

神奈川県衛生研究所研究報告

第 34 号（平成 16 年 9 月）

目 次

技術報告

水中のカビ臭物質（2-メチルイソボルネオールおよびジェオスミン）分析法の検討
渡辺貞夫

短 報

ウイルス性食中毒の発生状況（平成 15 年度）
原みゆき，古屋由美子，片山 丘，高橋孝則，今井光信
りんご果汁中含窒素系殺菌剤の簡易分析法
岸美智子，佐藤久美子，藤巻照久
高速液体クロマトグラフ／タンデム質量分析装置を用いた穀類の
イミダゾリノン系除草剤の分析について
佐藤久美子，藤巻照久，岸美智子，渡辺征夫
化粧品中のクロルクレゾールの高速液体クロマトグラフィーによる分析
松阪綾子，佐々木加代，佐藤信夫，土井佳代
水中の残留塩素測定の見直し
— Diethyl-*p*-phenylenediamine（DPD）法と *o*-tolidine（OT）法の比較—
清水壽美子，上村 仁，伊藤伸一
不快害虫用殺虫剤に含まれる農薬及び有害物質等の分析
長谷川一夫，辻 清美，石坂富美，伏脇裕一
ノロウイルスによる感染性胃腸炎の実態把握と予防への取り組み
原田美樹，伊東久美子，折原直美

資 料

肺炎マイコプラズマの凍結保存温度と凍結保存株の薬剤感受性試験への利用
岡崎則男，大屋日登美，渡辺祐子，佐々木次雄
Surface Plasmon Resonance センサーを利用したレジオネラ属菌の迅速検出法
渡辺祐子，板垣康治，大屋日登美，岡崎則男
小学校等で飼育されている鳥類の *Chlamydophila psittaci* 保有状況
寺西 大，古川一郎，長谷川幸江，尾上洋一，高野博道
木村真紀子，小野内章，澁谷世司，大阪周蔵
神奈川県における恙虫病の発生状況（平成 14 年度，15 年度）
古屋由美子，片山 丘，原みゆき，高橋孝則，今井光信
食品中の鉱物性異物及び金属片異物の検出事例
藤巻照久，佐藤久美子，萬年一剛，岸美智子
異臭等を原因とする食品の苦情事例—鉱物油臭—
甲斐茂美，渡辺裕子，渡辺貞夫，佐藤久美子，藤巻照久
岸美智子
食品汚染物残留調査結果（平成 15 年度）
佐藤久美子，渡辺裕子，甲斐茂美，藤巻照久，岸美智子
魚介類加工品によるアレルギー様食中毒および苦情事例について

渡邊裕子, 甲斐茂美, 岸美智子
遺伝子組換え食品の分析結果 (平成 15 年度)
大森清美, 土屋久世, パナッダー・ヴィルンブンヤパット,
岸 弘子, 山田利治, 平山クニ, 佐藤修二
食肉製品における発色剤添加方法の検討
関戸晴子, 中村廣志, 丹羽加世子, 折原直美

他誌掲載論文抄録 (平成 15 年 4 月～平成 16 年 3 月)

研究報告編集委員会 (平成 16 年度)

委 員 長
今 井 光 信 (所 長)

委 員
増 田 瑠 司 (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)
土 井 佳 代 (理化学部)
桑 原 千雅子 (理化学部)
日 比 和 美 (地域調査部)

県の花：山ゆり

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 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
mail eiken.1540.kikakujoyouhou@pref.kanagawa.jp

技術報告

水中のカビ臭物質（2-メチルイソボルネオール およびジェオスミン）分析法の検討

渡 辺 貞 夫

Studies on the Method for Determination of Musty Odor Substances (2-Methylisoborneol and Geosmin) in Water

Sadao WATANABE

Synopsis

The analytical method of 2-MIB and geosmin causing a musty odor in water was examined in detail by a solid-phase extraction-GC/MS. It was possible to measure up to one tenth of the water quality criteria by the tC18 cartridge column and it satisfied the coefficient of variation within 20%, too. The possibility of satisfying this requirement was suggested as for the cartridge column of C18 or PS-2. However, in the case of an actual sample, the measurements of the minimum limit up to one tenth of the criteria value were did not satisfied the requirment because of a pseudopositivity of the background origin in the sample under the present situation.

Key Words : analytical method, musty odor substance, 2-methylisoborneol(2-MIB), geosmin, solid-phase extraction, GC/MS

緒 言

平成15年5月30日の告示¹⁾により水質基準が改訂され、従来の46項目の中で9項目が削除され、新たに13項目が追加され50項目となった。今回の改訂で水のカビ臭原因物質の2-メチルイソボルネオール（2-MIB）及びジェオスミンが新たに水質基準項目に取り入れられた。

今回の水質基準値は2-MIB及びジェオスミンいずれも0.00001mg/L（10ng/L）以下と規定されたが、平成19年3月31日までは暫定的な基準値0.00002mg/L以下が適用される。測定精度に関しては、基準値の十分の一までを測定し、その値付近での変動係数が20%以下という指標が示されている²⁾。

告示で指定された測定法は、ページ・トラップ- ガスクロマトグラフ/ 質量分析法（以下 PT-GC/MS 法と略す）、ヘッドスペース- ガスクロマトグラフ/ 質量分析法（HS-GC/MS 法）及び固相抽出- ガスクロマトグラ

フ/ 質量分析法（固相抽出-GC/MS 法）の3方法である³⁾。前記2方法は、GC/MSの他にヘッドスペース装置またはページトラップ装置が必要であるが、固相抽出-GC/MS 法は特別な装置が不要で標準仕様の GC/MSで対応可能であるので、この方法を用いたときの検査上の問題点について検討した。

実験方法

1. 試薬

2-MIB 及びジェオスミン：和光純薬工業（株）社製水質試験用で、各100mg/L濃度の混合メタノール溶液を標準原液とした。これをメタノールで逐次希釈して0.01mg/L～0.1mg/Lの標準溶液を調製した。

精製水：逆浸透およびイオン交換による処理により得られた水を用いた。

Sep-Pak Plus C18, Sep-Pak Plus tC18及び Sep-Pak Plus PS-2カートリッジカラム：Waters 社製のカラムをジクロロメタン5mL, メタノール5mL 及び精製水5mLで順次洗浄及び活性化後、すみやかに使用した。

その他試薬：残留農薬試験用あるいは試薬特級を用いた。

2. 装置および測定条件

2・1 装置

ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS)：以下の2社の製品を用い、主として HP 社の製品で測定し、感度比較として日本電子 (株) 製と対比した。

A HP社製 6890/5973型

B 日本電子 (株) 製 オートマス System II 150

加圧型固相抽出用定流量ポンプ：Waters 社製 Sep-Pak コンセントレーターを用いた。

2・2 測定条件

GC/MSの測定条件は表1に示した。

表1 2-MIB 及びジェオスミン測定の GC-MS条件

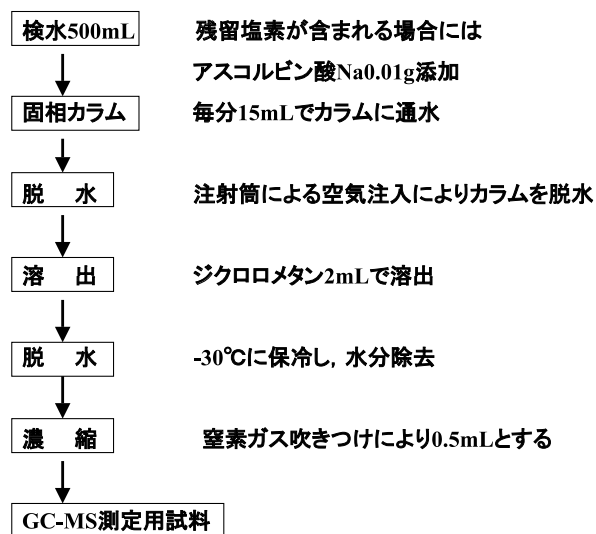
カラム：DB-5MS (長さ30m, 内径0.25mm, 膜厚0.25 μ m)
カラム温度：40 $^{\circ}$ C (1min)—10 $^{\circ}$ C/min—180 $^{\circ}$ C (0min)—20 $^{\circ}$ C/min—280 $^{\circ}$ C (4min)
注入口温度：200 $^{\circ}$ C
ガス流量：1.3mL/min
注入量：2 μ L (スプリット)
イオン化電圧：70eV
測定m/z：95, 107, 135 (試料注入後 5～11.5分の間)
112, 111, 125 (11.5～18分)

3. 試験溶液の調製

精製水及び水道水への2-MIB及びジェオスミン添加回収実験

精製水500mL に2-MIB及びジェオスミン0.01～0.1mg/Lの混合標準メタノール溶液を50 μ L添加し、0.000001mg/L～0.00001mg/Lの濃度の水溶液を調製した。水道水については、所内の水道蛇口を約2分間放水後、採水した水500mLに残留塩素を除去するためにアスコルビン酸ナトリウム0.01g 加え、かくはんして溶解後、約10分間放置した。その後、精製水と同様に2-MIB及びジェオスミンを添加した。調製した水溶液は、定流量ポンプにより毎分15mLで固相カラムに通水後、カラムは注射筒を使い水分が出なくなるまで3～5回強く空気を吹き出した後、ジクロロメタン2mLで溶出した。溶出したジクロロメタンにはまだ水分が含まれているため、密栓をして-30 $^{\circ}$ Cのフリーザーで2～3時間放置することにより水分を凍結し、凍結しないジクロロメタン相を分取した後、窒素気流下で0.5mLに濃縮した。なお、スキーム1にその概要を示した。得られた GC/MS 用試験液はジクロロメタン溶液であるので、2-MIB 及びジェオスミンの混合メタノール標準原液をジクロロメタンで希釈した標準系列

を調製した。標準系列の GC/MS 測定による絶対検量線法により2-MIB 及びジェオスミンの溶出濃度を求めた。



スキーム1 水中の2-MIB 及びジェオスミン固相抽出法

結果及び考察

1. GC/MS による2-MIB 及びジェオスミン標準溶液の測定

2-MIB 及びジェオスミンのマススペクトルを図1に示した。告示法では2-MIBは m/z 95, 107及び135のフラグメントイオン、ジェオスミンは m/z 112, 111及び125のフラグメントイオンのピーク高さ又はピーク面積により定量する方法が示されている。2-MIB 及びジェオスミンが水質基準値の0.00001mg/L である場合、500mL の水溶液から固相カラム濃縮及びジクロロメタン溶出操作で100%抽出できたとすると、0.5mL の GC/MS試験溶液中の濃度は0.01mg/L となる。この濃度では2-MIBの m/z 95, 107及び135, ジェオスミンの m/z 112, 111及び125のフラグメントイオンのピーク高さは十分に有り、いずれのフラグメントイオンでも定量に使うことが可能であった(図2)。しかし、その十分の一の濃度となると最もピーク高さのある2-MIBのフラグメントイオンの m/z 95, ジェオスミンの m/z 112での定量は可能であったが、他のフラグメントイオン強度は弱く定性には使えるが定量には不十分であった。そこで、2-MIBは m/z 95, ジェオスミンは m/z 112のピーク面積による定量を行い、他のフラグメントイオンは定性に使うこととした。

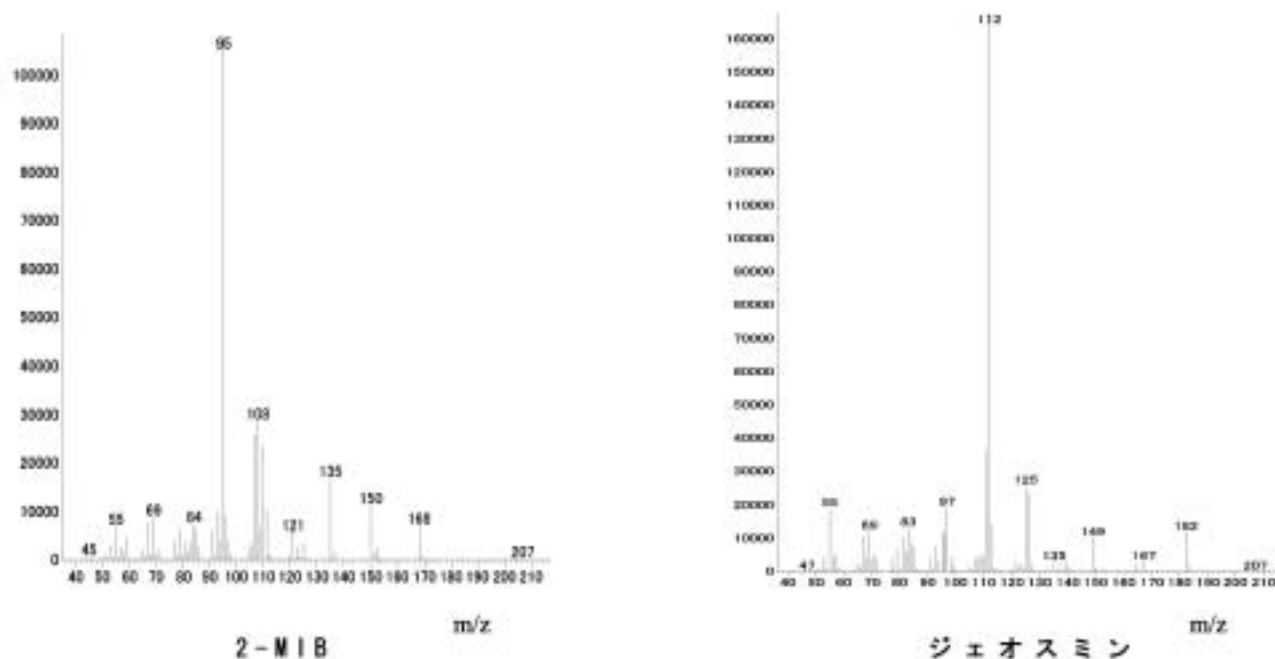


図1 2-MIB 及びジェオスミンのマススペクトル

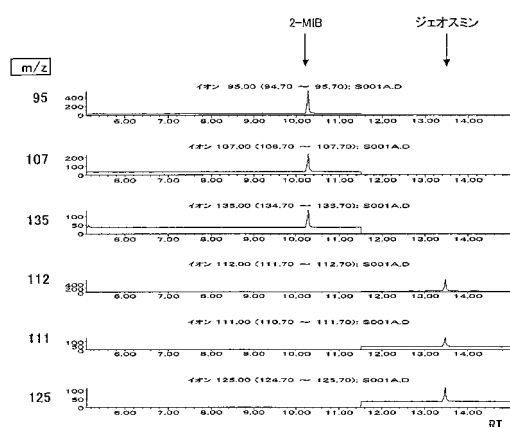


図2 2-MIB及びジェオスミン0.01mg/L 濃度のマスクロマトグラム

2. 固相カラムの検討

告示法で指定された固相カラムは、オクタデシル基を化学結合したシリカゲルを詰めたもの又はこれと同等以上の性能を有するものとの記載がある。今回、オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラムの C18 及び tC18, また水中の農薬の検査に汎用されるスチレンジビニルベンゼン重合体の PS-2カラムにより比較検討した結果を表2に示した。表には精製水あるいは水道水について空試験を行い、そのピーク面積を差し引いて得られた面積で定量値を求めた。

いずれのカラムも標準品を精製水に加えたものでは、基準値の十分の一である0.000001mg/L まで定量可能であり、2-MIB あるいはジェオスミンいずれもマスクロマトグラム上にそれぞれ3つのフラグメントイオンのピー

表2 固相カラムによる水溶液からの2-MIB 及びジェオスミンの回収

カラム	添加濃度 (mg/L)	2-MIB				ジェオスミン			
		精製水		水道水		精製水		水道水	
		回収率(%)**	CV(%)	回収率(%)**	CV(%)	回収率(%)**	CV(%)	回収率(%)**	CV(%)
C18	0.00001	97.2		106.0		83.4		117.1	
	0.000005	86.1		92.4		90.8		111.2	
	0.000002	76.0		65.2		75.4		68.3	
	0.000001	86.3		41.2		76.6		36.0	
tC18*	0.00001	89.0±11.3	12.7	107.3±15.7	14.6	86.7±15.2	17.5	111±8.5	7.7
	0.000005	85.7±7.5	8.8	105.7±13.6	12.8	87.3±4.5	5.2	105.7±14.0	13.3
	0.000002	84.3±13.1	15.5	77.0±8.5	11.1	105.7±17.6	16.7	79.3±14.7	18.6
	0.000001	96.7±12.3	12.8	42.3±26.6	62.8	90.7±4.0	4.5	68.7±45.0	65.5
PS-2	0.00001	96.0		83.1		121.5		95.1	
	0.000005	77.4		86.0		70.2		126.0	
	0.000002	100.7		62.1		88.0		64.3	
	0.000001	110.0		34.1		117.2		44.7	

*tC18カラムのみ3回繰り返し、回収率の欄は平均±S.D.を示した。他は1回の回収率である。

**回収率(%)はジクロロメタン標準液に対しての値で、かつ空試験値を差し引いた値である。

クがすべて認められた。実試料の定量は、標準品の単純な希釈系列による絶対検量線法によるものではなく、精製水500mLに標準品を添加し、検体と同じ操作を行ったもので定量用検量線を作成することになっている。そこで、tC18カラムの平均回収率を例にとり添加濃度に対して回収濃度を求めた結果を図3に示した。原点を通る一次回帰直線とはいかないまでも、検量線としては十分であり、この結果から基準値の十分の一の濃度まで検量線が得られた。他のカラムによる添加回収実験結果からも、回収率はいずれの濃度も70%以上あり、検査に使用できるものと思われた。今回、その中で tC18 のカラムは3回の繰り返し実験を行い、変動係数 (CV) を求めたところいずれも20%以内で、指定された条件を満たしていた。

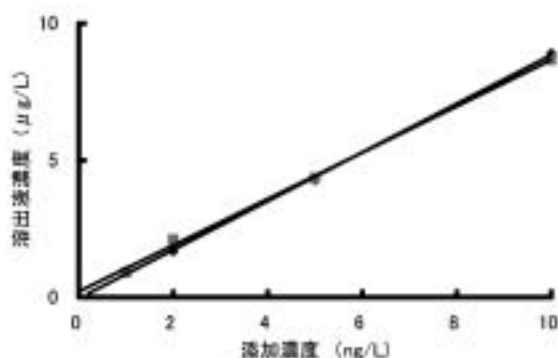


図3 絶対検量線により求めた固相カラム tC18—ジクロロメタン溶出による2-MIB およびジェオスミン濃度

◆：2-MIB，■：ジェオスミン

添加濃度：添加した2-MIB及びジェオスミンの水溶液 500mL 中の濃度

溶出液濃度：溶出液0.5mL 中の濃度

3. 水道水からの回収

水道水の場合には、検体由来の微量な有機物が定量に影響した。図4に tC18カラムにより得られた空試験によるイオンクロマトグラムを示したが、2-MIBにみられるように m/z 95では2-MIBの溶出相当位置にピークがあり、数値として定量された。しかし、定性に使う m/z の107及び135では溶出位置からわずかにずれた位置にはピークがあるが、溶出位置にはピークが認められないことから擬陽性であると判断された。ジェオスミンの場合も同様であった。表2にはこれらの空試験値を差し引いた結果を示した。

カビ臭に関しての臭気苦情が寄せられる最低濃度は2-MIBが20ng/L 程度以上、ジェオスミンが30～40ng/L 程

度以上との報告がある⁴⁾。このような背景から、今回の水質基準値は両者いずれも10ng/L 以下と極めて低い濃度に設定された。固相カラム-GC/MS 法は、検体由来のバックグラウンドの影響が特に低濃度で大きく影響し、0.000001mg/L (1ng/L) の濃度では tC18 のカラムで CV 値が20を大きく超えた。他のカラムでも空試験値を引くと回収率が低くなり、信頼できる定量値は得られにくくなると考えられた。

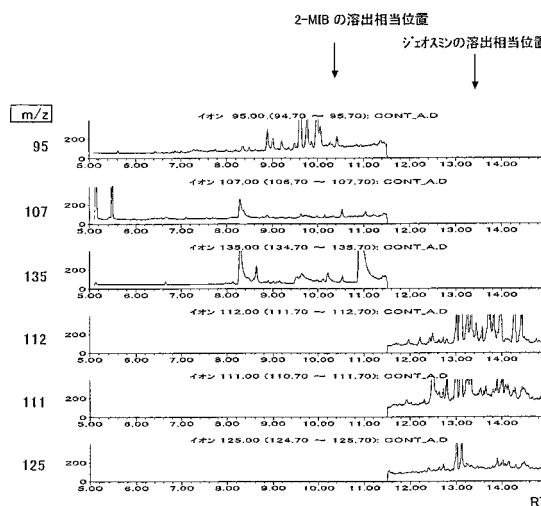


図4 水道水由来によるバックグラウンドのマスキングマトグラム

4. GC-MS の機種による比較

固相カラムによる測定では、検水に含まれる有機物の影響を受け、十分な定量下限が得られない場合があった。この原因が本実験で使用した HP 社製の GC/MS の性能によるものかを判断するため、一般的により高感度といわれている日本電子製の GC/MS との比較を行った。0.001mg/L ～ 0.01mg/L のジクロロメタン標準溶液について GC/MS 条件を同一にして行った結果を表3示した。この結果、本実験結果からは HP 社製あるいは日本電子製で測定された2-MIBの m/z 95及びジェオスミンの m/z 112のマスキングマトグラム上のピークの S/N 比から、いずれの濃度でも大きな有意差はなかった。また、一般的な定量限界である S/N 比の値が10を適用すると、基準値の十分の一の濃度では標準品でも S/N 比が10程度であるため、検体由来のバックグラウンドが高い試料では定量下限を0.000001mg/L にすることは本法では困難であり、信頼できる定量下限値は0.000002mg/L あるいはそれ以上になると考えられた。

表3 2-MIB 及びジェオスミン標準溶液のクロマトグラム上での S/N 比の比較

	HP5973			日本電子オートマス150 System II		
	0.01	0.005	0.001	0.01	0.005	0.001 (mg/L)
2-MIB	230	140	16	150	95	10
ジェオスミン	230	141	13	180	80	18

2-MIBはm/z 95,ジェオスミンは112で比較

告示に示された各方法の定量下限は，PT-GC/MS 法で0.000001mg/L，HS-GC/MS 法及び固相抽出-GC/MS 法で0.000002mg/L との報告がある⁵⁾．今回の結果などから，暫定基準の適用される平成19年3月31日までは固相抽出-GC/MS でも基準値の十分の一の測定は可能と考えられるが，本来の基準の適用されるそれ以降では基準値の十分の一については信頼性のある測定精度の確保はむずかしいと考えられた．

まとめ

固相抽出-GC/MS 法によるカビ臭原因物質2-MIB及び

ジェオスミンの測定法について詳細に検討した．固相カラムは tC18カラムで水質基準の十分の一まで測れる検量線が得られ，かつ変動係数も20%以内で条件を満たしていた．C18あるいは PS-2のカラムでもこの条件を満たす可能性が示唆された．ただし，実際のサンプルでは検体由来の微量な有機物の影響のためカイオンクロマトグラム上の夾雑ピークがあり，水質基準値の十分の一までの測定は現状では変動係数などの必要条件を満たせなかった．

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 厚生労働省令第101号 (2003)，平成15年5月30日
- 2) 健水発第1010001号 (2003)，平成15年10月10日
- 3) 厚生労働省告示第261号 (2003)，平成15年7月22日
- 4) 上水試験方法解説2001年版，pp.734，日本水道協会，東京 (2001)
- 5) 上水試験方法2001年版，pp.485-496，日本水道協会，東京 (2001)

短報

ウイルス性食中毒の発生状況 (平成15年度)

原みゆき*, 古屋由美子, 片山 丘
高橋孝則, 今井光信

Occurrence of Epidemic Gastroenteritis Caused by Viral Agents in Kanagawa Prefecture (2003)

Miyuki HARA, Yumiko FURUYA,
Takashi KATAYAMA, Takanori TAKAHASHI
and Mitsunobu IMAI

はじめに

ウイルス性食中毒は毎年10月頃から始まり翌年の5月頃まで発生している。従来、食中毒の原因物質として届けられていた小型球形ウイルス(SRSV)は、ほとんどが遺伝子増幅反応(PCR)によって検出されるノロウイルスであることから、平成15年8月29日に食品衛生法の一部改正にともない、病因物質がSRSVからノロウイルスに改められた。昨年度の原因別食中毒発生状況ではノロウイルスによるものが最も多く、感染の経路はノロ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の摂取することや調理従事者が調理中に食品をウイルスで汚染することによる場合が考えられている。

しかし最近、老人保健施設や保育園のような集団生活の場所での発生が増加しており、しかも患者発生の規模が大きい事例もあることから拡大を防ぐためにも原因調査などの早期の対応が重要となっている。

そこで平成15年4月から平成16年3月にかけて、県域で発生したウイルス性食中毒が疑われた事例について、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15年4月から平成16年3月に神奈川県域で発生した、ウイルス性食中毒が疑われた25事例より得られた便と吐

物308検体、事例関連の食品7検体を用いた。

2. ノロウイルスの遺伝子検出法

便および吐物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°C1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, IIのそれぞれについてウイルス遺伝子の定量を行った。さらにリアルタイムPCRでノロウイルス遺伝子が検出された代表的な検体についてPCR産物を用いてダイターミネーター法でダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

食品(加熱調理済み)は約1gを取り、滅菌PBS(-)を9ml加えて混合し、攪拌後3,000rpm 20分間遠心後上清を30%ショ糖溶液に重層し、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%ショ糖溶液に重層して40,000rpm 2時間遠心した。沈査を滅菌PBS(-)で再浮遊し、2%リタング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。

結果および考察

平成15年度に発生した25事例のうち14事例(56%)の84検体から遺伝子検出法でノロウイルスが検出され、そのうち1事例の3検体からは電子顕微鏡でもウイルス粒子が確認された(表1)。この検出されたノロウイルスのgenogroupはGIが1事例(7.1%),GIIが11事例(78.6%)で大部分を占めており、GIとGIIの両方が検出された事例は2事例(14.3%)であった。事例2はGIとGI・GII重複とGIIであり、事例14はGIとGI・GII重複であった。GIとGIIの両方が検出された事例は、2事例とも生カキを摂取していた。摂取したカキが複数のノロウイルスに汚染されており、そのために異なるgenogroupが同一事例から検出されたことが推察された。しかしこれらの事例で原因食品の生カキは残っておらず、

神奈川県衛生研究所 微生物部

〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋1-3-1

* 現 地域調査部

表1 平成15年度ウイルス性食中毒発生事例

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	genogroup	電顕 陽性数
1	H15.5	茅ヶ崎	飲食店	不明	患者便 従事者便	2 1	2 0	GI	0 0
2	H15.12	小田原	飲食店	生力キ	患者便 従事者便	19 7	14 0	GI,GI&II,GII	3 0
3	H15.12	藤沢	弁当屋	不明	患者便	5	1	G II	0
4	H15.12	平塚	養護施設	不明	患者便、吐物 従事者便	5 10	3 1	G II G II	0 0
5	H15.12	藤沢	飲食店	不明	患者便 従事者便	4 2	3 1	G II G II	0 0
6	H15.12	厚木	弁当屋	仕出し弁当	患者便 従事者便	7 23	1 0	G II	0 0
7	H15.12	小田原	飲食店	不明	患者吐物 従事者便	1 0	1 0	G II	0 0
8	H15.12	鎌倉	養護施設	不明	患者便 従事者便 食品	2 7 2	1 0 0	G II	0 0 0
9	H16.1	厚木	弁当屋	不明	患者便 従事者便	22 18	21 3	G II G II	0 0
10	H16.2	厚木	飲食店	不明	患者便 従事者便	10 12	4 0	G II	0 0
11	H16.2	平塚	老人保健施設	不明	患者便、吐物 従事者便	10 13	8 0	G II	0 0
12	H16.2	鎌倉	老人保健施設	不明	患者便、吐物 従事者便	4 15	4 6	G II G II	0 0
13	H16.3	鎌倉	老人保健施設	不明	患者便、吐物 従事者便	6 17	4 4	G II G II	0 0
14	H16.3	茅ヶ崎	飲食店	生力キ	患者便 従事者便	2 9	2 0	GI,GI&II	0 0

検査は不可能であった。原因食品の検査を行った事例8では原因として疑われた食品2検体に生鮮魚介類は含まれておらず、施設で提供された加熱した食事であり、ノロウイルスは検出されなかった。今後、生力キ等の生鮮魚介類の汚染状況把握のためにも食材を確保して、検査する必要があると思われる。

検出されたウイルスの遺伝子の塩基配列をしらべたところ、事例2のG Iはチバ株、事例2から13のG IIはローズディール株であった。チバ株は以前に県域で発生した生力キが原因のウイルス性食中毒からも検出されている株である。平成15年度全国で検出されたノロウイルスのgenogroupは平成14年度に引き続きG IIが多く、検出されたノロウイルスのgenogroupの傾向は同様であった²⁾。

生鮮魚介類を摂食せず、原因食品が不明であった事例4について、患者と従事者の塩基配列をしらべたところ、両者ともローズディール株であった(表2)。患者とともに調理従事者から同一のウイルス株が検出されたことから、調理従事者が食品を汚染したことにより食中毒が発生した可能性もあり、調理従事者には手洗いの励行や調理用手袋の着用など食中毒発生予防のための注意を喚起する必要があると思われる。

表2 事例4におけるノロウイルス株

検体名	RT-PCR	genogroup	株名
患者便	陽性	G II	ローズディール
従事者便	陽性	G II	ローズディール

平成15年度には、老人保健施設などの施設内でのノロウイルスによる食中毒様の集団発生は5事例あり、そのうち3事例が老人保健施設、2事例が養護施設で発生していた。事例11、12の老人保健施設での集団発生は発生時間にばらつきがあったことや聞き取り調査の結果から、人から人への感染により広がったことが考えられ、感染性胃腸炎の集団発生事例であった。またこの2事例はいずれも患者に嘔吐症状が強く、得られた患者吐物からノロウイルスが検出された。この患者吐物中のウイルス量は患者便のものと同程度であり、検体1gあたり 10^5 コピー以上が含まれていた。ノロウイルスの場合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⁾。そのためこの吐物のなかのウイルス量はノロウイルスによる感染性胃腸炎を起こすには十分であることから、吐物による施設内の汚染がノロウイルスによる感染を拡大したと考えられた。聞き取り調査の結果、事例12

の老人保健施設では平成14年にもロタウイルス感染症の集団発生を起こしていた。この施設では身の回りの介護を行う人が食事の給仕も行っており、日常的に便等の汚物が施設内を汚染している可能性があることがわかった。このように施設内でひとたび感染性胃腸炎を起こすウイルスの感染症が起こると患者の便や吐物から容易に室内環境を汚染し、その結果多くの患者が発生する。そのため拡大防止の迅速な対応や指導が必要である。調理従事者からの食品の二次汚染ばかりでなく、介護を担当する職員によるウイルス汚染の拡大を防止するための衛生教育を調理従事者とともに介護職員にも実施する必要性があると思われる。さらに施設内で集団発生が疑われた場合は、調理従事者や職員を含めた施設全体の発症者を把握し原因ウイルスの検出を速やかに行うことで、感染源および感染経路の推測ができ、集団発生を早期に終息に

導く事が可能になると考えられた。

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16年7月28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・2004年3月24日現在, 病原微生物検出情報, 25, 110-113 (2004)
- 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)

短報

りんご果汁中含窒素系殺菌剤の 簡易分析法

岸 美智子, 佐藤久美子, 藤巻照久

Simplified Analytical Methods of Residual Fungicides in Apple Juice

Michiko KISHI, Kumiko SATO
and Teruhisa FUJIMAKI

はじめに

近年各種のカビ毒に対する衛生上の注意が向けられている。平成15年11月には、りんごジュースおよび原料用りんご果汁等の清涼飲料水の成分規格として、カビ毒のバツリン含有量を0.50ppm未満とする基準が設定された。バツリンは、ペニシリウム属やアスペルギルス属等の真菌により生産され、バツリンの汚染率が高い農産物としてりんごが知られている。一方、我々は平成14年度に離乳食用の粉末果汁飲料の残留農薬調査を実施したところ、購入したりんご果汁1検体から殺菌剤ジフェノコナゾールを粉末中0.52ppmの濃度で検出した。検出した量は、製品の表示どおりに果汁を調製し飲用した時に体重5kgの幼児が毎日100mL飲用した場合であっても、1日許容摂取量(0.0096mg/体重kg/日)の約10%にあたる量であり、直ちに健康被害の発生を心配させるものではなかった。ジフェノコナゾールは浸透性殺菌剤で落葉果樹の黒星病や赤星病に効果があり、予防効果と治療効果の両方を有するとして使用されている。国および地方衛生研究所で検査された残留農薬調査結果報告¹⁾によると、ジフェノコナゾールは輸入農産物において検出率の高い農薬100種のうちにリストアップされている。平成12年度全国調査の輸入農産物の検査では、検査した147検体のうち2検体から検出(1.36%)されている。しかし、国産農産物および加工食品からの検出報告例はない。神奈川県では平成10年度以降、国産のもも、なし、りんご、ブドウ、トマトおよび輸入のバナナについて毎年ジフェノコナゾールの残留調査を行っているが、検出例は我々が14年度に検出したりんご加工食品における1例のみであり^{2)~5)}、ジフェノコナゾールの検出は稀な検出例に思われた。り

んご果汁にバツリンの含有上限値が設定されたことによりバツリンの生成防除に注意が偏り、今後殺菌剤の使用が増加することが懸念されるため、殺菌剤の残留を調査する簡便な方法を検討した。

