



神奈川県衛生研究所研究報告

第37号（平成19年9月）

目次

原著

化学物質による健康危害防止に関する調査研究

水道原水の塩素処理過程における農薬の分解

渡辺貞夫, 上村 仁, 村上和雄…………… 1

短報

感染症の監視と予防に関する調査研究

結核接触者健診における新しい感染診断法クオンティフェロン® TB-2Gの利用について

大屋日登美, 岡崎則男, 高橋智恵子, 渡辺祐子, 尾上洋一,
新川隆康, 今井光信…………… 6

「腸管出血性大腸菌O157及びO26検査実施標準作業書」作成のための基礎的検討

鈴木理恵子, 永井 裕, 原みゆき, 小松祐子, 小泉明子, 小儀國太郎…………… 9

食の安全・安心を確保するための調査研究

清涼飲料水原材料からのカビの分離と分離カビの耐熱性について

相川勝弘, 浅井良夫, 尾上洋一…………… 12

誘導結合プラズマ発光分光分析装置による清涼飲料水における重金属の分析

赤星 猛, 藤巻照久…………… 16

ミネラルウォーター中の全有機炭素(TOC)の分析方法の検討

岩淵真樹, 長谷川一夫…………… 20

市販鶏肉におけるカンピロバクター・ジェジュニの汚染状況および分離菌株の解析

古川一郎, 伊達佳美, 相川勝弘, 浅井良夫, 尾上洋一…………… 24

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穀類中のカビ毒, デオキシニバレノールの分析

甲斐茂美, 赤星 猛, 藤巻照久…………… 28

輸入食品中の着色料, スーダン, パラレッドの分析

岸 弘子…………… 31

チューインガム中の品質保持剤, プロビレングリコールの分析

岸 弘子, 関戸晴子…………… 35

精度管理における保存料検査の問題点

関戸晴子, 山崎直美, 藤本玲子, 市川晴貴, 須賀顕子…………… 38

県内流通遺伝子組換え食品の分析結果(平成18年度)

ーパパイヤ, トウモロコシおよび大豆の組換えDNA検査結果ー

大森清美, 土屋久世, 渡邊裕子, 関戸晴子, 岸 弘子, 山田利治…………… 41

食品中異物の検査方法および結果について(平成17年度・18年度)

大森清美, 渡邊裕子, 関戸晴子, 岸 弘子, 土屋久世, 山田利治…………… 45

アレルギーに関する調査研究

コナヒョウヒダニが生産するアレルゲンDer f 1量の測定とその安定性の評価

稲田貴嗣, 竹田 茂…………… 50

食品中のアレルギー物質検査における精度管理の検討ーI 酵素免疫測定法(ELISA)による定量

渡邊裕子, 児玉千絵, 関戸晴子, 津田啓貴, 宮沢啓貴,
渡部健二郎, 田中幸生, 山田利治…………… 53

公衆衛生における統計学的手法の検討ー食物アレルギーによるアンケート集計を題材にしてー

佐藤善博, 板垣康治, 中村廣志…………… 56

化学物質による健康危害防止に関する調査研究

相模川水系河川水中の医薬品類の分布

上村 仁…………… 60

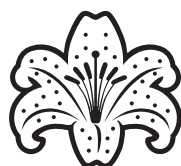
感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県域における病原微生物の検出動向（2002年～2006年）	
折原直美，佐藤善博	65
神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（平成18年度）	
石原ともえ，伊東久美子，黒木俊郎	68
県域の散発性下痢症患者から分離されたカンピロバクターの性状（平成18年度）	
伊東久美子，石原ともえ，黒木俊郎	70
神奈川県におけるウイルス性胃腸炎の集団発生状況（平成18年度）	
宮原香代子，原田美樹，片山 丘，古屋由美子	72
感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成18年度）	
片山 丘，宮原香代子，古屋由美子	75
神奈川県におけるつつが虫病の発生状況（平成18年度）	
古屋由美子，片山 丘	78

食の安全・安心を確保するための調査研究

食品汚染物質残留実態調査結果（平成18年度）－動物用医薬品，カビ毒，農薬，重金属等－	
佐藤久美子，赤星 猛，林 孝子，甲斐茂美，中村廣志， 藤巻照久	81

他誌掲載論文抄録（平成18年4月～平成19年3月）	85
---------------------------	----



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所研究報告編集委員（平成19年度）

今 井 光 信（委員長）	増 田 友 克
田 村 哲	佐 藤 善 博
高 橋 智恵子	古 屋 由美子
甲 斐 茂 美	熊 坂 謙 一
佐 藤 利 明	長 田 幸 郎（事務局）

神奈川県衛生研究所研究報告第37号

平成19年9月発行

編 集	神奈川県衛生研究所
発 行	〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1 TEL 0467-83-4400
印 刷	有限会社 長谷川印刷 〒232-0017 横浜市内南区宿町2-38 TEL 045-711-5286

原著

水道原水の塩素処理過程における農薬の分解

渡辺貞夫¹, 上村 仁¹, 村上和雄²

Degradation of pesticides by chlorination on the process of water treatment for drinking

Sadao WATANABE¹, Hitoshi UEMURA¹ and Kazuo MURAKAMI²

Synopsis

WATANABE, S., H. UEMURA (Kanagawa Ins. of P. H. Lab., 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki 253-0087, Japan) and K. MURAKAMI (Tokyo Kasei University). Degradation of pesticides by chlorination on the process of water treatment for drinking.

Decomposition of 17 pesticides by chlorination was investigated, because 17 pesticides were detected in 2004 by monitoring the Sagami River, which is the tap water source. It classified them into six categories by decomposition difficulties. Pesticides which belonged to the category to hardly degrade by chlorination were detected in the tap water in 2005, therefore these results obtained by the laboratory tests are able to apply to the field samples. The organophosphorus pesticides such as diazinon and fenitrothion were detected in the raw water, on the other hand those oxons were detected in the tap water. It was thought that these oxons were transformed from their originals by chlorination on the water purification processes and considerably steady at the residual chlorine level of 1 mg/l or less.

Key Words : pesticide, chlorination, tap water, organophosphorus pesticide, oxon

はじめに

平成16年の水質基準の改訂により、農薬は新たに水質管理上留意すべき項目として水質管理目標設定項目と位置づけられ、対象は101農薬となった¹⁾。この中から地域の特性を考え優先度の高い農薬を選定し、測定することとなっている。神奈川県では相模川、酒匂川水系が主要な水道水源として利用されているが、流域の水田、畑地で使用された農薬による水源汚染、さらには水道水汚染²⁻⁵⁾が危惧される。水道水は、消毒効果を維持するため給水栓水で遊離残留塩素を0.1mg/l以上保持するように定められている⁶⁾。この塩素処理が最近新たな問題として考えられている。分子内にP=S基を有するチオノ型

有機リン系農薬は、塩素処理により一般的にオキソン体と呼ばれるP=O基に変化するのである⁷⁾。有機リン系農薬の毒性については、急性毒性であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性阻害がよく知られているが、P=S基がP=O基に変化したオキソン体は、AChE活性阻害が原体よりも数百～数千倍も強くなることが報告されている⁸⁾。著者らは、寒川取水堰上流1Km地点の相模川で、平成16年5月～8月に91農薬の実態調査を行い、チオノ型有機リンのダイアジノン及びフェントロチオンを含んだ計17農薬が0.01～1.3 μg/lの範囲で検出されたことを報告した⁹⁾。今回、これら17農薬について、塩素処理による分解性を検討した。さらに、ダイアジノン及びフェントロチオンのオキソン体については生成段階及び生成後の消長について十分には明らかとなっていないので、この点についても詳細に検討した。

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
watanabe.9z38@pref.kanagawa.jp

2 東京家政大学 環境情報学科

方 法

1. 試薬及び調製法

1.1 塩素処理による分解実験対象農薬

平成16年に相模川で検出されたモリネート、フェノブカルブ、シマジン、ダイアジノン、イプロベンホス、ブロモブチド、シメトリン、フェニトロチオン、エスプロカルブ、フェンチオン、フルトラニル、イソプロチオラン、チオベンカルブ、プレチラクロール、メフェナセツト、カフェンストロール及びカルボフランの計17農薬を対象とした。

1.2 農薬標準品

1.1に示した17農薬、ダイアジノンオキソン及びフェニトロチオンオキソンは、和光純薬工業（株）あるいは林純薬（株）の農薬標準品を使用した。

1.3 塩素処理実験用の農薬混合溶液の調製

17農薬の中でカルボフランを除いた16農薬について、各10mgを10mlのメスフラスコに採り、アセトンに溶かして10mlとし、1000mg/lの標準原液を調製した。標準原液について、各5mlを100mlのメスフラスコに採り、アセトンで100mlに調製して50mg/lの16種の混合溶液を調製した。カルボフランはLCによる測定のため、これとは別にアセトンに溶かし、濃度1000mg/lの標準原液を調製した。

1.4 リン酸緩衝液

リン酸二水素カリウム0.136gを精製水1lに溶かし、1N水酸化ナトリウム溶液でpHを7.0±0.2に調整し、これをリン酸緩衝液とした。

1.5 次亜塩素酸ナトリウム溶液

和光純薬工業（株）の食品添加物用試薬を精製水で100倍に希釈して用いた。なお、この100倍希釈溶液はDPD法⁶⁾により遊離残留塩素濃度を確認したところ、120mg/lであった。

1.6 DPD試薬及びDPD法用リン酸緩衝液

関東化学（株）の製品を用いた。

2. 装置及び測定条件

2.1 GC-MS

装置：5973/6890（ヒューレット・パッカード社製）
カラム：DB-5MS（内径0.25mm，長さ30m，膜厚0.25μm，J & W Scientific社製）

カラム温度：50℃（2分間保持）－（10℃/分昇温）－170℃－（2.5℃/分昇温）－220℃－（10℃/分昇温）－300℃（5分間保持）

注入口温度：250℃

キャリアーガス：1.5ml/分（ヘリウム）

注入量：2μl（スプリットレス）

2.2 LC

装置：2695（Waters社製）

カラム：Symmetry RP-18（内径2.1mm，長さ150mm，粒径5μm，Waters社製）

カラム温度：35℃

移動相：水/アセトニトリル（1:1）

流速：0.3ml/分

注入量：5μl

検出器：PDA

3. 塩素処理実験

1.3で調製した50mg/lの16種農薬混合溶液1mlを1lのビーカーに採り、ドラフト内で減圧下により乾固後、リン酸緩衝液500mlを加え、5分間超音波発生装置を用いて溶解し、塩素処理実験用の試料溶液とした。

ビーカーから95ml，98ml及び99mlを別々の100mlの共栓付三角フラスコに採り、100倍に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液（遊離残留塩素120mg/l）を5ml，2ml及び1ml加え，全量を100mlとし，それぞれ6mg/l，2.4mg/l及び1.2mg/lの遊離塩素濃度溶液とした。この容器を軽くしんとした後，設定時間（1分，2分，5分，10分，30分，2時間，4時間，24時間及び48時間）後に4ml分取し，あらかじめアスコルビン酸ナトリウムを0.01g程度加えてある10mlの共栓試験管に採った。素早く振とうして残留塩素を消去後，ジクロロメタン2mlを加え1分間激しく混和した。しばらく静置後，下層のジクロロメタン層1mlをマイクロピペットで分取し，GC-MSで16農薬及び2種類のオキソン体濃度を測定した。これら16農薬は，乾固後に加えられたリン酸緩衝液中に超音波による溶解操作によりほぼ100%移行し，かつオキソン体を加えた18種類はジクロロメタンによる抽出操作によりいずれも大部分ジクロロメタン相に移行することは事前に確認した。また，実験中は必要に応じて残留塩素をモニターした。なお，実験は開始後10分まで室温で，それ以降は20℃の恒温槽に静置して行った。カルボフランについては，アセトンに溶解した1000mg/l濃度の標準原液0.5mlをドラフト内で乾固後，500mlのリン酸緩衝液500mlに溶解し，濃度1mg/lの塩素処理実験用の試料溶液を調製した。塩素処理実験は，16農薬の場合に準じて行い，設定時間ごとに1mlを分取した。アスコルビン酸ナトリウムにより残留塩素を消去後，アセトニトリル1mlを加えLCにより測定した。

結果と考察

1. 塩素処理による農薬の分解

残留塩素濃度が1.2，2.4及び6.0mg/lとなるように添加された条件下でのモリネートの濃度変化をFig.1に示した。添加された残留塩素濃度が高くなるに従ってモリネ

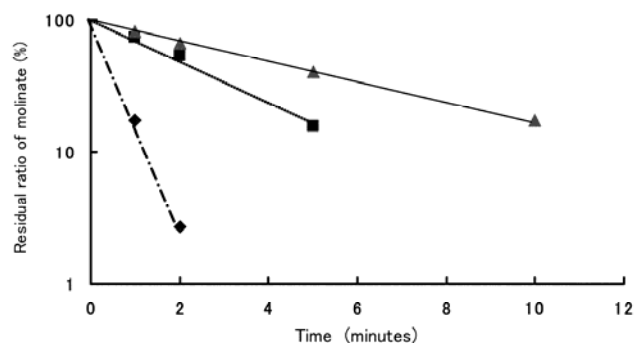


Fig.1 Profiles of the residual ratio of molinate in chlorination. Chlorine concentrations added initially were as follows:
◆: 6mg/l, ■: 2.4mg/l, ▲: 1.2mg/l

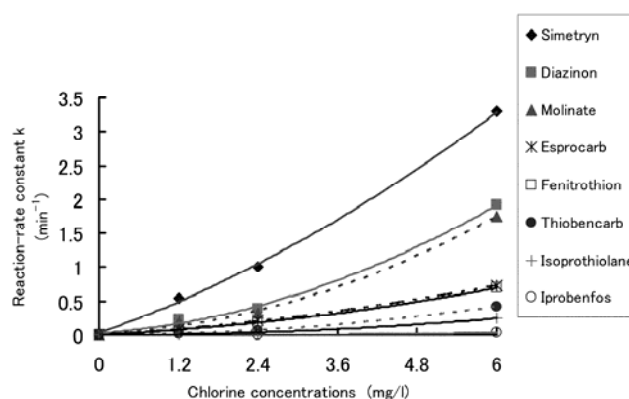


Fig.2 Relation between the reaction-rate constant k and the chlorine concentrations

Table 1 Degradation of 17 pesticides by chlorination

Name	Classification by chemical structure	Category
Simetryne	Triazine	I
Fenthion	Organophosphorous (P=S)	I
Molinate	Thiocarbamate	II
Diazinon	Organophosphorous (P=S)	II
Fenitrothion	Organophosphorous (P=S)	II
Esprocarb	Thiocarbamate	II
Thiobencarb	Thiocarbamate	II
Iprobenfos	Organophosphorous (P=O)	III
Isoprothiolane	Other	III
Flutolanil	Acid amid	IV
Pretilachlor	Acid amid	V
Fenobucarb	Carbamate	VI
Simazine	Triazine	VI
Bromobutide	Acid amid	VI
Mefenacet	Acid amid	VI
Cafenstrole	Acid amid	VI
Carbofuran	Carbamate	VI

*1 Chlorine concentration: Chlorine was added at the level of 2.4mg/l initially, and 1.4mg/l and 0.5 mg/l of chlorine were detected 4 hours later and 48 hours later, respectively.

*2 Pesticide concentration: Each concentration of the pesticides was at the level of ca. 0.1mg/l initially, except for the case of carbofuran was at the level of 1mg/l.

*3 Category: Category was divided as follows: Elapsed time of which the initial level of pesticide reduced to half.

I: within one minute, II: one minute~10 minutes, III: 20 minutes~10 hours, IV: 24 hours~48 hours, V: over 48 hours, VI: not decomposable by chlorination

ートの濃度低下が速くなることが認められた。縦軸はモリネートの残留率を対数化して表しており、この値が一次直線に従って減少していくことが認められた。そこで、モリネート濃度の半減に要した時間を半減時間 $T_{1/2}$ と表すと、 $T_{1/2}$ は分解速度定数kを用いて次式で表される。

$$T_{1/2} = (1/k) \ln 2 \quad (1)$$

ここで、計算上 $\ln 2$ を簡易的に0.693とすると、

$$k = 0.693 / T_{1/2} \quad (2)$$

となる。なお、残留塩素濃度は農薬分解に伴い減少していくため、実験初期の各農薬の減少率を図より求め、その傾きから計算した半減時間 $T_{1/2}$ と(2)式より分解速度定数kを計算により求めた。分解速度定数kと添加された遊離残留塩素濃度の関係をFig.2に示した。この結果、分解が認められた農薬はいずれも残留塩素濃度の2乗で分解速度定数kの値が大きくなり、分解速度が速くなることが認められた。なお、フェンチオンは遊離塩素添加1分後には検出限界以下となり半減時間 $T_{1/2}$ の算出は不可能であった。一般的に、浄水処理に用いられる塩素ガスあるいは次亜塩素酸ナトリウムも、水に溶けて生じた次亜塩素酸イオンなどによる酸化力が殺菌作用を有すると考えられる⁹⁾。塩素処理による農薬分解は、この酸化力以外にもハロゲン化などが考えられる。そこで、分解性を評価するカテゴリーとして分解の難易度により6グループに分け、Table 1に示した。

塩素分解性についてTable 1に示したような分子構造別で評価すると、酸アミド系に属するプレチラクロール、フルトラニル、プロモプチド、メフェナセツ及びカフェンストロールはカテゴリーIV~VIに属し、比較的分解を受けにくいことが認められた。新井ら¹⁰⁾は、101農薬を対象とする分子構造別の塩素分解性を検討し、酸アミド系の8農薬について、24時間後の残留率が50-90%が4農薬、90%以上が4農薬と報告している。塩素処理濃度など実験条件が少し異なるが、本実験と似たような結果であった。トリアジン系に属するシメトリン及びシマジンを比較すると、シメトリンは速やかに分解し、一方シマジンは分解が認められなかった。トリアジン環に付いた置換基の1つが、シメトリンはSCH₃基、シマジンはCl基の化学構造の差だけの違いであるので、SCH₃基の

部位が酸化に対して弱く、分解性に差が生じたと考えられた。

チオカーバメート系に属するモリネート、チオベンカルブ及びエスプロカルブはいずれもカテゴリーⅡに属し、カルバメート系のフェノブカルブ及びカルボフランはカテゴリーⅥに属し、本実験結果からは基本骨格が塩素分解性に強く係わるような結果が得られた。しかし、新井ら¹⁰⁾の実験結果では、カルバメート系11農薬について、非常に分解しやすいものと、分解し難いものとが混在しており、単純に基本骨格から分類したカテゴリーでは分類できないが、分子内にS（イオウ）を持つ化合物は分解しやすいという報告は本実験結果にも当てはまると考えられる。しかし、残留塩素による分解は、酸化反応、ハロゲン化反応などであるが、さらに実験条件である水溶液のpHにより分解性が異なることから¹⁰⁾、農薬個々についてデータを蓄積する必要があると考えられた。

2 有機リン系農薬の塩素処理によるオキシソニ体化

今回、Table 1に示したP=S型有機リン系農薬は3種類あったが、フェンチオンは塩素処理ではP=S基ではなく、ベンゼン環に結合したSCH₃基のS部位が酸化されやすく、残りの2種類はオキシソニ体へと変化する¹¹⁾。ダイアジノンについて、Fig.3に残留塩素の添加量を2.4mg/lとした場合の結果を示した。ダイアジノンの減少とともにオキシソニ体の生成が認められた。ダイアジノンは10分間で検出限界以下となり、生成したオキシソニ体は原体に換算すると90%程度であった。4時間経過後の残留塩素は1.4mg/lで、48時間後は0.5mg/l残存しており、生成したオキシソニ体は48時間後でも70%程度の残存が認められた。ダイアジノン及びオキシソニ体のモルで表した合計値は、ダイアジノンの消失する10分間について、この値がほぼ一定であることから、P=S基からP=O

基へ1:1の比で変換し、オキシソニ体は残留塩素が0.5～1.4mg/l程度という通常の給水条件下ではさらなる分解を受けず、かなり安定であると考えられた。

フェントロチオンについての実験結果をFig.4に示した。ダイアジノンの場合と同様に、主分解生成物はオキ

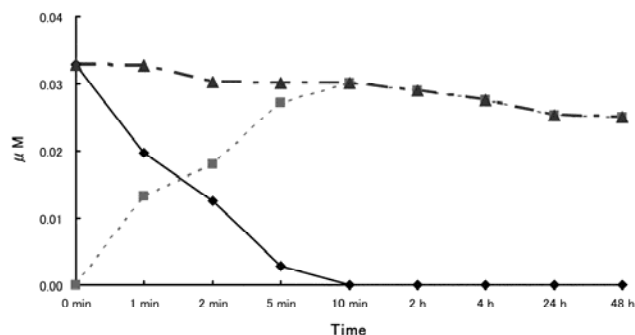


Fig.3 Profiles of the residual diazinon and the formation of diazinon-oxon in chlorination.

◆:diazinon, ■:diazinon-oxon, ▲:sum of diazinon and diazinon-oxon

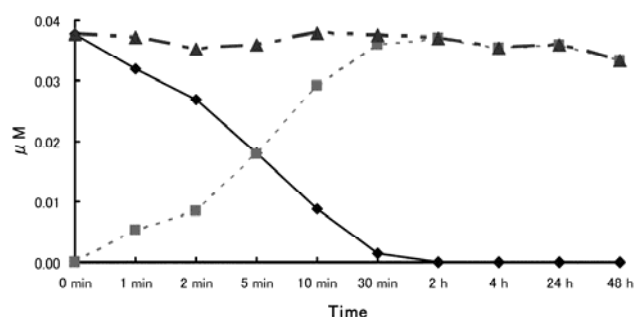


Fig.4 Profiles of the residual fenitrothion and the formation of fenitrothion-oxon in chlorination.

◆:fenitrothion, ■:fenitrothion-oxon, ▲:sum of fenitrothion and fenitrothion-oxon

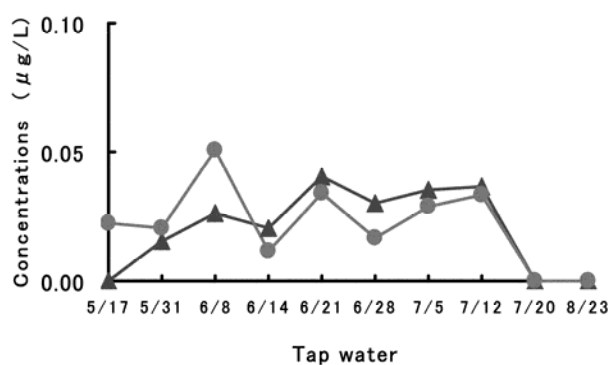
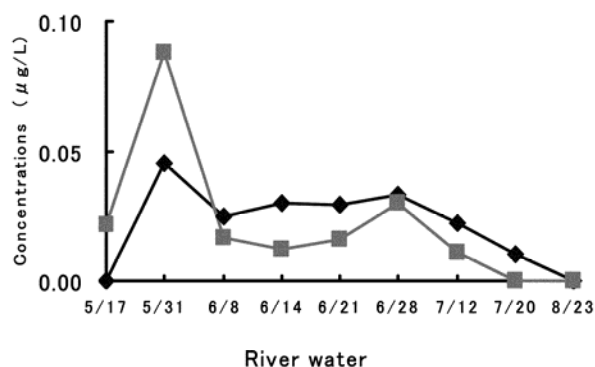


Fig.5 Monitoring of diazinon, diazinon-oxon, fenitrothion and fenitrothion-oxon in 2005.

The sampling point of the river water is 1 km upper of the intake dam of samukawa in the Sagami River and that of the tap water is at a water tap in Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, which supply water from the Samukawa Drinking-Water Plant.

■: fenitrothion, ◆: diazinon, ●: fenitrothion-oxon, ▲: diazinon-oxon

ソン体であり、残留塩素1.0mg/l程度ではほとんど分解を受けず、水中で安定であることが判明した。

3. 相模川河川水とそれを水源とする水道水中の農薬

平成17年の5月中旬から8月下旬まで、原水として既報⁹⁾と同じ地点の相模川河川水およびこの下流1km地点の寒川浄水場から給水を受けている神奈川県衛生研究所内で採水した水道水について、ダイアジノン、フェニトロチオン及びそれぞれのオキシソン体について調べた。Fig.5に示したように、河川水からはダイアジノン及びフェニトロチオンが検出されたが、一方オキシソン体は検出限界以下であった。水道水は、ダイアジノン及びフェニトロチオンは検出限界以下であり、そのオキシソン体が検出された。これは、浄水場での塩素処理により原水中のダイアジノン及びフェニトロチオンがオキシソン体に変化し、生成したオキシソン体は給水中の塩素濃度が1mg/l以下という条件では分解を受けにくく、給水末端の水道水から検出されたと考えられた。

水道水から検出されたこれ以外の農薬については、平成16年の調査結果⁹⁾と同様の傾向であり、本室内実験による塩素では分解を受けにくいカテゴリーIV～VIに属するフルトラニル、プレチラクロール、フェノブカルブ、シマジン、プロモブチド、メフェナセット、カフェンストロール及びカルボフランが検出された。

まとめ

水道水源である相模川から検出された農薬について、塩素処理による分解性を検討した。分解を受けにくい農薬が水道水から検出され、室内実験による分解試験結果が反映された。有機リン系農薬のダイアジノン及びフェニトロチオンのオキシソン体が給水末端の水道水から0.01～0.05 $\mu\text{g/l}$ の濃度で検出された。浄水場での塩素処理により生成したと考えられ、水中ではかなり安定であるため給水末端の水道水から検出されたと考えられた。生体に対する有機リン系農薬オキシソン体の毒性については、未だ十分には明らかとなっていないため、今後も水道水の監視が必要と考えられた。また、検出された濃度レベルで生体に対する有害性が今後明らかとなれば、除去・低減化対策が必要となると思われた。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) 相澤貴子, 嶋田俊夫, 鎌田素之, 西村哲治: 水道における新たな農薬監視体制: 用水と廃水, **46**, 582-590 (2004)
- 2) 嶋津治希, 杉田育生, 橋渡健児, 米倉祐司, 高尾健一郎, 広田忠彦: 太田川流域の浄水場における農薬類検出実態と原水中濃度の予想: 水道協会雑誌, **74**, 19-27 (2004)
- 3) 水戸部英子, 茨木 剛, 田辺顕子, 川田邦明, 坂井正昭, 貴船育英: 水田地域を流域とする河川水中における農薬濃度の変動: 環境化学, **9**, 311-320 (1999)
- 4) 近藤秀治, 福山龍次, 劉 愛民: 石狩川水系における農薬の多成分同時分析とその季節的変動: 環境化学, **11**, 253-266 (2001)
- 5) 小林正典, 平岩俊也, 小澤憲次: 寒川浄水場原水および浄水中の農薬調査(平成14年), 平成14年度県営水道の水質, 424-429 (2002)
- 6) 日本水道協会: 上水試験方法解説編 2001, 日本水道協会編, pp.291-298, 東京 (2001)
- 7) 小野寺祐夫, 石倉俊治, 香川容子, 田中恵子: 塩素処理による水中有機物の化学変化(第1報)P=S型有機リン系農薬からP=O型の生成: 衛生化学, **22**, 196-205 (1976)
- 8) 植村振作, 河村 宏, 辻万千子, 富田重行, 前田静夫: 農薬毒性の辞典 改訂版, pp.292, 三省堂, 東京(2002)
- 9) 渡辺貞夫, 上村 仁: 相模川における水質管理目標設定項目農薬の実態調査: 神奈川衛研報告, **36**, 33-36 (2006)
- 10) 新井崇子, 鎌田素之, 島崎 大, 浅見真理, 相澤貴子: 農薬の分子構造別の塩素分解性に関する研究, 水環境学会誌, **28**, 437-444(2005)
- 11) 鴨志田公洋, 小坂浩司, 浅見真理, 相澤貴子: 塩素処理における有機りん系農薬の類型別反応性とオキシソン体への変換について, 水環境学会誌, **30**, 145-154 (2007)

短報

結核接触者健診における新しい 感染診断法クオンティフェロン® TB-2G の利用について

大屋日登美, 岡崎則男, 高橋智恵子, 渡辺祐子,
尾上洋一, 新川隆康, 今井光信

Usefulness of QuantiFERON® TB-2G in diagnosis of tuberculosis infection among tuberculosis contacts

Hitomi OHYA, Norio OKAZAKI
Chieko TAKAHASHI, Yuko WATANABE
Yoichi ONOUE, Takayasu NIKKAWA
and Mitsunobu IMAI

はじめに

最近、結核感染診断のための新たな技術としてクオンティフェロン®TB-2G (Cellestis社, オーストラリア, 以下QFT) が開発され, 日本では2005年4月に体外診断薬として使用が認可され, 2006年1月には健康保険も適用された。また, 米国CDCから2005年5月にガイドラインが発表され¹⁾, 日本でも2006年に日本結核学会予防委員会から使用指針が提示された²⁾。

従来, 結核感染診断には主にツベルクリン反応検査(ツ反)が利用されてきた。ツ反は結核菌培養濾液から精製した蛋白(purified protein derivative; PPD)を被験者の皮内に接種し, PPDに対する遅延型アレルギー反応として出現する発赤等を測定する検査法である。このPPDは数百種類もの結核菌抗原を含み, 結核ワクチンに用いるBCGあるいは環境中の非結核性抗酸菌抗原と高い類似性を有する³⁾。このため, 結核感染を受けていない場合でも発赤が出現することがあり, BCG接種率が高い日本ではツ反で結核感染を診断することは難しいとされている²⁾。

QFT検査では, 結核菌の特異的蛋白であるESAT-6⁴⁾およびCFP-10⁵⁾を抗原とし, これらを被験者の血液に

添加し, Tリンパ球(感作白血球)から産生されるインターフェロン- γ を定量する。このため, BCG接種の影響を受けず, より確実な結核感染診断が可能である²⁾。

神奈川県では, 2005年11月より結核接触者健診においてQFT検査を導入し, 2006年3月までに神奈川県衛生研究所において331例の検査が実施された。本報では, これらのQFT検査成績から, 信頼性があるとされる6歳以上²⁾の270例の成績について, ツ反との比較, 被験者の年齢および接触場所等との関連性について報告する。

材料と方法

2005年11月~2007年3月までに, 県域保健福祉事務所の結核接触者健診においてツ反等により結核感染が疑われた6歳以上の270例から採取された血液を用いた。血液は抗凝固剤としてヘパリンを用い, 採血後7時間以内に当所に搬入された。また, 採血に際しては, QFT検査に対する被験者本人または保護者の同意を得た。

QFT検査は, 市販キットであるQFT-2G (日本BCGサプライ)を用い, 概ねキット添付の説明書に準拠して実施したが, 抗原添加後の血液培養は18時間, インターフェロン- γ 測定における免疫反応および発色反応温度は22℃とした。また, 本法は新しい検査法であるため, キットの説明書では不十分な点について結核研究所の指示および日本BCGサプライからの通知に従った。抗原添加後の血液の攪拌にはプレートミキサーMTS2/4(IKA JAPAN)を用い, ELISAプレートの洗浄にマイクロプレートウォッシャーモデル1575 (日本バイオラッド), ELISA発色後の吸光度測定にはマイクロプレートリーダーモデル680 (日本バイオラッド)を使用した。

吸光度測定後の解析は, 日本BCGサプライから供給された解析ソフトを使用し, 測定結果をIU/mlで示した。結果の判定は, キット添付の使用説明書および前述の使用指針²⁾に従い, 陽性(0.35IU/ml以上), 判定保留(0.1IU/ml以上~0.35IU/ml未満)および陰性(0.1IU/ml未満)とした。

結果および考察

表1に, 6歳以上の270例におけるQFT検査結果を示した。陽性は31例(11.5%), 判定保留が26例(9.6%), 陰性が213例(78.9%)であった。これらの被験者は接触者健診において主にツ反により結核感染が疑われた例であり, その内のほぼ80%がQFT検査では陰性であった。原田ら⁶⁾は, 接触者健診対象者数千人のQFT検査において, 陰性と判定された例から発病したのは4例のみであるとし, QFT使用指針²⁾でも, 陽性例が多く検出され, 潜在結核感染の可能性が大きいと判断される場合を

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
ohya.dwhv@pref.kanagawa.jp

除き、陰性例の追跡は原則として不要としている。このように、接触者健診におけるQFT陰性例が陽性に転ずる確率は低いことが示されており、陰性例は結核非感染と判断するのが妥当と考えられる。国内においては本報と同様な成績が報告されており⁷⁻⁹⁾、BCG接種が広く普及している日本では、ツ反で結核感染の有無を判定することは難しく、QFT検査の有用性が改めて確認された。QFT検査の精度についてはMoriら¹⁰⁾が感度89.0%、特異度98.0%と報告しており、特異度が高く、被験対象者によってツ反とQFTを併せて用いることにより効果的な接触者健診が可能となると考えられる。

表1 結核接触者健診における QFT 検査結果

検査例数	陽 性	判定保留	陰 性
	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
270	31 (11.5)	26 (9.6)	213 (78.9)

ツ反結果が判明している200例について、ツ反最大発赤径(mm)とQFT結果の比較を表2に示した。例数は少なかったが、発赤径9mm以下で陽性例はなかった。また、BCG接種例におけるツ反判定基準¹¹⁾とされる30mmを境界として今回の結果を見ると、29mm以下の106例中11例(10.4%)、30mm以上の94例中12例(12.8%)がQFT陽性であった。判定保留例を陽性例に含めても、

表2 結核接触者健診におけるツ反最大発赤径とQFT検査結果

発赤径 (mm)	検査 例数	陽 性	判定保留	陰 性
		例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
≤9	4	0 (0)	0 (0)	4 (100)
10-19	57	5 (8.8)	4 (7.0)	48 (84.2)
20-29	45	6 (13.3)	7 (15.6)	32 (71.1)
30-39	35	7 (20.0)	1 (2.9)	27 (77.1)
40-49	25	1 (4.0)	4 (16.0)	20 (80.0)
50-59	22	2 (9.1)	5 (22.7)	15 (68.2)
≥60	12	2 (16.7)	1 (8.3)	9 (75.0)
計	200	23 (11.5)	22 (11.0)	155 (77.5)

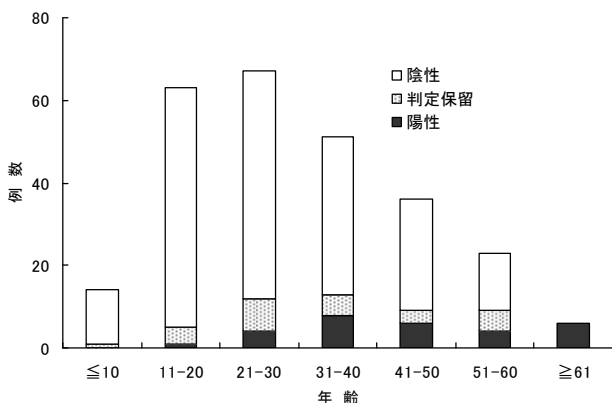


図1 結核接触者健診における年齢とQFT結果 (n=260)

29mm以下で22例(20.8%)、30mm以上では23例(24.5%)と、29mm以下でもQFT陽性例が相当数見られた。上記のツ反判定基準は、2006年の結核予防法改正に伴い日本結核病学会が暫定的に提示したもので、結核接触者健診においてBCG接種歴がある場合、発赤径30mm以上を結核感染疑い例としている。今回の被験者の多くがBCG接種歴を有すると考えられることから、ツ反発赤径による診断では多くの結核感染例が見落とされる可能性があると考えられた。

年齢が判明している260例の年齢とQFT結果について図1に示した。20歳以下の77例中QFT陽性は1例(1.3%)、判定保留を含めても6例(7.8%)であり、これらのほとんどが家庭内感染例であった。一方、21歳以上では陽性例が比較的多くなり、21～40歳の118例中12例(10.2%)および41～60歳までの59例中10例(16.9%)が陽性であり、61歳以上では被験者6例の全てが陽性であった。また、21歳以上の陽性および判定保留例計49例中の31例は医療従事者であり、殊に、61歳以上の陽性例6例中5例が同様に医療従事者であった。

結核接触者における患者との接触場所とQFT結果の関係を表3に示した。医療機関内では81例中19例(23.5%)がQFT陽性で、陽性率が最も高く、次いで家庭内17例中3例(17.6%)、職場内86例中9例(10.5%)で、学校内では75例中1例(1.3%)であった。事例によっては判定保留を陽性とすることもあり、判定保留例も含めて陽性とする、家庭内で8例(47.1%)、医療機関内が31例(38.3%)となり、これらの場所における陽性率が著しく高い値となった。

表3 患者との接触場所別による QFT 検査結果

場所	件数	検査 例数	陽 性	判定保留	陰 性
			例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
家庭	5	17	3 (17.6)	5 (29.4)	9 (53.0)
学校	4	75	1 (1.3)	2 (2.7)	72 (96.0)
職場	4	86	9 (10.5)	6 (7.0)	71 (82.5)
医療機関	5	81	19 (23.5)	12 (14.8)	50 (61.7)

このように、被験者の年齢別および接触場所別におけるQFT検査結果から、QFT陽性率は医療機関内および家庭内において高いことが明らかになった。これは、それぞれにおいて患者との接触が濃厚で、結核曝露の機会が多いためと思われる。殊に、医療機関内の医療従事者は結核患者との接触が高頻度にあると考えられることから、結核管理対策は重要であり、QFTは有用な管理手段の一つとなると思われた。また、61歳以上の6例全てがQFT陽性となったが、この年齢層では結核既感染率が高いとされ、最近の感染によるものかどうかの判断は難しいようである⁷⁾。結核感染後のQFT陽性値が何年間維持

されるのかは現在不明であり、結核既感染率の高い高齢者におけるQFT結果の解釈については課題の一つと思われる。一方で、5歳以下の低年齢層におけるQFTの有用性については、森ら¹²⁾の報告があるものの、臨床において小児結核を疑われる患者を対象にした成績であり、結核接触者における報告は現在のところ見当たらない。従って、この年齢層におけるQFT検査適用の可否が確認されていないことから、本報においても5歳以下の検査結果は省略した。今後、多くの検査成績の蓄積により、これらの課題の解決が急務である。

新しい結核診断技術であるQFT検査は上記の課題以外に、採血量(5ml)、採血から抗原刺激までの時間制限(12時間以内)、試薬の安定性および高価な検査経費等の解決すべき課題が残されているのも事実である。しかし、これらの課題があるにしても、本報および既報⁷⁻¹⁰⁾の成績から結核感染診断におけるQFTの有用性は明らかである。更に、本検査の導入により、不必要な化学予防を回避できることで患者の負担や医療経費の軽減も可能になることが報告されている¹³⁾。従って、今後、課題解決に向けて検討を続けると同時に、本県におけるQFT検査を利用した結核対策をより充実させていくことが重要と思われる。

