

神奈川県衛生研究所研究報告

第 35 号 (平成 17 年 9 月)

目 次

短報

集団下痢症におけるウエルシュ菌の効率的な検索法に関する検討

鈴木理恵子, 石原ともえ, 三宅芳枝, 黒木俊郎
高橋孝則, 新川隆康

インフルエンザ様疾患からのインフルエンザウイルスおよび
パラミクソウイルスの検出

渡邊寿美, 斎藤隆行, 新川隆康

集団胃腸炎事例からのウイルス検出と遺伝子解析

古屋由美子, 片山 丘, 伊達佳美, 高橋孝則
新川隆康

高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた食品中の
アフラトキシン類の分析

甲斐茂美, 赤星 猛, 岸美智子

家庭用接着剤中の揮発性有機化合物の分析

仲野富美, 長谷川一夫, 辻 清美, 伏脇裕一

室内空気中の VOC 測定用パッシブサンプラーのフィールド試験による評価
辻 清美, 長谷川一夫, 伏脇裕一

資料

神奈川県における恙虫病の発生状況 (平成 16 年度)

片山 丘, 古屋由美子, 高橋孝則, 新川隆康

インターネットで購入した中国茶中のカテキン類、カフェイン
及びテアニンの分析

岸 弘子, 土屋久世, 平山クニ

遺伝子組換え食品の分析結果 (平成 16 年度)

大森清美, 土屋久世, 岸 弘子, 山田利治
平山クニ

食品中の異物検査結果について (平成 15 年度・16 年度)

大森清美, 土屋久世, 岸 弘子, 山田利治
平山クニ

飲料水の大腸菌検査における ONPG 陽性培養液中の腸内細菌科に属する
細菌について

山本陽子, 湯川利恵, 石野珠紀, 沖津忠行

他誌掲載論文抄録 (平成 16 年 4 月～平成 17 年 3 月)

神 奈 川 県 衛 生 研 究 所

〒 253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1

研究報告編集委員会（平成17年度）

委 員 長
今 井 光 信（所 長）

委 員
増 田 瑞 司（副所長）
石 渡 節 子（管理課）
佐 藤 善 博（企画情報部）
石 原 ともえ（微生物部）
竹 田 茂（微生物部）
山 田 利 治（理化学部）
小 島 尚（理化学部）
長谷川 幸 江（地域調査部）

事 務 局
長 田 幸 郎（企画情報部）



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.kikakujoouhou@pref.kanagawa.jp

短報

集団下痢症におけるウェルシュ菌の効率的な検索法に関する検討

鈴木理恵子, 石原ともえ, 三宅芳枝
黒木俊郎, 高橋孝則, 新川隆康

Examination about an Effective Search Method of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in an Outbreak of Diarrheal Disease

Rieko SUZUKI, Tomoe ISHIHARA
Yoshie MIYAKE, Toshiro KUROKI

Takanori TAKAHASHI and Takayasu NIKKAWA

はじめに

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は偏性嫌気性の有芽胞非運動性のグラム陽性大桿菌で、ヒトや動物の腸管内の常在菌であるとともに、下水、河川水等の水中や土壌に広く分布する。ヒトの感染症としては、ガス壊疽、化膿性感染症、敗血症の原因菌として知られているが、最も多発するのは本菌による食中毒である。本菌による食中毒は、エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌(下痢原性ウェルシュ菌)が増殖した食品を喫食することにより、腸管内で本菌が増殖・芽胞を形成する際に產生するエンテロトキシンにより発症する感染型食中毒である。平成8年から平成16年までの本菌による食中毒の全国発生数は年平均29件程度で事件数としては少ないが、1事件あたりの患者数は平均78名と多く、原因施設が給食施設等の大規模調理施設であることがその要因のひとつである。県内では平成16年4月（患者数30名）および平成17年3月（患者数66名）にいずれも施設内給食による食中毒事例の発生があった。本菌による食中毒の最も確実な診断は、患者ふん便や推定原因食品等からエンテロトキシンを產生する本菌が分離されることであるが、2～6%と低率ながらも健康人がエンテロトキシン產生菌を保菌する¹⁾ことから、非病原性およびエンテロトキシン產生性の常在ウェルシュ菌と食中毒の原因菌である本

菌の鑑別が重要となる。また、血清型別による診断は、市販血清Hobbs (1～17型) 型およびこれに加えて東京都健康安全研究センター独自で行われているTW (1～66型) 型が用いられることが多い、市販血清のみでの血清型別は不十分である。また、血清型と病原性は必ずしも一致しないことなど、本菌を原因とする食中毒の診断には時間を要することが多く、改善が求められている。

今回、下痢症患者由来ふん便を用いてエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の検索を行い、本菌が疑われる場合の効率的な検索手順について検討を行ったので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

平成17年3月、食中毒が疑われた事例より採取した下痢症患者由来ふん便26検体および調理従事者ふん便1検体の計27検体を用いた。

2. 食中毒起因菌の分離および同定

ふん便は滅菌生理食塩液で10%乳剤とし、定法²⁾に準じて食中毒起因菌の検索を実施した。ウェルシュ菌検索の詳細は、チオグリコール酸培地（以下TGC培地）（栄研化学）15mlの管底にふん便の10%乳剤をスポットで接種し、100°C、10分加熱し、急冷後37°C、18～48時間培養した。このTGC培養菌をカナマイシン不含CW卵黄寒天培地（ニッスイ）（以下CW培地）に塗抹し、アネロパックケンキ（スギヤマゲン）を用いて37°C、18～48時間、嫌気培養を行った。

CW 平板上で周囲にレシチナーゼ反応および乳糖分解による黄色の白濁環を有する黄白色集落を釣菌し、 α 抗毒素含有濾紙（ニッスイ）を用いてレシチナーゼ抑制試験を行った。また、糖分解用 GAM 半流動高層培地（ニッスイ）を用いて運動性、インドールおよび糖分解試験（グルコース、ラクトース、ラフィノース）を、牛乳培地を用いて凝固およびガス产生試験を行った。

1 検体あたり平均4集落を釣菌して確認培養を行ったが、その後必要に応じて追加し、もっとも多い検体では18集落（平均9集落）について確認培養を行った。

以上の試験によりウェルシュ菌と同定された菌株について、耐熱性A型ウェルシュ菌免疫血清「生研」（デンカ生研）を用いて Hobbs 型による血清型別を実施した。

3. エンテロトキシンの検出

エンテロトキシン遺伝子の検索：TGC 培地培養液1mlを1.5ml マイクロチューブに採取し、遠心分離（15,000rpm、10分）後、リン酸緩衝液（以下 PBS）を用いて3回洗浄を行った。沈渣に PCR 用精製水100 μ lを加え95°C、10分加熱後、急冷して PCR 用の鉢型（以

下, TGC 鑄型)とした。ウェルシュ菌毒素産生遺伝子用 Primer Set CPE-1, -2(TaKaRa)を用いてエンテロトキシン遺伝子の有無を PCR 法で確認した。一方、平板に発育した集落密集地図塊(以下、CW 鑄型)および分離株については PCR 用精製水 100 μl に菌体を懸濁後、TGC 培地培養液からの方針に準じ実施した。

エンテロトキシン産生性試験：ふん便を 10% 乳剤とした遠心上清について、ウェルシュ菌エンテロトキシン検出用キット PET-RPLA 「生研」(デンカ生研)(以下、PET-RPLA) を用いエンテロトキシン産生の有無を確認した。

一方、分離株については変法 Duncan-Strong 培地で 37°C 18~24 時間培養後、その上清を検体とし同様に PET-RPLA でエンテロトキシン産生の有無を確認した。

4. パルスフィールドゲル電気泳動

分離株を GAM ブイヨンで 37°C、18 時間培養後、培養液 200 μl を 15,000 rpm, 10 分遠心分離した。沈渣を PBS で 3 回遠心洗浄後、精製水 200 μl に懸濁し、等量の 1% Seakem Gold Agarose (Cambrex) を加え菌体包埋プラグを作製した。作製したプラグは 1 mg/ml Lysozyme, 80 μg/ml Lysostaphin 添加 0.5M EDTA(pH8.0) 溶液で溶菌後、1 mg/ml proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine 添加 0.5M EDTA (pH8.0) 溶液で処理し、制限酵素 Sma I を用い DNA を切断後、パルスフィールドゲル電気泳動(以下、PFGE)を行った。

結果

ふん便 27 検体について食中毒菌の検索を行ったところ、TGC 培地にウェルシュ菌に特有の発育が 20 検体(74.1%)に認められた。CW 培地による分離培養の結果、TGC 培地に発育の認められた 20 検体すべてから、レシチナーゼ陽性菌の発育が認められた。

TGC 鑄型および CW 鑄型を用いたエンテロトキシン遺伝子検索では各々 18 検体(66.7%)が遺伝子を保有していたが、両鑄型で遺伝子保有が確認されたのは 17 検体であった。

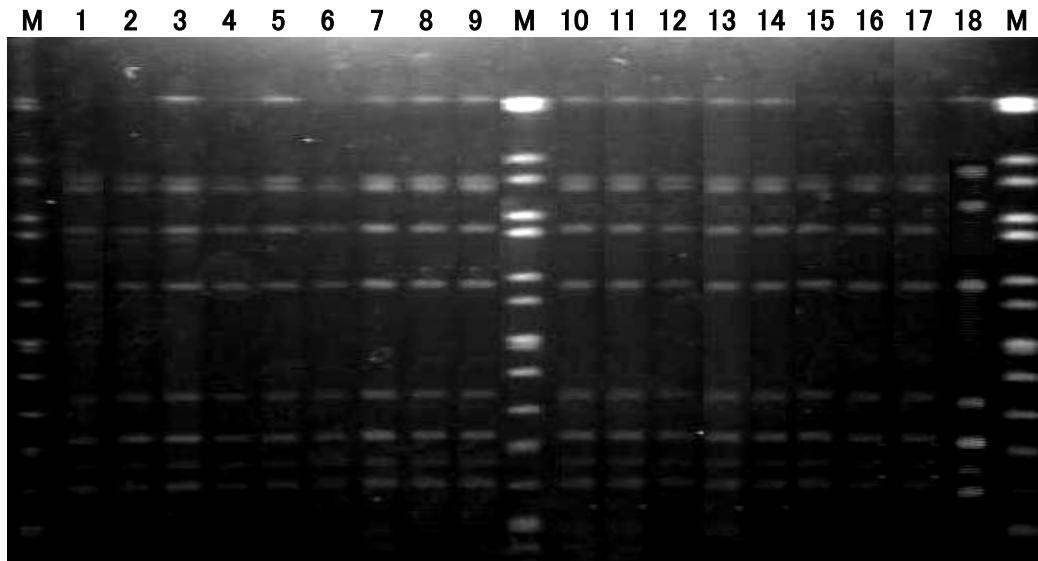
ふん便より 10% 乳剤が作製できた 24 検体について、PET-RPLA によるエンテロトキシン産生試験を実施したところ、15 検体(62.5%)でエンテロトキシン産生が確認された。

CW 培地上に発育したレシチナーゼ陽性集落を釣菌し、α 抗毒素含有濾紙でレシチナーゼ抑制反応が認められた株をウェルシュ菌と推定し、生化学性状試験、血清型別およびエンテロトキシン産生性および遺伝子の検出を行った。生化学性状はいずれも、運動性(-), インドール(-), グルコース(+), ラクトース(+), ラフィノース(+),

牛乳培地で凝固、ガス産生(+)であり、血清型は Hobbs13 型および型別不能株、エンテロトキシンは産生および非産生株が分離されており、エンテロトキシン産生株はすべてエンテロトキシン遺伝子を保有していた。血清型およびエンテロトキシン産生性により Hobbs13 型エンテロトキシン非産生株(13 検体)、血清型別不能エンテロトキシン産生株(17 検体)、血清型別不能エンテロトキシン非産生株(12 検体)の 3 種に型別され、同一検体から複数型のウェルシュ菌が分離された(表 1)。

表 1 供試検体およびウェルシュ菌検出状況

検体 由来	TGC 培地の発育				TGC 培地からのエンテロトキシン遺伝子検出	CW 平板密着地図塊からのエンテロトキシン遺伝子検出	耐熱性ウェルシュ菌検出	エンテロトキシン産生性	血清型	エンテロトキシン産生性	ふん便からの直接生化学性状試験
	TGC 培地	TGC 培地からのエンテロトキシン遺伝子検出	CW 平板密着地図塊からのエンテロトキシン遺伝子検出	耐熱性ウェルシュ菌検出							
1 調理従事者	+	-	-	+	UT(-)			UT(-)		-	
2 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(-)	+		
3 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(+)			
4 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(-)	+		
5 発症者	+	+	-	+	Hobbs13(-)			UT(+)			
6 発症者	+	+	+	+	UT(-)			UT(+)	+		
7 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(-)	+		
8 発症者	-	-	-	-						-	
9 発症者	-	-	-	-						-	
10 発症者	-	-	-	-						-	
11 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(-)	+		
12 発症者	-	-	-	-						NT	
13 発症者	+	-	+	+	Hobbs13(-)			UT(-)	+		
14 発症者	-	-	-	-						-	
15 発症者	-	-	-	-						-	
16 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(-)		NT	
17 発症者	+	+	+	+	UT(-)			UT(+)		-	
18 発症者	+	+	+	+	UT(+)				+		
19 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(-)	+		
20 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(+)		-	
21 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(-)	+		
22 発症者	+	+	+	+	UT(+)				+		
23 発症者	+	+	+	+	UT(-)			UT(+)		+	
24 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(+)		+	
25 発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)			UT(-)		NT	
26 発症者	-	-	-	-						-	
27 発症者	+	+	+	+	UT(+)				+		
計 (%)	20 (74.1)	18 (66.7)	18 (66.7)	20 (74.1)					15 (62.5)*		
NT: 検査せず					UT: 血清型別不能				*	検査数 24 検体	

図1 ウエルシュ菌のPFGEパターン（制限酵素 *Sma* I）

M : 分子量マーカー *Salmonella Braenderup* H9812
 レーン1~17: 下痢症患者由来株（型別不能・エンテロトキシン産生株）
 レーン18 : 参考株（型別不能・エンテロトキシン産生株）

実際の検査過程において CW 平板上からレシチナゼ陽性菌を無作為（平均4集落）に釣菌したところ、エンテロトキシン産生株が分離できたのは20検体中7検体で、釣菌数に対するエンテロトキシン産生株の占める割合は24.3%であった。しかし、TGC 培地による PCR スクリーニング成績（66.7%）を加味して平均9集落を追加釣菌したところ、釣菌数に対するエンテロトキシン産生株の占める割合は46.2%と上昇し、20検体中17検体からエンテロトキシン産生株を分離することができた。

TGC 鑄型または CW 鑄型でエンテロトキシン遺伝子の検出、ふん便乳剤中のエンテロトキシン産生性およびエンテロトキシン産生株の分離の4手法において不一致を示したのは24例中4例であった。

分離された型別不能・エンテロトキシン産生株（17株）および参考株として他事例より分離された型別不能・エンテロトキシン産生株（1株）について、制限酵素 *Sma* I を用いた PFGE を行ったところ、参考株を除く17株のDNA パターンは一致していた（図1）。

考 察

健常人における耐熱性ウエルシュ菌の保菌率は15～25%，エンテロトキシン産生株の保菌率はさらに低く2～6%¹⁾とされている。本菌が食中毒の原因菌か否かは同一血清型のエンテロトキシン産生菌が優位に検出されることが望ましいが、市販血清のみで対応することは難し

く、初期段階ではエンテロトキシン産生性の有無が食中毒か否かの指標となる。ウエルシュ菌は、ふん便から PET-RPLA を用いて直接エンテロトキシンの検索が可能であるが、煩雑な食中毒検査を実施している中、未だ原因菌の特定ができていない場合に並行して特定の細菌の毒素等の検索を行うことは難しく、検査材料も不足する場合がある。そこで加熱により選択的に増菌された培養液（TGC培地等）中の発育を観察した上で、培養液から食中毒原因菌の毒素遺伝子等をPCR法で検索することを取り入れることにより、原因菌の推定を迅速に行うことが可能になると考える（図2）。

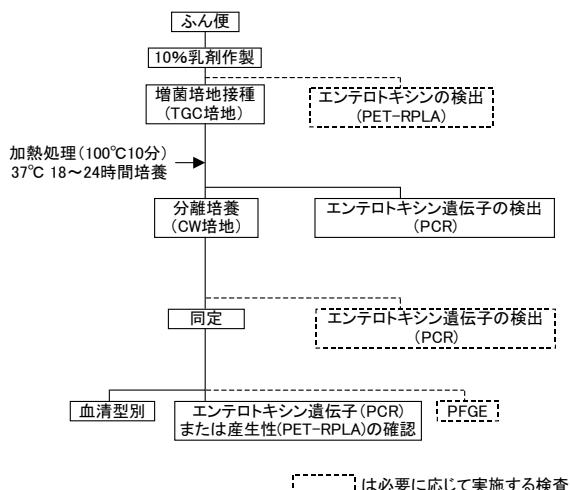


図2 耐熱性ウエルシュ菌の検索法

エンテロトキシン産生の有無は集落のみで判断することは難しく、培養液または平板集落密集地からのスクリーニング検査が有効と考えられる。しかし今回の結果では、すべてのスクリーニング法の結果が一致したわけではなく、24例中4例（検体番号5, 13, 17, 20）の不一致が確認されたことから、この原因を次のように考察した。CW 錄型での遺伝子検出およびエンテロトキシン産生株の分離が陰性であった検体番号5では、目的菌の遺伝子およびエンテロトキシンは検体中に存在していたものの、エンテロトキシン産生ウェルシュ菌が生残していなかったことが原因として考えられた。TGC 錄型における遺伝子検出のみが陰性であった検体番号13では、TGC 培養液中のエンテロトキシン産生菌量が PCR 法での検出限界以下であったことが原因として考えられた。ふん便中のエンテロトキシン産生性のみが陰性であった検体番号17および20では、輸送用培地中の検体量の不足、またはエンテロトキシン産生量が検出限界以下であった等が考えられた。スクリーニング法をどの段階で取り入れれば最も効率的で有用であるかを判断するには、今回の結果のみでは例数は不十分であることから、今後も実際の事例数を増やしデータの蓄積を行うことが重要である。

また、本菌を食中毒と決定する上での一指標とされている血清型別は、市販血清で型別不能であった場合に他施設に依頼を行うことになり迅速性にかける。このような場合 PFGE による DNA パターンの一致を疫学解析の一指標と考えることで、他施設に依頼することなく迅速な結果を得ることが可能である。

今回、下痢症患者の74.1%から耐熱性ウェルシュ菌が検出され、その中でも起因菌と考えられるエンテロトキシン産生株は全体の63.0%から検出されており、明らかに健常者より保菌率が高いこと、市販血清では型別不能であったが PFGE のパターンが一致したことにより、共通の汚染源による集団下痢症（食中毒）であることが推察された。

（本調査を実施するにあたり、ご協力いただいた茅ヶ崎保健福祉事務所生活衛生課および関係者の皆様に御礼申し上げます。）

（平成17年7月22日受理）

文 献

- 1) 坂崎利一：新訂食水系感染症と細菌性食中毒，pp396-412，中央法規出版，東京(2000).
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005

短報

インフルエンザ様疾患からの インフルエンザウイルスおよび パラミクソウイルスの検出

渡邊寿美、斎藤隆行、新川隆康

Detection of Influenza Virus and *Paramyxoviridae* from Influenza-like Illness

Sumi WATANABE, Takayuki SAITO

and Takayasu NIKKAWA

はじめに

かぜ様疾患の病原体のほとんどはウイルスであるといわれており、その種類は多岐にわたる。冬季のインフルエンザ流行期においては、インフルエンザあるいはインフルエンザ様疾患と診断された症例からインフルエンザウイルスが多数分離されてくるが、他のウイルスが分離されたり、ウイルス分離陰性となる症例も少なくない。また、インフルエンザ流行期の前後、あるいは時期はずれのインフルエンザ様疾患については、インフルエンザウイルスが分離されない症例の割合が多い。そこで、インフルエンザ様疾患の病原体検索を充実させるため、数種類の細胞を用いてインフルエンザ以外の呼吸器疾患関連ウイルスの分離を試みると共に、急性呼吸器感染症の原因として重要でありこれまで分離経験の少ないパラミクソ科に属するウイルス（パライフルエンザウイルスおよびRS (Respiratory Syncytial) ウイルス）の遺伝子検出を試みたので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

平成14年度から16年度（平成14年4月から17年3月）の3年間に検査依頼のあった集団かぜ患者検体および感染症発生動向調査の病原体定点から提供されたインフルエンザ様疾患患者検体を用いた。検体数は、集団かぜ（う

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

がい液）124検体、インフルエンザ様疾患（咽頭拭い液または鼻腔拭い液）605検体である。

2. ウィルス分離

全ての検体について、MDCK 細胞および Caco-2細胞を用いてインフルエンザウイルス分離検査を行った。2代の継代培養を経ても細胞変性効果 (CPE) が確認できなかったものをインフルエンザウイルス分離陰性検体とし、他のウイルスを対象とした分離検査を行った。使用した細胞は、RD-18S, HeLa, Vero, Hep-2, GMK, LLC-MK2およびVeroE6の7種類である。

3. 遺伝子検出

ウイルス分離陰性検体について、インフルエンザウイルス A(H1)型、A(H3)型、B型、パライフルエンザウイルス1～3型、RS ウィルスを対象に RT-PCR による各ウイルス遺伝子の検出を行った。患者検体から QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。抽出RNAは、Oligo(dt)₁₂₋₁₈PRIMER (Invitrogen) および Super Script II RT (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。Taq ポリメラーゼは Gene Taq (ニッポンジーン) を使用した。PCR 反応に使用したプライマーおよび PCR 産物の分子サイズは表1 のとおりである。また、各ウイルスの PCR 条件は以下のとおりである。インフルエンザウイルスは1stPCR, 2ndPCRともに既報¹⁾ のとおりの温度条件、変性94°C1分、アニーリング55°C1分、伸長72°C1分で行ったが、検出効率を上げるために、1stPCR は40サイクル、2ndPCR は30サイクルで行った。パライフルエンザウイルスの温度条件は1stPCR が94°C1分、50°C1分、72°C1分、2ndPCRが94°C1分、58°C1分、72°C1分で²⁾、インフルエンザウイルスの場合と同様に1stPCR は40サイクル、2ndPCR は30サイクルで行った。RS ウィルスの温度条件は参考文献では1stPCR が94°C1分、50°C1分、72°C1分、2ndPCR が94°C1分、60°C1分、72°C1分と設定されているが³⁾、一台の装置で同時に増幅する目的でパライフルエンザと同じ温度条件で予備実験を行った結果、非特異的反応は見られずかつ増幅効率も同等であることが確認できたので、2ndPCR のアニーリング温度をパライフルエンザウイルスと同じ58°Cに設定することにし、温度条件、サイクル数とともにパライフルエンザウイルスの条件に合わせて行った。なお、インフルエンザウイルスの1stPCR、パライフルエンザウイルスおよび RS ウィルスの PCR については、それぞれの型別プライマーを混合して使用し、インフルエンザウイルスの2ndPCR の場合のみ各型別に PCR 反応を行った。PCR 産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、エチヂウムプロマイドで染色した後、紫外線を照射して特異バンドを観察確認した。