現在りんごに使用される殺菌剤は約30種(残留基準設定20種)があるが、今回はこのうちジフェノコナゾールなどの含窒素系農薬9種について、逆相ミニカートリッジカラムを用いた固相抽出法と検出に熱アルカリ型検出器を備えたガスクロマトグラフィ(GC-FTD)を組み合わせた簡易な一斉分析法を適用する場合の条件検討を行い、あわせて市場調査を行った。

方 法

1. 試料

市販のりんご果汁を用いて、分析条件の検討を行った。市場調査は平成16年4月に購入した離乳食用のりんご製品(粉末、顆粒状およびペースト状)6検体、および紙パック入りりんご果汁類(6検体)について行った。

2. 試薬および試験溶液

農薬標準品：ジフェノコナゾール、テブコナゾール、シプロコナゾールは和光純薬工業(株)製、トリアジメノール、トリフルミゾール、ヘキサコナゾールは林純薬工業(株)製、フルシラゾール、プロピコナゾール、ペンコナゾールはRiedel deHaan社製の、いずれも農薬標準品を用いた。各農薬は10mgをアセトン溶液に溶解し100mLとした溶液を標準原液とし、必要に応じて混合および希釈して用いた(標準混合溶液)。

使用溶媒：アセトン、n-ヘキサン、メタノールは和光純薬工業(株)製残留農薬分析用を、酢酸エチルは和光純薬工業(株)製特級を用いた。

添加回収試験は、標準原液から調製した9種混合標準溶液(アセトン溶液)をフラスコに採り、40℃以下で減圧濃縮および窒素気流の吹きつけを行いアセトンを除去した後、水又は市販のりんごジュースを加え標準品を溶かし一定量とした試料(添加回収用標準水溶液および添加回収用りんご果汁)について行った。

3. 装置

ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製、GC-17A、熱アルカリ型検出器(GC-FTD)

4. 分析操作

1) 逆相ミニカートリッジカラムによる抽出法の検討
メタノール5mLで洗浄後、水でコンディショニングしたODS処理シリカゲルカートリッジカラム(Waters社製、Sep-Pak Vac 6cc, C₁₈) (以下ODSミニカラム)を用いた固相抽出を検討した。添加回収用標準水溶液及び添加回収用りんご果汁5mLを負荷し、水30m

Lで洗浄した後、各溶媒10mLで溶出し窒素気流下40℃以下で濃縮し、1mLのアセトン溶液とし、GC-FTDで測定を行った。溶出溶媒として酢酸エチル、アセトン、メタノールおよびアセトニトリルを検討した。

2) フロリジルミニカートリッジカラムによる精製条件の検討

標準混合溶液（アセトン溶液）の溶媒を留去した後、アセトン・ヘキサン（2：18）混合液2mLに溶解し、ヘキサンでコンディショニングしたフロリジルミニカートリッジカラム（Waters社製、Sep-Pak Cartridges Plus Florijil）（以下フロリジルミニカラム）に負荷し、ヘキサン5mLおよびアセトン・ヘキサン（2：18）混合液10mLを流し負荷流出液とあわせた画分（F1）、ついでアセトン・ヘキサン（4：16）混合液、アセトン・ヘキサン（1：1）混合液及びアセトンで溶出を行い、溶出液を分取しそれぞれ40℃以下窒素気流下に濃縮乾固し、それぞれの画分をF2、F3、F4とする。各画分はアセトンに溶解し試験溶液としてGC-FTDで測定した。

3) 定性・定量

市場調査において試験溶液からピークが検出された場合、保持時間により定性を行い、ピーク面積から定量した。検出が疑われた場合には、試験溶液を濃縮し、質量分析器付ガスクロマトグラフィにより測定を行い、得られたマススペクトルを標準溶液のマススペクトルと比較して確認を行った。

<GC-FTD 測定条件>

カラム：J & W Scientific 社製, DB-5 (0.25mm I.d. × 30m, 膜厚0.25μm)

カラム温度：50℃（2分間保持） - 昇温（15℃/分）
- 180℃（2分間保持） - 昇温（4℃/分）
- 280℃（20分間保持）

注入口および検出部温度：250℃および280℃

注入量：2μL

キャリアーガス：ヘリウム 流速2.4 mL / 分

結 果

1. ODSミニカラムからの溶出溶媒の検討結果

添加回収用標準水溶液および添加回収用りんご果汁について、含窒素系殺菌剤9種のODSミニカラムへの吸着と、溶出溶媒について検討した。添加回収用りんご果汁中の含窒素系殺菌剤9種約1μgおよび2μgは、ODSミニカラムに全量吸着し、酢酸エチル、アセトンおよびメタノールのいずれによっても、10mLの溶出で9種すべての殺菌剤が90%以上の良好な溶出結果を示した。またいずれの溶媒による溶出溶液においてもガスクロマトグラフ上、果汁成分による妨害は無く、9種の成分すべて検出可能

であった（図1）。溶出溶液からの水分除去が容易なアセトンで溶出操作を行い試験溶液Iを作成した。

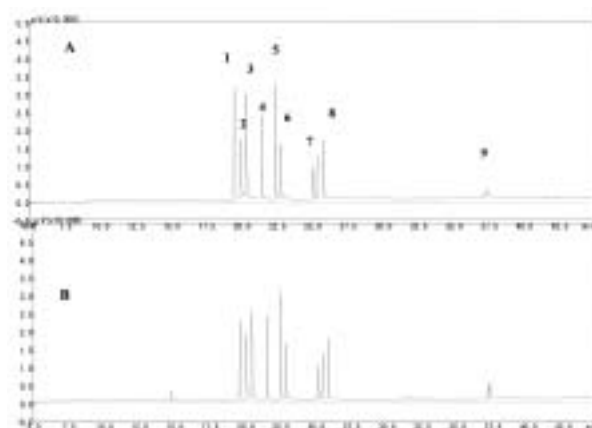


図1 含窒素系殺菌剤のガスクロマトグラフ（GC-FTD）

A：標準溶液 B：添加回収用果汁からの抽出溶液（ODSカートリッジカラムのみ）

1. ペンコナゾール 2. トリアジメノール 3. トリフルリミゾール 4. ヘキサコナゾール 5. フラシラゾール 6. シプロコナゾール 7. プロピコナゾール 8. テブコナゾール 9. ジフェノコナゾール

2. フロリジルミニカラムによる精製の条件検討結果

標準混合溶液の溶媒を除き、9種殺菌剤を各1μg又は2μg含む残留物をアセトン・ヘキサン混合溶液（2：18）2mLに溶解しフロリジルミニカラムに流し込み、ついでヘキサン5mLを流す。アセトン・ヘキサンの混合比率を変えた混合溶液およびアセトンを順次各10mLを流し、溶出画分を測定した。アセトン・ヘキサン混合溶液（2：18）ではいずれの殺菌剤も溶出せず、アセトン・ヘキサン混合溶液（4：16）およびアセトン・ヘキサン混合溶液（1：1）各10mLでほぼ全量が溶出を完了していると思われる結果であった。いずれの殺菌剤もアセトン・ヘキサン混合溶液（4：16）による溶出画分（F2）、アセトン・ヘキサン混合溶液（1：1）による溶出画分（F3）を合わせると、1μgの負荷で75%以上の回収が可能であった（表1）。また2μgの負荷ではいずれも約100%の回収が得られた。ジフェノコナゾールでは他の8種の殺菌剤の溶出状態に比較して、アセトン濃度20%では溶出がされにくいと思われる結果であった。また、添加回収用りんご果汁から得られたODSミニカラムによる抽出液（試験溶液I）について同様に操作したところ、標準混合溶液の場合に比較していずれの殺菌剤もそれぞれ約70%の回収があった。添加回収用りんご果汁からの精製操作では、試験溶液Iを溶解してフロリジルミニカラムに

負荷した流出液，アセトン・ヘキサン混合溶液（4：16）10mL，アセトン・ヘキサン混合溶液（1：1）20mL を流して流出した液をすべてあわせて捕集し試験溶液Ⅱとしたところ，ヘキサコナゾール以外は標準混合溶液の場合の約80%まで回収率を上げることができた。ヘキサコナゾールはアセトン・ヘキサン混合溶液（2：18）への溶解性が低いことが懸念されたため，フロリジルミニカラム負荷後の試験管内をアセトン少量で洗い，溶出液にあわせたところ改善が見られた。

表1 フロリジルミニカラムからのアセトン/ヘキサン混合液による溶出

殺菌剤名	負荷量 (μg)	負荷量に対する回収比率(%), n=3				
		F1	F2	F3	F4	F2+F3
ベンコナゾール	1.03	—	73.8	2.9	—	76.7
トリアジメノール	1.04	—	67.3	22.0	—	89.3
トリフルミゾール	0.91	—	94.0	3.3	—	97.3
ヘキサコナゾール	0.89	—	72.5	9.0	—	81.5
フルシラゾール	1.02	—	63.7	22.5	—	86.3
シプロコナゾール	1.02	—	55.4	20.1	—	75.5
プロビコナゾール	0.86	—	88.4	24.1	—	112.5
テブコナゾール	0.81	—	78.4	15.4	—	93.8
ジフェノコナゾール	0.8	—	46.3	65.3	—	115.8

F1: アセトン/ヘキサン混合溶液(2:18)

F2: アセトン/ヘキサン混合溶液(4:16)

F3: アセトン/ヘキサン混合溶液(1:1)

F4: アセトン

—: ピーク不検出

3. 市場調査実験

スキーム（図3）に示した分析法により2μgを添加して添加回収試験を行い，約70%の回収率が得られた。

本法により市販のりんご果汁について調査を行ったところ，平成16年4月購入の離乳食用果汁6検体および紙パック入り果汁6検体からは，9殺菌剤に該当するピークは検

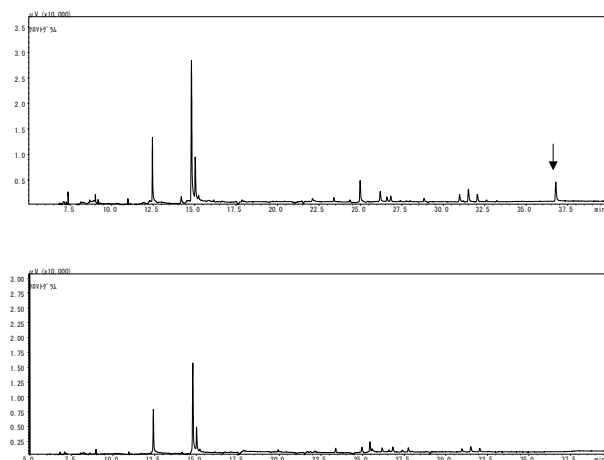


図2 調査検体のガスクロマトグラフ (GC-FTD)

上: ジフェノコナゾール検出検体 (平成14年) 購入

下: 同一成分の検体 (平成16年購入)

出されなかった。平成14年度調査時にジフェノコナゾールを検出した検体を今回の簡易分析法により検査したところ0.36ppmの結果が得られた。平成16年度購入の同一製造会社，同一成分の製品ではジフェノコナゾールは不検出であった（図2）。しかし同社製のペースト状製品で，定量限界以下の痕跡程度ではあるがジフェノコナゾールのピークが検出された。

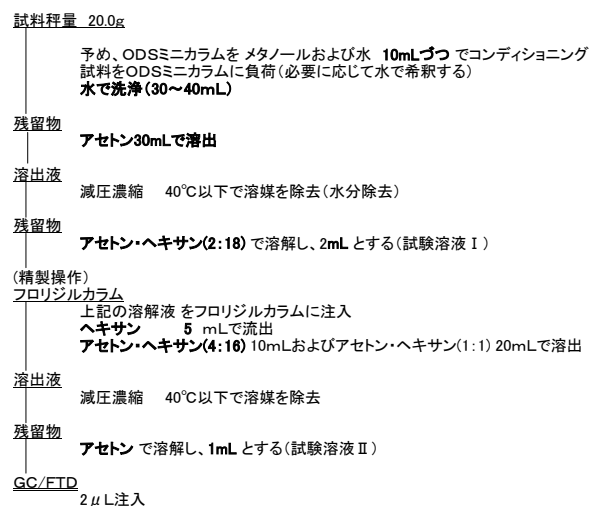


図3 含室素系殺菌剤の簡易分析法

考 察

公定法では，多種の果実および野菜を対象とするため，抽出および精製操作は多種多様な成分の除去に対応する事を考慮して作成してある。りんご果汁を対象とする場合は，主として極性の高い妨害成分の除去を行うことで，精製操作等は簡略化ができる。また今回対象とした室素系殺菌剤は検出器に GC-FTD を使用したため，検出成分が限定される。従ってりんご果汁のみを対象とした簡易試験に，本試験法を適用することで，溶媒使用量を減らし，操作時間の省略が可能であった。なお，市場調査を行った検体の一部に，添加回収試験における精製操作の際に，添加した標準殺菌剤が負荷溶液中に少量ながら流出する検体が認められた。分析法検討に際して用いたりんご果汁は濃縮還元100%を表示している果汁であったが，これらの検体は添加物を含有する旨の表示があった。りんご果汁中の極性の高い物質は ODS ミニカラム抽出により除かれることが明らかとなったが，少量存在する夾雑物の存在はフロリジルカラムでの精製の際に溶出条件に影響があるため，検体の配合成分には注意を要する。また GC-FTD 測定において，ジフェノコナゾールは他の農薬に比べ検出感度が低い結果であった。外海らが HPLC を用いて一斉分析を行った結果ではジフェノコナゾールが特に検出感度が低い傾向は認められ

ていない⁶⁾。我々も HPLC (UV 230nm) を用いたジフェノコナゾールの検出で、GC-FTD より低い濃度での検出が可能であることを確認した。本簡易分析法によりジフェノコナゾールのピークが検出された場合に、公定法による試験とともに HPLC による定量も有用であると思われる。

国産りんごの農薬残留実態調査結果報告（厚生労働省）⁷⁾で、これまで殺菌剤で基準値を超えて検出された例はなく、衛生上問題となる状態ではないといえる。しかし、果汁飲料や粉末飲料では、製造工程に濃縮又は乾燥があり、残留した農薬が濃縮される可能性があり、農産物以上に注意が必要と思われる。りんご果汁以外の果汁についても、スクリーニング法として適用範囲を広げることができるか、また近年国産りんごについて定量可能濃度で検出されているキャプタン、ビテルタノール、ビンクロリゾン、メプロニル等の殺菌剤についても固相抽出による簡易抽出法の条件検討を進めている。

ま と め

- 1) りんご果汁中の含窒素系殺菌剤の簡易残留調査には、ODSミニカラムを用いた固相抽出法が有用である。
- 2) 平成14年8月に購入したりんご果汁製品1検体からジフェノコナゾールを検出したが、平成16年4月に購入したりんご果汁製品12検体からは今回対象とした9種の殺菌剤は検出されなかった。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 厚生労働省医薬品局食品保健部基準課編：平成12年度食品中の残留農薬検査結果，食品衛生協会，(2002)
- 2-5) 神奈川県衛生部生活衛生課編：平成10年度～平成14年度の神奈川県食品衛生監視情報，(1998～2002)
- 6) 外海康秀，津村ゆかり，中村優美子，柴田 正：食品衛生学雑誌，39，13～25 (1998)

短報

高速液体クロマトグラフ／タンデム質量分析装置を用いた穀類のイミダゾリノン系除草剤の分析について

佐藤久美子¹, 藤巻照久¹,
岸 美智子¹, 渡辺征夫²

Analytical Method for Imidazolinone Herbicides in Cereals with Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry System

Kumiko SATO¹, Teruhisa FUJIMAKI¹,
Michiko KISHI¹ and Ikuo WATANABE²

はじめに

イミダゾリノン系除草剤はアメリカン・サイアナミッド社（現：ドイツ BASF 社）が開発した除草剤であり，イネ科雑草に対して幅広い除草活性を有する．

イミダゾリノン系除草剤の一つであるイマザモックスアンモニウム塩は豆類に対するイネ科雑草の除去に用いられ，平成13年2月26日に食品衛生法規格基準が設定され，基準値は大豆，小豆，えだまめに0.1ppm，とうもろこし，えんどう，そらまめ，らっかせいおよびその他の豆類に0.05ppm となっている¹⁾．イマザモックスアンモニウム塩以外のイミダゾリノン系除草剤については現在食品衛生法の規格基準は設定されていない．

除草剤耐性穀類では遺伝子組み換えによるグリホサート，グルホシネート耐性大豆が国内で既に承認されている．イミダゾリノン耐性作物は遺伝子組み換えによらない方法で育種開発されてきた作物²⁾である．現在国内では承認されていないが，今後海外で生産され，作物や加工品が輸入される可能性が考えられる．平成18年度にはポジティブリスト制が施行される予定であり，安全性を確保するためのイミダゾリノン系除草剤の残留分析法の検討は必要不可欠である．

イミダゾリノン系除草剤の一斉分析法については，水，

土壌について高速液体クロマトグラフ／タンデム質量分析装置（LC/MS/MS）を用いた報告例^{3,4)}があるが，穀類等の食品についての報告は誘導体化してガスクロマトグラフで測定する報告例⁵⁾が見られるものの少ない．

イマザモックスアンモニウム塩の告示分析法⁶⁾は，メタノール・塩酸混液による抽出・濃縮後，酢酸亜鉛処理を行い，4種類のミニカラムを用いて精製した後，アセトニトリル・ヘキサンによる脱脂操作を行って試験溶液とし，UV-HPLC にて測定する方法で，行程が長いにもかかわらず，タンパク・脂肪を含む穀類に対する精製効果は不十分であり検討を要する．

以上の背景から，イミダゾリノン系除草剤の穀類の精製法の簡易化と測定感度の向上を目的として，選択性が高く，高感度分析が可能と考えられる LC/MS/MS を用いた測定法を検討し，国内で入手可能なイミダゾリノン系5農薬（イマザピル，イマザモックス，イマゼタピル，イマザメタベンズメチル，イマザキン）（図1）について結果が得られたので報告する．

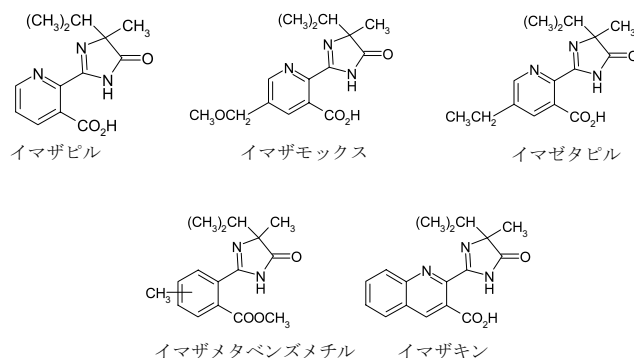


図1 イミダゾリノン5農薬の構造式

方 法

1. 試料

市販されている玄米，大豆，小豆，とうもろこし（ポップコーン用原料）を用いた．

2. 標準品および試薬

イマザピル，イマザモックス，イマザキン標準品は和光純薬工業社製残留農薬試験用を用いた．また，イマザメタベンズメチルは林純薬工業社製残留農薬試験用をイマゼタピルスペルコ社製の標準品を用いた

塩酸，酢酸亜鉛，酢酸ナトリウム，ギ酸，酢酸：和光純薬工業社製特級を用い，メタノール，n-ヘキサン：和光純薬工業社製残留農薬試験用を用いた．

精製用カートリッジカラムは Waters 社製 Oasis HLB (3cc 60mg)，Varian 社製 Bond Elut C₁₈ (1000mL) および Oasis MAX (3cc 60mg) を用いた．

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 国立保健医療科学院生活環境部

3. 装置

LC/MS/MS の LC 部は Agilent 1100 シリーズ, MS/MS 部は Micromass Quattro LC を用いた。移動相はメタノール・1%酢酸溶液 (3:2) を用い, 流速を毎分0.2mL とした。カラムは L-column ODS-L (化学物質評価研究機構) 2.1×150mm, 粒径5 μ m を用いた。カラムオープン温度は40℃とし, 注入量は2 μ L とした。MS/MS 条件は ESI ポジティブモードで行い, cone 電圧を SCAN・SIM モードでは50V, MRM モードでは30V とし collision 電圧は5農薬いずれも30eV とした。

HPLC 測定時, HPLC は Agilent 1100 シリーズを用い, カラム, カラムオープン, 移動相, 流速は LC/MS/MS と同様とした。検出器の測定波長は254nm とした。なお, 測定条件, 抽出条件時の検討では HPLC を用い, 添加回収試験では LC/MS/MS を用いた。

4. 検量線, 検出限界

HPLC 条件と LC/MS/MS の MRM モード条件下で 0.05~2ppm の混合溶液を2 μ L 注入し, 検量線の直線性を確認した。シグナルがノイズの3倍 (S/N=3) になる濃度を検出限界とした。

5. 抽出方法

```

試料10.0g
| ←メタノール・20mM塩酸 (3:2)
ホモジナイズ・遠心分離
|
上澄み液
| ←n-ヘキサン50mL
振とう
|
下層
|
減圧濃縮 (約10mLまで)
| ←酢酸亜鉛0.5g (にごりのひどい場合加える)
吸引ろ過
|
抽出液
Oasis HLB (予めメタノール, 水各1mLで洗浄)
| ←抽出液 (塩酸性状態) を負荷
| ←5%メタノール/水 1mLで洗浄
| ←メタノール1mLで溶出
溶出液
|
減圧濃縮 (溶媒除去)
| ←50mM酢酸ナトリウム (pH7) 2mLに溶解
溶液
Oasis MAX (予めメタノール, 水各1mLで洗浄)
| ←溶液負荷
| ←5%メタノール/50mM酢酸ナトリウム (pH7)
2mLで洗浄
| ←メタノール2mL (F1: イマザメタベンズメチ
ルが溶出)
| ←2%ギ酸/メタノール2mLで溶出
(F2: イマザメタベンズメチル以外が溶出)
F1とF2の溶媒除去
| ←F1とF2を合わせメタノールで正確に2mLとする
試験溶液
  
```

図2 イミダゾリノン5農薬の抽出法・精製法のスキーム

試料10.0g をメタノール・20mM塩酸 (3:2) 混液150mL にてホモジナイズ後, 遠心分離を行い, 上澄み液を得た。上澄み液に n-ヘキサン50mL を加え, 振とうし下層を約10mL になるまで減圧濃縮を行った。残留物のにごりがある場合は酢酸亜鉛0.5g を加え吸引ろ過を行った。

得られた抽出液を予めメタノール, 水各1mLで洗浄した Oasis HLB に負荷し, 5%メタノール1mL で洗浄したのち, メタノール1mLで溶出した。得られた溶出液の溶媒を減圧除去し, 50mM酢酸ナトリウム (pH7) 2mLに溶解し, 予めメタノール, 水各1mLで洗浄した Oasis MAX に負荷し5%メタノール・50mM酢酸ナトリウム (pH7) 2mLで洗浄し, メタノール2mLで溶出 (F1) 後, さらに2%ギ酸/メタノール2mLで溶出 (F2) し, F1とF2を合わせて溶媒を減圧除去しメタノールで正確に2mLとし, 試験溶液とした。スキームを図2に示した。

結果および考察

1. 検討結果

1-1 HPLC 条件について

イマザモックスアンモニウム塩の告示分析法⁹⁾では内径4.6×250mm の ODS カラムを用い, 0.01mol/L リン酸・メタノール (3:2) 混液を移動相として用いることとなっている。しかし, LC/MS の測定では一般的にリン酸のような不揮発性の酸を用いることができず, ESI モードでは流量を少なく設定する必要があるため, 内径の小さいカラムと揮発性の酸を用いた条件を設定する必要があった。セミマイクロカラムを用い, 流量を ESI モードの最適流量とされる毎分0.2mL とし, 揮発性の酢酸を含む移動相条件を検討した。食品衛生法の方法ではイマザモックスは約18分で溶出するが, この条件下では約6分で溶出し, 分析時間は約3分の1に短縮可能であった。得られた HPLC クロマトグラムを図3に示した。測定時の検出限界はイマザピル, イマザモックス, イマゼタピル, イマザメタベンズメチルが0.05ppm, イマザキンが0.02ppm (S/N=3) であり, 測定感度においても従来法とほぼ同様であった。

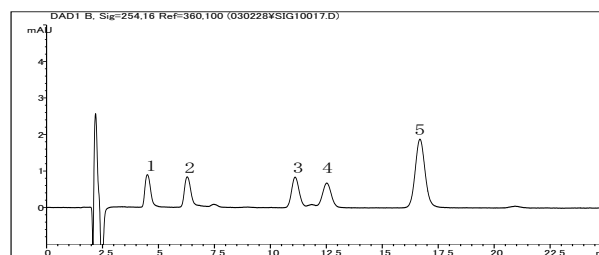


図3 イミダゾリノン5農薬の HPLC クロマトグラム

(1.イマザピル, 2.イマザモックス, 3.イマゼタピル
4.イマザメタベンズメチル, 5.イマザキン 各2ng)

1-2 LC/MS/MS 条件

SCAN モードにてイミダゾリノン5農薬各1 $\mu\text{g/mL}$ について分析した結果, それぞれの分子イオンピークのマスプロトグラムを抽出することにより5農薬すべてのマススペクトルを得ることができた. プリカーサーイオンは各農薬の分子イオンを選択し, プロダクトイオンはMS/MS スペクトルの中の強度の強いフラグメントイオンを選択した. 表1にMRM 測定時の5農薬のプリカーサーイオン, プロダクトイオンを示し, 標準溶液のMRM クロマトグラムを図4に示した.

表1 イミダゾリノン系5農薬のMRM モード測定時のプリカーサーイオン, プロダクトイオン

農薬名	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)
イマザピル	262	149
イマザモックス	307	193
イマゼタピル	290	159
イマザメタベンズメチル	289	144
イマザキン	312	199

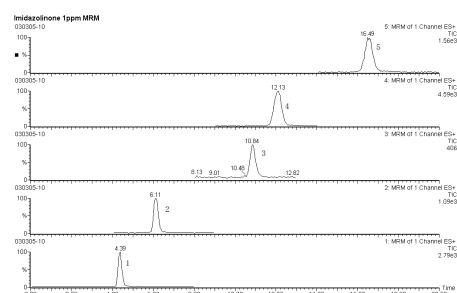


図4 イミダゾリノン系5農薬標準溶液 (1ppm) のMRM クロマトグラム

- (1. イマザピル, 2. イマザモックス, 3. イマゼタピル
4. イマザメタベンズメチル, 5. イマザキン)

検量線は0.1~2ng の範囲においてイマザピルの回帰式は $y=305.72x-3.3483$, 相関係数 $r=0.9999$, イマザモックスの回帰式は $y=147.5x+1.7032$, 相関係数 $r=0.9995$, イマゼタピルの回帰式は $y=66.128x-3.257$, 相関係数 $r=0.9948$, イマザメタベンズメチルの回帰式は $y=1008.1x+1.0116$, 相関係数 $r=0.9998$, イマザキンの回帰式は $y=349.2x+1.005$, 相関係数 $r=0.9999$ であり, 概ね良好な直線性を示した. 測定時の検出限界はイマザピルは0.005ppm, イマザモックス0.01ppm, イマゼタピル0.05ppm, イマザメタベンズメチル0.002ppm, イマザキン0.005ppm であり, HPLC よりもさらに高感度で測定可能であった.

2 抽出条件・精製条件の検討

メタノール・塩酸混液による抽出後, 脱脂を目的とし

たn-ヘキサン洗浄が可能か検討を行った. いずれのピークも検出されず, n-ヘキサン洗浄による損失はないと考えられた.

試験溶液の精製法について, 従来法では ODS, SCX, CH, NH₂の4種類のミニカラムを用いて煩雑な操作を行っているにもかかわらず, 十分な精製効果を得るのは困難であった. 精製操作を簡略化するための検討を行った.

5農薬について ODS カラムと強陰イオン交換樹脂カラムについて検討を行った. ODS カラムについては従来法で用いられている Bond Elut C₁₈とポリマーの充填材を用いてシラノール基のない Oasis HLB を比較し, イオン交換樹脂カラムについては, 酸性物質の保持が可能なイオン交換充填剤を有する Oasis MAX について溶出を検討した. Bond Elut C₁₈, Oasis HLB についてはいずれも良好な回収率であったが, 再現性は Oasis HLB のほうが優れ, 少ない溶媒量で溶出可能であった. Oasis MAX についてはカルボキシル基を持たないイマザメタベンズメチルのみがメタノール (F1) で溶出し, カルボキシル基を有する4農薬が2%ギ酸・メタノール混液 (F2) で溶出した. 今回は, 試験に再現性の良好な Oasis の2種のカラムを用い, 一緒に分析するために F1 と F2を合わせて分析することとした. 結果を表2に示した.

表2 イミダゾリノン系5農薬のミニカートリッジカラムの溶出結果 (n=3, 平均値±標準偏差)

農薬名	回収率 (%)		
	Oasis HLB	Bond Elut C ₁₈ [※]	Oasis MAX
イマザピル	94.6±1.4	102.2±7.6	94.9±3.1
イマザモックス	94.6±1.0	90.6±2.0	96.0±2.5
イマゼタピル	95.2±1.4	91.6±1.4	97.3±1.6
イマザメタベンズメチル	96.2±1.3	93.9±0.7	93.0±1.0
イマザキン	94.4±1.1	89.2±1.2	95.3±2.0

※ メタノール・水各5mLでコンディショニングしたのち負荷し, 塩酸溶液 (pH2.5) 5mLで洗浄, メタノール・塩酸溶液 (pH2.5) (1:1)10mLで溶出

3 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表3に示した. 玄米, とうもろこしにおいては5農薬中4農薬が70%以上の良好な回収結果であった. 玄米のHPLC クロマトグラムとMRM クロマ

表3 添加回収結果

農薬名	回収率 (%)			
	玄米	大豆	小豆	とうもろこし
イマザピル	58.1±0.4	5.3±1.2	11.7±2.8	73.8±13.0
イマザモックス	80.5±1.2	10.8±2.8	23.3±1.0	73.3±5.6
イマゼタピル	91.5±7.9	17.8±2.9	30.7±1.8	74.6±2.3
イマザメタベンズメチル	82.8±5.0	41.2±6.0	58.0±6.6	75.1±6.9
イマザキン	80.5±7.0	23.6±3.6	38.6±3.2	57.7±11.0

試料10.0gに各農薬を2 μg ずつ添加した. 回収率 (%) は平均値±標準偏差として示した (n=3).