稿を終わるに当たり、QFT検査の実施にご尽力いただきました神奈川県保健福祉部健康増進課、各保健福祉事務所の皆様および当所企画情報部水野桂子技幹(現、足柄上保健福祉事務所保健予防課)に深謝いたします。また、QFT検査手技に関してご指導いただいた結核予防会結核研究所原田登之および樋口一恵両先生に深謝いたします。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) Mazurek G.H., Jereb J., Lobue P., Iademarco M.F., Metchock B., Vernon A., Guidelines for using the QuantiFERON®TB Gold Test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States, MMWR.Dec. 16 : **54**(RR15) ; 49-55(2005)
- 2) 日本結核病学会予防委員会:クオンティフェロン®TB-2Gの使用指針, 結核, **81**, 393-397(2006)
- 3) von Reyn C.F., Horsburgh C.R., Olivier K.N., Barnes P.F., Waddell R., Warren C., et al. : Skin test reactions to *Mycobacterium tuberculosis* purified protein derivative and *Mycobacterium avium* sensitin among health care workers and medical students in the United States, Int. J. Tuberc. Lung Dis., **5**,1122-1128 (2001)
- 4) Anderson P., Andersen A.B., Sorensen A.L., Nagai S. : Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice, J. Immunol., **154**, 3359-3372 (1995)
- 5) Berthet F.X., Rasmussen P.B., Rosenkrands I., Andersen P. and Gicquel B. : A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10), Microbiology, **144**, 3195-3203 (1998)
- 6) 原田登之, 樋口一恵, 森亨 ; QuantiFERON®TB第二世代の基礎的特性, 結核, **80**, 774-777(2005)
- 7) 宮下裕文, 樋口一恵, 東山典子, 沖智子, 原田登之, 関谷幸恵他:接触者検診における全血インターフェロンγアッセイを用いた結核感染の診断ーQuantiFERON®TB-2Gを用いた検討ー, 結核, **80**, 557-564(2005)
- 8) 船山和志, 辻本愛子, 森正明, 山本洋美, 藤原啓子, 西村知泰他:大学での結核集団感染におけるQuantiFERON®TB-2Gの有用性の検討, 結核, **80**, 527-534(2005)
- 9) 原田登之, 森亨, 穴戸眞司, 樋口一恵, 関谷幸恵:集団感染事例における新しい結核診断法QuantiFERON®TB-2Gの有効性の検討, 結核, **79**, 637-643(2004)
- 10) Mori T., Sasatani M., Yamagishi F., Takashima T., Kawabe Y., et al. : Specific Detection of Tuberculosis Infection with an Interferon-gamma Based Assay Using New Antigens. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **170**, 59-64(2004)
- 11) 日本結核病学会予防委員会:今後のツベルクリン反応検査の暫定的技術的基準, 結核, **81**, 387-391 (2006)
- 12) 森雅亮, 黒澤るみ子, 今川智之, 片倉茂樹, 満田年宏, 相原雄幸他, 小児結核における結核感染診断用インターフェロンγ測定試薬の有用性についての検討, 感染症誌, **79**, 937-44(2005)
- 13) 森 亨, 原田登之: 接触者健診におけるQuantiFERON®TB第二世代による感染診断の経費効果分析, 結核, **80**, 675-686(2005)

短報

「腸管出血性大腸菌O157及びO26 検査実施標準作業書」作成のための 基礎的検討

鈴木理恵子, 永井 裕, 原みゆき, 小松祐子
小泉明子, 小儀國太郎

Examination about a standard operation procedure of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 & O26

Rieko SUZUKI, Yutaka NAGAI, Miyuki HARA
Yuko KOMATSU, Akiko KOIZUMI
and Kunitarou KOGI

はじめに

厚生労働省医薬食品局安全部監視安全課長から「腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法について」¹⁾(平成18年11月2日付け食安監発第1102004号、以下「新通知」)が通知された。それに伴い、平成9年7月4日付け衛食第207号及び衛乳第199号「腸管出血性大腸菌O157の検査法について」、並びに平成9年7月17日付け事務連絡「腸管出血性大腸菌O157の検査法の解説について」(以下、併せて「旧通知」)が廃止された。通知による主な変更内容は2点あり、食品中の腸管出血性大腸菌O157のほかに、血清型O26を検出する方法が定められたこと、食肉(内臓を含む)、食肉製品及びチーズ以外の食品について、ペロ毒素(以下、VT)遺伝子検出法をスクリーニング法として用いることが可能であることであった。

地域調査部では旧通知にもとづく「腸管出血性大腸菌O157検査実施標準作業書」について平成18年12月1日付けで部分修正を行い新通知に対応してきた。平成19年度より実施する食品検査には、主要な改正点であるVT遺伝子検出法を取り入れた新たな標準作業書(「腸管出血性大腸菌O157及びO26検査実施標準作業書」)の作成を行う必要があった。

新たに採用されたVT遺伝子検出法は、PCR法、Loop

mediated isothermal amplification(以下、LAMP)法、Real-time PCR法の3種の方法が示された。今回、操作が簡便で、短時間で遺伝子検出が可能であるLAMP法について、DNA抽出法を含めた標準作業書作成のための基礎的検討を行なったので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

供試菌株は、平成18年度に腸管出血性大腸菌患者由来ふん便より分離したO157:H7(VT1, 2)2株を用いた。

供試食品検体は野菜2検体(ナス、レタス)および新通知では対象外とされているが、適用の可能性を検討するため食肉2検体(鶏ひき肉、豚ひき肉)の計4検体を用いた。

2. 菌液および培養液の調製

菌液：供試菌株をTryptic soy broth(日本ベクトン・デッキンソン)10mlに接種し36℃、18時間培養後、遠心分離(3,000rpm, 20分間)を行った。この沈渣を滅菌生理食塩水で3回洗浄後、滅菌生理食塩水10mlに再浮遊し菌原液とした。菌原液を滅菌生理食塩水9mlで段階希釈を行い(以下、菌液)、ミスラー法²⁾により菌数の測定を実施した。

培養液：食品検体25gを滅菌ストマッカー袋に採取し、ノボジオシン加mEC(栄研化学)225mlを加え1分間ストマッカーで処理後、42℃、20～24時間増菌培養を行った。

この食品検体の増菌培養液に段階希釈した供試菌株O157の菌液を加え、培養液中のO157菌量を $10^2 \sim 10^5$ cfu/mlになるように検体調製を行なった。

これらを模擬培養液(以下、培養液)として、以下の方法について検討を行った。

3. DNA抽出法

アルカリ熱抽出：培養液0.1mlを遠心分離(10,000×g, 10分間)し、上清を取り除いた沈渣に滅菌50mmol/L NaOH 0.1mlを添加した。100℃で10分間加熱処理後、その処理液50μlを滅菌1mol/L Tris-HCl(pH7.0)8μlで中和し、遠心上清(10,000×g, 10分間)をテンプレートとした。抽出後は氷上等に静置し、直ちに使用しない場合には0～4℃で保存し4時間以内に使用した。

Extraction Solution for Foods : Extraction Solution for Foods(栄研化学)(以下、EX F)50μlに培養液50μlを添加し、転倒混和後軽く遠心した。95℃、5分間加熱処理後、簡易遠心分離器で1分間遠心し、氷上等に移し上清をテンプレートとした。直ちに使

用しない場合には0～4℃で保存し4時間以内に使用した。

PrepMan Ultra Sample Preparation Regent：培養液1.0mlを遠心分離（16,000×g，3分間）し，上清を取り除いた沈渣にPrepMan Ultra Sample Preparation Regent（アプライド・バイオシステムズジャパン）

（以下，PrepMan）0.2 mlを添加した。この添加液を攪拌機で10～30秒混和し，100℃で10分間加熱処理後，遠心分離（16,000×g，3分間）し，上清を新しい滅菌チューブに移しテンプレートとした。直ちに使用しない場合には0～4℃で保存した。

4. VT遺伝子検出法（LAMP法）

Loopamp腸管出血性大腸菌検出試薬キット（栄研化学）を用いて，添付書に従い試薬調製を行なった後，各々の方法で作製したテンプレートを加えた。遺伝子増幅の設定条件は添付書に従い，温度：反应用ブロック65℃，ホットボンネット75℃，測定時間：60分，酵素失活処理：80℃，2分間とした。

Loopampリアルタイム濁度測定装置（LA-320C）（栄研化学）を用いて遺伝子増幅および濁度測定を行い，VT遺伝子の有無を確認した。

5. 分離培養法

分離培養は，培養液を直接塗抹（以下，直接法）及び免疫磁気ビーズ（Dynabeads anti-E.coli O157，ダイナール製造，ベリタス販売）濃縮液の塗抹（以下，ビーズ法）により行なった。

培養液10 μl及び免疫磁気ビーズ濃縮液20 μlをセフィキシム・亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー寒天培地（以下，CT-SMAC培地）（オキソイド）

及びクロモアガーO157培地（クロモアガー製造，関東化学販売）の2種類の分離平板培地各2枚に塗抹し，36℃18～24時間培養を行なった。典型的コロニーを釣菌し，TSI寒天培地，SIM培地，リジン脱炭酸塩培地，VP半流動培地等の生化学的性状試験用培地に接種³⁾後，36℃，18～24時間培養し，生化学的性状およびO抗原等の確認を行った。

結 果

供試菌株2株の菌原液の菌数は，いずれも10⁸cfu/mlであった。供試食品4検体は培養法（直接法およびビーズ法）で大腸菌O157陰性，LAMP法ではVT遺伝子陰性であることを確認した上で模擬検体作成に用いた。

増菌培養液9ml（4種類）に段階希釈した10³～10⁶cfu/ml相当の菌液を1ml添加し，培養液（10²，10³，10⁴，10⁵cfu/ml）（4段階）を作成し，各々の培養液についてDNA抽出（3方法）を行い，テンプレートを作製した。このテンプレートを用いLAMP法によるVT遺伝子増幅を行うとともに，培養法による菌分離を実施した（一部培養液を除く）。

野菜（ナス・レタス），食肉（鶏ひき肉・豚ひき肉）の10³～10⁵cfu/ml模擬検体では，抽出方法毎に3回の繰り返し実験を行ったところ，いずれの抽出法でもVT遺伝子陽性であった。培養法では直接法，ビーズ法ともに腸管出血性大腸菌O157陽性であった。

10²cfu/ml模擬検体では，アルカリ抽出と他の2方法（EX F，PrepMan）で差が見られた。野菜（ナス・レタス）培養液について計8回（5回・3回）の繰り返し実験を実施したところ，アルカリ処理はすべて陽性，EX

表 1 LAMP 法における DNA 抽出法の比較と培養法の結果

模擬検体		野菜(ナス)					野菜(レタス)					食肉(鶏ひき肉)					食肉(豚ひき肉)				
培養液中の菌量cfu/ml (cfu/tube)		10 ⁵ (10 ³)	10 ⁴ (10 ²)	10 ³ (10 ¹)	10 ² (10 ⁰)	陰性 Cont.	10 ⁵ (10 ³)	10 ⁴ (10 ²)	10 ³ (10 ¹)	10 ² (10 ⁰)	陰性 Cont.	10 ⁵ (10 ³)	10 ⁴ (10 ²)	10 ³ (10 ¹)	10 ² (10 ⁰)	陰性 Cont.	10 ⁵ (10 ³)	10 ⁴ (10 ²)	10 ³ (10 ¹)	10 ² (10 ⁰)	陰性 Cont.
DNA 抽出 法	アルカリ処理 (陽性数/検査数)	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	— ^{a)}	+	+	+	+	—
	EX F (陽性数/検査数)	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—
	Prep Man (陽性数/検査数)	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—
培養 法	直接 法	CT-SMAC (陽性数/検査数)	NT ^{b)}	+	+	—	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	—	NT ^{b)}	+	+	+	—	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	—
		クロモアガーO157 (陽性数/検査数)	NT ^{b)}	+	+	—	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	—	NT ^{b)}	+	+	+	—	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	—
	ビー ズ 法	CT-SMAC (陽性数/検査数)	NT ^{b)}	+	+	—	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	—	NT ^{b)}	+	+	—	—	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	—
		クロモアガーO157 (陽性数/検査数)	NT ^{b)}	+	+	—	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	—	NT ^{b)}	+	+	+	—	NT ^{b)}	+	+	NT ^{b)}	—

a: 非特異的な増幅が認められた。ただし，Loopamp濁度測定器による判定は陰性。

b: 実施せず

Fでは陽性1回（ナス）、PrepManでは陽性0回（陰性）であった。同じく、食肉（鶏ひき肉・豚ひき肉）培養液について計8回（5回・3回）のアルカリ処理では陽性7回（4回・3回）、EX FおよびPrepManでは陽性0回（陰性）であった。野菜（ナス）、食肉（鶏ひき肉）についてのみ実施した培養法では、直接法およびビーズ法とも大腸菌O157陽性であったが、分離培地毎では若干の差が見られた（表1）。

考 察

近年の腸管出血性大腸菌患者から検出される血清型はO157に加えO26による患者報告例が増加し、O26による集団感染事例⁴⁾の報告もある。このことから、食品における腸管出血性大腸菌の検査法にO26も追加実施する通知（食安監発第11020004号）¹⁾が出され、従来の培養法とともに特異性に優れたVT遺伝子検出法が記載された。本通知法でも陽性判定に要する日数は同じであるが、VT遺伝子検出法を実施することで、陰性判定に要する最短日数が検体搬入後2日から1日に短縮される。結果判定までの時間が短縮されることで、食品の安全性を速やかに確認でき、食の安心・安全に寄与することができると考える。

PCR法を採用した場合、検査2日目の増菌培養（22±2時間）終了時間は、前日の検体搬入時間に大きく左右され、その後DNA抽出、PCR法、電気泳動などの煩雑な検査工程に約4時間を要する。さらに陽性判定となり培養検査に移行する場合には、2日目の検査工程は長時間におよぶことになる。

Real-time PCR法やLAMP法を用いた場合の所要時間は2.5時間、1.5時間であり、PCR法に比べ電気泳動を必要とせず短時間で終了し、検査工程の煩雑さは軽減される。しかし、各々の方法には専用機器が必要となりReal-time PCR法対応機器は高額で、LAMP法対応機器は比較的安価であった。また、LAMP法はReal-time PCR法に比べ、操作が簡便で、短時間で増幅が終了すること、通知に記載された試薬の提供があることから、年間約350検体（平成18年度厚木分室実績）を実施する日常検

査には適していると考えた。

通知に記載されたDNA抽出法は4種類（5方法）があるが、今回の標準作業書作成には操作法が簡便であるアルカリ処理、EX F、PrepManの3方法について検討をおこなった。10²cfu/ml培養液ではアルカリ処理の検出が良好であるが、再現性のある10³cfu/ml培養液では抽出法による差異は認められず再現性は100%であった。また、本通知では10⁴cfu/mlを検出可能なVT遺伝子検出法を用いることになっているが、LAMP法の再現試験での得られた検出限界は10³cfu/mlであり、通知に示された検出限界を十分満たしていた。

VT遺伝子検出法の対象外の食品である食肉について適用の可能性について検討したところ、陰性コントロールにおいて濁度上昇（非特異的な増幅）が1例認められた。しかし、特異的な濁度上昇とは異なったため判定は陰性であった。メーカーに問い合わせたところ、特異的な増幅の場合、濁度は急激に上昇するため増幅の勾配により判別は可能であり、このような現象は脂肪分の多い検体で稀にみられる現象であるとの説明があった。

以上より、LAMP法にはいずれの抽出方法でも十分な検査精度が得られており、今回の基礎的検討をふまえて「腸管出血性大腸菌O157及びO26検査実施標準作業書」を作成し、平成19年4月2日より地域調査部では施行することになった。

本検討にあたり、ご協力いただきました地域調査部小田原分室および茅ヶ崎分室の微生物検査担当の皆様へ感謝いたします。

（平成19年7月20日受理）

文 献

- 1) 腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法について、食安監発第11020004号、平成18年11月2日
- 2) 坂崎利一：新 細菌培地学講座、pp204、近代出版、東京(1978)。
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005
- 4) 腸管出血性大腸菌感染症2007年4月現在、病原微生物検出情報、28、131-132(2007)

短報

清涼飲料水原材料からのカビの分離 と分離カビの耐熱性について

相川勝弘, 浅井良夫, 尾上洋一

Heat resistance of mold isolated from raw materials for soft drink

Katsuhiro AIKAWA, Yoshio ASAI
and Yoichi ONOUE

はじめに

食品からの耐熱性カビの報告は、1930年代の果実の缶詰からの分離¹⁾が最初であり、当時はブルーベリー、イチゴなどの果実の缶詰による事故が主体であったが、食品製造技術の変遷等に伴い加熱工程のある加工食品全般から分離が報告されるようになってきた²⁾。

一般のカビは、湿熱条件では70℃、10分間で死滅するが、有性生殖器官として子嚢を形成する子嚢菌類、厚膜孢子や菌核などの耐久性細胞を形成するカビでは、耐熱性を示すことがある。カビの耐熱性の定義は明確に示されているわけではないが、80℃の湿熱による殺菌で生残する菌のほとんどは、耐熱性カビとみなしてよいとされている³⁾。

加熱加工食品にカビ発育の事故が起こるのは、加熱前の原材料や中間製品に子嚢孢子の汚染があった場合に加熱工程の熱により休眠していた子嚢孢子が活性化され、カビが発育してくることが原因となっている²⁾。

今回、清涼飲料水の原材料である濃縮果汁、濃縮野菜汁、紅茶葉および緑茶葉について、カビの汚染状況および耐熱性カビの分離を試みたところ、子嚢孢子を形成するカビが分離され、そのカビの耐熱性試験を実施したので報告する。

方 法

1. 清涼飲料水の原材料

清涼飲料水の原材料として、清涼飲料水製造施設から提供を受けた果汁8検体、野菜汁5検体、紅茶葉4検体および緑茶葉2検体を用いた。果汁および野菜汁は、すべて濃縮、冷凍保存で種類はオレンジ、グレープフルー

ツ、リンゴ(2種類)、グレープ(2種類)、パインアップル、ミックス、ニンジン(2種類)、セロリ、アスパラガスおよびホウレンソウであった。ミックス果汁は、日本でブレンドしたもので、それ以外は、輸入品(ブラジル、アメリカ、中国、南アフリカ、フィリピン、ニュージーランドおよびオランダ)であった。紅茶葉の原産国は、スリランカまたはスリランカ、インドおよびインドネシアのブレンド品、緑茶葉の原産国はすべて日本と中国のブレンド品であった。

2. 原材料からのカビの分離

カビ数の算定では、粘稠度の高い果汁においては果汁1mlに0.1%ペプトン水9mlを加えたものを試料とし、茶葉においては、茶葉10gに0.1%ペプトン水90mlを加えたものを試料とした。試料0.1mlをクロラムフェニコール(100mg/培地1000ml,OXOID)加Potato Dextrose Agar(Merck)平板3枚ずつにコンラージ棒で塗抹し、25℃7日間培養後、計数した。発育したカビの同定は、常法にしたがって行った。

耐熱性カビの検出は、果汁および野菜汁では、果汁・野菜汁50gと0.1%ペプトン水50mlを組織培養用フラスコ(150ml容)に各検体2組ずつに入れ、80℃の恒温水槽中に30分間沈めた後、氷水中で急冷し、加熱処理液を径150mmのシャーレに10mlずつ入れ、2倍濃度のクロラムフェニコール加ポテトデキストロース寒天培地10mlと混釈し、ポリエチレン袋に入れ30℃、30日間培養した。発育してきたカビは、常法により同定するとともに子嚢孢子の形成の確認を行った。子嚢孢子を形成したカビについては、走査型電子顕微鏡を用いて子嚢孢子の表面構造の観察を行った。

3. 耐熱性試験

耐熱性試験に用いる子嚢孢子は、紅茶葉から分離した子嚢孢子形成カビ15-3株をMalt Extract Agar(Merck)平板上に塗抹し、30℃で32日間および50日間の二つの異なる期間で培養したものをを用いた。子嚢孢子液の調製は、各期間培養した平板に0.01%Tween80(和光純薬)加生理食塩水を加えコンラージ棒で集落をかきとり、ガラスビーズ(φ0.991~1.397mm)の入ったチューブに入れ、ボルテックスミキサーで攪拌後、セルストレイナー70μm(BD Falcon)およびナイロンネットフィルター11μm(MILLIPORE)でろ過し、生理食塩水で3回洗浄して行い、10⁶~10⁷CFU/mlにした。試験子嚢孢子液は、使用する直前に70℃、10分間の加熱処理により、分生子および菌糸を死滅させたものをを用いた。

耐熱性試験の加熱媒体の組成は、グルコース16g、酒石酸0.5g、蒸留水100ml(pH3.6, Brix.14%)とした。加熱媒体は、3.8mlをキャップ付のガラス管(内径

10mm, 高さ120mm) に分注し, 115℃, 10分間高圧蒸気滅菌して用いた. 加熱媒体の入ったガラス管の加熱には, サーモアルミバス (旭テクノグラス) を用いた. 加熱媒体を各所定の加熱温度 (80℃, 85℃および90℃) で保持した後, 調製した子嚢胞子液0.2mlを添加後所定の時間加熱した. 加熱時間は, 5, 10, 20, 30, 60および90分間のうちの3段階以上で行った. 加熱時間0分を初期子嚢胞子数とし, 所定の加熱時間経過後, 直ちに, 氷水中に入れ, 加熱処理後の加熱媒体を必要に応じて生理食塩水で10倍段階希釈したものを検液とし, 検液1mlずつをPotato Dextrose Agarで混釈, 30℃で7~10日間培養後, 発育してきた集落数から生残子嚢胞子数を算出した.

3段階の加熱温度における各加熱時間の生残子嚢胞子数から, 生残子嚢胞子数曲線を作成した. また, 方程式 $(\log_{10} N_0 - \log_{10} N) = kt + C$ ³⁻⁴⁾ により子嚢胞子の熱死滅率を計算した. N_0 および N は, 子嚢胞子の初期計数値および生残子嚢胞子数, t は加熱温度時の加熱時間 (分), 指数 α は $\log_{10} t$ に対する $\log_{10} (\log_{10} N_0 - \log_{10} N)$ で作図した曲線の傾きの逆数, k は死滅割合の定数で直線化した曲線の傾き, C は定数で直線化した曲線の切片とした.

結果および考察

清涼飲料水の原材料として提供を受けた果汁および野菜汁のカビ数と分離カビを表1に示した. 13検体中11検体は, 検出限界以下であった. リンゴ果汁2検体からは, *Aspergillus*属, *Penicillium*属のカビが分離された. また, 果汁および野菜汁13検体を80℃, 30分間加熱した場合にカビの発育は認めなかった. 今回の果汁および野菜汁のほとんどのものは, カビの検出が検出限界以下であり, 耐熱性カビの分離を認めず, 果実飲料の殺菌方法が, 93~95℃に加熱された熱間充填が普通であることから, 製品のカビによる変敗は防止できると思われる. しかしながら, 果実および野菜は, カビの汚染を受けやすいので果汁および野菜汁作製時の衛生管理が重要になると思われる. リンゴ果汁からマイコトキシンの一つであるパツリンの産生に関係する*Aspergillus*属, *Penicillium*属の分離があったことは, カビの汚染防御だけでなくマイコトキシンの含有の有無の管理が必要と思われる. 食品から分離される耐熱性カビによる変敗の問題の主体が果実加工品であった²⁾が, 今回の調査では耐熱性カビは検出されなかった.

紅茶葉および緑茶葉からのカビの分離状況を表2に示した. 緑茶葉2検体のカビ数は, 検出限界以下であった. 紅茶葉4検体のカビ数は, 100未満~1100 CFU/mlであった. 80℃, 30分間の熱処理後に分離されたカビ

は9株で, このうち子嚢胞子の形成を認めたものは1株 (15-3株) であった. 15-3株は, Malt Extract Agar上の性状⁵⁾および走査型電子顕微鏡による子嚢胞子の表面構造 (図1) から *Talaromyces trachyspermus* と同定し

表1 果汁、野菜汁のカビ数と分離カビ

果汁・野菜汁	カビ数 (CFU*/ml)	分離カビ
濃縮混濁リンゴ果汁	20	<i>Aspergillus</i> 属
濃縮透明リンゴ果汁	40	<i>Aspergillus</i> 属, <i>Penicillium</i> 属
濃縮ホワイトグレープ果汁	10未満	—
濃縮オレンジ果汁	100未満	—
濃縮グレープフルーツ果汁	100未満	—
濃縮コンコルドグレープ果汁	100未満	—
濃縮バインアップル果汁	100未満	—
濃縮ミックス果汁	100未満	—
濃縮ニンジン汁①	10未満	—
濃縮ニンジン汁②	10未満	—
濃縮セロリ汁	10未満	—
濃縮アスパラガス汁	10未満	—
濃縮ホウレンソウ汁	10未満	—

*CFU: Colony Forming Unit, **—: 分離カビなし

表2 茶葉のカビ数と熱処理後の分離カビ

茶葉	カビ数 (CFU*/g)	熱処理後の 分離株数	子嚢胞子 形成株数
紅茶葉①	1100	0	0
紅茶葉②	400	4	0
紅茶葉③	100	4	1
紅茶葉④	100未満	1	0
緑茶葉①	100未満	0	0
緑茶葉②	100未満	0	0

*CFU: Colony Forming Unit

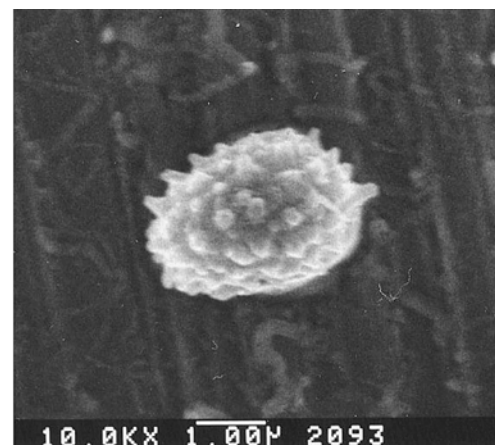


図1 紅茶葉から分離された *Talaromyces trachyspermus* (15-3株) の子嚢胞子 SEM像

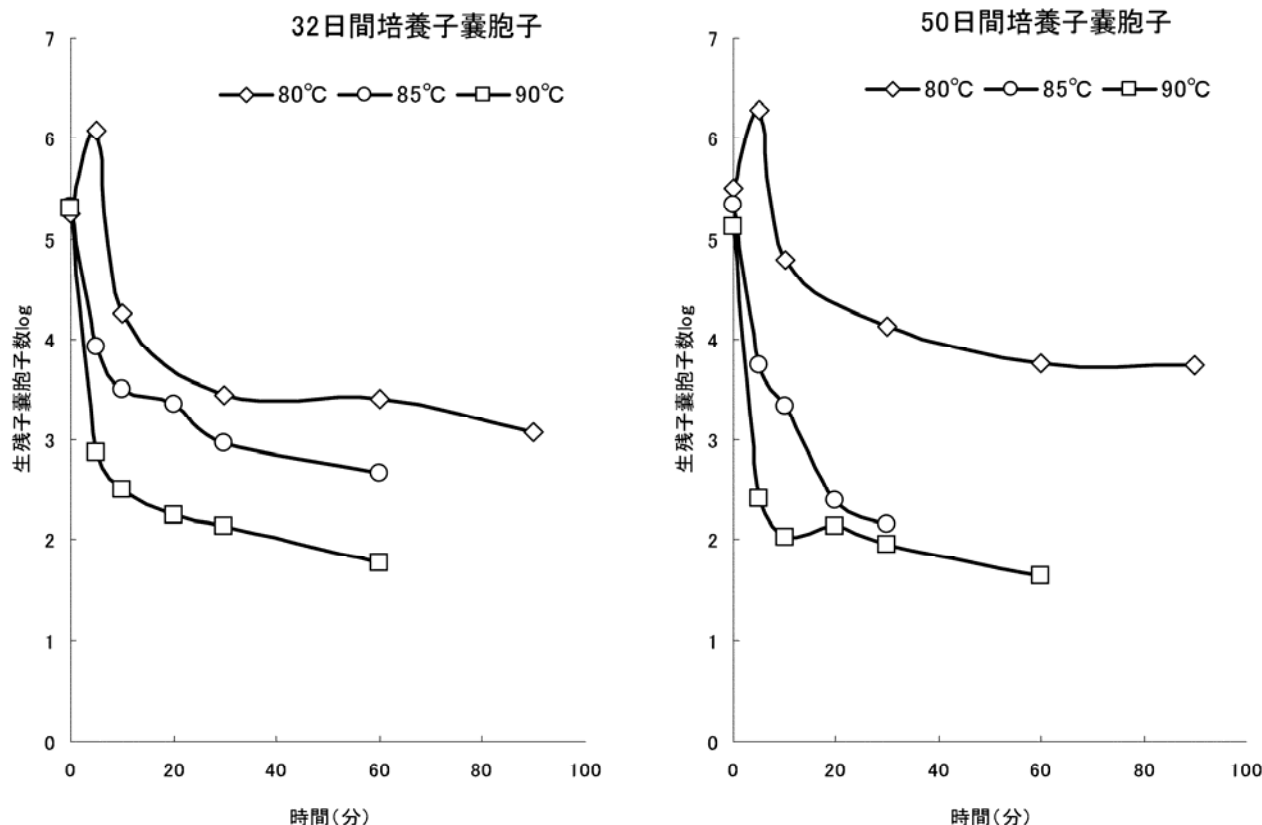


図2 紅茶葉から分離された *Talaromyces trachyspermus* (15-3 株) の
生残子嚢胞子数曲線 (32 日間および 50 日間培養子嚢胞子)

た. 紅茶葉から分離された *T.trachyspermus*(15-3株)の耐熱性試験は, 32日間および50日間の培養期間で得られた子嚢胞子を用いて行い, その生残子嚢胞子数曲線を図2に示した. 子嚢胞子の培養期間が32日と50日のいずれの場合も加熱温度80℃では, 加熱時間5分のときに子嚢胞子の活性化に伴う生残子嚢胞子数の増加が認められた. また, 実施したすべての加熱温度において加熱時間が経過するとともに, 生残子嚢胞子数の減少率が緩やかとなり, 直線性のある対数減少は認められなかった. 耐熱性カビの耐熱性試験におけるこの2つの現象については, King and Halbrook⁶⁾によって報告されており, 生残子嚢胞子数曲線が直線にならない場合は, 方程式 $(\log_{10} N_0 - \log_{10} N)^{\alpha} = kt + C$ が用いられている. この方程式の $\log$ 時間 (分) に対する $\log(\log_{10} N_0 - \log_{10} N)$ のグラフを作成し, その傾きから α を決定した. この α を用いて各時間に対する $(\log_{10} N_0 - \log_{10} N)^{\alpha}$ を求め, 加熱温度80℃および85℃における熱死滅率曲線を作成した (図3). 加熱温度が同じ場合, 子嚢胞子の培養期間32日のほうが50日のものよりも直線の傾きが大きくなり, 死滅率が高くなることがわかった. また, 加熱媒体のpH, Brix., 有機酸および供試する子嚢胞子の培養条件が子嚢胞子の耐熱性に影響を与えるという King and

Whitehandの報告もある⁷⁾. したがって, 耐熱性の比較にあたっては, 耐熱性試験実施における条件を同一にすることが必要であり, 耐熱性試験の実施においては, 供試菌株は少なくとも3週間以上の培養による胞子形成とその成熟の確認, 加熱媒体の標準液としては今回用いたグルコース16g, 酒石酸0.5g, 水100ml(pH3.6)使用が必要条件とされている.

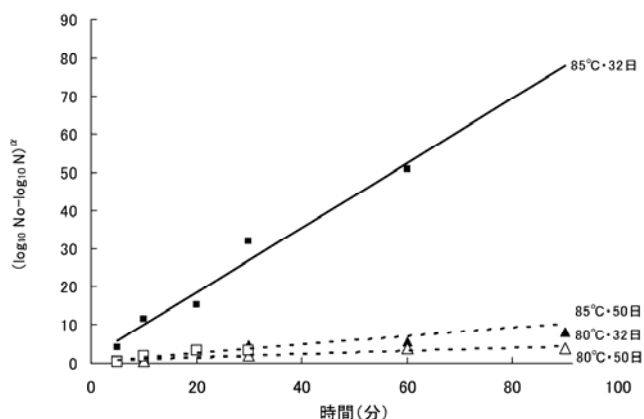


図3 紅茶葉から分離された *Talaromyces trachyspermus* (15-3 株) の公式 $(\log_{10} N_0 - \log_{10} N)^{\alpha} = kt + C$ による生残子嚢胞子数曲線の直線化

方程式($\log_{10} N_0 - \log_{10} N$)^a = $kt + C$ から各加熱温度における1/kを求めた結果および3logの子嚢胞子を死滅させる値から計算された時間を表3に示した. *T. trachyspermus* (15-3株)の1/k値および3logはそれぞれ, 80℃で11.0~24.5分および239.6~299.3分, 85℃で1.2~8.7分および69.1~126.3分, 90℃で1分以内および8.5~18.5分であった. 1/k値は, 対数の死滅率を示すD値に相応する非対数の死滅率として用いられる. 食品から検出された *T. trachyspermus*のD値として, 85℃, 45分という報告がある²⁾. *T. flavus*の耐熱性とし

ては, 80℃において1/k値63~113分, 3log値97~236分, 85℃において1/k値20~26分, 3log値32~36分, 90℃において1/k値2~8分, 3log値5~12分で, 同じ菌株であっても耐熱性に違いが認められたという報告がある⁶⁾. 今回紅茶葉から分離された耐熱性カビの耐熱性の指標値からは, 現在一般的に採用されている高温あるいは超高温殺菌条件において, 子嚢胞子が残存することはないと思われるが, 殺菌時の管理および原材料の汚染以外の管理点としては, 殺菌後の充填時における環境中の子嚢胞子の汚染に注意が必要と思われる.

表3 紅茶葉から分離された *T. trachyspermus* (15-3株)の熱耐性値

培養日数	加熱温度 (℃)	α	C	k	r^2	1/k(分)	3log(分)
32日	80	2.8450	1.0194	0.0908	0.8764	11.0	239.6
	85	4.0241	1.5378	0.8491	0.9704	1.2	96.1
	90	6.9589	80.921	108.55	0.9949	<1	18.5
50日	80	2.3191	0.5365	0.0409	0.8514	24.5	299.3
	85	2.4396	0.1511	0.1143	0.8330	8.7	126.3
	90	11.5075	72140	27771	0.9173	<1	8.5

r^2 : Cとkを決めるための時間(分)と($\log_{10} N_0 - \log_{10} N$)^aの間の決定係数

3log : 生存孢子数 3log を挿入して計算した時間

謝 辞

今回、清涼飲料水の原材料の果汁・野菜汁および茶葉を提供していただきましたキリンビバレッジ株式会社湘南工場および走査型電子顕微鏡の撮影に御協力いただきました神奈川県産業技術センターの今城敏専門研究員に深謝いたします。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) Olliver M. and Rendle T. : A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssoschlamys fulva* and its effect on tissues of processed fruit, J. Soc. Chem. Ind., **53**, 166-172(1934)
- 2) 宇田川俊一 : 食品のカビ I 基礎編 食品のカビ汚染と危害, pp.175-187, 幸書房, 東京(2004)
- 3) G. Alderton and N. Snell : Chemical states of bacterial spores: Heat resistance and its kinetics at intermediate water activity, Appl.

Microbiol., **19**, 565-572(1970)

- 4) D. King, Jr., H. G. Bayne and G. Alderton : Non-logarithmic death rate calculations for *Byssoschlamys fulva* and other microorganisms, Appl. Environ. Microbiol., **37**, 596-600 (1979)
- 5) 宇田川俊一, 矢口貴志 : 耐熱性子のう菌類の分類と同定, ソフトドリンク技術資料 別冊清涼飲料水の微生物管理2003年, pp.131-159, 社団法人全国清涼飲料工業会, 東京(2004)
- 6) A. D. King, Jr. and W. U. Halbrook : Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate, J. Food Sci., **52**, 1252-1254 (1987)
- 7) A. D. King, Jr. and L. C. Whitehand : Alteration *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heating medium composition, J. Food Sci., **55**, 830-832 (1990)

短報

誘導結合プラズマ発光分光分析装置による清涼飲料水における重金属の分析

赤星 猛, 藤巻照久

Analysis of heavy metals in soft drinks by ICP-OES

Takeshi AKABOSHI and Teruhisa FUJIMAKI

はじめに

清涼飲料水はカドミウム、鉛、スズ、ヒ素の4元素について、規格基準が定められている。これら4元素に対し、カドミウム、鉛は原子吸光光度法またはポーラログラフ法、スズはサリチリデン-2-チオフェノール法またはポーラログラフ法、ヒ素はグットツァイト法またはジエチルジチオカルバミン酸銀法が告示法となっている¹⁾。これらの試験法では試料を灰化した後、各測定法に合わせた抽出操作や呈色反応が必要であり4元素を測定するためにはいくつかの操作を並行して行うこととなる。また比色法は溶液の安定性が悪く測定精度に影響を与えている。一方誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析法では、灰化した試料をそのまま酸で希釈することにより4元素を測定可能な試験溶液とすることができ、前処理にかかる時間や試薬を削減できる。更に多波長同時測定可能なアキシャル型のICP発光分光分析装置を用いると、4つの元素を同時に測定でき分析時間の短縮も可能となる。

アキシャル型ICP発光分光分析装置は原子吸光光度計やラジアル型ICP発光分光分析装置と比較して感度もよく、多元素微量分析に優れている一方、感度がよいため灰化時に用いる硫酸や清涼飲料水に含まれる他の元素の影響を受けやすく、物理干渉、イオン化干渉など様々な干渉が定量値に影響を与える²⁾。この問題の解決に、検量線に用いる標準溶液のマトリックスを合わせる方法が考えられるが、検体が複数ある場合、それぞれの検体のマトリックスに合わせた標準溶液を作成することになり、多くの手間をかけることとなる。そこで、標準溶液のマトリックスを合わせることなく、干渉の影響を抑え

る、または補正する方法について、検討した。

実験方法

1. 試験溶液の作成

硫酸分解により灰化した後の試験溶液を想定して以下のように模擬試験溶液を調製した。

Cd(0.1 μ g/g)、Pb(0.4 μ g/g)、Sn(5.0 μ g/g)、As(0.2 μ g/g)を含む0.1N硝酸水溶液20gに、内標準元素としてY、Yb、In、Teを試験溶液中で1 μ g/mlとなるように添加した。更に、試験溶液中のマトリックスとして、硫酸を0~2ml、ナトリウムイオン(食塩を用いて)を0~500 μ g/mlとなるように添加し、0.1N硝酸水溶液により50mlに定容した(表1)。試験溶液A~Xはそれぞれ3本ずつ調製した。

表1 清涼飲料水模擬試験溶液への硫酸及びナトリウムイオンの添加量

		硫酸(ml)			
		0	0.5	1.0	2.0
Na ⁺ (μg/ml) (試験溶液)	0	A	B	C	D
	100	E	F	G	H
	200	I	J	K	L
	300	M	N	O	P
	400	Q	R	S	T
	500	U	V	W	X

試験溶液は0.1N硝酸により50mlに定容した

ここで、マトリックスに硫酸と、ナトリウムイオンを代表として用いたのは、次の理由による。硫酸は、検体の灰化時に用いるため、試験溶液中に含まれる。粘性が高いため、測定時には物理干渉の主な原因となる。ナトリウムイオンは食品中に通常含まれており、イオン化エネルギーが低いことから、測定時にはイオン化干渉の主な原因となる。

2. 装置及び分析条件

ICP発光分光分析装置はセイコーインスツルメンツ社製 Vista-pro を用い、高周波出力 1.2kW、プラズマフロー15L/min、補助フロー1.5L/min、ネブライザーフロー0.75L/min、積分時間 3sec として測定した。測定線は目的元素、内標準元素ともに感度がよい3つの波長を選んだ(表2)。表中(I)は測定線が原子線であること、(II)はイオン線であることを示す。

3. データの取扱いについて

試験溶液 A(表1)はマトリックスを添加していない。そこで試験溶液 A の発光強度を基準とした発光強度比 S を用いてマトリックスの影響を評価した。

$$S = I_n / I_A \quad \dots (式1)$$

ここで、 I_n は試験溶液 n(n = A~X)の発光強度を表す。

表2 測定波長 (nm)

Cd	214.439(II) 226.502(II) 228.802(I)*	Pb	220.353(II) 182.143(II)* 217.000(I)	Sn	189.927(II) 283.998(I) 235.485(I)*	As	188.980(I) 193.696(I) 197.198(I)*
Y	371.029(II)* 360.074(II) 377.433(II)	Yb	328.937(II) 369.419(II) 289.138(II)	In	230.606(II) 325.609(I) 303.936(I)*	Te	214.282(I) 182.150(I)* 238.579(I)

(I)は原子線, (II)はイオン線を示す. 分光干渉があったものを*で示す.