表1 対象ウイルスと使用プライマー

ウイルス	型(亜)別	1stPCR (分子サイズ)	2ndPCR (分子サイズ)	
インフルエンザ	B型	KF1/KF2 (329bp)	KF3/KF4 (192bp)	清水ら ¹⁾
	A(H1)型	KF5/KF6 (431bp)	KF7/KF8 (197bp)	
	A(H3)型	KF9/KF10 (578bp)	KF11/KF12 (232bp)	
パラインフルエンザ	1型	PIP1+/PIP1- (477bp)	PIS1+/PIS1- (316bp)	Echevarriaら ²⁾
	2型	PIP2+/PIP2- (507bp)	PIS2+/PIS2- (203bp)	
	3型	PIP3+/PIP3- (477bp)	PIS3+/PIS3- (102bp)	
RS	A型	RSVABF/RSVABR (838bp)	RSVAF/RSVAR (334bp)	Stocktonら ³⁾
	B型	A, B共通	RSVBF/RSVBR (183bp)	

表2 集団かぜ検体からのウイルス分離および遺伝子検査結果

検出ウイルス	平成14年度			平成15年度			平成16年度			計
	12月	1月	2月	12月	1月	2月	12月	1月	2月	
検体数	9	35	0	14	29	0	0	29	8	124
ウイルス分離										
インフルエンザA(H3)型	4	12		10	9		3	2		40
インフルエンザB型		6					6			12
単純ヘルペス1型		1 *					1			2
コクサッキーB1型				1 *						1
分離陰性検体数	5	17		4	20		19	6		71
PCRによる遺伝子検出										
インフルエンザA(H3)型	2	4		2	12			1		21
インフルエンザB型		1					3			4

* 同一検体からインフルエンザウイルスA(H3)型が分離されている

表3 インフルエンザ様疾患検体からのウイルス分離および遺伝子検査結果

検出ウイルス	平成14年度					平成15年度					平成16年度					計
	4~11月	12月	1月	2月	3月	4~11月	12月	1月	2月	3月	4~11月	12月	1月	2月	3月	
検体数	4	15	77	33	10	2	16	121	66	6	0	10	43	165	37	605
ウイルス分離																
インフルエンザA(H3)型	2	56	6	2	1	5	98	48	4		11	45	13	291		
インフルエンザB型		2	14	5		1		2			15	75	9	123		
アデノ1型			1											1		
アデノ2型													1		1	
アデノ3型									1					1		
アデノ4型				1										1		
コクサッキーB5型											1				1	
単純ヘルペス1型						1								1		
未同定						1								1		
分離陰性検体数	4	13	19	11	3	1	9	22	15	2	9	17	44	15	184	
PCRによる遺伝子検出																
インフルエンザA(H3)型	1	1	1				1							4		
インフルエンザB型		3	1											4		
パラインフルエンザ2型						1			1					1		
RS							1		1			1			3	

結 果

1. 集団かぜ検体のウイルス検索

124検体についてウイルス分離検査を行った結果、53検体(42.7%)から55株のウイルスが分離された(表2)。分離ウイルスの内訳は、インフルエンザウイルスが52株、その他のウイルス(単純ヘルペスウイルスおよびコクサッキーウイルス)が3株であった。単純ヘルペスウイルスのうちの1株とコクサッキーウイルスは、同一検体からインフルエンザウイルスA(H3)型も分離されており、それぞれ別々の培養細胞から分離された。分離陰性検体は71検体あり遺伝子検出を試みたところ、25検体(35.2%)からインフルエンザウイルス遺伝子が検出された。内訳は、A(H3)型21、B型が4であった。

2. インフルエンザ様疾患検体のウイルス検索

605検体についてウイルス分離検査を行った結果、421株のウイルスが分離された(表3)。分離ウイルスの内訳は、インフルエンザウイルスが414株で68.4%を占め、他のウイルス(アデノウイルス、コクサッキーウイルス、単純ヘルペスウイルスおよび未同定)は7株であった。ウイルス分離陰性検体は、184検体であった。ウイルス分離陰性検体のうち155検体について遺伝子検出を試みたところ、12検体(7.7%)から各ウイルスの特異遺伝子が検出された。内訳は、インフルエンザA(H3)型が4、同B型が4、RSが3、パライフルエンザ2型が1であった。

考 察

集団かぜ検体からのインフルエンザウイルス分離率は41.9%であったが、これに遺伝子検出の結果を加味するとインフルエンザウイルス検出率は62.1%となった。なお、結果は示していないが、インフルエンザウイルス検出陰性者のうち急性期および回復期のペア血清の抗体検査によりインフルエンザの感染が確認された27例を加えれば集団かぜ患者のインフルエンザウイルス陽性率は83.9%と高率であった。一方、感染症発生動向調査のインフルエンザ様疾患検体では、インフルエンザウイルス分離率は68.4%であり、遺伝子検出の結果を加味しても69.8%とインフルエンザウイルスの検出率はほとんど変わらなかった。

検体からのウイルス分離率に差が出た理由は、検体採取方法の差によるものと考えられる。山崎ら⁴⁾の報告によれば、うがい液中の感染価ウイルス量は 10^4 pfu/mlを超えるものが多く、咽頭および鼻腔拭い液は 10^4 pfu/mlを超えるものが約半数であった。遺伝子検出の利点は、検体中に分離に十分なウイルス量が存在しない場合、あるいはウイルスの感染力が失われてしまった場合でも、検出率を補うことができる点にある。今回行ったウイル

ス検出の成績から、集団かぜの病原体調査にインフルエンザウイルスの遺伝子検出を加えるとウイルス検出率の向上に効果的であり、感染症発生動向調査のインフルエンザ様疾患検体に対して遺伝子検出を試みるのであれば、インフルエンザウイルス以外のウイルスを対象とした方がより効果的であると考える。

今回の調査では、全検体の約30%がインフルエンザウイルス不検出という結果になった。インフルエンザ流行期に検出されてくる呼吸器疾患関連ウイルスとしては、RSウイルス、パライフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス等が挙げられる。病原微生物検出情報によれば平成15年1~12月にインフルエンザおよびインフルエンザ様疾患患者から分離されたインフルエンザ以外のウイルスで最も多かったのがアデノウイルスであり⁵⁾、我々の成績でも異なる型のアデノウイルスが分離されている。一方、RSウイルスやパライフルエンザウイルスは分離例が少ない。両ウイルスは、健康成人に対しては比較的軽症状ですんでしまうが、小児(特に乳幼児)に細気管支炎や肺炎等重篤な状況を引き起こすことがある。また、インフルエンザ非流行期ではあるが、RSウイルス⁶⁾やパライフルエンザウイルス3型⁷⁾による集団発生事例の報告もある。さらに、平成15年の感染症法の改正に伴い、RSウイルス感染症が5類感染症定点把握疾患に新たに加わったことなどから、これらのウイルスの動向把握ができる体制を整える必要があると思われた。今回の調査では、両ウイルスの検出における作業効率をあげるために、一台の装置で同時に遺伝子增幅を行う方法を実施した。その結果、インフルエンザ様疾患検体からRSウイルスおよびパライフルエンザウイルスを検出することができたことから、感染症発生動向調査においては、これらウイルスの遺伝子検出を導入することが効果的であると考える。

今後、PCR法を用いたヒトメタニューモウイルス検出系の検討を考えている。このウイルスは、RSウイルスやパライフルエンザウイルスと同じパラミクソウイルス科に分類されており、国内での分離⁸⁾や疫学調査⁹⁾の報告もある。RSウイルスとパライフルエンザウイルスの遺伝子検出系にこのヒトメタニューモウイルスも加え、パラミクソウイルス科に属するウイルスの動向把握を充実させていきたいと考えている。

(平成17年7月22日受理)

文 献

- 清水英明、渡邊寿美、今井光信：Nested-PCR法によるインフルエンザウイルスの検出、感染症学雑誌、71, 522-526 (1997)

- 2) Echevarria,J.E., Erdman,D.D., Swieerkosz,E.M., Holloway,B.P. and Anderdon,L.J. : Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1,2 and 3 from clinical samples by multiplex PCR, *J.Clin.Microbiol.*, **36**, 1388-1391 (1998)
- 3) Stockton J., Ellis J.S., Saville M., Clewley J.P. and Zambon M.C. : Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses, *J.Clin.Microbiol.*, **36**, 2990-2995 (1998)
- 4) 山崎雅彦, 三田村敬子, 川上千春: インフルエンザ迅速診断キットの現況, *インフルエンザ*, **4**, 43-50 (2003)
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター: アデノウイルスと咽頭結膜熱2003, *病原微生物検出情報*, **25**, 94-96 (2004)
- 6) 改田 厚, 村上 司, 入谷展弘, 久保英幸, 石井宮次, 浜本芳彦: 保育所における RS ウィルスの集団感染事例—大阪市, *病原微生物検出情報*, **25**, 235-236(2004)
- 7) 尾西 一, 大矢英紀, 川島栄吉, 庄田丈夫, 表佐和, 大田良子ほか: 中学校でのパラインフルエンザウィルス3型による集団かぜー石川県, *病原微生物検出情報*, **20**, 223-224 (1999)
- 8) 後藤郁男, 山本紀彦, 植木 洋, 佐藤千鶴子, 渡邊節, 秋山和夫ほか: インフルエンザ様患者からの human metapneumo virus の分離ー宮城県, *病原微生物検出情報*, **24**, 64-65 (2003)
- 9) 高尾信一, 下薙広行, 柏 弘, 松原啓太, 坂野 喬, 池田政憲ほか: 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的, 疫学的解析, *感染症学雑誌*, **78**, 129-137 (2004)

短報

集団胃腸炎事例からのウイルス 検出と遺伝子解析

古屋由美子, 片山 丘, 伊達佳美
高橋孝則, 新川隆康

Detection and Genetic Analyses of Viruses in Gastroenteritis Outbreaks

Yumiko FURUYA, Takashi KATAYAMA
Yoshimi DATE, Takanori TAKAHASHI
and Takayasu NIKKAWA

はじめに

平成16年12月から平成17年1月にかけて全国の老人保健施設で、ノロウイルスを原因とする集団胃腸炎が多発し問題となった。ノロウイルスは冬に発生するウイルス性食中毒や感染性胃腸炎の原因となることが知られている。老人保健施設や病院のような集団生活の場でウイルスが原因の感染性胃腸炎が発生すると、患者発生の規模が大きい事例になる可能性があることから、感染拡大を防ぐためにも原因ウイルスや感染源の調査など早期の対応が重要となっている。またウイルス性食中毒事例では生鮮魚介類以外の原因食品は不明な事例が多く、感染経路を解明することは重要である。

そこで平成16年4月から平成17年3月にかけて、県域で発生した集団胃腸炎事例について、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16年4月から平成17年3月に神奈川県域で発生した集団胃腸炎55事例より得られた便859検体と吐物7検体、事例に関連した食品33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したリン酸緩衝液(PBS(-))で10%乳剤とし、攪拌後10,000rpmで10分間遠心し、上清をRNA抽出に使用した。RNAの抽出にはQIAamp Viral

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

RNA Mini Kit (Qiagen 社製) を用いた。抽出した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°Cで1時間逆転写反応を行いcDNAを作製した。リアルタイムPCRは影山らの方法¹⁾に従って、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI 社製) を用いて、genogroup I (G I) はプライマー：COG1F/COG1R, プローブ：RING1-TP(a)／RING1-TP(b), genogroup II (G II) はプライマー：COG2F, ALPF/COG2R, プローブ：RING2AL-TPを使用し、G I, G 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新たにPCRを行い、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。

食品は約1gを取り、滅菌PBS(-)を9ml加えて混合し、攪拌後8,400rpmで20分間遠心した。さらに上清を30%ショ糖溶液に重層し、40,000rpmで2時間遠心した。沈査を滅菌PBS(-)200μlに再浮遊し、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は便と同様の方法で行った。

3. 電子顕微鏡観察

便は滅菌PBS(-)で10%乳剤とし、攪拌した。8,400rpmで20分間遠心後上清を30%ショ糖溶液に重層して40,000rpmで2時間遠心した。沈査を滅菌PBS(-)で200μlに再浮遊後、2%リンタングステン酸ナトリウムでネガティブ染色後40,000倍でウイルス粒子の有無を検鏡した。

4. A群口タウイルスの抗原検出法

A群口タウイルス抗原検出用キットであるロタクロン(TBF 社製)を用い、キットの使用説明書に従いA群口タウイルスを検出した。

結果と考察

平成16年度に発生した集団胃腸炎55事例のうち37事例の353検体から遺伝子検出法でノロウイルスが検出された。そのうち食中毒と判定されたものが10事例(表1)、感染性胃腸炎としてとり扱われたものが13事例あった(表2)。

電子顕微鏡観察は、主に遺伝子検出法でノロウイルスが検出されなかった事例についてノロウイルス以外の原因ウイルスの検索や、ノロウイルスが検出された検体の一部については確認の目的で行った。その結果ノロウイルス遺伝子が検出されなかった18事例中1事例からロタウイルス粒子が観察され、それらはA群口タウイルス抗原検出キットにより、A群口タウイルスであることが確

表1 食中毒事例

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	電頭 陽性数
1	H16.4	厚木	寮	不明	患者便	17	14	GII	N.D.
					調理従事者便	10	5	GII	N.D.
2	H16.12	茅ヶ崎	飲食店	和え物	患者便	32	27	GII	N.D.
					調理従事者便	34	5	GII	N.D.
3	H16.12	小田原	飲食店	生力ヰ	患者便	34	27	GI, GI&II, GII	N.D.
					調理従事者便	8	1	GII	N.D.
4	H16.12	小田原	飲食店	不明	患者便	4	3	GII	N.D.
					調理従事者便	12	5	GII	N.D.
5	H16.12	厚木	飲食店	不明	患者便	12	11	GII	N.D.
					調理従事者便	9	3	GII	N.D.
6	H17.1	小田原	飲食店	不明	患者便	17	17	GII	N.D.
					調理従事者便	14	1	GII	N.D.
					食品	1	0		
7	H17.1	藤沢	老人保健施設	不明	患者便	11	9	GII	0
					調理従事者便	17	7	GII	1
					食品	1	0		
8	H17.1	藤沢	旅館	不明	患者便	28	23	GII	3
					調理従事者便	16	1	GII	0
9	H17.2	厚木	飲食店	生力ヰ	患者便	9	8	GI, GI&II	1
					調理従事者便	5	0		0
					食品	2	0		
10	H17.3	秦野	飲食店	不明	患者便	13	11	GII	3
					調理従事者便	15	3	GII	0
					食品	1	0		

N.D. : 検査せず

表2 感染性胃腸炎事例

事例 No.	発生年月	管轄保健 福祉事務所	原因施設	検体名	検体数	RT-PCR 陽性数	genogroup	電頭 陽性数
1	H16.10	鎌倉	幼稚園	発症者便	81	27	GII	1
				食品	2	0		
2	H16.12	大和	老人保健施設	発症者便	34	30	GII	N.D.
				調理従事者便	14	0		N.D.
3	H16.12	足柄上	病院	発症者便	8	6	GII	N.D.
				調理従事者便	9	0		N.D.
4	H16.12	茅ヶ崎	病院	発症者便	25	20	GII	N.D.
				発症者吐物	6	4	GII	N.D.
				調理従事者便	15	0		N.D.
5	H16.12	大和	老人保健施設	発症者便	7	5	GII	N.D.
6	H16.12	大和	老人保健施設	発症者便	6	4	GII	N.D.
7	H17.1	三崎	老人保健施設	発症者便	5	4	GII	N.D.
8	H17.1	藤沢	老人保健施設	発症者便	4	1	GII	N.D.
				調理従事者便	4	0		N.D.
9	H17.1	足柄上	老人保健施設	発症者便	16	10	GII	N.D.
10	H17.1	厚木	老人保健施設	発症者便	7	4	GII	N.D.
				調理従事者便	12	0		N.D.
11	H17.1	三崎	老人保健施設	発症者便	2	2	GII	N.D.
12	H17.1	三崎	老人保健施設	発症者便	1	1	GII	N.D.
13	H17.2	平塚	老人保健施設	発症者便	9	7	GII	N.D.
14*	H17.3	鎌倉	老人保健施設	発症者便	12	0		6
				調理従事者便	19	0		N.D.
				食品	11	0		

N.D. : 検査せず

* : ロタウイルスが検出された事例

認された（表2）。またノロウイルス遺伝子が検出された食中毒事例8検体、感染性胃腸炎事例1検体から小型球形ウイルス粒子が観察され、それらはノロウイルスであることが確認された（図1、表1、2）。

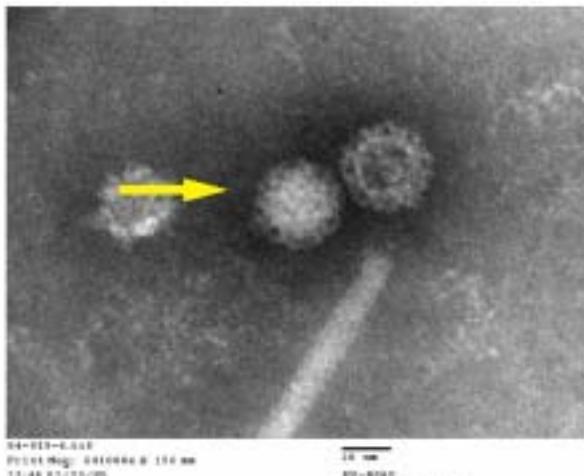


図1 食中毒事例から検出されたノロウイルス

食中毒事例で検出されたノロウイルスの genogroup は G II が 8 事例（80%）で大部分を占めており。G I と G II の両方が検出された事例は 2 事例（20%）であった。事例3の患者便からは G I のみ検出されたもの、G I および G II が重複して検出されたもの、G II のみ検出されたものがあり、事例9は G I のみ検出されたもの、G I と G II が重複して検出されたものがあった。同一事例で G I と G II が重複して検出されたこれらの 2 事例はともに生力キを摂食しており、原因食品は生力キと推定された。摂食した生力キが数種類のノロウイルスを蓄積しており²⁾、そのために異なる genogroup が同一事例から検出されたと推察された。しかし事例9の食品残品の生力キについて検査を行ったが、これら生力キからはノロウイルス遺伝子は検出されなかった。これは摂食した生力キはヒトを発症させる量のノロウイルスに汚染されていたが、残品の生力キは検出限界以下のウイルス汚染であったか、あるいは汚染されていなかつたと考えられた。

その他の事例の原因食品は、事例2については疫学調査から和え物と推定された。しかし事例6、7、10では原因食品の検査を行ったが、ノロウイルス遺伝子は検出されず、原因食品が不明であった。これら原因食品不明の事例ではいずれも調理従事者からノロウイルスが検出されていることから、調理従事者による二次汚染が原因で食中毒が発生した可能性も考えられた。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に注意を喚起する必要が再確認された。

検出されたウイルスの遺伝子の塩基配列を調べたとこ

ろ、事例3では G I および G II が重複した 1 検体の遺伝子は、G I が Stavanger 株近縁、G II が Miami 株近縁であり、他の 1 検体は G I が DesertShield 株近縁、G II が Chitta 株近縁であった。事例9では G I のみ検出された遺伝子は DesertShield 株近縁で、G I および G II が重複したものは G I が Winchester 株近縁、G II が Lordsdale 株近縁であった。生力キには数種類のノロウイルスが蓄積されている²⁾ことから、これら生力キによるウイルス性食中毒から検出される株は多種であると考えられた。またその他 5 事例は Lordsdale 株近縁、1 事例は Miami 株近縁、1 事例は Amsterdam 株近縁であった（図2）。

県内の食中毒事例で検出されたノロウイルスの genogroup は毎年 G II が多く、これは全国の状況と一致した³⁾。

感染性胃腸炎 13 事例の発生場所は、10 事例が老人保健施設、2 事例が病院、1 事例が幼稚園であった。感染性胃腸炎事例では、発症者（入所者、入院患者や施設等の職員）を中心に行っているが、食中毒を疑った事例では非発症の調理従事者についても検査を行ったものもある。感染性胃腸炎事例で検出されたノロウイルスの genogroup はすべて G II であり、全国の状況と同様の傾向であった³⁾。検出されたウイルスの遺伝子の塩基配列を調べたところ、10 事例は Lordsdale 株近縁、1 事例は Miami 株近縁であり（図2）、この時期県域では Lordsdale 株による感染性胃腸炎が流行していたと思われた。

聞き取り調査の結果ほとんどの事例で入所者や入院患者とともに職員にも発症が見られた。またこのなかには職員がはじめに発症している事例もみられており、このような場合、職員が施設外からウイルスを持ち込み感染源となった可能性が高いと考えられた。

ノロウイルスは 100 個程度のウイルスが体内に侵入すると発症する可能性がある⁴⁾。今回の事例では患者便や吐物中のウイルス遺伝子量は検体 1gあたり 10^4 コピー以上含まれていた。そのため便や吐物を処理する職員への感染の危険が高く、施設内で感染が起こると入所者や入院患者の間で感染が広がるとともに、職員の間でも感染が広がり、ノロウイルスによる感染を拡大したと考えられた⁵⁾。

このように施設内でひとたびノロウイルスの感染が起ると、特に老人保健施設においては容易に感染が拡大し、その結果多くの患者が発生する。そのため拡大を防止するには、職員の衛生教育を十分に行い、作業ごとの手洗いの奨励や、便や吐物の処理にはディスポーザブル手袋を使用し、容器や周囲の清掃と殺菌を徹底することが重要である。

平成 16 年度は昨年度に比べて施設内での感染性胃腸炎

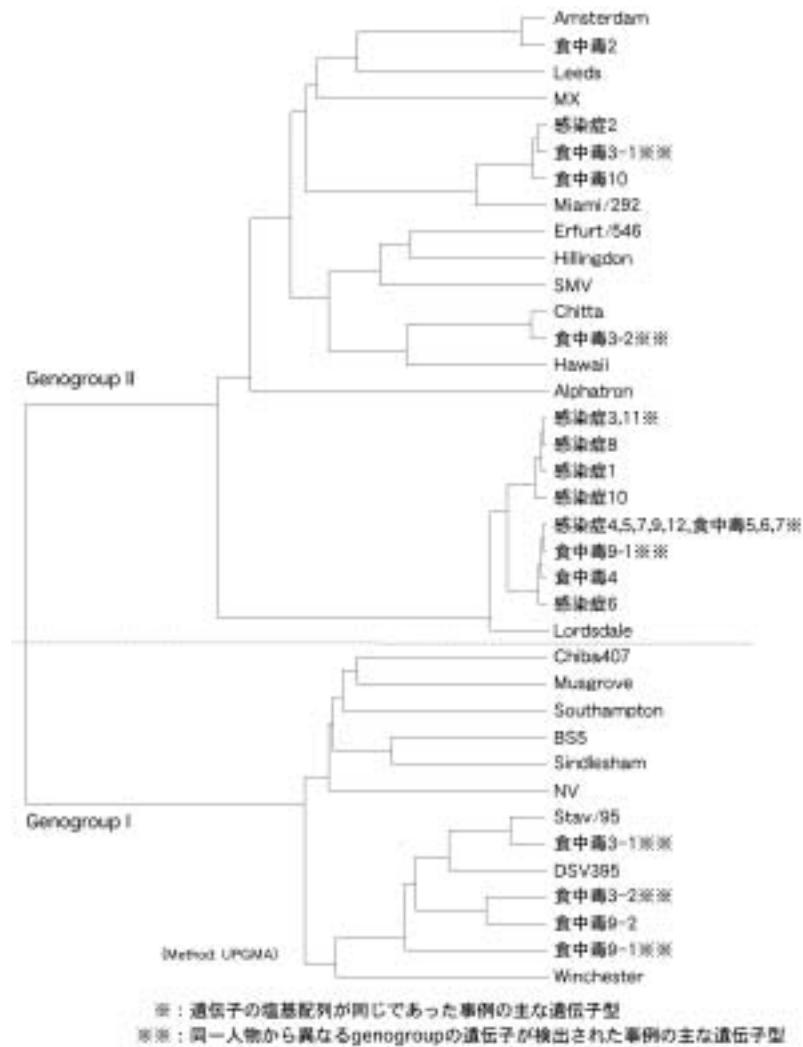


図2 県域の事例より検出されたノロウイルス遺伝子の系統樹

の集団発生が多発した。さらに今後もこの傾向は続くと思われる。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調査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、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、県生活衛生課および保健予防課（健康増進課）の方々に深謝いたします。