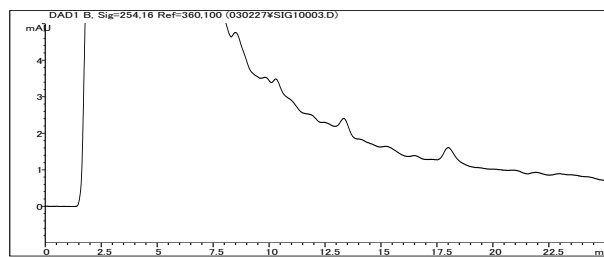


図5 玄米（blank）溶液から得られた HPLC クロマトグラム

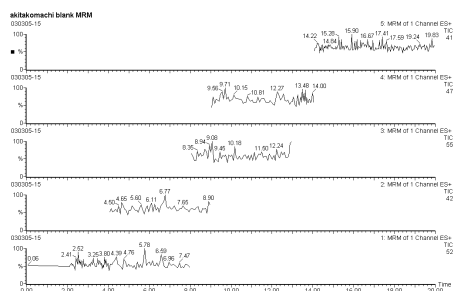


図6 玄米（blank）溶液から得られた MRM クロマトグラム

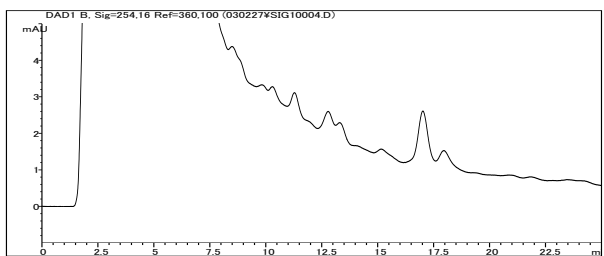


図7 玄米（添加）溶液から得られた HPLC クロマトグラム

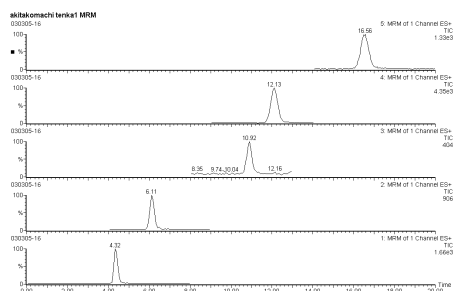


図8 玄米（添加）溶液から得られた MRM クロマトグラム

トグラムを図5～8に示した。HPLC クロマトグラムでは成分由来の影響を受け、検出不能であったが、MRM クロマトグラムでは、すべての試料で妨害ピークはみられず、5農薬のピークを検出可能であった。

大豆、小豆の添加回収率は5～58%にとどまった。大豆、小豆は玄米、とうもろこしよりもタンパク質を多く含んでいるために、妨害成分が除去しきれずに、イオン化の

障害を行っている可能性が考えられた。

ま と め

今回の検討により、従来法よりも簡易な方法で玄米、とうもろこしのイミダゾリノン系5農薬のスクリーニング試験を行うことが可能と考えられた。豆類については良好な回収率が得られなかったため、回収率低下の原因やイオン化障害の有無を解明し、精製方法等をさらに検討する必要がある。

謝 辞

本実験に御協力頂きました国立保健医療科学院の工藤雅子氏に深謝いたします。

（平成16年7月28日受理）

文 献

- 1) 食品・食品添加物等規格基準（抄），食品衛生学雑誌，45，J73-J75（2004）
- 2) The Food Directorate (involves Health Canada, the Canadian Food Inspection Agency), Novel Food Information-Food Biotechnology Imidazolinone Tolerant Rice, http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/ofb-bba/nfi-ani/e_imidazolinone_rice.html (2002)
- 3) S.J.Stout, et al:Rapid Direct Determination of Imidazolinone Herbicides in Water at the 1ppb Level by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry, J.Agric. Food Chem., 44, 2182-2186 (1996)
- 4) A.J.Krynitsky, et al:Maltiresidue Determination and Confirmation of Imidazolinone Herbicides in Soil by High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry, J.AOAC Int., 82, 956-962 (1999)
- 5) Abul K.M.Anisuzzaman, et al:Synthesis of Derivatives of Imidazolinone Herbicides: Their Use in Efficient Gas Chromatographic Methods for the Determination of These Herbicides, J.Agric.Food Chem., 48, 5893-5902 (2000)
- 6) 厚生労働省監修，食品衛生検査指針残留農薬編，イマザモックスアンモニウム塩試験法，pp.192-197 (2003)

短報

化粧品中のクロルクレゾールの
高速液体クロマトグラフィー
による分析

松阪 綾子¹, 佐々木 加代²,
佐藤 信夫², 土井 佳代¹

The Analytical Methods for
Chlorocresol
Determination in Cosmetics with
High Performance Liquid
Chromatography

Ayako MATSUZAKA , Kayo SASAKI,
Nobuo SATO and Kayo DOI

はじめに
クロルクレゾール (4-Chloro-3-methylphenol, CC)
は、平成12年9月に告示された化粧品基準¹⁾において、全
ての化粧品100g 中の最大配合量が0.5g 以下と配合に制
限があり、その分析法として、薬剤中の CC 量の高速液
体クロマトグラフ (HPLC) 蛍光検出法²⁾が報告されてい
る。しかし、蛍光検出器を用いる方法は誘導体化処理が
必要である。そこで、紫外吸光光度計 (UV 検出器) を
用い、化粧水及び乳液中の CC の定量方法について
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製

CC の異性体である、5-クロロ-2-メチルフェノール
(5C2MP) は東京化成試薬特級、2-クロロ-5-メチルフェ
ノール (2C5MP) は和光純薬試薬一級、4-クロロ2-メ
チルフェノール (4C2MP) は和光純薬化学用試薬を用
い、その他の試薬は全て和光純薬試薬特級品を用いた。
標準品として用いた CC の純度は、HPLC による不純物
ピーク含量比による、CC のピーク保持時間の6倍測定
で99.0%以上であった。

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 (株) コーセー研究本部

CC 約0.01g を精密に量り取り、メタノール/水混液
(60 : 40) で正確に100mL とし、0.05w/w%配合用の標
準溶液とした。また、CC 約0.1g を精密に量り取り、メ
タノール/水混液 (60 : 40) で正確に100mL とし、0.5w/
w%配合用の標準溶液とした。なお、定量範囲を確認す
るための試験は、6段階に希釈した1μg/mL~2mg/mL の
各標準溶液について、注入量8~12μLで測定した。

(2) 試料
試験に供した試作品である化粧水及び乳液は、表1に
示した配合成分及び配合量で調製した、CC 無配合、
0.05w/w%CC 配合及び0.5w/w%CC 配合品を用いた。

表1 試験に用いた化粧水及び乳液の処方

成 分	化 粧 水		無 配 合
	0.05w/w%CC	0.5w/w%CC	
水	78.2	73.25	78.25
エタノール95%	15.0	15.0	15.0
濃グリセリン	3.0	3.0	3.0
ジプロピレングリコール	3.0	3.0	3.0
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.5	5.0	0.5
クエン酸	0.02	0.02	0.02
クエン酸ナトリウム	0.08	0.08	0.08
メチルパラベン	0.15	0.15	0.15
クロルクレゾール	0.05	0.5	—

成 分	乳 液		無 配 合
	0.05w/w%CC	0.5w/w%CC	
水	77.345	76.895	77.395
エデト酸三ナトリウム	0.01	0.01	0.01
濃グリセリン	5	5	5
1,3-ブチレングリコール	7	7	7
メチルパラベン	0.15	0.15	0.15
カルボキシビニルポリマー	0.1	0.1	0.1
水酸化カリウム	0.045	0.045	0.045
イソステアリン酸ポリオキシエチレングリセリル	1.2	1.2	1.2
モノステアリン酸ポリオキシエチレングリセリン	0.8	0.8	0.8
ベヘニルアルコール	0.2	0.2	0.2
パチルアルコール	0.1	0.1	0.1
スクワラン	3.5	3.5	3.5
テトラ2-エチルヘキサン酸ペンタエリスリット	4.5	4.5	4.5
クロルクレゾール	0.05	0.5	—

(3) HPLC による分析条件の検討
HPLC はアジレント製1100シリーズ (クォータナリー
ポンプ, カラムオープン, オンラインデガッサー, オート
サンプラー) を用いた。
CC には3種類の異性体があることから、それらの保
持時間について、カラムは Unison US-C18 4.6mm
i.d.x150mm (5μm, インタクト製) を用い、移動相はメ
タノール/水混液の混合比率を55 : 45, 60 : 40及び65 : 3
5で検討を行った。
また、化粧品には、パラオキシ安息香酸エステル類
(パラベン類) 及びフェノキシエタノール (PE) が防腐
剤として繁用されていることから、CC とパラベン類で
あるメチルパラベン (MP), エチルパラベン (EP), イソ
プロピルパラベン (IPP), プロピルパラベン (PP), イソ
ブチルパラベン (IBP), ブチルパラベン (BP) 及び PE

の保持時間について、カラムは Unison US-C18 4.6mm i.d.x150mm (5 μ m, インタクト製), Inertsil ODS-3 4.6mm i.d.x150mm (5 μ m, GL サイエンス製), TSKgel ODS-80Ts 4.6mm i.d.x150mm (5 μ m, 東ソー製) 及び Inertsil ODS-3 4.6mm i.d.x150mm (3 μ m, GL サイエンス製) を用い、移動相はメタノール/水混液 (60:40) を用いて検討を行った。

なお、メタノール/水混液を移動相に用いた場合、カラムの背圧が上昇することから、移動相として pH2.5 に調整した 20mmol/L NaH₂PO₄/アセトニトリル混液 (1:1) を用い、カラムに Capcellpak C18 MG 4.6mm i.d.x250mm (5 μ m, 資生堂ファインケミカル製) を用いた検討も併せて行った。

(4) 標準品の添加回収の検討

前出の HPLC 装置を用い、カラムは Unison US-C18 4.6mm i.d.x150mm (5 μ m, インタクト製) を用いた。移動相にはメタノール/水混液 (60:40) を流量 1mL/min で流し、注入量は 10 μ L とし、UV 検出器 (測定波長 227nm) を用いた。

CC 無配合化粧品水を試料とし、試料約 1g を精密に量り取り、これに 0.05w/w% 配合用標準溶液を正確に 5mL 添加し、メタノール/水混液 (60:40) で正確に 50mL とする。また、0.5w/w% 配合用標準溶液を正確に 5mL 添加し、同様の操作を行い、これらの溶液を孔径 0.45 μ m、口径 13mm のメンブランフィルター 1 (DISMIC-13HP, アドバンテック製) によりろ過し、最初のろ液を 2mL 捨て、次のろ液を試料溶液とした。次に、CC 無配合乳液を試料とし、試料約 1g を精密に量り取り、0.05w/w% 配合用標準溶液を正確に 5mL 添加し、メタノール/水混液 (60:40) 及びエタノールを 30mL 程度加え、超音波に 5 分間かけて分散し、室温になるまで放冷後、メタノール/水混液 (60:40) 及びエタノールで正確に 50mL とする。また、0.5w/w% 配合用標準溶液を正確に 5mL 添加し、同様の操作を行い、これらの溶液を孔径 0.45 μ m、口径 25mm のメンブランフィルター 2 (GHP アクロディスク GF, ゲルマン製) によりろ過し、最初のろ液を 2mL 捨て、次のろ液を試料溶液とした。

(5) 試料溶液の調製及び定量

化粧品は試料約 1g を精密に量り取り、メタノール/水混液 (60:40) で正確に 50mL とする。この液をメンブランフィルター 1 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。乳液については試料約 1g を精密に量り取り、メタノール/水混液 (60:40) 及びエタノールを 30mL 程度加え、超音波に 5 分間かけて分散し、室温になるまで放冷後、メタノール/水混液 (60:40) 及びエタノールで正確に 50mL とした溶液をメンブ

ランフィルター 2 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。

結果および考察

(1) HPLC 測定条件

CC には 3 種類の異性体があり、これらの異性体が標準品に不純物として混入する可能性が考えられるため、保持時間について ODS 系カラムを用い、移動相の違いについて検討を行った。その結果、移動相にメタノール/水混液 (60:40) を用いたところ、3 種類の異性体について分離度は各々 2.3 以上が得られた。なお、4C2MP 及び 5C2MP の保持時間が接近しているため、この 2 成分は分離されなかったが、CC との分離には支障はなかった (図 1)。しかし、アセトニトリル系を移動相に用いた場合、今回の条件では異性体の 1 つである 2C5MP と CC のピークが一部重なり、分離はよくなかった。これらの結果から、今回検討した条件では CC とその異性体の分離には、移動相としてメタノール/水混液が適切であると考えられた。

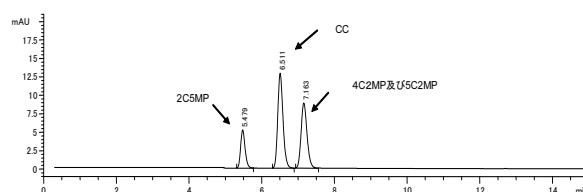


図 1 CC 及びその異性体のクロマトグラム

(2) CC 及びパラベン類及び PE における検討

CC とパラベン類及び PE について保持時間を確認したところ、MP, PE, EP, IPP, PP, CC, IBP, BP の順にピークは現れ、CC 及び PP の保持時間が接近していた。このことから粒径 5 μ m、長さ 150mm のメーカーの異なる 3 種類の ODS 系カラムを用いたが、いずれも分離度 1.5 以上は得られなかった。そこで粒径 3 μ m、長さ 150mm の ODS 系カラムを用いたところ、分離度 2.5 と良好な結果を得た。また、粒径は 5 μ m であるが、長さ 250mm の ODS 系カラムを用いたところ、分離度 2.3 と良好な結果を得た。これらの結果から、PP を含有する化粧品では、粒径 5 μ m、長さ 150mm の ODS 系カラムを用いる場合は、理論段数を大きくするため、細かい粒径のものを選択するか、保持時間は長くなるが、長さ 250mm の ODS 系カラムを選択することが可能であると考えられた。

(3) 検量線の作成

CC の定量下限値を S/N 比 10 以上で求めた結果 42ng 以上であったため、50ng~1.2 μ g の範囲で CC のピーク面積と CC 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回検量線を作成した結果，傾き 2.829 ± 0.013 ，Y切片 -0.8207 ± 1.427 と良好な結果を得た．なお，定量には $Y = 2.829X - 0.8207$ の回帰式を用いた．

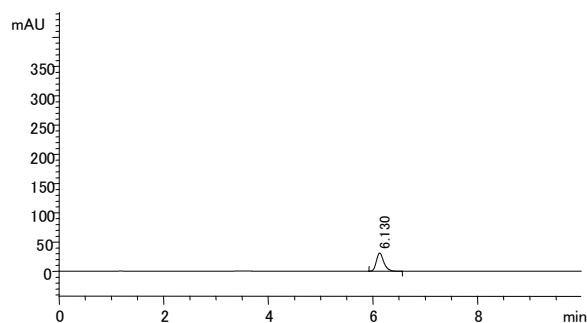
(4) 試料溶液の調製方法の検討

化粧水はメタノール/水混液（60：40）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/水混液（60：40）で正確に50mLとし，試料溶液としたところ，添加回収試験において99%以上の回収

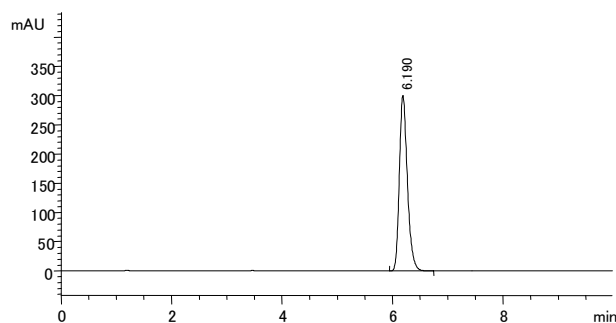
率が得られ，変動係数も0.5%以下であった．このことから，化粧水に対する本抽出条件は適切であると考えられた．乳液はメタノール/水混液（60：40）では白濁状態で分散し，抽出効率に影響が出ることが考えられたので，抽出をエタノールにしたところ，メタノール/水混液（60：40）ほど白濁せず，容易に分散した．そこで，メタノール/水混液（60：40）及びエタノールによる2種類の抽出方法について試験を行った．この結果，添加回収試験においてメタノール/水混液及びエタノールによ

表2 各試料の定量試験結果

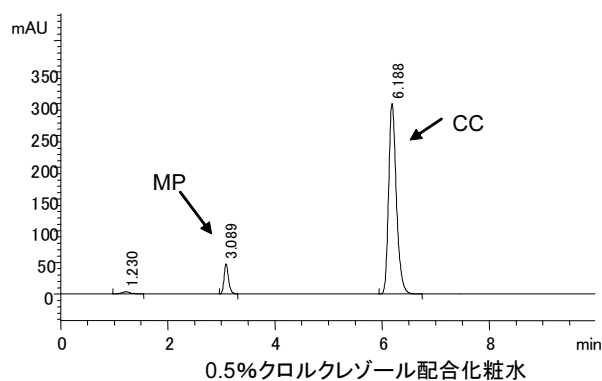
試料	化粧水		乳 液			
	メタノール/水混液(60:40)抽出		メタノール/水混液(60:40)抽出		エタノール抽出	
	0.05%CC 配合	0.5%CC 配合	0.05%CC 配合	0.5%CC 配合	0.05%CC 配合	0.5%CC 配合
平均値 ^a (%)	0.0477	0.4847	0.0501	0.4975	0.0502	0.4978
S.D.	0.0005	0.0049	0.0006	0.0069	0.0008	0.0031
CV 値	1.0482	1.0109	1.1970	1.3869	1.5936	0.6227



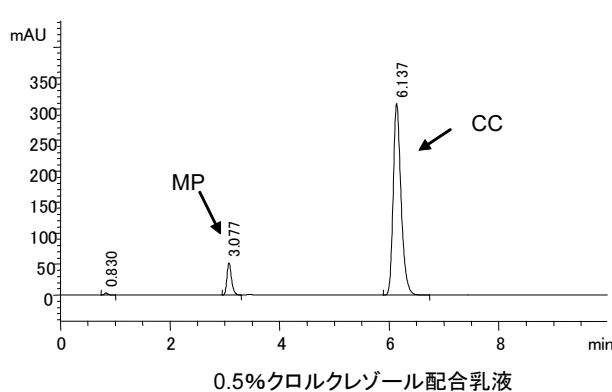
クロルクレゾール標準液(0.1 μg)



クロルクレゾール標準液(1.0 μg)



0.5%クロルクレゾール配合化粧水



0.5%クロルクレゾール配合乳液

図2 クロルクレゾール標準品及び化粧品のクロマトグラム

る抽出とともに99%以上の回収率であった。このことから、抽出時の試料溶液の白濁はCCの回収率にはほとんど影響しないことがわかった。しかしながら、試料の均一性の点から、乳液の抽出では、より澄明なる抽出液を選択することが望ましいと考えられた。なお、メンブランフィルターへの吸着の有無をみた結果、CC標準液については最初のろ液1mLからCC量に変動を認めなかった。試料溶液では最初のろ液1mLでは、CC量の低いものが認められたが、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。

(5) 試料の定量

表1に示した試作品の化粧水、乳液について定量を行った結果、表2の通り、配合量とほぼ一致する結果が得られた。また、各試料につき、6回繰り返し試験を行い、再現性を確認したところ、良好な結果を得た。

本条件におけるCCの定性下限値をS/N比3.3以上で求めた結果14ng、定量下限値をS/N比10以上で求めた結果42ng以上であった。本条件によるCCの理論段数は9400以上、シンメトリー係数は1.3であった。また、標準液0.1 μ g及び1.0 μ g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0.5%以下であった。なお、試料として用いた化粧水及び乳液には防腐剤であるMPが含まれていたが、図2に示す通り、MPとCCを良好に

分離することができた。

これらのことから、本法はCCの定量法として使用できるものと考えられた。

ま と め

化粧品に防腐剤等として配合されるCCの定量方法として、ODS系カラム、移動相としてメタノール/水混液(60:40)、UV検出器(測定波長227nm)を用い、試料溶液の調製は、化粧水はメタノール/水混液(60:40)、乳液はメタノール/水混液(60:40)またはエタノールで抽出することにより、添加回収試験において99.0%以上の回収率が得られ、試料の定量は配合量にほぼ一致する結果が得られた。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 厚生省告示第330号及び厚生省告示第331号、平成12年9月
- 2) Gatti R., Roveri P., Bonazzi D. and Cavrini V.: HP LC-fluorescence determination of chlorocresol and chloroxylenol in pharmaceuticals, J. Pharm. Biomed. Anal., 16, pp.405-412 (1997)

短報

水中の残留塩素測定の見討 —Diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) 法と *o*-tolidine (OT) 法 の比較—

清水壽美子¹, 上村 仁², 伊藤伸一²

On measuring residual chlorine in water —Comparison between Diethyl-*p*- phenylenediamine (DPD) method and *o*-tolidine (OT) method—

Sumiko SHIMIZU, Hitoshi UEMURA
and Shin-Ichi ITOH

はじめに

「『水道水質に関する基準の制定について』の一部改正について」(生衛発第1876号, 平成12年12月26日付)により, 快適水質項目の残留塩素測定法から *o*-トリジン法 (以下 OT 法) が平成14年4月1日より削除された。これに伴い, 簡便で広く使われてきた OT 法から, ジエチル-*p*-フェニレンジアミン法 (以下 DPD 法) に変わった。

そこで今回, DPD 法への移行にあたり, 従来の OT 法との測定上の相違等を比較検討し, DPD 法での問題点や注意点について, 実試料を用いて検討を行ったので報告する。

方 法

1. 試薬

上水試験方法2001年版¹⁾に準じて DPD 試薬, リン酸緩衝液, C.I. Acid Red 265を用いた標準比色系列を調製した。DPD 混合試薬は関東化学のラピッド DPD 試薬 (粉末) を用いた。

o-トリジン溶液は, 和光純薬製を用いた。それ以外のクロム酸カリウム・ニクロム酸カリウム溶液及びりん酸緩衝液を用いた標準比色系列は, 上水試験方法2001年版に準じて調製した。

濃度約9%の次亜塩素酸ナトリウム溶液2.17mLを希釈水 (精製水を直火で煮沸して残留塩素を除いたもの) で100mLとし, ここから10mLを採り希釈水で1Lとして, 20mg/Lの標準塩素水 ($f=1.0093$, よう素滴定法) を調製した。

2. 検体

水道水A~Eの5検体に上記の標準塩素水を適量添加し, 0.1~1.0mg/Lの範囲で5段階の検体を調製した。プール水の6検体F~Kは標準塩素水を添加せず, そのまま用いた。

3. 分析方法

3.1 検量線の作成

標準塩素水 (20mg/L) を適宜希釈し, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0mg/Lと, 7段階の濃度溶液を調製した。これを用いて下記の吸光光度法の検量線を作成した。

3.2 DPD 法 (吸光光度法及び目視法)

りん酸緩衝液2.5mLを共栓付比色管に採り, DPD 試薬0.5gを加えた。次に検体を加え全量を50mLとし, 混和後1分以内に分光光度計を用い, 波長510nmでの吸光度を測定し, 検量線から遊離残留塩素濃度を求めた (吸光光度法)。同時に, 呈色を標準比色系列と側面から比色して遊離残留塩素濃度を求めた (目視法)。さらに, 発色させた溶液にヨウ化カリウム0.5gを加えて溶かし, 約2分間静置後, 吸光光度法と目視法それぞれの方法により, 総残留塩素濃度を求めた。

3.3 OT 法 (吸光光度法及び目視法)

o-トリジン溶液5mLを共栓付比色管に採り, 検体を加えて全量を50mLとし, 直ちに混和し5秒以内に分光光度計を用い, 波長437nmで吸光度を測定し, 検量線から遊離残留塩素濃度を求めた (吸光光度法)。同時に, 呈色を標準比色系列と側面から比色して遊離残留塩素濃度を求めた (目視法)。さらに, 発色させた溶液を5分静置後, 吸光光度法と目視法それぞれの方法により, 総残留塩素濃度を求めた。

結果及び考察

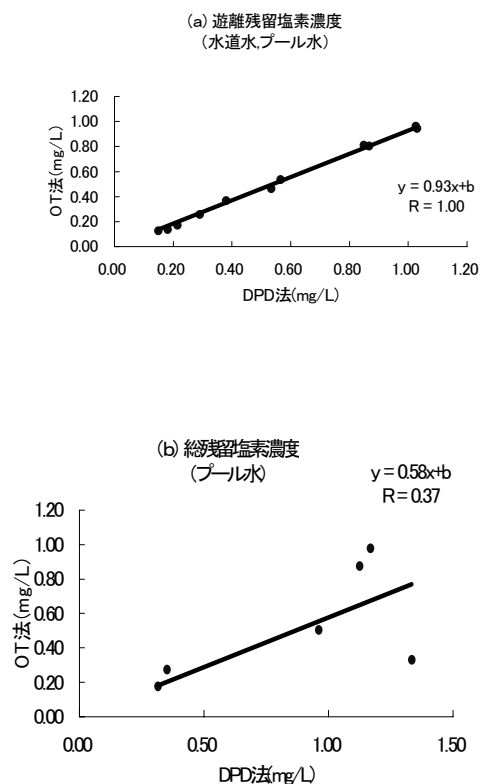
1. DPD 法と OT 法の相関

遊離残留塩素濃度についてはA~K (水道水及びプール水) の11検体を, 総残留塩素濃度についてはF~K (プール水) の6検体を用いて, 吸光光度法により DPD 法と OT 法の相関を検討した。

結果は, 図1(a)に示したように, 遊離残留塩素濃度については, グラフの傾きが0.93, 相関係数1.00と良好であった。一方, 総残留塩素濃度については, 図1(b)に示したように, DPD 法と OT 法で結果が大きく異なった。この原因の一つとして, OT 法の反応時間が遅いことが

1 相模原市衛生試験所
〒229-0036 相模原市富士見6-5-8
2 神奈川県衛生研究所 理化学部

考えられた。そこで、DPD 法と OT 法との測定値の差が大きかったプール水 G 及び J を用いて、反応時間と吸光度の変化を観察したところ、表1の結果が得られた。



(濃度測定は吸光度法による)

図1 実試料を用いた DPD 法と OT 法の相関

表1 OT 法による総残留塩素測定の実験時間

経過時間	プール水(G)		プール水(J)	
	吸光度(437nm)	濃度(mg/L)	吸光度(437nm)	濃度(mg/L)
5秒	0.727	0.97	0.132	0.18
5分	0.806	1.08	0.363	0.48
10分	0.820	1.09	0.563	0.75
15分	0.826	1.10	0.735	0.98
20分	0.829	1.11	0.842	1.12
25分	—	—	0.864	1.15
30分	—	—	0.860	1.15
DPD法濃度	1.17		1.33	

(濃度測定は吸光度法による)

上水試験方法による OT 法の総残留塩素濃度は試薬と検体を入れ、5分静置後に測定することになっているが、それ以降も時間経過とともに残留塩素濃度が上昇したことから、5分では反応が終了していないことが確認された。吸光度が変化しなくなった時点を真の濃度と考えると、DPD 法で得られた濃度と同程度の値となった。こ

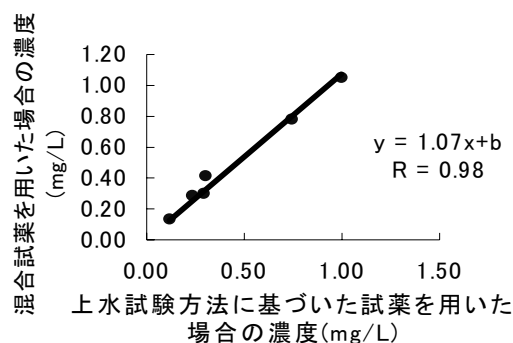
れらのことから、OT 法で結合型残留塩素を測定する際は、反応時間を5分以上とる必要がある検体もあることがわかった。

以上のように、遊離残留塩素測定においては、DPD 法と OT 法の相関は良好で、DPD 法に測定法を切り替えても、従来と同じ検査結果が得られると考えられる。また、総残留塩素を測定する場合には、DPD 法のほうが反応時間に左右されず、短時間で正確な値が得られると考えられる。

2. DPD 混合試薬の検討

上水試験方法に基づいて調製した試薬と、市販の DPD 混合試薬を比較した。水道水2検体とプール水2検体を用いて、水道水については遊離残留塩素濃度を、プール水については遊離残留塩素と総残留塩素濃度を吸光度から求めたところ、図2の結果が得られた。

グラフの傾きが1.07、相関係数0.98で両者の相関は良好であり、混合試薬も上水試験法と同等の結果が得られることがわかった。



(濃度測定は吸光度法による)

図2 上水試験法に基づいた試薬と混合試薬の相関

3. DPD 法におけるブランクの着色

DPD 法では、ブランクが時間経過とともに着色していく現象が認められた。検体として残留塩素を含まない蒸留水50mL と混合試薬を用いて検討した。反応開始後3分までは30秒ごとに、3～10分までは1分ごとに、10～30分までは5分ごとに吸光度を測定したところ、図3のようなブランクの着色の経時変化が得られた。

反応開始直後の吸光度が高く出ているのは、試薬が溶ける際の気泡もしくは、溶けきらない試薬の残りが影響していると考えられた。反応開始後、30秒程で吸光度が安定し、その後4～5分まではブランクの着色が認められなかった。

この結果より、反応開始後30秒～4分以内に測定すれば、時間経過とともに吸光度が増加する影響は受けないと思われた。

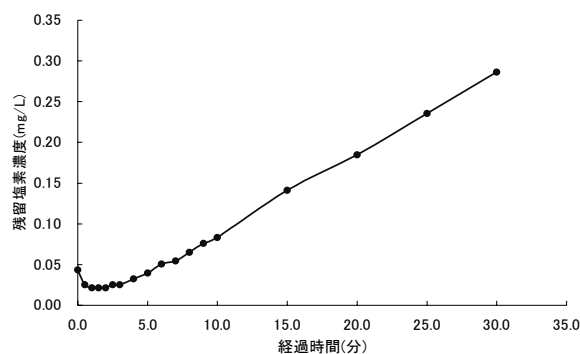


図3 プランク着色の経時変化について

4. DPD 法の標準比色系列と実試料の色調の違い

DPD 測定の見視法では、残留塩素濃度が1mg/L を超えるような検体の場合、標準比色系列と実試料の色調が異なり、判定しにくかった。X軸に吸光光度法で求めた残留塩素濃度を、Y軸に吸光光度法と目視法で測定した濃度の差の絶対値をプロットした結果を図4に示した。このように、残留塩素濃度が1mg/L を超える検体の中には、判定誤差が大きくなるものがあった。

この原因を調べるため、残留塩素濃度1.2mg/L(混合試薬を用いた目視法による)の検体と、標準比色系列1.2mg/L との吸収スペクトルパターンを比較してみたところ、図5のようになった。この吸収スペクトルパターンの違いが色調の違い、すなわち目視法の判定誤差に影響しているのではないかと考えられた。従って、残留塩素濃度の高い検体(1mg/L 以上)を測定する場合、目視法での判定は色調に注意が必要であり、より正確な測定を行うためには、吸光光度法を用いることが望ましいと思われる。

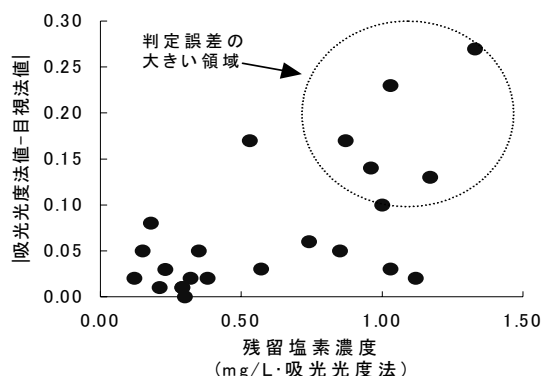


図4 吸光光度法と目視法の判定誤差

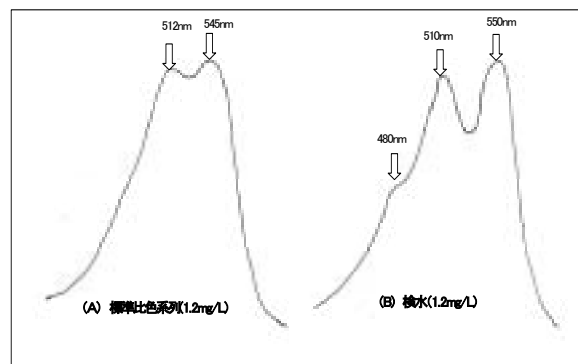


図5 標準比色系列と実試料のスペクトルパターン

最後に、多大なるご指導とご協力を頂きました神奈川県衛生研究所の各位に深謝いたします。なお、本研究は平成13年度に神奈川県衛生研究所で行った重点項目研修の成果をまとめたものであることを付記します。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 上水試験方法 2001年版, 日本水道協会, 東京 (2001)

短報

不快害虫用殺虫剤に含まれる 農薬及び有害物質等の分析

長谷川一夫, 辻 清美, 石坂富美, 伏脇裕一

Determination of Pesticides and Hazardous Material in Insecticide for Nuisance

Kazuo HASEGAWA, Kiyomi TSUJI,
Fumi ISHIZAKA and Yuichi FUSHIWAKI

はじめに

家庭用殺虫剤には多くの商品形態があり、対象となる害虫の種類も様々である。現在、人への安全性を確保するためにハエ、ゴキブリ等の衛生害虫用殺虫剤については薬事法の規制を受けている。一方、アリ、クモ、ナメクジ等の不快害虫用殺虫剤及びイガ等の衣料用防虫剤については法規制がなく、業界団体が作成した自主基準¹⁾だけが存在するのが現状である。不快害虫用殺虫剤の有効成分には食品²⁾、水道水³⁾、室内空気⁴⁾等で濃度規制があるものも使用されている可能性が考えられ、使用方法によっては消費者に健康被害が起こることが懸念される。今回、入手した不快害虫用殺虫剤で表示のあった有効成分を含む10種類の農薬類について濃度分析を行った。同時に未表示で人への健康被害が懸念される有害物質の検索及び定量を行い考察を加えたので報告する。

方 法

1 試料

平成14年4月に県消費生活課⁵⁾から入手した不快害虫用殺虫剤10試料(固形剤1試料, 粒剤2試料, エアゾル製品7試料)を用いた。

2 試薬

1,4-ジクロロベンゼン, ディート, アレスリン, レスメトリン, フタルスリン(テトラメスリン), フェノトリン, クロルピリホス, S421, は林純薬工業の農薬標準品, フェノブカルブ, フェニトロチオン(MEP), ダイアジノン は和光純薬工業の残留農薬試験用標準品, チ

アベンダゾールとピペロニルブトキシドは関東化学の残留農薬試験用標準品, テトラデカン は関東化学の特級試薬, アセトンは和光純薬工業の残留農薬試験用試薬, n-ドコサン_{d₄₆}は C/D/N Isotopes 社の安定同位体化合物を用いた。

3 装置

ガスクロマトグラフ質量分析計: ヒュレットパッカー社製 HP5890 ガスクロマトグラフに同社製質量選択検出器(MSD: HP5972)を装備したもの(以下 GC-MS とする)を使用した。

4 測定方法

4-1 試料の採取及び試験溶液の調製方法

固形剤は試料を細片に砕いて0.020gを共栓三角フラスコ中に精秤し, アセトン10mLを加え, 超音波で溶解後, アセトンで正確に20mLとして試験溶液とした。粒剤は試料1.0gを共栓三角フラスコ中に精秤し, アセトン20mLを加え, 超音波で30分間抽出した。抽出液を100mLメスフラスコ中にガラスろ過器(G-1)を用いてろ過後, アセトンで正確に100mLとして試験溶液とした。エアゾル製品は家庭用品中のメタノール測定⁶⁾の公定法⁶⁾に従って試料を三角フラスコ中に採取した。三角フラスコ内に捕集した試料1.0gを, アセトン約80mLを入れた100mLメスフラスコに精秤し, アセトンで正確に100mLとして試験溶液とした。n-ドコサン_{d₄₆}を内標準物質として使用し, _{d₄₆}100mg/Lアセトン溶液を調製した。試験溶液をアセトンで必要な濃度に希釈後, n-ドコサン_{d₄₆}の最終濃度が1mg/Lとなるように調製し, GC-MS測定溶液とした。

4-2 GC-MSによる分析方法

調製したGC-MS測定溶液をGC-MSに注入して分析を行った。定量はSIM法で測定し, 得られたクロマトグラム上の各ピーク面積を求め, 0.1~10mg/Lの範囲の検量線を作成して, 内標準法により試料中の成分濃度を算出した。異性体ピークが存在するアレスリン, レスメトリン, フタルスリン, フェノトリンについては異性体ピークの総量で定量を行った。固形または顆粒の試料はW/W%濃度を算出した。エアゾル製品は, W/W%以外に採取後の試料の比重を測定し, W/W%×比重からW/V%濃度を算出した。また容器に表示のある内容量(AmL)と溶剂量(BmL)の数値を用いて, W/V%×B/AからW/V内容量%濃度を算出した。溶剂量表示が無い試料は他試料の平均値を用いてW/V内容量%濃度を算出した。定性及び有害物質の検索はSCAN法で測定し, 定量対象成分は標準物質の保持時間とマススペクトルの一致により確認を行った。試料の測定は, 試料の調製, 表示有効成分の定量, 表示有効成分の確認, 未表示

の有害物質の検索及び確認，試料の再調製，未表示の有害物質の定量の手順で行った．

4-3 GC-MS の測定条件

カラム：アジレント社製 HP-5MS (0.25mm×30m×0.25 μm)

カラム温度：50℃ (2分保持) →40℃/分→150℃→6℃/分→280℃ (5分保持)

注入口温度：280℃

注入量：1 μL (スプリッスレス注入)

キャリアーガス：ヘリウム (1.0mL/分)

SIM モードのモニターイオン (m/z) : 1,4-ジクロロベンゼン (146, 148, 111), ディート (191, 119, 120), フェノブカルブ (150, 121, 107), フェニトロチオン (277, 125, 109), アレスリン (123, 136, 107), レスメトリン (171, 123, 128), フタルスリン (テトラメスリン) (164, 123, 165), フェノトリン (183, 123, 184), n-ドコサン_d₄₆ (内標物質, 98), テトラデカン (85, 71), クロルピリホス (197, 199), ダイアジノン (179, 227, 304), S421 (130, 132), チアベンダゾール (201, 174), ピペロニルブトキシド (176, 177).