また, 内標準補正を行う場合は内標準に使用した元素の測定線 λ_i の発光強度 $I_n(\lambda_i)$ に対する, 目的元素の測定線 λ_p の発光強度 $I_n(\lambda_p)$ を相対発光強度 $I_n(\lambda_p)/I_n(\lambda_i)$ として用いた. この場合 (式1) の発光強度を相対発光強度におきかえた相対発光強度比 S_r によりマトリックスの影響を評価した.

$$S_r = \{I_n(\lambda_p)/I_n(\lambda_i)\} / \{I_A(\lambda_p)/I_A(\lambda_i)\} \quad \cdots \text{(式2)}$$

結果及び考察

1. 分光干渉について

表2に分光干渉のある測定波長を示した. これらの測定波長は他の金属の発光線と重なるため正確な結果が得られない (Pb の 182.143nm の例を図1に示す). バックグラウンド補正により真度, 精度ともに多少の改善が見られるが, これらの波長は使用しないこととした. 分光干渉のない波長による測定結果は精度よく与えられ, 全て相対標準偏差3%以内であった.

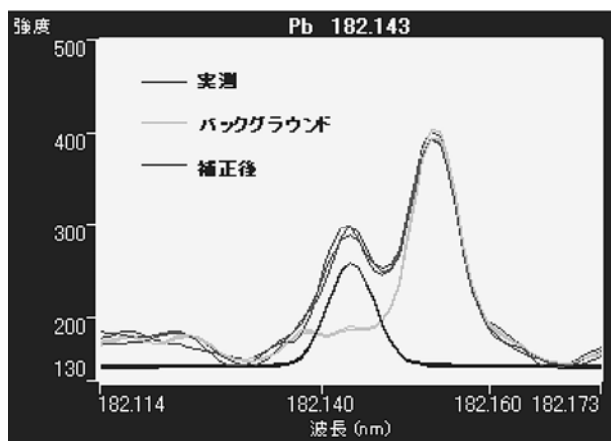


図1 Pb182.143nm 付近の発光スペクトル

2. マトリックスによる影響

(1) ナトリウムイオンによる発光強度変化

各目的元素の分析線から1波長ずつ選び試験溶液に含まれるナトリウムイオンによる発光強度変化を図2に示す. 各元素ともナトリウムイオンの増加に伴い, 感度の減少がみられたが, その減少率がそれぞれ異なっており,

ヒ素の発光強度変化はわずかである.

(2) 硫酸による発光強度変化

硫酸添加量による発光強度変化を(1)と同じ波長を選び図3に示す. カドミウム, 鉛, スズの発光強度は硫酸の増加に伴いほぼ同様に減少したのに対し, ヒ素はほとんど変化していない.

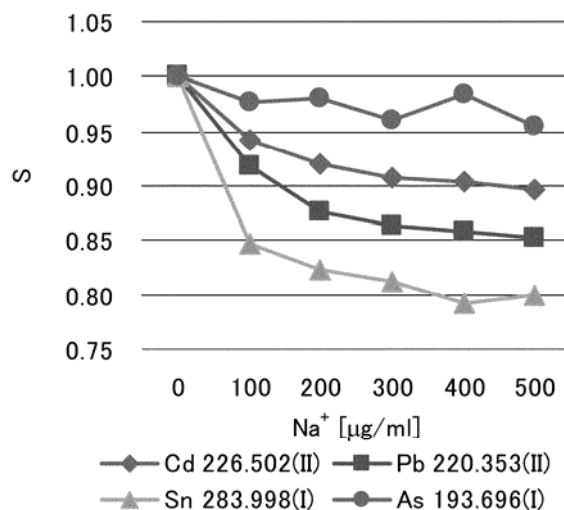


図2 Na+濃度による発光強度変化

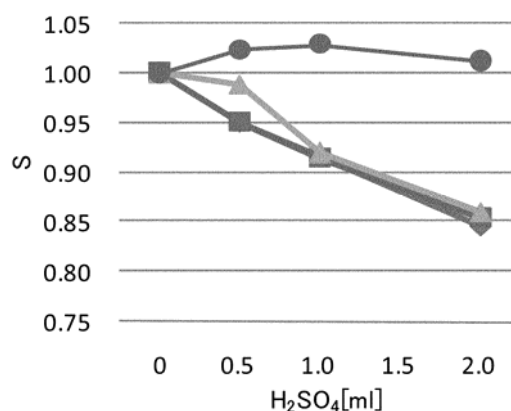


図3 硫酸添加量による発光強度変化

(3) ナトリウムイオン及び硫酸混合マトリックスによる発光強度変化

ナトリウムイオン及び硫酸を添加した試験溶液のカドミウム、及びヒ素の発光強度変化を表3、4に示す。カドミウムの場合、ナトリウムイオンだけを添加したものや硫酸だけを添加したものとは比べ、更に発光強度が低下していることがわかる。この強度低下の度合いは例えばナトリウムイオン100 $\mu\text{g/ml}$ 及び硫酸1mlを添加している試験溶液Gの場合、発光強度比Sは0.87であったが、これはこの添加量に対応する試験溶液E及びCの発光強度0.94及び0.92の積0.865に近い値をとっている。これは他の試験溶液に対してもほぼ成り立っており、また鉛やスズでも同様な傾向がみられた。このことから、ナトリウムイオンと硫酸が発光強度の変化に対して互いに独立な作用を及ぼしていることが考えられる。一方ヒ素については、ナトリウムイオン及び硫酸からほとんど影響を受けていないため両方が含まれている試験溶液でも、ほとんど影響を受けていない。

表3 Cd 226.502(II)のマトリックスによる発光強度比S

		硫酸(ml)			
		0	0.5	1.0	2.0
Na ⁺ ($\mu\text{g/ml}$) (試験溶液中)	0	1.00	0.95	0.92	0.85
	100	0.94	0.89	0.87	0.81
	200	0.92	0.88	0.85	0.80
	300	0.91	0.86	0.84	0.80
	400	0.90	0.86	0.84	0.79
	500	0.90	0.86	0.83	0.78

表4 As 193.696(I)のマトリックスによる発光強度比S

		硫酸(ml)			
		0	0.5	1.0	2.0
Na ⁺ ($\mu\text{g/ml}$) (試験溶液中)	0	1.00	1.02	1.03	1.01
	100	0.98	1.02	0.98	0.99
	200	0.98	0.99	1.01	1.00
	300	0.96	0.98	1.03	0.99
	400	0.98	0.96	1.01	0.96
	500	0.95	1.00	1.01	1.01

3. 分析線によるマトリックスの影響の違い

マトリックスによる発光強度の変化について試験溶液Kを例として表5に示す。イオン線を測定線として選んだ場合Inを除いて、およそ15%程度強度が減少している。一方、原子線を測定線として選んだ場合、20%以上強度が減少する元素とほとんど変化のない元素の2グループに分かれた。一般にICPの内標準補正は線種をそろえて行うと良いとされている²⁾。しかし、この結果から線種がそろえばどの波長を選んでも良いとはいえず、適した組合せを選ばなければならないことがわかる。

表5 各分析線及び発光強度比S

元素及び線種	分析波長(nm)	S	元素及び線種	分析波長(nm)	S
As(I)	188.980	1.04	Cd(II)	214.439	0.86
As(I)	193.696	1.01	Cd(II)	226.502	0.85
Pb(I)	217.000	0.77	Pb(II)	220.353	0.81
Sn(I)	283.998	0.79	Sn(II)	189.927	0.89
In(I)	325.609	0.77	In(II)	230.606	0.75
Te(I)	214.282	0.98	Y(II)	360.074	0.85
Te(I)	238.579	0.97	Y(II)	377.433	0.85
			Yb(II)	328.937	0.86
			Yb(II)	369.419	0.84
			Yb(II)	289.138	0.83

4. 内標準元素による補正

これらの結果をふまえ、今回測定した内標準元素の測定線の中から、目的元素の発光強度変化にできるだけ近いものを選び、カドミウムの 226.502nm はイットリウム 360.074nm、鉛の 220.353nm はイッテルビウムの 289.138nm、スズの 283.998nm はインジウムの 325.609nm で補正を行ったところその相対発光強度比S_rは表6～8のようになり適切な補正が行われた。一方

表6 Cd 226.502nmをY 360.074nmで補正したときの相対発光強度比S_r

		硫酸(ml)			
		0	0.5	1.0	2.0
Na ⁺ ($\mu\text{g/ml}$) (試験溶液中)	0	1.00	0.98	0.97	0.96
	100	1.00	0.99	0.99	0.98
	200	1.01	1.00	1.00	0.99
	300	1.01	1.00	0.99	0.99
	400	1.01	1.00	1.00	0.99
	500	1.01	1.01	1.00	0.99

表7 Pb 220.353nmをYb 289.138nmで補正したときの相対発光強度比S_r

		硫酸(ml)			
		0	0.5	1.0	2.0
Na ⁺ ($\mu\text{g/ml}$) (試験溶液中)	0	1.00	0.99	0.98	0.97
	100	1.00	0.97	0.97	0.95
	200	0.98	0.98	0.98	0.97
	300	0.99	0.99	0.97	0.97
	400	0.99	0.97	0.98	0.98
	500	0.99	1.00	0.99	0.98

表8 Sn 283.998nmをIn 325.609nmで補正したときの相対発光強度比S_r

		硫酸(ml)			
		0	0.5	1.0	2.0
Na ⁺ ($\mu\text{g/ml}$) (試験溶液中)	0	1.00	1.03	0.98	0.97
	100	0.98	1.02	1.02	1.02
	200	0.99	1.02	1.02	1.00
	300	1.00	1.00	1.01	0.99
	400	0.98	1.01	1.00	1.00
	500	1.01	1.06	1.01	1.01

表9 実サンプル添加回収試験結果 (n = 3)

サンプル	回収率	Cd	Pb	RSD	Sn	As	RSD	回収率	RSD
		RSD			回収率				
スポーツドリンク	100.1	0.6	99.8	0.3	104.2	1.4	104.3	2.1	
炭酸飲料	99.8	0.7	96.8	1.6	98.2	1.8	102.6	1.8	
りんご果汁	100.8	0.7	97.4	1.3	96.3	1.6	101.3	1.4	
乳飲料	101.2	0.9	92.1	2.1	93.1	2.4	103.6	1.6	

ヒ素は同様の傾向を示す内標準元素の分析線がなかった。しかし、マトリックスの影響をほとんど受けていないため、補正せずに定量が可能であると考えられる。

実サンプルによる検証とまとめ

この結果について実サンプルを用いて検証を行った。サンプルは、事前にカドミウム、鉛、スズ、ヒ素が検出されなかった市販の清涼飲料水（スポーツドリンク、炭酸飲料、りんご果汁および乳飲料）それぞれ20gにCd(0.1 μ g/g)、Pb(0.4 μ g/g)、Sn(5.0 μ g/g)、As(0.2 μ g/g)となるように標準用液を添加して、硫酸分解した後内標準元素を加えて50mlに定容した。この試験溶液を測定し内標準元素で補正したところ、4元素ともに90～

105%の回収率が得られ、相対標準偏差が3%以内と良好な結果が得られた（表9）。このように適切な内標準元素及びその波長を選ぶことで、マトリックスの影響を有効に補正することが可能であり、清涼飲料水に規格基準のある4元素について同時測定することができた。

（平成19年7月20日受理）

参考文献

- 1) 日本食品衛生協会, 食品衛生検査指針 理化学編 2005, 421-435
- 2) 原田紘幸, ICP発光分光分析の基礎と応用, pp185-216, 講談社サイエンティフィック, 東京(1986)

短報

ミネラルウォーター中の全有機炭素(TOC)の分析方法の検討

岩淵真樹, 長谷川一夫

Studies on the method for determination of Total Organic Carbon in mineral water

Masaki IWABUCHI and Kazuo HASEGAWA

はじめに

平成15年5月30日水道水の水質基準が改正され¹⁾, 有機物量の指標が過マンガン酸カリウム消費量からTOC(全有機炭素)の量に移行された。

一方, 水道水の味への不満や安全性への不安から, ミネラルウォーターが飲料水として使われその需要が年々増加してきている²⁾。食品衛生法でのミネラルウォーターの規格基準によれば, その原水にのみ過マンガン酸カリウム消費量の基準値が設定されている³⁾が, こちらも将来TOCに移行することが考えられる。しかし, 水道水と異なりミネラルウォーターの中にはたとえばカルシウム, マグネシウム及びナトリウムなどの共存物質を多く含むものがある。この中には, pHに対して緩衝作用のある成分や無機炭素(IC)も含まれるため, 水道法に準拠した方法⁴⁾でTOCを測定しようとする際には適正なpH設定やICの完全除去が難しく, 条件設定に注意が必要となる可能性がある。合田ら⁵⁾は, 2種類のミネラルウォーターを試料として, IC除去のための通気時間の検討を行い, 多量のICを含む場合は通常より通気時間を長くすることが必要であることを報告している。

そこで, 今回我々は多種類のミネラルウォーターを試料として, TOC測定の適正な条件を把握することを目的に, pHを3以下にした後, 通気処理する方法⁶⁾における測定時の酸添加率及び通気時間を検討したので報告する。

方 法

1 試料

試料は県内に流通している国産及び輸入のミネラル

ウォーター, 53試料とした。試料番号は試料入手順にNoを付けた。No.13, No.14, No.15, No.25, No.26, No.36及びNo.38の試料は炭酸入り又は発泡性と表示されていた。

2 試薬及び標準溶液

1N塩酸($f=1.000$)は和光純薬工業の容量分析用を, 2N塩酸は同社精密分析用塩酸をTOC用超純水で希釈して調製しそれぞれ用いた。

TOC標準液は和光純薬工業の水質試験用フタル酸水素カリウム標準液(Cとして: 1mg/ml水溶液)をTOC用超純水で希釈し, 0.1, 0.5及び1.0mg/lになるように調製して用いた。

IC標準液はナカライテスクの無水炭酸ナトリウム(試薬特級)をTOC用超純水で溶解して, Cとして1mg/mlとなるように調製してIC標準原液とした後, これをTOC用超純水で希釈して, 10, 20, 50及び100mg/lになるように調製して用いた。

3 装置

TOC計: 島津製作所製TOC-V_{CPH}(燃焼酸化方式/非分散形赤外線ガス分析)

陽イオンクロマトグラフ: 日本ダイオネクス社製DX120

電気伝導率計: 東亜ディーケーケー社製CM-21P

pHメーター: 堀場製作所社製F-22

TOC用超純水製造装置: Barnstead社製NANOpure DiamondUV

4 測定条件

1) TOC

ICの処理法: 酸性化通気処理法

通気処理タイプ: TOC計本体内部でのスパージ

注入量: 800 μ l

酸添加率: 2N塩酸を試料量の1.5%, 酸の添加量が不足する場合は増加

通気時間: 0.5~4.5分

キャリアガス: 高純度空気G3

キャリアガス流量: 130ml/分

燃焼温度(高感度触媒): 680°C

2) IC

注入量: 50 μ l

IC反応器: ICをリン酸酸性でCO₂ガスへ変換

5 検討方法

TOC測定に影響を与える試料中の濃度指標として, 硬度, 電気伝導率及びICを選択し, 以下の検討を行った。

1) 硬度及び電気伝導率と酸添加率との関係の検討

硬度は容器表示の値を用いた。表示されていない試料については陽イオンクロマトグラフを使用して, カルシ

ウム、マグネシウムイオン濃度を測定した後、換算して硬度を求めた。電気伝導率は電気伝導率計を用いて測定した。試料中の炭酸イオン、炭酸水素イオンが99.96%以上炭酸になる条件であるpH3以下にするのに必要な酸添加量は、ガラス容器に試料量30ml採取した後、1N塩酸を用いて攪拌しながら30 μ lずつ滴下し、pHが3以下となる量で求めた。酸添加率は試料量に対する酸添加量からパーセント換算して求めた。

2) 通気時間の検討

TOC測定を通気時間1.5分と3.5分の両条件で行い、測定値に差がある試料については通気時間を変化させて最適通気時間を求めた。測定値に差がない試料のうち2試料についても参考のため、通気時間を変えて最適通気時間を求めた。通気時間に関係がある濃度指標としてICの測定を行った。

結果及び考察

1 検量線及び再現性

TOC標準液を用いて0～1mg/lの範囲で検量線を作成したところ、相関係数0.999以上の良好な直線性が得られた。表1にTOC用超純水と0.1mg/l標準液の再現性を示した。それぞれ平均値は0.027mg/l, 0.111mg/l, 変動係数は14.9%, 6.3%であった。有機物の定量下限値は、水道水の試験方法では変動係数20%を満足する濃度⁶⁾とあることから0.03mg/lを定量下限値とした。0.1mg/lの標準液は再現性が非常に良好であったが、0.5mg/l未満の低濃度での再現性を良好に保つにはTOC用超純水の純度の確保、容器及び手等からの有機物汚染に細心の注意を払った。

表1 TOC用超純水と標準液の再現性

試料	TOC用超純水	0.1mg/l標準液*)
—	—	0.101
	0.032	0.112
	0.027	0.118
	0.026	0.110
	0.020	0.109
	0.029	0.108
	0.027	0.122
AV	0.027	0.111
SD	0.004	0.007
CV(%)	14.9	6.3

*)調製に使用したTOC用超純水のTOC濃度は0.010mg/l

2 硬度及び電気伝導率と酸添加率の検討

試料のpHを3以下にするのに要する酸添加率は硬度に依存すると推測し、53試料の硬度と1N塩酸の添加率の

関係を求めた。結果は、図1に示すように硬度は1未満～1,610mg/l, 酸添加率は0.1～10.4%に分布していた。硬度が高くなるにしたがって、酸添加率も高くなる傾向を示し、相関係数は0.593で有意な相関 ($p<0.001$) が認められた。酸添加率が一番高い1試料を除く52試料の硬度と酸添加率の関係を図2に示した。この場合の相関係数は0.610であった。同程度の硬度でも酸添加率に差がみられる場合があった。これは、硬度が高くなるにしたがってイオン濃度も高くなるが、硬度が同じでも含まれるイオンの性質によってpHの緩衝性に差があることに基づくと思われる。島津全有機炭素計TOC-Vメンテナンス講習会資料によれば、多種多様な水試料は2N塩酸1.5%添加で、通常の水道水、飲料水や水道原水は1N塩酸1.5%添加で、また、硬度の低い水道水は0.5N塩酸1.5%添加で測定できると記載されている。52試料は1N塩酸3% (2N塩酸1.5%) で十分であったが1試料は10%を超える酸が必要であった。水道水水質基準の約2倍の硬度700mg/l以下であれば1N塩酸1.5%で十分であることが確認できた。

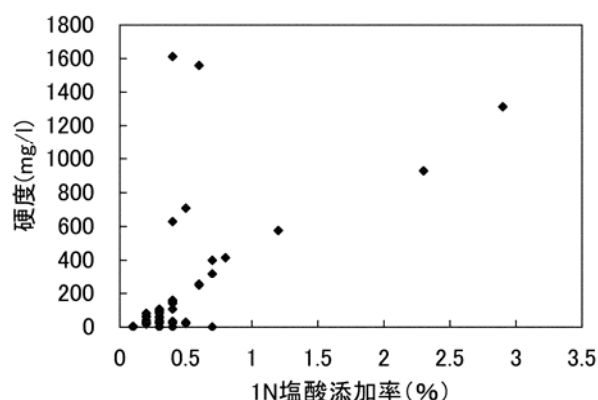
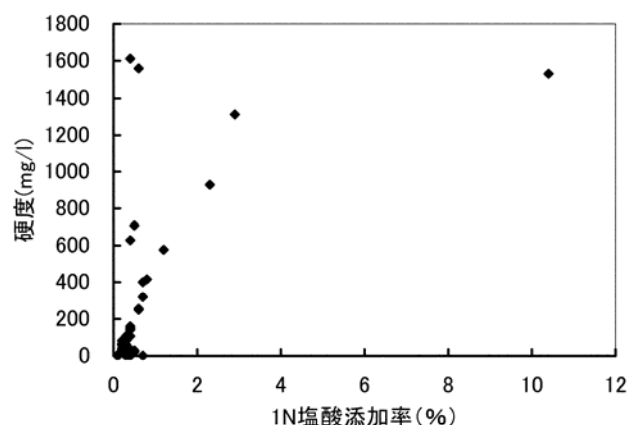


図2 硬度と酸添加率の関係(n=52)

次に、試料のpHを3以下にするのに要する酸添加率は硬度よりイオン濃度の総量を示す電気伝導率に依存するのではないかと推測し、53試料の電気伝導率と酸添加率の関係を求め、図3に示した。電気伝導率は6,53~8,050 $\mu\text{s}/\text{cm}$ で、相関係数は0.942であった。酸添加率が一番高い1試料を除く52試料の電気伝導率と1N塩酸の添加率の関係を図4に示した。このときの相関係数は0.724が得られた。硬度の場合と同様に電気伝導率が高くなるにしたがって、酸添加率も高くなる傾向を示し、同程度の電気伝導率でも酸添加率に差がみられる場合があったが、相関係数を比較したところ電気伝導率の方が硬度よりも酸添加率と高い相関が認められた。以上の結果から、硬度又は電気伝導率が高い試料については酸添加率を考慮する必要がある。なお、図2に示した硬度と酸添加率の関係、図4に示した電気伝導率と酸添加率の関係から、それぞれ2グループの傾向が見うけられるが、原因を解明するには至らなかった。このことは今後検討する必要があるものと考えられる。

3 通気時間の検討

53試料について、通気時間1.5分と3.5分で、TOC濃度を比較した結果を図5に示した。各通気時間ともTOC濃度は0.6mg/l未満で、50%以上が0.2mg/l未満の低い値であった。有機物の定量下限値に求められる測定精度20%未満⁶⁾を考慮に入れ、1.5分と3.5分の値を比較した結果、48試料は1.5分から3.5分に延長してもTOC濃度の減少は20%以内であったので通気時間は1.5分で十分と考えられた。しかし、残り5試料については、3.5分のTOC濃度は、1.5分の20%以上減少し1.5分では通気時間が不足と考えられた。これらの試料はすべて炭酸入りの表示がされていた。53試料のIC濃度を測定した結果を図6に示した。濃度範囲は0.5~1,470mg/lで炭酸入りの表示が無い46試料のICは80mg/l未満であったが、炭酸入

りの表示がある7試料のICは347mg/l以上であった。その中の5試料がIC656mg/l以上で、通気時間1.5分では通気時間が不十分な試料と一致した。IC濃度の高い2試料(No.25, No.38)と一般的な井戸水のIC濃度2試料(No.30, No.43)のTOC濃度と通気時間との関係を図7に示した。正確なTOC濃度を得るための通気時間は、試料No.43(IC=5.6mg/l)は1.0分、試料No.30(IC=30.1mg/l)は

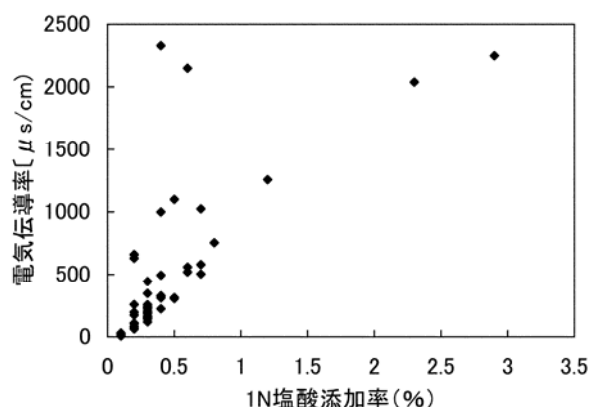


図4 電気伝導率と酸添加率の関係 (n=52)

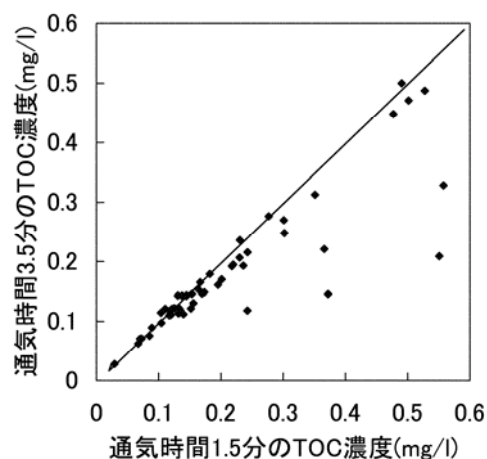


図5 通気時間 1.5 分と 3.5 分の TOC 濃度比較

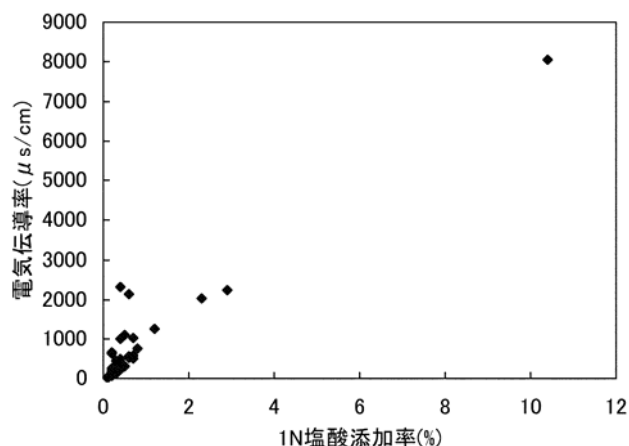


図3 電気伝導率と酸添加率の関係 (n=53)

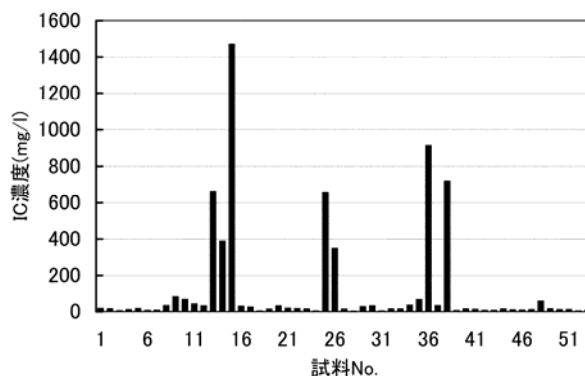


図6 ミネラルウォーターの IC 濃度

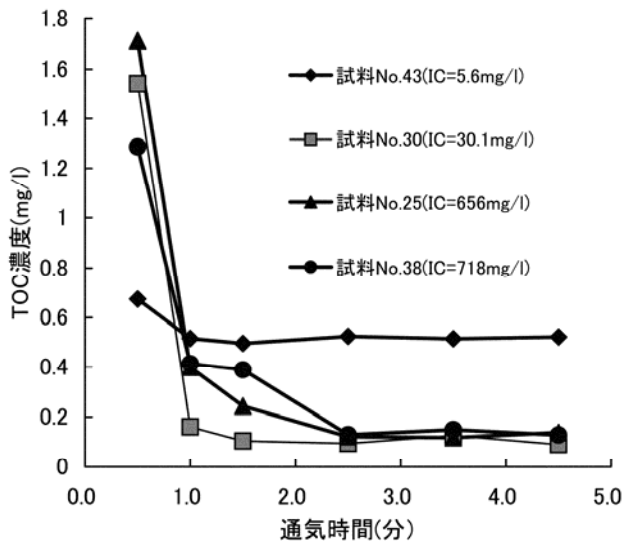


図7 通気時間による TOC の変化

1.5分、試料No.25(IC=656mg/l)は2.5分、試料No.38(IC=718mg/l)は2.5分以上でIC濃度が高い試料は通気時間を長くする必要があった。島津全有機炭素計TOC-Vメンテナンス講習会資料によれば、水道水は通気時間1.5分で十分と記載されている。今回、IC387mg/l以下の試料では1.5分以下の通気時間で十分であったが、炭酸入りの表示があり、ICを多く含むと予想される試料については通気時間を検討する必要があるものとする。

まとめ

ミネラルウォーター53試料を用いて、酸性化通気処理法での測定時の硬度及び電気伝導率と酸添加率の関係並びにIC濃度と通気時間の関係について検討した。

1 硬度及び電気伝導率ともに酸添加率と相関が認められ、電気伝導率は硬度より高い相関が得られた。52試料は1N塩酸3%の添加で十分であったが、硬度及び電気伝導率の高い1試料は1N塩酸10%以上が必要であった。硬度または電気伝導率が高い試料については酸添加率を考慮する必要がある。

2 48試料は通気時間1.5分で十分であったが、ICが656mg/l以上の5試料は1.5分以上の通気時間が必要であった。炭酸入りの表示があり、ICを多く含むと予想される試料については通気時間を検討する必要がある。

(平成19年7月20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) 日本ミネラルウォーター協会：ミネラルウォーターの一人当たり消費量の推移
<<http://www.minekyo.jp/sub.htm>>
- 3) 厚生省告示第370号 (1959), 昭和34年12月28日
- 4) 厚生労働省告示第261号 (2003), 平成15年7月22日
- 5) 合田悟ほか：燃焼酸化赤外線分析法による水中の全有機炭素(TOC)分析法の検討, 北海道立衛生研究所報, **54**, 47-49 (2004)
- 6) 上水試験方法2001年版, 日本水道協会, 東京 (2001)

短報

市販鶏肉におけるカンピロバクター・ ジェジュニの汚染状況および 分離菌株の解析

古川一郎, 伊達佳美, 相川勝弘
浅井良夫, 尾上洋一

Prevalence of *Campylobacter jejuni* from retail chicken and epidemiological study of isolates

Ichiro FURUKAWA, Yoshimi DATE
Katsuhiko AIKAWA, Yoshio ASAI
and Yoichi ONOUE

緒言

近年, 国内外で *Campylobacter jejuni* による食中毒が多発して問題となっており^{1,2)}, *C. jejuni* は最も重要な食中毒原因物質の一つとなっている. 本菌は, 食肉のうち特に鶏肉において汚染率が高いことから³⁻⁵⁾, 鶏肉の生食や加熱不足または調理場等における二次汚染が食中毒の主な原因とされ, *C. jejuni* 汚染の低減に向けた対策が急務となっている. また患者由来の *C. jejuni* 分離株については, ニューキノロン系薬剤に対する耐性菌の増加が問題となっている^{1,6)}. 今回, 市販鶏肉における *C. jejuni* の汚染状況を把握することを目的とし, *C. jejuni* の分離を試みるとともに最確数 (MPN) を求め, 分離菌株について薬剤感受性試験を行った. さらに, 集団および散発下痢症患者に由来する *C. jejuni* は複数の血清型が報告されており⁷⁾, 主要な感染原因食品である鶏肉から分離される *C. jejuni* についてその多様性を遺伝子レベルで把握するため, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による分子疫学的解析を行ったので報告する.

材料と方法

1. 調査対象: 2005年6月から2006年5月に神奈川県内の8店舗 (A~H店) で市販されていた国産鶏肉35検体を調査対象とした.
2. 鶏肉からの *C. jejuni* の分離同定: 検体25gにプレストン増菌培地 (Oxoid) 100mlを加えてホモジナイズし,

5倍乳剤を作製して試料原液とした. 試料原液10mlを試験管に分注して42℃で22~24時間微好気培養後, 増菌培養液をプレストン寒天培地 (Oxoid) およびCCDAサプリメント (Oxoid) 添加カンピロバクター血液無添加選択寒天培地 (Oxoid) に1白金耳ずつ接種し, 42℃で44~48時間微好気培養した. 平板培地上の疑わしい集落を1検体あたり6~10株釣菌し, 5%羊脱せん血 (日本バイオテスト) 加Blood Agar Base No.2 (Oxoid) 平板培地で純培養後, 常法⁸⁾に従い *C. jejuni* を同定した. 分離同定した *C. jejuni* は, 市販のカンピロバクター免疫血清 (デンカ生研) を用いてPennerの血清型別試験を行った.

3. 鶏肉における *C. jejuni* の菌数測定: 菌数の測定はMPN3本法で行った. すなわち, 上記の試料原液10mlを3本の空の試験管に分注し, さらにプレストン培地9mlを3本ずつ分注した試験管に試料原液, 10倍希釈液および100倍希釈液をそれぞれ1mlずつ加えた. 培養条件は上記の分離同定の項と同様にして行い, 分離平板培地にはプレストン寒天培地を使用した.

4. 分離菌株の薬剤感受性試験: テトラサイクリン (TC), エリスロマイシン (EM), ゲンタマイシン (GM), クロラムフェニコール (CP), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), オフロキサシン (OFLX), シプロフロキサシン (CPFX) の8薬剤について, センシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いたKirby-Bauer法により分離菌株の感受性試験を行った. すなわち, 分離菌株をNutrient Broth No.2 (Oxoid) で微好気培養し, 培養液を0.5%NaCl加Mueller Hinton寒天 (Difco) に塗抹した後に各々のディスクを置き, 37℃で48時間微好気培養して阻止円を計測した.

5. PFGEによる分子疫学的解析: 分離菌株を血液寒天培地で37℃, 48時間微好気培養後, Ribotら⁹⁾の方法に従って電気泳動用試料 (プラグ) を作製した. プラグは制限酵素 *Sma* I (Takara) で処理後, 1% Pulse Field Certified Agarose (BioRad) を電気泳動用アガロースとしてCHEF-DR III (BioRad) を用いて電気泳動を行った. 泳動条件は, 電圧6V/cm, パルスタイム6.8秒から38.4秒, バッファー温度14℃, 泳動時間19時間に設定した. 電気泳動後の泳動像はTIFFファイルとして保存し, FingerPrint II (BioRad) を用いてデータ解析を行った.