（平成17年7月22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) 斎藤博之, 原田誠三郎, 佐藤宏康: ノーウォークウイルス (NLV) の検査における一本鎖高次構造多型 (SSCP) 解析の応用, 臨床とウイルス, 30, 163-171 (2002)
- 3) ウィルス検出状況・2005年3月25日現在, 病原微生物検出情報, 26, 110-112 (2005)
- 4) 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: ウィルス性食中毒の病因, 臨床とウイルス, 31, 163-169 (2003)
- 5) 古屋由美子, 片山 丘, 伊達佳美, 高橋孝則, 新川隆康: 2004年12月神奈川県域で発生したノロウイルスによる集団胃腸炎事例, 病原微生物検出情報, 26, 71-72 (2005)

短報

高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた食品中のアフラトキシン類の分析

甲斐茂美, 赤星 猛, 岸美智子

Analysis of Aflatoxins in Foods Using Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry

Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI
and Michiko KISHI

はじめに

カビが産生する自然毒であるアフラトキシンは発ガン性を有する毒素であり、B1, B2, G1, G2などをはじめとして十数種類の類縁体が知られている(図1)。アフラトキシン产生カビである *Aspergillus* 属は香辛料、穀物等に発生することから、ナツメグ、コショウなどの香辛料及びピーナッツなどの豆類、とうもろこし、そば粉などの穀類やこれらの加工品などの汚染が懸念されている。アフラトキシン類は70カ国以上の国で食品及び飼料に対し規制値が設定されている¹⁾。日本では最も毒性の強いアフラトキシンB1を対象に、暫定的規制値が食品中濃度として10ppbと設定されているが、アフラトキシンB群とG群の合計量で規制をしている国もある。

我が国におけるアフラトキシン分析法は、平成14年に示された通知法²⁾に、アセトニトリル抽出し、多機能ミニカラムによるクリーンアップ後、蛍光誘導体化し蛍光検出器付HPLCにより測定、LC/MSで確認する機器分析法が採用された。当所では15年度より機器分析によるアフラトキシンB1, B2, G1, G2の検査を実施している。しかし、通知法に示された多機能ミニカラムによる精製では、ホワイトペッパーやブラックペッパー等の香辛料中の夾雑物質を除去することができず、これらがHPLC分析の妨害となる場合があった。また、シングルモードのLC/MSによる測定では、アフラトキシン類は測定条件を変化させても、[M+H]⁺の擬分子イオンとNa⁺や溶

媒付加イオンしか生成せず、構造情報を反映するようなフラグメントイオンは観察されないため、食品由来の妨害物質との判別が困難であり、確認法として用いるには不十分であった。

近年、LC/MSよりもさらに高感度分析が可能な高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置(LC/MS/MS)が開発された。LC/MS/MSのうち、イオントラップ機能を有する装置では、一段目の四重極で選択したプリカーサーイオンのみを通し、次のコリジョンセルでの衝突開裂により生じたフラグメントイオンを二段目の四重極でトラップし Scan モードで検出する高感度プロダクトイオンスキャン(EPI)や、コリジョンセルで生成したフラグメントイオンのうち特異的なプロダクトイオンのみを二段目の四重極でモニターする、タンデム質量分析計に特有の測定モードであるマルチプルリアクションモニタリング(MRM)などの分析が可能であり、高感度測定と構造解析能を合わせ持つことから、測定目的物質に対する高い選択性を期待することができる。

そこで著者らは、これらの分析方法について比較し、より定性能力の高いイオントラップ LC/MS/MS を用いたアフラトキシン類の確認法について検討した。

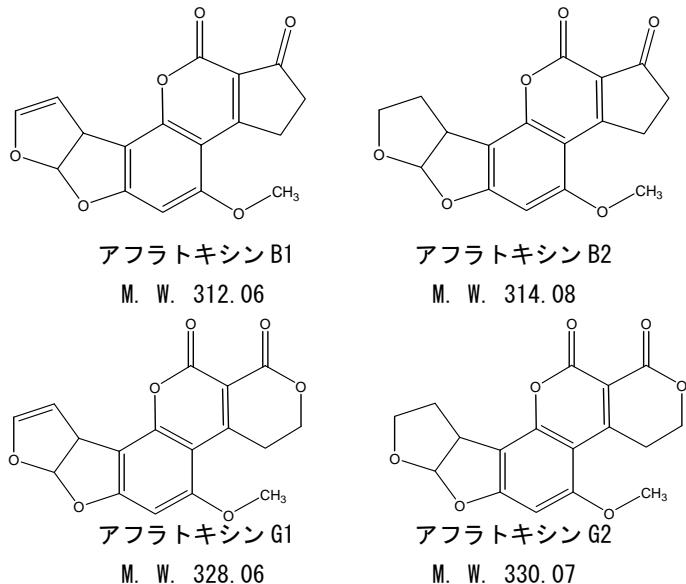


図1. アフラトキシン類4種の構造式

実験方法

1. 試料及び試薬

試料は平成15～16年度に神奈川県内で販売されていた輸入豆類、穀類及び香辛料を分析対象とした。豆類及び穀類は殻を除いてフードプロセッサーで粉碎混合したもの用いた。香辛料及び粉末状の穀類については粉末

状に加工されたものをそのまま用いた。

標準原液はSigma社製混合アフラトキシンキット(1バイアル中B1, G1: 1 μg/mL, B2, G2: 0.3 μg/mL含有する、メタノール溶液)を用いた。標準原液を移動相で段階的に希釈し各濃度の標準溶液とした。多機能ミニカラムはRomer Labs社製MultiSep #228を用いた。アセトニトリル、メタノールは和光純薬工業(株)製残留農薬分析用及びLC/MS用を用い、トリフルオロ酢酸、酢酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製特級を用いた。水はMillipore社製 MILLI-Qにより精製して用いた。

2. 装置及び分析条件

蛍光検出器付HPLCはAgilent社製1100シリーズを用いた。カラムにGLサイエンス(株)製Inertsil ODS-3(4.6mm i.d.×150 mm, 5 μm)を用いたときは移動相をアセトニトリル-メタノール-水(1:3:6)、和光純薬工業(株)製ワコーパック Fluofix 120E(4.6mm i.d.×250 mm, 5 μm)を用いたときは移動相をメタノール-水(7:3)とし、カラム温度40°C、流速1.0 mL/min、注入量20 μL、励起波長365nm、蛍光波長450nmで分析した。LC/MSはAgilent社製LC/MSD1100シリーズSLを用い、イオンソースはエレクトロイオンスプレー(ESI)を使用した。イオン化モードはポジティブ、フラグメント電圧110V、ガス温度350°C、乾燥ガス流量10.0 L/min、ネブライザーガス圧40psi、V Cap3000Vとした。選択イオンモード(SIM)で測定し、選択イオンはアフラトキシンB1; m/z 313、アフラトキシンB2; m/z 315、アフラトキシンG1; m/z 329、アフラトキシンG2; m/z 331で測定した。LC/MS/MSはApplied Biosystems社製Qtrap™ LC/MS/MSを用い、イオンソースはESIを使用した。イオン化モードはポジティブ、イオンスプレー電圧5.5kV、イオン源温度450°C、ネブライザーガス流量はEPIのとき50psi、MRMのとき70psiで測定した。その他のLC/MS/MSの装置条件は表1に示した。LC/MS及びLC/MS/MS分析時のカラムは昭和电工社製ShodexSilica C18M 2D(2.1mm i.d.×150mm, 5 μm)を用い、カラム温度40°C、移動相はアセトニトリル-メタノール-10mM酢酸アンモニウム(9:26:65)を流速0.2 mL/minで送液し、注入量10 μLで分析した。

3. 試験溶液の調製

試験溶液の調製法は通知法に準じて行った。粉碎均一化された試料の5gを共栓付遠沈管に量り取り、アセトニトリル-水(9:1)を豆類、穀類では10mL、香辛料では40mLを正確に加えて振とう機を用いて30分間激しく振とうして抽出した。これを毎分3000回転で10分間遠心分離し、上澄液を抽出液とした。この5mLを多機能ミニカラムに通過させ、初流通過液を採取した。蛍光検出器付

表1. アフラトキシン類のLC/MS/MSにおける測定パラメーター

化合物	プレカーバイオン m/z	MRM		EPI	
		プロダクトバイオン m/z	DP	CE	DP
アフラトキシンB1	313	241	66	51	50
アフラトキシンB2	315	259	56	43	50
アフラトキシンG1	329	200	56	53	50
アフラトキシンG2	331	189	66	51	50

DP: デクラスタリングポテンシャル(Declustering Potential)

CE: コリジョン エネルギー(Collision Energy)

HPLC分析には初流通過液を豆類及び穀類は1mL、香辛料は0.5mLを小試験管に分取し、窒素気流下で溶媒を除去し、残留物にトリフルオロ酢酸0.1mLを加え密栓して激しく攪拌し室温暗所で15分放置した後、アセトニトリル-水(1:9)を豆類及び穀類には0.9mL、香辛料には0.4mLを加え試験溶液とした。LC/MS及びLC/MS/MS分析には初流通過液1mLを小試験管に分取し、窒素気流下で溶媒を除去した後、移動相250 μLに溶解し試験溶液とした。

結果と考察

1. LC/MS/MS測定条件について

1) MRM分析条件

アフラトキシン類のイオン化はイオンソースをESIとし、ポジティブモードで行なった。各標準溶液を直接MSに導入するインフュージョンによるイオンソースの最適化を行ない最大感度が得られる条件を求めた。この結果、いずれのアフラトキシン類縁体も [M+H]⁺をプレカーバイオンとした。B1とB2、G1とG2は構造が酷似していることから、感度が強く得られたプロダクトイオンのうち、各物質に特有なイオンをモニターイオンとした。次にフローインジェクションを用いて、イオンスプレー電圧、イオンソース温度、ガス流量等の最適条件を求めた。各標準物質のモニターイオンによるクロマトグラムを図2に示した。MRMによる分析で各物質の検量線を作成したところ、B1及びG1は0.005~5ng、B2及びG2は0.015~1.5ngの範囲で良好な直線性を示し、検量線の相関係数(r)はB1; 0.9987、B2; 0.9980、G1; 0.9989、

G2; 0.9990であった。また B1及び G1は0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 5.00 ng, B2及びG2は0.015, 0.03, 0.15, 0.30, 1.50ng の各注入量における測定を5回行いピーカ面積の変動係数を求めたところ、定量下限値においての変動係数は10%以内³⁾であり満足できる分析精度が得られた。また、MRMによる検出限界は各物質とも0.001ng(S/N \geq 3)⁴⁾まで十分測定することが可能であった。

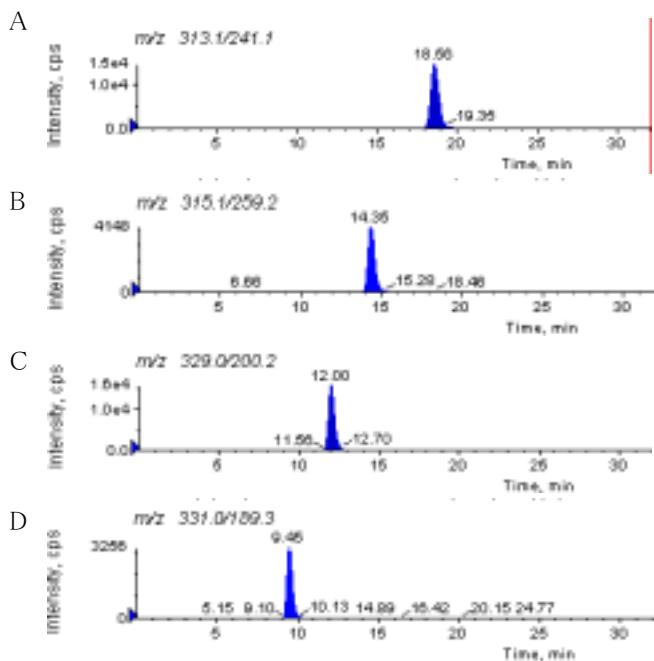


図2. アフラトキシン類の LC/MS/MS (MRM モード) のクロマトグラム
A : アフラトキシン B1 B : アフラトキシン B2
C : アフラトキシン G1 D : アフラトキシン G2
アフラトキシン B1, G1 1ng
アフラトキシン B2, G2 0.3ng

2) EPI 分析条件

4種のアフラトキシン標準溶液について、 $[M+H]^+$ のプレカーサーイオンと、それぞれ複数のプロダクトイオンが測定できる条件を求めた。アフラトキシン類はシングルモードのLC/MSではフラグメントー電圧を変化させても $[M+H]^+$ の擬分子イオンの他には $[M+Na]^+$ や溶媒付加イオンしか生成せず、構造情報を反映するようなプロダクトイオンは得られなかった。しかし、LC/MS/MSではコリジョンエネルギー(CE)の値を増大させることにより、 $[M+H]^+$ のプレカーサーイオンのスペクトルは小さくなり、プレカーサーイオンに由来するプロダクトイオンが観察された。CEの違いによるスペクトルの変化についてアフラトキシンB1の例を図3に示した。CE=

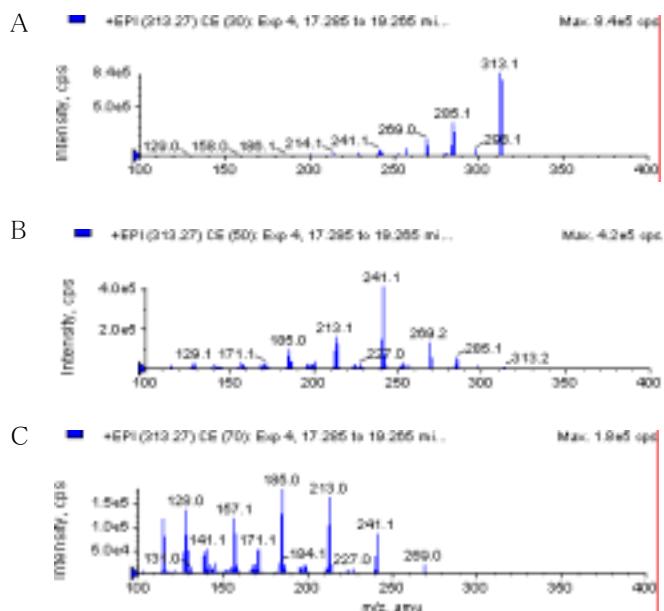


図3. collision energy の違いによるアフラトキシン B1 の LC/MS/MS (EPI) スペクトルの変化
A : collision energy 30V B : collision energy 50V
C : collision energy 70V アフラトキシン B1, 1ng

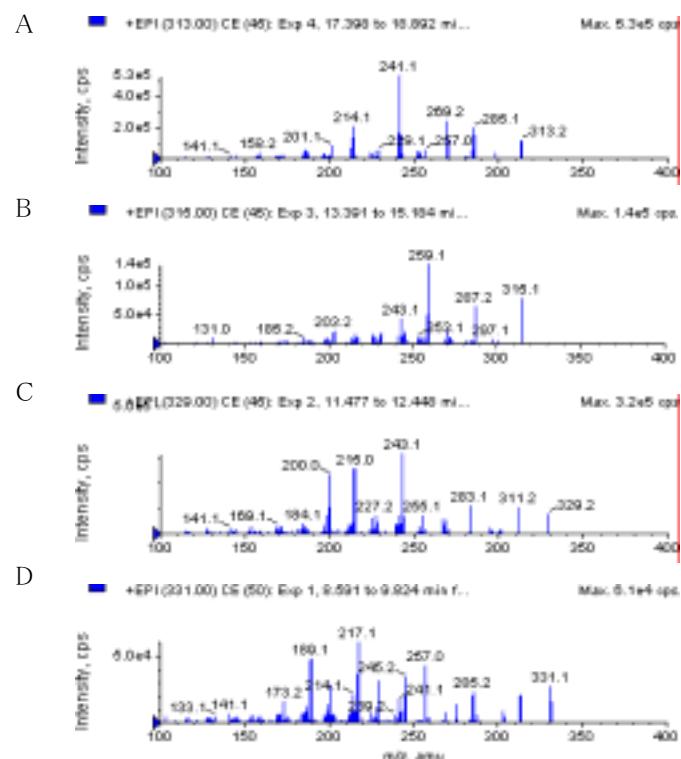


図4. アフラトキシン類の LC/MS/MS (EPI モード) のスペクトル
A : アフラトキシン B1 B : アフラトキシン B2
C : アフラトキシン G1 D : アフラトキシン G2
アフラトキシン B1, G1 1ng
アフラトキシン B2, G2 0.3ng

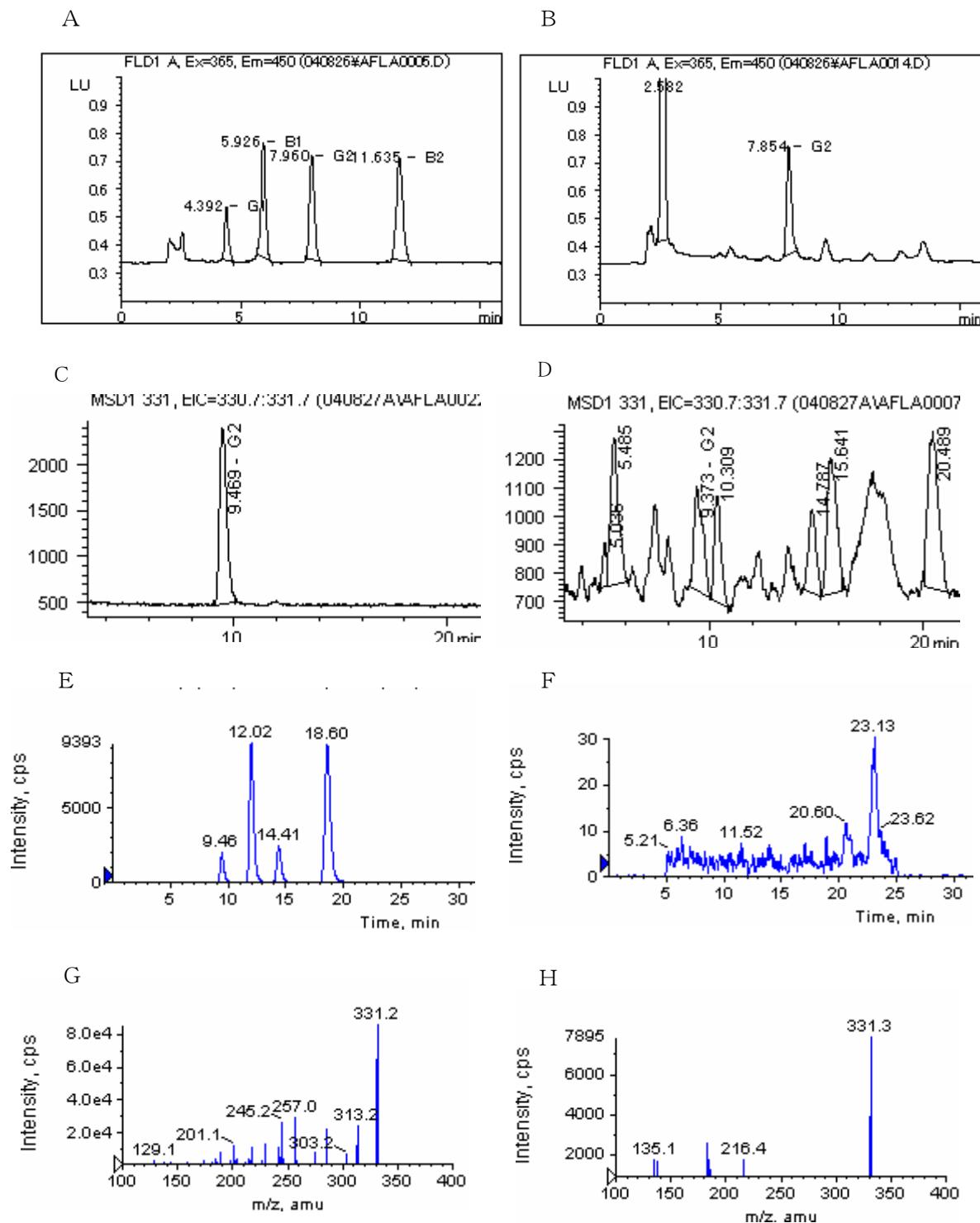


図5. HPLC, LC/MS, LC/MS/MS(MRM, EPI)によるクロマトグラム及びマススペクトル
A: アフラトキシン B1,B2,G1,G 2 標準溶液 (HPLC), B: ブラックペッパー抽出液 (HPLC),
C: アフラトキシン G2 (LC/MS), D: ブラックペッパー抽出液 (LC/MS),
E: アフラトキシン B1, B2, G1, G 2 標準溶液 (LC/MS/MS-MRM),
F: ブラックペッパー抽出液 (LC/MS/MS-MRM) G: アフラトキシン G2 (LC/MS/MS-EPI),
H: ブラックペッパー抽出液 (LC/MS/MS-EPI)

30Vのときは $[M+H]^+$ のスペクトルが大きく現れ、他のスペクトルはあまり見られないが、CE=50Vのときは m/z ; 313.1 はほとんど見られなくなり、代わって m/z ; 241.1 のスペクトルが大きく現れた。さらにCE=70Vとすると、 $[M+H]^+$ は見られなくなり、低分子側のスペクトルが見られるようになった。そこで、 $[M+H]^+$ と他のスペクトルがともに見られる CE 条件を求めたところ、各物質に最適な CE は、B1, B2, G1 では 45V, G2 は 50V であった。最適条件での注入量 B1, G1 各 1ng, B2, G2 各 0.3ng における各物質のスペクトルを図 4 に示した。アフラトキシン G1 及び G2 は E 環に δ ラクトンを有するため、 $[M+H]^+$ からの脱水 (G1 : m/z 329.3→311.2, G2 : m/z 331.1→313.1) が推測される反応が観察されたが、E 環に δ ケトンを有する B1 及び B2 には見られなかった。EPI による分析では各物質とも 0.1ng までの範囲で同様のスペクトルが得られた。このことから、EPI 分析による化合物の構造情報が定性分析の指標として有効であると考えられた。

2. 残留実態調査

蛍光検出器付 HPLC, LC/MS, イオントラップ LC/MS/MS のそれぞれの分析装置により得られたクロマトグラムを図5に示した。蛍光検出器付 HPLC 測定により残留実態調査を実施したところ、62検体中12検体でアフラトキシン G1 あるいは G2 が検出された (図5-A 及び B)。これらはいずれもホワイトペッパー、ブラックペッパー等の香辛料であり、成分由来の妨害であることが疑われたが、シングルモードの LC/MS による確認では食品成分との識別は不可能であった (図5-C 及び D)。しかし LC/MS/MS の MRM, EPI による分析を実施したところ、どちらのモードによる分析でもアフラトキシンの検出は

認められなかつた (図5-E~H)。よって、検査した輸入香辛料30検体、輸入ナッツ類14検体、輸入豆類14検体、輸入穀類4検体はすべてアフラトキシン B1, B2, G1, G2 は不検出であった。

このことから、蛍光検出器付 HPLC, LC/MS の分析結果をより確実なものにするために LC/MS/MS による確認は非常に有効であると考えられた。

まとめ

香辛料及び豆類、穀類中のアフラトキシン類縁体4種の分析について、イオントラップ LC/MS/MS による測定を検討した。イオントラップ LC/MS/MS の MRM や EPI モードによる分析は、従来の蛍光検出器付 HPLC や LC/MS を用いた分析と比べて、より高感度であり構造情報も得ることができるので、分析精度を飛躍的に向上させることができることが明らかになった。