SCAN 質量範囲：45～500m/z

結果及び考察

表示のあった有効成分及びダイアジノン，クロルピリホスの分析結果を，W/W%濃度で表1に示した．有効成分として表示されていたが，試料 No.2のトリクロルホンは他の定量物質と GC-MS 同時分析が困難であり，No.10のイソペンタンは溶剤として使用されていると思われるので定量を行わなかった．試料の中にエアゾル製品があったので，室内で使用した場合の室内空気汚染を考慮し，表示有効成分ではないが，室内濃度指針値⁹⁾のある農薬のダイアジノン，クロルピリホスの測定も同時に行った．その結果，表示有効成分濃度は0.019～95W/W%で試料により大きな差がみられたが，各試料ともに表示有効成分以外は定量下限値未満の濃度であった．試料 No.6については定量下限値に近いアレスリンのピークがクロマト上に認められた．この原因については，製品に添加されたものか何らかの汚染が明らかにできなかった．フェニトロチオンとフェノブカルブの検出された No.1, 4, 6, 7, 9の試料については，これらが食品の残留基準値²⁾，水道水の目標値³⁾，さらにフェノブカルブについては室内空気中の指針値⁹⁾も決められていることから，人体への曝露を防ぐように十分な注意をはらって使用することが必要と思われる．

表2に事業者が表示有効成分濃度を情報開示⁵⁾した6試

表1 表示有効成分等の定量結果

試料 No.	表示 有効成分	濃度(W/W%)										試料 タイプ
		1,4-ジクロ ロベンゼン	ディート	フェノブ カルブ	フェニトロ チオン	アレスリ ン	レスメ トリン	フタル スリン	フェノ トリン	ダイア ジノン	クロルピ リホス	
1	フェニトロチオン フタルスリン	ND	ND	ND	1.3	ND	ND	0.25	ND	ND	ND	エアゾル
2	パラジクロロベンゼン トリクロルホン*	95	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	固形剤
3	アレスリン レスメトリン フタルスリン	ND	ND	ND	ND	0.48	0.52	0.20	ND	ND	ND	エアゾル
4	フェニトロチオン フタルスリン	ND	ND	ND	6.8	ND	ND	0.14	ND	ND	ND	エアゾル
5	フタルスリン レスメトリン	ND	ND	ND	ND	ND	0.27	0.31	ND	ND	ND	エアゾル
6	フェニトロチオン	ND	ND	ND	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	粒剤
7	フェノブカルブ ディート	ND	1.5	2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	粒剤
8	フタルスリン フェノトリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.44	0.54	ND	ND	エアゾル
9	フェニトロチオン フタルスリン	ND	ND	ND	1.2	ND	ND	0.25	ND	ND	ND	エアゾル
10	フタルスリン レスメトリン イソペンタン**	ND	ND	ND	ND	ND	0.023	0.019	ND	ND	ND	エアゾル

*:他の定量物質とGC/MS同時分析が困難であるので定量を行わなかった

** : 溶剤成分と思われるので定量を行わなかった

ND: 定量下限値未満, No.2は<0.5, No3, 5, 6は<0.005, No.10は<0.003, 他は<0.05

料について、定量結果と開示濃度(%)の比較を示した。エアゾル製品については、W/W%以外にW/V%、W/V内容量%で示した。固形剤と粒剤はW/W%の結果と事業者が示した濃度(%)が一致した。家庭用品ではエアゾル製品中の有害物質濃度の基準値⁶⁾は溶剤中のW/W%で規制されている。しかし、W/W%とW/V%は事業者が示した濃度(%)とは一致しなかった。エアゾル製品については、一般に噴射剤の捕集が困難であり、試料採取が可能なのは溶剤部分であることから、噴射剤も含めた濃度を算出する方法を考え、容器に表示のある内容量と溶剤量の数値を用いてW/V内容量%を算出した。その結果、No.4のフタルスリンとNo.5のレスメトリンを除いて、W/V内容量%と事業者が示した濃度(%)が一致した。事業者は噴射剤を含めた製品全体の容量に対しての濃度を情報開示したものと思われる。エアゾル製品中の有効成分測定方法についてはさらに検討する必要があるものと思われる。

未表示の成分で使用方法によっては人への健康被害が懸念される有害物質を検索した結果、4試料からS421、ピペロニルブトキシド、チアベンダゾール及びテトラデカンが検出された。図1にS421、ピペロニルブトキシド、チアベンダゾール及びテトラデカンが検出された4試料のトータルイオンクロマトグラムを示し、表3に定量結果を示した。S421は0.61W/W%で、表1に示した有効成分のアレスリン、レスメトリン、フタルスリン濃度0.48

～0.20W/W%と同程度であった。同様にピペロニルブトキシドは0.18W/W%で、レスメトリン、フタルスリン濃度0.27～0.31W/W%、チアベンダゾールは0.16W/W%で、フェニトロチオン濃度0.10W/W%濃度と同程度であった。テトラデカンは0.22～27W/W%で試料によって濃度に差が見られた。ピペロニルブトキシド及びチアベンダゾールは農薬であり、S421とピペロニルブトキシドは農薬の作用を高めるために添加される共力剤、チアベンダゾールは抗菌剤として使われていると考えられる。S421は衣料用防虫剤及び防虫シート、ピペロニルブトキシドは防虫シートから検出された報告⁷⁾がある。テトラデカンは溶剤として使用されていると思われるが、室内空気濃度指針値⁸⁾が設定されている物質である。密閉された6畳程度の室内(容積23.3m³)で試料No.3を数秒間使用(使用溶剤量2gとする)し、均一に室内に拡散すると仮定すると、室内濃度は21500μg/m³と計算され、テトラデカンの室内濃度指針値330μg/m³を大きく超える可能性がある。以上のことから、未表示で人への健康被害が懸念される有害物質がまだ多く存在することが考えられ、これらの物質の表示も不可欠であり、使用时には、部屋の換気を十分に行う、人に向けて使用しない等の注意が必要と思われる。

ま と め

不快害虫用殺虫剤について10種類の農薬類の分析を行っ

表2 表示有効成分の定量結果と事業者が示した濃度の比較

試料 No.	試料 タイプ	定量した有効成分	定量濃度			事業者が示 した濃度(%)
			W/W%	W/V%	W/V内容量%*	
2	固形剤	パラジクロロベンゼン	95	—	—	98
7	粒剤	フェノブカルブ	2.0	—	—	1.8
		ディート	1.5	—	—	1.5
3	エアゾル	アレスリン	0.48	0.34	0.17	0.18
		レスメトリン	0.52	0.36	0.18	0.18
		フタルスリン	0.20	0.14	0.07	0.0675
4	エアゾル	フェニトロチオン	6.8	5.3	2.6	2.784
		フタルスリン	0.14	0.11	0.05	0.079
5	エアゾル	フタルスリン	0.31	0.26	0.13	0.125
		レスメトリン	0.27	0.22	0.12	0.0667
10	エアゾル	フタルスリン	0.019	0.010	0.005	0.01
		レスメトリン	0.023	0.013	0.007	0.01

*: 容器表示の内容量と溶剤量を用いて、W/V%×溶剤量/内容量から計算した
溶剤量表示が無い試料(No.5, No.10)については他試料の平均値で換算した

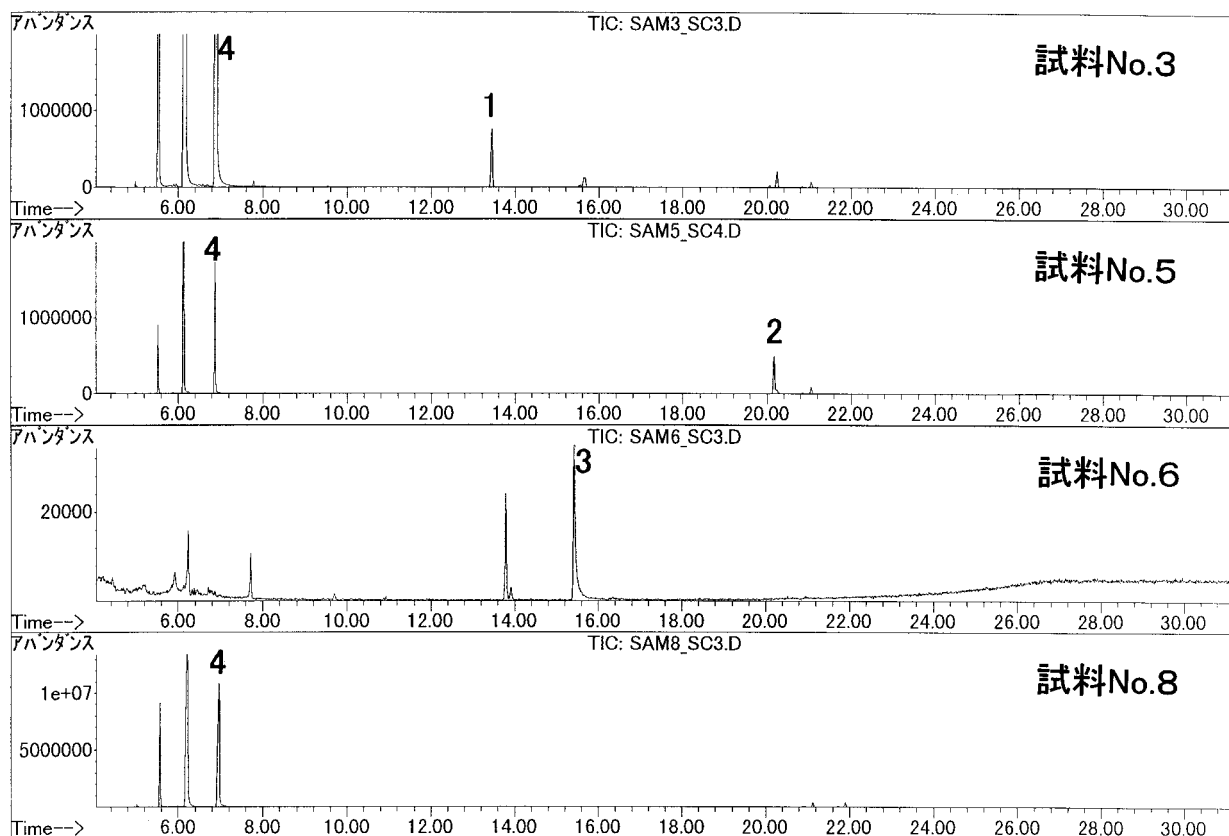


図1 S421, ピペロニルブトキシド, チアベンダゾール及びテトラデカンが検出された試料のトータルイオンクロマトグラム

1: S421 2: ピペロニルブトキシド 3: チアベンダゾール 4: テトラデカン

表3 未表示有害物質の定量結果

試料 No.	試料 タイプ	物質名	定量濃度		
			W/W%	W/V%	W/V内容量% *
3	エアゾル	S421	0.61	0.42	0.21
		テトラデカン	25	18	8.8
5	エアゾル	ピペロニルブトキシド	0.18	0.15	0.08
		テトラデカン	0.22	0.19	0.10
6	粒剤	チアベンダゾール	0.16	—	—
8	エアゾル	テトラデカン	27	20	12

*: 容器表示の内容量と溶剂量を用いて、 $W/V\% \times \text{溶剂量} / \text{内容量}$ から計算した
溶剂量表示が無い試料No.5については他試料の平均値で換算した

た結果、表示のあった有効成分8種類が 0.019～95W/W %検出された。

定量結果と事業者が示した濃度を比較した結果、固形剤と粒剤は W/W%濃度が一致した。エアゾル製品は、W/V%を表示にある内容量と溶剂量の数値で換算した W/V 内容量%濃度が事業者の示した濃度と一致した。

未表示の成分で使用方法によっては人への健康被害が懸念される物質として S421が0.61、ピペロニルブトキシドが0.18、チアベンダゾールが0.16、テトラデカンが0.22～27W/W%検出された。したがって、有効成分だけではなく、これらの存在も考慮した上で使用には十分な注意が必要と思われる。

本研究の一部は県消費生活課の平成13、14年度生活科学研究ネットワーク推進事業「農薬類似成分商品の調査」⁹⁾ の内容を含む。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 家庭用不快害虫用殺虫剤の自主基準について、衛生18号，平成元年3月1日
- 2) 食品、添加物等の規格基準，厚生省告示第370号，昭和34年12月
- 3) 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正について，健発1010004号，平成15年10月10日
- 4) 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について，医薬発第0207002号，平成14年2月7日
- 5) 神奈川県県民部消費生活課：農薬類似成分商品の調査，平成15年5月
- 6) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則，厚生省令第34号，昭和49年9月26日
- 7) 宇都宮暁子，長谷川一夫，森康明：防虫・防ダニ家庭用品中のピレスロイド系農薬，共力剤及び忌避剤の分析と変異原性，衛生化学，43，366-375 (1997)

短報

ノロウイルスによる感染性胃腸炎
の実態把握と予防への取り組み

原田美樹, 伊東久美子, 折原直美*

Surveillance of Viral
Gastroenteritis at Chigasaki Area
in Kanagawa Prefecture,
2002.11-2003.2

Miki HARADA, Kumiko ITO
and Naomi ORIHARA*

緒 言
毎年、冬季に発生する食中毒や集団下痢症の病因物質としてはノロウイルスが上位を占めている¹⁾。平成14年神奈川県食中毒発生状況によると、県内で発生した食中毒事件の51%がノロウイルスによるもので、患者数は905人、全体の70%に相当する。これには、生カキによる食中毒のみならず、食品の二次汚染によるものと思われる集団発生も多く見られる²⁾。

一方、同時期に散発的に流行し、嘔吐、下痢を主症状とする感染性胃腸炎については医師による臨床診断のみを根拠としている。平成14年度神奈川県感染症発生動向調査において、茅ヶ崎保健福祉事務所管内での報告数は1,020件に上った³⁾。しかし、患者便等のウイルス検索による病因物質の特定はほとんど行われておらず、喫食状況との関連性についても不明な点が多い。

そこで散発する感染性胃腸炎の病因物質と原因食品を特定し、医療機関や学校、保育所、高齢者施設等の集団施設や住民に情報提供するため、また食中毒予防と感染症予防の連携による総合的なノロウイルス対策を行うために以下の調査を実施した。

調査方法
調査期間 平成14年11月～平成15年2月
調査対象 管内医療機関で協力が得られた年齢7ヶ月から14歳の患者37名

(1) 管内医療機関において、感染性胃腸炎と診断された患者の疫学情報を得るため、アンケート調査を実施し

神奈川県衛生研究所 地域調査部 茅ヶ崎分室
〒253-0041 茅ヶ崎市茅ヶ崎1-8-7
*現 企画情報部

た(表1)。質問事項は、ヒト-ヒト感染の可能性を調査するために、家族、学校等で同様の症状の人がいるか、また、食中毒の可能性を調査するために、喫食状況(貝類の有無)・どこで食べたか(自宅、外食、給食、行事食等)等に関するものである。

表1 感染性胃腸炎診断時の患者調査表

記入年月日: 年 月 日 No.				
医療機関名:				
No	質 問 事 項		内 容	
1	住 所	1 茅ヶ崎	2 寒川町	3 その他
2	年齢・性別	年齢()才、性別(男・女)		
3	診察月日 (発症月日)	平成 年 月 日 (平成 年 月 日)		
4	主 症 状	①嘔気 有・無 ②嘔吐 有(回)・無 ③腹痛 有・無 ④下痢(水様、血便、粘性) 有・無 ⑤発熱 有(°C)・無 ⑥咳等の呼吸器症状 有・無 ⑦家族、食場、学校などで同様の症状の人 有・無 それはいつ頃から		
5	病名診断(推定)	感染性胃腸炎		
6	摂食状況		貝類	主なおかず どこで
	※貝類を食べましたか。 食べた○	きょう	昼食 ○・× 朝食 ○・×	自・給・外 自・給・外
	※おもな副食物(おかず)に ついてご記入下さい。	きのう	夕食 ○・× 昼食 ○・× 朝食 ○・×	自・給・外 自・給・外 自・給・外
	※「どこで」: 自宅・外食・ 給食等調理した場所の区別	おととい	夕食 ○・× 昼食 ○・× 朝食 ○・×	自・給・外 自・給・外 自・給・外
	※集団発生時は、行事食に ご留意下さい。	その他気が付いた食事(おやつなど: いつ、どこで)		
7	検便採取など	検便	吐物	
8	食品残品の有無	有・無		
※特に、貝類に留意して下さい。				

(2) 感染性胃腸炎と診断され、協力が得られた患者の便、吐物について、ノロウイルス、アデノウイルス、ロタウイルス、食中毒菌の検査を行い、病因物質の特定を行った。検査方法については、ノロウイルスはSV Total RNA Isolation System (Promega) によりRNAを抽出、逆転写し、構造蛋白領域をターゲットとしたPCR法を実施した。1st PCRのプライマーはGenogroup I (GI) ではG1-SKF/G1-SKR (増幅断片381bp)、Genogroup II (GII) ではG2-SKF/G2-SKR (増幅断片344bp)、G2-SKF/G2AL-SKR (増幅断片344bp)を用いた。アデノウイルス、ロタウイルスの抗原検出にはイムノクロマト法による同時検出市販キット、ラピッドテスト ロターアデノ (Orion Diagnostica, 第一化学薬品)を使用した。食中毒菌は、食品衛生法上食中毒菌に指定されている13菌種について直接平板塗抹培養法を実施した。
(3) 散発例に共通性があるか確認するため、1st PCRで検出されたノロウイルス遺伝子増幅産物の塩基配列解析を、国立感染症研究所で行い、遺伝子型を特定した。

結果と考察

(1) 病因物質の特定

感染性胃腸炎と診断された患者37名のうち26名(70.3%)がノロウイルスによる発症例であり、1名(2.7%)がロタウイルスによるものであった。アデノウイルスは検出されなかった(表2)。

食中毒菌検索では、ノロウイルス検出者のうち3名(8.1%)に黄色ブドウ球菌が同時検出された。その他の食中毒菌はいずれも検出されなかった。

以上のことから、冬季に散発する感染性胃腸炎の病因物質のほとんどがノロウイルスであることが示唆された。

(2) アンケート調査による疫学情報

ノロウイルスが検出された26名について患者が発症する前に家族や兄弟に嘔吐・下痢症状があったか、あるいは学校等で同じような症状の流行が見られたかを調査した結果、15名(57.7%)が該当していた(表2)。これらは食品を媒介としないヒト-ヒト感染が疑われる事例と考えられる。

これに対して貝類が感染原因と考えられた事例は26名中5名(19.2%)であった。したがって、ノロウイルス

表2 散発事例のアンケート結果と病因物質検出状況

No.	検査対象	貝類関連	ヒト-ヒト関連	ノロウイルス (geno group)	ロタウイルス	アデノウイルス	食中毒菌
1	便			+	(G II)	-	-
2	便		○	+	(G II)	-	-
3	便	○	○	+	(G II)	-	-
4	吐物		○	+	(G II)	NT	NT
5	吐物			+	(G II)	NT	NT
6	便		○	+	(G II)	-	-
7	便	○		-	-	-	-
8	便		○	+	(G II)	-	-
9	便			+	(G II)	-	-
10	便		○	+	(G II)	-	-
11	便		○	+	(G II)	-	-
12	便			+	(G II)	-	+
13	便	○	○	+	(G II)	-	-
14	便		○	+	(G II)	-	+
15	便		○	+	(G II)	-	-
16	便		○	+	(G I)	-	-
17	便	○		+	(G II)	-	-
18	便		○	+	(G II)	-	-
19	便	○		+	(G II)	-	-
20	便			+	(G II)	-	-
21	便		○	-	-	-	-
22	便	○		+	(G II)	-	-
23	便		○	+	(G II)	-	-
24	便			+	(G II)	-	-
25	便			+	(G II)	-	-
26	便			-	-	-	-
27	便			-	-	-	-
28	便			-	-	-	-
29	便			-	-	-	-
30	便			+	(G II)	-	+
31	便			-	-	-	-
32	便			-	-	-	-
33	便			-	-	-	-
34	便		○	+	(G II)	-	-
35	便		○	+	(G II)	-	-
36	便			-	-	-	-
37	便			-	+	-	-

○：関連あり
NT：試験せず

*：食中毒菌の+は、黄色ブドウ球菌を検出した

ス感染事例は、家庭内や集団施設での飛沫等によるヒト-ヒト感染が貝類の喫食による感染を大きく上回っていた。このことから、ノロウイルス患者の発生予防のためには、学校、保育所等の集団施設や一般家庭へのノロウイルスに関する情報提供が重要であると考えられた。

(3) ノロウイルスの遺伝子型

検出された26件のノロウイルス遺伝子のうち、25件はG IIの遺伝子型で、1件のみがG Iの遺伝子型であった。感染性胃腸炎の主要原因がG IIであったことが確認された(表2)。これは全国的なG I、G IIの検出割合とほぼ一致⁴⁾、茅ヶ崎管内においても全国と同様な傾向が見られた。

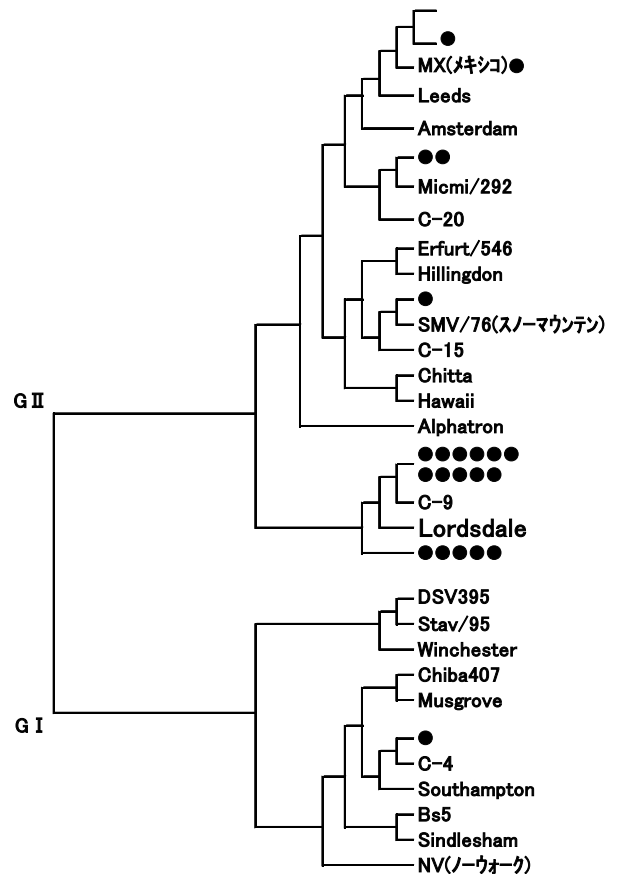


図1 ノロウイルスの構造蛋白全領域に基づく系統樹
—茅ヶ崎保健福祉事務所管内分離患者株の解析
(●：患者分離株)

また、管内患者分離株の遺伝子型を明らかにするため解析できた22株のノロウイルス構造蛋白領域に基づく系統樹¹⁾を作成した。散発事例であるにもかかわらず、管内患者分離株の遺伝子型はG IIのLordsdaleクラスターに属する株が多数を占めた(図1)。同時期に愛

媛県でも Lordsdale 株の流行が確認されており⁵⁾、遺伝学的に類似のウイルスによる感染である可能性も考えられた。

(4) 今後の課題

現在、冬季に発生する食中毒の原因としてノロウイルスが注目されている。平成14年に神奈川県で発生したノロウイルスによる食中毒のうち、生カキを原因としたものが推定を含めて14件 (45%)、食品の二次汚染によるもの、不明が17件 (55%) で、この中には調理従事者等による食品の汚染も考えられる。

ノロウイルス感染症は症状が軽く、症状が消失した後3～7日間ウイルスが便中に排出されることが知られている。また、不顕性感染によるウイルスの排出例も報告されており⁶⁾、食中毒予防には大きな困難が予想される。

今回の調査から、冬季に多発する感染性胃腸炎の大部分がノロウイルスによるものと考えられた。しかも、貝類が疑われた感染も、ヒト→ヒト感染も同じ GII であり、全国的な流行と同様であった。つまり、食中毒事件の背景には、ヒト→ヒト感染による全国的な感染性胃腸炎の流行があると考えられた。

ノロウイルス感染症は、個別には比較的軽症な経過を取るが、流行の規模が大きく、社会的な損失が大きいため、発生予防が特に望まれる疾患である。ノロウイルスによる食中毒の予防対策は、ヒト→ヒト感染による感染性胃腸炎を視野に入れたものでなければ、根本的な対策にならないのは明白である。今後もこのような原因、感染経路の調査を継続し、医療機関や学校、保育所、高齢者施設等の集団施設へのヒト→ヒト感染

の注意を喚起するとともに、一般住民への感染予防のための注意を喚起することが重要である。発生予測のためには、食品衛生と感染症対策が一体となった施策展開が強く望まれる。

今回の調査に対し検査の協力、およびご助言いただいた、国立感染症研究所ウイルス第二部第一室長、武田直和先生、および同主任研究官名取克郎先生に深謝致します。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 武田直和：ノーウォーク様ウイルス感染症，感染症発生動向調査感染症週報，3 (8)，10-13 (2001)
- 2) 神奈川県衛生部生活衛生課事務連絡：平成15年3月24日，平成14年神奈川県食中毒発生状況，(2002)
- 3) 神奈川県感染症情報センター：神奈川県感染症発生動向調査週報，平成14年45週 (2002) ～平成15年9週 (2003)
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター：臨床診断名別2002年7月～12月累計，病原微生物検出情報，24，26 (2003)
- 5) 近藤玲子ら：愛媛県において10月から流行したノーウォーク様ウイルス胃腸炎，病原微生物検出情報，24，9-10 (2003)
- 6) 柴田伸一郎ら：人に急性ウイルス性胃腸炎を起こすノーウォーク様ウイルスの感染経路ならびに不顕性感染の実態調査，大同生命厚生事業団第7回地域保健福祉研究助成報告集，179-182 (2000)

資料

肺炎マイコプラズマの 凍結保存温度と凍結保存株の 薬剤感受性試験への利用

岡崎則男¹，大屋日登美¹，渡辺祐子¹，
佐々木次雄²

Preservation of *Mycoplasma pneumoniae* in Freezing at Various Temperature and Use of the Preserved Strains for Antibacterial Susceptibility Test

Norio OKAZAKI, Hitomi OHYA,
Yuko WATANABE and Tsuguo SASAKI

肺炎マイコプラズマ（以下肺炎マ）は細胞壁を欠くため、温度、pH、超音波あるいは凍結融解等の物理化学的な刺激に対して抵抗性が低い^{1,2)}。また、液体培地あるいは寒天培地で本菌を培養し、終止期以後もそのまま放置した場合は急速に死滅する³⁾。このような肺炎マを長期間保存するために、凍結、凍結乾燥法、あるいはL-乾燥法が利用される⁴⁾が、手技の簡便性から通常は凍結法が利用される。しかし、凍結保存温度に関しては、より低温であれば良いとされているものの、温度別による保存性を比較した報告はない。また、肺炎マの増殖速度は一般細菌と比べて遅く、その上に菌株により異なる³⁾ことから、一度に多数の肺炎マ菌株を使用する薬剤感受性試験において、全株を同程度の発育レベルおよび菌数で供試することが困難であった。供試菌株を同程度の発育レベルで一端凍結し、後日、それらを一度に使用することが可能であれば、能率的な薬剤感受性試験が実施できるばかりでなく、試験の再現性も高くなると考えられる。本報では、-20、-40あるいは-80℃において数年～20年間保存した肺炎マ分離株482株について、それらの生残性を報告すると同時に、肺炎マの薬剤感受性試験における凍結菌株の使用を検討したので併せて記載する。

1982年～1999年までに神奈川県内で分離され、-20、-40、あるいは-80℃で保存されていた計482株を対象と

した。これらの菌株は、PPLO 液体培地（Difco）、ウマ血清（Gibco）15%、25%酵母エキス（自製）10%、ブドウ糖1%、ペニシリンG 10³U/ml、酢酸タリウム0.025%およびフェノールレッド0.002%から成る培地2mlにて培養後、そのまま上記温度にて凍結保存された。凍結保存株の融解は約30℃の微温湯中で行い⁴⁾、融解後、直ちに上記組成の液体培地に接種し、37℃で7～14日間培養した。一部の分離株の培養液を肺炎マ用寒天平板培地に接種し、37℃で10日間培養後、コロニー形態、ニワトリ赤血球吸着性およびTTC還元性（嫌気/好気）等を調べ⁵⁾、肺炎マとしての性状を確認した。

また、肺炎マの薬剤感受性試験に短期間の凍結保存株が使用可能かどうかを調べた。肺炎マ菌数（CFU/ml）の定量は定法⁶⁾に従った。供試薬剤はエリスロマイシン、ジョサマイシン、テトラサイクリンおよびミノサイクリンの4剤（和光純薬）で、これらは肺炎マ感染症の治療に汎用されている抗生物質である。薬剤感受性試験はマイクロプレートを使用した微量液体希釈法⁷⁾で行った。

表1に、凍結保存温度および保存期間別による肺炎マ分離株の生残性を示した。-80℃で保存した場合の生存率は10年後で100%、20年後においても86.8%であった。しかし、-40℃で10年間保存すると、70.6%の生存率となり、-20℃で12年間の保存では5.7%と極端に低下した。このように、肺炎マを10年以上の長期間に亘り保存する場合は、-80℃が適切であり、-20あるいは-40℃での保存は避けるべきと思われる。

-80℃で5年以内、同じく16～20年間、-40℃で10年間および-20℃で12年間保存されたそれぞれ62株、33株、31株および4株の計130株につき、ニワトリ赤血球吸着性およびTTC還元性（嫌気/好気）を調べたところ、全株で陽性を示し、これらの性状については凍結保存による変化は見られなかった。

表1 肺炎マイコプラズマ分離株の凍結温度および保存期間による生残性。

温度(℃)	保存期間(年)	株数	生存数	生存率(%)
-80	～5	62	62	100
	6～10	112	112	100
	11～15	149	148	99.3
	16～20	38	33	86.8
-40	10	51	36	70.6
-20	12	70	4	5.7

肺炎マの薬剤感受性試験では、通常、新鮮培養菌が使用されるが、一部の動物マイコプラズマにおいては-70℃で凍結保存した菌液が使用されている⁸⁾ことから、著

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 国立感染症研究所細菌第二部

表2 -80℃で4週間保存後における肺炎マイコプラズマの生残菌数.

菌 株	CFU / ml	
	保存後	対 照 ^{*1}
KS-1018	2.3 x 10 ⁷	8.3 x 10 ⁷
KS-1020	6.8 x 10 ⁷	1 x 10 ⁸
KS-1339	1.2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸
KS-1343	8.6 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁸
KS-1550	3.4 x 10 ⁷	2.2 x 10 ⁷
KS-1560	1 x 10 ⁸	1.2 x 10 ⁸
KS-1676	8.4 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁸
KS-1677	3.6 x 10 ⁷	6.5 x 10 ⁷
KS-1703	1 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷
KS-1990	2.8 x 10 ⁶	9.8 x 10 ⁶

*1 新鮮培養液

表3 -80℃で4週間保存後の肺炎マイコプラズマ(10株)^{*1}の薬剤感受性.

薬 剤	MIC ^{*2} (μg/ml)	
	保存後	対 照 ^{*3}
エリスロマイシン	0.012 ~ 0.024	0.006 ~ 0.024
ジョサマイシン	0.012 ~ 0.098	0.024 ~ 0.098
テトラサイクリン	0.195 ~ 1.56	0.39 ~ 1.56
ミノサイクリン	0.39 ~ 1.56	0.39 ~ 3.12

*1 表2参照

*2 最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration)

*3 新鮮培養液

者らも肺炎マの凍結 (-80℃) 菌液が使用可能かどうかを検討した. 薬剤感受性は被検菌液の菌数に大きく影響されることから, まず, 凍結保存による肺炎マ菌数の変化を調べた. 表2に示すように, -80℃で4週間保存した後の菌数は, やや減少傾向にあるものの,それほど変化していないように思われた. また, 表3に凍結保存前後における肺炎マのエリスロマイシン, ジョサマイシン,

テトラサイクリンおよびミノサイクリンに対する感受性を示した. 肺炎マのこれらの薬剤に対する感受性に変化は見られなかった. 以上の結果から, -80℃で4週間以内の肺炎マ保存株が薬剤感受性試験に供試可能であると思われるが, 今後, より多くの菌株と薬剤を使用した検討が必要である.