結果

各検査実施日における汚染率およびMPN法により算出した汚染菌数の結果を表1に示した. 7回に分けて実施

した調査すべてで *C. jejuni* が分離され、市販鶏肉35検体のうち、17検体 (48.6%) が *C. jejuni* 陽性であった。さらに汚染菌数をMPN法により算出した結果、1検体は $1.5 \cdot 10^1/100g$ 、9検体は $10^1 \cdot 10^2/100g$ 、4検体は $10^2 \cdot 10^3/100g$ 、3検体は $>10^3/100g$ となり、平均値は $3.6 \times 10^2/100g$ であった、菌数の範囲は $7.0 \cdot 2.3 \times 10^3/100g$ であった。

各検体から分離された *C. jejuni* の血清型別試験、薬剤感受性試験およびPFGE型別結果を表2に示した。血清型別試験を分離代表株について行ったところ、型別不能 (UT) が最も多く、以下B群、F群、Y群、C群等の順であった。薬剤感受性試験は、市販鶏肉17検体から分離された *C. jejuni* 150菌株について行い、14検体から分離した71菌株 (47.3%) が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。35菌株 (23.3%) がTC単独、24菌株 (16.0%) がTC、NA、NFLX、OFLXおよびCPFXの5剤、12菌株 (8.0%) がNA、NFLX、OFLXおよびCPFXの4剤に耐性を示し、NFLX、OFLXおよびCPFXのニューキノロン系薬剤に対し36菌株 (24.0%) が耐性であった。

市販鶏肉17検体から分離された *C. jejuni* 150菌株について、*Sma* I 処理によるPFGEの結果をFingerPrint II により解析したところ、分離菌株は合計42のPFGE型に識別された。*C. jejuni* 陽性17検体のうち12検体から複数パターン of *C. jejuni* の分離が確認され、1検体あたりのPFGE型の数は平均2.9であった。分離菌株におけるPFGE型と血清型別試験の比較では、B群はPFGE型が10種、C群およびY群はそれぞれ5種、F群、G群およびK群はそれぞれ3種に分けられた。PFGE型と薬剤感受性試験の比較では、分離菌株間で薬剤耐性パターンが異なる

場合はPFGE型も異なり、TC単剤耐性株は10種、5剤および4剤耐性株はそれぞれ5種に分けられ、ニューキノロン系薬剤に耐性を示した分離菌株は10種であった。店舗別に解析した結果、店舗A由来の3菌株は、店舗B由来の1菌株または店舗E由来の2菌株のいずれかと同一のPFGE型を示した。

考 察

市販鶏肉35検体中17検体 (48.6%) から *C. jejuni* が分離され、鶏肉における *C. jejuni* の汚染が改めて確認された。MPN法により求めた *C. jejuni* の汚染菌数は、平均で $3.6 \times 10^2/100g$ を示し、 $10^3/100g$ 以上が3検体確認された。これまでに、鶏肉の *C. jejuni* 汚染実態については多くの報告があり³⁻⁵⁾、報告者により異なるものの、国産鶏肉における *C. jejuni* の汚染率は40~60%あるいはそれ以上とされ、今回も同様の結果が得られた。*C. jejuni* による食中毒は温暖な時期に増加する傾向を示すが冬季においても発生しており¹⁾、今回も調査実施日すべてで *C. jejuni* が分離され、鶏肉については年間を通して衛生対策が必要であることが改めて示された。さらにBlackらは、ヒトにおける *C. jejuni* の発症菌量が $10^2 \sim 10^3$ 個以上であることを報告しており¹⁰⁾、今回の汚染菌数の調査結果では $10^2/100g$ 以上の菌数が35検体中7検体で確認され、生肉の不適切な取扱いや加熱不足による発症の可能性が考えられることから、消費者を含めた生肉の取扱者に対し *C. jejuni* 食中毒防止に向けたさらなる啓発が必要と思われた。

薬剤感受性試験の結果、今回調査を行った35検体中9検体 (25.7%) からニューキノロン系薬剤およびナリジクス酸耐性株が分離された。国内においては、散发事例

表1 市販鶏肉における *C. jejuni* 陽性率および菌数の分布

検査実施日	陽性検体数 ／検査検体数	菌数 (MPN /100g)				
		<1.5 *	$1.5 \cdot 10^1$	$10^1 \cdot 10^2$	$10^2 \cdot 10^3$	$>10^3$
2005.6.13	2/5	3		2		
6.27	2/5	3	1	1		
8.8	2/5	3		2		
9.27	5/5			1	1	3
11.21	4/5	1		2	2	
2006.3.13	1/5	4		1		
5.22	1/5	4			1	
計	17/35 (48.6%)	18	1	9	4	3

* 検出限界以下

表 2 店舗、検体別菌数と分離代表株の血清型および *C.jejuni* 分離株における薬剤耐性パターンと PFGE 型

店舗	検体		Penner 血清型 (分離代表株)	分離菌株の性状	
	No.	MPN/100g		薬剤耐性パターン(株数)	PFGE 型
A	2	7.5x10 ¹	F 群,D 群,UT	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (3)	27*
				TC (3)	26
				感受性 (2)	16*,24
	3	7.5x10 ¹	C 群,F 群,UT	NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	9,25
				感受性 (4)	12
	18	2.3x10 ³	C 群,Y 群,UT	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	27*
				NA,NFLX,OFLX,CPFX (1)	39
				TC (6)	4,29*,42
				感受性 (1)	31
	19	4.7x10 ²	B 群,C 群,Y 群, UT	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (3)	27*
				NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	38
				TC (2)	29*
				感受性 (3)	5,31
B	7	7.0x10 ¹	B 群,F 群	TC (3)	8
				感受性 (5)	6,7
	8	1.8x10 ²	F 群	TC (6)	8
	17	1.2x10 ³	B 群,Y 群,UT	TC (5)	29*,33,37
				感受性 (5)	35,36,40
C	11	5.5x10 ¹	A 群,P 群,Y 群	TC (2)	22,
				感受性 (8)	30,41
	33	1.2x10 ²	B 群,G 群	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	10,
				感受性 (8)	13,14,15
D	14	4.6x10 ¹	K 群	感受性 (9)	1,2
	20	1.2x10 ³	B 群	感受性 (10)	34
E	16	7.5x10 ¹	B 群,K 群,UT	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	27*
				感受性 (4)	16*,23
F	21	1.8x10 ¹	UT	NA,NFLX,OFLX,CPFX (7)	20
	23	1.8x10 ¹	A 群,B 群	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (3)	28
				感受性 (7)	19
G	24	1.5x10 ²	Y 群,Z6 群	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (9)	17,18
				TC (1)	3
	25	2.2x10 ²	R 群,UT	TC (7)	32
				感受性 (3)	21
	30	4.6x10 ²	UT	感受性 (10)	11

* 異なる店舗間で同一の PFGE 型

患者由来 *C. jejuni* のニューキノロン系薬剤耐性株の分離率が、30～40%程度を推移し増加傾向にあることから¹⁾、今後も継続したモニタリングが必要である。耐性菌の増加については、ニューキノロン系薬剤の家畜への使用が主な原因とされ⁶⁾、患者由来菌株と同様、市販の鶏肉を中心とした食品からの *C. jejuni* 分離菌株について解析する必要性は高いものと思われる。現在、*C. jejuni* による下痢症の治療にはエリスロマイシンが第一選択薬剤として使用されるが、今回分離された *C. jejuni* については、エリスロマイシン耐性株は確認されなかった。米国では、小売りの鶏肉からエリスロマイシン耐性 *C. jejuni* が分離されており⁶⁾、ニューキノロン系薬剤も含め、耐性株の動向について監視することが必要と思われる。

C. jejuni による食中毒事例では、患者および原因施設で処理された鶏肉から複数の血清型およびPFGE型が分離されることが報告され¹¹⁾、市販鶏肉の *Campylobacter* 汚染については、食鳥処理場における相互汚染が主な原因であることが指摘されている⁴⁾。今回も血清型別試験およびPFGE による解析において、*C. jejuni* 陽性の17検体中12検体から複数パターンの *C. jejuni* が分離され、市販鶏肉における菌株の多様性が確認されたことから、鶏肉から *C. jejuni* を分離するには複数のPFGEパターンが検出されることを常に考慮すべきものと思われた。今回、異なる店舗で販売された鶏肉から、同一のPFGEパターンを示す *C. jejuni* が確認され、食鳥処理場あるいは仕入れ先等における複合汚染が示唆された。*C. jejuni* の遺伝子型別法においてはPFGEの識別能は高く¹²⁾、事例発生時の汚染源追求に有効であるが、事例発生時の感染源および感染経路を解明するためには、可能な限り多くの菌株を分離することが必要と思われた。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) カンピロバクター腸炎：病原微生物検出情報, **27** (2006)
- 2) Altekruuse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I. and Swerdlow, D.L. : *Campylobacter jejuni* -an emerging foodborne pathogen, *Emerg. Infect. Dis.*, **5**, 28-35 (1999)
- 3) 滝沢金次郎, 浅井良夫：食品におけるカンピロバクターの汚染状況, 獣畜新報, **790**, 310-315 (1987)
- 4) 伊藤武, 高橋正樹, 斉藤香彦, 柳川義勢, 甲斐明美, 大橋誠：市販食肉および食肉店舗や食鳥処理場の環境における *Campylobacter* の汚染状況ならびに分離菌株の血清型別に関する研究, 感染症誌, **62**, 17-25 (1988)
- 5) Ono, K. and Yamamoto, K. : Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama Japan, *Int. J. Food. Microbiol.*, **47**, 211-219 (1999)
- 6) Gupta, A., Nelson, J.M., Barrett, T.J., Tauxe, R.V., Rossiter, S.P. and Friedman, C.R. et al.: Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001, *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 1102-1109 (2004)
- 7) カンピロバクター腸炎：病原微生物検出情報, **20** (1999)
- 8) 伊藤武：新訂食水感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編, 中央法規出版, pp.336-362, 東京 (2000)
- 9) Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B. and Barrett, T.J. : Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 1889-1894 (2001)
- 10) Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P. and Blaser, M.J. : Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans, *J. Infect. Dis.*, **157**, 472-479 (1988)
- 11) 小野一晃, 土井りえ, 安藤陽子, 大塚佳代子, 柴田穰, 尾関由姫恵ほか：カンピロバクター食中毒における患者便および食品からの分離菌株の型別, 日食微誌, **21**, 151-155 (2004)
- 12) Wassenaar, T.M. and Newell, D.G. : Genotyping of *Campylobacter* spp, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1-9 (2000)

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穀類中の カビ毒，デオキシニバレノールの分析

甲斐茂美，赤星 猛，藤巻照久

Analysis of deoxynivalenol in grain using liquid chromatography / tandem mass spectrometry

Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI
and Teruhisa FUJIMAKI

はじめに

デオキシニバレノール(DON)は，一般に赤カビとよばれるフザリウム(*Fusarium*)属の真菌により産生されるトリコテセン系カビ毒の一種である(図1)．DONは植物病原性を有するフザリウム属菌が，小麦，大麦，トウモロコシ等の主要穀類に圃場で感染し産生されることから，食品汚染の原因となっている．トリコテセン系カビ毒の毒性は，タンパク合成阻害，核酸合成阻害，免疫毒性等があり，急性毒性としては，嘔吐，下痢などの消化管障害を呈する¹⁻³⁾．フザリウム属の真菌は我が国の土壤にも生息しており，日本の気象条件でもトリコテセン系カビ毒の生産が可能で，国産農産物への汚染が問題となっている^{3,4)}．食品中のDONの規制は，欧米諸国を中心に300～2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に設定されている⁴⁾．我が国では平成14年に小麦中のDONに対し1.1ppmの暫定基準値が設定された．DONの試験法は，定性及び定量試験として紫外分光光度型検出器付高速液体クロマトグラフィー(UV-HPLC)法が，確認試験として液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC-MS)またはガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC-MS)が厚生労働省通知に示されている⁵⁾．しかし，DONのUV-HPLCでの測定波長220nmは，多くの有機化合物が吸収を持つため選択性が低く夾雑物質の影響を受けるので，定量性に問題がある．またGC-MS法ではDONを誘導体化する必要がある．抽出操作が煩雑である．LC-MS法について，Agilent社製LC/MSD1100シリーズSLで検討したところ，イオンソースをAPCIとしネガティブモードで，移動相に酢酸アンモニウムを加え

測定するとき，DONの酢酸付加イオンである $[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$ の m/z 355を定量イオンとし測定することが可能であった．しかし，食品によってはDONの測定イオンと同様の m/z を有する夾雑物質により測定が妨害される恐れがあった．また，APCIの測定では，移動相にアセトニトリルを用いると，コロナニードルの先端が炭化しやすくなり，感度低下を起こす要因となるので，移動相の有機溶媒の選択に制限が生じた．

一方，近年普及してきた高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置(LC-MSMS)の活用は，食品由来の夾雑成分中から多数の目的物質を精度よく検出するために，DONの分析において非常に有効であると思われる．著者らは，従来からイオントラップ機能を有するLC-MSMSが，プロダクトイオンスキャン(EPI)やマルチプルリアクションモニタリング(MRM)等の機能により，高感度測定と構造解析能を合わせ持ち，高い選択性を有することに着目し，検査の確認に活用してきた⁶⁾．そこで，今回DONの分析法としてイオントラップLC-MSMSによる確認法及び定量法を確立し，日常検査への適用について検討したので報告する．

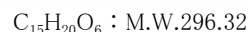
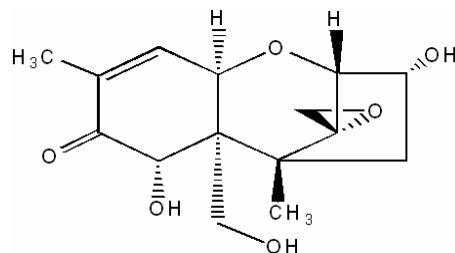


図1 デオキシニバレノールの構造式

実験方法

1. 試料及び試薬

試料は神奈川県内で販売されていた小麦(玄麦)を分析対象とし，粉碎混合したものを用いた．

デオキシニバレノール標準品は和光純薬工業(株)製を用いた．標準品10mgを精秤し，アセトニトリルに溶解して100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ としたものを標準原液とした．標準原液をメタノール-水(10:90)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 # 227を用いた．ガラス繊維ろ紙はWhatman社製GF/B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，他は特級を用いた．

2. 装置及び分析条件

LC-MSMSはApplied Biosystems社製QtrapTM LC-MSMSを用い，イオン源はESIを使用した．イオン化

モードはネガティブ、イオンスプレー電圧 -4.2kV、イオン源温度480℃、ネブライザーガス圧は70psiで測定した。MRMモードではプレカーサイオンは m/z 295、プロダクトイオンは定量イオン m/z 265(コリジョンエネルギー(CE) -12V) 参照イオン m/z 138(CE -28V)で測定した。分析カラムは東ソー社製 TSK-Gel 100-V(2.1mmid.×150mm, 3 μ m)を用い、カラム温度40℃、移動相はアセトニトリル-2mM酢酸アンモニウムを用い、0-20min ; (5:95)から(50:50)までの直線グラジエント、流速0.2ml /minで送液し、注入量5 μ l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⁵⁾に準じて行った。粉碎均一化された試料の25.0gを三角フラスコに量り採り、アセトニトリル-水(85:15)100ml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た後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過した。多機能ミニカラムに抽出液10mlを注入し、毎分1ml以下の流速で流出させた。初流通過液約3mlを捨て、DONが流出する分画の約5mlを採取した。この流出液の4.0mlをナス型フラスコに正確に採り、45℃以下で溶媒を除去した。残留物にメタノール-水(10:90)1.0mlを加えて溶かした後、13000rpmで5分間遠心分離し、上澄液を試験溶液とした。

結果と考察

1. LC-MSMS測定条件について

1)EPI分析条件

分析の選択性を高めるために、構造情報の得られる、イオントラップLC-MSMS特有の機能のEPIモードの測定条件について検討した。DONはイオン源をESIとし、ネガティブモードでイオン化が可能であった。DON標準溶液について、 $[M-H]^-$ のプレカーサイオンと、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。CE=-10Vのときは $[M-CH_2O]^-$ の m/z 265のフラグメントイオンが大きく現れ、CE=-30Vのときは代わって m/z 138のフラグメントイオンが大きく現れた。 $[M-H]^-$ と他のフ

ラグメントイオンが共に検出されるCE=-25Vを最適条件とした(図2)とき、EPIによる分析では0.25ngまでの範囲で同様のスペクトルが得られた。これらのスペクトルは化合物の構造情報を反映しており、定性分析の指標として有効であると考えられた。

2)MRM分析条件

EPIモードよりさらに高感度な測定による定量、確認のためMRMモードによる分析条件について検討した。イオン源をESI、ネガティブモードでイオンソースの最適化を行い、 $[M-H]^-$ である m/z 295をプレカーサイオンとし、 $[M-H]^-$ から派生するプロダクトイオンのうち、最も感度が強く得られた m/z 265を定量イオン、次に感度が強く得られた m/z 138を参照イオンとした。DONのモニターイオンによるクロマトグラムを図3に示した。定量イオンで検量線を作成したところ、0.025~2.5ngの範囲で良好な直線性を示し、検量線の相関係数(r)は0.9999であった(図4)。また0.025, 0.05, 0.5, 1.25, 2.5ng

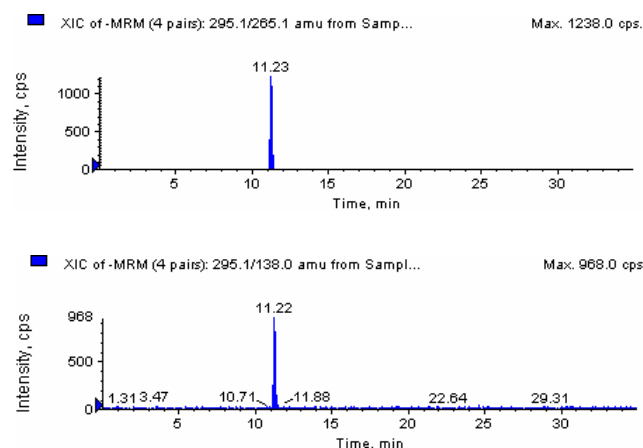


図3 LC-MSMS (MRM) によるDONのクロマトグラム(0.1ppm)
上段: m/z 295→265 (定量イオン)
下段: m/z 295→138 (確認イオン)

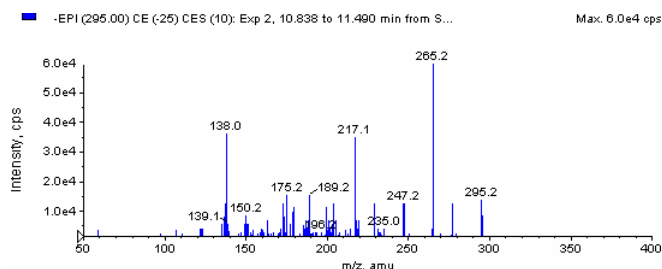


図2 LC-MSMS (EPI) によるDONのスペクトル

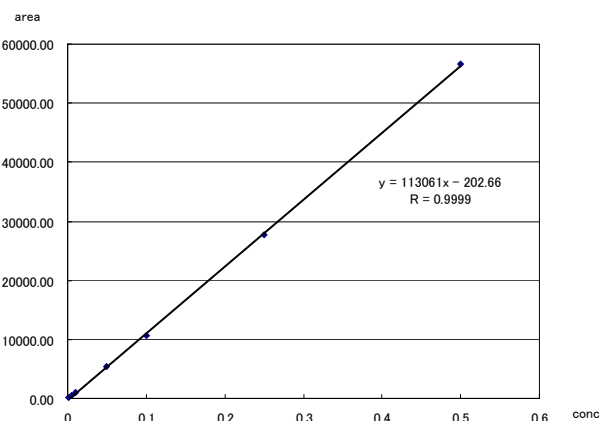


図4 LC-MSMS (MRM) によるDONの検量線

の各注入量における測定を5回行いピーク面積の変動係数を求めたところ、各注入量における変動係数は10%以内であり満足できる分析精度が得られた。検量線の最小濃度付近の標準溶液を5回測定して得られた標準偏差の10倍から算出した定量限界は $0.01 \mu\text{g/g}$ であり、HPLC法で示された定量限界値の $0.1 \mu\text{g/g}$ ⁷⁾を十分満たすものであった。標準偏差の3倍から算出した検出限界は $0.005 \mu\text{g/g}$ であった。

LC-MSMSのMRM分析で物質を同定する方法について、EUのガイドライン⁸⁾では「定量イオンに対する参照イオンの強度比が一定範囲にあることで物質を同定する」としている。そこで注入量の違いが、強度比に及ぼす影響について調べた。DON標準溶液の0.025, 0.05, 0.5, 1.25, 2.5ngの各注入量における定量イオンに対する参照イオンの強度比(R/T)を求めたところ、R/Tの平均値は 0.70 ± 0.07 であった。EUのガイドラインに従うと、R/Tが0.5より大きいときの変動の許容範囲は $\pm 20\%$ となっており、これを今回の検討で得られたDONのR/Tに当てはめると、R/Tの許容範囲は0.56～0.84となった。R/Tの実測値は0.025～2.5ngの範囲で0.68～0.76であり、これはEUのガイドラインで示している許容範囲を十分に満足する値であった。

このことから、定量イオンに対する参照イオンの強度比は、目的物質の注入量に影響されず、強度比が一定の範囲内にあることが明らかになり、MRM測定における物質の同定の指標となることが確認された。

3) 添加回収試験及び残留実態調査

通知法では検査に用いる試料量を50.0gとしているが、市販の食材の一包装量が少量である時を考慮し、試料量を1/2の25.0gとし、抽出溶媒等も1/2に変更することとした。本法を用いて、小麦にDONを $0.1 \mu\text{g/g}$ 及び $0.5 \mu\text{g/g}$ 添加して回収試験(n=5)を行った。 $0.1 \mu\text{g/g}$ 添加のときの回収率は $95.7 \pm 4.6\%$ 、相対標準偏差は4.8%、 $0.5 \mu\text{g/g}$ 添加のときの回収率は $100.1 \pm 3.3\%$ 、相対標準偏差は3.3%と良好であった。

また、本法を用いて平成17～18年度に神奈川県内に流通する小麦(玄麦)6検体についてDONの残留実態調査を実施したところ、いずれも不検出であった。

まとめ

フザリウム(*Fusarium*)属の真菌により産生されるトリコテセン系カビ毒のDONについて、LC-MSMSによる定量・確認法を確立し、日常検査への適用を検討した。LC-MSMSによる測定では、誘導体化等の複雑な前処理を行うことなく、簡便な抽出法で得られたサンプルでの測定が可能であった。また、イオントラップLC-MSMSのEPIやMRMによる分析は、より高感度であり構造情報も得ることができるため、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。DONの類縁体であるニバレノールなど、我が国ではまだ規制値が定められていないが、食品汚染が懸念されるカビ毒が多数知られている。今後はこのようなカビ毒に対しても、LC-MSMS等を用いた分析法を導入し、市販食品のモニタリング調査を進めていきたいと考える。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) 田端節子：食品分析インフォメーションVol.11, 食品衛生研究, **55**, 41-47(2005)
- 2) 田中敏嗣, 芳澤宅實：カビ毒による中毒例と研究のあゆみ, FFIジャーナル, **211**, 997-1003 (2006)
- 3) 小西良子：カビ毒の毒性と作用機序および最近の知見, FFIジャーナル, **211**, 1004-1009 (2006)
- 4) 吉澤宅實：食品のカビ毒汚染, その規制とリスク評価の現状, FFIジャーナル, **211**, 1018-1026 (2006)
- 5) 厚生労働省医薬局食品局食品安全部長通知, : デオキシニバレノールの試験法について(食安発第0717001号, 平成15年7月17日)
- 6) 甲斐茂美, 赤星猛, 岸美智子：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, 神奈川県衛生研究所研究報告, **35**, 13-17(2005)
- 7) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針 理化学編 2005, 585-590, (社)日本食品衛生協会, 東京 (2005)
- 8) European Parliament Decision 2002/657/EC, Official Journal of European Communities L221, 8(2002)

短報

輸入食品中の着色料，スーダン， パラレッドの分析

岸 弘子

Analysis of Dyes, Sudan I, II, III, IV and Para Red in imported foods

Hiroko KISHI

はじめに

スーダン色素およびパラレッドは油溶性の赤色色素で、工業用や化粧品用に用いられ、食品への使用は認められていない。2003年5月にフランスで唐辛子製品からスーダンⅠが検出され、その後、EU諸国や中国、日本で多くの検出事例が報告され^{1,2)}、食品中の分析法も報告されている^{3,4)}。平成18年5月1日には、厚生労働省から試験法が通知された⁵⁾。当所では、輸入食品中の指定外添加物の検査を行っており、検査項目にスーダン色素およびパラレッドを追加するために、通知法を検討し、一部試験法の改良を行ったので報告する。

方 法

1. 試薬等

標準品：スーダンⅠ，Ⅱ，Ⅳおよびパラレッドはシグマ・アルドリッチ社製，スーダンⅢは東京化成工業(株)製を用いた。

逆相HPLC用標準液：スーダンⅠ,Ⅱおよびパラレッドは各10mgにアセトニトリルを加え100mlとし，スーダンⅢおよびⅣは各10mgを20mlの酢酸エチルに溶解後，アセトニトリルを加え100mlとし，標準原液とした。各色素の標準原液5mlを採り，アセトニトリルを加えて100mlとし，逆相HPLC用混合標準液とした(各5 μ g/ml)。

順相HPLC用標準液：スーダンⅠ，Ⅱ，ⅢおよびⅣは各10mgを20mlの酢酸エチルに溶解後，ヘキサンを加えて100mlとし，パラレッドは10mgに酢酸エチルを加えて100mlとし，標準原液とした。各色素の標準原液2mlを採り，ヘキサンを加えて100mlとし，混合標準液とした(各2 μ g/ml)。

TLC用混合標準液：順相HPLC標準原液各2mlを混合し，TLC用混合標準液とした(各20 μ g/ml)。

前処理用カートリッジカラム：Sep-Pak Plus シリカ(690mg,Waters社製)は使用前にヘキサン10mlで，Sep-Pak Plus フロリジル(910mg,Waters社製)およびSep-Pak Plus C18(360mg,Waters社製)はアセトニトリル10mlでコンディショニングして用いた。

オクタデシル化シリカゲル(ODS)薄層板：RP-18 F254s, 10 $\times$ 10cm, Merck社製

シリカゲル薄層板：Kieselgel 60, 10 $\times$ 10cm, Merck社製

2. 装 置

ホモジナイザー：ポリトロンPT-3100 KINEMATICA社製

吸引マニホールド：GL-SPE ジーエルサイエンス(株)社製

HPLC装置：Agilent Technologies社製1100シリーズ

3. HPLC条件

1)逆相用

カラム：Inertsil ODS-3V 4.6mm i.d. $\times$ 250mm(ジーエルサイエンス社製)，移動相：アセトニトリル／水(95:5)，流速：1.0ml/min，検出：フォトダイオードアレイ(PDA)検出器(波長範囲350 $\sim$ 600nm，測定波長500，540nm)，カラム温度：40 $^{\circ}$ C，注入量：50 μ l

2)順相用

カラム：Inertsil SIL 4.6mm i.d. $\times$ 250mm(ジーエルサイエンス社製)，移動相：ヘキサン／酢酸エチル(95:5)，流速：1.0ml/min，検出：PDA検出器(波長範囲350 $\sim$ 600nm，測定波長480nm) カラム温度：40 $^{\circ}$ C，注入量：20 μ l

4. TLC 条件

条件1

薄層板：ODS，展開溶媒：アセトニトリル／酢酸エチル／25%アンモニア水(80:10:10)

条件2

薄層板：ODS，展開溶媒：アセトニトリル／水(9:1)

条件3

薄層板：シリカゲル，展開溶媒：ヘキサン／キシレン／ジエチルエーテル(90:10:5)

条件4

薄層板：シリカゲル，展開溶媒：アセトニトリル飽和ヘキサン／ジエチルエーテル(9:1)

5. 試料液の調製

(1) 逆相HPLC用

油脂は，試料5gをヘキサンに溶解し100mlとした。この液10mlにヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加え5分間振とう，アセトニトリル層を分取した。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加えて同様の操作を繰り返し，全アセトニトリル層を減圧濃縮した。残

留物にヘキサン5mlを加え、Sep-Pak Plus シリカに負荷し、ヘキサン5mlで容器を洗い、この洗液を同カートリッジに負荷した。ヘキサン/ジエチルエーテル(9:1) 15mlを用いて容器を洗い、洗液を同カートリッジに負荷し、全溶出液を減圧濃縮し、窒素気流下で乾固させた後、残留物にアセトニトリル5mlを加え、0.45 μ mのフィルターに通して試料液とした。

カレー粉は、試料5gをアセトニトリル50ml、無水硫酸ナトリウム10gを加えて約1分間ホモジナイズ、3000rpmで5分間遠心分離した後、アセトニトリル層を分取した。残渣にアセトニトリル30mlを加え、同様にホモジナイズ、遠心分離した後、アセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルを加えて100mlとした。この4mlをSep-Pak Plus フロリジルに負荷、アセトニトリル15mlで溶出した。全溶出液を合わせ、減圧濃縮、さらに窒素気流下で乾固し、ヘキサン5mlに溶解した。全量をSep-Pak Plus シリカに負荷し、油脂と同様に操作し、残留物にアセトニトリル2mlを加え、0.45 μ mのフィルターに通して試料液とした。

その他の食品は、試料5gをカレー粉と同様にアセトニトリル抽出を行い、この4mlを減圧濃縮し、さらに窒素気流下で乾固、ヘキサン5mlに溶解し、全量をSep-Pak Plus シリカに負荷し、油脂と同様に操作し、残留物にアセトニトリル2mlを加え、0.45 μ mのフィルターに通して試料液とした。

(2) 順相HPLCおよびTLC用

逆相用試料液をSep-Pak Plus C18に負荷し、さらにアセトニトリル15mlをカートリッジに負荷し、全溶出液を減圧濃縮し、窒素気流下で乾固させた後、残留物をヘキサン適量に溶解し、0.45 μ mのフィルターに通して試料液とした。

6. 定 量

逆相HPLC用混合標準液にアセトニトリルを加えて0.05~0.5 μ g/mlの検量線用標準液を調製した。検量線用標準液および試料液の各50 μ lをHPLCに注入し、得られたピーク面積と検量線から、試料液中の各色素濃度を求めた。

7. 確 認

(1) TLC

TLC用混合標準液および試料液2 μ lずつ(試料液中の着色料の濃度により塗布量を増減)をスポットし、4種の条件で展開した後、Rf値と色調を比較して定性を行った。

(2) 順相HPLC

混合標準液および試料液の各20 μ lをHPLCに注入し、得られたピークの保持時間と吸収スペクトルを比較し、定性を行った。

結果および考察

1. 標準溶液の調製

順相HPLC用およびTLC用標準原液：通知に従いヘキサンのみでの溶解を試みたが、溶解できなかった。平成17年5月11日付けの事務連絡⁵⁾では、ヘキサンやアセトニトリルに溶けにくいスーダン色素を酢酸エチルに溶解している。そこで、スーダンⅠ、Ⅱ、ⅢおよびⅣはあらかじめ酢酸エチルを用いて溶解させ、ヘキサンを加えて定容とした。パラレッドは酢酸エチルのみで定容とした。

TLC用混合標準液：通知ではTLCに20 μ lをスポットするとされているが、20 μ lでは操作に時間がかかり、また、スポットが広がり形状が悪くなるため、2 μ lでスポットできるように濃度を20 μ g/mlとした。

2. HPLC条件の検討

通知では逆相HPLCの注入量が20 μ lであるが、低濃度でのスペクトルの確認もできるように注入量を50 μ lとした。注入量50 μ lでもピーク形状の悪化は認められなかった。

順相HPLCでは、各色素濃度が0.2 μ g/mlでピークの保持時間とスペクトルの確認が可能であった。試料液のヘキサンを0.5mlとすると、検出限界の0.5 μ g/gまで確認可能となった。

3. 試料液の調製法の検討

通知法に従い、添加回収試験を行った。添加濃度は通知の検出限界0.5 μ g/gの2倍、1 μ g/gと精度管理濃度の5 μ g/gとした。ラー油、パーム油は油脂の方法、チリソース、カレー粉、タバスコ、中濃ソースはその他の食品の方法で試料液を調製した。結果を表1に、タバスコのHPLCクロマトグラムを図1に示した。

表 1 食品からのスーダン色素及びパラレッドの回収率 (通知法)

食品	添加量 (μ g/g)	回収率(%) [*]				
		スーダンⅠ	スーダンⅡ	スーダンⅢ	スーダンⅣ	パラレッド
ラー油	1	85.1	93.2	92.2	87.9	87.0
	5	83.2	96.5	93.7	90.3	88.8
タバスコ	1	93.6	94.4	93.2	90.8	84.9
	5	96.3	98.7	96.8	95.6	94.7
カレー粉	1	38.0	75.6	67.9	54.6	55.0
	5	34.8	65.3	64.3	55.0	58.6
パーム油	1	97.0	95.1	90.3	95.5	94.8
	5	95.6	95.7	92.2	104.7	109.4
チリソース	1	82.2	92.6	91.5	86.9	74.2
	5	97.3	99.0	98.7	92.8	90.6
中濃ソース	1	85.7	91.5	89.8	84.6	85.3
	5	86.2	95.1	93.3	89.9	89.4

^{*} n=1

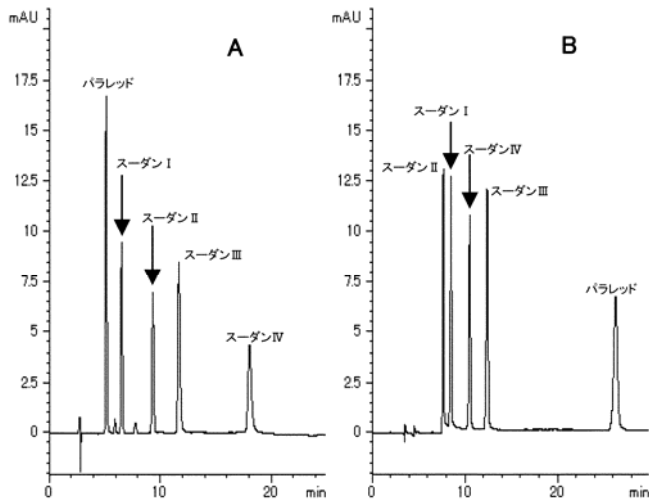


図1 タバスコ中のスーダン色素及びパラレッドのHPLCクロマトグラム 添加量: 各5 $\mu\text{g/g}$

(A 逆相HPLC)

カラム: Inertsil ODS-3V (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm)

移動相: アセトニトリル/水混液(95:5) カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

流速: 1.0 ml/min 測定波長: 500 nm (350~600 nm) 注入量: 50 μl

(B 順相HPLC)

カラム: Inertsil SIL 100A (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm)

移動相: ヘキサン/酢酸エチル混液(95:5) カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

流速: 1.0 ml/min 測定波長: 480 nm (350~600 nm) 注入量: 20 μl

カレー粉では回収率が低かったが、アセトニトリル抽出物にヘキサンに不溶の成分が多く、これが妨害していると推定された。フロリジルカートリッジによる処理を追加したところ、妨害成分が除かれ回収率が向上した。そこで、カレー粉については、フロリジルカートリッジを追加した前処理を行うこととした。

パーム油の500nmのクロマトグラムではスーダンIVの保持時間付近に妨害ピークがあったが(図2矢印)、540nmではピークが認められず、スペクトルの比較によりスーダンIVと異なることが確認できた。

4. 添加回収実験

ラー油、タバスコは通知法、カレー粉はフロリジル処理を追加した改良法で3回繰り返しの添加回収実験を行った。添加濃度は1 $\mu\text{g/g}$ と5 $\mu\text{g/g}$ とした。回収率は77.9~109.7%で、良好な結果が得られた(表2)。

表2 食品からのスーダン色素及びパラレッドの回収率(改良法)

食品	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率(%) [*]				
		スーダン I	スーダン II	スーダン III	スーダン IV	パラレッド
ラー油	1	109.7 $\pm$ 4.9	99.5 $\pm$ 3.3	95.6 $\pm$ 1.5	86.0 $\pm$ 2.2	89.5 $\pm$ 4.0
	5	101.8 $\pm$ 1.8	96.3 $\pm$ 1.0	95.6 $\pm$ 1.8	87.9 $\pm$ 1.3	90.0 $\pm$ 3.4
タバスコ	1	103.7 $\pm$ 3.6	103.2 $\pm$ 3.1	96.2 $\pm$ 0.4	98.1 $\pm$ 1.6	98.3 $\pm$ 1.0
	5	103.2 $\pm$ 2.1	102.0 $\pm$ 1.4	99.2 $\pm$ 0.2	101.5 $\pm$ 0.4	99.5 $\pm$ 0.5
カレー粉	1	96.6 $\pm$ 0.8	90.3 $\pm$ 0.8	82.8 $\pm$ 1.7	86.3 $\pm$ 1.4	85.5 $\pm$ 3.6
	5	93.8 $\pm$ 1.5	90.3 $\pm$ 1.5	81.6 $\pm$ 1.6	84.6 $\pm$ 2.5	77.9 $\pm$ 3.4

* 平均 $\pm$ S.D. n=3

5. TLC

Rf値および検出限界の確認を行った。各条件でのRf値を表3に示した。通知では2 $\mu\text{g/ml}$ の標準液20 μl を使用するため、各40ngでRf値および色調を試料液と比較する。標準液を用いて、目視で確認可能な色素量を求めた。

表3 スーダン色素及びパラレッドのRf値

色素名	Rf値			
	条件1	条件2	条件3	条件4
スーダン I	0.48	0.32	0.31	0.49
スーダン II	0.31	0.18	0.31	0.54
スーダン III	0.22	0.12	0.16	0.35
スーダン IV	0.13	0.07	0.19	0.42
パラレッド	0.61	0.45	0.09	0.18

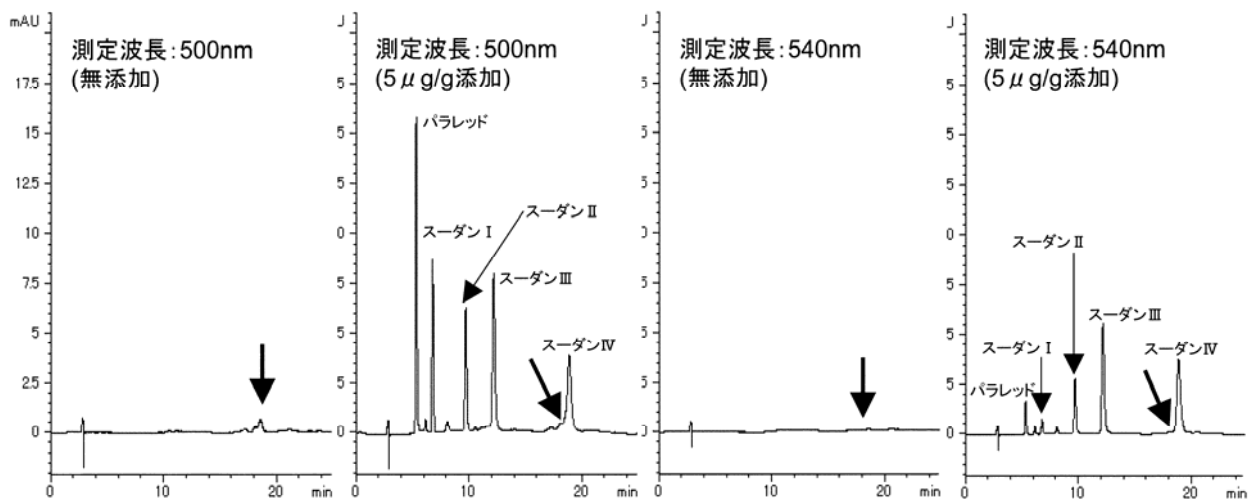


図2 パーム油のHPLCクロマトグラム(逆相HPLC)

ところ、各20ngから確認が可能であった。試料中の色素濃度が定量限界の $0.5 \mu\text{g/g}$ の時、試料液全量中に油脂では250ng、カレー粉とその他の食品では100ngの色素が含まれるため、20ng以上となるように塗布量の調整を行った。

ラー油、パーム油、チリソース、カレー粉、タバスコ、中濃ソースに、試料中 $1 \mu\text{g/g}$ 濃度となるように標準液を添加した場合、食品由来妨害を受けずに確認が可能であった。

6. 市販食品の検査結果

平成17～18年度に神奈川県内で市販されていた調味料5検体、カレー2検体、カレー粉1検体、ラー油2検体、パーム油1検体についてスーダンⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳおよびパラレッドの分析を行ったところ、すべて不検出であった。

まとめ

食品中のスーダンⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳおよびパラレッドの分析法について検討した。通知法を検討し、カレー粉にフロリジルカートリッジ精製を加える等の改良法を作成した。逆相HPLCでの回収率は75%以上、定量限界は $0.5 \mu\text{g/g}$ であった。

まず、逆相HPLCで定量とピークの吸収スペクトルの

比較を行い、さらに、順相HPLCとTLCを確認に用いることにより、多様な食品への適用が可能となった。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) 四方田千佳子：唐辛子製品中の違反色素Sudan, 食品衛生学雑誌, **45**, J-229-230 (2004)
- 2) 伊藤澄夫：スーダンレッドの違反事例について, 食品衛生学雑誌, **47**, J-273-275 (2006)
- 3) 中里光男, 粕谷陽子, 松本ひろ子, 安田和夫：唐辛子を使用した加工食品中のスダンⅠ及びその同族体の分析, 東京都健康安全研究センター研究年報, **55**, 107-110(2004)
- 4) 天川映子, 萩原勉, 都田路子, 永山敏寛：TLC及びHPLCによるオイスターソース中のスダン色素の分析, 東京都健康安全研究センター研究年報, **56**, 141-144 (2005)
- 5) 「食品中のスーダン色素およびパラレッドの試験法について」(食安監発第0501007号, 平成18年5月1日付)
- 6) 「着色料の試験法について」(厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課事務連絡, 平成17年5月11日付)

短報

チューインガム中の品質保持剤、 プロピレングリコールの分析

岸 弘子、関戸晴子

Analysis of Wetting Agent, Propylene Glycol in chewing gum

Hiroko KISHI and Haruko SEKIDO

はじめに

品質保持剤であるプロピレングリコール(PG)は、生めん、いかくん製品に2.0%以下、ギョウザ、シュウマイ、ワントンおよび春巻きの皮に1.2%以下、その他の食品に0.60%以下と使用基準が定められている。また、チューインガム軟化剤として0.60%以下の基準もある。

従来はパックドカラムのGC法¹⁾が食品中のPGの分析法として用いられてきたが、分析装置の進歩により、キャピラリーカラムを用いたGCおよびGC/MSによる方法²⁻⁴⁾に変化している。さらに、パックドGC装置の減少もあり、分析法の変更が必要となった。キャピラリーGCに移行するために検討を行っている過程で、メタノール抽出による試料液の調製法²⁻⁴⁾では、一部のチューインガムで妨害成分によりPGの測定が困難なことが判明した。そこで、改良法を検討したところ良好な結果が得られたので報告する。

方 法

1. 試料

神奈川県内で購入したチューインガムを用いた。

2. 試薬

標準品のプロピレングリコール(PG)は和光純薬工業(株)製の食品添加物用、その他の試薬は和光純薬工業(株)製の試薬特級を用いた。

PG500mgにメタノールを加えて100mlとし、標準原液(5mg/ml)とした。標準原液4mlにメタノールを加えて100mlとし、標準液(200 μ g/ml)とした。

3. 装置および測定条件

(1)GC測定条件

装置：Agilent 6890

カラム：SUPELCOWAX10 0.25mm i.d.×30m, 膜厚 0.25 μ m

カラム温度：60℃(2分)–(15℃/分)–200℃

注入口温度：220℃

検出器温度：250℃

カラム流量：He 1ml/min

注入量：1 μ l(スプリットレス)