(平成17年7月22日受理)

文 献

- 1) 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男: 食品安全性セミナー5 マイコトキシン, 細貝祐太郎, 松本昌雄監修, pp. 73-86, 中央法規出版株式会社, 東京, (2002)
- 2) 「カビ毒(アフラトキシン)を含有する食品の取り扱いについて」: 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知, 食監発第0326001号, (平成14年3月26日)
- 3) 松田りえ子: 内部精度管理, pp. 73-76, 林純薬工業株式会社, 大阪
- 4) 第14改正日本薬局方解説書, pp. B-15-B-49, 廣川書店, 東京(2001)

短報

家庭用接着剤中の揮発性 有機化合物の分析

仲野富美, 長谷川一夫
辻 清美, 伏脇裕一

Determination of Volatile Organic Compounds in Glue for Household Use

Fumi NAKANO, Kazuo HASEGAWA
Kiyomi TSUJI and Yuichi FUSHIWAKI

はじめに

現在、シックハウス症候群、シックススクールなど、住居や学校の新築や改築で健康被害を受ける事例が問題となっている。しかし室内空気に放出される化学物質は建材など建物由来に限定されるものではなく、私たちが使用しているさまざまな家庭用品もその発生源となりうる。家庭用接着剤は家庭、学校等で日常的に使用され、ホームセンターや文具店には多くの製品が販売されている。これらの製品は有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律¹⁾により規制を受けているが、揮発性有機化合物（VOC）についての基準はない。そこで、家庭用接着剤を対象に、室内空気について指針値²⁾が設定されている VOC であるトルエン、キシレン、スチレン及び有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律で家庭用エアゾル製品について基準があるトリクロロエチレン、テトラクロロエチレンの含有量の分析を行った。同時に、5物質以外の VOC についても定性分析を行い、さらに品質表示についても検討したので報告する。

方 法

1. 試 料

平成12年から平成15年度に神奈川県内で試買した家庭用接着剤30検体を試料とした。

2. 試 薬

エタノールは和光純薬工業株式会社製特級試薬を用い

神奈川県衛生研究所 理化学部

〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋 1-3-1

た。トルエン、トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレンは和光純薬工業株式会社製特級試薬を、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン及びスチレンは東京化成工業株式会社製特級試薬を使用した。内部標準物質として用いたジブロモクロロメタンは和光純薬工業株式会社製トリハロメタン測定用試薬を使用した。ガスタイツリソジの洗浄には純窒素ガス（純度99.9995%以上）を用いた。

3. 装 置

ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）は Agilent 社製ガスクロマトグラフ（HP6890）に同社製質量分析装置（HP5973）を装備したものを利用した。

4. 標準溶液

VOC 標準溶液はトルエン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、スチレン、トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレンが各1.0, 0.1, 0.01, 0.005w/v%になるようエタノールで希釀して混合溶液を調製した。

5. 分析操作

(1) 試料の採取及び試験溶液の調製

ヘッドスペースバイアルびん（容量125ml）に0.004%ジブロモクロロメタン（内部標準物質）含有エタノール50mlを入れた後、図1のように、びんの口にマイクロピペット用のチップ（5ml用）の上下をカットしたものを装着して、試料1.0gを正確に量り取り、直ちにゴム栓とアルミキャップで密栓した。なお、チップは試料採取後、取り外した。これを軽く混和し、25°Cの恒温水槽で1時間以上24時間以内静置し、GC-MS 分析用試料とした。標準溶液についても1.0mlを正確に加えて試料と同様に操作した。

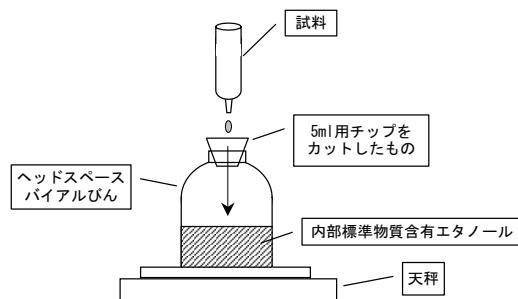


図1 家庭用接着剤試料の採取法

(2) GC-MS 法

(1)で得られたヘッドスペースガスをガスタイツリソジを用いて GC-MS に0.2ml マニュアル注入し、SIM モードで測定した。ガスタイツリソジは試料注入後、プランジャーをはずし、次試料の注入までシリジン内を窒素

ガスで洗浄後使用した。得られたクロマトグラムから各ピーク面積を求め、内部標準法により、あらかじめ作成した検量線から試料中の各 VOC 含有量 (w/w%) を算出した。定量下限値は検量線の最小濃度から算出した 0.005w/w%とした。キシレンについては o-, m-, p-異性体の合計量で含有量を算出した。また、SCAN モードで定性測定も行った。測定結果を NIST 及び Wiley ライブライバーにより検索し、過去の分析例から一致度80%以上のものを含有成分として推定した。

(3) GC-MS の測定条件

カラム : DB-1 (60m×0.25mm i.d., 膜厚 1.0 μm,
J&W Scientific 社製)
カラム温度: 40°C (5min) – 10°C/min – 250°C – 30°C
/min – 280°C (1min)
キャリアガス : ヘリウム (1.0ml/min)
注入口温度 : 200°C
注入方法 : スプリット注入, スプリット比 5:1
注入量 : 0.2ml
モニターイオン (m/z) : トルエン (91, 92, 65),
o-, m-, p-キシレン (106, 105, 91, 77), スチレン (104, 103, 78), トリクロロエチレン (130, 132, 95), テトラクロロエチレン (166, 164, 129), ジブロモクロロメタン (129, 127)
SCAN 質量範囲 : 35~250m/z

結果及び考察

接着剤は試料採取のとき、一定量を量り採ることが難しく、試料がエタノール中に採取されずにびんの口や内壁に付着すると測定結果に誤差がみられた。これはびんの口などに付着した試料がヘッドスペースに揮散するため、気液平衡に誤差が生じたと考えられた。そこで、図1に示したようにマイクロピペット用のチップの上下をカットして装着することで試料採取が容易となり、正確に定量することが可能となった。また、VOC 含有量が多い試料を GC-MS 法で測定したとき、ガスタイルシリジ内に前試料の成分が残留したが、注入に用いたガスタイルシリジを次試料注入の直前まで窒素ガスで約30分間洗浄して使用することで解決できた。さらに、標準試料を注入するガスタイルシリジは検体用と分けて測定を行った。

表1に VOC 測定結果を示した。*印は製品の成分表示に物質名が記載されていたことを示す。接着剤の種類は製品の品質表示により、溶剤形18検体、化学反応形8検体、水性形2検体、不明のもの2検体であった。

トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレンは調査した30検体では全て定量下限値未満であった。

トルエンは21検体から検出され、含有量が多かったものは4検体（試料 No.3 : 6.1w/w%, No.7 : 1.7w/w%, No.24 : 76w/w%, No.30 : 63w/w%）で、その種類は2検体が溶剤形 (No.7, 30), 残りの2つは種類の記載のない製品 (No.3, 24) であった。製品の成分表示に「トルエン」の記載があったのは試料 No.3 及び No.30のみであった。このようなトルエン含有量の多い製品を室内で使用したケースを想定し、閉め切った6畳程度の室内(容積23.3m³)でトルエン76w/w%含有の接着剤を1g使用したとき、製品中のトルエンがすべて室内空气中に放出され、かつ室内に均一に拡散したと仮定すると、室内の気中濃度は次の計算式により、

$$76/100 \times 1 \times 1000 \times 1000 / 23.3 = 32618 \mu\text{g/m}^3$$

約32600 μ g/m³と計算され、室内空气中トルエンの指針値260 μ g/m³の125倍となる。実際には徐々に空気中に放出されるのでこのように高濃度にはならないと思われるが、室内空気の指針値を一時的に超える可能性が考えられる。

キシレンは9検体、スチレンは2検体から検出され、含有量の検出範囲はおのおの 0.010~0.13w/w%, 0.006~0.095w/w% であった。トルエンに比べ、検出率及び含有量はともに低かったが、製品中の含有量が少なくて、壁や家具の補修などに大量に接着剤を使うなど、使用量が多くなれば物質の絶対量が多くなり、室内の気中濃度が高くなることも懸念される。

調査を実施した全ての年度で、トルエン、キシレンまたはスチレンが検出され、これらの物質を含有する製品が販売されていることが明らかとなった。

SCAN モードにより定性を行った結果をクロマトグラムのピーク面積が大きい順に表1に示した。シクロヘキサン、酢酸ブチル、酢酸エチル、酢酸メチルなどが検出され、溶剤形接着剤の試料で検出率が高かった。SCAN モードでのクロマトグラムの例を図2に示した。試料 No.22はシクロヘキサンが最も大きいピークとして確認され、ノルマルヘプタン、ノルマルヘキサンなどが検出された。試料 No.5は酢酸メチルが最も大きいピークとして確認され、酢酸イソプロピル、酢酸ブチルなどが検出された。検出された VOC は成分表示と一致するものが多かったが、酢酸メチルは SCAN モードで大きいピークとして確認されても成分表示に記載されていなかった。現在、室内空気汚染が問題視され、接着剤の主溶剤は今まで汎用してきたトルエンから他の有機溶剤に置き換えられていると言われているが³⁾、それを裏付ける結果となった。室内空気の指針値はないが、ベンゼンが3検体から検出された (No.24, No.27及び No.30)。ベンゼンは自動車の排ガスなどに含まれるため、大気中の環境基準

表1 家庭用接着剤中の揮発性有機化合物測定結果

実施 年度	試料 No.	種類	含有量(w/w%)			ライブラリー検索から推定した物質
			トルエン	キシレン	スチレン	
	1	化学反応形	ND	ND	ND	なし
	2	溶剤形	0.089	ND	ND	酢酸メチル、酢酸イソプロピル、酢酸エチル、酢酸ブチル*、シクロヘキサン
	3	?	6.1*	ND	ND	なし
	4	溶剤形	0.025	ND	ND	酢酸ブチル*、酢酸エチル、1-ブタノール
	5	溶剤形	0.011	ND	ND	酢酸メチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル*、シクロヘキサン、酢酸エチル
H12	6	化学反応形	0.009	ND	ND	なし
	7	溶剤形	1.7	0.040	ND	シクロヘキサン*、ノルマルヘプタン*、ノルマルヘキサン
	8	水性形	0.55	ND	ND	シクロヘキサン
	9	溶剤形	ND	ND	ND	シクロヘキサン*、ノルマルヘプタン*
	10	化学反応形	0.028	ND	ND	なし
	11	溶剤形	0.38	0.079	ND	シクロヘキサン*、ノルマルヘキサン*
	12	溶剤形	0.38	0.13	ND	シクロヘキサン*、ノルマルヘキサン*
	13	溶剤形	ND	ND	ND	ノルマルヘキサン*、シクロヘキサン
	14	溶剤形	ND	ND	ND	テトラハイドロフラン*
	15	溶剤形	ND	ND	0.006	シクロヘキサン*、酢酸ブチル*
H13	16	化学反応形	0.098	ND	ND	なし
	17	溶剤形	ND	0.011	ND	シクロヘキサン*、ノルマルヘプタン*
	18	溶剤形	0.37	0.12	ND	シクロヘキサン*、ノルマルヘキサン*
	19	溶剤形	0.10	ND	ND	2-ブタノン*、ノルマルヘプタン
	20	化学反応形	0.057	0.011	ND	ウンデカン
	21	水性形	ND	ND	ND	なし
	22	溶剤形	0.020	0.010	ND	シクロヘキサン、ノルマルヘプタン、ノルマルヘキサン、酢酸エチル
	23	溶剤形	0.081	ND	ND	酢酸メチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル*、シクロヘキサン
H14	24	?	76	0.019	ND	ベンゼン
	25	化学反応形	ND	ND	ND	なし
	26	化学反応形	0.092	ND	ND	なし
	27	溶剤形	ND	ND	ND	ベンゼン、酢酸エチル
H15	28	溶剤形	0.12	ND	ND	2-ブタノン*、酢酸メチル
	29	化学反応形	0.006	ND	ND	アビジン酸ジエチルヘキシル
	30	溶剤形	63*	0.039	0.095	ベンゼン、エチルベンゼン

ND: 定量下限値(0.005w/w%)未満

*: 製品の成分表示に記載があるもの

トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンは全ての試料で定量下限値未満であった

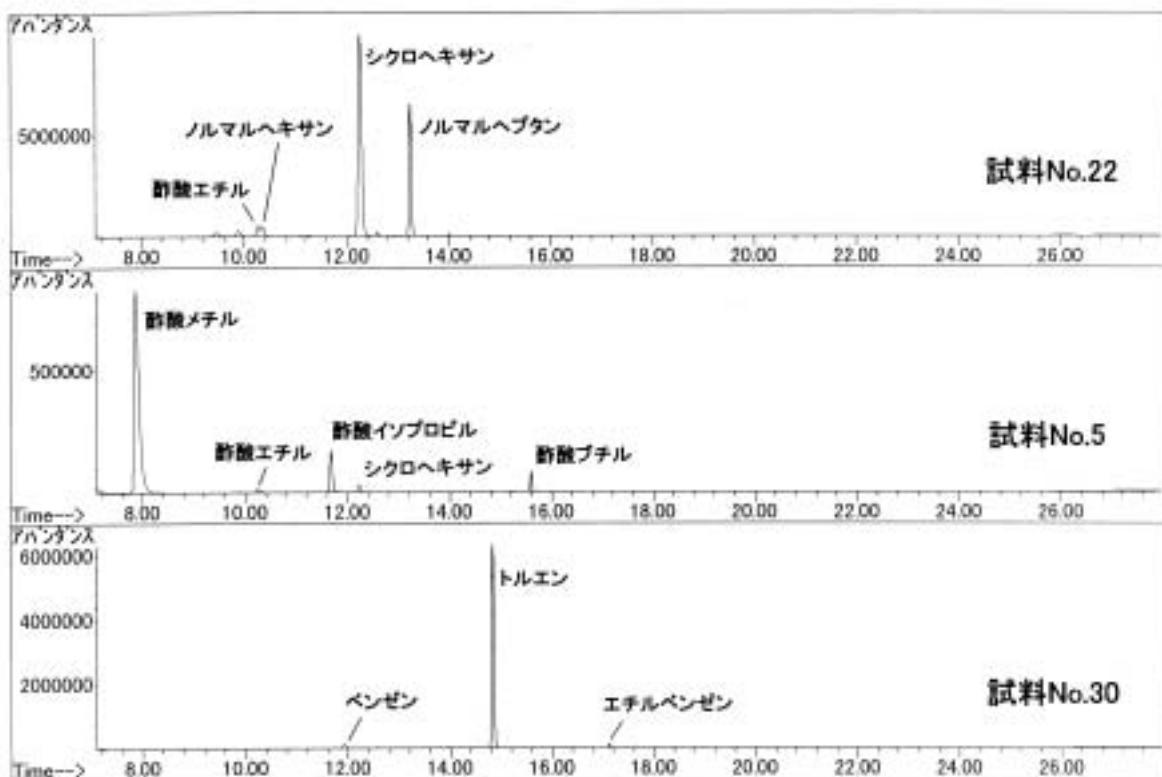


図2 家庭用接着剤のトータルイオンクロマトグラム

表2 家庭用接着剤試料 No.24 及び 30 の品質表示

品質表示規程*に定められた事項	試料No.	
	24	30
1 種類の表示	—	溶剤形接着剤
2 成分表示	合成ゴム30%、クロロブレンゴム、有機溶剤70%	合成樹脂(20%)、有機溶剤(80%)トルエン、ミネラルスピリット
3 毒性の表示	—	劇物含有と記載
4 用途の表示	○ (ゴム、皮、布、プラスチック、金属、ガラスなど多用途)	○ (皮革、木材、ゴム、布、プラスチック、金属など多用途)
5 正味量の表示	○	○
6 子供の手の届かない所に置き、いたずらをしないよう注意する旨	○	○
取扱い上の注意の表示	接着用以外には使用しない旨 使用に際して換気をよくする旨 有機溶剤を含んでいるので有害であり蒸気を吸わないように注意する旨 人体に影響を及ぼすことが想定される場合には応急処置を適正に行う旨	— ○ — —
7 表示者の連絡先	○ (会社名、住所)	○ (会社名、住所)

○：記載あり、—：記載なし

*家庭用品品質表示法雑貨工業品品質表示規程 通産省告示第672号

が設定されており⁴⁾、ヒトに対する発癌性が認められている物質なので健康への影響が危惧される。試料 No.24及び No.30はトルエン含有量多く、No.30はエチルベンゼンも検出された(図2)。

今回の定量結果からトルエンが主溶剤と判明したもののトルエン含有量が63w/w%, 76w/w%について、製品に記載された品質表示と比較、検討した。試料 No.24及び No.30の品質表示を表2に示した。家庭用接着剤の品質表示は家庭用品品質表示法により表示事項及び表示方法が定められている。その表示事項は表2に示したように種類、成分、毒性、用途、正味量、取扱いの注意及び表示者の連絡先の7項目がある⁵⁾。有機溶剤の成分表示に際しては、主要な成分を適正に表示すること、合計の含有率を示す数字を百分率で付記することが定められている。試料 No.24の成分表示は「合成ゴム30%，クロロブレンゴム、有機溶剤70%」と記載されていた。分析結果ではトルエン76w/w%，キシレン0.019 w/w%あり、成分表示内容とほぼ一致した。しかし、主要な成分の化学物質名を記載しておらず、消費者はトルエンが含有していると認識できないことが憂慮される。さらに、接着剤の種類の表示がないこと、トルエンを含有しているにもかかわらず「劇物含有」の記載がないこと、取扱い上の

注意の表示も不十分で、適切な品質表示に改善する必要があると思われた。試料 No.30の品質表示は「合成樹脂(20%)、有機溶剤(80%)トルエン、ミネラルスピリット」と記載されていた。分析結果ではトルエン63 w/w%、キシレン0.039 w/w%、スチレン0.095 w/w%，その他SCAN モードにより推定された VOC がベンゼン及びエチルベンゼンであったので、表示されている有機溶剤80%のうち大部分がトルエンであると確認できた。試料 No.30の事例では品質表示の面からみると適切な表示がされていると思われるが、トルエンの含有量が多いこと、ベンゼン、エチルベンゼンを含有していることから、健康への影響が懸念される。

家庭用接着剤は用途が多様であるため、学校で児童が工作等で使ったり、さまざまな世代が使用する家庭用品である。一般に手元で使用するものなので使用者は一時的に多量の含有物質を吸入する可能性もある。健康被害を防ぐためには防護マスクを使ったり、使用時および使用後に換気を徹底したり、場合によっては屋外で使うなど配慮が必要である。また、室内で使用する際には小さい子供が風下にいないかなど風向きなどへの配慮も必要であると考えられる。

ま と め

今回の調査から、家庭用接着剤には多種類の VOC が含有しており、室内空気汚染の原因となり得ることが明

らかになった。調査した試料中にはトルエンを主溶剤として使用している製品が存在していた。品質表示は健康被害防止に必要な情報を提供するものであるが、表示事項の記載が不十分な製品も存在した。メーカー側は明確な品質表示及び注意喚起をすべきであると考えられた。

本研究は県生活衛生課の事業を含み、御協力いただいた生活衛生課及び各保健福祉事務所環境衛生課の皆様に深謝いたします。

(平成17年7月22日受理)

文 献

- 1) 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、厚労省令第34号、昭和49年9月26日
- 2) 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
- 3) 神藤正則、福田弘美、田畠佳世、盛田正敏、松本憲一：市販されている接着剤の VOC (揮発性有機化合物) 調査、第41回全国衛生化学技術協議会年会講演集、204-205 (2004)
- 4) ベンゼン等による大気の汚染に係る環境基準について、環境省告示第4号、平成9年2月4日
- 5) 家庭用品品質表示法雑貨工業品品質表示規程、通産省告示第672号、平成9年12月1日

短報

室内空気中の VOC 測定用 パッシブサンプラーの フィールド試験による評価

辻 清美, 長谷川一夫, 伏脇裕一

Evaluation of Diffusion Sampler for Determination of VOC in Indoor Air by Field Examination

Kiyomi TSUJI, Kazuo HASEGAWA
and Yuichi FUSHIWAKI

はじめに

近年、建材などに含まれる揮発性化合物 (VOC) 等の化学物質による室内空気汚染で体調をくずすシックハウス症候群が大きな問題となっている。現在までに厚生労働省によりトルエン等13物質の室内濃度指針値が定められており¹⁾、室内空気中のVOC濃度を把握し、健康影響やそのリスク評価をしていくことが求められている。

VOC の測定はサンプリングの際にポンプを用い、空気を捕集管に吸着させるアクティブ法が標準とされているが¹⁾、ポンプの設置場所、騒音、操作性など実態調査に向向きな点が多い。これに対し、パッシブサンプラーによる室内空気中の VOC 測定法 (パッシブ法) は分子拡散を利用しているため、ポンプや電源を必要とせず、小型軽量で簡便な測定方法である。パッシブ法による空気中濃度の算出は空気中濃度 C (ppb), 捕集量 W (ng), 捕集時間 t (h) とすると (1) 式が導かれる²⁾。

$$C = W / (\alpha \times t) \quad (1)$$

α : uptake rate (濃度換算係数) ng/(ppb · t)

α は濃度換算係数で物質固有の定数であるが、実際のサンプリングではパッシブサンプラーを構成している多孔質チューブ等や適用濃度範囲等によってかわる可能性がある³⁾。 α を求めるには、チャンバー法やアクティブサンプリングとの相関により求める方法がある。今回は

パッシブサンプラーのメーカーが推奨している濃度換算係数を使用し、アクティブ法との比較により2種のパッシブサンプラーを用いたパッシブ法の評価を試みたので報告する。

実験方法

1 試薬及びサンプラー

試薬は二硫化炭素（作業環境測定用試薬、和光純薬工業）を用いた。標準試薬は和光純薬工業の室内環境測定用 VOCs 混合標準原液 (45種混合)、内部標準はトルエン-d₈ (99.6%, アイソテック社) を使用した。

パッシブサンプラーには溶媒離脱型のサンプラーA : VOC-SD (捕集剤、カーボンモレキュラーシーブ) シグマアルドリッヂジャパン社スペルコ製とサンプラーB : パッシブガスチューブ (捕集剤、椰子殼活性炭) 柴田科学社製を用いた。アクティブサンプラーにはORBO-91L (捕集剤、カーボンモレキュラーシーブ) シグマアルドリッヂジャパン社スペルコ製を用いた。

2 装置及び測定条件

アクティブ用試料捕集ポンプ ; GSP-250FT (ガステック)

ガスクロマトグラフ質量分析計 ; GC : HP5890,

MS : HP5972

カラム : DB-1 (60m x 0.25mm i.d., 1.0 μm)

カラム温度 : 40°C (5分保持) → 10°C/分 → 300°C (3分保持)

注入口温度 : 250°C

キャリアーガス : He (1 ml/min)

注入量 : 1 μl (スプリット1 : 10)

モニターイオン(m/z) : トルエン (91, 92), パラジクロロベンゼン (146, 148), キシレン (91, 106), エチルベンゼン (91, 106), スチレン (104, 103)

3 試料捕集方法

パッシブサンプラーによる捕集は部屋の中央あるいは生活に支障をきたさない場所で、高さ約1.2m 付近に取り付け、24時間暴露した。同時に、ほぼ同じ位置でアクティブサンプラーをポンプに取り付け、100 ml/分で24時間連続捕集した。