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 中村昌弘, 坂本博章: 人系マイコプラズマの温度, pH および振盪に対する安定性, 日細菌誌, 22, 595-599 (1967)
- 2) Kim, K.S., W.A.Clyde, JR., and F.W. Denny: Physical properties of human mycoplasma species, J.Bacteriol., 92, 214-219 (1966)
- 3) 中村昌弘: マイコプラズマ, 佐々木正五, 尾形 学, 中村昌弘 編, pp.8-27, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1974)
- 4) 柚木弘之: マイコプラズマとその実験法, 尾形 学 監修, 興水 馨, 山本孝史 編, pp.372-376, 近代出版, 東京 (1988)
- 5) 中村昌弘, 伊藤 亨, 市丸弘子: ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定, 日本細菌学会教育委員会 編, pp.23-71, 菜根出版, 東京 (1982)
- 6) Okazaki, N., M.Narita, S.Yamada, K.Izumikawa, M.Umetsu, T.Kenri et al.: Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*, Microbiol. Immunol., 45, 617-620 (2001)
- 7) 村田昌芳: マイコプラズマとその実験法, 尾形 学 監修, 興水 馨, 山本孝史 編, pp.441-448, 近代出版, 東京 (1988)

資料

Surface Plasmon Resonance センサーを使用した レジオネラ属菌の迅速検出法

渡辺祐子¹, 板垣康治², 大屋日登美¹,
岡崎則男¹

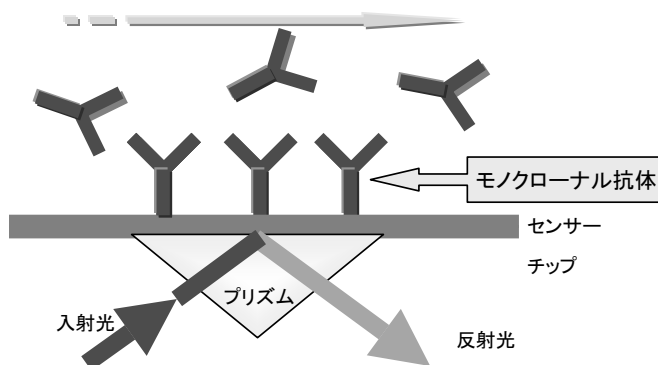
Rapid Detection of Genus *Legionella* by Surface Plasmon Resonance Sensor

Yuko WATANABE, Yasuharu ITAGAKI,
Hitomi OHYA and Norio OKAZAKI

温泉や冷却塔水などの環境水中のレジオネラ属菌の検出には培養法^{1,2)}が使用されているが、レジオネラ属菌は発育が遅いため、結果を得るまでに10日近くを要する。このため、レジオネラ属菌の迅速検出法の必要性から、遺伝学的手法をはじめ ELISA、蛍光抗体法などを利用した検査法が検討され、現在、これらの方法を応用した市販キットも存在する。今回、これまでの検出法とは全く異なる手法を用いた Surface Plasmon Resonance センサー (SPR センサー) によるレジオネラ属菌の迅速検出法を検討する機会を得たので概略を報告する。

SPR センサーは抗原・抗体複合物等の結合物質を迅速に検出する装置である。抗原あるいは抗体を金属薄膜に蒸着したセンサーチップ表面に固定化し、このセンサー

モノクローナル抗体の固定化



チップ上に固定化された抗原あるいは抗体に作用する物質を含む試料を一定量流し、抗原抗体反応を起こさせ、この時生じる微妙な金属表面の変化を表面プラズモン共鳴*という光学現象を用いて検出し、センサグラムと呼ばれるグラフにより表示する。このように従来の細菌検査法と異なり、定性試験と同時に既知濃度の試料をもとに作製した検量線を用いて定量検査を行うことができる。さらに、光学的な変化を直接検出する手法であるため標識を行う必要が無く、短時間で測定できるとともに少量の試料で検出することが可能という特徴を有している。

(*: 表面プラズモン共鳴とは、ある特定の角度から入射した光は金属表面プラズモンと共鳴し吸収されるが、このとき金属膜の表面で抗原抗体反応等が発生すると、反射光が高感度に変化するという原理を利用している(図1).)

測定装置は Biacore 3000(ピアコア社製) を使用し、センサーチップとして CM5チップ (カルボキシシルメチル基を導入) を用いた。抗体は、抗 *Legionella pneumophila* 血清群 1 (以下 *L.pneumophila*SG1) モノクローナル抗体マウス(以下 MAb)IgG1(Biogenesis), MAb IgG3(PROGEN), MAb IgM (Biogenesis) の3種と同じく抗 *L.pneumophila* 血清群1-14ポリクローナル抗体ヒツジ (以下 PAb) IgG (CORTE) を使用した。供試菌株として *L.pneumophila* SG1 ATCC 33152 及び *L.dumoffii* ATCC 33279 を使用した。

測定試料 (抗原) は各菌株を BCYE α 寒天培地にて36℃, 3日間培養後コロニーを PBS (pH7.2) に浮遊させ、マクファーランド4の濃度になるように調整し、この菌液を95℃10分間加熱した。さらに、加熱菌液の2分の1を超音波破碎処理 (BRANSON 250D) して破壊菌を作

抗原抗体反応と反射光の変化

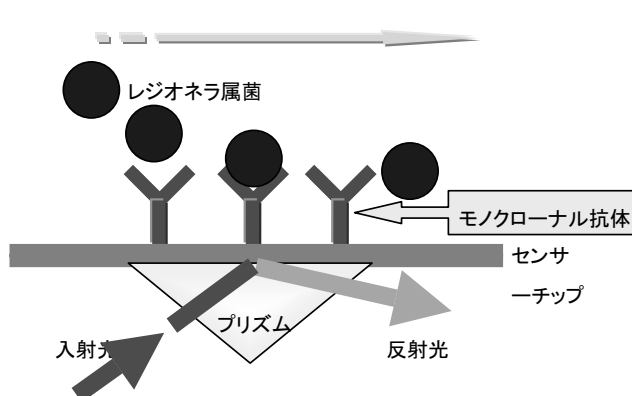


図1 SPR センサーの測定原理

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 理化学部

り、加熱菌、加熱破壊菌の2種類の抗原液を準備した。なお、感染被害の危険防止を考慮し、測定には生菌を使用しなかった。測定時にこれらの抗原液を移動相 (1mM HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Surfactant P20) で希釈し、 1×10^7 CFU/ml 相当の抗原液とした。これらを更に希釈し、 2×10^6 , 1×10^6 , 2×10^5 , 1×10^5 CFU/ml 相当の抗原液を作製した。

次に使用抗体について、レジオネラ属菌との反応性をELISAで確認した。ELISAは、概ね Helbig らの報告³⁾に従ったが、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識の抗マウス IgG1抗体 (ICN Biomedicals, Inc) 及び抗ヒツジ IgG 抗体 (ICN Biomedicals, Inc) を、基質としては p-nitrophenylphosphate (Bio-Rad) を用いた。

まず、各抗体の *L.pneumophila*SG1 に対する反応性を確認したところ、MAb IgG3, PAb IgG は良好な反応性を示した。MAb IgG1 は MAb IgG3 に比べ10分の1程度の反応性であったが、破壊菌抗原に対しては全菌体抗原より強く反応した。非特異反応の有無を確認する目的で *L.dumoffii* の反応性をみたが、各抗体に対する反応性は低かった。なお、MAb IgM については、2次抗体の入手ができなかったため確認をしなかった。

Biacore 3000 の操作手順としては、まず、センサーチップ (CM5チップ) を装置にセットし、移動相を用いて装置の安定化を行った。使用抗体は、固定化溶液 (10mM 酢酸ナトリウム pH4.5) でタンパク質量 $10 \sim 15 \mu\text{g/ml}$ になるように希釈した後、図2のような手順でアミノカップリング薬 ($50 \mu\text{M}$ Ethyl-3-carbodiimide hydrochloride, $200 \mu\text{M}$ N-hydroxysuccinimide) でチップの活性化、抗体の固定及び $1 \mu\text{M}$ ethanolamine-HCl によるブロッキングを行い、固定化をした。チップ接触時間は通常、活性化、固定化の順に各7分ずつ行うが、今回は、固定化

量を多くするため固定化時間を15分とした。上記抗体の内、MAb IgG3と PAb IgG 抗体は固定化できなかった。

次に測定を行ったが、測定条件は Biacore3000 の既定条件に従った。同一抗体による繰り返し測定を行うため、センサーチップ上で結合した抗原を解離溶液 (10mM グリシン-塩酸緩衝液) で解離した。MAb IgG1 との結合抗原は解離したが、MAb IgM との結合抗原はセンサーチップに固定した MAb IgM も同時に解離することから、通常 $5 \mu\text{l/min}$ の移動相の流速を $10 \mu\text{l/min}$ にあげて洗浄することにより解離させた。

SPR センサーによる *L.pneumophila*SG1 測定結果を図3のセンサグラムと表1及び表2に示した。測定結果は、センサーチップ上の質量変化をピアコア独自の単位であるリゾナンスユニット (RU) で表した。 ($1000\text{RU} = 1\text{m}^2$ 当たり 1ng の変化) 検出限界は暫定的にシステムのシグナル強度 10RU としたところ検出限界は、ともに 2×10^5 であった。MAb IgG1 に対する反応は加熱菌に比べ加熱破壊菌の反応が高く、ELISA の結果と同様であった。

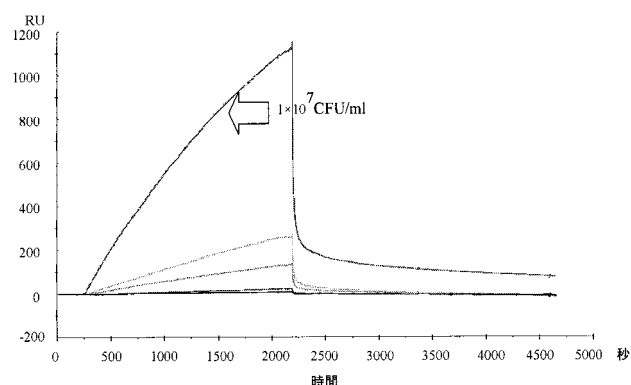


図3 *L.pneumophila*SG1を検出したセンサグラム
(モノクローナル IgM 固定化)

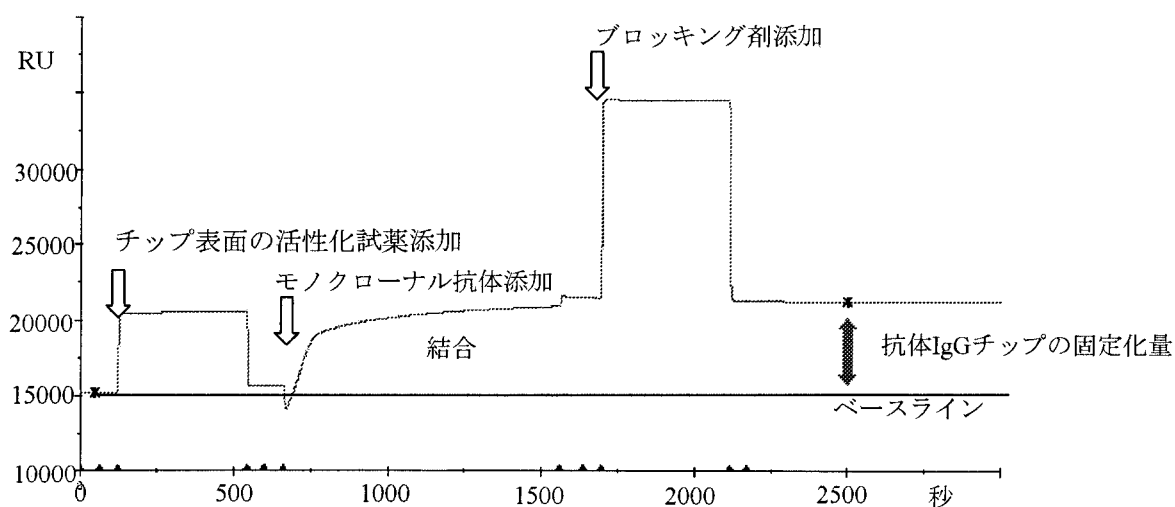


図2 モノクローナルの抗体固定の手順

表1 モノクローナル抗体 IgG1をセンサーチップに固定時の *L.pneumophila* の結合量

<i>L.pneumophil</i> 濃度 (CFU/ml)	1×10^5	2×10^5	1×10^6	2×10^6	1×10^7
加熱菌 (RU)	5.3	12.45	83.19	171.39	712.86
加熱破壊菌 (RU)	5.96	28.21	148.43	272.96	802.21

表2 モノクローナル抗体 IgM をセンサーチップに固定時の *L.pneumophila* の結合量

<i>L.pneumophila</i> 濃度 (CFU/ml)	1×10^5	2×10^5	1×10^6	2×10^6	1×10^7
加熱菌 (RU)	6.7	18.7	128	255.5	1086.6

このように、SPR センサー (Biacore3000) による *L.pneumophila*SG1の検出は可能であり、検出限界は 2×10^5 CFU/ml であった。しかし、この方法の検出感度は培養法によるそれ (10CFU/100ml) と比べて10万分の1と低く、実用に供するには今後大幅な改善が必要と思われる。今回使用した4種の抗体のうち、3種は事前にELISAで *L.pneumophila*SG1に対する反応性を確認しており、その結果から全ての抗体がSPRセンサーでの使用が可能と考えられたが、MAb IgG3と PAb IgG 抗体はセンサーチップに固定することが出来なかった。従って、SPRセンサーの感度向上には反応性の高い抗体の模索と同時にセンサーチップ上への固定化方法の検討が必要と考えられた。

謝 辞

今回の実験を進めるに当たり、ピアコア社営業部 大橋誠様に多大なご協力を得たことを記し、関係各位に深謝します。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課監修：新版レジオネラ症防止指針，財団法人ビル管理教育センター，東京 (1997)
- 2) 水質試験等調査専門委員会：上水試験方法2001年版，社団法人日本水道協会，東京 (2001)
- 3) Jorgen Herbert Helbig, John B.Kurtz, Maddalena Castellani Pastoris, Carmen Pelaz, Paul Christian Luck : Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies:possibilities and limitations for division of the species into serogroups, J.Clin.Microbiol, 35 :2841-2845(1997)

資料

小学校等で飼育されている鳥類の *Chlamydophila psittaci* 保有状況

寺西 大¹, 古川一郎¹, 長谷川幸江^{1*},
尾上洋一¹, 高野博道², 木村真紀子²,
小野内章², 澁谷世司², 大坂周蔵²

Prevalence of *Chlamydophila* *psittaci* from Birds, Bred in Elementary School.

Hiroshi TERANISHI¹, Ichiro FURUKAWA¹,
Yukie HASEGAWA^{1*}, Youichi ONOUE¹,
Hiromichi TAKANO², Makiko KIMURA²,
Akira ONOUCHI², Seiji SHIBUYA²
and Shuzou OSAKA²

オウム病は、オウム病クラミジア *Chlamydophila psittaci* (*Chlamydia psittaci*) を病原体とし、オウム、インコ類などの愛玩鳥からヒトに感染する動物由来感染症である。ヒトにおいては、インフルエンザ様の症状を呈し、重篤な例では、肺炎や脳炎に発展する。

わが国では1999年4月に感染症法が施行され、本症が4類感染症として届け出が義務化され、発生数が把握されるようになった。2001年末から2002年初頭にかけての鳥根県の動物展示施設での、飼育担当職員及び来園者の17名のオウム病集団発生は大きな社会問題となった。

現在国内での飼育鳥の *C.psittaci* 分離率は10～53%にも及び¹⁾、この *C.psittaci* 保菌鳥からヒトへの感染の危険性が疑われている。また、その多くは不顕性感染と推定される。

神奈川県では2000年4月から厚生労働省の「動物由来感染症予防体制整備事業」に基づき、県民の健康維持、公衆衛生の向上を図る目的で動物由来感染症に関する正しい知識の普及、様々な感染症の病原体保有状況に関する情報を調査分析する事業を、動物保護センター、衛生研究所が中心となって、関係機関の協力を得て実施している。

今回、県内小学校等で飼育されている鳥類の糞便につ

いて、*C.psittaci*の検出を試みたので、その調査結果及び対応について報告する。

2002年10月～2003年7月まで、県内の津久井地域及び足柄地域の小学校35校及び動物保護センター禽舎の計36施設で飼育されている鳥類56検体の糞便を採取し検査に供した。また、2003年10月～2004年2月までの期間に県中央地域の小学校47校で飼育されている鳥類48検体の糞便を同様に採取し、検査に供した。1禽舎に対して1検体試料を採取するものとし、同じ禽舎で複数飼育されていても、複数羽の糞便を集めて1検体とした。

検査の結果、*C.psittaci*が検出された場合には、治療し、再検査を行い、陰性化を確認した。

検査は「小鳥のオウム病の検査法等ガイドライン（暫定版）」²⁾に準拠したEIA法及びPCR法によりクラミジア科（*Chlamydophila*属及び*Chlamydia*属）抗原の検出を試みた。

2003年10月以降の検体については、2003年3月に改訂された「小鳥のオウム病の検査法等ガイドライン」³⁾に準拠してPCR法で検査を行った。

EIA法はイデア PCEクラミジア（協和メディックス）を使用した。このキットは、クラミジア科共通抗原を認識するため、スクリーニングとして使用し、PCR法で確認した。

Template DNA 作製のためQIAamp® DNA Stool Mini Kit（キアゲン）を用いて糞便から試料調製を行った。

200mgの検体を2.0mlのマイクロチューブに入れて氷上に置き、Buffer ASL 1.4mlを添加後、1分間ボルテックスミキサーにより混合した。この懸濁液を70℃で5分間加熱後、15秒間ボルテックスを行い、15,000rpmで1分間遠心した。上清 1.2mlを新しい2.0mlのマイクロチューブに入れ、Inhibit EX 錠1個を添加し、直ちに1分間ボルテックスを行った。室温で1分間静置後、15,000rpmで3分間遠心し、すべての上清を新しい1.5mlのマイクロチューブに入れ、15,000rpmで3分間遠心した。新しい1.5mlのマイクロチューブに15μlのProteinase Kを入れておき、これに遠心後の上清0.2mlとBuffer AL 0.2mlを加えてボルテックス後、70℃で10分間加熱した。この試料に99.5%エタノール（和光純薬）を0.2ml加えてボルテックス後、QIAamp スピнкаラムに添加した。15,000rpmで1分間遠心して濾過液を除去し、QIAamp スピнкаラムにBuffer AW1を0.5ml添加し、15,000rpmで1分間遠心後、濾過液を除去した。さらにBuffer AW2を0.5ml添加し、15,000rpmで3分間遠心後濾過液を除去した。新しい1.5mlのマイクロチューブにQIAamp スピнкаラムを設置し、Buffer AEを0.2ml添加して室温で1分間静置後、15,000rpmで1分間遠心した。

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
* 現 神奈川県衛生研究所 地域調査部
2 神奈川県動物保護センター

回収した約0.2ml を Template DNA 溶液として以下のPCRに使用した。なお、上記のDNA抽出は、すべてキットの試薬を使用した。

PCR反応のプライマーは、Yoshidaら⁴⁾により報告されたクラミジア科に特異的な Major Outer Membrane Protein (MOMP) 遺伝子内の245-259bpを増幅させるために設計された2種類の合成オリゴヌクレオチド (CM1: CAGGACATCTTGTCTGGCTT, CM2: CAAGGATCGCAAGGATCTCC) を用いた。PCR反応液は、10XPCR GOLD Buffer 5 μ l, dNTP Mix (2mM each dNTP) 5 μ l, 25mM MgCl₂ Solution 3 μ l, AmpliTaq Gold (5U/ μ l) 0.25 μ l (以上アプライドバイオシステムズ社), プライマー (20pmol/ μ l)を各1 μ lずつ, Template DNA 溶液を5 μ l, 滅菌精製水30 μ lを加えて全量を50 μ lとした。反応はタッチダウンPCRを行った。すなわち、94°C10分の後、94°C20秒、65°C20秒、72°C30秒を10サイクル繰り返すが、このときアニーリング温度を1サイクルごとに1°Cずつ下げ、さらに94°C20秒、55°C20秒、72°C30秒を35サイクル繰り返し、72°C 5分の最終伸長反応を行った。反応後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドによる染色後、紫外線照射により245-259bpのDNA断片の有無を確認した。クラミジア科遺伝子が検出された検体について、残りのPCR反応液からDNA精製キット GeneClean (BIO101)を用いて検出DNAを精製し、制限酵素処理を行った。PCR反応液から精製されたDNA断片について、Yoshida

ら⁴⁾の方法に従い、*AluI* (タカラバイオ) 及び *PvuII* (タカラバイオ) の2種類の制限酵素を用いてクラミジア科の種の同定を試み、PCRで増幅されたDNAが、これら2種類の制限酵素により切断されたことで *C.psittaci*を確認した。

2002年10月に採取した検体は、スクリーニング検査としてEIA法を用いて検査を行った結果、56検体中51検体(91.1%)がクラミジア科抗原陽性になった。確認のためにPCR検査を実施したところ、36施設で飼育されている鳥類56検体中7施設7検体から *C.psittaci*が検出された。陽性率は12.5%であった(表1)。2003年10月以降の検査はEIA法がガイドラインから削除されたため、PCR法のための検査を実施し、47施設で飼育されている鳥類48検体で2施設2検体から *C.psittaci*が検出された。陽性率は4.2%であった(表2)。

陽性の検体については、治療後再検査を行い、陽性検体の認められた動物保護センターの禽舎に侵入した、野生のスズメの糞便1検体についても検査を行った。

2003年2月の再検査では前回検査で陽性だった7検体のうち1検体が死亡したため、6検体について検査を実施したが1検体が再度陽性になり、治療を継続し、2003年7月の再々検査で陰性化した。野生のスズメの糞便1検体からも *C.psittaci*が検出された(表3)。

2003年10月の検査で陽性となった2検体は治療後の再検査でいずれも陰性化した(表4)。

表1 飼育鳥類糞便禽舎別のPCR法による *Chlamydophila psittaci* 検出状況 (2002年10月実施)

種 類	検 体 数	<i>C. psittaci</i> 検 出 数	陽 性 率 (%)
ニワトリ 等	4 0	6	15.0
ハト	6	0	0
インコ 等 小鳥	8	0	0
アヒル 等 水鳥	1	0	0
キンケイ	1	1	100
合 計	5 6	7	12.5

表2 飼育鳥類糞便禽舎別のPCR法による *Chlamydophila psittaci* 検出状況 (2003年10月実施)

種 類	検 体 数	<i>C. psittaci</i> 検 出 数	陽 性 率 (%)
ニワトリ 等	3 5	1	2.9
インコ 等 小鳥	9	1	11.1
キンケイ	1	0	0
ニワトリ, インコ	1	0	0
ニワトリ, アイガモ	1	0	0
ウコッケイ, キジ	1	0	0
合 計	4 8	2	4.2

表3 *Chlamydia psittaci*感染鳥治療成績Ⅰ

No.	種 類	飼育施設	検 査 結 果	再 検 査 結 果	再々 検 査 結 果
			2002 年 10 月 実 施	2003 年 2 月 実 施	2003 年 7 月 実 施
1	ウコッケイ	A 小学校 禽舎	+	—	
2	チャボ	B 小学校 禽舎	+	—	
3	チャボ	C 小学校 禽舎	+	—	
4	ウコッケイ, チャボ	D 小学校 禽舎	+	+	—
5	キンケイ	E 小学校 禽舎	+	—	
6	チャボ	動物保護センター 禽舎	+	—	
7	スズメ (野鳥)	動物保護センター 禽舎	+		

表4 *Chlamydia psittaci*感染鳥治療成績Ⅱ

No.	種 類	飼育施設	検 査 結 果	再 検 査 結 果
			2003 年 10 月 実 施	2004 年 2 月 実 施
1	セキセイインコ	F 小学校 禽舎	+	—
2	チャボ, ウコッケイ, 雑種	G 小学校 禽舎	+	—

*C.psittaci*が検出された小学校においては、動物保護センター職員が禽舎の清掃・消毒について指導を行った。また、児童による清掃等は自粛してもらった。併せて開業獣医師による抗生剤治療を行った。治療方法は、餌または飲水に抗生剤を混ぜる方法で、水分の多い野菜等の給餌は控えてもらった。動物保護センターにおける陽性鶏についても禽舎の清掃・消毒および隔離を行った。治療については、抗生剤1日1回筋肉注射を7日間連続実施と併せて、抗生剤飲水投与を1ヵ月半行った。同居陰性鶏についても同様に、予防措置として飲水投与と治療を行った。また、陽性鶏の認められた禽舎については、金網等により野鳥の侵入を防ぐ措置と、定期的な消毒等の予防措置を行っていくこととした。

2002年1月に示された暫定版のオウム病の検査法等ガイドラインでは、EIA法によるスクリーニング検査は有効としていたが、2003年に改訂されたガイドラインではEIA法は削除されている。これは、国立感染症研究所が実施したPCR法との比較試験でEIA法のキットは特異性と感度の点で劣り、トリからのオウム病クラミジア抗原の検出におけるスクリーニング検査としては適当でないことが判明したためである。今回の成績においても2002年10月に実施したEIA法によるスクリーニング検査では非特異反応と考えられる陽性例が多数認められ、91.1%が陽性と判定されており、このことを裏付けていると推察された。

今回の調査で、小学校飼育鳥に*C.psittaci*感染が認められたが、オウム病の症状を示している個体は認められず、不顕性感染であることが示唆された。

小学校で飼育されることの多いニワトリやインコ類は*C.psittaci*に抵抗性を示し、不顕性感染となる例が多いので、その飼育には十分な注意が必要である。また、トリの治療に抗生物質を投与しても、わずかでも抗生物質が存在していればクラミジアが分裂せずに、細胞内に基本

小体として潜伏する⁹⁾ため、持続感染している*C.psittaci*を完全に排除できない場合がある。これは、基本小体に代謝活性がなく、ほとんどの抗生物質が効力を発揮しないことによる。従って、治療により、いったんは陰性化した個体でも定期的な調査が必要であると考ええる。

また、今回、禽舎に侵入する野生のスズメの糞便から*C.psittaci*を検出しており、禽舎に侵入する野鳥も*C.psittaci*を保菌していることが確認された。学校飼育鳥をオウム病感染から防ぐためにも、禽舎は野鳥の侵入を防ぐ構造にする必要がある。

学校飼育動物は鳥類が多く、それらの動物由来感染症に関する調査はほとんど行われていない。今後も調査を継続し、オウム病をはじめ人獣共通感染症に関する知見を集め、児童が安全に動物たちの近くで直に観察できる環境を整備していくことが必要と考える。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 三宅恭司, 森下高行: 鳥類のオウム病, 獣医畜産新報, No.802, 290-296 (1988)
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課: 平成14年1月22日付事務連絡「小鳥のオウム病の検査法等ガイドライン (暫定版)」, 厚生労働省, (2002)
- 3) 岡部信彦: 厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「動物展示施設における人と動物の共通感染症対策ガイドライン」作成に関する研究分担研究報告書, (2003)
- 4) Yoshida, H., Kishi, Y., Shiga, S. and Hagiwara, T.: Differentiation of *Chlamydia* Species by Combined Use of Polymerase Chain Reaction and Restriction Endonuclease Analysis, Microbiol. Immunol., 42, 411-414 (1998)
- 5) 真田直子, 真田靖幸: 鳥クラミジア症, 獣医畜産新報, 57, 380-386 (2004)

資料

神奈川県における恙虫病の 発生状況 (平成14年度, 15年度)

古屋由美子, 片山 丘, 原みゆき*, 高橋孝則,
今井光信

Occurrence of Tsutsugamushi Disease in Kanagawa Prefecture (2002, 2003)

Yumiko FURUYA, Takashi KATAYAMA,
Miyuki HARA*, Takanori TAKAHASHI
and Mitsunobu IMAI

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, 日本各地で春期や秋期に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再び急増し, 1984年には約1,000名の患者発生に至った。その後患者数は徐々に減少する傾向であったが, 2000年には一時増加がみられた。しかし2003年に全国での患者数は約400名と減少した。神奈川県でも1990年に112名の患者が報告されたが, その後減少傾向を示し, 1996年, 1997年には9名にまで減少した。しかし1998年より増加傾向に転じ, 1999年35名, 2000年42名の患者が報告されたが, 再び2001年7名, 2002年4名, 2003年5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った。検査体制は従来行っていた immunofluorescence assay (IF) による血清診断に加え, 1994年より polymerase chain reaction (PCR) による恙虫病の迅速診断および感染株の型別を行うことにより, 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。

2002年4月から2004年3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16例, 秦野保健福祉事務所管

内2例, 小田原保健福祉事務所管内1例, 平塚保健福祉事務所管内1例の合計20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 (4倍以上の差) により9例が恙虫病患者と診断された。また急性期の血液のみの搬入で, IF では判定できず判定保留となったものが5例あり, 他の6例は抗体が検出されず陰性であった。

IF で陽性であった9例のうち, PCR による急性期の血液を用いた *Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*) DNA の検出では7例から DNA が検出され, 早期に診断が可能であった。また IF で判定保留の1例は DNA が検出され, 陽性と判定された。*O. tsutsugamushi* DNA の検出では8例が恙虫病と診断された。しかし IF で陽性であった2例で DNA が検出されなかった。以上のことから IF と PCR の検査を併用することにより, IF で判定保留の例や PCR で DNA が検出されない例についても診断が可能であった。

PCR により *O. tsutsugamushi* DNA の検出された8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った (表1)。この結果, 今回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1例 (12.5%), 6例 (75%) および1例 (12.5%) 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, 足柄上郡山北町に集中しており過去の発生状況と同じであった。

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が, 今回, 細胞培養により病原体 *O. tsutsugamushi* が3例分離された。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, 2例 (検体番号2003-5, 2003-8) が Kawasaki 株特異的のモノクローナル抗体と1:3200倍以上の反応性が示され, Kawasaki 株と同定された。1例 (検体番号2003-4) は Kuroki 株特異的のモノクローナル抗体と1:3200倍以上の反応性が示され, Kuroki 株と同定された。また PCR による型別においても特異的のプライマーにより DNA の増幅が見られ, IF の結果と同様に Kawasaki 株と Kuroki 株に型別され, 恙虫病患者から病原体が確認された。

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60%を占めていた。また感染時の行動は, 畑, 田圃などでの農作業が多く, 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った。

恙虫病は適切な薬剤投与により完治する病気であるが、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

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16年7月28日受理)

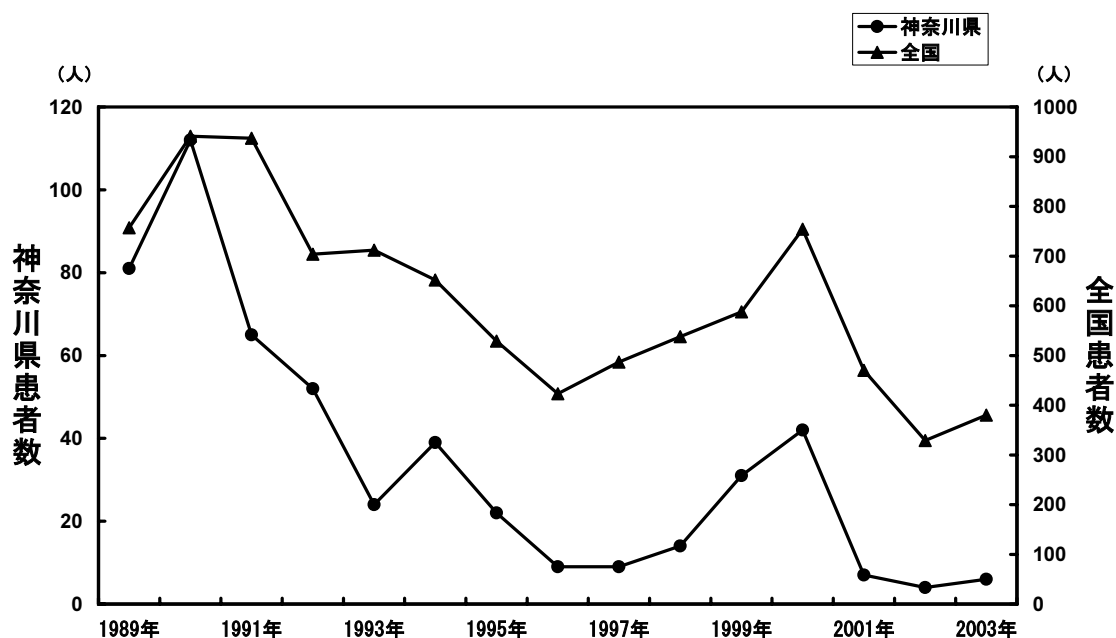


図1 恙虫病患者発生状況

表1 恙虫病患者の 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			
2002-1	女	75	2002/5/18	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
2002-2	男	43	2002/5/28	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2002/6/5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
2002-3	男	54	2002/6/15	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2002/10/29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陰性	陽性
2002-4	男	63	2002/11/4	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	320	80	陽性	陰性	陽性
			2002/11/6	80	<10	<10	<10	<10	<10	320	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
2002-5	男	68	2002/11/14	320	40	160	<10	320	<10	320	40	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2002/11/18	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
2002-6	男	45	2002/12/3	160	80	<10	<10	160	<10	640	160	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2002/11/25	80	<10	20	<10	40	<10	320	<10	20	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
2002-7	女	8	2002/12/11	320	20	160	<10	160	<10	640	80	160	<10	陰性	陰性	陰性
			2002/11/27	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
2003-1	男	56	2002/12/16	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2003/4/22	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
2003-2	男	64	2003/5/12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2003/10/14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
2003-3	男	81	2003/10/21	640	<10	10	<10	10	<10	2560	640	10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2003/10/22	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
2003-4	男	77	2003/11/4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2003/10/30	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kr)	陽性
2003-5	男	42	2003/11/10	160	40	640	40	640	40	160	20	2560	160	陽性	陽性(Kr)	陽性
			2003/10/30	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
2003-6	男	65	2003/10/31	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2003/11/12	2560	40	640	20	320	20	5120	640	1280	20	陽性	陰性	陽性
2003-7	男	27	2003/11/1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2003/11/15	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
2003-8	男	62	2003/12/1	640	<10	20	<10	20	<10	2560	<10	20	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2003/12/15	1280	40	20	40	20	20	2560	2560	20	20	陽性	陽性(Kw)	陽性
2003-9	男	57	2003/12/10	80	<10	160	<10	80	<10	80	<10	80	<10	陽性	陽性(Kp)	陽性
			2003/12/17	2560	80	2560	640	2560	20	640	<10	2560	160	陽性	陽性(Kp)	陽性
2003-10	男	51	2003/12/15	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
			2003/12/21	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2003-11	男	54	2003/12/21	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2003-12	男	20	2003/2/25	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2003-13	男	66	2004/3/16	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性