検出器：FID

(2)GC/MS測定条件

装置：Agilent 6890/5973N MSD

カラム：SUPELCOWAX 0.25mm i.d.×30m, 膜厚 0.25 μ m

カラム温度：60℃(2分)–(15℃/分)–200℃

注入口温度：220℃

トランスファーライン温度：250℃

注入量：1 μ l(スプリットレス)

カラム流量：He 1ml/min

イオン化法：EI

SIM：m/z 29, 45, 61

SCAN：m/z 10~200

4. 試料液の調製

メタノール抽出:細切した試料5gを採り、メタノールを加えて50mlとし、時々振り混ぜながら2時間放置した。これを5Aのろ紙でろ過し、ろ液を試料液とした。
希釈メタノール抽出:細切した試料5gを採り、メタノール(1→2)を加えて50mlとし、時々振り混ぜながら2時間放置した。これを5Aのろ紙でろ過し、ろ液10mlを採り、減圧濃縮後、窒素ガスを吹き付けて水分を除いた。残留物に少量のメタノールを加えて超音波洗浄機で溶解し、洗液と合わせて10mlとし、遠心分離(3,000rpm, 10min)して上清を試料液とした。

5. 検量線の作成

標準液0.5, 1, 2, 3, 4, 5mlにメタノールを加えて10mlとした。1 μ lをFID-GCに注入し、ピーク面積から絶対検量線法で10~100 μ g/mlの検量線を作成した。

6. FID-GCによる定量

試料液0.5~2mlにメタノールを加えて10mlとし、測定液とした。測定液1 μ lをFID-GCに注入し、検量線を用いて定量した。

7. GC/MSによる測定

測定液1 μ lをGC/MSに注入し、ピークの保持時間およびマススペクトルを確認し、SIMで定量を行った。

結果および考察

1. 検量線の検討

絶対検量線法とトリメチレングリコール(TG)を用いた内部標準法を比較した。10~100 $\mu\text{g/ml}$ とともに相関係数0.9990以上で、良好な直線性を示した。

生めん、ギョウザの皮等では問題ないが、その他の食品ではクロマトグラム上に多数のピークが検出された。マロンケーキでは、内部標準のTGの保持時間付近にピークが検出されたが、GC/MS測定によりTGではないことが確認された。多様な加工食品ではこのような妨害の可能性も多い。そこで、食品由来成分の影響を受けにくく、相関係数も良好な絶対検量線法で定量を行うこととした。

2. 試料液調整法の検討

一部のチューインガムでは、メタノール抽出液をFID-GCで測定すると、PGと保持時間の近い妨害ピークが観察された。PGが含まれない試料でもPGと誤認する恐

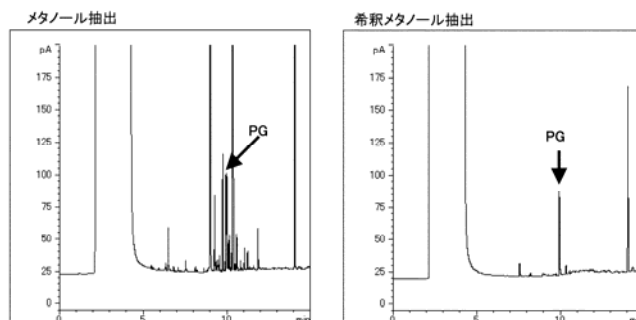


図1 チューインガムの抽出溶媒による差 (FID-GC)
(チューインガムA 0.1%添加)

れがあり、PGが含まれる場合は分離不十分なピークとなり、正確な面積値が得られなかった。

GCの昇温速度を調整したが、妨害ピークとPGのピークの十分な分離はできなかった。また、カートリッジカラムによる精製を試みたが、C18,PSA,カーボンでは妨害成分の除去はできなかった。そこで、抽出される妨害

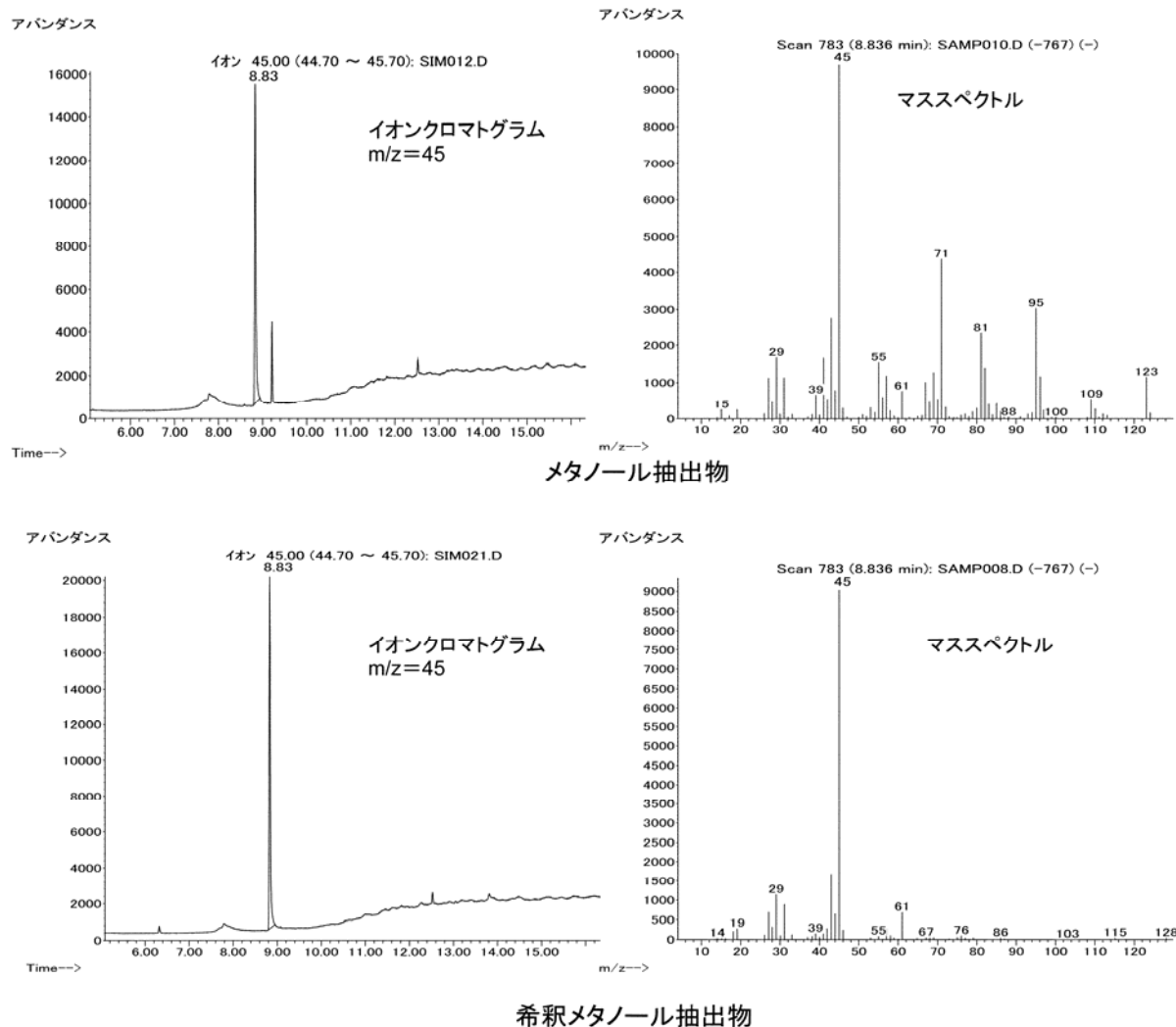


図2 チューインガムの抽出溶媒による差 (GC/MS)
(チューインガムA 0.1%添加)

成分を減らすために、希釈メタノールで抽出を行った。これをFID-GCで測定したところ、妨害ピークが消えており、PGの定量が可能となった(図1)。さらに、PGを含むチューインガムで抽出溶媒による差を検討したところ、希釈メタノール抽出でPG以外のピークが減少し、PGの抽出量は差がなかった。

3. GC/MSによる測定

メタノール抽出物、希釈メタノール抽出の両方で、マススペクトルによる確認とSIM測定による定量は可能であったが、希釈メタノール抽出ではPG以外のピークが減少し、マススペクトルも標準液とより良く一致した(図2)。GC/MS測定にも希釈メタノール抽出が有効であることが確認された。

4. 添加回収試験

PGの含まれないチューインガムを用いて添加回収試験を実施した。添加量は使用基準を考慮し、0.1%と0.5%とし、メタノール抽出と希釈メタノール抽出を行った。

添加回収の結果を表1に示した。FID-GC、GC/MS共に希釈メタノール抽出により回収率が改善された。本法による定量限界は0.05%であった。

表1 チューインガムの添加回収結果

抽出溶媒	定量法	添加量(%)	回収率(%)	RSD(%)
メタノール	FID-GC	0.1	120.6	2.3
		0.5	118.8	8.3
希釈メタノール	FID-GC	0.1	98.5	2.9
		0.5	101.7	5.1
メタノール	GC/MS	0.1	113.2	2.1
		0.5	114.3	3.5
希釈メタノール	GC/MS	0.1	100.0	4.4
		0.5	103.9	4.7

n=5

チューインガムを分析する場合は、まず、メタノール抽出でFID-GC測定を行い、妨害ピークのある場合は、希釈メタノール抽出を行ってFID-GCで定量する。GC/MS測定は、マトリックスによりイオン化が影響される場合があるため、確認法として行うこととした。

5. 市販チューインガムの分析

チューインガム12検体の分析を行い、定量結果を表2に示した。3検体からPGが検出された。試料A、Bは希釈メタノール抽出で定量値が低下した。

なお、試料Iはガムベースを用いたチューインガムではなく食べられるチューイングキャンディで、他の試料

表2 チューインガムの定量結果(%)

チューインガム	FID-GC		GC/MS	
	メタノール	希釈メタノール	メタノール	希釈メタノール
A	0	0	0	0
B	0.24	0.15	0.19	0.17
C	0.25	0.20	0.22	0.21
D	0	0	0	0
E	0	0	0	0
F	0	0	0	0
G	0	0	0	0
H	0	0	0	0
I*	0.07	0.10	0.07	0.10
J	0	0	0	0
K	0	0	0	0
L	0	0	0	0

*:チューングキャンディ

と異なり希釈メタノールで高い値が得られた。原材料に水あめ、砂糖等の水溶性の物が多く、メタノールでは抽出が不完全となったと考えられる。

メタノール抽出物のFID-GCでは、妨害が多い試料があったが、希釈メタノール抽出を行うと、妨害の影響を受けずに測定が可能となった。FID-GCとGC/MSは、ほぼ同様の結果が得られた。

まとめ

チューインガム中のPGの分析法として、キャピラリーカラムを用いたFID-GCによる定量およびGC/MSによる確認法を検討した。試料を希釈メタノールで抽出することにより、食品由来の妨害成分の影響を受けずに測定でき、日業検査に有効な方法であった。

(平成19年7月20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 2003, pp519-524, 日本食品衛生協会, 東京 (2003)
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005, pp312-314, 金原出版, 東京 (2005)
- 3) 森谷昌幸, 関根百合子, 今西龍馬, 戸羽智子, 米田真知子, 小野寺みゆきほか：食品添加物一日摂取量調査ー加工食品中の品質保持剤(プロピレングリコール)についてー, 仙台市衛生研究所報, **34**, 78-83 (2004)
- 4) 大橋正孝, 米田正樹, 素輪善典：食品中のプロピレングリコールの分析, 奈良県保健環境研究センター年報, **39**, 79-80 (2004)

短報

精度管理における保存料検査の問題点

関戸晴子¹, 山崎直美², 藤本玲子³
市川晴貴⁴, 須賀顕子⁵

Problem of preservation fee inspection in accuracy control

Haruko SEKIDO, Naomi YAMAZAKI
Reiko FUJIMOTO, Haruki ICHIKAWA
and Noriko SUGA

はじめに

平成9年の食品衛生検査施設への業務管理 (GLP) の導入以来, 神奈川県 (横浜市, 川崎市を除く) では検査の信頼性を確保するために内部精度管理を実施している。ところが食品の理化学検査における精度管理 (添加回収試験) において, 添加回収率 (真度) が食品GLPで規定する70~120%の範囲¹⁾に入らないことがある。そこで著者らは, 最も検査依頼件数が多い保存料検査において, 回収率の低下が高い頻度で見られる魚肉練り製品及び食肉製品について, 共通試料を用いた保存料3種 (安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸) の添加回収試験を行い, 内部精度管理における保存料検査の問題点の検証を実施し, 若干の知見を得たので報告する。

方 法

今回の添加回収試験を実施するに当たり, 試料採取量, 標準液添加量, 食塩添加量, 検量線の作成方法, 液体クロマトグラフの測定波長及びカラム温度, 注入回数 of 条件を統一し, その他は各参加機関の検査実施標準作業書 (SOP) に従うこととした。

1. 参加機関

理化学部食品成分グループ, 地域調査部小田原分室, 厚木分室, 相模原市衛生試験所, 藤沢市保健所の5機関

が参加した。機関によって複数回試験を実施しており, その全ての結果を集計に採用したため, 総回答数は11となった。

2. 試 料

食品添加物が無添加であることが確認されている市販の魚肉練り製品 (かまぼこ) 480 g, 食肉製品 (ロースハム) 500 g の2試料を各検査機関に配布した。

3. 試 薬

標準溶液として, 安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸各々400 μ g/mlに調製したものを各50mlずつスタンダードベッセルに入れ各検査機関に配布した。

4. 試験溶液の調製

試料50 gに各標準溶液を2.5mlずつ添加したもの (0.02g/kg相当: 定量下限値の2倍) を添加回収試料とし, 各機関のSOPに従い水蒸気蒸留法による試験溶液の調製を実施することとした。ただし, 食塩添加量は80 g, 蒸留速度は約19ml/min (25分で470ml蒸留し水で500mlにメスアップする) か各検査機関のSOPの条件のどちらかを選ぶ形とした。操作フローを図1に示した。

かまぼこ, ロースハムともそれぞれ5回ずつ水蒸気蒸留による試験溶液の調製を行うこととした。試験操作ブランクとして試料の代わりに水50 gでも同様の条件で1回添加回収を実施することとした。

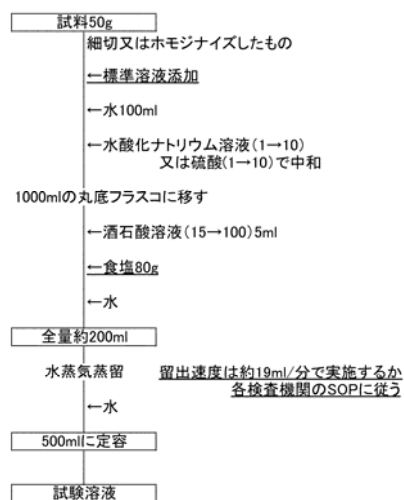


図1 試料溶液の調製法

5. 測定条件

液体クロマトグラフ装置 (HPLC) を用いて, 波長230nm, カラム温度40度とし, その他は各検査機関におけるSOP条件で実施することとした。検量線は, 配布した標準溶液をもとに安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸の3種混合標準液 (20 μ g/ml) を作製し, この標準液を正確に希釈して1, 2, 4 μ g/mlに調製したものをを用いて, 原点を含まない3点検量線を作成することとした。注入回数は標準溶液, 試験溶液ともに3回繰り返した。

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
2 神奈川県衛生研究所 地域調査部小田原分室
3 神奈川県衛生研究所 地域調査部厚木分室
4 相模原市衛生試験所
5 藤沢市保健所

注入とし、3回の測定値の平均を測定結果として採用することとした。

結果及び考察

1. HPLCにおける注入精度

測定機種はA社、W社の2社に分かれたが、検出器はDAD（フォトダイオードアレイ）、使用カラムはODS系4.6×150mm、粒径5 μ m、移動相はメタノール：アセトニトリル：5mmolクエン酸緩衝液（1:2:7）、注入量20 μ lとほぼ同じ条件であった。

使用機種による注入精度の違いを見るため3濃度の標準溶液の測定結果について相対標準偏差（%）で表したものを表1に示した。日本薬局方（第15改正）では、HPLCにおける試験の再現性は通常、標準溶液を6回繰り返し注入し、相対標準偏差1.0%以下であることが望まれる²⁾と示されているが、今回は3回繰り返しのデータで再現性を確認した。

安息香酸とデヒドロ酢酸において相対標準偏差が1.0%をこえたものが各1データあったが、それ以外は各機関とも1.0%未満で平均すると0.2%となり、使用したHPLCの20 μ lにおける注入精度は各機関ともほぼ良好であると思われた。測定機種別における注入精度の顕著な差も

表1 使用機種の違いによる標準溶液測定結果
(相対標準偏差%)

安息香酸					
No.	機種	標準液			平均
		1 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml	
1	W社	0.324	0.081	0.105	0.170
2	W社	0.246	0.199	0.099	0.181
3	W社	0.211	0.051	0.112	0.125
4	W社	1.138	0.497	0.122	0.586
5	W社	0.435	0.106	0.059	0.200
6	A社	0.199	0.204	0.162	0.188
7	A社	0.284	0.222	0.251	0.252
8	A社	0.284	0.222	0.251	0.252
9	A社	0.234	0.246	0.126	0.202
10	A社	0.223	0.232	0.678	0.378
11	A社	0.192	0.120	0.127	0.146
ソルビン酸					
No.	機種	標準液			平均
		1 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml	
1	W社	0.334	0.326	0.027	0.229
2	W社	0.372	0.505	0.058	0.312
3	W社	0.265	0.209	0.079	0.184
4	W社	0.116	0.610	0.186	0.304
5	W社	0.280	0.231	0.010	0.174
6	A社	0.016	0.071	0.083	0.057
7	A社	0.241	0.158	0.110	0.170
8	A社	0.241	0.158	0.110	0.170
9	A社	0.256	0.179	0.161	0.199
10	A社	0.035	0.032	0.070	0.046
11	A社	0.247	0.064	0.178	0.163
デヒドロ酢酸					
No.	機種	標準液			平均
		1 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml	
1	W社	0.280	1.090	0.042	0.471
2	W社	0.917	0.203	0.039	0.386
3	W社	0.857	0.483	0.141	0.494
4	W社	0.661	0.490	0.034	0.395
5	W社	0.710	0.201	0.227	0.379
6	A社	0.074	0.358	0.130	0.187
7	A社	0.228	0.067	0.031	0.109
8	A社	0.228	0.067	0.031	0.109
9	A社	0.219	0.095	0.105	0.140
10	A社	0.119	0.028	0.087	0.078
11	A社	0.182	0.006	0.171	0.120

認められなかった。以上のことから各機関では、使用しているHPLCにおいて十分な保守管理がなされていることが伺われた。

2. 試料調製

5機関とも水蒸気蒸留法による試験溶液の調製をSOPに採用していた。各機関とも公定法³⁾に準じた操作を実施しており、ほとんどの操作に相違は見られなかったが、蒸留中フラスコ内の液量に変化しないよう補助加熱をしていた機関が2カ所あった。また、蒸留速度は10.4～19.6ml/minの間で実施されていた。蒸留速度と回収率の関係を図2に示した。補助加熱の有無や蒸留速度の違いによる添加回収率の顕著な差は認められなかった。

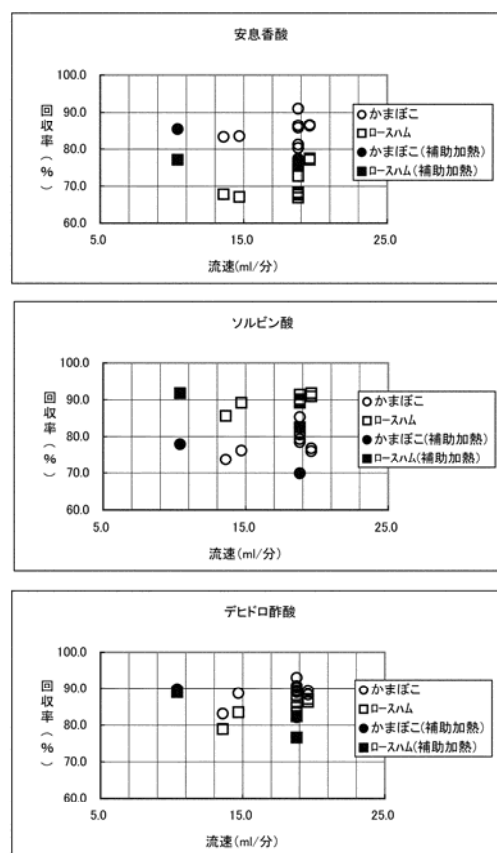


図2 蒸留速度と回収率

3. 添加回収

各機関における検量線の相関係数はすべて0.9995以上（0.99981～1.00000）と良好であった。また、水50gに同様の条件で添加、水蒸気蒸留をした試験操作ブランクは、安息香酸平均93.97%（90.07～100.09）、ソルビン酸平均90.34%（85.91～98.97）、デヒドロ酢酸平均96.51%（93.72～99.61）と高い回収率を示した。以上のことから、各機関とも標準溶液の希釈操作、試験溶液の調製等の過程において技術的に安定した操作が行われていることが推測された。

得られたデータ数はかまぼこ53件（1機関で2件欠損

表2-1 かまぼこを用いた場合の保存料3種の回収率 (%)

	安息香酸	ソルビン酸	デヒドロ酢酸
データ数	53	53	53
平均値	84.35	77.87	88.80
最小値	71.31	66.99	80.73
最大値	92.56	86.37	93.57
標準偏差	4.350	4.090	3.090
変動係数	5.157	5.252	3.480

値を生じた), ロースハム55件で回収率の平均値, 標準偏差, 変動係数は表2-1~表2-2のとおりである. ロースハムでは安息香酸の回収率が70%未満となったデータは53件中25件で47%, かまぼこではソルビン酸の回収率が70%未満となったデータは53件中3件で6%認められ, その他は回収率が70%未満となったものはなく, GLPで規定する70~120%の範囲内であった. デヒドロ酢酸は, どちらの検体においても差は見られず良好な回収率(80%以上)が得られた. かまぼことロースハムの回収率の分布を図3に示した. かまぼこではソルビン酸が,

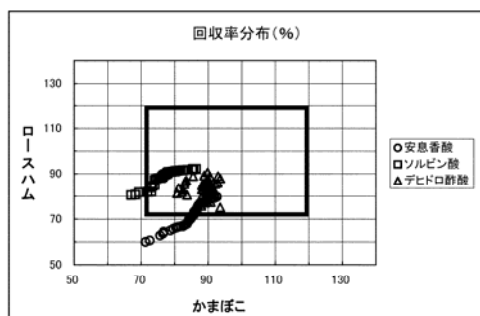


図3 回収率分布

表2-2 ロースハムを用いた場合の保存料3種の回収率 (%)

	安息香酸	ソルビン酸	デヒドロ酢酸
データ数	55	55	55
平均値	71.40	89.25	83.42
最小値	59.98	80.49	73.83
最大値	80.03	92.64	90.58
標準偏差	5.260	3.140	3.660
変動係数	7.367	3.518	4.387

(0.02g/kg相当: 定量下限値の2倍)に食塩添加量を100gとしたものについて, 添加回収試験を実施した. その結果を表3に示した.

実施回数は各機関n=1であるのでマトリックスの有無の傾向を見る形となったが, 試料を50gから20gに減少し食塩添加量を100gとしたものについて, 実施した全ての機関において回収率が上昇する傾向が見られた. 食塩添加量を80gから100gに増量しただけのものは回収率にあまり変化が見られなかった. この結果から, 試料採取量を減少し食塩添加量を増量することによって, 70%を下回らない回収率が得られる可能性が示唆された.

まとめ

今回の結果から, 魚肉練り製品や食肉製品では現在SOPに採用している試験溶液の調製方法では保存料の項目によっては添加回収率が70%を下回ることが明らかとなった. しかしながら試料採取量や添加する食塩の量等の条件を見直すことにより回収率が改善される傾向が見られたことから, 今後試験溶液の調製方法を十分に検討することにより安定した回収率が得られるものと考えられた.

表3 添加回収結果(回収率%)

試料	採取量(g)	食塩添加量(g)	データ数	安息香酸		ソルビン酸		デヒドロ酢酸	
				平均値	変動係数	平均値	変動係数	平均値	変動係数
かまぼこ	50	80	53	84.35	5.157	77.87	5.252	88.80	3.480
		100	9	86.50	4.871	78.24	5.627	88.97	3.655
	20	100	7	93.86	3.389	86.31	2.851	94.08	2.971
ロースハム	50	80	55	71.40	7.367	89.25	3.518	83.42	4.387
		100	8	76.30	4.919	90.54	4.684	84.92	5.531
	20	100	8	90.67	1.237	94.05	2.184	93.32	3.540

ロースハムでは安息香酸が回収率70%を下回る傾向が顕著に見られた. 120%を超えるものは両検体とも安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸の3項目において1件も認められなかった.

以上のことから現在各機関で採用している保存料3種の試験溶液の調製方法は, 検体によって添加回収率にばらつきがでることが認められ, 項目によっては回収率が70%を下回る可能性が高いことも示唆された.

試験溶液調製におけるマトリックスの影響を見るため, 配布した試料が残っている機関において, 食塩添加量を80gから100gに増量したものと試料採取量を50gから20gに減少させ各標準溶液を1mlずつ添加したもの

本研究は, 平成18年度食品GLP精度管理理化学部会の事業の一環として実施したものである.

(平成19年7月20日受理)

参考文献

- 「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」: 厚生省生活衛生局食品保健課長通知, 衛食第117号, (平成9年4月1日)
- 第15改正日本薬局方解説書, pp.B-101-B-130, 廣川書店, 東京(2006)
- 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針, 食品添加物編, pp.12-20, 社団法人日本食品衛生協会, 東京(2003)

短報

県内流通遺伝子組換え食品の
分析結果（平成18年度）

－パパイヤ、トウモロコシおよび大豆の組換え
DNA検査結果－

大森清美，土屋久世，渡邊裕子，関戸晴子
岸 弘子，山田利治

Investigation on the qualitative and
quantitative analysis of genetically
modified foods in Kanagawa
Prefecture (2006)

Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA Hiroko
WATANABE, Haruko SEKIDO, Hiroko KISHI
and Toshiharu YAMADA

はじめに

GM食品の安全性に対する消費者の不安感は強く，平成17年度に厚生労働省，食品安全委員会が実施した食品安全モニター約500名による遺伝子組換え食品の安全性に関するアンケートでは，77%が「非常に不安である」及び「ある程度不安である」と回答している．食品の表示は，消費者が食品を選択するための最も重要な情報源であることから，消費者の食品を選択する権利を守るためには，食品の表示が正しいか否かを確認する必要がある．神奈川県は，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平成13年度にGM食品の検査を開始した．検査項目数および検体数は年々増加し¹⁻⁴⁾，平成18年度には6組換え系統，90検体について検査を実施した．本報では，その結果について報告する．

方 法

試験方法は，平成18年6月29日食安発第0629002号の厚生労働省通知（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，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．通知法では，定量試験は原則として穀粒のみを対象品目としている．冷凍枝豆，豆腐および豆乳は，大豆加工食品に分類されることから，通知法では定量試験の適用外の品目である．しかし，神奈川県は調査的観点において，加工食品へのGM作物混入に対する消費者の不安に応えるために，比較的加工程度が低いと考えられる大豆加工食品に限り，定量試験を実施している．ただし，それらの加工食品について検査を実施した結果，違反の可能性が生じた場合には，原料とされた大豆穀粒について通知法に従った定量試験を実施し，最終判定を行うこととしている．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．

結果および考察

食品90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

表 1 平成18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	DNA抽出精製法	組換え系統	内在性遺伝子
パパイヤ	パパイヤ青果	6	定性	PCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	55-1	Papain
	トウモロコシ青果	4			(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	CBH351 Bt10	
	トウモロコシ穀粒	4					
トウモロコシ	コーンスナック菓子	12	定性	PCR法	(QIAGEN)Genomic-tip Kit 法	CBH351	Zein
	コーンフレーク	3					
	コーンスープ	5					
	トウモロコシ缶詰	2					
	冷凍トウモロコシ	2	定量	PCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	35S・GA21	SS II b
	トウモロコシ青果	4					
	トウモロコシ穀粒	4					
大豆	大豆穀粒	12	定量	PCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法 / (QIAGEN) Genomic-tip Kit 法	RRS	Le1
	冷凍枝豆	8					
	豆腐	12					
	豆乳	12					
合計		38	定性				
		52	定量				

イヤ6 検体の定性試験では、55-1組換え遺伝子はすべて不検出であった（表2）。トウモロコシの定性試験については、18年6月から、穀粒を対象としてBt10組換え遺伝子の定性試験が通知法とされたことから、トウモロコシ穀粒4検体および青果4検体について、Bt10組換え遺伝子の検査を実施した。そのほか、CBH351組換え遺伝子については、トウモロコシ穀粒、青果および加工食品について実施した。その結果、コーンフレーク2検体を除く36検体で、いずれも組換え遺伝子是不検出であった（表2）。コーンフレークについては、試料採取量を4gとし、DNA抽出精製法にも独自の改良法⁵⁾を用いてCBH351組換え遺伝子の定性試験を実施したが、検体No.27および28で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知不能となった。トウモロコシの

定量試験は、トウモロコシ穀粒および青果8検体について、35SおよびGA21組換え遺伝子スクリーニング試験を実施した。その結果、すべての検体において、定量PCRの終了時点（40サイクル）でもThreshold（TH）Lineを超える蛍光強度の増大は認められず、不検出であった（表3）。大豆の定量試験は、大豆穀粒12検体、冷凍枝豆8検体、豆腐12検体および豆乳12検体について、RRS組換え遺伝子の定量試験を実施したが、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RRSは検出されなかった（表3）。検体No.82およびNo.86の豆乳については、抽出DNA濃度はいずれも400 ng/ μ lを超え、十分量のDNAが回収されたが、通知法にしたがい20ng/ μ lに希釈したDNA試料液を用いて、定量PCRを実施した結果、大豆内在性遺伝子（Le1）

表2 平成18年度 組換え遺伝子定性試験結果

No.	品目	産地/原産国	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
1	パパイヤ青果	アメリカ	55-1	不検出	なし
2	パパイヤ青果	アメリカ	55-1	不検出	なし
3	パパイヤ青果	アメリカ	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	パパイヤ青果	フィリピン	55-1	不検出	なし
7	トウモロコシ青果	群馬県	CBH351/Bt10	不検出	なし
8	トウモロコシ青果	神奈川県	CBH351/Bt10	不検出	なし
9	トウモロコシ青果	神奈川県	CBH351/Bt10	不検出	なし
10	トウモロコシ青果	山梨県	CBH351/Bt10	不検出	なし
11	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	なし
12	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
13	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
14	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
15	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
16	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
17	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
18	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
19	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
20	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
21	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
22	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
23	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	なし
24	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	なし
25	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
26	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
27	コーンフレーク	不明	CBH351	検知不能	遺伝子組換えでない
28	コーンフレーク	不明	CBH351	検知不能	遺伝子組換えでない
29	コーンフレーク	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
30	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	なし
31	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
32	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
33	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
34	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
35	トウモロコシ缶詰	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
36	トウモロコシ缶詰	不明	CBH351	不検出	なし
37	冷凍トウモロコシ	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
38	冷凍トウモロコシ	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない

表3 平成18年度 組換え遺伝子定量試験結果

No.	品目	産地/原産国	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
39	トウモロコシ青果	群馬県	35S・GA21	不検出	なし
40	トウモロコシ青果	神奈川県	35S・GA21	不検出	なし
41	トウモロコシ青果	神奈川県	35S・GA21	不検出	なし
42	トウモロコシ青果	山梨県	35S・GA21	不検出	なし
43	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S・GA21	不検出	なし
44	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S・GA21	不検出	遺伝子組換えでない
45	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S・GA21	不検出	遺伝子組換えでない
46	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S・GA21	不検出	遺伝子組換えでない
47	大豆穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.003%)	遺伝子組換えでない
48	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
49	大豆穀粒	中国	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
50	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
51	大豆穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.007%)	遺伝子組換えでない
52	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
53	大豆穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.03%)	遺伝子組換えでない
54	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
55	大豆穀粒	日本	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
56	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
57	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
58	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
59	冷凍枝豆	不明	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
60	冷凍枝豆	中国	RRS	不検出	なし
61	冷凍枝豆	タイ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
62	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
63	冷凍枝豆	日本	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
64	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
65	冷凍枝豆	中国	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
66	冷凍枝豆	タイ国	RRS	不検出	なし
67	豆腐	カナダ	RRS	定量下限値未満検出(0.01%)	遺伝子組換えでない
68	豆腐	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.004%)	遺伝子組換えでない
69	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	なし
70	豆腐	不明	RRS	不検出	なし
71	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.05%)	遺伝子組換えでない
72	豆腐	日本	RRS	定量下限値未満検出(0.001%)	遺伝子組換えでない
73	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.08%)	遺伝子組換えでない
74	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	遺伝子組換えでない
75	豆腐	日本	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
76	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.003%)	遺伝子組換えでない
77	豆腐	カナダ	RRS	定量下限値未満検出(0.01%)	遺伝子組換えでない
78	豆腐	カナダ	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	遺伝子組換えでない
79	豆乳	不明	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
80	豆乳	不明	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
81	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.04%)	遺伝子組換えでない
82	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.2%)	遺伝子組換えでない
83	豆乳	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.1%)	なし
84	豆乳	不明	RRS	不検出	なし
85	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	なし
86	豆乳	不明	RRS	検知不能	なし
87	豆乳	中国	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
88	豆乳	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.09%)	遺伝子組換えでない
89	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.01%)	遺伝子組換えでない
90	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.01%)	遺伝子組換えでない

コピー数は200コピー未満であった。そこで、No.82およびNo.86のDNA試料原液を希釈せずに定量PCRに使用したところ、No.82の Le1コピー数は10000コピー程に増大したが、No.86については700コピー未満であった。当所では、RRSの定量試験において、Le1コピー数の下限の目安を10000コピーとしていることから、No.86については、「検知（定量）不能」とした。豆乳12検体のDNA試料原液について、0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った結果、検体No.82およびNo.86の抽出DNAは低分子量化していることが明らかになった（図1）。しかし、検体No.82およびNo.86以外の抽出DNA（No.80, 83, 88, 89および90）でも低分子量化は認められており、それらのDNA試料溶液20ng/ μ lを用いた場合のLe1コピー数は、13000~50000コピーであったことから、検体No.82およびNo.86のDNA試料液には、DNAの低分子量化以外にもLe1のPCR増幅を妨げる要因が存在することが考えられた。また、RRSの定量試験においては、コラボレーションスタディー⁶⁾結果により、定量下限値は0.5%とされている。平成18年度に大豆定量試験を実施した44検体中20検体で、定量下限値未満ではあるものの、0.001~0.23%のRRSが検出された。その他の不検出と記載した24検体については、40サイクル終了時点でTH Lineを超える蛍光強度の増大は認められなかった。昨年度までの試験結果において、

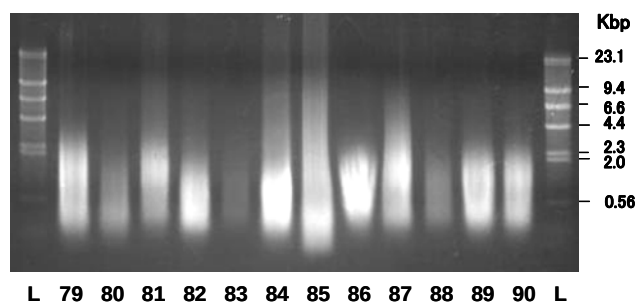


図1 豆乳から抽出した DNA 試料液の分子量分布

L：分子量マーカー；レーン 79~90：検体 No.79~90 の DNA 試料液

微量のRRSが検出された大豆および大豆加工食品の原料の多くは、アメリカおよびカナダ等から輸入された大豆であったが¹⁻⁴⁾、本年度の試験結果においても同様な傾向がみとめられた。また、本年度は豆腐および豆乳等の加工食品で、高頻度に定量下限値未満のRRSが検出された。さらに、豆腐1検体（No.72）については、日本産の大豆使用を表示していたにもかかわらず、0.001%のRRSが検出された。これらの結果は、GM作物および非GM作物の分別が行われていても、極微量のGM作物が食品に混入している実態を示すものであった。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食品の表示に対する監視が必要であると考えられた。

本検査は神奈川県保健福祉部生活衛生課の食品科学調査事業により実施した。

（平成19年7月20日受理）

参考文献

- 1) 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）
- 2) 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）
- 3) 大森清美，土屋久世，岸弘子，山田利治，平山クニ：遺伝子組換え食品の分析結果（平成16年度），神奈川県衛生研究所研究報告，**35**，33-35（2005）
- 4) 大森清美，土屋久世，渡邊裕子，関戸晴子，岸弘子，山田利治：遺伝子組換え食品の分析結果（平成17年度），神奈川県衛生研究所研究報告，**36**，59-61（2006）
- 5) 大森清美ほか：トウモロコシ加工食品からのイオン交換タイプキットを用いたDNA抽出精製法の検討，食品衛生学雑誌，投稿中
- 6) 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）

短報

食品中異物の検査方法および結果について（平成17年度・18年度）

大森清美，渡邊裕子，関戸晴子，岸 弘子
土屋久世，山田利治

Analytical method and case studies on contaminations of foreign matters in foods in 2005 and 2006

Kiyomi OHMORI, Hiroko WATANABE

Haruko SEKIDO, Hiroko KISHI

Hisayo TSUCHIYA and Toshiharu YAMADA

はじめに

神奈川県内で販売または製造された食品への苦情に対しては、本県の各保健福祉事務所が対応を行っている。それらのうち、検査を要すると判断された場合には、保健福祉事務所に併設された衛生研究所地域調査部の各3分室で検査がおこなわれている。しかし、異物が極微量である場合もしくは特殊な分析機器および技術を必要とする場合などは、衛生研究所の理化学部または微生物部に検査が依頼される。表1は、平成17年度および18年度に、理化学部、食品成分グループが担当した食品中異物の検査事例である。平成15年度および16年度には8件の異物検査を行ったが¹⁾、平成17年度および18年度の件数は1.5倍に増加し12件であった。本報では、これらの異物検査に用いた方法を示すとともに、表1に示した事例の中から、意外な結果が導き出された事例5および8について報告する。

方 法

(1) 実体顕微鏡による観察

装置：実体顕微鏡 オリンパスSGX9

(2) 蛍光X線分析

装置：微小部蛍光X線分析計SEA5120（セイコーインスツルメンツ㈱），希土類等を除くほぼ全ての元素を測定する条件：励起電圧50kV・大気中，主に軽元素を測定する条件：励起電圧15kV・真空中

(3) フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）分析

装置：Spectrum One NTS(Perkin Elmer社)，測定方法：全反射吸収測定（ATR：Attenuated Total Reflection）法