4 測定用試料の調製

サンプラー内部の吸着剤をバイアル瓶に移し、二硫化炭素を2~5 mlと内部標準液 (トルエン-d₈) の一定量を加え、時々かき混ぜながら2時間放置し、溶出した。溶出液を GC/MS 測定用試料とした。ブランク試験は未使用のサンプラーを用い、同様に溶出を行った。

5 定量

試料1 μl を GC/MS に注入し、内標法によりあらかじ

め作成した検量線からサンプラーへの捕集量を算出した。

6 調査

2001~2002年にかけて神奈川県内の一般住宅(38戸)の居間あるいは寝室でパッシブ法(2種類)とアクティブ法により同時にサンプリングし、VOC調査を行った。パッシブ法による空気中の VOC 濃度はそれぞれのメーカーが推奨している濃度換算係数を用いて平均室内濃度を算出した。

結果及び考察

未使用のパッシブサンプラーのプランク試験を行い、図1にその溶出液の GC/MS クロマトグラムを示した。パッシブサンプラーA はデカンの大きなピークが検出さ

れたが、パッシブサンプラーA(改良型)はほとんど検出されず、VOC測定への影響は少ないことが判明したため、パッシブサンプラーA(改良型)を使用した。

サンプラーB はドデカン、テトラデカン等の脂肪族炭化水素化合物の大きなピークが検出され、これらの炭化水素化合物の測定には問題があることがわかった。

45物質の内、指針値が示されているトルエン、パラジクロロベンゼン、キシレン、エチルベンゼン、スチレンを対象とし、アクティブ法による測定値とパッシブ法によって算出された測定値について解析した。それ以外の VOC は今回の調査において検出数が少なく、濃度が低かったため、解析から除外した。

1) トルエン

アクティブ法とパッシブ法との相関を図2に示す。サン

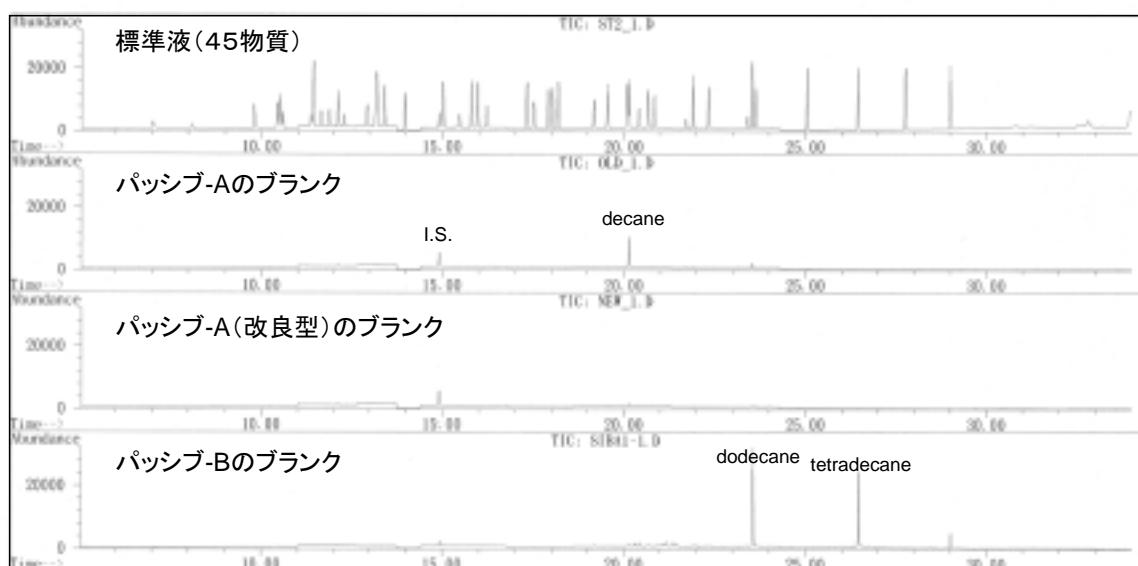


図1 パッシブサンプラーブランクのGC/MS トータルイオンクロマトグラム

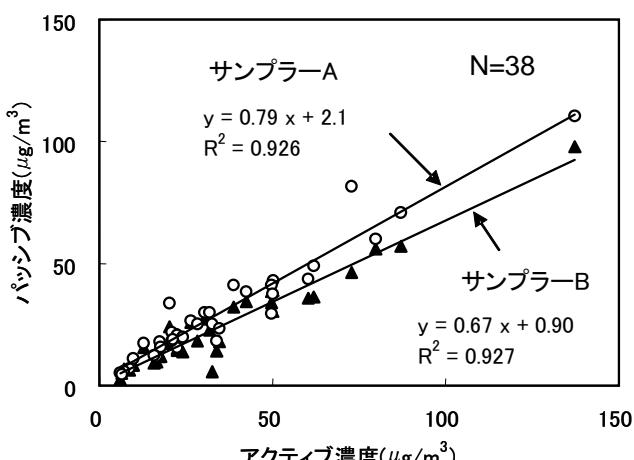


図2 アクティブ法とパッシブ法の比較
—トルエン—

サンプラーAは回帰式 $Y=0.79x + 2.1$, $R^2 = 0.926$, サンプラーBは回帰式 $Y=0.67x + 0.90$, $R^2 = 0.927$ であった。両方法はアクティブ法と良好な相関(有意水準1%)を示した。それぞれの濃度換算係数を用いて算出した濃度を比較すると回帰式の傾きが0.7と0.8となることから、サンプラーAとBはアクティブ法よりわずかに低い濃度を示すことが判明した。

2) パラジクロロベンゼン

アクティブ法との相関を図3に示す。サンプラーAは回帰式 $Y=1.2x + 4.2$, $R^2 = 0.983$, サンプラーBは回帰式 $Y=0.59x - 0.17$, $R^2 = 0.986$, であった。トルエンと同様に両方法ともに高い相関(有意水準1%)を示した。

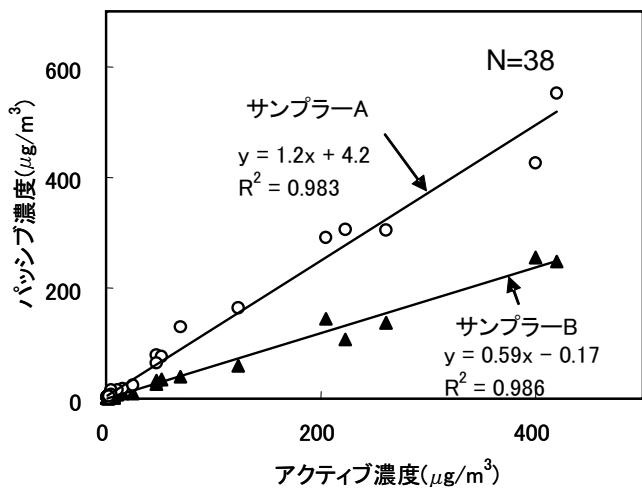


図3 アクティブ法とパッシブ法の比較
—パラジクロロベンゼン—

サンプラーB から算出された濃度はアクティブ法により得られた濃度の6割程度とかなり低い値を示し、濃度換算係数の見直しが必要と考えられた。一方、サンプラーAは小林らの報告⁴⁾と同様にパッシブ法がアクティブ法より高い傾向がみられた。

3) エチルベンゼン

サンプラーA、サンプラーBについて検討した(図4)。サンプラーAは回帰式Y=0.91x + 0.46, R² = 0.999, サンプラーBは回帰式Y=1.1x - 3.7, R² = 0.998と非常に相関も高く(有意水準1%), 算出された濃度もよく一致した。1500 μg/m³付近の値を除いてサンプラーAはR² = 0.991, サンプラーBはR² = 0.983と高い相関を示した。実試料であるため、指針値3800 μg/m³近くの値での比較はできなかったが、測定濃度範囲では良好な結果が得られた。

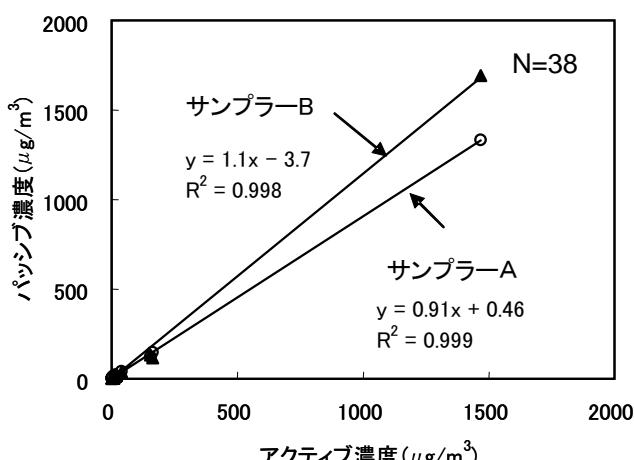


図4 アクティブ法とパッシブ法の比較
—エチルベンゼン—

4) キシレン

図5に示すように、アクティブ法とパッシブ法は有意水準1%で高い相関を示した(サンプラーA: R² = 0.989, サンプラーB: R² = 0.983)。サンプラーAは回帰式Y=0.89x + 2.1, サンプラーBは回帰式Y=0.52x + 3.1であった。サンプラーAはアクティブ法とほぼ一致した値を示したが、サンプラーBから算出された濃度はアクティブ法による濃度の約5割程度と低い値であり、濃度換算係数の見直しが必要と考えられた。

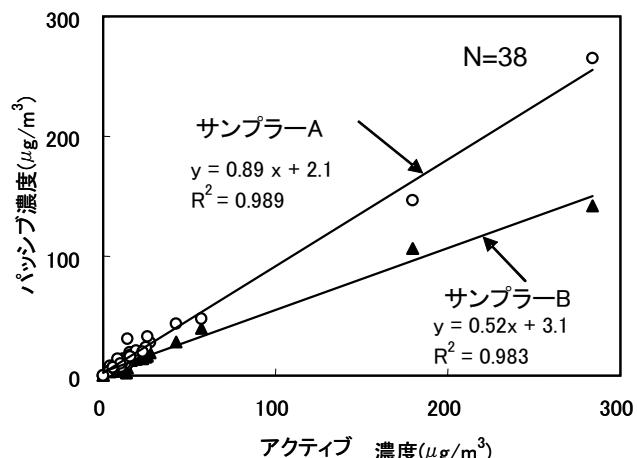


図5 アクティブ法とパッシブ法の比較
—キシレン—

5) スチレン

スチレンはサンプラーA: R² = 0.935, サンプラーB: R² = 0.902と両方法ともにアクティブ法と比較的高い相関(有意水準1%)を示した。回帰式はサンプラーA: Y=1.4x - 0.62, サンプラーB: Y=1.2x - 0.73であり、アクティブ法に比べて高い値となった。これは測定値が30 μg/m³以下と低い範囲であることと、アクティブ法で用いた吸着剤ORBO91Lのスチレンの回収率に問題があるとの指摘⁵⁾があることから、スチレンに関しては今後、さらに、検討する必要がある。

まとめ

比較検討した室内濃度指針値が示されているトルエン、パラジクロロベンゼン、キシレン、エチルベンゼン、スチレンについては、パッシブ法2種はアクティブ法と高い相関が認められた。サンプラーBはパラジクロロベンゼン、キシレンでアクティブ法による測定値に比べて5-6割と低い値を示したことから、濃度換算係数の見直しが必要である。サンプラーAは今回の測定範囲ではアクティブ法の測定値と比較的一致し、その実用性が認めら

れ、使用可能であることが明らかとなった。今回比較できなかった VOC についても今後このような実態調査を積み重ねて、検討していくことが必要と考えられる。

本研究を行うにあたり、測定にご協力頂きました生活衛生課及び各保健福祉事務所環境衛生課の皆様に深謝致します。

(平成17年7月22日受理)

文 献

- 1) 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
- 2) 山口貴史、真砂秀夫、大塚広末、渡辺征夫：パッシ

ブサンプラーによる VOC 室内空気濃度並びに個人暴露濃度測定、群馬県衛環研年報、31, 88-92 (1999)

- 3) 関根嘉香、廣田ちはる、佛願道男：空気中揮発性有機化合物（VOCs）濃度測定用溶媒脱離型パッシブサンプラーの性能評価、環境化学、12, 847-854 (2002)
- 4) 小林博美、金田恵美子、川本 寛、桐山徳也、徳田三郎：パッシブ法での室内空气中揮発性有機化合物測定の有効性について、滋賀衛環七所報、38, 78-81 (2003)
- 5) 「空気中の化学物質に関する調査研究」平成10-12年度総合報告書（厚生科学的研究補助金生活安全総合事業）

資料

神奈川県における恙虫病の発生状況 (平成16年度)

片山 丘, 古屋由美子
高橋孝則, 新川隆康

Occurrence of *Tsutsugamushi* Disease in Kanagawa Prefecture (2004)

Takashi KATAYAMA, Yumiko FURUYA

Takanori TAKAHASHI and Takayasu NIKKAWA

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考えられていた。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年には全国で約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、2002年からの3年間の患者数は300から400名で推移している。神奈川県での患者発生数の推移は、全国の患者発生数とほぼ同じ傾向がみられ、1990年に112名の患者が報告された後減少傾向を示し、1996年、1997年には9名であったが、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。その後再び減少傾向を示し、2001年7名、2002年4名、2003年5名となり、2004年はやや増加して18名の患者発生であった(図1)。2004年は全国患者発生数が前年に対し減少したが神奈川県では増加した。神奈川県では1996年頃から10名前後の患者発生が3年間続き、2年間ほど増加傾向を示してまた減少するというパターンが図1よりみられている。この傾向で推移するのかについては今後注目していく必要がある。全国患者発生数の減少は、例年多くの患者発生がみられている九州地方で患者が減少したためと考えられるがその詳細は不明である。

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

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・研究の情報が速やかに還元されている。

2004年4月から2005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22例、小田原保健福祉事務所管内1例、秦野保健福祉事務所管内1例の合計24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。18例が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)から陽性と判定され、恙虫病患者と診断された。5例は急性期の血液のみの検査で、IFでは判定できず判定保留となった。1例は抗体が検出されず陰性と判定された。

IFで陽性であった18例のうち、PCRによる急性期の血液を用いた *Orientia tsutsugamushi* DNAの検出では13例からDNAが検出された。またIFで判定保留の1例からもDNAが検出され、陽性と判定されたことから、合わせて14例がDNA検出で恙虫病と診断された。しかしIFで陽性であった残り5例中4例でDNAが検出されず、1例は血清のみの検体であったためにPCRが行えなかった。以上のことからIFとPCRの検査を併用することにより、早期に診断が可能なうえ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。恙虫病はテトラサイクリン系薬剤の適切な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、他の病気との鑑別のためにも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考えられた。PCRによるDNAの検出においては、以前より急性期血液中の抗体価が高い場合検出できない傾向があり、近年では急性期の抗体価が低いか、または検出されない検体でもDNAが検出されない場合がみられている。このことから、血清中の抗体による抗原の除去以外に、たとえば患者血液中に遺伝子抽出試薬やPCR試薬を阻害する物質が含まれている可能性を視野に入れて、さらなる試薬の変更や改良が今後の課題と考えられる。

PCRにより *O. tsutsugamushi* DNAの検出された14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)。今回県内で感染が見られた株は、

Kawasaki および Kuroki の2株であり、それぞれ10例（71.4%）および4例（28.6%）であり、例年と同様にその大部分が Kawasaki 株による感染であることが判明した。毎年10%程度感染がみられていた Karp 株が PCR による感染株の検索で検出されなかった。しかし PCR で陰性であった検体番号2004-19の患者は、IF 検査で IgM, IgG 抗体が他の株に比べ Karp 株に対して高い値を示しており、Karp 株の感染が推測された。

昨年と同様に培養細胞による恙虫病患者血液からの病原体の分離を実施したが、検体の状態により分離に適さないものが多かったため、今年度は病原体 *O. tsutsugamushi* を分離することができなかった。病原体を分離することは、県内で発生している恙虫病の解析や検討を行う上で重要なことであり、今後とも分離を実施していくとともに分離率の向上が検討課題となってくる。

恙虫病患者より聞き取り調査で得られた感染推定場所は、足柄上郡山北町と南足柄市に集中しており過去の発

生状況と同じであった。発生時期は10月から3月で、そのほとんどは10月から12月の発生であり、11月が63%を占めていた。近年ではみられなくなっていた年明けの3月にも1例の患者発生がみられた。感染時の行動は、田畠などの農作業が多く、次に山菜取りなどの山作業であり日常生活での感染の機会が多かった。このことから神奈川県で患者発生が増加傾向であった理由としては、例年と同様であるヒトの行動等に起因するのではなく、病原体を持ったツツガムシの発生が多かった可能性が考えられた。今後ツツガムシの発生数に関しては現地調査を行い、患者発生数との関連を調べることが重要であると思われた。

最後になりましたが、患者情報の収集に御協力いただきました各医療機関の先生方および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（現健康増進課）の方々に深謝いたします。

（平成17年7月22日受理）

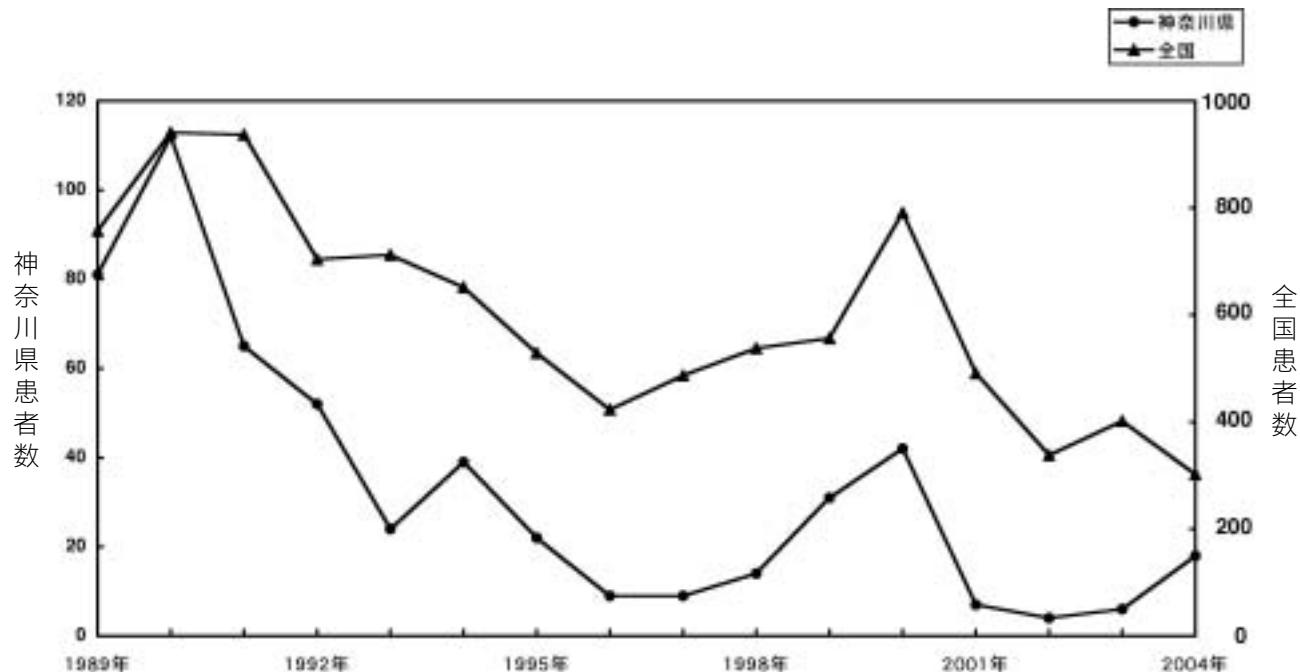


図1 恙虫病患者発生状況

表1 患虫病を疑われた患者の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					
2004-1	男	46	2004.5.4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性	
2004-2	男	59	2004.9.14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性	
2004-3	女	53	2004.10.1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性	
2004-4	男	65	2004.10.29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kr)	陽性	
2004-5	女	52	2004.10.29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kr)	陽性	
2004-6	男	54	2004.10.30	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陰性	陽性	
2004-7	女	79	2004.10.30	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性	
2004-8	女	63	2004.11.5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性	
2004-9	男	57	2004.11.6	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性	
2004-10	男	54	2004.11.17	2560	80	80	40	160	40	5120	640	80	40	40	陽性	陽性(Kw)	陽性	
2004-11	男	54	2004.11.16	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性	
2004-12	男	71	2004.11.30	5120	160	320	160	320	160	5120	640	320	160	40	陽性	陽性(Kw)	陽性	
2004-13	男	67	2004.11.24	640	160	20	20	20	80	640	320	<10	40	40	陽性	陰性	陽性	
2004-14	男	26	2004.11.30	640	320	<10	160	<10	320	640	640	<10	80	80	陽性	陽性(Kw)	陽性	
2004-15	女	63	2004.11.26	40960	10	40960	320	40960	160	160	160	10	81920	640	陽性	陽性(Kr)	陽性	
2004-16	男	68	2004.11.29	160	80	<10	20	<10	80	320	80	<10	80	80	陽性	陰性	陽性	
2004-17	男	63	2004.12.13	640	640	20	640	10	320	640	1280	40	640	640	陽性	陽性(Kr)	陽性	
2004-18	男	43	2004.11.30	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	10	10	陽性	陽性(Kw)	陽性
2004-19	男	74	2004.12.7	160	1280	640	2560	80	1280	40	10	160	1280	1280	陽性	陰性	陽性	
2004-20	男	70	2004.12.15	2560	80	320	40	320	160	5120	320	160	20	20	陽性	陽性(Kw)	陽性	
2004-21	女	71	2004.12.24	5120	320	640	320	640	320	10240	1280	640	160	160	陽性	陽性(Kw)	陽性	
2004-22	男	54	2005.1.27	20	20	<10	<10	<10	<10	<10	40	40	<10	<10	保留	陰性	陰性	
2004-23	男	63	2005.1.28	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性	
2004-24	男	64	2005.2.5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	未検査	陽性	
			2005.3.11	20	<10	40	<10	20	<10	<10	<10	<10	40	<10	陽性			
			2005.3.23	1280	320	1280	640	1280	640	<10	<10	2560	1280					

Kr : Kuroki株, Kw : Kawasaki株

資料

インターネットで購入した中国茶 中のカテキン類、カフェイン 及びテアニンの分析

岸 弘子, 土屋久世, 平山クニ

Determination of Catechins, Caffeine and Theanine in Chinese Tea Bought by Internet

Hiroko KISHI, Hisayo TSUCHIYA

and Kuni HIRAYAMA

神奈川県では、消費者の権利の確立と県民生活の質の向上を図るために、生活科学研究ネットワーク推進事業で消費者の視点に立った試験・調査・研究を実施している。最近、健康への関心の高まりから茶が注目されており、平成16年度は中国茶に含まれる生理作用を持つ成分の調査を行った。茶葉には渋みの成分で抗酸化、コレステロール低下作用のあるカテキン、中枢神経興奮作用のあるカフェイン、うま味成分でリラックス効果のあるテアニン等が含まれている。

調査対象は、インターネットで個人輸入代行業者を通じての購入が可能であった中国茶15検体及び比較のための日本茶5検体とした。分析した項目は、カテキン類4種；エピガロカテキン(EGC), エピガロカテキンガレート(EGCG), エピカテキン(EC), エピカテキンガレート(ECG), カフェイン(CF) 及びテアニン(TH)の6項目とした。

カテキン標準品は和光純薬工業(株)製の生化学用、CF標準品は和光純薬工業(株)製の特級、TH標準品はLKT Labs社製を用いた。その他の試薬は、特級またはHPLC用を用いた。

カテキン標準品は5mgを各々水に溶解して25mlとし、CF標準品は5mgを水で溶解して50mlとした後、それらを混合して混合標準原液を調製した。水-メタノール-1%ギ酸(70:20:10)で適宜希釈して標準溶液と