Kw : Kawasaki 株, Kr : Kuroki 株, Kp : Karp 株

資料

食品中の鉱物性異物 及び金属片異物の検査事例

藤巻照久¹, 佐藤久美子¹,
萬年一剛², 岸 美智子¹

The Inspected Examples of Foreign Mineral and Metal Substance in Food

Teruhisa FUJIMAKI, Kumiko SATO,
Kazutaka MANNEN and Michiko KISHI

最近、行政から依頼された鉱物性異物及び金属片異物の3事例について報告する。

事例1

「直巻きおにぎり 鮭わかめ」(平成13年11月製造)を届出者(埼玉県在住)が食べたところ、素焼き様片の異物が歯にあたり、製造所所在地を管轄する津久井保健所に届け出たものである。

試料は、おにぎり中の素焼き様異物である。使用した機器は、実体顕微鏡オリンパス社製 SZX9, 偏光顕微鏡ニコン社製 OPTIPHOTO 2-POL, X線回折装置(以下, XRD) 理学電機工業社製 Miniflex である。

異物は長径約6mmで長軸の両端が錘形をなす三角柱状で一面は平面をなす。硬質緻密で淡黄橙色を呈する陶器状ないし岩片状の物質である。やや淡色の四角形の物質を含み(以下, 包有物), これがあるため火山岩に一

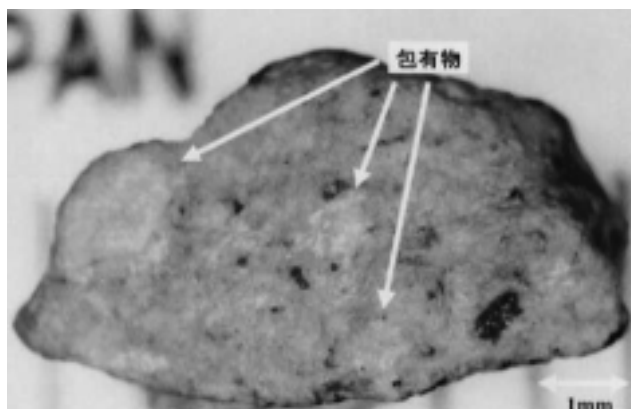


図1 おにぎり中の素焼き様異物

- 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 神奈川県温泉地学研究所 研究部

般的な斑晶組織を呈するようにも見える(図1)。異物の薄片を作成し、偏光顕微鏡下で観察した結果、異物中に大きさ約0.25~0.5mmの石英結晶が顕微鏡視野の15~20%散在する。気泡などなく緻密である(図2)。包有

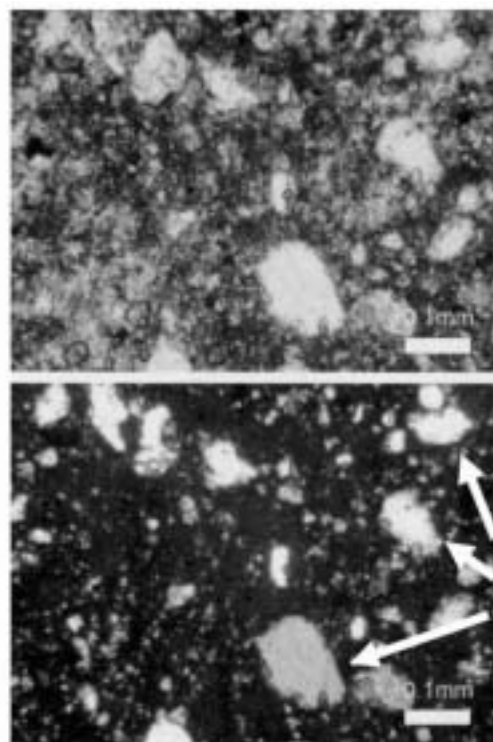


図2 異物の偏光顕微鏡写真
(上:開放ニコル, 下:直行ニコル)

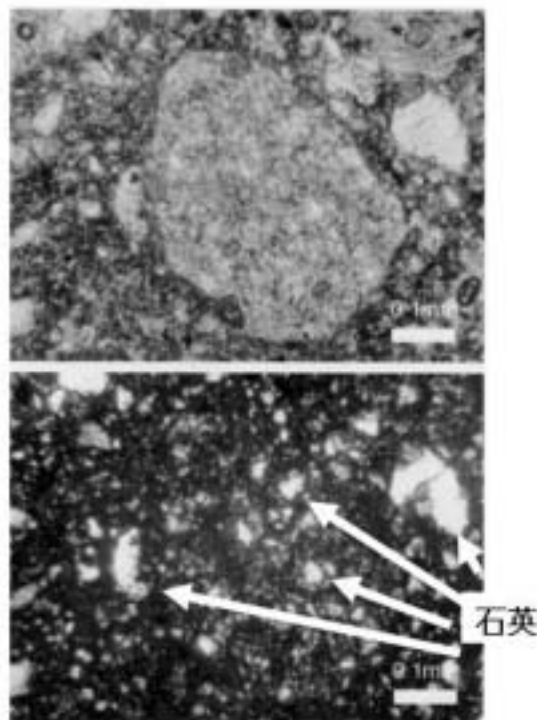


図3 含有物の偏光顕微鏡写真
(上:開放ニコル, 下:直行ニコル)

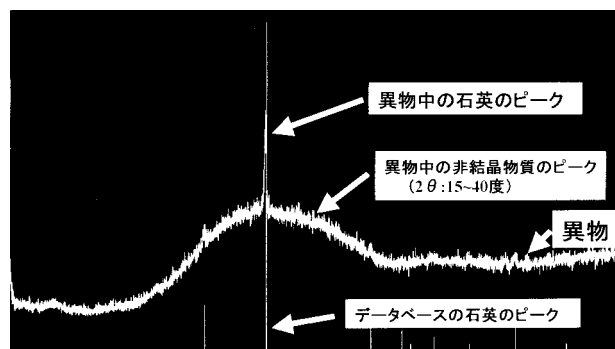


図4 異物のX線回折プロファイル

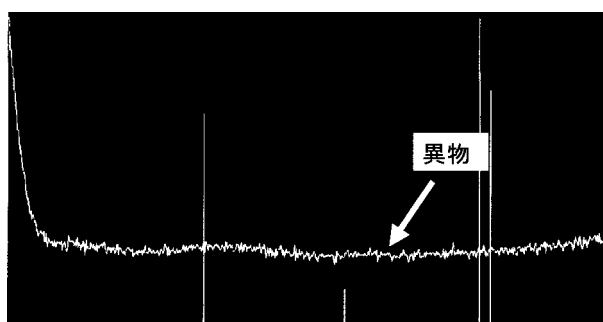


図5 低角度領域における異物のX線回折プロファイル

物は異物全体と同質である(図3)。異物をすりつぶし、水に懸濁させてスライドガラス上に塗布し、乾燥させたものをXRDで分析を行った。その結果、石英のピークが認められたほか、測定角度(2θ)において15~40度になだらかな高まりが認められる(図4)。このなだらかな高まりは大量の非結晶物質(アモルファス、ガラス状物質)の存在を示している。一方、粘土鉱物の特徴的なピークが出現する0~15度(2θ)付近のスキャンのピークは不明瞭であった(図5)。従って粘土鉱物はほとんど入っていないものと判断される。

鉱物は高温(1000℃以上)で焼成すると一般的にアモルファス化して、粘土鉱物が検出されなくなる。天然物でアモルファス化した岩石は凝灰岩に見られるはずの斜長石の存在がないため天然の岩石ではない可能性が高い。形状的なことから一面がほぼ水平な面であることやこの面では包有物が露出せず、それ以外の破断したような形状を呈する面にのみ包有物が見られることも本異物が何らかの人為的操作によって形成されたものと思われる。高温で焼成された人為的なものから仮にセラミックであるとする磁器ないしストーンウェアが考えられる。磁器はFeを除去し白色である。本異物は白くないが磁器と同じように緻密な素地をしている点や原料に長石を用いていない点からストーンウェアである可能性が高い。ストーンウェアは耐熱性、耐酸性を要求されるパイプや反応管、電解槽、歩道煉瓦に用いられる。また、伝統的

な焼物のうち常滑焼や備前焼などもストーンウェアに分類される。

以上のことから本異物は天然物ではなくストーンウェアに代表される高温(1000℃以上)で焼成された人工的な物質である可能性が高いものと思われる。

事例2

ゆで麺(平成15年4月製造)に金属片が付着しているとの苦情があり、製麺所所在地を管轄する鎌倉保健所から破損したシャワー(ゆで麺洗浄用)の金属片組成と異物金属片組成の同一性について依頼があった。試料は製麺中の金属片異物、ホース接続部とシャワーヘッド接続部分及びシャワーヘッド根本部分である。使用した機器は、光学反射顕微鏡ニコン社製 OPTIPHOTO-100、電子線微小領域分析装置 日本電子社製 JXA-8900R である。

ホース接続部とシャワーヘッド接続部分の地金は、いずれも黄色い金属光沢があり、真鍮と推定された。一方、製麺中の金属片異物は、白色の金属光沢があり、ざらざらとした表面であった。シャワーヘッドの部品にも地金をつなぎ合わせる部分に同様の金属が用いられていた。これら白色の金属光沢を持つ物質ははんだの類であることがわかった。はんだは必ずしも均質ではなく、直径0.1~0.4mmの暗灰色の金属粒子(以下、はんだ包有物)を含んでいた。はんだは、Snを主成分とし、他の元素は明瞭には検出できなかった。はんだ中の包有物は、Sn以外の元素を含んでおり、製麺中の金属片異物(図6)とシャワーヘッド根本部分(図7)はSn以外の元素がPb及びPで、Siを含まず、ピーク強度も一致しておりほぼ同一物質と判断される。ホース接続部とシャワーヘッド接続部分(図8)のはんだ包有物は前述の2試料と同様にPb、Pを含むが、ピーク強度が異なる上にSiを含むことがわかった。従って異物金属片及びシャワーヘッド根本の地金をつなぎあわせる部分は、いずれもSnを主成分とするはんだであり、また包有物の特徴も一致することから同一物質と考えられる。

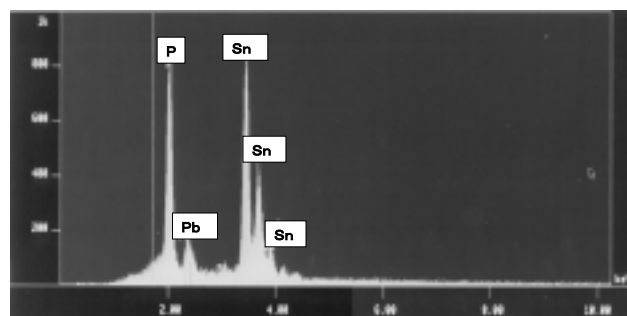


図6 製麺中の金属片異物(はんだ含有物)のスペクトル

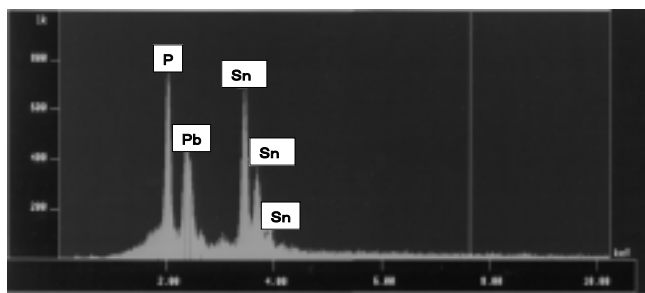


図7 シャワーヘッド根本部分（はんだ含有物）のスペクトル

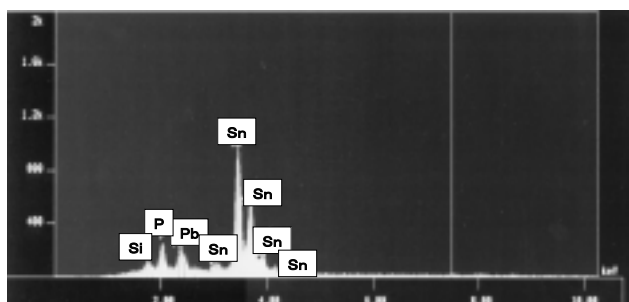


図8 ホース接続部とシャワーヘッド接続部分（はんだ含有物）のスペクトル

事例3

おにぎりを食べたところ金属様異物が発見されたので、購入者は秦野保健所に届け出た（平成16年3月）。製造所所在地を管轄する厚木保健所から苦情品及び製造所内で使用中の対照品が搬入された。試料は、おむすび中の

金属様異物と対照品である片面紙のアルミ箔，表裏光沢のアルミ箔及び片面のみ光沢のアルミ箔である。使用した機器は，エネルギー分散型蛍光X線分析計セイコーインスツルメント社製 SEA-5120である。

おむすび中の金属様異物の蛍光X線スペクトルにおいて管電圧15kVでは，AlのK α 線（1.487keV付近）¹⁾が強く観察され，ほかにPdのL α 線（2.839keV付近）¹⁾が観察された。また，管電圧50kVでは，ZrのK α 線（15.7keV付近）¹⁾及びFeのK α 線（6.4keV付近）¹⁾が観察された。一方，片面紙のアルミ箔，表裏光沢のアルミ箔及び片面のみ光沢のアルミ箔（光沢面）では管電圧15kVにおいてPdが検出されなかったが，片面のみ光沢のアルミ箔（非光沢面）では検出された。管電圧50kVにおいて苦情品と対照品に大きな相違はなかった。

以上の結果からおむすび中の金属様異物は，Alが主成分の金属片であることと，管電圧15kV及び50kVにおける定性試験において，片面のみ光沢のアルミ箔（非光沢面）のスペクトルパターンに近いことが確認された。従って，蛍光X線分析において苦情品は弁当製造所内で使用していたアルミ箔（片面のみ光沢ホイル）にきわめて類似した金属片であると推察された。

（平成16年7月28日受理）

参考文献

- 1) 日本アイソトープ協会編：改訂10版アイソトープ手帳，pp.86-87，丸善，東京（2001）

資料

異臭等による食品の苦情事例 — 鉱物油臭 —

甲斐茂美, 渡邊裕子, 渡辺貞夫, 佐藤久美子,
藤巻照久, 岸 美智子

Case Studies on Complaints of Unusual Smell in Food

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

食品への苦情事例の中で、食品の異味・異臭に対しての苦情は、消費者が不快感、不信感を訴える頻度が高い。中でも石油臭、ガソリン臭等の鉱物油臭は、食品に由来する臭いとは明らかに異なることから、消費者が不安感を示しやすい。一方、臭気分析法として、ガスクロマトグラフ（以下 GC）やガスクロマトグラフ／質量分析計（以下 GC/MS）を用いることで、原因物質の解明が可能となった。鉱物油は原油の原産地や蒸留方法により組成は常に一定であるとは限らないものの、灯油（ケロシン）は C-11～C-14、軽油は C-15～C-17、重油は C-17～C-19、潤滑油・ワセリンは C-20～C-40 を主成分とする炭化水素（n-パラフィン）の混合物をその主要構成成分としているため、GC・GC/MS の分析で特徴的なクロマトグラムが得られることが知られている。そこで、平成12年度から15年度に分析を実施した鉱物油混入が疑われた苦情事例について報告することにより、今後の異臭苦情事例への対応の参考とする。

事例1. 油膜様物質の認められた牛乳

保育園で県内製造の紙パック入り牛乳をコップに小分けしたところ、牛乳の表面に少量の油膜様の物質がみられたとの苦情が保健所に寄せられた。保健所の調査により、園の調理員が行った直前の官能検査では、味、においに異常は認められなかったが、苦情品の牛乳4パック（同時購入、賞味期限同一日）及び対照品の牛乳1パックが搬入された。

搬入直後に、試料を広口の容器に小分けして室温でしばらく放置するとき、苦情品2検体には表面に極少量の糸状油膜を確認したが、他の検体では認められなかった。

冷蔵庫に1日放置後、再度室温に戻し観察したところ苦情品の検体ではいずれにおいても極少量の糸状油膜を確認した。しかし、対照品では糸状油膜は認められなかった。臭い、味は苦情品、対照品に差はなく、異常は認められなかった。そこで、牛乳表面に油膜状になる物質として石油系潤滑油を検査対象とし、炭素数 C-20、C-22、C-24、C-26、C-28、C-30及び C-32の n-パラフィンをリテンションタイムインデックスとして用い GC 分析を行った。

牛乳100mL を分液ロートに採取し、n-ヘキサン300mL を加え振とう抽出後、n-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水したのち、40℃以下で約1mL に減圧濃縮し抽出溶液とした。内径10mm ガラス製カラム管に、130℃で活性化後5% (w/w) 含水させたシリカゲル1g を n-ヘキサンで充填し、無水硫酸ナトリウム1g を重層したクリーンアップカラムに、抽出溶液の全量を負荷し n-ヘキサン20mL で溶出した。溶出溶液の溶媒を40℃以下で留去し、窒素気流下で乾固した後 n-ヘキサンで1mL とし、次の GC 条件で分析した。

GC 条件：GC；島津製作所製 GC17-A（FID 検出器），カラム；J&W 社製 DB-5（0.25mmi.d.×30m，膜厚 0.25 μm），カラム温度；220℃（1min）→15℃/min→300℃（10min），注入口温度；280℃，検出器温度；300℃，キャリアーガス流量；2.1mL/min，注入量；2 μL（スプリット，スプリット比1：8）

苦情品である4検体および対照品のいずれからも石油系潤滑油の特徴的なピーク群は認められず、鉱物油の混入は認められなかった。なお、本法により牛乳に10 μg 及び5 μg の炭化水素混合溶液を添加したときの回収率は、個々の n-パラフィンについて概ね75%以上、検出限界は0.01 μg/mL であった。

事例2. 異臭のした米

消費者から販売店へのクレーム処理後の確認・原因究明のため、精米業者より異臭のした米の石油成分について分析の依頼があり、異臭米および対照品の米各1検体が搬入された。官能検査で石油臭がしたこと、検体の製造・保管ラインで器具の洗浄や害虫駆除剤の溶剤としてケロシンが利用される可能性があることから、検査対象をケロシンとし、GC 及び GC/MS で分析を行った。

米30g を共栓付ガラス容器に採取し、n-ヘキサン飽和アセトニトリル20mL 及び n-ヘキサンを正確に2.0mL 加え、10分間振とう抽出後、上澄み液を分取し、3000回転で10分間遠心分離し、上層を次の GC 及び GC/MS 条件で分析した。

GC 条件：GC；島津製作所製 GC17-A（FID 検出器），カラム；J&W 社製 DB-5（0.25mmi.d.×30m，膜厚0.25

μm), カラム温度; 50°C (2 min) $\rightarrow 20^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 290^{\circ}\text{C}$ (5 min), 注入口および検出器温度; 250°C , キャリヤーガス流量; $2.1\text{mL}/\text{min}$, 注入量; $2\mu\text{L}$ (スプリットレス)

GC/MS 条件: GC; アジレント社製 HP6890, MS; 日本電子社製 Automass150, カラム; J&W 社製 DB-5 ($0.25\text{mm.i.d.} \times 30\text{m}$, 膜厚 $0.25\mu\text{m}$), カラム温度; 50°C (2 min) $\rightarrow 20^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 290^{\circ}\text{C}$ (5min), 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; 250°C , イオン化電圧; 70eV , キャリヤーガス圧; 1.2psi , 注入量; $2\mu\text{L}$ (スプリットレス)

FID-GC による分析で, ケロシンは C-10~C-16 の範囲に n-パラフィンの規則的なピークがみられた. 異臭米からもケロシンと同様な, 櫛状の規則的なピークが得られた. GC/MS の scan モード分析により, ケロシンのピークからは m/z : 57, 71, 85 の特徴的なフラグメントイオンを持つマススペクトルが得られ, 異臭米の C-10~C-16 の各ピークが示すマススペクトルとパターンが酷似していた. さらに SIM モードによりフラグメントイオン m/z : 71 と m/z : 85 を選択し, C-10~C-16 の n-パラフィンの検出パターンを比較したところ, 異臭米

のピーク保持時間はケロシンと一致し, フラグメントの強度比もほぼ一致していた. 対照品からはこれらのピークパターンは得られなかった.

この結果, 異臭米からケロシン様の n-パラフィンが確認され, 石油臭の成因となっていると考えられた. しかし, その汚染源については特定できなかった.

事例 3. 石油臭のした水煮竹の子

消費者より仕出し弁当の酢豚中の竹の子を口に入れた際にガソリンまたは灯油臭がしたとの苦情が保健所に寄せられ, 仕出し弁当の残品 (竹の子 1) が持ち込まれた. 保健所の調査に応じ, 弁当業者より原材料の水煮竹の子のうち, 同様の異常のあるもの 1 検体 (竹の子 2) と異常の認められない検体 (竹の子 3) が提出された. 当日の弁当の販売数は不明であったが, 同一内容の苦情は他に 3 件あった.

搬入直後に広口のガラス容器に移し, 直ちに臭気を調べたところ, 竹の子 1, 2 では鉱物油系の異臭が確認された. 竹の子 3 には異常は認められなかった. 官能検査の結果から, 灯油・軽油・重油等の鉱物油を分析対象とした. そこで, 炭素数 C-10~C-25 の n-パラフィンについて GC/MS で分析を行った.

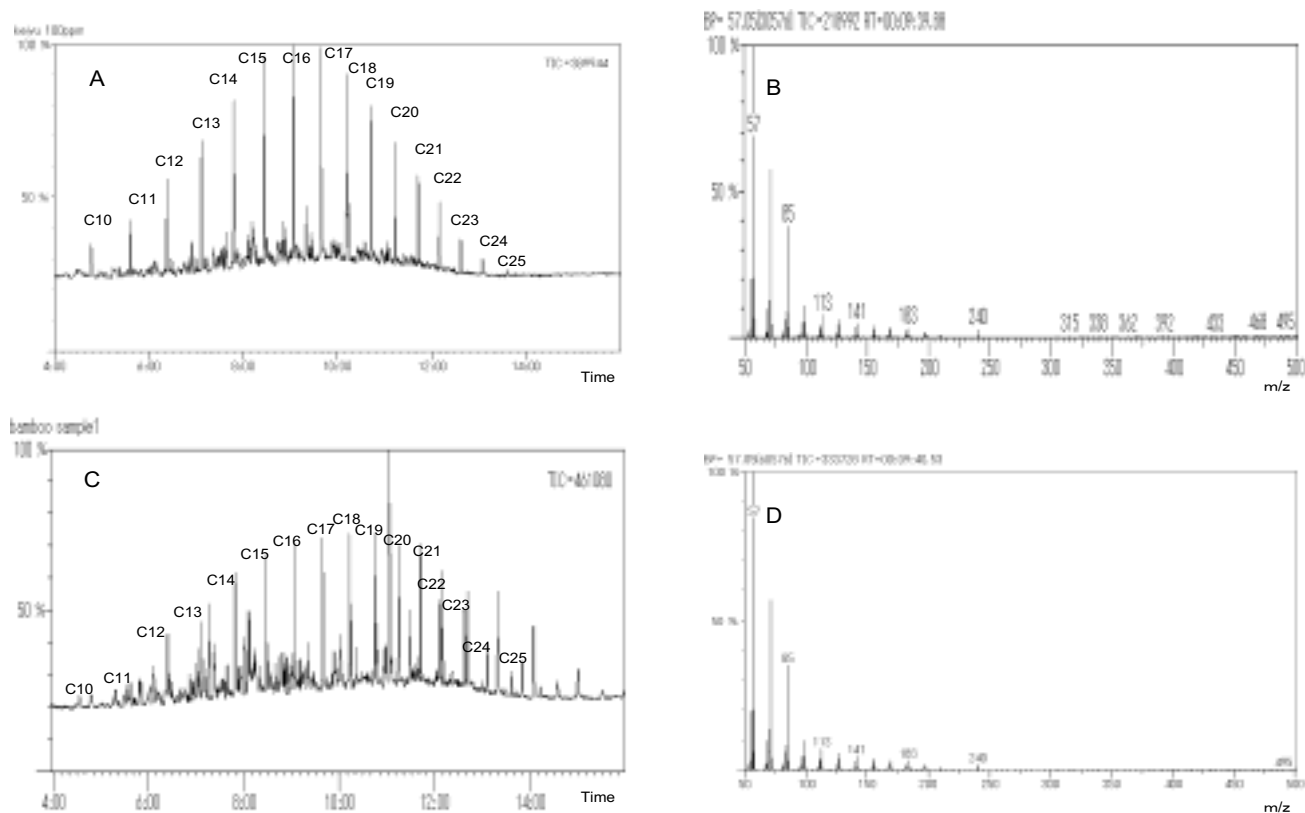


図 1 事例 3 軽油溶液及び水煮竹の子 1 (苦情品) 試験溶液の TIC 及びマススペクトル

A: 軽油溶液の TIC B: 軽油溶液の C17 (保持時間 9:40) のマススペクトル

C: 水煮竹の子 1 の TIC D: 水煮竹の子 1 の C17 (保持時間 9:40) のマススペクトル

水煮竹の子3～10gをガラス製共栓付遠沈管に採取し、試料と等量のn-ヘキサンを加え10分間振とう抽出し、1PSろ紙でろ過後n-ヘキサン層を次のGC/MS条件で分析した。試料を加えずに同様の操作を行い空試験とした。

GC/MS条件：GC；アジレント社製HP6890，MS；日本電子社製Automass150，カラム；J&W社製DB-5(0.25mmi.d.×30m，膜厚0.25μm)，カラム温度；50℃(1min)→10℃/min→180℃(1min)→20℃/min→280℃(1min)，注入口温度；220℃，インターフェイス温度；250℃，イオン源温度；250℃，イオン化電圧；70eV，キャリアーガス流量；2.1mL/min，注入量；2μL(スプリットレス)

C-10～C-25のn-パラフィンについて，GC/MS scanモードで分析したところ，竹の子1及び2から軽油と同様のパターンを示すスペクトルを検出した(図1)が，竹の子3からは同様のパターンを示すスペクトルは検出されなかった。検体が市販のポリ袋に入れられて搬入されており，Scanモード測定でポリ袋に由来すると思われる妨害ピークが認められたため，さらにSIMモードでn-パラフィンの特徴的なマススペクトル(m/z：57, 71, 85)について測定したところ，竹の子1及び2からは軽油とピーク保持時間が一致する，n-パラフィン混合物に特有なクロマトグラムが得られた。竹の子3からは

空試験と同様のクロマトグラムしか得られなかった。

官能試験及びn-パラフィンの分析の結果から，竹の子1及び2には鉱物油混入が推測され，これが異臭の原因と思われた。検体からのn-パラフィンの検出パターンはC-10～C-25の範囲に櫛状に規則的なピークが見られ，これは軽油のパターンと一致していることから，混入した鉱物油が軽油であると考えられた。一方，竹の子3は官能試験では異常が認められず，n-パラフィンの分析結果は，スペクトルの強度・パターン等が空試験溶液と同様のクロマトグラムを示した。このことから竹の子3には鉱物油の混入は認められなかった。

食品の鉱物油臭等による，鉱物油混入の疑いについての分析方法として，簡易な操作により抽出した試験溶液をGC，GC/MSで分析することは，有効な手段であった。食品の異臭事例では，その臭いから原因を予想することが原因究明の重要な手がかりとなる。この際，苦情が寄せられた状況などの情報を，なるべく多く収集することが重要である。また，石油臭のした水煮竹の子の事例に示したように，検体搬送時の容器によっては，測定結果に影響を及ぼす恐れもある。異臭分析に際してはこのような条件を考慮するとともに，検査依頼者にも周知する必要があると思われる。

(平成16年7月28日受理)

資料

食品汚染物残留調査結果 (平成15年度)

佐藤久美子, 渡邊裕子, 甲斐茂美,
藤巻照久, 岸 美智子

Investigation on the Residual Levels of Food Chemical Contamination in Kanagawa Prefecture (2003)

Kumiko SATO, Hiroko WATANABE,
Shigemi KAI, Teruhisa FUJIMAKI
and Michiko KISHI

我々は、食品の安全性を確認・確保する目的で、食品中の農薬、動物用医薬品の残留調査および環境汚染物質の汚染実態調査を継続して行っている。平成15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対して、一日許容摂取量（ADI）を基にして、残留農薬の規格基準を定めている。平成16年6月現在240農薬について規格基準が設定されている¹⁾。

我々は、平成2年度より、残留基準が未設定である農薬の残留調査と残留基準設定の対象となっていない加工食品に対する残留調査を並行して行っている。平成15年度は、中国産うなぎ加工品（白焼きまたは蒲焼き）の有機塩素系農薬、漬け物の有機りん系農薬、輸入りんごのジフェニルアミン、チオファネートメチル、有機リン系農薬について調査を行った。また、規格基準設定農薬であるが、グリホサート、グルホシネートに対し輸入大豆の残留実態を調べる目的で調査を行った。結果を表1に示した。

中国産うなぎ加工品10検体中6検体から DDT 代謝物の pp'-DDE が検出された。検出濃度は0.001～0.005ppmであった。定量限界（0.001ppm 未満）の1～5倍程度の濃度範囲であった。DDT 本体は検出されなかった。また、濃度範囲も低かったことから、現在農薬として使用されたものではなく、うなぎの生育環境の水質、土壌等からの取り込みによるものと考えられた。うなぎ加工品

には残留基準は設定されていない。参考値として輸入食肉の脂肪中の暫定基準値は総 DDT として5ppm²⁾であり、今回検出された濃度は1000分の1以下であった。体重50kg のヒトが今回検出された一番高い濃度の魚介類を、地域ブロック別食品群別摂取量（関東1）の94.8g²⁾摂取した場合、pp'-DDE の ADI（0.005mg/kg 体重/日³⁾）に対する割合は0.19%であり、食品安全上問題のない濃度と考えられた。

中国産梅を加工した梅干しからパラチオンが0.01ppm 検出された。パラチオンは特定毒物であり³⁾、農産物に対して規格基準が設定されているが、生うめに対するパラチオンの規格基準は設定されていない。パラチオンの ADI は0.005mg/kg 体重/日³⁾であり、体重50kg のヒトが検出濃度の果物類を、地域ブロック別食品群別摂取量（関東1）の118g²⁾ 摂取した場合、ADI の0.47%に相当する。摂取する果物に対する梅干しの割合は少ないと推定され、食品安全上問題のない濃度と考えられた。それ以外の漬け物加工食品からは今回測定した項目の農薬は検出されなかった。

輸入りんごについては、昨年度の調査ではクロルピリホスが2検体中1検体から検出された⁴⁾が、今回の検体では測定した項目の農薬は検出されなかった。輸入大豆10検体のうち、カナダ産大豆1検体からグリホサートが0.11ppm 検出された。大豆のグリホサートの規格基準は20ppm⁵⁾であり、今回検出された濃度は規格基準の180分の1以下であった。残留濃度は低いものの大豆に対して実際にグリホサートが使用されていることが窺われた。グリホサートの ADI は0.75mg/kg 体重/日³⁾であり、体重50kg のヒトが検出濃度の豆類を地域ブロック別食品群別摂取量（関東1）の62.1g²⁾摂取した場合、ADI の0.018%であり、食品安全上問題のない濃度と考えられた。

②輸入香辛料、ナッツ類、穀類のアフラトキシン B₁ 検査

県域流通の輸入香辛料、ナッツ類、穀類、合計32検体について、平成14年3月16日付け食監発第0326001号「カビ毒（アフラトキシン）を有する食品の取り扱いについて」に従い、アフラトキシン B₁の検査を実施した。すべて不検出であった。結果を表2に示した。

③食肉、魚介類中の動物用医薬品・抗生物質残留調査結果

食品衛生法では平成16年6月現在、31品目の動物用医薬品・抗生物質について規格基準が設定されている¹⁾。我々は平成8年度より動物用医薬品・抗生物質について継続して検査を行っている。平成15年度は食肉26検体、