(4) 溶解性試験

異物に0.5mol/L塩酸を滴下し，溶解性を観察した。

(5) ヨウ素反応試験

異物に0.01mol/Lヨウ素試液を滴下した。

(6) ニンヒドリン反応試験

異物に0.3%ニンヒドリン・エタノール溶液を滴下した。

(7) 燃焼性試験

異物を磁製するつぼにとり，ガスバーナーの炎でゆっくりと加熱した。

(8) 高速液体クロマトグラフ（HPLC）法による糖類の分析（事例8のみで実施）

カラム：Shodex Sahipak NH2P-50 4E (4.6mm×250mm)，移動相：アセトニトリル-水(75：25)，流速：1.0mL/min

カラム温度：40℃，検出：示差屈折検出器

結果および考察

1. 事例5

苦情は、ピーナツチョコレートを喫食中に、硝子かプラスチック塊のような異物に気づき、口中から取り出したという内容であった。異物は、幅および厚さ6mm程、長さ9mm程の無色半透明物質であった。異物の対照品として、苦情食品の製造工場から譲り受けたチョコレートの鋳型（モールド）についても分析を行った。まず、実体顕微鏡下で異物を検鏡したところ、表面には不定形の浅い凸凹がみられ、カッターナイフを用いて採取した異物の破片表面には、板状結晶の形態が認められた。一方、対照品の一部から採取した破片については、板状結晶の形態は認められなかった。異物小片に水一滴を滴下し、5分ほど放置後観察を行った結果、異物は水に完全に溶解していた。これにより、異物は硝子またはプラスチック類等の水不溶性物質である可能性は否定された。異物は水溶性であること、また無色半透明の結晶物質であることなどから、これらの特徴を有する最も身近な食品として、岩塩または糖類の可能性が考えられた。そこで、燃焼性試験を行ったところ異物は白煙とともに炭化し、有機物であることが判明した。異物小片、スクロース（蔗糖）（和光純薬㈱，特級），フルクトース（和光純薬㈱，特級），グルコース（和光純薬㈱，特級）及びマルトース（和光純薬㈱，特級）をそれぞれ乳鉢で微粉末とし、赤外吸収スペクトル（IRスペクトル）

表 1 異物混入事例の検査方法と結果概要

事例 No.	年 月	苦情内容	肉眼・顕微鏡観察	ヨウ素 試液	ニヒド リン試 験	溶解性 試験	燃焼性試 験	フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR)分析	蛍光X線 分析	その他の試験	結果
1	17	6	シュークリームを食べたところ、口の中に異物 感(強い感)があり、それを口から出して見た ところゴキブリにも見えた。	—	—	—	—	対照品(シュークリーム皮、ペーキ ングシートからとったもの(薄皮)、 金属へら付着物をとったもの(黒 皮)、ペーキングシートからとったもの(薄 皮)、金属へら付着物をとったもの(黒 色))とほぼ一致。	—	—	対照品(金属へら付着物をとったもの (黒色))と似た形態が一部に見られ、IR スペクトルは対照品(シュークリーム 皮、ペーキングシートからとったもの(薄 皮)、金属へら付着物をとったもの(黒 色))とほぼ一致。
2	17	6	赤ワインを取んだところ、口の中に異物が残っ た。舌で噛んだ感じは金属のようであった。	—	—	O	—	酒石酸水素カリウム標準品のIRス ペクトルとほぼ一致した。	—	—	ワインの「おり」の主成分である酒石酸 水素カリウム。
3	17	10	小学校の給食(コーンシチュー)の中に異物が 2個混入していた。鳥の骨(A)および軟骨(B) のように見えた。	—	—	—	—	異物AのIRスペクトルは、たわしの 毛及びミニほうき毛のIRスペクト ルに類似していたが、完全には一 致しない。異物BのIRスペクトルを ライブラリ検索した結果、接着 剤成分もしくはどうもこうし(乾燥 品)のIRスペクトルと異なる。	—	—	異物Aは、顕微鏡観察およびFT-IR分 析結果より、対照品であるたわしの毛 に類似した物質。 異物Bは、不明。ただし、FT-IR分析結 果より、形態から推測される接着剤等 の化学成分品及びトウモロコシの可能 性は否定。
4	17	12	ハンバーグの中に茶色の堅い異物を4個発見 した。	—	—	—	—	対照品(調理場オーブンから採取 したこげ)のIRスペクトルと類似し ていた。	—	—	調理場オーブンから採取したこげと類 似した物質。
5	18	2	ピーナツチョコレートを食べたところ、噛めない異 物に気が付き、取り出したところ、餅ずかづら スチック塊のようであった。	—	—	O水	O燃焼後、 灰化→有 機物	スクロースのIRスペクトルと一致し た。	—	—	HLPLC(示差屈折 検出器)分析によ り、スクロースの ピークを検出 していた。
6	18	2	ヨーグルトを開封したところ、表面に黒い異物 が複数浮いているのを発見した。	—	—	×水(浮 遊)	—	対照品(異物除去フィルター・黒色 物)および容器内部表面(蓋内側 中央部、蓋シール部)のIRスペク トルに類似していた。	—	—	色、質感およびIRスペクトルについて、 対照品(異物除去フィルター・黒色物)と 類似。
7	18	4	宅配された当該食品(苦情食品)を半分喫食した ところ下痢を起こしたため、冷蔵保管してあっ た当該食品を廃棄しようとしたところ、無色透 明のビニール様異物が入っているのを発見し た。	—	—	—	—	ポリエチレンのIRスペクトルとほぼ 一致した。	—	—	ポリエチレン。
8	18	5	パンを食べたところ、堅いものを感じたの で口から出して見たところ、歯のようなものだっ た。	×	×	×クロロ ホルム、 ×水、 ×希塩 酸(発 砲)	O白化、 残留→無 機化合物 を主とする 物質	ヒトの歯、マウスの歯およびマウ スの顎骨のIRスペクトル・ハター ンと類似していた。	OCaお よびP	—	ヒトの歯、マウスの歯およびマウスの顎 骨に類似した物質。
9	18	6	ヨーグルトを食べようとしたところ、ヨーグルト 断面に数個の微細な黒い異物を発見した。	—	—	×水	—	ヨーグルトミックスこげのIRスペク トルと類似していた。	—	—	「ヨーグルトミックスのこげ」の類似物 質。
10	18	7	ヨーグルトを食べている途中に、ヨーグルトと は異なる堅い固まりを一個発見した。	×	—	—	—	卵黄および全卵加熱物のIRスペク トルが一致した。	—	—	卵たんぱく質および牛乳たんぱく質を 含有する物質。
11	18	9	パンを食べたところ、パンの中から1cm位の黒 い異物が出てきた。	?	—	×水	O	苦情食品(パン)のIRスペクトルは ×重金 属および 注素	—	—	動物の糞ではない、有機物である。糞 物ではない。重金属を含有していない。 対照品(製造所採取物)とは同一物質 ではない。
12	18	12	生コロッケを購入し、自宅で揚げたて食しよう としたところ、黒い小豆のようものが付いて いた。虫の卵のように入っていた。	O	—	—	—	苦情食品(コロッケ)表面の衣とIR スペクトルがほぼ一致した。	—	—	主にデンプン質から構成され、苦情食 品(コロッケ)表面の衣と類似した物質。

O:実施した結果、反応が認められた。 ×:実施したが、反応が認められなかった。 —:実施しなかった

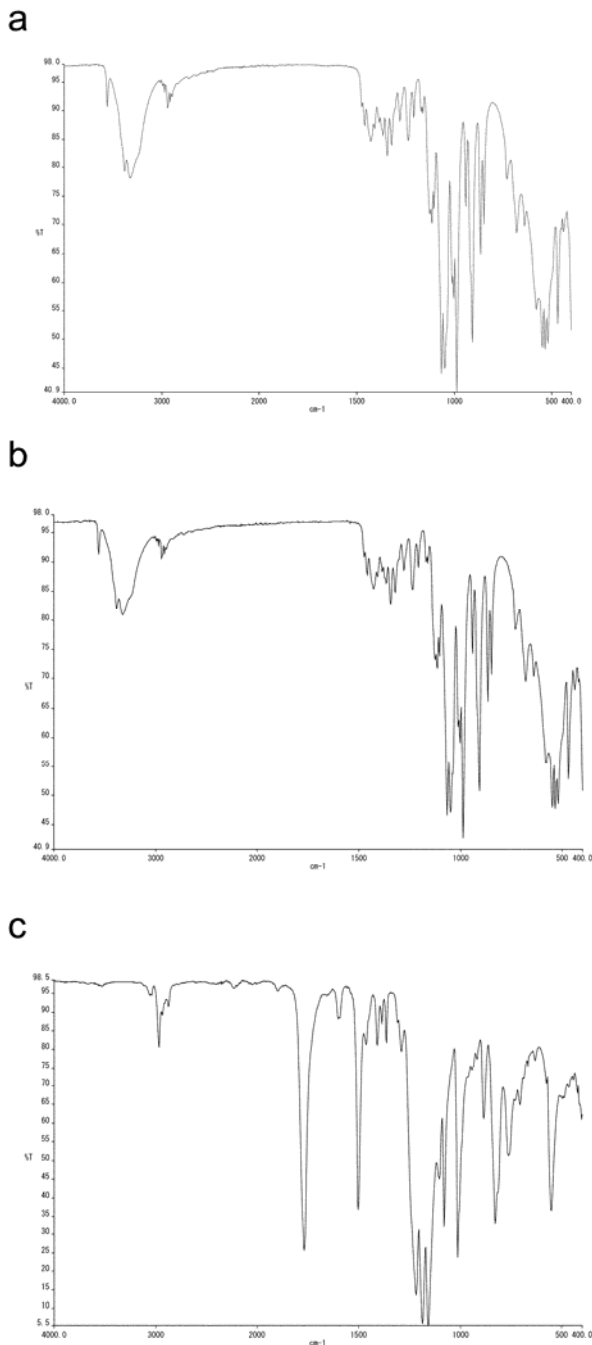


図1 異物、スクロース標準品および対照品（モールド）のIRスペクトル
a：異物，b：スクロース標準品，c：対照品（モールド）

を測定した。対照品（モールド）については、一部をカッターナイフで薄く削りとり、そのままIRスペクトルを測定した。その結果、異物のIRスペクトル（図1a）は、スクロースのIRスペクトルと一致した（図1b）。また、モールドのIRスペクトル（図1c）については、異物のIRスペクトルとは異なり、ライブラリーに登録されていたポリカーボネートのIRスペクトルとほぼ一致した。さらに、示差屈折検出器付きHPLCを用いて、糖類

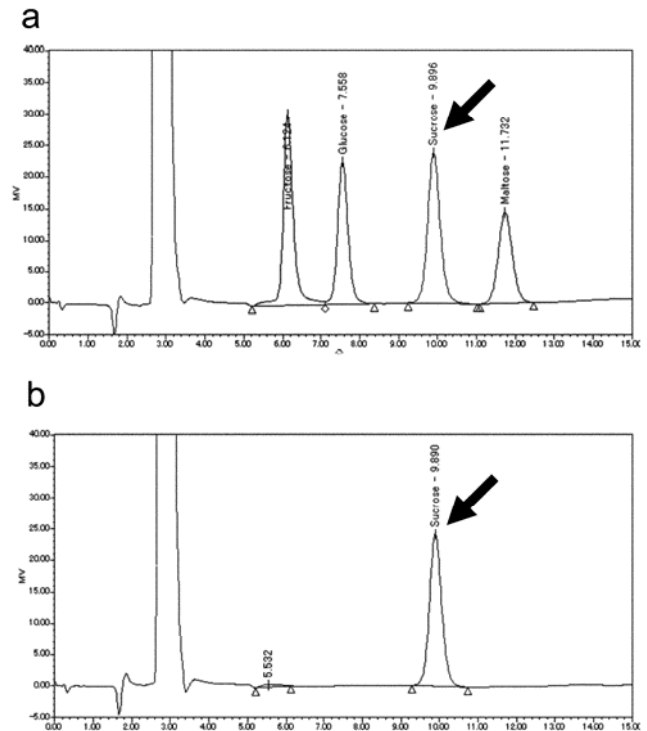


図2 糖標準溶液および異物試料溶液のHPLCクロマトグラム
a：糖標準溶液，b：異物試料溶液

の分析を行った結果、異物を溶解した試料溶液のピーク保持時間はスクロースのピーク保持時間と一致し（図2）、ピーク面積から、異物中のスクロース含有量は90%以上であることが概算された。以上の分析結果から、異物は純度の高いスクロースであることが判明し、形状上の特徴などから氷砂糖である可能性が高いと考えられた。

2. 事例8

パンを喫食中に口中で堅いものを感じ、出して見たところ歯のように見えたという苦情であった。異物は、幅7mm、長さ8mm、厚さ3mm程のトウモロコシ粒型の堅い物質であり、一面については凹状のくぼみが観察された。実体顕微鏡観察では、異物表面および凹状のくぼみ内部には茶褐色塊状の付着物が認められ、異物切片を採取した後の切断面は、乳白色を呈していた。異物表面の形態がパン生地と類似していたことから、まず、ヨウ素試液反応性試験を実施した。その結果、異物切片はヨウ素試液の色（褐色）には染まったが、ヨウ素デンプン反応による暗紫色は呈さなかった。次に、ニンヒドリン試液反応性試験実施したが、タンパク質等にみられる紫色の変化も認められなかった。そこで、燃焼性試験を行った結果、異物は徐々に炭化し、更に加熱することにより白化した。白化物にはひび状の細かい割れ目が認め

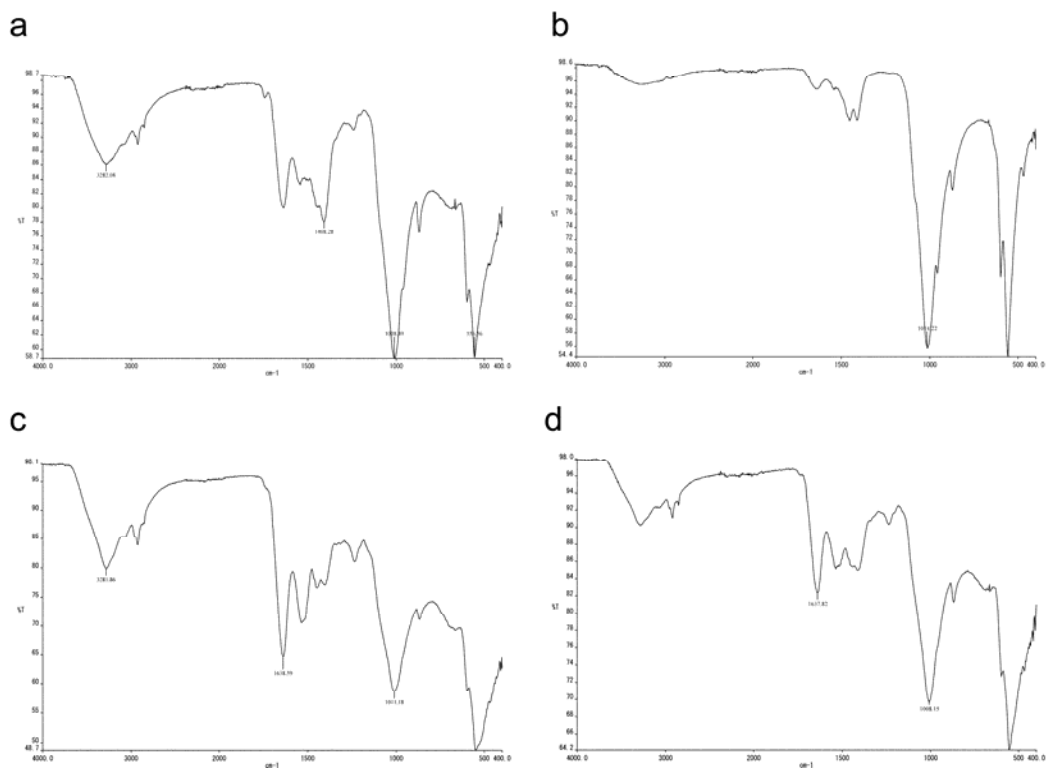


図3 異物および対照品のIRスペクトル
a: 異物, b: ヒト歯, c: マウス歯, d: マウス顎骨

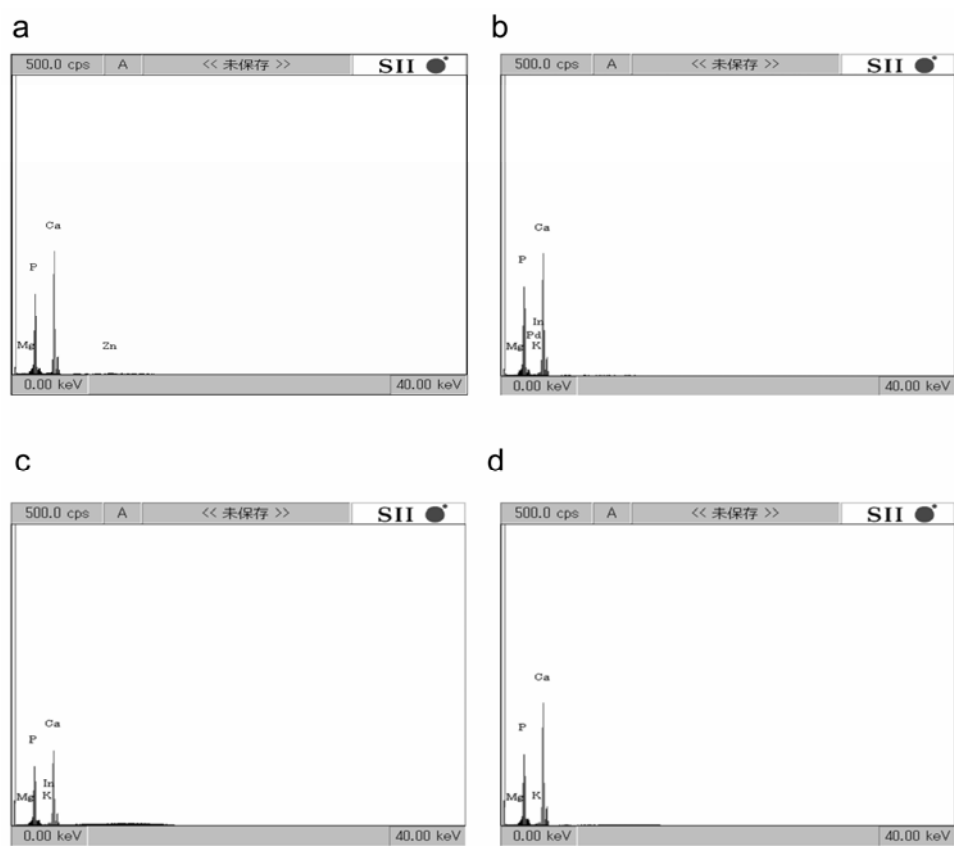


図4 異物および対照品の蛍光X線スペクトル
a: 異物, b: ヒト歯, c: マウス歯, d: マウス顎骨

られたが、大きさおよび形は燃焼前と変わらず、ピンセットで摘める硬さであった。更に、溶解性試験を実施した。異物切片および燃焼性試験後の白化した異物を超純水およびクロロホルム中にそれぞれ1晩浸漬した結果、いずれも溶解せずにもとの形態を保っていた。しかし、希塩酸中では、白化した異物は発砲しながら溶解した。これらの分析結果より、異物は無機化合物を主とする水不溶性物質であり、希塩酸溶解性の炭酸塩を含有している可能性が考えられた。そこで、ヒトの歯、マウスの歯および顎骨を対照品として、IR分析および蛍光X線分析を行った。IR分析では、異物および対照品のIRスペクトルは、 3280cm^{-1} 付近、 $1600\sim 1400\text{cm}^{-1}$ 付近、 1000cm^{-1} 付近および 550cm^{-1} 付近に吸収を認め、マウスの歯および顎骨のIRスペクトルパターンは異物のIRスペクトルパターンと類似していた(図3)。また、蛍光X線分析においても、異物および対照品の蛍光X線スペクトルは類似し、CaとPの強いピークが認められた(図4)。Ca/Pピーク強度比については、ヒトの歯およびマウス

の歯は約1.4、マウスの顎骨は約1.8、異物は約1.6であり、異物と対照品は近似した値を示した。以上の分析結果から、異物は、ヒトの歯、マウスの歯およびマウスの顎骨に類似した物質であると考えられた。

異物検査において、顕微鏡観察から得られる情報は非常に多く、分析の方向性を決める大きな手がかりとなる。また、化学分析の過程においても、化学反応の結果や染色の状態を顕微鏡下で観察することで、より詳細な情報を得ることができる。異物検査では、限られた量の試料から物質の特定を行わなければならないことから、試料の取り扱い、検査の順序や方向性の判断が重要であるとする。

(平成19年7月20日受理)

参考文献

- 1) 大森清美ほか：食品中の異物検査結果について(平成15年度・16年度)，神奈川県衛生研究所研究報告，**35**，36-40(2005)

短報

コナヒョウヒダニが生産する アレルゲン Der f 1 量の測定と その安定性の評価

稲田貴嗣, 竹田 茂

Measurement of allergen content of Der f 1 yielded from *Dermatophagoides farinae* and evaluation of its stability

Takatsugu INADA and Shigeru TAKEDA

はじめに

屋内性ダニ類のチリダニ科ヒョウヒダニ属のコナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* とヤケヒョウヒダニ *D. pteronyssinus* は、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患を引き起こすアレルゲン物質を生産することが知られている^{1,2)}。これらのダニはどこの家庭でも普通に発生するダニで、床や布団などから採取した屋内塵（ハウスダスト）中に見つかるダニの大多数を占めている。

ダニアレルゲンとなる物質を明らかにするために、ダニおよびダニ飼育培地からタンパク質が抽出・分離され、その構造解析などの研究が盛んに行われている。その結果、排泄物（糞）由来アレルゲン（Der 1）や虫体由来アレルゲン（Der 2）など10数種類のヒョウヒダニ由来のアレルゲンが見つかり³⁾、それらの性状や構造が明らかにされている。それらのダニアレルゲンの中でも Der 1 および Der 2 はアレルギー疾患と関連が強く、屋内塵中などにそれらが多く蓄積すると喘息の感作や発作を誘発することが知られている。特に、長期間押入に収納されていた寝具はダニが増加しやすい環境に置かれ、ダニの糞や死骸などが蓄積されている。そのため寝具を使用する際、ダニアレルゲンを吸引することによって喘息発作を誘発する危険性が大きい⁴⁾と考えられている。寝具など、定期的に清掃が行われない状況にある場合、ダニアレルゲンは蓄積され増加するのか、それとも徐々にアレルゲン性を失うのか、その安定性は明らかでない。そこでコナヒョウヒダニを個別に飼育して、生産さ

れるダニアレルゲン（Der f 1）量を測定し、ついで Der f 1 の活性が時間の経過によってどのように変化するかを試験した。

材料および方法

1. 材料および飼育室の環境条件

ダニは神奈川県内の一般家庭で採取した屋内塵から分離・抽出し、餌（35g）の入った腰高シャーレ（ $\phi 90\text{mm} \times 60\text{mm}$ ）で飼育培養したコナヒョウヒダニを用いた。

餌は飼育培養前に飼育室内と同条件に数週間置くことによって水分含量を調整した、マウス・ラット用粉末飼料（MF粉末、オリエンタル酵母工業）を用いた。

飼育室は、25℃、65%RH、24時間暗条件に調節した。

2. 糞の採集

培養したコナヒョウヒダニを、飽和食塩水浮遊法を用いて餌からろ紙上に分離し、実体顕微鏡下で若虫を抽出した。若虫は成虫になるまで、飼育室に置いたガラス管（図1）の中で1個体ずつ飼育した。成虫を別のガラス管に移し、さらに飼育室で2週間飼育後、ダニの糞を餌とともにガラス管内から取り出した（オス：334個体、メス：383個体）。ガラス管内の餌は、1本あたり平均0.003g使用した。

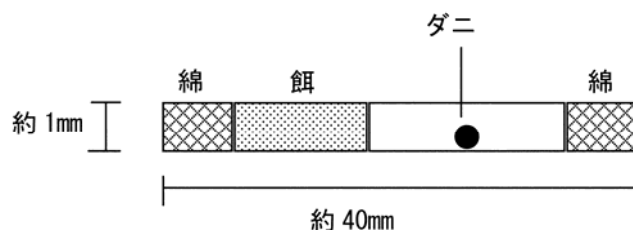


図1 ダニの個別飼育容器

3. ダニアレルゲンの安定性試験

ダニの糞が蓄積された餌を、雌雄別に3-13匹分を1サンプルとしてシャーレに集めた（オス：48サンプル、メス：49サンプル）。ダニを取り除いた後、餌が飛散ないようにシャーレにナイロン布でフタをして、飼育室に一定期間（1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月）放置した。

4. ダニアレルゲン Der f 1 量の測定

シャーレ内の餌をマイクロチューブ（1.5ml）に移し、1%BSA含PBS-T（0.05%Tween20）を1ml加え、室温（25℃）で4時間攪拌した。ついで2000rpm、10分間遠心後、上澄み液を用いて、ELISA法でDer f 1量を測定した。

モノクローナル抗体および標準ダニ抗原は、INDOOR社製ELISAキット（Der f 1 ELISA 20）を用いた。

ELISA法の作業手順は、wellの洗浄回数を5回に変更した以外はELISAキット付属の手順書に従った。

結果および考察

1. Der f 1生産量

糞採集直後の試料で測定したDer f 1生産量を表1に示した。コナヒョウヒダニ1匹が1日あたりに生産するDer f 1量はオスが 0.37 ± 0.17 ng (平均±標準偏差)、メスが 0.28 ± 0.09 ngであった。

表1 コナヒョウヒダニ1匹が1日に生産するDer f 1量

	平均±SD (ng)	最大 (ng)	最小 (ng)
オス成虫	0.37 ± 0.17	0.71	0.28
メス成虫	0.28 ± 0.09	0.39	0.18

WHO⁵⁾ やPlatts-Mills et al.⁶⁾ などによって細塵1gあたりのDer 1量 2μ gがアレルギー患者の感作基準とされている。このDer 1量は、Tovey et al.⁷⁾ が測定したヤケヒョウヒダニの糞1個に含まれるDer p 1量と1日に生産される糞数から、ダニ100匹が7日間に排出する量に相当するといわれている。今回の測定結果をもとにダニ100匹が7日間で生産するDer f 1量を算出すると、オス 0.26μ g、メス 0.20μ gであり、Tovey et al.⁷⁾ の報告値の約1/10の量であった。Tovey et al.⁷⁾ は、ダニの飼育環境が最適でない場合、糞の生産数が減少することを報告している。本試験では餌にカビが発生するのを抑えるため、コナヒョウヒダニの発育に最適な湿度(約70% RH)よりも少し低い条件(65% RH)で飼育を行っており、その影響を受けて糞の生産量が減少した可能性が考えられる。このことは、ダニが好む最適な状態にならないように住環境を調節することによって、ダニアレルゲンの蓄積量が抑えられることを示している。ダニの発生数を抑制するための一般的な対策として、室内を乾燥させることが重要とされている。室内を乾燥するなどの住環境対策を行うことは、ダニの発生数を抑制するだけでなく、ダニアレルゲン生産量の抑制にもつながると考えられる。

2. アレルゲン活性の変化

時間経過にともなうDer f 1量の変化を図2に示した。

オスが生産したDer f 1は糞採集直後の試料(0.37 ± 0.17 ng/匹/日)、1ヶ月後の試料(0.34 ± 0.13 ng/匹/日)、3ヶ月後の試料(0.32 ± 0.11 ng/匹/日)、6ヶ月後の試料(0.28 ± 0.10 ng/匹/日)で有意な差はなく(Kruskal-Wallis test, N.S.)、時間経過にともなうアレルゲン活性の減少は見られなかった。一方、メスでは

3ヶ月後の試料(0.16 ± 0.06 ng/匹/日)が糞採集直後(0.28 ± 0.09 ng/匹/日)および1ヶ月経過後の試料(0.22 ± 0.08 ng/匹/日)よりもDer f 1量が少なく、有意な差が見られた(Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$)。しかし6ヶ月経過した試料(0.18 ± 0.07 ng/匹/日)では他の試料と有意な差は無く(Mann-Whitney U-test, N.S.)、メスでもDer f 1のアレルゲン活性は6ヶ月間失われぬものと考えられる。橋本・吉村⁸⁾は屋内塵中のダニアレルゲン活性の安定性を夏期の住環境(25–38℃, 70% RH以上, 直射日光が1日数時間当たる条件)で2ヶ月間試験し、Der 1の分解や変性はほとんど無く、居住環境の条件ではDer 1の安定性は高いとしている。本試験においてもDer f 1のアレルゲン活性は6ヶ月間変化があまり見られず、橋本・吉村⁸⁾と同様に、その安定性が高いことが示された。したがって、ダニアレルゲンは自然に減少することではなく、清掃などによって除去しない限り、蓄積され増えていくものと考えられる。

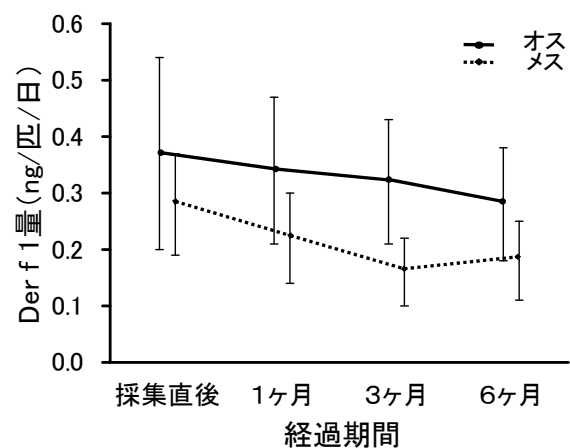


図2 時間経過にともなうDer f 1量の変化
Error bar:SD

まとめ

本試験の結果、Der f 1の活性は長期間変化しないことが明らかになった。一方、1個体が生産したDer f 1量は一般的にいわれている値に比べて非常に少なかった。原因のひとつとして湿度などの環境要因が影響している可能性が考えられた。今後この原因を明らかにすることが、温湿度の調整など環境整備の面からダニアレルゲン対策を行ううえで重要であると考えられる。

謝辞

本研究は、平成17年度神奈川県重点基礎研究費で行われた。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) Voorhorst, R., Spieksma-Boezeman, M. I. A. and Spieksma, F. Th. M.: Is a mite (*Dermatophagoides* sp.) the producer of the house-dust allergen?, *Allergie und Asthma*, **10**, 329-334 (1964)
- 2) 宮本昭正, 大島司郎, 石崎達, 佐藤重男: 室内塵とダニの抗原性の一致について, *アレルギー*, **17**, 85-90 (1968)
- 3) Thomas, W. R., W. Smith, B. J. Hales, K. L. Mills and R. M. O'Brien: Characterization and immunobiology of house dust mite allergens, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **129**, 1-18 (2002)
- 4) 西宮市ダニアレルギー調査委員会: ダニアレルギー調査報告書, 西宮市環境衛生局出版, 兵庫 (1989)
- 5) WHO : Dust mite allergens and asthma. A worldwide problem, *Bull. WHO*, 769-780 (1988)
- 6) Platts-Mills, T. A. E., W. R. Thomas, R. C. Aalberse, D. Vervloet and M. D. Chapman: Dust mite allergens and asthma: Report of a second international workshop, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **89**, 1046-1060 (1992)
- 7) Tovey, E. R., M. D. Chapman and T. A. E. Platts-Mills : Mite faeces are a major source of house dust allergens, *Nature*, **289**, 592-593 (1981)
- 8) 橋本知幸, 吉村結子: コナヒョウヒダニDer I アレルゲンの飼育培地中における蓄積と安定性の評価, *日環セ所報*, **28**, 56-62 (2001)

短報

食品中のアレルギー物質検査における精度管理の検討- I

酵素免疫測定法 (ELISA) による定量

渡邊裕子¹, 児玉千絵², 関戸晴子¹, 濟田清隆³
宮沢啓貴³, 渡部健二郎³, 田中幸生², 山田利治¹

Study of managing accuracy methods for detection of
foods containing allergic substances - I
Quantitation by ELISA

Hiroko WATANABE, Chie KODAMA
Haruko SEKIDO, Kiyotaka SAITA
Hirotaka MIYAZAWA, Kenjiro WATABE
Yukio TANAKA and Toshiharu YAMADA

緒言

平成14年11月に通知された「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食発第1106001号)に基づき神奈川県内では川崎市、横浜市と県衛生研究所の3機関で行政検査を行っている。当検査は加工食品中のアレルギータンパク質をELISA法で定量することをスクリーニング検査としている。また、スクリーニング検査の陰性・陽性の判断基準を $10 \mu\text{g/g}$ と設定し、定量値が $8 \sim 12 \mu\text{g/g}$ となった場合に再測定を行ない、値の平均値を採用することが定められている。食品中のアレルギータンパク質は、加工による変性状態が多様で不均一となり、食品からの抽出効率が大きく変化することが知られている。また、ELISA法は抗原抗体の結合反応を用いた測定法であることから、食品試料中の夾雑物の影響を受けやすく、判断基準である $10 \mu\text{g/g}$ を基準とした数値の再現性及び信頼性の確保が検査法の課題として挙げられる。

そこで、平成14年度に通知されたELISAを用いた定量法の信頼性を確保することを目的に3機関共同で日常検査において簡易に行うことができる精度管理の方法について検討を行った。本報告では3機関の室間誤差を明らかにし、その要因について試料の調製、食品からの抽出

方法、ELISA法におけるスパイクチェック等の検討を行った。アレルギー原因物質の表示義務として検査法が設定されている5品目(卵、乳、小麦、落花生、そば)のうち、卵タンパク質を測定することにより評価した。

方法

1. 試料の調製

試料として卵黄蒸しケーキを調製し、用いた。ケーキは卵黄 300g、小麦粉300g、バター180g、砂糖200g、ベーキングパウダー10gを混合し、35gずつカップに小分けしたものを11分、13分、15分蒸して調製した(卵黄の割合30.3%)。各材料は同一ロットを使用し、卵黄を除く材料の卵タンパク量が検出限界以下であることを確認した。

2. 試薬および機器

卵タンパク量の測定には、(株)森永科学研究所製モリナガ卵白アルブミン(OVA)キット(以下OVAキット)および日本ハム(株)製FASTKITTM卵エライザキット(以下卵キット)を用いた。その他の試薬は、すべて試薬特級を用いた。水は超純水を用いた。

サンプルの均一化には、フードカッター ナショナル製 MK-K58を用いた。抽出操作には、キネマティカポリトロン製ホモジナイザーPT3100、あるいはボルテックスミキサー製VORTEX社製VORTEXGENE2、高速冷却遠心機トミー製GRX-220を用いた。ELISA法には、マイクロプレートウオッシャー バイオラッド(株)製モデル1575及びマイクロプレートリーダー バイオラッド(株)製モデル680を用いた。pHの測定には東亜電波工業社製HM-30Gを用いた。

3. 卵タンパク質の測定

試験溶液の調製は検査方法に従い¹⁾、均質化されたサンプルを50mLのポリプロピレンチューブに約2g取り、キット付属の抽出用緩衝液を38mL加えた後、氷冷しながらホモジナイザーで10,000rpm、60秒ホモジナイズし、pH6~8に調整する。さらに10,000rpm、60秒ホモジナイズを2回繰り返した後、 $3000 \times g$ 、4℃で20分遠心分離し、上清を採取した。ボルテックスミキサーによる抽出では90秒攪拌した後、遠心し上清を採取した。卵タンパクの定量として用いたELISA法は既報^{1)~5)}に従い行った。定量限界については、日本薬局方の基準を準用し、 $> \mu \pm 10 \sigma$ (μ ; ブランク溶液の吸光値の平均値、 σ ; ブランク溶液吸光値の標準偏差)とした。3機関をA,B,Cとして結果を示した。

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 川崎市衛生研究所

3 横浜市衛生研究所

結果及び考察

試料の調製

試料調製は調製方法が簡易な食品として卵黄蒸ケーキを選定した。試料調製のための卵タンパク質の標準品が入手できないことから、市販の卵から卵黄を分離したものを卵標準品として加え調製した。この場合、卵タンパク質量が未知である卵黄を用いるため、添加回収率を求めることはできない。ゆえに分析法における真度を評価することはできない。しかし、日常の検査において同一試料を保存しその継続的な定量によって室内、室間精度の維持ができることから、本試料を用いた室内、室間精度の評価を行った。

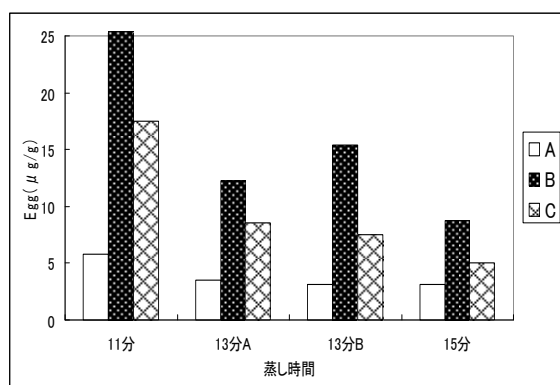


図 1 各機関で調製した卵黄蒸ケーキの蒸し時間の検討：卵キット(n=2)

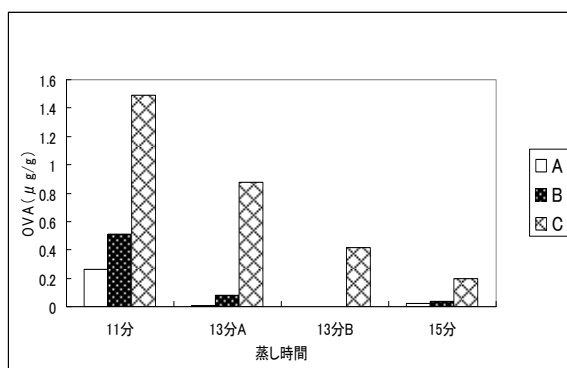


図 2 各機関で調製した卵黄蒸ケーキの蒸し時間の検討：卵白アルブミンキット(n=2)

各機関でそれぞれに卵黄蒸ケーキを調製し、蒸し時間による卵タンパク質の変化について検討を行った。卵タンパク質の定量結果を図1（卵キット）と2（OVAキット）に示した。卵キットでは13分と15分の蒸し時間で3～15 $\mu\text{g/g}$ の定量値となることから、基準値の10 $\mu\text{g/g}$ 付近でELISA法の検量線の範囲内であることから、13分の蒸し時間が妥当と考えられた。一方、OVAキットでは11分から15分の蒸し時間で1.5 $\mu\text{g/g}$ 以下となり、精度管理に適切な値が得られなかった。ゆえに精度管理検討用

サンプルとして、13分の蒸し時間で調製した卵黄蒸ケーキを用い、卵キットの測定値を採用した。

次に共通試料として共同で調製した卵黄蒸しケーキを用いて、3機関の定量値を比較した。共通試料は、試料1と2の2回試料調製を行い、2回抽出による平均値を図3に示した。2回の試料調製では、試料1で2機関が20 $\mu\text{g/g}$ 以上の検量線外の値となった。加工を伴う試料調製の再現性を一定に保ち、検量線内に3機関の定量値を安定させることは難しかった。また、試料2の結果をみると3機関の定量値の傾向と図1に示した各機関で調製したサンプルの定量値の傾向とが一致していた。つまり、定量値がB>C>Aの順となった。この傾向はサンプル調製に因らないことから、3機関の室間誤差の要因を明らかにするために抽出方法およびELISA法の見直しを行った。