した。TH標準品は17.4mgを0.01M塩酸で10mLとし、標準原液を調製した後、0.02M塩酸で適宜希釈し、標準溶液とした。

カテキン類及びCFの分析条件：HPLC装置は、Agilent社製1100シリーズを用いた。カラムはAtlantis dC18 4.6×150mm(Waters社製)、移動相は、A液；水、B液；メタノール、C液；1%ギ酸、グラジェント条件は、A液70%, B液20%, C液10%から、10分後にA液60%, B液30%, C液10%, 20分後にA液30%, B液60%, C液10%のリニアグラジェントとした。流速は1.0mL/min、カラム温度は40°C、検出波長は280nm、注入量は10μLとした。

THの分析条件¹⁾：全自动アミノ酸分析機は、日本電子(株)製JLC-500/Vを用いた。カラムは日本電子(株)製LCR-6(多段式カラム、4mm×120mm)にプレカラムLCR-7(4mm×70mm)を接続した。移動相は日本電子(株)製クエン酸緩衝液(生体アミノ酸分析用)、注入量は50μLとした。

各検体について、実際に飲用する条件を想定した茶浸出液と茶葉(含有成分を抽出)の2種類の試験溶液を作成した。茶浸出液は、五訂増補日本食品標準成分表²⁾を参考に、試料5gに沸騰した熱水220mLを加えた。浸出時間は、検体の表示を参考に試料No.5,6,7については3分間、その他は2分間とした。放置後、ガーゼを用いてろ過した。TH分析用は0.5M塩酸4mLを加え、カテキン、CF分析用は、水-メタノール-1%ギ酸(70:20:10)で適宜希釈し、0.45μmのメンブランフィルターでろ過して試験溶液とした。

茶葉のカテキン類、CF分析用は、粉砕した試料0.5gに40%エタノールを加えて100mLとし、超音波洗浄機中で60分間放置した後、ガラスワールを用いてろ過した³⁾。ろ液を、水-メタノール-1%ギ酸(70:20:10)で適宜希釈し、0.45μmのメンブランフィルターでろ過して試験溶液とした。TH分析用は、粉砕した試料1.0gに沸騰水80mLを加え、5分間時々攪拌しながら放置した。ガーゼでろ過した後、0.5M塩酸2mLを加え、水で100mLとした。この溶液を0.45μmのメンブランフィルターでろ過して試験溶液とした。

カテキン類及びCFのクロマトグラム例を図1に、THのクロマトグラム例を図2に示した。分析結果を表1、表2に示した。

No.5はティーバックで葉が細かく、成分が抽出されやすかった。No.7は他の検体と比較してカテキン、CF、THのすべてが低濃度であった。表示では、成分として緑茶以外に土茯苓、沙参、淮山藥、草決明と記載されており、茶葉は一部であった。その他の検体はすべて茶葉

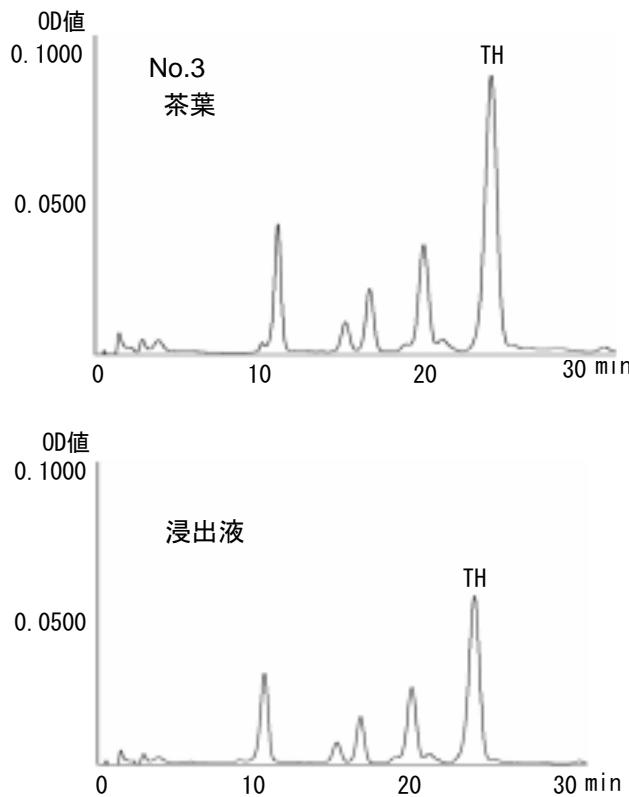
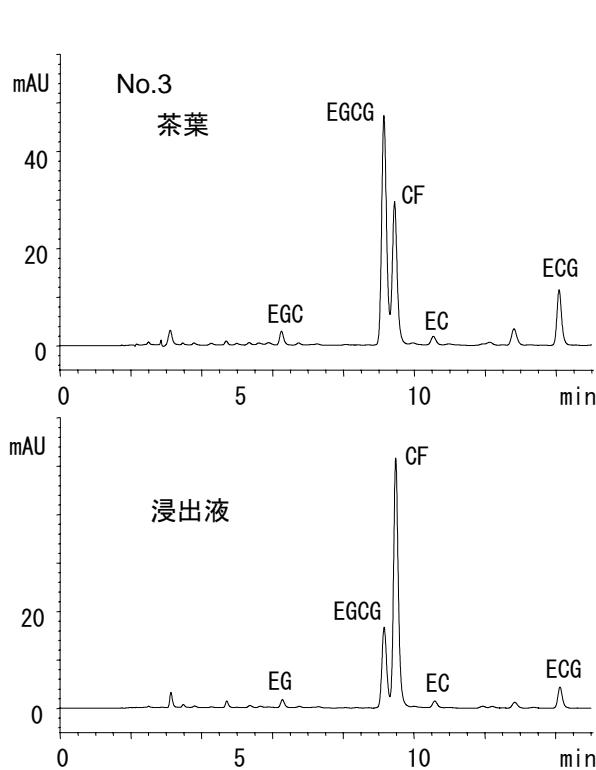


図1 カテキン類及びCFのクロマトグラム

図2 THのクロマトグラム

表1 浸出液の分析結果

No.	検体名	分類	浸出液中濃度(μg/mL)					
			EGC	EGCG	EC	ECG	CF	TH
1	翠玉茶	青茶(半発酵)	281.8	183.7	56.9	32.6	487.7	61.7
2	凍頂烏龍茶	青茶(半発酵)	300.1	199.7	46.6	28.7	351.3	73.8
3	清香茶	青茶(半発酵)	196.9	262.9	44.7	48.7	404.9	31.2
4	阿里山金壺千葉茶	青茶(半発酵)	211.8	242.0	33.2	27.6	391.5	60.3
5	鉄觀音	青茶(半発酵)	773.9	876.5	132.0	160.1	529.0	96.7
6	緑茶沱茶	緑茶(非発酵)	347.2	658.3	402.6	550.7	537.4	191.1
7	碧生源常潤茶	緑茶(非発酵)	9.6	10.8	2.4	4.1	22.3	4.8
8	西湖龍井	緑茶(非発酵)	253.4	831.3	101.7	206.1	689.6	230.1
9	プーアル茶	黒茶(後発酵)	19.3	ND	ND	ND	471.5	ND
10	武夷肉桂	青茶(半発酵)	221.4	220.4	70.5	67.6	645.9	100.3
11	白毫銀針	白茶(弱前発酵)	18.9	144.0	10.8	47.3	532.2	66.8
12	龍井茶	緑茶(非発酵)	74.7	464.8	47.0	127.6	553.7	159.0
13	碧螺春	緑茶(非発酵)	258.2	857.5	106.1	274.9	730.8	187.5
14	竹葉青	緑茶(非発酵)	225.7	1009.3	85.6	248.3	709.9	82.8
15	黄山毛峰	緑茶(非発酵)	59.6	373.7	42.7	95.0	556.5	171.7
16	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	859.5	1070.3	177.2	188.8	611.9	192.5
17	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	842.4	798.5	167.4	134.7	580.7	222.6
18	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	657.4	914.2	167.9	161.5	668.1	458.3
19	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	462.1	654.2	128.7	108.1	555.0	460.3
20	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	765.3	501.0	152.5	83.8	420.0	176.6

ND:定量下限値未満

定量下限値:TH 1 μg/mL, カテキン類 1 μg/mL, CF 0.5 μg/mL

表2 茶葉の分析結果

No.	検体名	分類	茶葉中含有量(mg/g)					
			EGC	EGCG	EC	ECG	CF	TH
1	翠玉茶	青茶(半発酵)	49.7	50.3	7.2	8.0	24.8	7.5
2	凍頂烏龍茶	青茶(半発酵)	56.4	60.3	7.8	8.5	24.2	14.9
3	清香茶	青茶(半発酵)	31.6	75.5	5.6	13.0	24.0	4.2
4	阿里山金壺千萱茶	青茶(半発酵)	31.5	55.1	4.1	6.1	20.2	8.2
5	鉄觀音	青茶(半発酵)	32.4	51.6	6.1	10.1	21.1	3.7
6	緑茶沱茶	緑茶(非発酵)	21.0	48.5	21.1	44.8	27.2	10.0
7	碧生源常潤茶	緑茶(非発酵)	3.0	6.2	0.8	2.3	5.8	0.7
8	西湖龍井	緑茶(非発酵)	17.0	81.4	7.5	22.6	34.5	17.5
9	プーアル茶	黒茶(後発酵)	1.1	ND	ND	0.1	25.6	ND
10	武夷肉桂	青茶(半発酵)	26.1	39.8	7.0	11.6	33.4	7.7
11	白毫銀針	白茶(弱前発酵)	3.4	66.0	7.2	25.6	47.4	17.1
12	龍井茶	緑茶(非発酵)	8.3	75.4	6.2	24.0	33.6	16.0
13	碧螺春	緑茶(非発酵)	16.4	90.7	6.1	30.0	41.1	9.6
14	竹葉青	緑茶(非発酵)	11.5	112.2	4.1	33.8	48.8	6.4
15	黄山毛峰	緑茶(非発酵)	7.9	77.7	7.8	26.3	36.7	21.8
16	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	46.7	81.9	9.4	14.9	28.3	9.5
17	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	50.8	69.8	9.7	11.6	27.9	11.0
18	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	33.7	66.8	8.1	12.4	32.0	21.3
19	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	29.2	57.7	8.1	10.3	28.8	23.0
20	日本茶(煎茶)	緑茶(非発酵)	59.0	57.6	10.1	9.5	21.2	10.0

ND:定量下限値未満

定量下限値:TH 0.1mg/g, カテキン類 0.1mg/g, CF 0.05 mg/g

のみであった。No.9のプーアル茶にはカテキン類はほとんど検出されなかった。また、THも検出されなかった。黒茶で後発酵茶のプーアル茶では発酵により、アミノ酸類は分解し、カテキン類は酸化重合が進んで含有量が減少するため⁴⁾、今回の分析対象とした4種のカテキン以外に変化したと推定される。

日本茶 (No.16~20) の CF 及び TH については、茶葉含有量の80%以上が溶出され、カテキン類は約60%が溶出された。しかし、中国茶では浸出率の差が大きく、CF 及び TH については17~100%，カテキン類は10~85%となり、茶葉が細かいほど、浸出率が高い傾向であった。

(平成17年7月22日受理)

文 献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編, pp.263-268, 日本食品衛生協会 (2003)
- 2) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会編：五訂増補日本食品標準成分表 (2005)
- 3) 寺田久屋, 鈴木晃世, 田中治夫, 山本勝彦：セミクロ高速液体クロマトグラフィーによる食品中のカテキン類及びメチルキサンチン類の定量, 食品衛生学雑誌, 33, 347-354(1992)
- 4) 黃素梅, 井上和美, 李 岩, 田中隆, 石丸幹二：オートクレーブ処理した茶葉および茶ドリンクのカテキン成分, 日本食品化学学会誌, 11, 99-102, (1997)

資料

遺伝子組換え食品の分析結果 (平成16年度)

大森清美, 土屋久世, 岸 弘子
山田利治, 平山克二

Investigation on the Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified Foods in Kanagawa Prefecture (2004)

Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA, Hiroko KISHI
Toshiharu YAMADA and Kuni HIRAYAMA

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16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集された70検体について検査を実施した。

試験方法は、平成16年6月28日食安発第0628001号の厚生労働省通知に従い、安全性未承認の組換え遺伝子については定性試験を、安全性承認済み組換え遺伝子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。冷凍枝豆については大豆加工品に分類され、通知では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、大豆穀粒の定量試験法を参考

に調査的観点から定量試験を実施した。使用機器類は、TaKaRa PCR Thermal Cycler SP, Mupid ミニゲル泳動装置、ATTO BIOINSTRUMENT, AE-6905H Image Saver HR, 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、冷凍トウモロコシ1検体を除く34検体で、いずれも組換え遺伝子は不検出であった。検体No.34の冷凍トウモロコシについては、内在性遺伝子であるZeinが検出されなかったことから検査不能であった。

定量試験結果(表3)については、トウモロコシ青果5検体及び穀粒5検体、大豆穀粒10検体及び大豆加工品(冷凍枝豆)15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。しかし、検体No.46, 47及び50の大豆穀粒からは、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るがいずれも0.04~0.06%のRRSが検出された。そのほか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、定量下限値未満ではあるものの微量のRRSが検出されたNo.46及び47はアメリカ産、No.50はカナダ産のIPハンドリングを有する大豆穀粒であり、いずれも豆腐原材料の大豆であった。平成14年度及び平成15年度に実施した組換え遺伝子の試験結果^{2) 3)}においても、大豆穀粒3検体でRRSが0.1~2.6%検出され、それらは全てアメリカ産大豆であった。食品科学広報センターのホームページによると、GM作物作付面積世界第1位のアメリカにおける2003年度のGM大豆作付け比率は8.2%であり、GM作物作付面積世界

表1 平成16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	定性又は定量法	DNA抽出精製法	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	(QIAGEN) DNeasy Plant Mini Kit 法	55-1	Papain
	トウモロコシ青果	5					
	トウモロコシ穀粒	5					
	コーンスナック菓子	9					
トウモロコシ	コーンフレーク	1	定性	PCR法	(QIAGEN) Genomic-tip Kit 法	CBH351	Zein
	コーンスープ	6					
	トウモロコシ缶詰	1					
	冷凍トウモロコシ	3					
	トウモロコシ青果	5	定量	PCR法	(QIAGEN) DNeasy Plant Mini Kit 法	35S・GA21	SS II b
	トウモロコシ穀粒	5					
大豆	大豆穀粒	10	定量	PCR法	CTAB法 / (Promega) Wizard Clean up Resin Kit 法	RRS	Le1
	冷凍枝豆	15					
	合計	35	定性				
		35	定量				

表 2 平成 16 年度 組換え遺伝子定性試験方法

No.	品目	産地/原産国	検査遺伝子	結果	GMIに関する表示
1	パパイヤ(青果)	アメリカ(Hawai)	55-1	不検出	なし
2	パパイヤ(青果)	アメリカ(Hawai)	55-1	不検出	なし
3	パパイヤ(青果)	アメリカ(Hawai)	55-1	不検出	なし
4	パパイヤ(青果)	フィリピン	55-1	不検出	なし
5	パパイヤ(青果)	フィリピン	55-1	不検出	なし
6	トウモロコシ(青果)	福島県	CBH351	不検出	なし
7	トウモロコシ(青果)	千葉県	CBH351	不検出	なし
8	トウモロコシ(青果)	青森県	CBH351	不検出	なし
9	トウモロコシ(青果)	千葉県	CBH351	不検出	なし
10	トウモロコシ(青果)	不明	CBH351	不検出	なし
11	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351	不検出	組換えでない
12	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351	不検出	組換えでない
13	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組換え不分別
14	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351	不検出	組換えでない
15	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351	不検出	組換えでない
16	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	アメリカ	CBH351	不検出	組換えでない
17	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
18	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
19	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
20	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
21	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
22	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
23	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
24	コーンスナック菓子(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換え不分別
25	コーンフレーク(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
26	コーンスープ(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
27	コーンスープ(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	なし
28	コーンスープ(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
29	コーンスープ(トウモロコシ加工品)	アメリカ	CBH351	不検出	組換えでない
30	コーンスープ(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
31	コーンスープ(トウモロコシ加工品)	不明	CBH351	不検出	組換えでない
32	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	組換えでない
33	冷凍トウモロコシ(トウモロコシ加工品)	ニュージーランド	CBH351	不検出	組換えでない
34	冷凍トウモロコシ(トウモロコシ加工品)	アメリカ	CBH351	検知不能	組換えでない
35	冷凍トウモロコシ(トウモロコシ加工品)	アメリカ	CBH351	不検出	組換えでない

表 3 平成 16 年度 組換え遺伝子定量試験方法

No.	品目	産地/原産国	検査遺伝子	結果	GMIに関する表示
36	トウモロコシ(青果)	青森県	35S-GA21	不検出	なし
37	トウモロコシ(青果)	千葉県	35S-GA21	不検出	なし
38	トウモロコシ(青果)	千葉県	35S-GA21	不検出	なし
39	トウモロコシ(青果)	福島県	35S-GA21	不検出	なし
40	トウモロコシ(青果)	不明	35S-GA21	不検出	なし
41	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出	組換えでない
42	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出	組換えでない
43	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出	遺伝子組換え不分別
44	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出	組換えでない
45	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出	組換えでない
46	大豆穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.04%)	NON-GMO
47	大豆穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.06%)	NON-GMO
48	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	NON-GMO
49	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	NON-GMO
50	大豆穀粒	カナダ	RRS	定量下限値未満検出(0.06%)	NON-GMO
51	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	NON-GMO
52	大豆穀粒	福島県	RRS	不検出	組換えでない
53	大豆穀粒	北海道	RRS	不検出	組換えでない
54	大豆穀粒	北海道	RRS	不検出	組換えでない
55	大豆穀粒	北海道	RRS	不検出	なし
56	冷凍枝豆(大豆加工品)	タイ	RRS	不検出	組換えでない
57	冷凍枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出	組換えでない
58	冷凍枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出	組換えでない
59	冷凍枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出	組換えでない
60	冷凍枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出	組換えでない
61	冷凍枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出	なし
62	冷凍枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出	なし
63	冷凍枝豆(大豆加工品)	台湾	RRS	不検出	なし
64	冷凍枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出	組換えでない
65	冷凍枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出	組換えでない
66	冷凍枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出	なし
67	冷凍枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出	なし
68	冷凍枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出	なし
69	冷凍枝豆(大豆加工品)	中国	RRS	不検出	なし
70	冷凍枝豆(大豆加工品)	北海道	RRS	不検出	組換えでない

第3位のカナダでは、GM 大豆は GM なたね、GM トウモロコシに続く第3位の作付け面積であった。これらの国では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こる可能性があるものと考えられた。

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強い。消費者の「食品を選択する権利」をまもるために、今後も GM 食品の表示に対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17年7月22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レ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)
- 3) 大森清美ほか：遺伝子組換え食品の分析結果（平成15年度）、神奈川県衛生研究所研究報告、34, 56-58 (2004)

資料

食品中の異物検査結果について (平成15年度・16年度)

大森清美, 土屋久世, 岸 弘子
山田利治, 平山克二

Case Studies on Contaminations of Foreign Matters in Food

Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA
Hiroko KISHI, Toshiharu YAMADA
and Kuni HIRAYAMA

近年、食品に関わる様々な事件が発生し報道される中、食品に対する消費者の不安、不信感は益々増幅されているように思われる。それを反映しているかのように、食品に関する苦情とくに異物の検査依頼は後を絶たない。検査により異物を特定することは、苦情者の不安や不満

に応えると共に、食品製造ラインの問題点を明らかにする上でも重要である。表1は平成15年度及び16年度に検査を行った異物混入事例の概要である。これらの異物検査は大きく二つに分けられる。一方はメーカーから製造ラインにおいて混入が疑われる物質が対照品として提供され異物と対照品の比較分析が可能な、事例3, 4, 5, 6及び7のような場合である。もう一方は、異物が製造ラインからは推測できず対照品がない、事例1, 2及び8のような場合である。後者の場合、異物の形態観察結果や製造ライン、苦情内容などから混入が疑われる物質を推測し、検査を進めることになる。いずれの場合においても、異物を特定する場合には、実体顕微鏡観察、フーリエ変換赤外分光(FT-IR)分析及び蛍光X線測定が非破壊的で情報量の多い分析法となる。しかし、それらによっても物質の特定が困難な場合には、さらに種々の分析手法を応用し、異物の溶解物または抽出物についてのクロマトグラフィー及び質量分析計等による分析を必要とするケースがある。そこで、表1の事例のうち、対照品の提供があり、高速液体クロマトグラフィー・フォトダイオードアレイ(HPLC-PDA)を用いた合成樹脂の添加剤分析法を応用により、異物の特定を行った事例No.7について詳細を示す。また、対照品の提供は無くFT-IR、

表1 異物混入事例の検査方法と結果概要

事例No.	異物混入食品	異物の状況	対照品	結果	使用機器
1	乳酸飲料	褐色の異物	提供なし	鉱物、金属ではない物質	実体顕微鏡観察 蛍光X線
2	寿司	淡赤色の爪状の異物	提供なし 鯛(購入)の鱗	魚の鱗	実体顕微鏡観察 FT-IR(ATR)
3	キムチ	白色の異物	メーカーより提供 包装材(ポリ塩化ビニル)	ポリスチレン	実体顕微鏡観察 FT-IR(ATR)
4	クッキー	青いビニール状の異物	メーカーより提供 製造(生地延ばし)用シート	製造(生地延ばし)用シート	実体顕微鏡観察 FT-IR(ATR)
5	パン	淡褐色の硬い異物	メーカーより提供 パン材料(穀類)	パン材料(穀類)	実体顕微鏡観察 蛍光X線 FT-IR(ATR)
6	かまぼこ	黒色の硬い異物	メーカーより提供 かまぼこ焦げ(デモサンプル)	かまぼこ焦げ	実体顕微鏡観察 蛍光X線 FT-IR(ATR)
7	弁当	透明のフィルム状異物	メーカーより提供 弁当包装材等	弁当包装材	実体顕微鏡観察 FT-IR(ATR) HPLC(PDA)
8	チョコレート	淡赤色の苦い異物	提供なし ビタミン製剤(購入)	シアノコバラミン、ビスベンチアミン 含有製剤	実体顕微鏡観察 FT-IR(ATR) HPLC(PDA) LC/MS/MS

HPLC-PDA 及び液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた分析により異物含有成分を解明した事例 No.8について詳細を示す。

事例 No.7

苦情品は、合成樹脂片が混入していた弁当（生姜焼肉丼）であった。異物は、合成樹脂（フィルム）片であったため、対照品として苦情品の弁当が包まれていた外包装と弁当製造工場内にあった合成樹脂7品が提供された。それらの対照品①から⑧は、①は苦情品の外包装、②は①の比較品弁当箱が入っていた袋、③は未使用の弁当箱が入っていた袋、④は未使用の弁当箱ふたが入っていた袋、⑤は原材料(肉)の包装、⑥は原材料（玉ねぎ）の包装、⑦は原材料(調味料)の包装、⑧は他の弁当に使用されている未使用ふたの包装であった。まず目視により異物及び対照品を観察した結果、対照品③及び⑥は色調及び樹脂の厚さ等により、異物及び他の対照品とは異なる高密度ポリエチレンと推察された。このことから、対照品③及び⑥以外の対照品と異物について、ユニバーサル ATR 法による FT-IR 分析を行った。その結果（図1）、異物及び対照品⑦の外側を除く対照品の吸収スペクトルにポリエチレン特有の吸収 ($720\sim725\text{cm}^{-1}$) が見られ、それらはライブラリー検索によるポリエチレンの吸収スペクトルとほぼ一致した。対照品⑦については内側の面のみがポリエチレンとほぼ一致したが、外側の面はナイロンの吸収スペクトルと一致した。また、異物に見られた 1700cm^{-1} 付近の吸収はポリエチレンには認められないことから、 1700cm^{-1} 付近の吸収の由来を調べるために、異物に付着していた油状物質の吸収スペクトルを測定した。その結果、 1700cm^{-1} 付近の吸収は食品由来の油脂と推察された。しかし、これら目視観察及び FT-IR 測定では対照品の中から苦情品中の異物を特定することができなかった。そこで、ポリエチレンに添加されている酸化防止剤等の分析法を応用し、異物及び対照品に添加されている酸化防止剤の HPLC クロマトグラムのパターンから異物の特定を試みた。抽出方法は既報¹⁾に従い、異物と対照品①、②、④、⑤及び⑧は、シクロヘキサン・イソプロピルアルコール混液（1：1）により酸化防止剤を抽出した。各抽出液について、HPLC-PDA により分析を行った（図2）。その結果、異物抽出液と対照品①抽出液のクロマトグラムはほぼ一致し、他の対照品とは異なることから、異物は苦情品の外包装であると考えられた。