表1：輸入農産物および加工食品の農薬等残留調査結果

検体名	検体数	生産国(検体数)	検出頻度(検出数/検体数)					
			有機塩素系 農薬 ^{*1}	有機リン系 農薬 ^{*2}	ジフェニル アミン	チオファネート メチル	グリホサート	グルホシネート ^{*3}
うなぎ加工品(白焼・蒲焼)	10	中国(10)	6/10 ^{*4}	-	-	-	-	-
梅干し	8	中国(5) 国産(3)	-	1/8 ^{*5}	-	-	-	-
エリノギ醤油漬	1	中国(1)	-	0/1	-	-	-	-
キャベツ(浅漬・酢漬)	2	国産(1) ドイツ(1)	-	0/2	-	-	-	-
きゅうり(醤油漬・酢漬)	2	中国(1) ドイツ(1)	-	0/2	-	-	-	-
しょうが酢漬	1	タイ(1)	-	0/1	-	-	-	-
だいこん(浅漬・醤油漬)	2	不明(1) 国産(1)	-	0/2	-	-	-	-
白菜(キムチ・塩漬)	2	国産(2)	-	0/2	-	-	-	-
ホワイトアスパラガス瓶詰	1	中国(1) ドイツ(1)	-	0/1	-	-	-	-
らっきょう甘酢漬	1	中国(1)	-	0/1	-	-	-	-
輸入りんご	1	オーストラリア (1)	-	0/1	0/1	0/1	-	-
輸入大豆	10	アメリカ(6) カナダ(2) 中国(2)	-	-	-	-	1/10 ^{*6}	0/10

-：未実施

*1 有機塩素系農薬：総BHC(α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC), DDT(pp'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD, op'-DDT, pp'-DDT), エボキシドを含む

*2 有機リン系農薬：EPN, エトプロホス, クロルピリホス, クロルピリホスメチル, ジクロルボス, ダイアジノン, チオメトン
オン, ビリミホスメチル, フェニトロチオン, プロチオホスおよびマラチオン

*3 代謝物のMPPA(3-メチルホスフェニコプロピオン酸)を含む

*4 pp'-DDEの定量値は 0.001, 0.002, 0.002, 0.002, 0.002, 0.002, 0.005ppm

*5 パラチオンの定量値は 0.01ppm

*6 グリホサートの定量値は 0.11ppm

定量限界 チオファネートメチル, グルホシネート 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
系農薬およびグリホサート 0.01ppm, 有機塩素系農薬 0.001ppm,表2：輸入香辛料、ナッツおよびトウモロコシのアフラトキシンB₁検査結果

検体名	生産国(検体数)	検体数	検出頻度 (検出数/検体数) アフラトキシンB ₁
ホワイトペッパー(粒・粉末)	インドネシア(1) マレーシア(1) インドネシア・マレーシア混合(1) 不明(1)	4	0/4
ナツメグ(粉末)	インドネシア(3)	3	0/3
ジンジャー(粉末)	中国(1) インド・中国混合(1)	2	0/2
ブラックペッパー(粒・粉末)	マレーシア(1) 不明(1)	2	0/2
レッドペッパー(粉末)	中国(1) 不明(1)	2	0/2
コリアンダー(粉末)	モロッコ(1)	1	0/1
シナモン(粉末)	中国(1)	1	0/1
ターメリック(粉末)	インド(1)	1	0/1
パプリカ(粉末)	メキシコ(1)	1	0/1
メース	不明	1	0/1
香辛料合計		18	0/18
落花生及び加工品	中国(5) 南アフリカ(1) アメリカ(3)	6	0/6
ピスタチオ	イラン(2) オーストラリア(1)	6	0/6
トウモロコシ(ポップコーン)	アメリカ(2)	2	0/2
ナッツ・トウモロコシ合計		14	0/14

定量限界 アフラトキシンB₁: 0.01ppm

卵4検体, 魚介類11検体について, オキシテトラサイクリン(OTC), クロルテトラサイクリン(CTC), テトラサイクリン(TC), スピラマイシン, アルベンダゾール代謝物, チアベンダゾール, ゼラノールおよびβ-ト

レンボロンの動物用医薬品8品目を対象として検査を行った。また, 中国産うなぎのエンロフロキサシンの残留が問題となった背景から, 通知法³⁾に従い, 中国産うなぎ2検体のエンロフロキサシンの検査を追加して行った。結果を表3に示した。国産ブリ1検体からOTCが0.04ppm検出された。魚介類におけるOTCの残留基準値は0.2ppm¹⁾であり, 今回検出された値は基準値の約20分の1であった。OTCのADIは0.003mg/kg体重/日であり, 今回検出された値は体重50kgのヒトが検出濃度の魚介類を地域ブロック別食品群別摂取量(関東1)の94.8g²⁾摂取する場合, ADIに対する割合は2.5%であり, 食品衛生上問題のない濃度と考えられた。それ以外の検体からは検出されなかった。

④海産魚介類の有機スズ化合物の汚染実態調査結果

有機スズ化合物は, 過去に漁網や船底塗料中に使用され, 昭和60年代頃から魚介類の汚染が食品衛生上問題とされてきた物質である。我々は昭和60年度よりビストリブチルスズオキシド(TBTO)およびトリフェニルスズ(TPT), 平成6年度以降は, さらに代謝産物であるジブチルスズ(DBT)を調査項目に加え, アジ, イワシ, カ

表 3：食肉、魚介類中の動物用医薬品・抗生物質残留検査結果

検体名	検体数	生産国(検体数)	検出頻度 (検出数/検体数)								
			OTC	CTC	TC	スピラマイシン ^{*1}	アルベンダゾール代謝物 ^{*2}	チアベンダゾール ^{*3}	ゼラノール	β-トレンボロン	エンロフロキサシン
国産牛肉	5	国産(5)	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-	-	-	-
輸入牛肉	4	アメリカ(1) オーストラリア(3)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	-
国産豚肉	5	国産(5)	0/5	0/5	0/5	-	-	-	-	-	-
輸入豚肉	4	カナダ(2) オーストラリア(1) 不明(1)	0/4	0/4	0/4	-	0/4	0/4	-	-	-
国産鶏肉	4	国産(4)	0/4	0/4	0/4	0/4	-	-	-	-	-
輸入鶏肉	3	ブラジル(2) アメリカ(1)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-
輸入羊肉	1	ニュージーランド(1)	0/1	0/1	0/1	-	0/1	0/1	-	-	-
国産鶏卵	4	国産(4)	0/4	0/4	0/4	-	-	-	-	-	-
鮮魚(サケ)	5	チリ(1) 国産(1)	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-
鮮魚(タイ)	2	国産(2)	0/2	-	-	-	-	-	-	-	-
鮮魚(ブリ)	2	国産(2)	1/2 ^{*4}	-	-	-	-	-	-	-	-
えび	3	タイ(1) インドネシア(1) ミャンマー(1)	0/3	-	-	-	-	-	-	-	-
うなぎ加工品	2	国産(1) 中国(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	0/2

-：未実施

*1 ネオスピラマイシンを含む

*2 5-プロピルスルホニル-III-ベンズイミダゾール-2-アミンを測定

*3 チアベンダゾール代謝物の5-ヒドロキシチアベンダゾールを含む

*4 OTCの定量値は0.04ppm

定量限界 スピラマイシン, ネオスピラマイシン, エンロフロキサシン 0.05ppm, CTC 0.003ppm, OTC, TC 0.02ppm,
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

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	漁獲地 (検体数)	TBTO		TPT ^{*1}		DBT ^{*1}	
			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 ^{*2}	4	島根(1) 秋田(1) 富山(1) 相模湾(1)	0/4	ND	0/4	ND	0/4	ND
サバ	3	相模湾(2) 島根(1)	3/3	0.021, 0.018 0.013	0/3	ND	2/3	ND, 0.010 0.011
タチウオ	2	相模湾(2)	1/2	ND, 0.023	0/2	ND	0/2	ND
ミズカマス	2	相模湾(2)	2/2	0.011, 0.016	0/2	ND	0/2	ND
イサキ	1	鳥取(1)	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
ウルメイワシ	1	相模湾(1)	0/1	ND	0/1	ND	1/1	0.016
タイ	1	鳥取(1)	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
ワラサ	1	鳥取(1)	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND

検出頻度：検出数/検体数

ND：定量限界未満 定量限界：TBTO 0.005ppm, TPT, DBT 0.010ppm

*1 TPTおよびDBTは、それぞれTPTC（塩化トリフェニルスズ）、DBTC（塩化ジフェニルスズ）として算出

*2 相模湾の1検体はオアカムロそれ以外の3検体はマアジ

マス、サバ、タチウオ等を中心として入手可能な魚種について継続して調査を行っている。試験法は衛乳第20号に準じて行った。平成15年度は15検体について TBTO, TPT, DBT の調査を行った。結果を表4に示した。15検体中6検体から TBTO (濃度範囲0.011~0.023ppm) が、3検体から DBT (濃度範囲0.010~0.016ppm) が検出された。TPT はすべての検体から検出されなかった。サバは3検体すべてから TBTO が検出された。平成14年度より機器の感度の向上により低濃度範囲も測定可能になったため、定量限界濃度を TBTO については0.01ppm 未満から0.005ppm 未満へ、TPT は0.01ppm 未満から0.010ppm 未満へ、DBT は0.02ppm 未満から0.010ppm 未満へと引き下げた⁴⁾ため、13年度以前は定量困難であった TBTO の0.005~0.010ppm, TPT, DBT の0.010~0.020ppm の定量が可能となっている。今回の検出範囲は定量限界濃度に近い0.005~0.023ppm であった。濃度レベルは全体的には低くなっているものの、大衆魚とされるサバ、イワシ、タチウオ等で依然として汚染がみられることや、内分泌攪乱化学物質とされる有機スズ化合物の低濃度範囲における生体影響の懸念もあることから、継続してモニタリングを続ける必要があると考えられた。

なお、本調査は県生活衛生課の事業であり、県内保健所の専門監視員の協力により行ったものである。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 食品・食品添加物等規格基準 (抄), 食品衛生学雑誌, 45, No.1 J73-J75 (2004)
- 2) 厚生省保健医療局健康増進栄養課: 国民栄養の年次推移, 厚生 の指標 (特別編集号), 42 (16), 6-16 (1995)
- 3) 植村振作, 河村 宏, 辻 万千子, 富田重行, 前田 静夫: 農薬毒性の事典, 改訂版, p.146, 三省堂, 東京 (2002)
- 4) 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: 食品汚染物残留調査結果 (平成14年度), 神奈川県衛生研究所報告, 33, 107-110 (2003)
- 5) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課: うなぎにおけるエンロフロキサシン分析法について, 食監発第0605002号, 平成15年6月5日

資料

魚介類加工品によるアレルギー様食中毒および苦情事例について

渡邊裕子, 甲斐茂美, 岸 美智子

Regarding the Claim and Allergy-like Food Poisoning Caused by Processed Seafood

Hiroko WATANABE, Shigemi KAI
and Michiko KISHI

毎年、6月から7月を中心に、魚介類及びその加工品に対する苦情やヒスタミンによるアレルギー様食中毒が多く発生している。湿度が高く、温度変化の激しいこの時期には、特に魚介類の保管管理の徹底が重要となる。また、この時期はじんま疹、下痢などの症状を引き起こしやすく、その症状からアレルギー様食中毒が疑われる。これは、赤身魚筋肉中に多く含まれる遊離のヒスチジンが、細菌により脱炭酸されて生成されるヒスタミンに起因するものと考えられる。また、異味、異臭に関する苦情は、腐敗による食品のpHの変化、揮発性塩基窒素化合物等の増加が原因と考えられる。本報告はこれまでの5事例を挙げ、その対応について検証を行い、今後の行政検査に役立てることを目的とする。

アレルギー様食中毒事例1

〔状況〕キハダマグロのぶつ切りを購入し、同日に食した2名がいずれも30分から2時間の間にじんま疹、発熱、頭痛の症状を訴えた後、下痢の症状を引き起こした。病院で手当をうけ、1名は1日入院となった。

〔検査検体〕マグロ切り身2検体（苦情品：キハダマグロぶつ切り1検体、及び対照品：冷凍マグロ切り身1検体）

〔検査項目〕ヒスタミンを含む4種ポリアミン

〔検査方法〕高速液体クロマトグラフィーによる赤身魚中のポリアミン類の同時定量及び鮮度判定の分析法を準用した¹⁾。

分析試料の調製：

魚肉5.0g をとり、6%過塩素酸20mL を加えて除タン

パク後、3,000rpm、10分遠心分離し、上清を分取する。さらに沈殿物に過塩素酸20mL を加え、抽出した後、上清をあわせ、50mL に定容した。これを分析試料とした。標準溶液の調製：

チラミン塩酸塩 SIGMA 社製 99%以上

プトレシン塩酸塩 SIGMA 社製 98%以上

カダベリン塩酸塩 SIGMA 社製 98%以上

ヒスタミン塩酸塩 SIGMA 社製 99%以上

標準品約10mg を0.1N 塩酸溶液100mL に溶かし、100ppm 溶液を調製し、検量線を作成した。

分析装置：Waters 社製ポストカラム蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ

カラム Inertsil ODS-3V 4.6φ×15cm

注入量 20μL

定量限界：1.0mg/100g

〔検査結果〕表1にマグロ切り身の4種ポリアミン測定結果を示し、図1～3にポリアミン標準品、対照品及び苦情品のクロマトグラムを示した。

表1 マグロ切り身中の4種ポリアミン含量

検体名	(mg/100g)			
	チラミン	プトレシン	カダベリン	ヒスタミン
冷凍マグロ切り身 (対照品)	不検出	不検出	不検出	1.2
マグロぶつ切り (苦情品)	不検出	不検出	15.1	632.1

この結果、苦情品から高濃度のヒスタミンが検出され、ヒスタミンによるアレルギー様食中毒であることが確認された。他の3種の腐敗アミンでは、カダベリンが検出された。赤身魚のアレルギー様食中毒は、特にヒスタミンによる中毒が主要原因となっているが、カダベリンはその症状を増強する効果があるといわれている²⁾。このことから、赤身魚によるアレルギー様食中毒が疑われた場合、これら2種のポリアミンについて、分析が必要と考えられた。摂取量では、一般的にヒスタミン100mg/100g 以上を含む食品の場合、30分から60分で顔、特に口のまわりや耳たぶの熱感、頭痛、全身の紅潮、じんま疹などが現れる。本事例は摂取量とその症状においても明らかにヒスタミンによる食中毒と一致した。

一方、ヒスタミンは、アミンの一種であることから、アルカリ性を示し、辛味を呈するといわれており、赤身魚またはその加工品を食べたときに辛味を感じたり、舌がピリピリする場合は、相当量のヒスタミンが存在しているものと考えられる³⁾。また、本苦情品は対照品に比べ、肉色が茶色を呈していたことから、特に6月から7月の時期の生鮮品については、購入時に鮮度を見分け、さらに食卓においても食用に適した状態であるかどうかを見分けるように消費者への注意喚起が必要と考えられた。

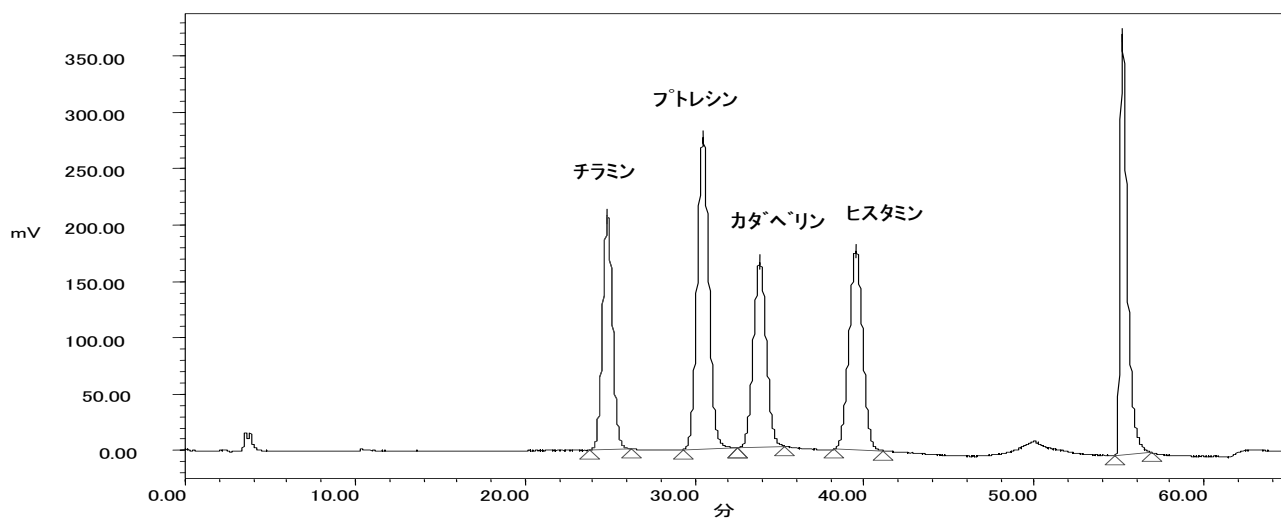


図1 4種ポリアミン標準品10ppmのクロマトグラム

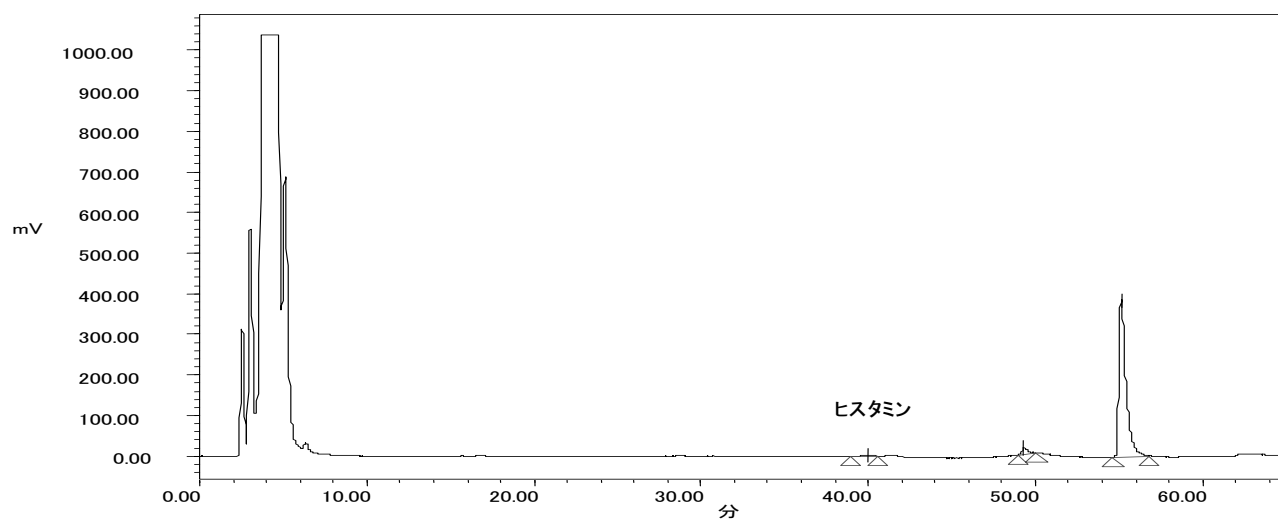


図2 冷凍マグロ切り身 (対照品) のクロマトグラム

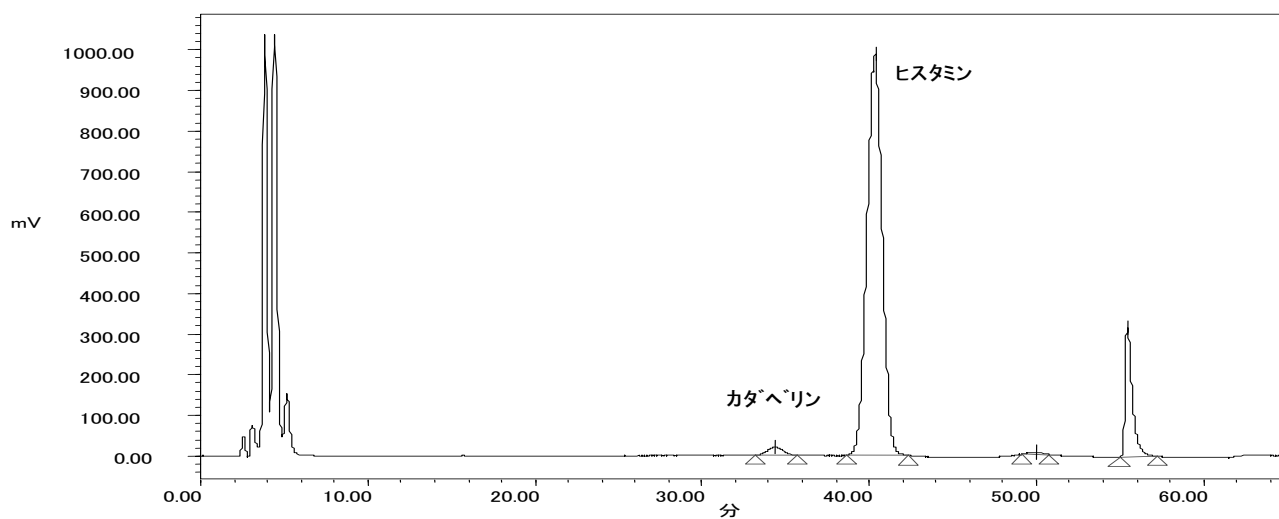


図3 マグロぶつ切り (苦情品) 10倍希釈のクロマトグラム

アレルギー様食中毒事例2

〔状況〕1事業所において、仕出し弁当摂食者22名のうち5名が摂食後30分から3時間の間に頭痛、発熱、じんま疹、下痢の症状を訴え、1名が病院で手当を受けた。

〔検査検体〕さばのみりん焼3検体（製造者での残品2検体および苦情品1検体）

〔検査項目〕ヒスタミンおよびカダベリン

〔検査方法〕事例1と同様に検査を行った。

〔検査結果〕表2にさばのみりん焼中のヒスタミン、カダベリン測定結果を示した。

表2 さばのみりん干し中のカダベリンとヒスタミン含量

検体名	(mg/100g)	
	カダベリン	ヒスタミン
さばのみりん干し1 (事業者での残品)	73.0	1059.7
さばのみりん干し2 (事業者での残品)	118.3	1266.6
さばのみりん干し3 (苦情品)	62.7	631.4

いずれの検体からも、100mg/100g 以上の高濃度のヒスタミンが検出され、ヒスタミンによるアレルギー様食中毒であることが確認された。ヒスタミン食中毒の要因となる遊離のヒスチジン量は、赤身魚のマグロが最も多く、次いでサバ、サンマ、アジの順となる。また、食中毒発生食品の形態としては、焼き魚、干物、刺身、フライ、煮物、缶詰など様々であり³⁾、ヒスタミンはこれらの加工処理においても安定している。本事例のような赤身魚の加工品による高濃度摂取の場合、集団食中毒となる可能性が高く、特に注意が必要と考えられた。さらに、調理加工により官能的に判断出来ない場合が多いと考えられるため、消費者による点検も難しいと言える。

アレルギー様食中毒が疑われた事例3

〔状況〕1事業所で夕食として摂食した30名のうち1名が摂食後2時間後にじんま疹の症状を訴え、病院で手当を受けた。

〔検査検体〕献立のうち、魚介類材料のもの7検体（サーモン、マグロ刺身、甘エビ刺身、シマアジ刺身、タイ刺身、スズキ（焼き）、タチウオ）

〔検査項目〕ヒスタミンおよびカダベリン

〔検査方法〕事例1と同様に検査を行った。

〔検査結果〕ヒスタミンおよびカダベリンは、いずれの検体も不検出であった（測定結果は示さない）。白身魚、およびエビや貝類などでは、ヒスチジンの含量が赤身魚の1/10から1/100であることから、ヒスタミンによる食

中毒の可能性は考えにくい³⁾。また、じんま疹の発症から、マグロの刺身中のヒスタミンが疑われたが不検出であった。しかし、個人差により数 mg/100g のヒスタミン量でも、じんま疹の症状を起こす場合があるため、消費者自身が体調や体質を把握し、食品を選択することも必要と考えられた。

異味、異臭苦情事例1

〔状況〕2日前に購入したイカの塩辛を食べたところ、刺激性的食感があった。

〔検査項目〕揮発性塩基窒素化合物（VBN）および pH

〔検体〕いかの塩辛瓶詰 2検体（苦情品と同じロット1検体および苦情品と別のロット1検体）

〔検査方法〕VBN は、衛生試験法の食品成分試験法、1) 揮発性窒素(1)拡散法による定量を準用した⁴⁾。

分析試料の調製：

pH 測定 いかの塩辛約10g をとり、水50mL を加え2分ホモジナイズ後、3,000rpm で10分間遠心分離し、ろ過後に pH メーター（堀場 M-13）を用いて、測定を行った。

VBN 測定 いかの塩辛約10g をとり、6%過塩素酸50 mL を加えて2分ホモジナイズ後、3,000rpm で10分間遠心分離し、ろ過後、0.1N 水酸化ナトリウム溶液で中和し、100mL に定容し、VBN 測定用試料とした。

〔検査結果〕表3にいかの塩辛の pH および VBN 測定結果を示した。

苦情品の VBN は、対照品に比べ10mg/100g 高い値を示した。VBN は、腐敗によって発生するアンモニア、トリメチルアミン、ジメチルアミンなどの総量を示し、発酵食品では、発酵から腐敗の指標として測定されている。塩辛はその製法として、塩分濃度が重要となっている。一般的に、4～12%の塩分濃度が知られている。本品の塩分濃度は約7%であるため、食塩濃度7.6%の場合を参照すると⁵⁾、10℃貯蔵後6～13日後に適性期となる。また、19日頃に過熟成期になると肉やせが進み、遊離水が出てアンモニア臭が感じられるようになり、33日目には完全に腐敗する。苦情品は、製造日から13日後に食しており、適性期から熟成期と考えられる。しかし、苦情者は、過熟成期と考えられる刺激性的食感を訴えている。熟成と腐敗の境界は明瞭ではないが、宇野⁶⁾は VBN100mg/100g を超えると、異味異臭により食用不適となるとしている。官能的な感覚は化学分析を上回る感度を示すことがあり、個人差も大きいことから、苦情としての取り扱いや判断が難しい。

一方、当該製造業者による賞味期限の設定をみると、保存方法10℃以下で、11月から4月は45日間、5月から10

月までは30日間となっている。前述した10℃保存による変化を見ると、賞味期限は腐敗とほぼ同じ時期に設定されている。以上の点から、発酵食品の場合、保存方法の徹底と安全率を見込んだ賞味期限の設定がこのような事例の予防対策として有効であると考えられた。

異味，異臭苦情事例2

〔状況〕 いわしみそ煮缶詰を食べたところ，いわし頭部に腐敗したような異味，異臭を感じた。

〔試験項目〕 揮発性塩基窒素化合物（VBN）

〔検体〕 いわしみそ煮缶詰 2検体（苦情品1検体および対照品1検体）

〔検査方法〕 みそをふき取ったいわしについて，事例1と同様に試験を行った。

〔検査結果〕 表3にいわしみそ煮缶詰の VBN 測定結果を示した。

表3 イカの塩辛とイワシミそ煮缶詰中の揮発性塩基窒素含量および pH

検体名	揮発性窒素 (mg/100g)	pH
イカの塩辛 (苦情品と同じロット)	40	6.9
イカの塩辛 (苦情品と異なるロット)	30	6.8
イワシミそ煮缶詰 (苦情品)	24	-
イワシミそ煮缶詰 (対照品)	19	-

対照品に比べ，苦情品の VBN 量が若干高い値を示した。魚肉における VBN は，鮮度低下に伴って増加し，

5～10mg/100g で普通の鮮度，30～40mg/100g では初期腐敗，50mg/100g 以上を腐敗の目安としている⁷⁾。これによると，苦情品は初期腐敗に近い値となるが，みそ煮などの加工品での腐敗値については不明であった。一方，分析に際し，本品は検体量が少なく，頭部のみの採取が出来なかったことから，苦情の状況を再現した分析値が得られなかったことが懸念された。

苦情品の場合，持ち込まれる検体の状況を把握し，分析に際し，よりよい保存状態を確保することが最も重要であると考えられた。さらに，多様な加工食品においては，苦情品に対し対照品の確保も，重要な要素となる。対照品との検査結果の比較から苦情品の状態を把握できる場合が多く，ゆえに検査結果が苦情者への有効な情報提供となる。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 山中英明，松本美鈴：高速液体クロマトグラフィーによる赤身魚中のポリアミン類の同時定量及び鮮度の判定，食品衛生学雑誌，30，396-405（1989）
- 2) 池田静徳ら：魚介類の微量成分，初版，池田静徳編，pp.4-10，恒星社厚生閣，東京（1981）
- 3) 天野慶之ら：最新食品衛生学，全訂版，pp.90-92，恒星社厚生閣，東京（1990）
- 4) 衛生試験法・注解2000，日本薬学会編，pp.171-172，金原出版，東京（2000）
- 5) 藤井健夫：塩辛・くさや・かつお節，初版，pp.31-52，恒星社厚生閣，東京（1992）
- 6) 宇野勉：北水誌月報，31，15（1974）
- 7) 新井健一ら：水産食品学，初版，須山三千三，鴻巣章二編，pp.134-135，恒星社厚生閣，東京（1987）

資料

遺伝子組換え食品の分析結果
(平成15年度)

大森清美，土屋久世，
パナッダー・ヴィルンブンヤパット，
岸 弘子，山田利治，平山クニ，佐藤修二*

Investigation on the Qualitative
and Quantitative Analysis of
Genetically Modified
Foods in Kanagawa
Prefecture (2003)

Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA,
Panadda Vironbounyapad, Hiroko KISHI,
Toshiaki YAMADA, Kuni HIRAYAMA
and Shuji SATO*

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，表示が義務化されたこと
に伴い，神奈川県では平成13年度から GM 食品の検査
を実施している．平成15年度は，7月から11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
売り店舗から収取された70検体について検査を実施した．
試験方法は，平成15年6月18日食安発第0618002号及び
平成15年11月13日食案発第1113001号の厚生労働省通知
に従い，GM 作物として安全性未承認の作物及び食品に

ついては定性試験を，安全性承認済みの作物及び食品に
ついては定量試験を実施した．表1に検査項目及び品目
ごとの試験方法を示した．なお，大豆穀粒の定量試験に
おける DNA 抽出法は，食案発第1113001号（平成15年11
月13日通知）でシリカゲル膜キット法（DNeasy Plant
Mini Kit）が削除されたが，通知が試験実施途中であっ
たことから，平成15年度の収取検体の大豆については，
スクリーニング的にシリカゲル膜キット法により抽出し
た DNA について定量を行った．それらにより定量下限
値（0.5%）¹⁾以上の組換え遺伝子が検出された検体につ
いてのみ，食案発第1113001号で適用されている CTAB
法により再度 DNA 抽出を行い，最終的な定量値を求め
た．また，きなこ及び枝豆については大豆加工品である
ことから，通知における大豆穀粒の定量試験法は適用さ
れていないが，加工食品への GM 作物の混入に対する
消費者の不安が大きいことから，大豆加工品についても
大豆穀粒の定量試験法を参考に調査の観点から定量試験
を実施した．使用機器類は，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を用いた．
食品70検体についての，組換え遺伝子の定性及び定量
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，トウモロコシ及びその加工品30検体の定性
試験（表2）では，コーンフレーク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．コーンフレー
ク2検体（表2，検体 No.22および23）については，内在
性遺伝子である Zein が検出されないことから検査不能
となった．しかし，他のコーンフレーク2検体（表2，検

表1 平成15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
	トウモロコシ青果	3					
	トウモロコシ穀粒	7					
	トウモロコシ缶詰	4					
トウモロコシ	焼きトウモロコシ	1	定性	PCR法	Genimic-tip	CBH351	Zein
	コーンスープ	3					
	コーンスナック菓子	8					
	コーンフレーク	4					
	トウモロコシ青果	3					
大豆	トウモロコシ穀粒	7	定量	PCR法	DNeasy Plant Mini	35S・GA21	SS II b
	大豆穀粒	10					
	きなこ	6	定量	PCR法	DNeasy Plant Mini	RRS	Le1
	枝豆	9			CTAB		
合計		35	定性				
		35	定量				

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
*現 地域調査部

表2 平成15年度 組換え遺伝子定性試験結果

No.	分類	産地/原産国	検査遺伝子	結果
1	パパイヤ(青果)	ハワイ	55-1	不検出
2	パパイヤ(青果)	ハワイ	55-1	不検出
3	パパイヤ(青果)	ハワイ	55-1	不検出
4	パパイヤ(青果)	フィリピン	55-1	不検出
5	パパイヤ(青果)	ハワイ	55-1	不検出
6	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
7	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
8	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
9	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	オーストラリア	CBH351	不検出
10	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	ベルギー	CBH351	不検出
11	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
12	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
13	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	オーストラリア	CBH351	不検出
14	コーンスープ(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
15	コーンスープ(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
16	コーンスープ(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
17	コーンスープ(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
18	トウモロコシ缶詰(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
19	トウモロコシ缶詰(トウモロコシ加工品)	アメリカ	CBH351	不検出
20	トウモロコシ缶詰(トウモロコシ加工品)	アメリカ	CBH351	不検出
21	焼きトウモロコシ(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
22	コーンフレーク(トウモロコシ加工品)		CBH351	検査不能
23	コーンフレーク(トウモロコシ加工品)		CBH351	検査不能
24	コーンフレーク(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
25	コーンフレーク(トウモロコシ加工品)		CBH351	不検出
26	トウモロコシ(青果)	福島県産	CBH351	不検出
27	トウモロコシ(青果)	群馬県産	CBH351	不検出
28	トウモロコシ(青果)	山梨県産	CBH351	不検出
29	トウモロコシ(青果)	山梨県産	CBH351	不検出
30	トウモロコシ(青果)	富良野産	CBH351	不検出
31	トウモロコシ穀粒	フランス	CBH351	不検出
32	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351	不検出
33	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351	不検出
34	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351	不検出
35	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351	不検出