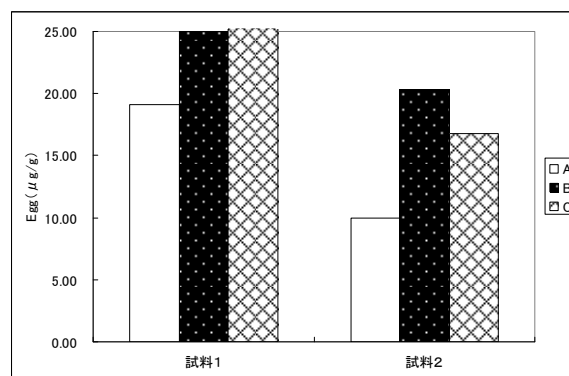


図 3 共通試料における3機関の定量値の比較：卵キット (n=2)

食品からの抽出方法

今回検討した3機関では、2機関が内径の異なるホモジナイザーで抽出を行い（A:12mm, C:20mm）、1機関がボルテックスミキサーでの抽出を行っていた(B)。

そこで、これらの抽出条件による定量値の比較を行った（表1）。ホモジナイザーによる抽出では内径12mmと20mmで同じ結果が得られた。また、12mm径では回転数を10,000rpmと20,000rpmで比較したが同等の結果が得られた。さらに、ホモジナイザーとボルテックスミキサーによる抽出においてもほぼ同様の結果が得られ

表 1 抽出方法の違いによる比較(n=5)

検討項目	抽出条件	平均値($\mu\text{g/g}$)	CV値(%)
ホモジナイザー抽出条件による検討 ¹⁾	内径12mm/10,000rpm	4.0	4.9
	内径12mm/20,000rpm	3.9	2.2
	内径20mm/10,000rpm	4.0	2.8
ホモジナイザーとボルテックスミキサーとの比較 ¹⁾	ホモジナイザー (内径20mm/10,000rpm)	7.1	6.7
	ボルテックスミキサー	6.5	5.2

1)同一試料を用いて1機関で測定した

たことから、抽出方法の違いによる影響ではないことが示された。

ELISA法における標準品のスパイクチェック

本検討では、3機関がそれぞれの施設で測定した場合に、同一標準品を用いたスパイクチェックを行った。結果を表2に示した。OVAキットと卵キットそれぞれに8,16 $\mu\text{g/g}$ と5,10 $\mu\text{g/g}$ の各2濃度でチェックを行った。いずれもほぼ同等な結果が得られ、3機関のELISA法の真度が確保されていることを確認した。

表2 3機関によるELISA標準品スパイクの比較 ($\mu\text{g/g}$)

キット	標準品濃度	測定機関		
		A	B	C
OVA	8	8.7	8.1	7.7
	16	15.8	16.0	13.6
卵	5	4.1	4.5	4.0
	10	10.1	10.8	10.9

抽出緩衝液の調製方法の違いによる比較

次に、抽出用緩衝液の調製方法の違いによる卵キットの定量値の比較を行った(表3)。通知法では抽出用緩衝液を試料に添加後、中性付近(pH6.0~8.0)となるようにpHを調整することが明記されている。タンパク質の抽出効率には、抽出用緩衝液のpHも大きく関与することから、各機関で調製した抽出用緩衝液と共通に調製した抽出用緩衝液を用いて抽出を行い、その時のpHを比較した。

表3 抽出緩衝液の調製の比較(n=2)

抽出緩衝液	測定項目	測定機関		
		A	B	C
共通	pH	7.06	7.11	7.05
	卵($\mu\text{g/g}$)	20<	18.8	18.3
各機関で調製	pH	7.14	7.11	7.85
	卵($\mu\text{g/g}$)	18.6	17.5	20<

共通に調製した抽出用緩衝液のpHを各機関で測定した結果はpH7.05~7.11 (B>A>C) となり、定量値はA>B>Cの順となった。また、各機関で調製した抽出用緩衝液はpH7.11~7.85 (C>A>B) となり、定量値はC>A>Bであった。抽出用緩衝液のpH値はいずれもpH6.0~8.0の範囲内であることから、通知法に準じると中性に調整する必要はない。また、3機関が調製した抽出用緩衝液のpHと定量値の関係は一定の傾向を示さなかった。このことから、抽出効率の変動によると考えられる定量値の変動は他の要因によると考えられ、さらに検討

が必要であった。

以上、我々は精度管理方法の検討として、試料の調製を行い、抽出方法およびELISA法の手順を確認し、3機関の室間誤差を明らかとし、その要因について検討を行った。その結果、ELISA法における手法や技量が同等であることを確認し、室内精度が確保されていることを示すことができたが、室間誤差の要因を明らかとすることはできなかった。一方、アレルギー物質の検査においては標準品が公開されていないことや食品によりその抽出効率が大きく異なるなど、精度管理を行うにあたり安定した試料の確保や真度の把握が大きな課題であり、本検討においてもそれらの2点をコントロールすることは難しかった。

精度確保の取り組みとして、佐藤⁶⁾はELISA法における検査結果の評価と課題について挙げ、独自に作製している内部標準試料の調製方法について紹介している。また、戸谷⁷⁾は日常の検査での注意点を挙げ、精度維持のための取り組みを紹介している。各機関での取り組みは、通知法にはない検査の原理と限界を理解した上で検査にあたることで、精度の評価とその確保に不可欠であることを示すものである。さらに、平成17年および平成18年度に検査法の改正が行われ、検査側が検査法を評価し採用するという選択が可能となった。しかし、各機関でこれらの検討を行うにはコスト面での負担が大きいことから、今後も継続的に共同研究をすすめ、検査の信頼性の確保に務めていきたい。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) 穂山浩：アレルギー物質を含む食品の検査方法について、食衛誌, **44**, J168-J177(2003).
- 2) 穂山浩, 豊田正武：食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の概要, 食品衛生研究, **52**, 65-73(2002).
- 3) 穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝, 渡邊裕子, 飯島賢, 山川宏人他：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, 食衛誌, **44**, 213-219(2003).
- 4) 高畑能久:ELISAによる特定原材料の検出について(1), 食衛誌, **44**, J275-277(2002).
- 5) 豆越真一：ELISAによる特定原材料の検出について(2), 食衛誌, **43**, J277-J279(2002).
- 6) 佐藤秀隆：アレルギー物質検出に関する課題について, 食衛誌 **46**, J249-J251(2005).
- 7) 戸谷和男：特定原材料の定量検査で気にかけていること 食衛誌 **47**, J352-J353(2006).

短報

公衆衛生における統計学的 手法の検討 — 食物アレルギーによる アンケート集計を題材にして —

佐藤善博, 板垣康治, 中村廣志

Examination about a statistical method in public health — About the case of the theme based on questionnaire survey of food allergy —

Yoshihiro SATO, Yasuharu ITAGAKI
and Hiroshi NAKAMURA

はじめに

神奈川県における食物アレルギーの実態を把握し、解析した成果を今後の食物アレルギーの治療や予防対策に役立てることを目的に、平成16年に神奈川県内3市の小学生およびその家族を対象としてアンケート調査（地域保健推進特別事業費で賄った）を実施した。得られたデータに基礎的な解析を行い総合研究報告書¹⁾を提出したが、食物間の関連性等はクラメールの独立係数によって求めている。しかし、各設問は複数回答が主体であり、これらを加味した回答者間並びに食品間の相対的な位置関係等を求めるためには他の手法の検討が求められた。そこで、多変量解析の一手法である数量化Ⅲ類²⁾で解析し、解析結果を2次元平面に配置することによりカテゴリあるいはサンプル間の類似性や位置関係の解釈を試みたので報告する。

方 法

アンケートで得られた全データ（34,441件）から、「食物を食べて何らかのアレルギー症状を起こしたことがありますか」で「ある」と回答のあった3,590名を解析対象とした。

解析ソフトはエクセル統計2004（(株)社会情報サービス社）を用いた。アンケート結果をエクセル[®]で集計したデータベース（以下、元データ）について、回答が「は

い」、「あり」を1,「いいえ」「わからない」「無回答」を0として1/0データに数値変換したものを解析に供した。ここで、数量化Ⅲ類とは項目(カテゴリ)と回答者(サンプル)にそれぞれ質的データ（ここでは「はい」「いいえ」のような2値判断したデータ）が与えられているとき、お互いに類似性の高い項目・回答者が近づくように並べ替えると、反応したものが対角線の周辺に集まってくる。これから新しいファクター(軸)が求められ、このファクターにより項目と回答者をそれぞれ得点化し、その相互の関連(カテゴリ・サンプルの類似性)を明らかにする手法である。今回の解析においてカテゴリ相互の類似性から軸を抽出したが、今回はこれを2軸として解析を行い、それぞれカテゴリスコア、サンプルスコアを算出した。また、元データから回答項目別の集計を行った。

結果および考察

1. サンプルスコアと属性別平均

アレルギーを起こしたことがある食品(以下、アレルギー原因食品)を変数として解析を行い、得られたサンプルスコアから散布図を作成した(図1)。複数回答から得られた結果であるため幅広い分布を示しているが、各プロットは必ずしも回答者1名を表しているのではなく、例えば左下隅のプロットは卵だけにアレルギー有りと答えた人の集合で、元データから577名が重なっているような場合もある。各プロットはそれぞれ性別、年齢などの属性を持つので、ここでは男女別に総合研究報告書で示された就学前（乳幼児期）、学童期、成人前までと20歳

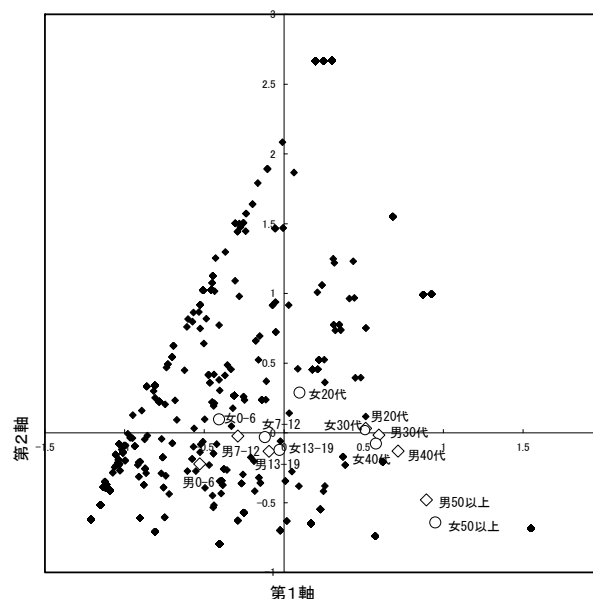


図1. サンプルスコアの散布図と性・年齢区分による属性別平均

代から50歳代まで10歳刻みでサンプルスコアから性別と年齢区別に平均値(以下、属性別平均)を求めたものを散布図に配置した。年齢が大きくなるとともに左から右へ属性別平均値のプロットが移行していくことが見られたので、第2軸は年齢と相関の高い軸と解釈された。

2. アレルギー原因食品と性別・年齢区別属性平均

次にカテゴリスコアから散布図を作成し、これに前述の性別・年齢区別属性平均を配置したものを示す(図2)。カテゴリスコアの散布図と属性別平均の散布図はデータの単位が異なるため、同じグラフに書き込んで分析することは本来好ましくないとされている²⁾が、カテゴリスコアの散布図とサンプルスコアの散布図の軸の名称と方向性は同じなので、位置関係を明瞭にするためにあえて重ね合わせたものを示した。第1軸は動物性食品と植物性食品を分ける軸、第2軸は前述のサンプルスコアの属性別平均から、年齢と相関の高い軸と解釈された。卵、牛乳が属する象限には就学前を含めた若い年齢層が配置され、これら食品によるアレルギーを発症する傾向が強いものとみられた。野菜・くだものは成人、特に女性³⁾で発症が増加し、それ以上の年代では年齢とともに魚介類によるアレルギー発症が増加し、全体で見ると年齢とともにアレルギー原因食品が移行していく現象が示された。この移行については厚生労働科学研究班による報告書⁴⁾で、「多くの割合の児童については卵、牛乳、小麦が乳幼児の食物アレルギーの主な原因であり、その後加齢とともに耐性を獲得していく」と報告されて

いる。ここでさらに、この報告書で区分されている乳児期(0歳)、幼児期(1歳、2-3歳、4-6歳)、学童期以降(7-19歳)、成人期(20歳以上)で区分した属性別平均をカテゴリスコアの散布図に配置してみると(図3)、乳幼児期には卵、牛乳だけでなく小麦、そば、落花生なども原因食品であることが明らかになり、この推移がより明瞭に裏付けられた。

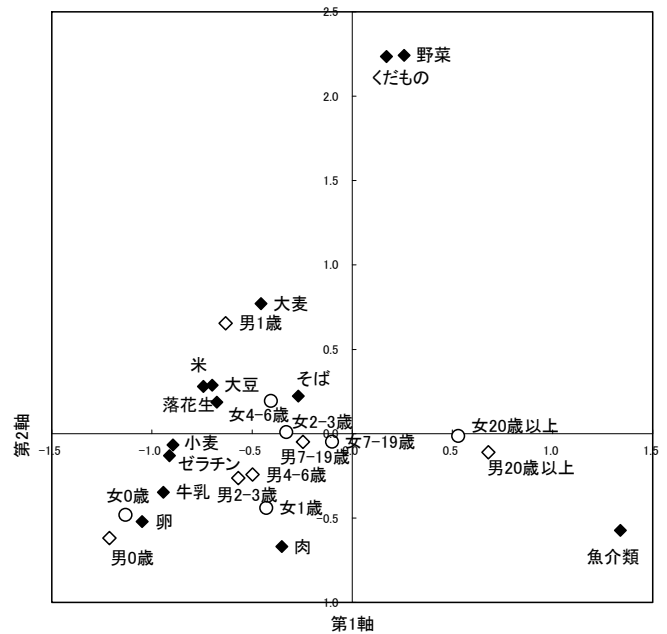


図3. 年齢区分を変更したアレルギー原因食品の散布図

3. アレルギー原因食品と自覚症状・診断名

アレルギー原因食品、自覚症状並びに診断名を変数にとり解析した結果を示した(図4)。軸の解釈は上記と同じであり、気管支喘息に代表される呼吸器症状が属する象限には穀類が主に属し、特にそばと近い関係にあることがわかった。また、食物アレルギーとアトピー性皮膚炎は牛乳、卵と同じ象限に属しており、乳幼児がここに属していることは先に示したとおりであり、食物アレルギーは乳児期のアトピー性皮膚炎に合併して発症するケースが多いという報告^{4,5)}を裏付けているものと解釈された。じんましんは魚介類と強い関係にあるが、食物アレルギーとじんましんは異なった象限に属し、アンケートで魚介類に食物アレルギーがあると答えた人の多くはヒスタミン中毒によるじんましんが含まれているものと推定された。野菜・くだものと口腔アレルギー症候群は、近い位置に配置され、口腔アレルギーの原因食品であることが示され、さらに、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎も同じ象限にあることから野菜・くだものにアレルギーのある人は花粉症を合併することが多い⁴⁾ことが示された。

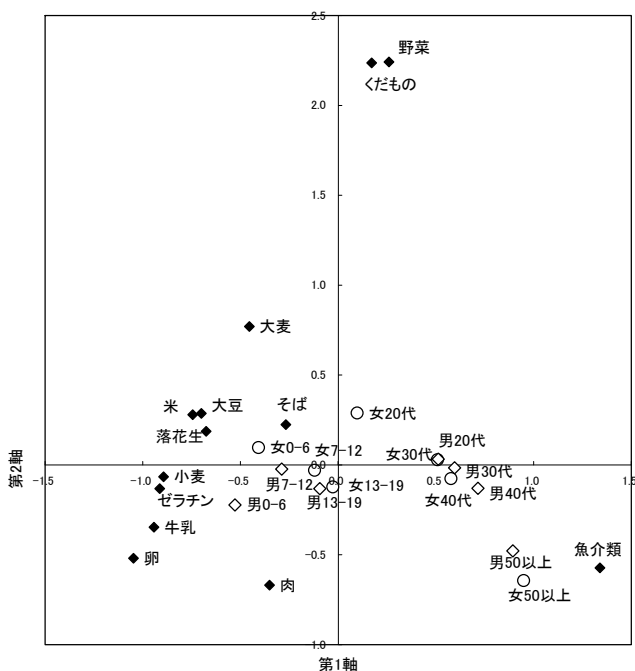


図2. アレルギー原因食品の散布図と性・年齢区分による属性別平均

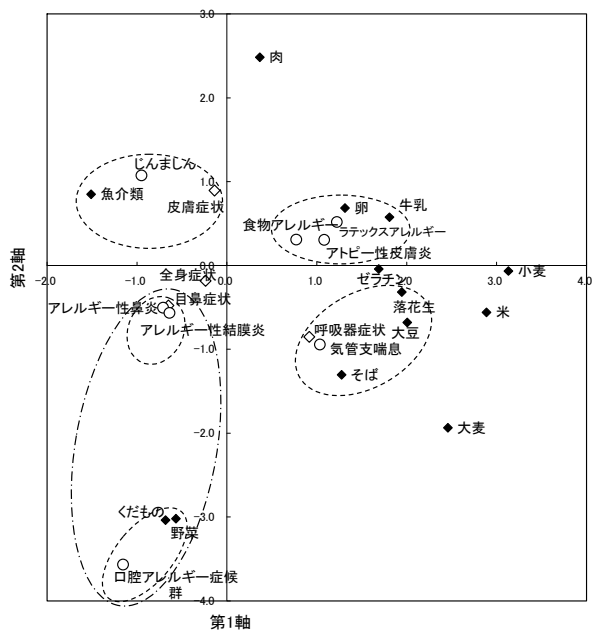


図4. 食品と自覚症状・診断名の散布図
◇自覚症状 ○診断名

4. 魚介類相互間の関連性

魚介類にアレルギーがあると回答した人に、魚介類13種類について回答(複数回答)を求め、これらを変数にとり解析し、これに「じんましん」と診断された人の属性別平均を求め配置した(図5)。エビ、カニ(甲殻類)、イカ、タコ(頭足類)、タラ〜タイのグループに大きく分かれたが、イクラとサバは離れた位置に配置され、特異的であることが示された。元データからサバのみに回答した人は172名、イクラのみに回答した人は55名で

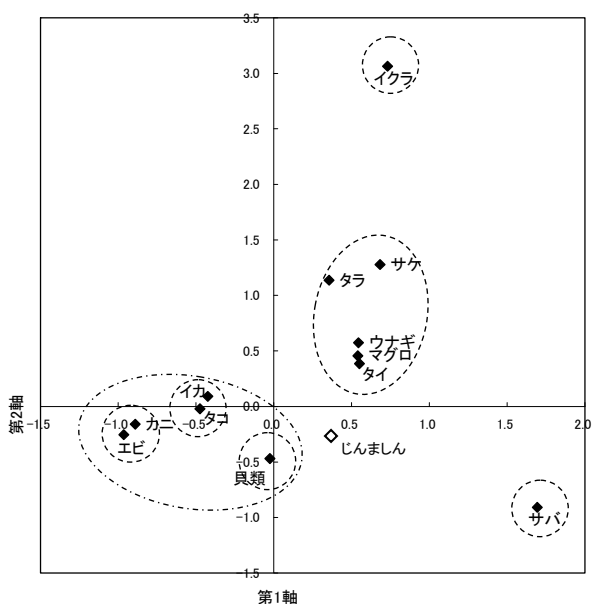


図5. 魚介類相互間の関連性とじんましんの属性別平均

あった。サバは「じんましん」と同じ象限に属し、前述の「アレルギー様食中毒」と呼ばれている疾病が含まれていること⁶⁾が推測された。貝類は甲殻類、頭足類とほぼ同じ象限に属しており、アレルゲンとしてトロポミオシンを含んでいる。マグロータラ、マグローサケはパルブアルブミンによる交差反応性が報告⁶⁾されており、全体としてみると、魚介類は含有するトロポミオシン、パルブアルブミン、コラーゲン等のアレルゲンの種類により各象限に配置されることが推測できた。

5. 野菜類相互間の関連性

野菜類にアレルギーがあると回答した人に野菜類20種類について回答(複数回答)を求め、これらを変数にとり解析し、これに「花粉症有り」と答えた人、口腔アレルギー症候群と診断された人の属性別平均を配置した結果を示す(図6)。なお、解析には回答の少ない(0~2例)カリフラワー等4品目を除いて解析を行った。元データからヤマイモが最も回答数が多く、トマト、タケノコ、キノコ、ナスがこれに続いた。ナス科、ウリ科の野菜類と「花粉症あり」並びに口腔アレルギー症候群の属性別平均とは近い位置関係にあり、主要な原因食品と考えられた。特にトマトアレルゲンとスギ・ヒノキ花粉アレルゲンの強い抗原交差性⁷⁾がその位置から明瞭に示された。ここで、ヤマイモとタケノコは口腔アレルギー症候群とは異なった象限に配置され、これらは含有するアセチルコリン(仮性アレルゲン)によるアレルギー様症状と、さらにヤマイモは含有するシュウ酸による物理的刺激による接触皮膚炎によるものが回答に相当数含まれている可能性が示唆された。

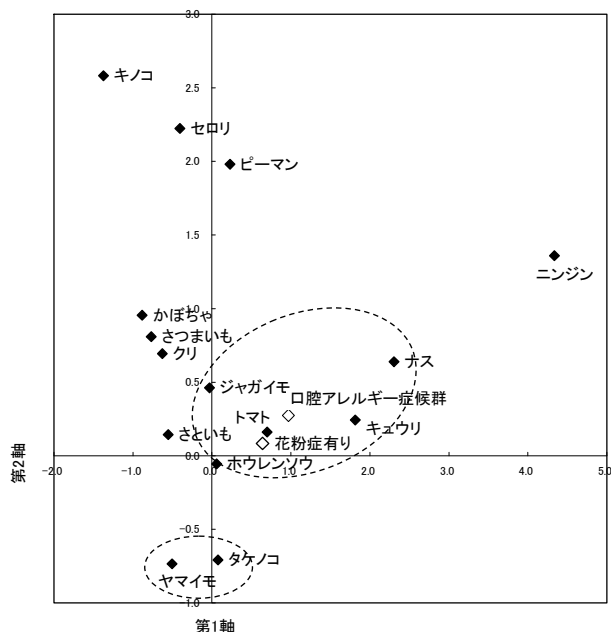


図6. 野菜類相互間の関連性と「花粉症あり」・口腔アレルギー症候群の属性別平均

6. くだもの相互間の関連性

くだものにアレルギーがあると回答した人にくだもの17種類について回答(複数回答)を求め、これらを変数にとり解析し、散布図に「花粉症有り」と答えた人、口腔アレルギー症候群と診断された人の属性別平均を配置した結果を示す(図7)。元データからキウイが最も回答数が多く、メロン、モモがこれに続いた。象限別に見るとキウイが口腔アレルギー症候群と特に強い関係のあることが示された。リンゴ、桃、サクランボなどバラ科のくだものは近い位置に集まり、これらのアレルゲンはカバノキ科アレルゲンとの抗原交差性⁷⁾を有するものであり、ヨモギ・ブタクサ花粉アレルゲンと抗原交差性が報告⁷⁾されているメロン、スイカなどウリ科並びにバナナも比較的近い位置関係に配置されることが示された。

「花粉症有り」と答えた人の属性別平均の位置からみると、あらゆるくだものと花粉症は程度の差はあれ関連があることが示された。口腔アレルギー症候群と「花粉症あり」の属性別平均はきわめて近い位置に配置され、両者は以上述べたアレルゲンの抗原交差性という点で密接な関係にあることが示された。

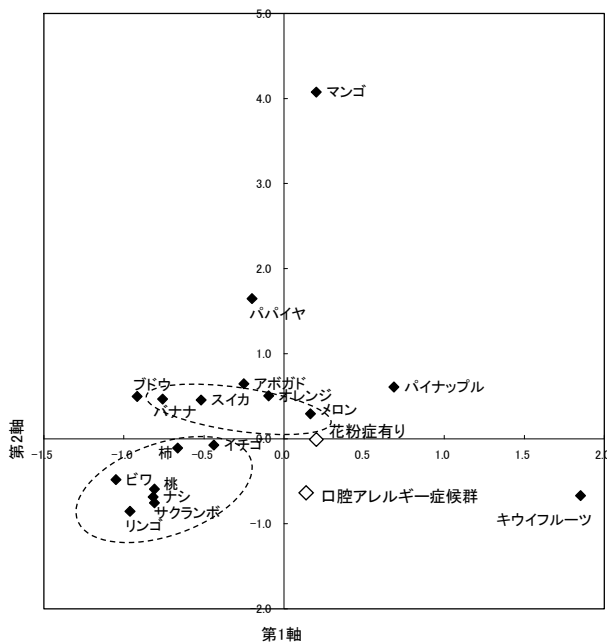


図7. くだもの相互間の関連性と「花粉症あり」

・口腔アレルギー症候群の属性別平均

まとめ

複数回答を解析する目的で数量化Ⅲ類を実施し、解析結果を2次元平面に配置することにより、食品間の関連性、サンプルの分布、アレルギー疾患と食物の関連性等を視覚的に知ることが可能となった。さらにこれに性別、年齢などの属性を加えることにより、年齢による推移を捉えることができた。従来の解析に加え、数量化Ⅲ類の解析を追加することで、その裏付けができたばかりでなく、食物アレルギーのより深い考察が可能となり、その有用性が示された。

(平成19年7月20日受理)

文献

- 1) 板垣康治：地域保健推進特別事業「食物アレルギーによる発症予防事業」平成16～18年度総合研究報告書(2006)
- 2) 菅 民郎：多変量解析の実践，下巻，pp118-159，現代数学社，京都(1993)
- 3) 海老澤元宏：“食”とアレルギーの最新動向1 食物アレルギーの疫学，アレルギーの臨床，**290**，427-431(2002)
- 4) 海老澤元宏ほか：厚生労働科学研究班による食物アレルギーの診療の手引き2005，2-3(2005)
- 5) 海老澤元宏：食物アレルギーの現状と対策，アレルギーの臨床，**330**，342(2005)
- 6) 塩見一雄：魚貝類とアレルギー，成山堂書店，東京(2003)
- 7) 池澤善郎：特集 Oral allergy syndrome，アレルギー・免疫，**8**，837-919(2001)

短報

相模川水系河川水中の医薬品類の分布

上村 仁

Distribution of pharmaceuticals in water
of Sagami River

Hitoshi UEMURA

はじめに

近年，新たな水環境汚染物質として医薬品や身体ケア用品(Pharmaceuticals and Personal Care Products; PPCPs)が注目されている^{1,2)}．PPCPsを含む河川水を水道原水として利用した場合，PPCPsそのものや浄水過程で生じる塩素処理生成物を飲料水と共に摂取してしまうことが考えられる．PPCPsは生理活性を持ち，微量でも生体に作用することから，水環境中の含有量が微量であっても，摂取した場合に健康影響を及ぼしたり，薬剤耐性菌が発生することなどが懸念される³⁾．そこで，神奈川県内に供給される水道水の主要な水源となっている相模川水系について，PPCPsの濃度分布を調査した．

方 法

1．対象としたPPCPs

ヒト用および動物用として使用量が多い医薬品，わが国の水環境における検出報告のある²⁾化合物，一般家庭でよく用いられる製品に含まれる化合物として表1に示した30化合物を調査対象とした．

表 1 測定対象化合物とその用途

化合物	用途	化合物	用途
テトラサイクリン	抗生物質	マレイン酸クロルフェニラミン	抗ヒスタミン剤
オキシテトラサイクリン		ジフェンヒドラミン	
クロルテトラサイクリン		フマル酸ケトチフェン	
ドキシサイクリン	高脂血症用剤代謝物	ロラタジン	
クロフィブリック酸		塩酸フェキソフェナジン	鎮痒剤
カルバマゼピン	抗てんかん薬	二塩酸セチリジン	
プロプラノロール	抗不整脈薬	ニフマル酸エメダスチン	
アセトアミノフェン	解熱鎮痛消炎剤	塩酸アゼラスチン	副腎皮質ホルモン(鎮痒剤)
アセチルサリチル酸		オキサトミド	
イブプロフェン		クロタミトン	消毒剤
インドメタシン		デキサメタゾン	
ケトプロフェン		グルコン酸クロルヘキシジン	合成抗菌剤
フェノプロフェン	忌避剤	塩化ベンザルコニウム	
ナプロキセン		トリクロサン	
ジエチルトルアミド(DEET)		スルファメトキサゾール	

網掛けした化合物はわが国の水環境中における検出報告があるもの

2．試料の採取方法

河川水試料は2007年1月23日および24日に表2および図1に示した16地点で採取した．また，寒川浄水場の浄水が供給されている寒川町内の蛇口水も併せて採取した．採取した試料は冷蔵保存し，速やかに分析に供した．

表 2 試料採取地点

	採水地点	河川
1	弁天橋	相模川本川
2	青山	道志川
3	高田橋	相模川本川
4	さくら橋	鳩川
5	日向橋	中津川
6	才戸橋	中津川
7	鮎津橋	中津川
8	清川村役場下	小鮎川
9	片原橋	小鮎川
10	第二鮎津橋	小鮎川
11	旭町スポーツ広場	相模川本川
12	八木間橋	玉川
13	酒井橋	玉川
14	新八木間橋	恩曾川
15	平泉橋	永池川
16	寒川取水堰直上	相模川本川
17	寒川町内蛇口	(寒川系浄水)

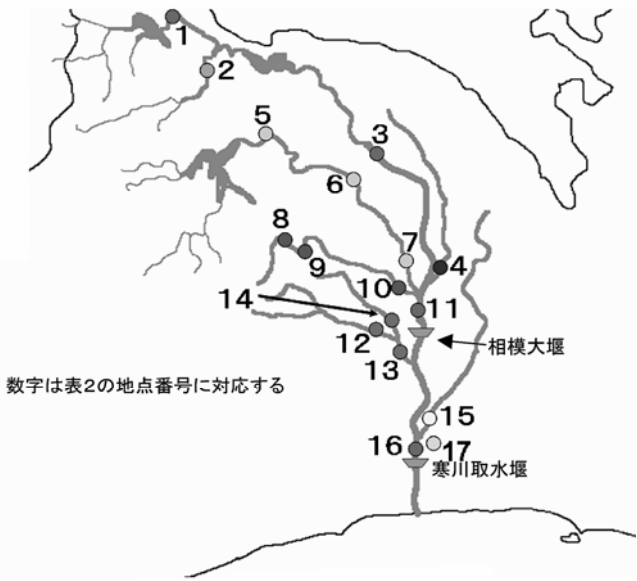


図 1 試料採取地点

3. 試 薬

各化合物の標準物質には和光純薬(株)の高速液体クロマトグラフ用, 生化学用試薬等を使用した。固相カラムからの溶出溶媒には和光純薬(株)の残留農薬試験用(5000倍)試薬を, HPLCの溶離液には和光純薬(株)のLC/MS用またはHPLC用試薬を使用した。アセナフテン-*d*₁₀はCDI Isotope製試薬を, BSTFA(N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド)はスペルコ製試薬を用いた。

固相抽出にはウォーターズのHLBプラスカートリッジ, MCXプラスカートリッジを使用した。

4. 装置および測定条件

(1) LC/MS/MS

HPLC条件:

装置: アライアンス 2695 (ウォーターズ製)

カラム: RSpak DE-213 (2.0mmi.d.×150mm, 4 μ m, 昭和電工製) または SunFire C18 (2.1mmi.d.×150mm, 3.5 μ m, ウォーターズ製) または Atlantis HILIC Silica (2.1mmi.d.×100mm, 3 μ m, ウォーターズ製)

カラム温度: 40℃

流速: 0.2ml/分

移動相: 溶離液条件は表3に示した。

注入量: 10 μ l

MS/MS条件:

装置: Quattro Ultima Pt (マイクロマス製)

イオン化法: エレクトロスプレー

イオン源温度: 130℃

キャピラリー電圧: 3kV

化合物ごとのその他の条件は表3に示した。

(2) GC/MS

装置: POLARIS Q (サーモフィッシャーサイエントフィック製)

カラム: HP-5TA (0.25mmi.d.×30m, 0.25 μ m, アジレント製)

カラム温度: 50℃(2分)→(35℃/分)→120℃→(6℃/分)→300℃(2分)

注入口温度: 250℃

キャリアガス: 1ml/分 (ヘリウム)

注入量: 2 μ l (スプリットレス)

表3 各化合物の抽出用固相カートリッジとLC/MS/MS測定条件

化合物	使用固相	極性	MRM Trace (m/z)	Cone電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	使用カラム	溶離液条件
テトラサイクリン	HLB	+	445→410	65	20	DE-213	A:0.5%ギ酸/アセトニトリル(7:3) B:アセトニトリル A(100%)→20分→A(10%)
オキシテトラサイクリン	HLB	+	461→426	65	20		
クロルテトラサイクリン	HLB	+	479→444	65	20		
ドキシサイクリン	HLB	+	445→428	65	20		
カルバマゼピン	HLB	+	237→193	70	15	SunFire C18	A:10mMヘプタフルオロ酪酸 B:アセトニトリル A(90%)→15分→A(60%)(10分保持)
プロプラノロール	HLB	+	260→116	65	20		
アセトアミノフェン	HLB	+	152→110	35	15		
ジフェンヒドラミン	HLB	+	256→167	40	10	DE-213	A:0.1%ギ酸/メタノール(4:6) B:メタノール A(100%)→15分→A(50%)(5分保持)
クロタミトン	HLB	+	204→136	80	15		
デキサメタゾン	HLB	+	393→373	40	10		
DEET	HLB	+	192→119	65	15		
クロフィブリック酸	HLB	-	213→127	35	10	DE-213	A:0.1%ギ酸/メタノール(4:6) B:エタノール A(70%)→15分→A(10%)(5分保持)
イブプロフェン	HLB	+	224→161	40	15		
インドメタシン	HLB	+	358→139	60	15		
ケトプロフェン	HLB	+	255→209	70	15		
ナプロキセン	HLB	+	231→185	60	15		
二塩酸セチリジン	HLB	+	390→201	50	15		
オキサミド	HLB	+	428→167	80	15		
グルコン酸クロルヘキシジン	HLB	+	253→170	35	15	HILIC	A:1%ギ酸/アセトニトリル(4:1) B:アセトニトリル A(30%)(2分保持)→13分→A(100%)(5分保持)
ニフマル酸エメダスチン	MCX	+	304→245	80	20	SunFire C18	A:10mMヘプタフルオロ酪酸 B:アセトニトリル A(90%)→15分→A(60%)(10分保持)
マレイン酸クロルフェニラミン	MCX	+	275→230	50	15	DE-213	A:0.1%ギ酸/メタノール(4:6) B:メタノール A(100%)→15分→A(50%)(5分保持)
フマル酸ケトチフェン	MCX	+	310→96	80	20		
塩酸アゼラスチン	MCX	+	382→112	80	25		
ロラタジン	MCX	+	384→337	85	25	DE-213	A:0.1%ギ酸/メタノール(4:6) B:エタノール A(70%)→15分→A(10%)(5分保持)
塩酸フェキソフェナジン	MCX	+	503→466	80	25		
塩化ベンザルコニウム	MCX	+	333→240	60	20		
スルファメトキサゾール	MCX	+	254→156	55	15		

※グラジエントはいずれも直線グラジエント

測定モード：スキャンモード

定量用質量数(m/z)： 195 (アセチルサリチル酸),
270 (フェノプロフェン), 200 (トリクロサン),
162 (アセナフテン- d_{10})

5. 試験溶液の調製

試料水はガラス繊維ろ紙(Whatman GF/F, 粒子保持能 $0.7\mu\text{m}$, あらかじめ電気炉中で加熱して(450°C , 約5時間)有機物を除去したもの)を用いて懸濁物をろ別し, 抽出に用いた.

(1) LC/MS/MS試験溶液-HLBによる抽出

テトラサイクリン, オキシテトラサイクリン, クロルテトラサイクリン, ドキシサイクリン, カルバマゼピン, プロプラノロール, アセトアミノフェン, ジフェンヒドラミン, クロタミトン, デキサメタゾン, ジエチルトルアミド(DEET), クロフィブリック酸, イブプロフェン, インドメタシン, ケトプロフェン, ナプロキセン, 二塩酸セチリジン, オキサトミド, グルコン酸クロルヘキシジンの19項目を対象とした. これらの項目は以下のように試験溶液の調製を行った.

メタノール, 精製水各5mlで洗浄, コンディショニングしたHLBカートリッジに, ろ過試料1000ml(DEETのみ100ml)を通水(20ml/分)した. カートリッジに窒素ガスを40分程度通気して乾燥した後, 通水とは逆方向にメタノール5mlを穏やかに流して捕獲成分を溶出した. 溶出液は10ml遠沈管に受け, 遠心エバポレーターを用いて1ml以下まで濃縮した後, メタノールで1mlにメスアップして試験溶液とした.

(2) LC/MS/MS試験溶液-MCXによる抽出

ニフマル酸エメダスチン, マレイン酸クロルフェニラミン, フマル酸ケトチフェン, 塩酸アゼラスチン, ロラタジン, 塩酸フェキソフェナジン, 塩化ベンザルコニウム, スルファメトキサゾールの8項目を対象とした. これらの項目は以下のように試験溶液の調製を行った.

メタノール, 精製水各5mlで洗浄, コンディショニングしたMCXカートリッジに, ろ過試料1000ml(塩酸でpH2程度に調整したもの)を通水(20ml/分)した. カートリッジに窒素ガスを40分程度通気して乾燥した後, 通水とは逆方向に5%アンモニア水含有メタノール5mlを穏やかに流して捕獲成分を溶出した. 溶出液は10ml遠沈管に受け, 遠心エバポレーターを用いて1ml以下まで濃縮した後, メタノールで1mlにメスアップして試験溶液とした.

(3) GC/MS試験溶液

アセチルサリチル酸, フェノプロフェン, トリクロサンの3項目を対象とした. これらの項目は以下のように試験溶液の調製を行った.

ジクロロメタン, メタノール, 精製水各5mlで洗浄,

コンディショニングしたHLBカートリッジに, ろ過試料1000ml(塩酸でpH2程度に調整したもの)を通水(20ml/分)した. カートリッジに窒素ガスを60分程度通気して乾燥した後, 通水とは逆方向にジクロロメタン5mlを穏やかに流して捕獲成分を溶出した. 溶出液は10ml遠沈管に受け, 内部標準溶液(アセナフテン- d_{10} 10mg/lアセトン溶液) 0.1mlを添加後, 遠心エバポレーターを用いて1ml以下まで濃縮した. ジクロロメタンで1mlにメスアップし, BSTFA 0.2mlを添加して振り混ぜた後, 1時間程度室温で放置して試験溶液とした.

6. 検量線

標準物質をメタノールまたはアセトンまたは精製水に溶解して標準溶液を調製した. 精製水1lに標準溶液を添加して0.01, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/l}$ となるように調製したものを試料と同様に処理して検量線を作成した.

試料の定量値が検量線範囲を超えた場合は検量線範囲内に収まるように適宜希釈して再度測定して定量を行った.

結果と考察

上記分析法にて測定した結果を表4に示した.