事例 No.8

苦情品はピーナツチョコレートであり、苦情内容は同品を食べたところチョコレートの中にピンク色の粒があり、ピンク色の粒を潰すと苦い味がしたというものであった。苦情品から異物として採取した淡褐色異物、黒

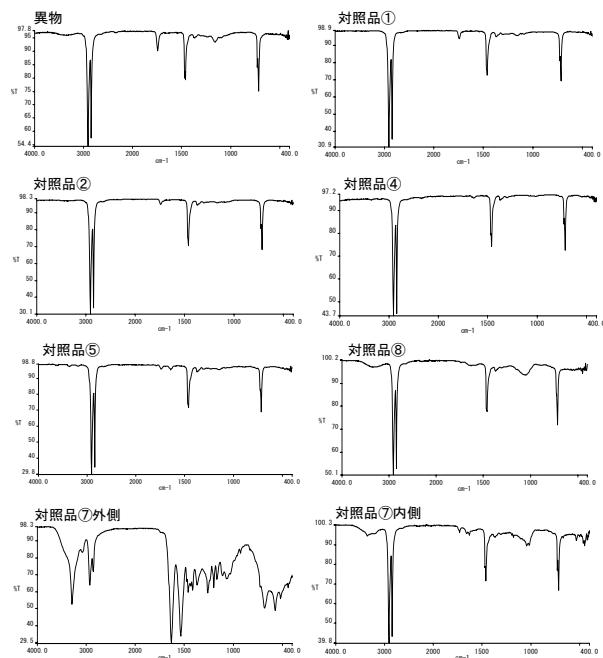


図1 異物及び対照品の FT-IR スペクトル

装置；Spectrum One NTS (パーキンエルマー社)

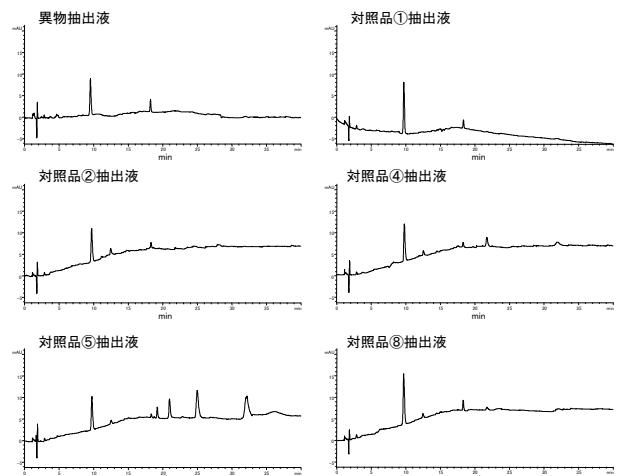


図2 異物及び対照品の HPLC クロマトグラム

装置；HP1100 (ヒューレットパッカード社), カラム；Inertsil ODS-3 (4x150mm, 3 μm), カラム温度；50°C, 移動相；開始時にはアセトニトリル水 (6:4), リニアグレジェントで 13 分後にアセトニトリル 100% とし、更に 22 分間アセトニトリル 100% で溶出、検出器；フォトダイオードアレイ (220~700nm), 抽出波長；225nm, 流量；1.0mL/min, 注入量；10 μL

色異物、淡赤色異物について目視及び実態顕微鏡（オリンパス SGX9）による形態観察及び化学分析により検討を行った。淡褐色異物及び黒色異物については、形態観

察ではカラメル様もしくは焦げ様の物質であると推定されたが、FT-IR 及び HPLC 等による化学分析では物質を特定することはできなかった。淡赤色異物は、水と混合し静置すると、赤色の上澄液と白色の粉末状沈殿物に別れた。赤色の上澄液については、食品に使用されている色素が混入したものと推測し、赤色系の水溶性合成色素及び天然色素を標準品として、HPLC-PDA を用いてカラム保持時間及び紫外可視吸収スペクトルの比較を行った。その結果、それらの色素標準品と赤色成分は異なる挙動を示したことから、上澄液の赤色成分は食品添加物として使用されている色素とは異なる物質であると考えられた。白色の粉末状沈殿物については、メタノールで洗浄し、乾燥したものを FT-IR のユニバーサル ATR 法により赤外吸収スペクトル測定を行った。その結果（図3）、淡赤色異物中の白色粉末の赤外吸収スペクトルはセルロース（シグマ社）の赤外吸収スペクトルと一致した。セルロースは、主に医薬品などの製剤中で賦形剤として用いられることから、淡赤色異物は医薬品またはサプリメント類に由来する可能性が浮かび上がった。淡赤色異物を水に懸濁し、PTFE 膜でろ過した溶液を試料溶液として、HPLC-PDA により分析を行った。その結果（図4）、試料溶液の HPLC クロマトグラムにおける保持時間 10.9 分の Peak A の UV 吸収スペクトルは、360nm 及び 550nm 付近に極大吸収波長を有していた。それらの極大吸収波長、水溶性及び赤色を呈するという特徴から、シアノコバラミン（ビタミン B₁₂）であることを推察し、HPLC-PDA によるシアノコバラミンの分析を行った。

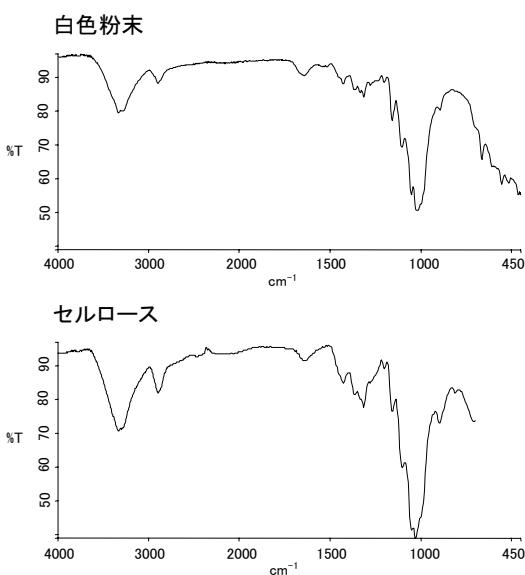


図3 白色粉末及びセルロースの FT-IR スペクトル

装置；Spectrum One NTS（パーキンエルマー社）

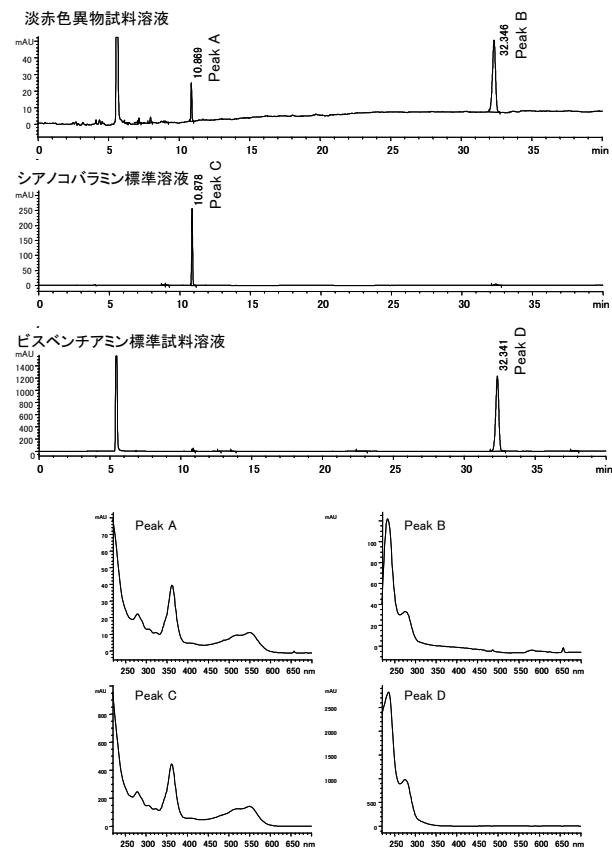


図4 淡赤色異物試料溶液、シアノコバラミン標準溶液、ビスベンチアミン標準試料溶液の HPLC-PDA クロマトグラム及びピーク A, B, C 及び D の UV 吸収スペクトル

装置；HP 1100 series (ヒューレットパッカード社), カラム；Inertsil ODS-3 (4x150mm, 3mm), カラム温度；40°C, 移動相；開始時には 0.01M 酢酸アンモニウム・アセトニトリル (95:5), リニアグラジエントで 40 分後に 0.01M 酢酸アンモニウム・アセトニトリル (30:70), 検出器；フォトダイオードアレイ (220~700nm), 流量；1.0mL/min, 注入量；20 μL

その結果（図4）、淡赤色異物試料溶液の Peak A の UV スペクトルは、シアノコバラミン標準溶液の HPLC クロマトグラムにおける保持時間 10.9 分の Peak C の UV 吸収スペクトルと一致した。さらに、LC/MS/MS により淡赤色異物試料溶液とシアノコバラミン標準溶液について分析を行った結果（図5）、淡赤色異物試料溶液のトータルイオンクロマトグラム (TIC) において、14.6 分と 35.6 分にピークを検出した。また、14.6 分のピークについてのマススペクトルは、 m/z 1355.5 及び 678.4 に特徴的なイオンピークを有し、 m/z 1355.5 のマスクロマトグラム及び m/z 679 のマスクロマトグラムでは、UV 550 nm 検

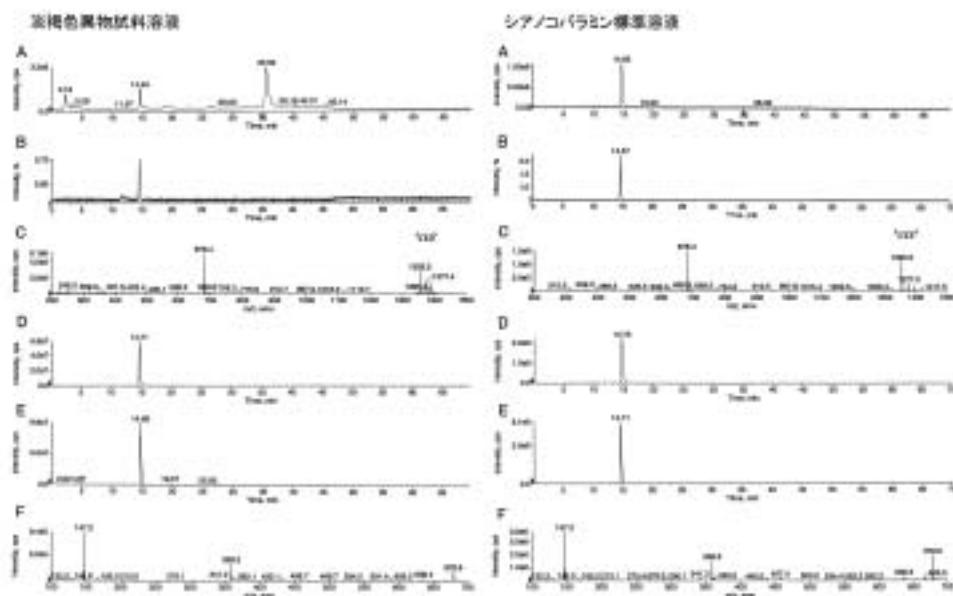


図5 淡赤色異物試料溶液及びシアノコバラミン標準溶液のLC/MS/MSデータ

MS/MS 条件

装置; QTRAPTM LC/MS/MS System (アプライドバイオシステムズ社), イオン化モード; ESI (エレクトロスプレーイオン化法), ポジティブモード, コリジョンエネルギー; 20V, キャピラリー電圧; 5500V, 乾燥ガス温度; 450°C, スキャンタイプ; EMS (エンハンスドマススペクトル) モード及びEPI (エンハンスドプロダクトイオン) モード

HPLC 条件

装置; Agilent 1100 series(アジレントテクノロジー社), カラム; Inertsil ODS-3 (2x150mm, 3 μm), カラム温度; 40°C, 検出波長; UV550nm, 流量; 0.2mL/min, 注入量; 10 μL

A ; トータルイオンクロマトグラム (TIC), B ; 550nm 検出クロマトグラム, C ; TIC14.6 分のマススペクトル, D ; EPI モードにおける TIC (Q1 ; m/z 1355.5, Q3 ; m/z 200-1500), E ; EPI モードにおける TIC (Q1 ; m/z 679.0, Q3 ; m/z 100-700), F ; E における 14.7 分ピークのマススペクトル

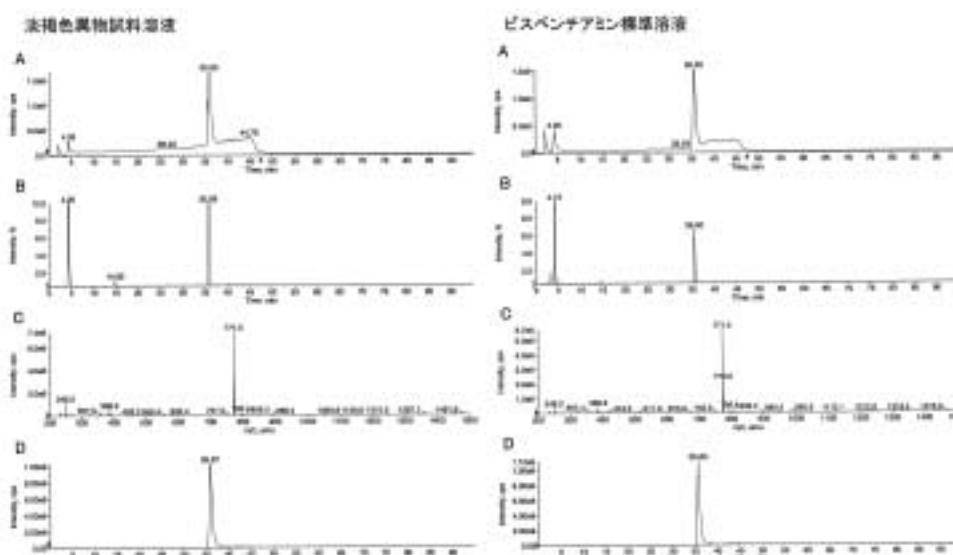


図6 淡赤色異物試料溶液及びビスベンチアミン標準試料溶液のLC/MS/MSデータ

MS/MS 条件

装置; QTRAPTM LC/MS/MS System (アプライドバイオシステムズ社), イオン化モード; エレクトロスプレーイオン化法, ポジティブモード, コリジョンエネルギー; 20V, キャピラリー電圧; 5500V, 乾燥ガス温度; 450°C, スキャンタイプ; EMS モード及びEPI モード

HPLC 条件

装置; Agilent 1100 series (アジレントテクノロジー社), カラム; Inertsil ODS-3 (2x150mm, 3 μm), カラム温度; 40°C, 検出波長; UV254nm, 流量; 0.2mL/min, 注入量; 10 μL

A ; トータルイオンクロマトグラム (TIC), B ; 254nm 検出クロマトグラム, C ; TIC35.6 分ピークのマススペクトル, D ; EPI モードにおける TIC (Q1 ; m/z 771.0, Q3 ; m/z 200-1500)

出によるクロマトグラムと同一の保持時間にピークを検出した。さらに m/z 679 のマスクロマトグラムにおける 14.7 分ピークのマススペクトルには、 m/z 359.2 及び 147.2 に特徴的なイオンピークを検出した。シアノコバラミン標準溶液の TIC においても 14.7 分にピークを検出し、そのマススペクトルは、淡赤色異物試料溶液の TIC における 14.6 分のピークと同様に m/z 1355.5 及び 678.4 に特徴的なイオンピークを検出した。シアノコバラミンの平均分子量は 1355.4 であることから m/z 1355.5 のイオンピークはシアノコバラミンのプリカーサーイオンであると考えられた。 m/z 1355.5 のマスクロマトグラム及び m/z 679 のマスクロマトグラムでは、UV550nm 検出によるクロマトグラムと同一の保持時間にピークを検出し、さらに m/z 679 のマスクロマトグラムにおける 14.7 分ピークのマススペクトルには、 m/z 359.3 及び 147.2 に特徴的なイオンピークを検出した。したがって、試料溶液の TIC における 14.6 分のピークはシアノコバラミンであることが確認された。その他、淡赤色異物試料溶液の TIC には 35.6 分のピークを検出し、そのマススペクトルは、 m/z 771.5 に強いイオンピークを有していた。そこで、分子量 772 付近の成分について、Merck Index の分子量検索を行ったところ、ビスベンチアミン（平均分子量 770.9）がリストアップされた。一般薬日本医薬品集²⁾では、シアノコバラミン及びビスベンチアミンを含む製剤は 4 製剤が該当した。ビスベンチアミン標準品の入手が困難であったことから、4 製剤中の 1 製剤をビスベンチアミンの標準試料として、LC/MS/MS 及び HPLC-PDA による確認を行った。その結果、ビスベンチアミン標準試

料溶液の TIC においても淡赤色試料溶液と同一保持時間である 35.5 分にピークを検出し、そのピークのマススペクトルには、ビスベンチアミンの平均分子量 771.4 に強いイオンピークを検出した（図 6）。 m/z 771 のマスクロマトグラムでは UV254nm 検出によるクロマトグラムと同一の保持時間にピークを検出した。また、ビスベンチアミン標準試料溶液の HPLC-PDA による分析結果（図 4）では、ピーク保持時間 32.3 分に Peak D を検出し、その UV スペクトルは淡赤色試料溶液の HPLC クロマトグラムにおける保持時間 32.3 分の Peak B の UV 吸収スペクトルと同様の 240nm 及び 280nm 付近に極大吸収波長を有していた。それらの結果により、 m/z 771.5 の成分はビスベンチアミンであることが強く示唆された。そして、ビスベンチアミン標準試料の内容物を水で湿らせた対照品は、形態的にも淡赤色異物と酷似しており、標準試料を碎いた淡赤色の内容物は苦く、苦情者からの聞き取り内容と一致していた。以上の化学分析結果、形態及び味等の特徴から、チョコレートに混入していた異物は、シアノコバラミン及びビスベンチアミンを含有する製剤であると考えられた。

（平成 17 年 7 月 22 日受理）

参考文献

- 1) 河村葉子ほか：HPLC によるポリエチレン中の酸化防止剤及び紫外線吸収剤の一斉分析法、食品衛生学雑誌、37、272-280（1996）
- 2) 一般薬日本医薬品集 2000-01、（財）日本医薬品情報センター編

資料

飲料水の大腸菌検査における ONPG陽性培養液中の腸内細菌科 に属する細菌について

山本陽子, 湯川利恵, 石野珠紀, 沖津忠行

Investigation of Family *Enterobacteriaceae* in ONPG Positive Cultured from Drinking Water Tested for *Escherichia coli*

Yoko YAMAMOTO, Rie YUKAWA, Tamaki ISHINO
and Tadayuki OKITSU

水道法(昭和32年法律第177号)第4条に基づく水質基準に関する省令が廃止され、新たな水質基準に関する省令(平成15年厚生労働省令第101号)が平成16年4月1日から施行された。今回の改正の中で、細菌学的項目および基準のうち従来の「大腸菌群が検出されないこと」が削除され、新たに「大腸菌が検出されないこと」が追加になり同時に大腸菌の検査法が特定酵素基質培地法に統一された。特定酵素基質培地法では、培地に接種された検体中に大腸菌群が存在した場合、培地が黄変し、さらに大腸菌が存在した場合には紫外線照射下で培地が蛍光を発する。

今回、新しい水質基準に対応するために、我々が平成16年4月1日から飲料水の大腸菌検査に導入した特定酵素基質培地による検査において、大腸菌または大腸菌群陽性と判定された培養液中の腸内細菌科(Family *Enterobacteriaceae*)に属する細菌(以下、腸内細菌とする)について調査した。

調査は平成16年5~7月の間に、当分室で飲料水の水質基準適合検査の依頼を受けた380検体について実施した。特定酵素基質培地としてコリラート(アスカ純葉)を使用し、これに検体を接種して36°C24時間培養後、ONPG(ω-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)陽性培養液について、DHL寒天培地(日水)を用い常法¹⁾によって腸内細菌を分離培養した。培養後、分離培地上

の肉眼で形態が区別可能な集落の代表株各々1株を釣菌し、TSI培地、SIM培地、リジン脱炭酸試験用培地およびVP半流動寒天培地(栄研)に接種した。これらの培地による確認試験^{1, 2)}を実施するとともに、市販簡易同定キット(IDテストEB20、日水)を一部併用して分離株の属または種レベルまでを同定した。ONPG陽性かつ紫外線照射下で蛍光を認めたMUG(4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide)陽性培養液からの分離株は、すべてハートインヒュージョン寒天培地培養菌をコリラート培地に各々接種培養後、蛍光の有無を観察した。

供試した380検体中ONPG陽性は75検体(19.7%)、うち8検体(2.1%)がMUG陽性であった(表1)。すなわち、細菌学的項目が大腸菌群から大腸菌に変更されたことによって、当該項目での水質基準不適合の割合はおよそ10分の1に減少した。

表1 飲料水の大腸菌検査結果(平成16年5~7月)

検査結果*	検体数				
	5月	6月	7月	計	
ONPG陽性	MUG陽性	0	5	3	8
	MUG陰性	23	35	9	67
ONPG陰性	89	115	101	305	
合計	112	155	113	380	

*ONPG陽性且つMUG陽性は大腸菌陽性、その他は大腸菌陰性

ONPG陽性培養液75検体から釣菌した分離株数は118株で、同一検体から2, 3, 4, 5および6種類の複数の分離株を釣菌した検体数が各々17, 2, 3, 2および1検体あった。118株のうち106株が腸内細菌に同定され、残り12集落は*Aeromonas*属菌7株、*Pseudomonas*属菌1株および同定不能4株であった。同定できた114株について、ONPG陽性培養液のMUG結果別に一覧で示した(表2)。ONPG陽性且つMUG陽性培養液から分離された20株について、各々コリラート培地で培養をした結果、MUG陽性であった分離株は大腸菌(*Escherichia coli*)の7株だけで、MUG陽性が大腸菌の存在を証明できることを確認できた。

一方、今回の供試検体では8検体の培養液がONPG陽性かつMUG陽性で大腸菌陽性と判定されたが、そのうち2検体からは大腸菌が分離できなかった(表3)。このことは検体中の大腸菌の菌量が他の腸内細菌よりも少量であったことが理由と思われるが、ヒト等の哺乳動物の糞便汚染指標菌として高い指標性を有する大腸菌と混在する他の腸内細菌も、大腸菌と同様に指標菌としての有用