表3 平成15年度 組換え遺伝子定量試験結果

No.	分類	産地/原産国	検査遺伝子	結果
36	トウモロコシ(青果)	福島県産	35S-GA21	不検出
37	トウモロコシ(青果)	群馬県産	35S-GA21	不検出
38	トウモロコシ(青果)	山梨県産	35S-GA21	不検出
39	トウモロコシ(青果)	山梨県産	35S-GA21	不検出
40	トウモロコシ(青果)	富良野産	35S-GA21	不検出
41	トウモロコシ穀粒	フランス	35S-GA21	不検出
42	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出
43	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出
44	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出
45	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出
46	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出
47	大豆穀粒	アメリカ	RRS	検出(2.6%)
48	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出
49	大豆穀粒		RRS	不検出
50	大豆穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.1%)
51	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出
52	大豆穀粒	中国	RRS	不検出
53	大豆穀粒	米国	RRS	不検出
54	大豆穀粒	国内産	RRS	不検出
55	大豆穀粒	国内産	RRS	不検出
56	きな粉(大豆加工品)		RRS	不検出
57	きな粉(大豆加工品)		RRS	不検出
58	きな粉(大豆加工品)	北海道	RRS	不検出
59	きな粉(大豆加工品)		RRS	不検出
60	きな粉(大豆加工品)	北海道	RRS	不検出
61	きな粉(大豆加工品)		RRS	定量下限値未満検出(0.2%)
62	枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出
63	枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出
64	枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出
65	枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出
66	枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出
67	枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出
68	枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出
69	枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出
70	枝豆(大豆加工品)	タイ	RRS	不検出

体 No.24および25) では内在性遺伝子が検出され、検査不能ではなく不検出となった。コーンフレークは内在性遺伝子が検出されない加工品とされているが、トウモロコシの内在性遺伝子が検出可能なコーンフレークも存在することが明らかとなった。

定量試験結果(表3)については、トウモロコシ青果及び穀粒10検体、大豆加工品15検体(きなこ6検体、枝豆9検体)及び大豆穀粒10検体について、いずれの検体からも、意図せざる混入の場合の許容上限値5%を越える組換え遺伝子 RRS は検出されなかった。検体 No.47の大豆穀粒からは、シリカゲル膜キット法により2%を超える RRS が検出されたため CTAB 法で再度定量を行った結果、2.6%の RRS が検出された。しかし、検体 No.47は分別生産流通管理(IP ハンドリング)を有しており、検出された RRS は意図せざる混入と判断され、法律上の問題にはならなかった。また、検体 No.50及び61については、コラボレーションスタディー¹⁾により確認された定量下限値(0.5%)には満たない値ではあったものの0.1%及び0.2%の RRS が検出された。そのほか表3で不検出と記載された32検体については、定量 PCR の終了時点(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。

これらの試験結果において、大豆組換え体の混入が定量下限値をこえた検体 No.47及び定量下限値未満ではあるものの RRS が検出された No.50及び61のうち、2検体(No.47及び50)はアメリカ産の大豆穀粒であった。平成14年度に実施した組換え遺伝子の試験結果²⁾においても、大豆穀粒3検体で RRS が0.1~0.2%で検出され、それらも全てアメリカ産大豆であった。大豆はアメリカ国内で

も最も組換え体生産比率が高い作物であることから、大豆穀粒の流通過程において、IP ハンドリングを取り交わされた作物であっても、意図せぬ組換え体の混入が起りやすい状況にあるものと考えられ、今後も GM 食品に関する監視体制を継続していくことの必要性が再認識された。

平成15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、1検体では2.6%の RRS が検出され、また2検体については、定量下限値未満ではあるものの RRS が検出された。

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「食品を選択する権利」をまもるためには、今後も GM 食品の表示に関する監視が重要であると考えられた。なお、本検査は神奈川県衛生部生活衛生課の食品科学調査事業により実施された。

(平成16年7月28日受理)

参考文献

- 1) 渡邊敬浩ほか：遺伝子組換え食品定量分析法のコラボレーションスタディーⅡ，(社)日本食品衛生学会第85回学術講演会，A-26 (2003)
- 2) 大森清美ほか：遺伝子組換え食品の分析結果(平成14年度)，神奈川県衛生研究所研究報告，33，111-113 (2003)

資料

食肉製品における 発色剤添加方法の検討

関戸晴子¹, 中村廣志²
丹羽加代子³, 折原直美²

Investigation of How to Treat Meat Product with Nitrite

Haruko SEKIDO, Hiroshi NAKAMURA,
Kayoko NIWA and Naomi ORIHARA

発色剤（亜硝酸根）の食肉製品への使用量は食品衛生法施行規則において成分規格基準値が規定されている。ボンレスハムの成分規格検査において、発色剤（亜硝酸根）が0.073g/kg 検出（使用基準は0.070g/kg 以下）され、残品を再検査したところ0.045～0.058g/kg と亜硝酸根の残存量にバラツキ（CV14.7%）が見られ、その原因として当該品の製造工程に問題のあることが疑われた。

ボンレスハム製造所の調査を行ったところ、製品中の亜硝酸根の残存量がバラツク原因は、製造工程中の塩漬が肉塊に針で傷をつけながら塩漬剤に漬け込む方法（インジェクト法）ではなく、樽に肉塊を並べて塩漬剤に漬け込む方法（非インジェクト法）によって行われていたためであると考えられた。非インジェクト法でボンレスハムに均等に亜硝酸根を添加することは困難で、原料生肉全体に対する亜硝酸根の添加量が適正であっても、加工後の製品は部位によってその残存量がバラツキ、基準値外の結果をもたらすことが懸念される。

そこで、本法によるボンレスハム製造工程における亜硝酸根の挙動を把握し、製品中の亜硝酸根を基準内に留める方策を見出すために本調査を実施した。

検査材料は、前述した検査において基準値外の亜硝酸根が検出されたものと同一ロットのボンレスハム1検体の5部位（表1）、新たなボンレスハムの製造工程別に採取したA～Eの5検体の各々5～6部位（表1および図1）とした。ただし肉質によるバラツキを防ぐため、新たに製造するボンレスハムに使用する原材料生肉は同一豚のもも肉とし、さらに製品の亜硝酸根残存量が基準値外になることを避けるために、塩漬剤（図1）を前述の収去

品の20%減で製造することとした。これら検体中の亜硝酸根の検査は、食肉製品の成分規格検査法に従った。

ボンレスハムの製造工程の概要および亜硝酸根の検査結果を図1および表1に示した。

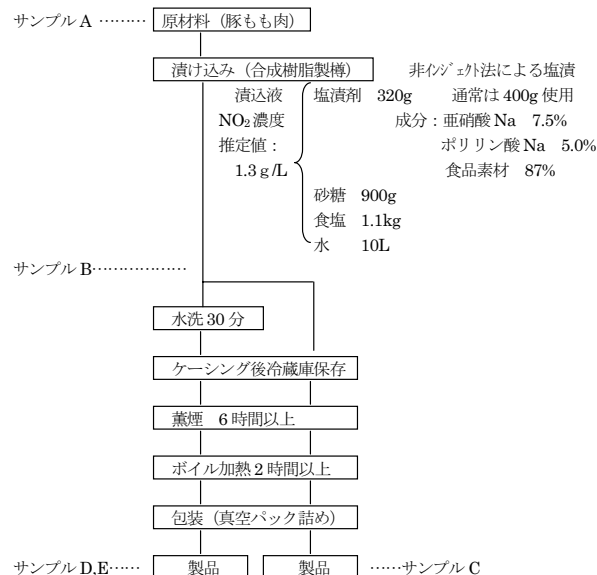


図1 ボンレスハムの製造工程

亜硝酸根の残存量が基準値であった当該品と同一ロットの製品は、各々の部位から亜硝酸根が0.062～0.080g/kg 検出され、2部位において基準値外で当該品と同様の結果であった。製造工程の過程で採取した各検体においても、亜硝酸根残存量は中心部よりも末端部で高く、非インジェクト法による製造法から予想されたとおり部位によりかなりのバラツキがみられた。

また、原料生肉の厚さによって亜硝酸根残存量にかなりの差がでることが確認され、薄手生肉使用製品（サンプルE）において高い残存量を示した。これは、肉を重ね合わせた部分の隙間からも塩漬液が浸透したためと考えられる。

製造工程では、塩漬終了直後の検体（サンプルB）において予想されたことではあるが、水洗をする前で塩漬剤が表面に付着しているため亜硝酸根の残存量は高い値を示した。塩漬後、水洗を省略した場合および通常通り30分水洗した場合に関しては、製品（サンプルC、D）における各部位の亜硝酸根の残存量にほとんど差は見られなかった。半製品（サンプルB）が製品（サンプルC、D、E）になる工程で亜硝酸根が減少する要因は、塩漬後の水洗ではなく燻煙および燻煙後のボイル加熱によることが確認された。なお製造工程は食品衛生監視指針（神奈川県衛生部編）に即しており、特に問題は見られなかった。

1 神奈川県衛生研究所 地域調査部小田原分室
〒250-0042 小田原市荻窪350-1
2 神奈川県衛生研究所 企画情報部
3 神奈川県生活衛生課

表 1 製品等の亜硝酸根検査結果

検体の区分	検体の種類	塩漬後の水洗	熱処理	NO ₂ (g/kg)					
				※1	※2	※3	※4	※5	※6
製品	当該品 同一ロット	有	燻煙・ボイル	0.073	0.064	0.065	0.080	0.062	
原料生肉	サンプルA			0.0001 (Blank)					
半製品	サンプルB	無	燻煙・ボイル	0.209	0.176	0.026	0.045	0.133	
塩漬液	塩漬液（塩漬後） ※7			0.192 (g/L) ※8					
製品（通常生肉使用）	サンプルC	無	燻煙・ボイル	0.057	0.052	0.038	0.045	0.051	
	サンプルD	有	燻煙・ボイル	0.052	0.050	0.032	0.042	0.039	0.048
製品（薄手生肉使用）	サンプルE	有	燻煙・ボイル	0.062	0.064	0.051	0.045	0.060	
検体表面積の概算値(c m ²)				240	240	0	160	320	480
検体量 (g)				200	200	50	150	400	500
検体 10 g に含まれる表面積量(c m ²)				12.0	12.0	0	10.6	8.0	9.6

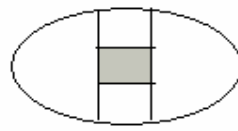
※1



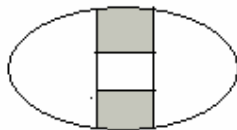
※2



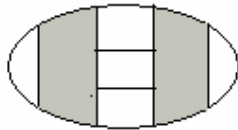
※3



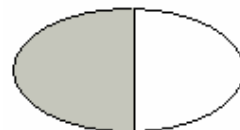
※4



※5



※6



※1～※6 は検査時の検体採取部分（ただし※3は中心部を採取）

※7 塩漬液（塩漬前）は亜硝酸ナトリウムの使用量を通常時（収去時）の20%減で調製

※8 塩漬液（塩漬前）のNO₂濃度は1.3 g/L（推定値）

今回の調査では塩漬剤を従来の20%減で製造したところ、製品中の亜硝酸根残存量は0.032~0.052g/kgとなった。また使用する肉の厚さが薄い物では0.045~0.062g/kgと高く、従来の塩漬剤の量で製造していたと仮定した場合の予測値ではあるが、通常生肉1塊で製造した製品は最大0.065g/kg、薄手生肉数枚を成型して製造した物では最大0.078g/kgとなり、部位によっては基準値を超えてしまっていたと予想される。従ってボンレスハムの亜硝酸根過量を未然に防止するためには、図1に示したような非インジェクト法による製造工程において、塩漬剤使用量を従来量の20%以上減ずる必要性があると考ええる。しかし、本製造工程中の塩漬（漬込）によって肉塊に吸収される亜硝酸根の量は、使用される肉塊の総表面積の大小や肉質がバラツキに影響を与える可能性があるため均一にはならない。つまりボンレスハムは全てが

可食部であり、仮に全体を均一にしてサンプリングした検体の亜硝酸根が使用基準以下だったとしても部位により基準を超えるものがあり得るという問題は残る。非インジェクト法のような製造工程をとる食肉製品製造業者には、行政から業者に対して塩漬剤の使用量等に関する適切な指導・助言を行っていくことが大切であると思われる。

今回の亜硝酸根の調査より、検査と行政の連携は食の安全と安心確保のためにこれからも必要不可欠であると考ええる。

謝 辞

本調査を実施するにあたり協力いただきました茅ヶ崎保健福祉事務所食品衛生課に深謝いたします。

(平成16年7月28日受理)

他誌掲載論文抄録 (平成15年4月～平成16年3月)

Observation of CO₂ in Fourier transform infraed spectral measurement of living *Acholeplasma laidlawii* cells
(*Acholeplasma laidlawii* 生菌の FTIR 測定において観察された二酸化炭素について)

大村陽子 (県立保健福祉大保健福祉学部), 岡崎則男 (神奈川衛研), Spectrochimica Acta, 59A, 1895-1904 (2003)

パルミチン酸d₃₁とオレイン酸を2:3で含む培地で増殖した *Acholeplasma laidlawii* 細胞の構造傷害を経時的に FTIR 分光測定法により調べた。その結果, 2343cm⁻¹の位置において吸収バンドが観察され, バンドの強さは時間と共に増大した。この吸収バンドは *A. laidlawii* から単離した細胞膜を試料とした場合には観察されなかった。従って, 2343cm⁻¹に出現したバンドは *A. laidlawii* のアミノ酸代謝における終末産物である CO₂ に起因ことが示唆された。

ウイルス性食中毒の病因

西尾治 (国立感染研), 西香南子 (三重県科学振興センター), 福田伸治 (広島県保健環境センター), 西田知子 (山口県保研), 篠原美千代 (埼玉衛研), 三上稔之 (青森県環境保健センター), 沖村容子 (宮城県保健環境センター), 新川奈緒美 (鹿児島県環境保健センター), 杉枝正明 (静岡県環境衛生科学研究所), 古屋由美子 (神奈川衛研), 大瀬戸光明 (愛媛衛環研), 鈴木宏 (新潟大), 臨床とウイルス, 31, 163-169 (2003)

小型球形ウイルスが食中毒の病因物質に加えられ, 現在ではウイルス性食中毒のほとんどがノーウォークウイルス (NV) であることがわかっている。わが国におけるウイルス性食中毒事例は毎年11月頃から発生し, 生カキの関与事例が多い。市販生カキについて月別の NV 汚染状況を調べたところ, 12月から3月に NV に汚染されたカキが検出され, 食中毒事例の月別発生状況とカキの NV 汚染との関連が強く示唆された。また輸入魚介類を介しての NV による食中毒事例も発生している。今後, 国内のみではなく諸外国の腸管系ウイルスと食品汚染についての監視と食品の安全性確保に努める必要があると考えられた。

Mite Vectors (Acari:Trombiculidae) of Scrub Typhus in a New Endemic Area in Northern Kyoto, Japan
(恙虫病の新しい流行地京都府北部でのベクター)

高橋守 (川越総合高), 三角仁子 (埼玉医大), 浦上弘 (新潟薬大), 中嶋智子, 降井佐太郎 (京都府保環研), 山本正悟 (宮崎衛環研), 古屋由美子 (神奈川衛研), 三角素弘, 松本勲 (埼玉医大), J.Medical Entomology, 41, 108-114 (2003)

京都府における1983年から1999年までの恙虫病患者27名は, 以前は患者発生のみられなかった京都府北部の野田川流域で発生していた。患者血清は *Orientia tsutsugamushi* (*O.tsutsugamushi*) Gilliam 型に高い値を示した。この恙虫病を媒介するツツガムシの特定を行うために, 1996年から1999年に野田川流域で野ネズミとツツガムシの調査を行った。採取された野ネズミは73.3%がハタネズミであり, ハタネズミに最も多く寄生していたのはフトゲツツガムシであった。野ネズミとフトゲツツガムシから *O.tsutsugamushi* の分離を試みたところ, Gilliam 型が分離された。これらのことから, 野田川流域の恙虫病媒介種はフトゲツツガムシと考えられた。

オゾンおよび紫外線を用いた生活排水二次処理水の消毒効果の基礎的検討

竹田 茂, 伏脇裕一, 森 康明 (神奈川衛研), 浄化槽研究, 15, 5, 1-8 (2003)

生活排水二次処理水を対象に回分式でオゾン処理および紫外線処理実験を行ったところ, オゾン処理ではオゾン注入濃度, 紫外線処理では紫外線照射量に応じて大腸菌群や一般細菌が顕著に除去され, 初期菌数が多いほど一定菌数に低減するのに時間がかかった。例えば, 初期大腸菌群が2,000CFU/mL の場合, オゾン処理ではオゾン注入濃度30mg/L, 紫外線処理では紫外線照射量120mW・s/cm²で大腸菌群数がほぼ不検出となった。

特定原材料 (卵) 測定の厚生労働省通知 ELISA 法の複数機関による評価研究

穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝 (国立医薬品食品衛生研究所), 渡邊裕子 (神奈川県衛生研究所), 飯島賢, 山川宏人 (㈱日清製粉グループ本社), 水口岳人, 吉川礼次 ((財) 食品環境検査協会), 山本美保, 佐藤秀

隆, 渡井正俊 ((財) 食品分析センター), 荒川史博, 小笠原健 (三栄源エフ・エフ・アイ(株)), 西原理久香, 加藤久 (昭和産業(株)総合研究所), 山内淳 ((独) 国立健康栄養研究所), 高畑能久, 森松文毅 (日本ハム(株)中央研究所), 豆越慎一, 村岡嗣朗, 本庄勉 (株)森永生科学研究所), 渡邊敬浩, 和久井知世子 (国立医薬品食品衛生研究所), 今村知明 (東京大学医学部付属病院), 豊田正武, 米谷民雄 (国立医薬品食品衛生研究所), 食衛誌, 44, 213-219 (2003)

特定原材料である卵の通知試験法 ELISA 法の評価のために10機関による検証評価試験を行った. 卵白アルブミン, オボムコイドおよび卵タンパク質を測定する3種 ELISA と同時再現性はおおむね CV 値10%以下と良好であった. 10機関で卵標準溶液添加した5食品の各食品抽出液を分析した際の平均回収率は, 3種 ELISA 法とも40%以上であり, 併行再現性の相対標準偏差は, それぞれ18.7~25.5%, 18.6~41.8%, 21.3~43.3%であり, 室間再現性の相対標準偏差はそれぞれ16.8~35.1%, 19.6~35.8%, 24.7~51.1%であり, ELISA 測定としては実用上支障がないと考えられた. 3種 ELISA 法の検出限界は, 測定溶液の濃度で4~5 ng/mL であった.

An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells (Bhas 42細胞を用いた化学物質の発がんプロモーション活性検出法)

大森清美 (神奈川衛研), 佐々木澄志, 浅田晋, 田中憲穂, 梅田誠 (食薬安全センター), Mut. Res., 557, 191-202 (2004)

発がんプロモーターを含めた非変異発がん性物質を検出するための簡易インビトロ試験法の開発が重要な課題となっている. Bhas 42細胞は, BALB/c 3T3細胞に v-Ha-ras 遺伝子が組み込まれ, 2段階形質転換説におけるイニシエーションを受けた状態にあると考えられている細胞である. 我々は, Bhas 42細胞を用いて発がんプロモーターを検出するための試験法を開発した. この試験法では, 細胞は6ウェルプレートに播種され, 11日間の被験化学物質処理を含めて計17日間の培養の後, 形質転換フォーカスの発現により活性を判定する. 本試験法での結果は, 発がんプロモーターである TPA をはじめ, 種々の化学物質について動物実験で報告されているプロモーター活性と相関が見られた. 我々は, この Bhas 42細胞形質転換試験法が実用的で有用な発がんプロモーター検出法であることを提案する.

Promoter and Mutagenic Activity of Particulate Matter

Collected from Urban Air

(都市大気の粒子状物質に関する発がんプロモーター活性と変異原性)

江副優香 ((独) 国立環境研究所), 大久保忠道 (国立保健医療科学院), 大森清美, 伏脇裕一, 森康明 (神奈川衛研), 梅田誠 ((財) 食品薬品安全センター), 後藤純雄 ((独) 国立環境研究所), J.Health Science, 50, 181-184 (2004)

東京都港区の国立公衆衛生院の屋根に置かれたハイボリュームエアーサンプラーによって集められ大気粒子状物質について Bhas 42細胞を用いた形質転換試験 (Bhas assay) により発がんプロモーション活性を, また Ames 試験により発がんイニシエーション活性を検討した. 両試験法において, サンプル濃度と発がんイニシエーション活性及びプロモーション活性に, 良好な濃度依存的反応が認められた. また, 春季試料と秋季試料とを単位粒子量当たりで比較すると秋季の方が高い値を示し, 変異原性物質と発がんプロモーターが相関をもって汚染している可能性が示唆された. これらのことより大気粒子状物質の発がん性に関するモニタリングには, 変異原性試験ばかりでなく発がんプロモーターに関するバイオアッセイが必要であることが認められた.

エフェドラアルカロイドを含む個人輸入健康食品の医薬品成分に関する検討

小島 尚 (神奈川衛研), 関田節子 (国立衛研, 筑波), 医薬品研究, 35, 22-28 (2004)

エフェドリン類含有を標榜する個人輸入の健康食品に関する調査を行った. 検体は3グループに分類できた. 第1は痩身を標榜した8検体で, 1検体はフェニルプロパノールアミンのみで, 4検体はマオウとカフェインを成分とする植物からなり, さらに, 3検体にそれらに加えアスピリンが含まれていた. 第2はアレルギー対策の2検体で, プソイドエフェドリンを成分とするものであったが, アスピリンやカフェインは検出されなかった. 第3は便宜上呼ぶ“エフェドラサプリメント”の2検体で, エフェドリン類を含んでいた. いずれの検体からもエフェドリン類が検出された. 米国ではこのような健康食品により死亡事故が報告されている. 個人輸入において医薬品成分あるいは強い薬理作用を有する成分を含む健康食品の取り扱いにはビタミンやミネラルを含む健康食品とは異なる対応が取られるべきと考えられる.

いわゆる“ケミカルドラッグ”の実態調査の結果

小島 尚, 宮澤真紀 (神奈川衛研), 石川哲也, 高柳栄郎, 浅谷秀行 (神奈川県衛生部薬務課), 土井佳代

(神奈川衛研), 中毒研究, 17, 71-72 (2004)

陶酔, 興奮や幻覚作用などを目的とした“脱法ドラッグ”の中でも麻薬や覚せい剤と化学的に類似した物質が“ケミカルドラッグ”と呼ばれ販売されている。しかし, その実態は十分に把握されておらず, 県内の繁華街で店頭販売されている商品の実態調査を行った。9検体についてフーリエ変換赤外吸収スペクトル及び質量分析計により測定した。標榜する化学物質と化学構造が一致し, 検体の純度は98%以上であった。今回測定したケミカルドラッグは規制ドラッグに類似し, 危害性も高いことが予想される。乱用や中毒による健康被害を防止するため, このような脱法ドラッグの情報を広く周知し, 健康被害に関わるような問題点を明らかにする必要がある。

桑葉抽出物のラットにおける90日間反復混餌投与毒性試験

宮澤真紀, 宮原智江子, 佐藤修二 (神奈川衛研), 酒井案理 (豊玉香料㈱), 食衛誌, 44, 191-197 (2003)

桑葉抽出物についてラット90日間反復混餌投与毒性試験を実施した。1%, 0.4%および0.1%の桑葉抽出物添加飼料をSD(IGS)系雌雄ラットに90日間自由摂取させ, 経時的に体重測定および摂餌量の測定, 試験終了後に, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 剖検および病理組織学的検査を行った。その結果, 雌雄とも体重および一般状態に特記すべき変化を認めず, その他の検査でも対照群と比べ有意の差は認められなかった。1%投与群での平均被験物質摂取量 (mg/kg/day) は, 雄 884.1mg, 雌 995.7mgであり, この量において桑葉抽出物をラットに90日間混餌投与を行っても毒性は認められず, 桑葉抽出物の亜慢性毒性は低いものと推察された。

健康食品に添加されていた経口血糖降下薬グリベンクラミドの検出事例

熊坂謙一, 小島尚, 土井佳代, 佐藤修二 (神奈川衛研), 薬学雑誌, 123, 1049-1054 (2003)

経口血糖降下薬の一種であるグリベンクラミドが健康食品より検出された。今回, 薄層クロマトグラフィー (TLC) によりスクリーニングを行い, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及び液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS) で同定, 定量を実施した。検体試料溶液とグリベンクラミド標準溶液を比較した結果, TLCではスポットの挙動・発色が一致し, HPLCではピークの保持時間とUVスペクトルが一致し, さらにLC/MSではグリベンクラミドの分子イオンピーク ($M+H$)⁺である m/z :494が確認され, また, フラグメントイオンピーク

クも一致したことから, 検体にグリベンクラミドが含有していることが明らかとなった。その濃度は検体1カプセルあたり約0.78mgであり, 製品に記載されていた摂取目安が4-6カプセルであることから, この製品は十分な医薬品的作用を持つものであると考えられた。

GC-FPDによる野菜, 果実中のグリホサートおよびグルホシネートの同時分析

渡辺真夫 (神奈川衛研), 食衛誌, 45, 38-43 (2004)

グリホサート及びグルホシネートは, 国内で繁用されている除草剤であり, 最近ではその耐性遺伝子を組み込んだ大豆等の作物が開発されている。食品衛生法では80品目以上にグリホサート及びグルホシネートの両方に規格基準が設定されているが, 告示分析法はまったく異なりかつどちらも煩雑な方法で, 食品中の残留実態を調査した報告例がほとんどない。今回, 前報 (『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』食衛誌, 43, 169-172, 2002) の方法を改良し, 両者の簡易迅速同時分析法を開発した。本法を野菜, 果実等に適用したところ良好な回収率が得られ, 妨害もなく日常検査に利用できる方法であった。

防腐剤クレオソートによる室内空気汚染と毒性評価

伏脇裕一, 森 康明 (神奈川衛研), 中島大介, 後藤純雄 ((独) 国立環境研), 小野寺祐夫 (東京理大・薬), 環境化学, 14 (1), 135-139 (2004)

クレオソートに関する室内環境汚染実態とその成分の毒性についての研究を行った。防腐剤としてクレオソートを使用していた集合住宅の調査では, クレオソートの主成分7物質が検出された。また, 細胞増殖阻害が住戸における居間の室内空気について認められた。

クレオソートが塗布された木片をモデルボックスに挿入した実験において, 各種温度条件下で発生したクレオソート成分の濃度変化を検討したところ, クレオソート成分の気中濃度は温度の上昇に伴い増加する傾向にあった。同様に細胞増殖阻害性についても温度の上昇に従って増殖阻害率が上昇した。しかし, Ames 変異原性試験では, クレオソート各成分の濃度範囲では変異原性を示さなかった。室内環境汚染質の評価には, バイオアッセイ法を併用することにより, 化学物質測定のための評価では不十分なものが, より詳細に評価できるようになる。

Cesium uptake by edible mushrooms and microorganisms isolated from mushroom substrata

(食用キノコとキノコ生息基質より分離された微生物に

よる Cs の取込)

桑原千雅子 (神奈川衛研), 杉山英男 (国立保健医療科学院), 加藤文男 (東邦大学), Radioprotection-colloques, 37, C1, 347-352 (2002)

富士山より採取した野生キノコとその生息基質中の¹³⁷Csと安定Csを測定した。またトレーサーとして¹³⁷CsとCsを用いて、食用キノコである *Pleurotus ostreatus* の¹³⁷Cs 取込み培養実験を行ったところ、キノコ子実体中の¹³⁷Cs 濃度は、日本で採取された野生キノコに比べ2桁から4桁高かった。培地中に添加した¹³⁷CsとCs濃度に応じ、キノコ中の¹³⁷CsとCsは高濃度に取り込まれていた。さらにキノコ生息基質中の土壌微生物のCsに対する感受性とその取込を調べた。キノコ生息基質からの細菌と放線菌の出現頻度は、培地へ添加するCs濃度の増加とともに減少した。放線菌は細菌に比べるとCsに対する感受性が高かった。またキノコ生息基質から分離された放線菌は、5mMCs存在下では、菌体内へのCs取込量も比較的高いが、Cs耐性株である *Streptomyces lividans* TK24や *Streptomyces* sp. TOHO-2に比べると生育阻害が若干認められた。走査型電子顕微鏡-X線マイクロアナライザと¹³³Cs-NMRを利用し、放線菌の菌糸内でのCsの存在状態を調べたところ、細胞内に取込まれたCsは細胞質内の輝点を含む領域に酸素、リンとともに高濃度に局在化していた。このCsの局在化が、放線菌の細胞内Csの解毒に関与しているのではないかと推測している。

Uptake and distribution of ¹³⁷Cs and stable Cs by micro-organisms isolated from mushroom substrata in the Japanese forests

(日本の森林内のキノコ生息基質より分離された微生物による¹³⁷Csと安定Csの取込と分布)

桑原千雅子 (神奈川衛研), 福本敦 (東邦大学), 柴田尚 (山梨森林総研), 杉山英男 (国立保健医療科学院), 加藤文男 (東邦大学), Proceedings of the International Symposium on Radioecology and Environmental Dosimetry, 290-295 (2004)

野生キノコが生息する土壌についてpHを調べたところ、42試料全てわずかに酸性に傾いていたため、培地中のpHを変化させることにより、土壌微生物の出現頻度、生育及びCs取込に影響があるか調べた。富士山から採取したキノコ生息土壌を除き、土壌からの放線菌と細菌の出現頻度には、培地中のpH(pH5, 6および7)によって、顕著な違いは認められなかった。またキノコ生息土壌より分離された放線菌、細菌の数株におけるpHの違いによる生育ならびにCs, K取込への影響は、特別な傾向は認められなかった。キノコ生息土壌より分離された微生物は、Csを高濃縮するキノコとほぼ同程度の濃縮を示したので、微生物は土壌中のCsを取込み、細胞内に蓄えることが可能であると推定した。

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

Investigation on the Residual Levels of Food Chemical Contamination in
Kanagawa Prefecture (2003)

Kumiko SATO, Hiroko WATANABE, Shigemi KAI, Teruhisa FUJIMAKI
and Michiko KISHI

Regarding the Claim and Allergy-like Food Poisoning Caused by Processed Seafood
Hiroko WATANABE, Shigemi KAI and Michiko KISHI

Investigation on the Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified
Foods in Kanagawa Prefecture (2003)

Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA, Panadda Vironbounyapad
Hiroko KISHI, Toshiharu YAMADA, Kuni HIRAYAMA and Shuji SATO

Investigation on a Way to Treat Meat Products with Nitrite

Haruko SEKIDO, Hiroshi NAKAMURA, Kayoko NIWA and Naomi ORIHARA

Abstracts of original papers by research staffs (June, 2003 - May, 2004)

KANAGAWA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki 253-0087

JAPAN

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health (Bull. Kanagawa
Ins. of P. H.) is an official periodical on research works at Kanagawa
Prefectural Institute of Public Health and is published, 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. 34 (September, 2004)

CONTENTS

Technical paper

Studies on the Method for Determination of Musty Odor Substances
(2-Methylisoborneol and Geosmin) in Water
Sadao WATANABE

Short reports

Occurrence of Epidemic Gastroenteritis Caused by Viral Agents
in Kanagawa Prefecture (2003)
Miyuki HARA, Yumiko FURUYA, Takashi KATAYAMA, Takanori TAKAHASHI
and Mitsunobu IMAI

Simplified Analytical Methods of Residual Fungicides in Apple Juice
Michiko KISHI, Kumiko SATO and Teruhisa FUJIMAKI

Analytical Method for Imidazolinone Herbicides in Cereals with
Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry System
Kumiko SATO, Teruhisa FUJIMAKI, Michiko KISHI and Ikuo WATANABE

The Analytical Methods for Chlorocresol Determination in Cosmetics with
High Performance Liquid Chromatography
Ayako MATSUZAKA, Kayo SASAKI, Nobuo SATO and Kayo DOI

On the Measuring Residual Chlorine in Water — Comparison between
Diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) Method and *o*-tolidine (OT) Method —
Sumiko SHIMIZU, Hitoshi UEMURA and Shin-Ichi ITOH

Determination of Pesticides and Hazardous Material in Insecticide for Nuisance
Kazuo HASEGAWA, Kiyomi TSUJI, Fumi ISHIZAKA and Yuichi FUSHIWAKI

Surveillance of Viral Gastroenteritis at Chigasaki Area in Kanagawa Prefecture,
2002. 11– 2003. 2
Miki HARADA, Kumiko ITO and Naomi ORIHARA

Data

Preservation of *Mycoplasma pneumoniae* in Freezing at Various Temperature and
Use of the Preserved Strains for Antibacterial Susceptibility Test
Norio OKAZAKI, Hitomi OHYA, Yuko WATANABE and Tsuguo SASAKI

Rapid Detection of Genus *Legionella* by Surface Plasmon Resonance Sensor
Yuko WATANABE, Yasuharu ITAGAKI, Hitomi OHYA and Norio OKAZAKI

Prevalence of *Chlamydophila psittaci* from Birds, Bred in Elementary School
Hiroshi TERANISHI, Ichiro FURUKAWA, Yukie HASEGAWA
Yuuichi ONOUE, Hiromichi TAKANO, Makiko KIMURA
Akira ONOUCHI, Seiji SHIBUYA and Shuzou OSAKA

Occurrence of Tsutsugamushi Disease in Kanagawa Prefecture (2002, 2003)
Yumiko FURUYA, Takashi KATAYAMA, Miyuki HARA, Takanori TAKAHASHI
and Mitsunobu IMAI

The Inspection Example of Mineral Foreign Substance and the Piece Foreign Substance
of Metal in Food
Teruhisa FUJIMAKI, Kumiko SATO, Kazutake MANNEN and Michiko KISHI

Case Studies on Complaints of Unusual Smell in Food