表2 ONPG陽性培養液から分離された菌種または菌属

菌種または菌属	ONPG陽性培養液	
	(MUG陽性)	(MUG陰性)
腸内細菌科菌		
<i>Cedecea</i> 属	1	
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	
<i>Citrobacter freundii</i>	3	8
<i>Citrobacter</i> 属	1	19
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	4
<i>Enterobacter amnigenus</i>		1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1
<i>Enterobacter sakazakii</i>		1
<i>Enterobacter</i> 属		8
<i>Escherichia coli</i>	7	
<i>Hafnia alvei</i>	2	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>		8
<i>Klebsiella ozaenae</i>		1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		8
<i>Klebsiella</i> 属		10
<i>Kluyvera ascorbata</i>		1
<i>Kluyvera cryocrescens</i>		3
<i>Proteus</i> 属	2	5
<i>Salmonella</i> BGIII		1
<i>Serratia ficaria</i>		1
<i>Serratia fonticola</i>		1
<i>Serratia liquefaciens</i>		1
<i>Serratia marcescens</i>		1
<i>Aeromonas</i> 属		
<i>Aeromonas caviae</i>		3
<i>Aeromonas hydrophila</i>		1
<i>Aeromonas sobria</i>		3
<i>Pseudomonas</i> 属	1	
計	20	94

性を無視できない場合があることを示唆するものと言えよう。従来の細菌学的項目であった大腸菌群にはこれらの腸内細菌も含まれることから、特に水道事業者でない一般家庭の井戸水等の水質検査においては、大腸菌群の検査結果を併せて提供することも検討すべき課題であると思われた。

(平成17年7月22日受理)

表3 大腸菌陽性培養液(ONPG陽性且つMUG陽性)からの分離株

番号	検体番号	分離月日	分離株
1	42	6月1日	<i>Pseudomonas</i> 属 <i>Enterobacter cloacae</i>
2	1	6月14日	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i>
			<i>Citrobacter</i> 属 <i>Escherichia coli</i>
3	11	6月14日	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i>
			<i>Proteus</i> 属
4	43	6月29日	<i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter freundii</i>
			<i>Proteus</i> 属
5	45	6月29日	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Citrobacter freundii</i>
6	23	7月26日	<i>Escherichia coli</i>
7	40	7月27日	<i>Escherichia coli</i>
8	59	7月27日	<i>Escherichia coli</i>

文 献

- 1) 善養寺浩, 坂井千三, 寺山 武, 工藤泰男, 伊藤 武: 腸管系病原菌の検査法, pp.24-96, 医学書院, 東京 (1985)
- 2) Edited by John G H et al: Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed., pp.175-192, Williams & Wilkins, Baltimore (1994)

他誌掲載論文抄録

(平成16年4月～平成17年3月)

マクロライド耐性肺炎マイコプラズマの分離と耐性株の遺伝子変異

岡崎則男, 大屋日登美 (神奈川県衛研), 成田光生 (札幌鉄道病院), 佐々木次雄 (国立感染研), 日本マイコプラズマ雑誌, 30, 82-84 (2004)

2001年～2002年に分離された肺炎マイコプラズマ14株を供試し, マクロライド系抗生物質8剤, リンコマイシンおよびテトラサイクリン系抗生物質2剤に対する感受性を調べた。その結果, 3株 (21.4%) が供試したマクロライド系抗生物質の全てあるいは一部に耐性であった。これらの耐性株の内, 2株は23S rRNA 遺伝子の2063位のアデニンがシトシン (A2063C) またはグアニン (A2063G) に置換していた。A2063C 株は供試した全てのマクロライド系抗生物質に高度の耐性を示し, A2063G 株は16員環抗生物質に対する耐性度が比較的低かった。しかし, 他の1株はこれらの位置には変異は見られず, 14員環抗生物質に中等度の耐性を示したもの, 16員環抗生物質には感受性であった。このように, 患者から分離された抗生物質耐性肺炎マイコプラズマはマクロライド交差耐性あるいは遺伝子変異において一様ではなかった。

Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan

(国内において患者から分離されたマクロライド耐性肺炎マイコプラズマの細菌学的性状と遺伝子解析)

松岡真由美 (国立感染研), 成田光生 (札幌鉄道病院), 岡崎則男, 大屋日登美 (神奈川県衛研), 山崎勉 (埼玉医科大学), 鈴木五三男, 安藤智暉 (茅ヶ崎市立病院), 見理剛, 佐々木裕子, 掘野敦子, 新谷三春, 荒川宜親, 佐々木次雄 (国立感染研), Antimicrob. Agents Chemother., 48, 4624-4630(2004)

日本では最近になってマクロライド耐性肺炎マイコプラズマが出現してきた。今回, 2000～2003年に国内3地域で分離された76株の肺炎マイコプラズマにつき, 薬剤感受性試験を実施したところ, 13株 (17.1%) がエリスロマイシン (EM) 耐性であった。これらの耐性株の内, 12株は高度耐性で, 1株は中等度耐性であった。耐性株の遺伝子変異を調べたところ, 10株が23Sr RNA 遺伝子

ドメインV領域の2063位が A から G (A2063G), 1株が A2064G そして中等度耐性を示した1株は C2617G の点変異が認められた。これらの菌株のリボゾーム蛋白L4およびL22遺伝子における変異は認められなかった。

また, 肺炎マイコプラズマの耐性に係わる遺伝子変異の検出法を検討したところ, PCR-RFLP 法により 23Sr RNA 遺伝子 A2063G, A2063C, A2064C および C2617G の変異が検出可能となった。

Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the World Health Organization Western Pacific Region, 2003

(2003年の WHO 西太平洋地区淋菌薬剤感受性サーベイランス)

John Tapsall (The Prince of Wales Hospital オーストラリア), Haji Mohamad Haji Kassim (ブルネイ), Yin Yue Ping and Su Xiaohong (中国), P Kumar and S Singh (フィジー), KM Kam (香港), Yuko Watanabe and Masatoshi Tanaka (日本), K Lee and Y Chong (韓国), T Phouthavane (ベトナム), B Garin, (ニューカレドニア), M Brokenshire, (ニュージーランド), C Manesikia, (パプアニューギニア), CC Carlos, D Agdamag (フィリピン), Cecilia Ngan (シンガポール), Commun Dis Intell, 29, 62-64 (2005)

WHO 西太平洋地区淋菌サーベイランスは2003年に13カ国, 約11,250株の淋菌について, PC, CPFX, SPCM, TC, CTRX の薬剤感受性調査を行った。これまでと比べ耐性パターンに大きな変化はなかったが, PC は各国で 5.5%～100% の耐性菌を検出し, CPFX はパプアニューギニアを除く各国で 5.7%～98.6% の耐性菌を検出した。SPCM 耐性株は中国で少数の報告があったのみであった。高度耐性 TC はニューカレドニア以外各国で 0.3%～58.5% の検出率であった。オーストラリア, ニュージーランド, 中国, 韓国, ブルネイから少数の CTRX (第3世代セファロスポリン系薬剤) の薬剤感受性低下株の報告があり, 地域内で分離される淋菌の治療薬剤の選択肢はますます制限されてきている。

Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1974 to 2003 in Japan by multilocus sequence typing.

(わが国において1974～2003年に分離された髄膜炎菌株の multilocus sequencing typing 法による特徴)

Hideyuki Takahashi, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Hiroshi Tanaka, Hiroo Inouye, Shiro Yamai and Haruo Watanabe, J Med Microbiol, 53 (Pt 7), 657-662 (2004)

わが国で過去30年に分離された髄膜炎菌株182株の血清型別と multilocus sequencing typing (MLST) 法による解析を行った。血清型別では、B 群が103株ともっとも頻度が高く、次いで Y 群の39株であった。MLST 法による解析では65タイプが見出されたが、42タイプはわが国に固有のタイプであった。

Reliability of the detection of meningococcal γ -glutamyl transpeptidase as an identification marker for *Neisseria meningitidis*.

(髄膜炎菌の鑑別マーカーとしての γ -グルタミルトランスペプチダーゼ検出の信頼性)

Hideyuki Takahashi, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Surang Dejsirilert, Leelaowadee Saengsuk, Shiro Yamai and Haruo Watanabe, Microbiol. Immunol, 48, 485-487 (2004)

髄膜炎菌の γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性が鑑別に利用されているが、活性が欠落した株を健康保菌者から分離した。さらに、これまでに収集した245株のうちさらに2株の活性欠落株を見出した。したがって、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性を利用した鑑別法の信頼性は98.8%であった。

イムノクロマトグラフィー法によるインフルエンザウイルス迅速診断キットの評価

山崎雅彦 (座間小児科診療所), 三田村敬子 (川崎市立川崎病院), 清水英明 (川崎市衛研), 小林米幸, 小林紫英 (小林国際クリニック), 木村和弘, 市川正孝, 辻山 修 (伊勢原協同病院), 渡邊寿美, 今井光信 (神奈川衛研), 川上千春 (横浜市衛研), 長 秀男 (川崎市立川崎病院), 菅谷憲夫 (神奈川県警友会けいゆう病院), 感染症誌, 79, 29-30(2005)

金コロイド標識したモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト法を原理とするインフルエンザウイルスの迅速診断キット「ラピッドテスター FLU II」の精度について検討した。2004年1月から3月の間にインフルエンザ様症状で受診した患者について初診時の鼻腔検体（拭い液あるいは吸引液）を採取し、本キットとウイルス分離の結果

を比較したところ、検出率は従来の試薬とほぼ同等であった。本キットは、特異度が高く偽陽性が極めて少ないという利点があると考えられた。

A Case of Symptomatic Primary HIV Infection

(発疹等の症状を示した HIV 初期感染の症例)

小林里実, 瀬川聰子, 川島 眞, 井戸田一朗 (東京女子医大), 嶋 貴子, 今井光信 (神奈川衛研), The Journal of Dermatology, 32, 2, 137-142 (2005)

30歳の同性愛者である日本人男性が、熱・不快感・食欲不振・のどの痛みが14日間続き受診した。麻疹様の発疹が顔と胴体と臼歯に、白っぽい発疹が頬と口内に見られ、また皮膚に発疹ができる前に下痢と目のわずかな充血が4日間続いていた。受診時、HIV RNA は血清中に 5.8×10^6 コピー／mlと高値を示した。脳脊髄液ではHIV RNA は5488コピー／mlであり、無菌性髄膜炎を示した。入院の5日目、皮膚発疹が見られた7日目にセロコンバージョンを示し、WB 法で Gp160 と p24 抗体が見られた。結局、熱は3週間、皮膚発疹は12日間続いた。組織病理学的に、単球の浸潤が CD8+T リンパ球が優勢に、小さな導管と汗腺を囲んだ上部真皮で見られた。さらに、CD1a+樹状細胞は血管から濾過されており、CD8+ と CD4+T リンパ球を取り囲んでいた。In situ hybridization 法では、皮膚生検標本からは HIV 抗原は検出できなかった。皮膚における CD8+T リンパ球と CD1a+樹状細胞の相互作用が急性 HIV 感染での皮膚顕現を引き起こす可能性が示唆された。

保健所での検査・予防活動

中瀬克己 (岡山市保健所), 嶋 貴子, 今井光信 (神奈川衛研), 日本エイズ学会誌, 6, 3, 118-122 (2004)

「後天性免疫不全症候群に関する特定感染症予防指針 (平成11年10月)」に基づき、これまでのわが国におけるエイズ対策の考え方や国の施策としての HIV 検査と予防対策の方向性について解説した。また、エイズ対策の取り組みの現状として、保健所における HIV 検査、保健所 HIV 検査への即日検査の導入、特定施策層への予防対策と NGO との連携および岡山市で行っている HIV 検査と予防施策等について紹介した。

HIV の検査法

今井光信, 嶋 貴子, 須藤弘二, 近藤真規子 (神奈川衛研), 小児内科, 37, 3, 311-315 (2005)

HIV 感染の検査法は抗体検査を中心に、抗原検査、核酸増幅検査も含め、その時代の先端技術を応用して急速な進歩を遂げてきた。しかしその一方で、HIV 感染の広が

りは世界的規模で進んでおり、日本においても毎年報告されるHIV感染者数は増加の一途をたどっている。このため、感染者の早期発見・早期ケアと感染拡大防止の両面から、HIV検査のあり方、特に保健所等でのHIV無料検査のあり方が注目され、さまざまな試みがなされている。近年、HIV抗体迅速検査法が開発されたことから、結果を即日に返却可能な「HIV即日検査」が可能となつた。また、核酸増幅検査を用いることにより、HIV抗体上昇前の感染初期HIV感染の検出が可能となっている。これらのHIV検査法の進歩を概説すると共に、それら検査法の導入による、保健所等でのHIV検査体制の充実・強化の試みについて紹介し、今後の課題等について解説した。

水の消毒に用いる塩素の水環境への排出実態と生態系への影響

竹田茂(神奈川衛研)、防菌防黴, 32, 10, 515-522(2004)

水の消毒には塩素系薬剤が一般に用いられている。塩素は安価で消毒効果の持続性が高いなどの特長を有するが、発ガン性が指摘されるトリハロメタンや全有機ハロゲン化合物などを生成するとともに、河川等に塩素が残留すると水生生物への影響も無視できない。そこで、生活排水処理施設から公共用水域へ流入する残留塩素やトリハロメタン等の排出実態を明らかにするとともに、塩素消毒処理水が魚類、海藻などに及ぼす影響や変異原性による毒性などを総合的に評価し、低減策を提案した。特に、処理施設放流水中の残留塩素やトリハロメタン生成量を抑制する方策として、生物処理工程での硝化を行なう運転操作技術の導入による塩素注入量の低減効果、塩素剤使用量を抑えるために開発した消毒設備の実証試験効果などについて述べた。

特定原材料(牛乳)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(株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)、高畠能久、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, 45(3), 128-134(2004)

衛誌, 45(3), 120-127(2004)

特定原材料である牛乳タンパク質測定のELISA法の確立のために10機関による検証評価試験を行った。カゼイン、 β -ラクトグロブリンおよび牛乳タンパク質を測定する3種ELISAとも同時再現性はおおむねCV値10%以下と良好であった。10機関で牛乳標準溶液を添加した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法とも数種類の食品抽出液を除きおおむね40%以上であった。しかし、カゼインキットでは、回収率が極端に低いソースの抽出液の場合、抽出液のpHを中性に調整した後に測定すると回収率が改善された。また牛乳エライザキットでは、クッキー、シリアル、パスタソースの抽出液において、回収率が低かったが、プレート上の抗体量を増加させることにより改善された。3種類のELISA法の検出限界は、測定溶液の濃度で1ng/mLであった。

特定原材料(小麦)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(株日清製粉グループ本社)、水口岳人、吉川礼次((財)食品環境�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)、高畠能久、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, 45(3), 128-134(2004)

特定原材料である小麦タンパク質測定のELISA法の確立のために10機関による検証評価試験を行った。グリアジンおよび小麦タンパク質を測定する2種ELISA法とも同時再現性はおおむねCV値10%以下と良好であった。10機関で小麦標準溶液を添加した5食品の各食品抽出液を分析した際の平均回収率は、2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16~26.9%, 3.7~36.2%であり、室間再現性の相対標準偏差はそれぞれ21.6~38.5%, 29.7~53.8%であり、ELISA測定としては実用上支障がないと考えられた。小麦エライザキットのプレートに結合した抗体量を増加した結果、回収率が低かったシリアルで添加回収率が改善された。

2種類ELISA法の検出限界は、測定溶液の濃度で

1ng/mL であった。

特定原材料（落花生）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 (株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), 高畠能久, 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, 45(6), 325-331(2004)

特定原材料である落花生の通知試験法 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。落花生タンパク質を測定する2種 ELISA とも同時再現性はおおむね CV 値10%以下と良好であった。10機関で落花生標準溶液を添加した4食品の各食品抽出液を分析した際の平均回収率は、2種 ELISA 法とも50%以上であり、併行再現性の相対標準偏差は、それぞれ15.2~49.7%, 3.0~28.3% であり、室間再現性の相対標準偏差はそれぞれ 23.5~44.4%, 9.6~28.4% であり、ELISA 測定としては実用上支障がないと考えられた。2種類の ELISA 法の検出限界は、測定溶液の濃度で2~2.5ng/mL であった。

特定原材料（そば）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 (株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), 高畠能久, 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, 45(6), 313-318(2004)

特定原材料であるそばタンパク質測定の ELISA 法の確立のために10機関による検証評価試験を行った。そば

タンパク質を測定する2種 ELISA とも同時再現性はおおむね CV 値10%以下と良好であった。10機関でそば標準溶液を添加した3食品の各食品抽出液を分析した際の平均回収率は、2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6.8~78.5%, 5.0~33.9% であり、室間再現性の相対標準偏差はそれぞれ 11.9~69.5%, 16.5~34.1% であり、ELISA 測定としては実用上支障がないと考えられた。2種類の ELISA 法の検出限界は、測定溶液の濃度で1ng/mL であった。

いわゆる“ケミカルドラッグ”の現状 一標示名称と含有成分の相違

小島 尚, 宮澤真紀, 土井佳代 (神奈川衛研), 高柳栄郎, 清水 明 (神奈川県衛生部薬務課), 中毒研究, 18, 83-85 (2005)

インターネット上のホームページで販売されていた “ケミカルドラッグ”について質量分析及び各種クロマトグラフィーにより試験を行ったところ、3検体は標榜する名称とは異なる化合物が検出された。そのうち、2検体は標榜する化合物と含有していた化合物とが異なり、1検体は1種類の化合物を標榜していたが、2種類の化合物を検出した。これらの化合物の生体に及ぼす作用は不明なものが多いため、危険性や相乗作用による有害性等に関する情報もほとんどない。今後も脱法ドラッグの理化学分析及び動物実験を通じて科学的な検証を行い、健康被害や薬物乱用を防止に役立つように努めたい。

Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandical hyperglycemia in normal rats.

(正常ラットの糖負荷試験における桑葉抽出物の血糖上昇阻害作用について)

宮原知江子 (元神奈川衛研), 宮澤真紀, 佐藤修二 (神奈川衛研), 酒井案理, 水崎茂揚 (豊玉香料(株)), J.Nutr.Sci.Vitaminol., 50, 161-164 (2004)

桑葉のエタノール抽出物 (ME) の食後血糖上昇阻害効果について、Wistar ラットを用い研究した。炭水化物の摂取0.5時間前に ME を投与すると、用量依存的に血糖の上昇を阻害し。ME の ED₅₀ は、スクロース投与時 0.11g/kg, マルトース投与時 0.44g/kg 及びスターチ投与時 0.38g/kg であった。ME のラット小腸由来二糖類分解酵素の阻害率 (IC₅₀) は、sucrase 3.2 μg /mL, isomaltase 10 μg /mL 及び maltase 51 μg /mL であった。ME をイオン交換樹脂処理した 1-deoxynojirimycin が含有される画分 (MB) では、IC₅₀ は sucrase 0.36 μg /mL, isomaltase 1.1 μg /mL 及び maltase 6.2 μg /mL であった。精製した 1-deoxynojirimycin の IC₅₀ は、血糖降下葉

である voglibose と同程度だった。以上のことから、ME は、二糖類分解酵素の活性を阻害することによって引き起こされる強い食後血糖上昇阻害作用を有することが明らかになった。

Tumor-Promoting Activity and Mutagenicity of 5 Termiticide Compounds

(防蟻剤関連 5 種の化合物の発癌プロモーター活性および変異原性の検索)

後藤純雄（国立環境研究所）、浅田 晋（（財）食品薬品安全センター秦野研究所）、伏脇裕一、森 康明（神奈川衛研）、田中憲穂、梅田 誠（（財）食品薬品安全センター秦野研究所）、中島大介（国立環境研究所）、武田 健（東京理科大学薬学部）、J. UOEH（産業医大雑誌），26, (4), 423-430(2004)

防蟻剤に関する市販 5 種の化合物の発がんプロモーター活性を、BHAS42 細胞を用いた形質転換フォーカス形成試験で測定した。同時にイニシエーター活性（変異原性）を Ames 法の変法であるマイクロサスペンジョン法で測定した。その結果、形質転換フォーカス形成試験では、フェニトロチオン、シラフルオフェン、ビフェントリンで発がんプロモーター活性が認められた。その活性の強さは、フェニトロチオン > シラフルオフェン > ビフェントリンの順になった。一方、変異原試験では S421 とフェニトロチオンに変異原性が認められた。また、それぞれの活性はあまり高くはなかったが、S421 > フェニト

ロチオンとなった。2 段階発がんのメカニズム等を考慮すると、両活性を示したフェニトロチオンや発がんプロモーター活性及びイニシエーター活性を単独で示した化合物でもそれらの同時使用や長期曝露は極力避ける必要があることが示唆された。

Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation

(ミクロシスチン-LR の微生物分解により生成した Adda の同定)

原田健一、今西 進、加藤 創、水野雅義（名城大学）、伊藤恵美子（千葉大学）、辻 清美（神奈川衛研）、Toxicon, 44, 107-109 (2004)

自然界から分離した *Shingomonas* B-9 株によるラン藻類が産生する有毒化合物ミクロシスチン-LR の分解を検討した。分解生成物を単離し、ESI-LC/MS/MS 等により構造解析を行ったところ、分解生成物としてミクロシスチン-LR 特有の構成アミノ酸である Adda がそのまま単離された。B-9 株細胞抽出液によるミクロシスチン-LR の分解は中間体として直鎖状ミクロシスチン-LR とテトラペプチドを生成し、最終的には Adda を生成することが判明した。Adda はマウスへの毒性及びプロテインフォスファターゼ阻害活性がミクロシスチン-LR に比べ、顕著に減少しており、分解によって無毒化されたと考えられる。

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health (Bull. Kanagawa
Ins. of P. H.) is an official periodical on 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. 35(September, 2005)

CONTENTS

Short reports

Examination about an Effective Search Method of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in an Outbreak of Diarrheal Disease
Rieko SUZUKI, Tomoe ISHIHARA, Yoshie MIYAKE, Toshiro KUROKI
Takanori TAKAHASHI and Takayasu NIKKAWA

Detection of Influenza Virus and *Paramyxoviridae* from Influenza -like Illness
Sumi WATANABE, Takayuki SAITO and Takayasu NIKKAWA

Detection and Genetic Analyses of Viruses in Gastroenteritis Outbreaks
Yumiko FURUYA, Takashi KATAYAMA, Yoshimi DATE
Takanori TAKAHASHI and Takayasu NIKKAWA

Analysis of Aflatoxins in Foods Using Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry
Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI and Michiko KISHI

Determination of Volatile Organic Compounds in Glue for Household Use
Fumi NAKANO, Kazuo HASEGAWA, Kiyomi TSUJI
and Yuichi FUSHIWAKI

Evaluation of Diffusion Sampler for Determination of VOC in Indoor Air
by Field Examination
Kiyomi TSUJI, Kazuo HASEGAWA and Yuichi FUSHIWAKI

Data

Occurrence of Tsutsugamushi Disease in Kanagawa Prefecture (2004)
Takashi KATAYAMA, Yumiko FURUYA, Takanori TAKAHASHI
and Takayasu NIKKAWA

Determination of Catechins, Caffeine and Theanine in Chinese Tea Brouse by Internet
Hiroko KISHI, Hisayo TSUCHIYA and Kuni HIRAYAMA

Investigation on the Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified Foods in Kanagawa Prefecture (2004)
Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA, Hiroko KISHI,
Toshiharu YAMADA and Kuni HIRAYAMA

Case Studies of Contaminations of Foreign Matters in Food
Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA, Hiroko KISHI,
Toshiharu YAMADA and Kuni HIRAYAMA

Investigation of Family *Enterobacteriaceae* in ONPG Positive Cultured from Drinking Water Tested for *Escherichia coli*
Yoko YAMAMOTO, Rie YUKAWA, Tamaki ISHINO
and Tadayuki OKITSU

Abstracts of original papers by research staffs (June, 2004 - May, 2005)