オキシテトラサイクリン, アセトアミノフェン, イブプロフェン, インドメタシン, ナプロキセン, DEET, 塩酸フェキソフェナジン, クロタミトン, グルコン酸クロルヘキシジン, トリクロサンが検出された(定量下限値はいずれの化合物も0.01 $\mu\text{g/l}$ とした). このうち, オキシテトラサイクリンとアセトアミノフェンについては0.1 $\mu\text{g/l}$ を超える濃度で検出される地点があった. オキシテトラサイクリン, アセトアミノフェン, クロタミトン, トリクロサンの濃度分布を図2に示した. オキシテ

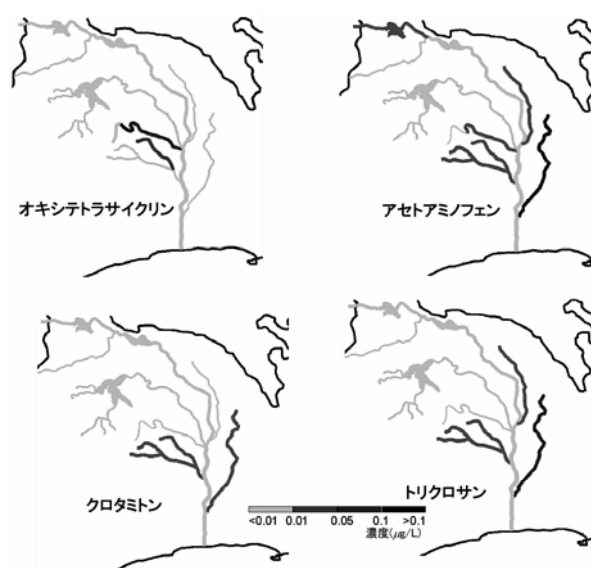


図2 オキシテトラサイクリン, アセトアミノフェン, クロタミトン, トリクロサンの濃度分布

表4 各採水地点におけるPPCPs濃度

(μg/l)

採水地点(河川)	抗生物質				高脂血症用 剤代謝物	抗てんかん薬	抗不整脈薬	解熱鎮痛消炎剤							忌避剤
	テトラサイクリン	オキシテトラサイクリン	クロルテトラサイクリン	ドキシサイクリン	クロフィブリック酸	カルバマゼピン	プロプラノロール	アセトアミノフェン	アセチルサリチル酸	イブプロフェン	インドメタシン	ケトプロフェン	フェノプロフェン	ナプロキセン	
1 弁天橋	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2 青山(道志川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3 高田橋	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	N.D.
4 さくら橋(鳩川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5 日向橋(中津川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6 才戸橋(中津川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7 鮎津橋(中津川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8 清川村役場下(小鮎川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9 片原橋(小鮎川)	N.D.	0.15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10 第二鮎津橋(小鮎川)	N.D.	0.06	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11 旭町スポーツ広場	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12 八木間橋(玉川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
13 酒井橋(玉川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
14 新八木間橋(恩曾川)	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15 平泉橋(永池川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.10	N.D.	0.03	0.02	N.D.	N.D.	0.03	0.03
16 寒川取水堰直上	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17 寒川系浄水	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

採水地点(河川)	抗ヒスタミン剤									鎮痛剤	副腎皮質ホルモン(鎮痛剤)	消毒剤		合成抗菌剤	
	マレイン酸クロルフェニラミン	ジフェニヒドラミン	フマル酸ケチフェン	ロラタジン	塩酸フェキソフェナジン	二塩酸セチリジン	ニフマル酸エメタスチン	塩酸アゼラスチン	オキサトミド	クロタミトン	デキサメタゾン	グルコン酸クロルヘキシジン	塩化ベンザルコニウム	トリクロサン	スルファメトキサゾール
1 弁天橋	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2 青山(道志川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.
3 高田橋	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4 さくら橋(鳩川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	N.D.
5 日向橋(中津川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6 才戸橋(中津川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7 鮎津橋(中津川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8 清川村役場下(小鮎川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9 片原橋(小鮎川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10 第二鮎津橋(小鮎川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11 旭町スポーツ広場	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12 八木間橋(玉川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	N.D.
13 酒井橋(玉川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.
14 新八木間橋(恩曾川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	0.01	N.D.	0.02	N.D.
15 平泉橋(永池川)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03	N.D.	N.D.	N.D.	0.06	N.D.
16 寒川取水堰直上	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17 寒川系浄水	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.:定量下限値(0.01μg/l)未満

トラサイクリンとそれ以外の化合物では分布パターンが異なり、違った汚染源を持つことが示唆された。

ヒト用および動物用医薬品のオキシテトラサイクリンは、清川村役場下の採水地点とその下流の片原橋の採水地点間の距離が1km程度しか離れていないにもかかわらず、濃度が急激に上昇していた。この区間で養豚設備からの排水が小鮎川に流れ込んでおり、畜産排水による汚染であることが考えられた。神奈川県保健福祉部によるクリプトスポリジウム調査⁴⁾において片原橋でクリプトスポリジウムの検出数が急激に増加していることから畜産排水が汚染源である可能性が高いと思われた。

一方、アセトアミノフェン、クロタミトンはヒト用の医薬品であり、トリクロサンは医薬部外品や化粧品等に

用いられる殺菌剤である。解熱鎮痛剤として多用されているアセトアミノフェンについては、服用後に代謝や吸収されなかったものが排泄されたり、余った医薬品を流し等に廃棄したりすることにより河川に流入した可能性が考えられた。クロタミトンは虫さされ等のかゆみ止めとして、トリクロサンは薬用石鹸やデオドラント製品、化粧品等に殺菌、防腐剤として用いられることから、手洗いや入浴時等の排水に混入して河川に流入した可能性が考えられた。この地域の下水道は相模川流域下水道に接続し、処理水は今回の調査対象区域外(寒川取水堰よりも下流の相模川あるいは相模湾)に放流されている。したがって、下水道に接続されていない施設、家屋から河川へ排出されたPPCPsが検出されたものと考えられ

た。

今回の測定の結果、水道原水となる相模大堰近傍（旭町スポーツ広場）および寒川取水堰直上、寒川系浄水においてはいずれのPPCPsについても不検出であった。しかし、化合物によってはある時期に集中的に使用され、河川水中の濃度が大きく変動する可能性もあり（杉花粉の季節における抗ヒスタミン剤や夏季における忌避剤および鎮痒剤等）、1年を通したモニタリングが必要であると思われる。また、浄水過程における塩素処理分解物が毒性を持つ可能性もある。例えば、アセトアミノフェンは塩素処理によって1,4-ベンゾキノンや*N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニミンとなり、毒性(LD₅₀)が58倍あるいは25倍になることが報告されている⁵⁾。検出される可能性があるPPCPsについては、その塩素処理分解物についての存在や毒性を明らかにすることが今後必要となると考えられる。

また、今後は医薬品類の環境への放出を抑制するための社会的なシステムの構築が急務であると考えられる。すでに一部の地域では不要になった医薬品を薬局で回収する取り組みが行われている。このような先進的な取り組みが全国に広がることで、より安全な生活環境を維持

するために重要であると考えられる。

（平成19年7月20日受理）

文 献

- 1) 高田秀重, 谷島利勝:医薬品による環境汚染, 医学のあゆみ, **205**, 159-160 (2003)
- 2) 清野敦子, 古荘早苗, 益永茂樹:わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在, 水環境学会誌, **27**(11), 685-691 (2004)
- 3) 清野敦子, 長谷川泰子, 益永茂樹:金目川, 鶴見川, 多摩川における薬剤耐性大腸菌の分布, 水環境学会誌, **27**(11), 693-698 (2004)
- 4) 神奈川県: クリプトスポリジウム等実態調査
〈<http://www.pref.kanagawa.jp/osirase/seikatueisei/kanajin/suidou/kuriputo.html>〉
- 5) Bedner, M. and Maccrehan, W. A. : Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1,4-benzoquinone and *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine, Environ. Sci. Technol., **40**, 516-522 (2006)

資料

神奈川県域における病原微生物の
検出動向
(2002 年－2006 年)

折原直美, 佐藤善博

Surveillance of infectious agents in
Kanagawa prefecture
(2002－2006)

Naomi ORIHARA and Yoshihiro SATO

神奈川県衛生研究所では、病原微生物の検出情報を「神奈川県微生物検査情報」として月報、年報で提供しており、第1号が1980年8月に発刊された。この情報の2002年～2006年の5年間のデータから病原微生物の検出動向を分析した。

病原細菌の検出に対しては、食品を媒介とした食中毒及び有症苦情の発生事例、感染症発生動向調査における病原体定点医療機関（小児科定点、インフルエンザ定点、眼科定点、基幹定点）から提供された検査材料および依頼検査からの検査検体が対象である。ウイルス、リケッチアの検出に対しては、病原体定点医療機関から提供された検査材料が主な対象であるが、その他食中毒及び感染症としての集団発生事例も含まれる。

表1に2002年～2006年の5年間の臨床診断別の病原細菌累積データを示した。病原細菌の検出は、食中毒や有症苦情のように食品を媒介とする事例からが最も多く、次いで感染性胃腸炎、腸管出血性大腸菌感染症の順であった。希少例として2006年にジフテリア様症状を呈した患者から県内で初めてコリネバクテリウム・ウルセランスが1件検出された¹⁾。なお、国内においても検出は5例目であった²⁾。依頼検査においては腸管出血性大腸菌（EHEC）、EHEC 以外の大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター・ジェジュニが検出され、無症状病原体保有者の存在が確認された。多種の病原細菌が病因となる疾患は、感染性胃腸炎及び食中毒、有症苦情などの食品媒介胃腸炎であった。感染性胃腸炎のうち病原体定点医療機関からの病原細菌検出状況は、5年間で EHEC が2件、

神奈川県衛生研究所 企画情報部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1

表1 病原細菌検出状況（臨床診断別）
－2002年～2006年－

	コレラ	細菌性赤痢	パルチフス	腸管出血性大腸菌感染症	A群溶血性レンサ球菌感染症	淋菌感染症	マイコプラズマ肺炎	レジオネラ症	その他	食中毒	有症苦情	依頼検査	合計
腸管出血性大腸菌(EHEC)				100	2					6	5		113
EHEC以外の大腸菌					79					15	8	1	103
赤痢菌 D群		5											5
サルモネラ					4					10	6	17	37
腸炎ビブリオ	1									59	12		72
カンピロバクター・ジェジュニ					22					38	35	1	96
カンピロバクター・コリ											5		5
黄色ブドウ球菌										22	2		24
ウエルシュ菌					1					164	7		172
セレウス菌											1		1
A群溶血性レンサ球菌				73									73
マイコプラズマ・ニューモニエ							88						88
淋菌						49							49
髄膜炎菌								1					1
パラチフス A菌			1										1
O1&O139以外のコレラ菌	1												1
アエロモナス・キャピエ											1		1
レジオネラ・ニューモフィラ								1					1
コリネバクテリウム・ウルセランス									1				1
計	2	5	1	100	73	108	49	88	1	2	314	77	844

EHEC 以外の大腸菌が75件、サルモネラが4件、カンピロバクター・ジェジュニが22件、ウエルシュ菌が1件であった。なお、EHEC 以外の大腸菌4件については集団事例からの検出であった。カンピロバクター・ジェジュニの検出は2002、2003、2004年が各2件、2005年1件、2006年は、15件と急増を示した。

表2 病原細菌年次別検出状況（A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎・マイコプラズマ肺炎・淋菌感染症）

	2002年	2003年	2004年	2005年	2006年	計
A群溶血性レンサ球菌	13	4	8	9	39	73
マイコプラズマ・ニューモニエ	0	47	4	12	25	88
淋菌	37	6	0	0	6	49

表2に示すようにA群溶血性レンサ球菌は5年間で計73件検出され、特に2006年は大幅に増加し39件であった。なお、感染症発生動向調査においても報告数が増加していた。マイコプラズマ・ニューモニエは5年計で88件検出され、年次別推移をみると2003年の検出が多く2006年がそれに次いでいた。感染症発生動向調査によると1988年以前は、4年おきに規則正しく流行していたが、1992年以降この周期性が崩れ、近年報告数が増加しているが、その原因はまだ不明であり、さらなる調査研究と病原体サーベイランスが必要である

表3に2002年～2006年の5年間の病原細菌月別累積データを示した。腸炎ビブリオは8月、9月に、ウエルシュ菌は3月から6月の間に限局して検出されている。通年で検出される病原細菌は、大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター・ジェジュニ、A 群溶血性レンサ球菌であった。通常、胃腸炎症状を起こす病原細菌は夏季を中心として検出されるが、腸管出血性大腸菌をはじめとした大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター・ジェジュニは冬季にも

が検出された。また、8月検出の1件は南半球への海外渡航者からであり、南半球は7月～10月頃が流行期であったためである。ウイルスの検出傾向をみると、A群コクサッキーウイルスは6月、7月をピークとして5月～11月に検出され、手足口病、ヘルパンギーナから主に検出された。B群コクサッキーウイルス及びエコーウイルスは7月、8月をピークとして主として4月～11月に検出され、主に無菌性髄膜炎から検出された。また、アデノウイルスは多種の血清型があり疾患により検出される血清型が知られている⁴⁾が、県域では血清型別の検出数は少ないが、アデノウイルスとしては表6に見られるように季節的な限局はなく年間にわたり検出されている。アデノウイルスのうち特にアデノウイルス3型は通年にわたって検出されたが、主に咽頭結膜熱から、他にはヘルパンギーナ、インフルエンザ様から検出された。このように上気道炎などの呼吸器疾患を起こす型、下気道炎（肺炎を含む）、結

膜炎を起こす型などが知られている。ノロウイルス検出のピークは12月であるが、夏季を除き通年検出される傾向が見られた。ロタウイルスは、3月をピークとして12月～5月に検出された。インフルエンザ様、手足口病、ヘルパンギーナ、咽頭結膜熱、感染性胃腸炎などの疾患とウイルスが検出された時期を重ねあわせると、その検出ピークは感染症発生動向調査による流行とほぼ同じ時期と重なっていた。手足口病の主な起因ウイルスであるコクサッキーウイルスA16型は年間を通じて検出されており、手足口病及びヘルパンギーナのみからの検出であった。手足口病及びヘルパンギーナの両疾患の日本の流行発生は初夏から初秋⁵⁾といわれているが、この県域の検出状況により、季節外の発生が裏付けられた。表7に示すように咽頭結膜熱、感染性胃腸炎、手足口病、ヘルパンギーナ、インフルエンザ様疾患、無菌性髄膜炎から多種の血清型が多種の疾患から検出された。

長期間の検出の動向を解析しておくことは重要であり、これからも引き続きデータ収集に努めていきたい。

(平成19年7月20日受理)

表7 ウイルス・リケッチア検出状況（臨床診断別）
－2002年～2006年－

	つ つ が	デ ン グ	急 性 脳 炎	R S ウ イ ル ス	咽 頭 結 膜 熱	感 染 性 胃 腸 炎	手 足 口 病	ヘル パ ン ギ ー ナ	流 行 性 耳 下 腺 炎	イン フル エン ザ 様	無 菌 性 髄 膜炎	食 中 毒	そ の 他	合 計
インフルエンザ AH1										95				95
インフルエンザ AH3			2							561				563
インフルエンザ B										145				145
パラインフルエンザ 1										2				2
パラインフルエンザ 2										1				1
パラインフルエンザ 3								1						1
R S				1						3			2	6
ポリオ 3													2	2
コクサッキー A2								4						4
コクサッキー A4							4	36						40
コクサッキー A5							2	3						5
コクサッキー A6							11	22						33
コクサッキー A8								1						1
コクサッキー A9									1		1			2
コクサッキー A10									13					13
コクサッキー A12									11					11
コクサッキー A14							2							2
コクサッキー A16							88	4						92
コクサッキー B1					1					1	4			6
コクサッキー B2								1			2		2	5
コクサッキー B3							1							1
コクサッキー B4											1		1	2
コクサッキー B5										2	2			4
エコー 3									2				1	3
エコー 6											4			4
エコー 11											2			2
エコー 13							1	1			14		1	17
エコー 14											1			1
エコー 18							7							14
エコー 30											3			3
エンテロ 71							25				1			26
パレコ 1			1											1
ムンプス									25	1	6			32
アデノ 1								1		1			1	3
アデノ 2								1		1			1	6
アデノ 3					3			4		4			7	37
アデノ 4					22									22
アデノ 5					3					2				5
アデノ 6					2		1				1			4
アデノ 40/41							5							5
アデノ(型未決定)							2						1	3
単純ヘルペス 1							4	6		3			3	16
ロタ							60					13		73
小型球形							4					32		36
ノーウォーク							24					102		126
ノロ							380					849		1229
サボ							36							36
デング			1											1
未同定				1			1						2	4
オリエンタ ツツガムシ	17													17
合 計	17	1	4	1	31	511	147	109	28	823	49	996	24	2741

参考文献

- 1) 萩原紀子, 堀毛聡, 笠原茂子, 菅沼徹, 相澤哲, 中村圭介ほか: ジフテリア様症状を呈した *Corynebacterium ulcerans* による感染症の1例, 病原微生物検出情報, 27, 334-335 (2006)
- 2) 国立感染症研究所細菌第二部第三室: ジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* とは?, 病原微生物検出情報, 27, 333 (2006)
- 3) 厚生労働省ホームページ; 食中毒・食品監視関連情報 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>
- 4) コクサッキーウイルスによる疾患Aヘルパンギーナ(水疱性咽頭炎): 感染症予防必携, 第2版, 山崎修道, 井上榮, 牛尾光弘, 岡部信彦, 神谷齊, 倉田毅ほか編, PP144-146, (財)日本公衆衛生協会, 東京 (2005)
- 5) アデノウイルスによる疾患: 感染症予防必携, 第2版, 山崎修道, 井上榮, 牛尾光弘, 岡部信彦, 神谷齊, 倉田毅ほか編, pp.4-5, (財)日本公衆衛生協会, 東京 (2005)

資料

神奈川県における腸管出血性大腸菌
の検出状況（平成 18 年度）

石原ともえ，伊東久美子，黒木俊郎

Occurrence of enterohemorrhagic
Escherichia coli in Kanagawa
Prefecture（2006）

Tomoe ISHIHARA, Kumiko ITOH
and Toshiro KUROKI

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）は平成11年4月に施行された「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」（以下感染症法）で三類感染症に分類され，医師により EHEC の患者と診断された場合には，各医療機関は直ちに所轄の保健所に報告する．これを受けて，保健所は分離された菌株をそれぞれの地方衛生研究所（地研）に送付している．地研は集められた菌株について生化学的性状，血清型，毒素型等を確認したのち，厚生省生活衛生局食品健康課長通知（平成8年6月19日付衛食第160号）により国立感染症研究所（感染研）細菌第一部に送付している．全国から送付された菌株について感染研は，分子疫学的調査の手法としてパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）解析を実施して感染症の大規模化，散発的集団発生（diffuse outbreak：一見散発事例の多発に見えるが，実は同じ原因で起こっている集団事例）の検出と抑止に力を注いでおり，また，感染研で得られた結果はそれぞれの地研に還元されている．

当所においても，地域における感染拡大の予防のため，送付された EHEC 菌株が，同時期に同一の血清型で同一の毒素型を産生する菌株が3株以上確認された場合には関連部署と連絡をとり，同一感染源をもつ菌による集団感染が発生していないかどうかを調べるために，PFGE 解析を実施した．また，食中毒の際に保健所により行われる原因食品等の疫学調査から同一の原因による感染であると推測された場合についても必要に応じて PFGE 解析を行った．

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

表 1 18年度 EHEC 菌株受領状況	
施設	菌株数
神奈川県域保健福祉事務所	
茅ヶ崎	14
平塚	11
鎌倉	4
厚木	10
大和	4
小田原	6
足柄上	1
秦野	1
県食肉衛生検査所（ウシ由来）	3
藤沢市	30
横浜市	1
川崎市	3
相模原市	4
東京都	2
計	94

表1には，平成18年度の菌株受領状況を示した．内訳としては，横浜市，川崎市，横須賀市，相模原市および藤沢市をのぞく神奈川県内（県域）の医療機関や保健福祉事務所から当所に送付された51株，食肉衛生検査所から送付されたウシ由来3株，藤沢市分離30株および広域の事例に関連して他の自治体から分与された10株の計94株であった．

つぎに，表2に，県域と藤沢市分離の EHEC 81株を分離月別に示した．7月と8月に多く，9月はやや少ないものの，10月および11月も多いままで推移している．12月から2月は菌株の分離はなかったが3月に1株分離された．81株の内訳は，O157（VT1&2）がもっとも多く39株，O157（VT2）は18株，O26（VT1）は23株，また，O血清型別不能 OUT（VT1）が1株であった．

集団発生事例としては8月から9月にかけて茅ヶ崎・平塚における O157（VT1&2）10株による原因不明の感染事例¹⁾（事例1）があった．この事例は，当初，家族によ

表 2 EHEC の月別血清型と毒素型（81株）					
月	O157(VT1&2)	O157(VT2)	O26(VT1)	OUT(VT1)	計
4	2				2
5		1	5		6
6	1		2		3
7	11	3		1	15
8	15	4	1		20
9	3	1			4
10	3	9			12
11	3		15		18
12					
1					
2					
3	1				1
計	39	18	23	1	81

る散発事例と考えられていたが、同時期に同じ地域においてこの事例と同一の毒素型を示す O157 が相次いで分離されたことから、PFGE 解析を用いた分子疫学調査を実施した結果、関連の認められない4株の PFGE パターンが2家族6人のパターンと一致したことから散発的集団発生事例であることが推察された。この事例では、感染拡大の懸念があったことから近隣の地研に PFGE 画像を電子メールで送付（電送）し、また、川崎市および相模原市から菌株を分与頂き PFGE 法による解析を実施した。この結果、他の自治体においては同一のパターンを示す菌株は認められなかった。9月末から10月にかけて藤沢市保健所管内の飲食店で発生した O157 (VT2) 13株の事例²⁾(事例2)は、他の自治体（東京都2株および横浜市1株）でも同一店を利用した患者が発生した。このため PFGE 画像を電送して比較し、パターンが一致したことから、自治体をこえた集団事例であったことが確認された。図1にこの2事例関連の菌株の PFGE パターンを示した。レーン1～5は事例1、レーン6～10は事例2のパターンである。レーン No.2でバンドが1本異なるが、レーン No.1の初発者と同じ家族であることから同一の感染源であったと推察できた。事例2ではすべての菌株で一致したパターンであった。

また、11月に藤沢市内幼稚園で原因不明の O26(VT1) 15株の事例³⁾があった。

O157の薬剤感受性試験は33件から分離された57株について、アミノペニシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、クロラムフェニコール(CP)、ホスホマイシン(FOM)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、ストレプトマイシン(SM)、スルフイソキサゾール・トリメトプリム合剤(ST)およびテトラサイクリン(TC)の11薬剤について CLSI (米国臨床検査標準化協会) 法に準拠して

実施した。この結果、3剤(ABPC・SM・TC)耐性1件3株、2剤(ABPC・SM および ABPC・TC)耐性2件各1株、単剤(ABPC, SM, TC)耐性3件各1株で、27件から分離された49株が供試した11薬剤に感受性であった。

表3 EHEC O157の薬剤耐性パターン (33件)

耐性数	耐性パターン			件数	菌株数
3 剤	ABPC	SM	ST	1	3
2 剤	ABPC	SM		1	1
	ABPC		TC	1	1
単 剤	ABPC			1	1
		SM		1	1
			TC	1	1
感受性				27	49
計				33	57

一方、O26では8件から分離された23株中 FOM 耐性1件1株と SM 耐性1件15株であった。なお、SM に耐性を示した15株すべてが FOM で中間値（感受性・耐性のどちらともいえないが、薬剤の種類によっては臨床的に使用可能な値）を示した。

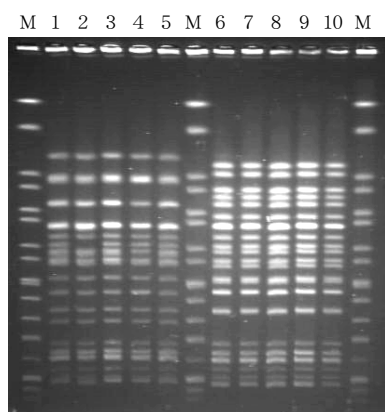
今回、散発と考えられた事例が散発的集団発生と推察されたことおよび飲食店における食中毒事例で自治体をこえた電送による PFGE 結果を比較することで事件の拡大予防に迅速に対応することが可能であったことから、PFGE 法を用いた分子疫学解析の重要性が改めて確認された。今後も、迅速な対応による感染拡大防止に尽力していきたい。

最後に、ご協力を頂きました各医療機関、医療検査機関、衛生研究所各分室および菌株搬入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健康増進課、藤沢市保健所の方々、また、菌株分与にご協力いただきました東京都健康安全研究センター、横浜市衛生研究所、川崎市衛生研究所および相模原市衛生試験所の方々に深謝いたします。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) 同一感染源が示唆された腸管出血性大腸菌 O157 感染事例—神奈川県、病原微生物検出情報, **27**, 317-318 (2006)
- 2) 焼肉店が原因施設とされた腸管出血性大腸菌 O157 の食中毒事例—藤沢市、病原微生物検出情報, **28**, 138-139 (2007)
- 3) 幼稚園で発生した腸管出血性大腸菌 O26 による集団感染事例—藤沢市、病原微生物検出情報, **28**, 141-142 (2007)



M: マーカ: *Salmonella* Braenderup

図1 食中毒事例の PFGE パターン

1～5: 事例1: O157(VT1&2)による散発的集団発生事例
6～10: 事例2: O157(VT2)による自治体をこえた集団事例

資料

県域の散発性下痢症患者から分離されたカンピロバクターの性状 (平成18年度)

伊東久美子, 石原ともえ, 黒木俊郎

Characteristics of *Campylobacter* isolated from patients with sporadic diarrhea in Kanagawa Prefecture (2006)

Kumiko ITOH, Tomoe ISHIHARA
and Toshiro KUROKI

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) はヒトの下痢症の起因菌とされ, 小児散発性下痢症患者から高頻度に検出される。また, 近年では本菌による腸炎を主症状とする食中毒事例が増加する傾向にあり, 鶏肉, 生乳, 飲料水などが原因食品とされている。^{1,2)} このカンピロバクター腸炎の主な起因菌は *C. jejuni* であるが, *C. coli* もまれに報告¹⁾ されている。

神奈川県は感染症発生動向調査事業において, 県域の小児科定点医療機関で感染性胃腸炎と診断された下痢症患者便の腸管系病原菌検査を実施している。平成18年4月から平成19年3月にかけて小児科定点医療機関で感染性胃腸炎と診断され当所に病原体検査を依頼された散発性下痢症患者便は189検体であった。このうち, 14検体から *C. jejuni* を, 1検体から *C. coli* を検出した。

著者らは県域のカンピロバクターによる感染症の全体像を把握していく目的で, 散発性下痢症患者便から分離した菌株について, 血清型 (*C. jejuni* について実施), 薬剤感受性試験およびパルスフィールドゲル電気泳動 (以下PFGE) を実施したのでその結果を報告する。

カンピロバクターの分離同定は常法²⁾ に準じて行い, *C. jejuni* と *C. coli* の鑑別性状である馬尿酸加水分解試験で弱陽性および陰性の菌株については, Lintonら³⁾ の報告したPCR法により菌種を確認した。

カンピロバクターは検査総数189検体中15検体から検出されたが, このうち1検体は保存できなかった。今回は

C. jejuni が検出された13検体と *C. coli* が検出された1検体の合計14検体から分離した50株について以下の検査を実施した。

C. jejuni の血清型別は市販の血清 (デンカ生研) を用いて Penner の型別を行った。薬剤感受性試験は Sensi-Disk (BBL) を用い一濃度ディスク法により実施した。使用薬剤はストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), アンピシリン (ABPC), クロラムフェニコール (CP), スルファメトキサゾール/トリメトプリム (ST), テトラサイクリン (TC), オフロキサシン (OFLX), ナリジクス酸 (NA), エリスロマイシン (EM), ホスホマイシン (FOM) の10薬剤とした。PFGEは制限酵素 *Sma* I を用いて, 電圧6V/cm, パルスタイム6.8秒から38.4秒, バッファー温度14℃, 泳動時間19時間の条件で行った。

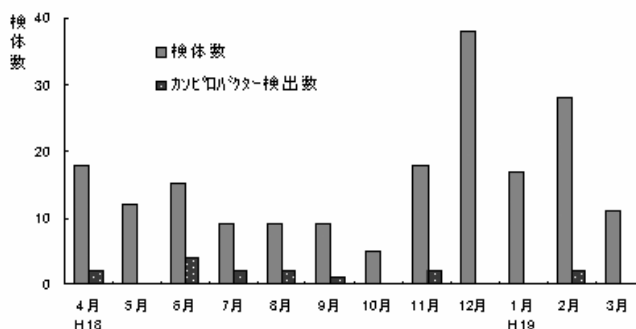


図1 散発性下痢症患者便の月別検体数とカンピロバクター検出数

図1に平成18年度の県域の散発性下痢症患者便の月別検体数とカンピロバクターの検出数を示した。カンピロバクターは年間を通して検出された。6月から9月にかけては毎月検出され, 6月は15検体中4検体 (26.7%) から, 7月と8月が共に9検体中2検体 (22.2%), 9月が9検体中1検体 (11.1%) から検出された。

カンピロバクターが検出された患者の年齢層は1歳代から50歳代に及び, 10歳未満が5検体で一番多く, 次に30歳代4検体, 10歳代3検体, 40歳代2検体, 50歳代1検体の順であった。

表にカンピロバクターの血清型別と薬剤感受性試験の結果を示した。 *C. jejuni* 血清型はPennerのD群が5検体から検出され最も多く, 次にC群の2検体であった。その他A, B, F, G, L, O群が各1検体であり, 合計8種類の血清型であった。

薬剤感受性試験は, 1剤以上の薬剤に耐性を示した菌株は *C. jejuni* では11検体, また *C. coli* では1検体の合計12検体 (86%) から分離された。その耐性型は, ST単剤耐性が最も多く7検体, 次いでST, TCとST, FOMの2剤耐

表 カンピロバクターの血清型と薬剤感受性試験

菌種	血清型	検体数	1剤耐性	2剤耐性			感受性
			ST	ST+TC	ST+ABPC	ST+FOM	
<i>C. jejuni</i>	A	1	1				
	B	1		1			
	C	2	2				
	D	5	2			2	1
	F	1					1
	G	1			1		
	L	1		1			
	O	1	1				
	NT	1	1				
<i>C. coli</i>	NT	1	1				
		14	7	2	1	2	2

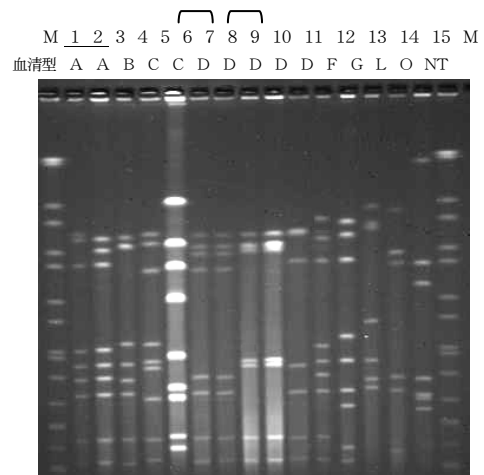
ST:スルファメトキチゾール/トリメトプリム, TC:テトラサイクリン,
ABPC:アンピシリン, FOM:ホスホマイシン
NT:試験せず

性が各2検体, STとABPCが1検体であった。ST耐性株は薬剤に耐性を示した12検体全てから分離された。一方, 試験薬剤10種類全部に感受性を示した*C. jejuni*の菌株は2検体(14%)から分離された。

現在何らかの細菌性の胃腸炎が疑われた場合にはニューキノロン剤が用いられることが一般的であり, 近年その薬剤に耐性を示す*C. jejuni*が増加している。また, カンピロバクター腸炎の主要な治療薬であるEMに対しても耐性菌が確認されている¹⁾。カンピロバクター・リファレンスセンターによると, *C. jejuni*におけるNAとOFLX等のニューキノロン剤に対する年次別耐性率は30~40%で推移しているものの, やや増加傾向を示し, またEMに対する耐性率は1~3%であり, ほとんど変動が見られていない¹⁾。今回の結果ではNAとEM, およびOFLXの耐性菌は認められなかった。

PFGEのパターンは*C. jejuni*血清型A群の1検体から分離された4株のうち1株はバンドの位置が1カ所異なっていたが, 同一検体からの分離菌株はほぼ同じパターンを示した。図2にカンピロバクターが検出された14検体の代表分離株15株(菌株No.1,2は同一検体から分離)のPFGEパターンを示した。5検体から分離された*C. jejuni*血清型D群のうち, 分離菌株No.6と7, およびNo.8と9は相互に同一のパターンを示し, *C. jejuni*血清型D群は3種類のパターンに分類された。*C. jejuni*血清型D群以外の血清型A, B, C, F, G, L, Oおよび*C. coli*はそれぞれに異なったパターンを示した。*C. jejuni*血清型D群で同一のパターンを示した分離菌株No.6と7の薬剤感受性試験は共にSTとFOXの2剤耐性で, No.8と9の薬剤感受性試験は共にSTの1剤耐性で薬剤の耐性型も同一であった。これらの株が由来する4検体の検体採取時期は異なっており, 共通の汚染源等の疫学的背景は明らかにできなかった。

食中毒事例では喫食状況等の聞き取り調査から原因食品の推定が可能であるが, 個々の事例からほとんど聞き取り調査のできない散发事例では汚染源をさぐる明確な関係を見出すことは難しい。しかし, 散发性下痢症患者

図2 分離菌株の血清型とPFGEパターン(*sma* I 処理)

M : マーカール *Salmonella* Braenderup H9812
1~15 : 分離菌株No. (1~14: *C. jejuni*, 15: *C. coli*)
—— : 同一検体を示す(1, 2で2はバンドの位置が1カ所異なる)
NT : 試験せず

から分離された菌株の性状を分析することより, どのような疫学的特徴を有するかを明らかにすることは, これら事例間の関連性を推測し, その発生要因や感染経路を追求していく上で, 有益な基礎データになると考える。カンピロバクターの菌種, 血清型, 薬剤感受性試験は全体を把握する疫学マーカーとして有用であり, また薬剤感受性を把握しておくことは, 患者治療時の抗生物質を選択する際にも重要である。近年ではPFGE法など遺伝子解析の手法が試みられ, 種々の疫学マーカーと組み合わせ互いに検証することで, より詳細な疫学解析が可能になってきている。著者らは今後もこれらの基礎データを積み重ね, 感染予防対策のために, その結果を県民や医療機関への的確な情報提供に努めていきたい。

最後に, 本調査にご協力いただきました感染症発生動向調査の小児科定点医療機関および県健康増進課の方々に深謝いたします。

(平成19年7月20日受理)

参考文献

- 1) カンピロバクター腸炎1999~2005, 病原微生物検出情報, **27**, 167-175 (2006)
- 2) 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編集, pp.336-362, 中央法規出版, 東京 (2000)
- 3) Linton D., Lawson A.J., Owen R.J. and Stanley J.: PCR detection, Identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples, J.Clin. Microbiol., **35**, 2568-2572 (1997)

資料

神奈川県におけるウイルス性 胃腸炎の集団発生状況 (平成18年度)

宮原香代子, 原田美樹, 片山 丘, 古屋由美子

Occurrence of viral gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2006-March, 2007)

Kayoko MIYAHARA, Miki HARADA
Takashi KATAYAMA and Yumiko FURUYA

ウイルスによる胃腸炎の集団発生は、主に食品を介する食中毒やヒトからヒトへ伝播する感染性胃腸炎として冬季を中心に起きている。その原因ウイルスには、ノロウイルスをはじめサポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスなどがある。例年、胃腸炎を起こす原因ウイルスを検索するために、県域の定点医療機関より搬入された感染性胃腸炎患者便について病原体検査を行っている。その結果、今年度はノロウイルスの検出数が例年に比べ1ヶ月ほど早い11月から増加をはじめ、ピーク時の12月には前年度同月の2.5倍となった(図1)。またこの時期、新聞やテレビでノロウイルスによる胃腸炎の集団発生が多く報道されるようになり、ノロウイルスが全国的にも流行していた。

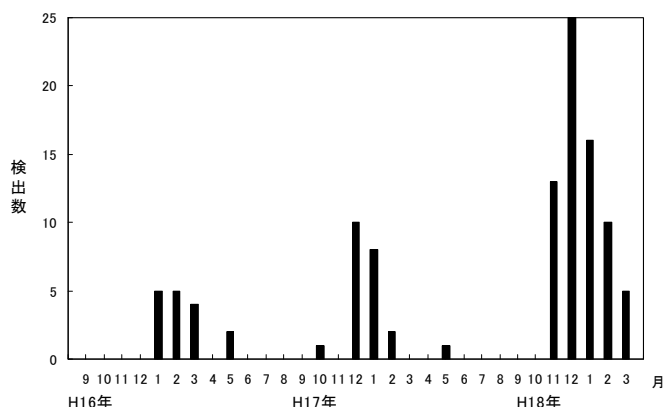


図1 定点医療機関より搬入された胃腸炎患者便からのノロウイルス検出状況

我々は胃腸炎の集団発生時にその感染拡大を防止するため、原因ウイルスや感染源の早期解明を目的とした検査および調査を実施している。平成18年4月から平成19年3月に県域保健所から検査依頼があった胃腸炎の集団発生は98事例で、検体数は便および吐物1,241検体、食品64検体、ふきとり13検体の1,318検体であった。平成17年度の検体数が625検体であったのに対し約2倍に増加した。検査方法については、ノロウイルスは定量PCR、サポウイルスは逆転写PCR、A群ロタウイルスとアデノウイルスはイムノクロマトを用いた。また原因ウイルスを広く迅速に検索するため、有症者の検体を中心に電子顕微鏡観察を行った。その結果、75事例の便および吐物467検体からウイルスが検出されたが、食品およびふきとりからは検出されなかった。75事例のうち、ノロウイルスが74事例から、小型球形ウイルスが1事例から検出された。ノロウイルスが検出された事例の内訳は、食中毒と判定されたものが10事例、感染性胃腸炎と判定されたものが14事例、有症苦情が16事例、他の自治体からの関連調査が34事例であった。小型球形ウイルスが検出された1事例は他の自治体からの関連調査であった。

食中毒10事例において検出されたノロウイルス遺伝子は、事例9の患者便1検体がgenogroup I とgenogroup II の混合で、それ以外は全てgenogroup II であった(表1)。genogroup I とgenogroup II が混合して検出される場合は魚介類の生食を原因とすることが多いが、事例9の患者1名についての摂食状況は不明であった。この事例における他の陽性患者便39検体からはgenogroup II のみが検出されたことから、genogroup I とgenogroup II が検出された患者1名は、この集団発生との関連は少ないと考えられた。また、定量PCRと同時にを行った患者便の電子顕微鏡観察では、8事例の35検体から小型球形ウイルス粒子が検出され、これらの粒子はノロウイルスであると確定された。

食中毒事例は、定点医療機関からの病原体検査結果と同様に11月に多く発生していた。また原因食品や調理施設の汚染場所を調べるため、事例2, 3, 5, 10については食品およびふきとりの検査を行ったがノロウイルスは検出されず、原因食品および汚染場所の特定はできなかった。一方、事例9では調理従事者便31検体中の約3割から、また他の事例においても複数の調理従事者からノロウイルスが検出され、調理従事者による汚染の拡大が食中毒の原因のひとつであると考えられた。

さらに今回ノロウイルスが検出された12名(検出例A~L)について、ノロウイルスが便中に排泄される期間を調べる目的で、継続的に検査を行った(表2)。経過日数は初回の検出日を基準とし、約2週間後に1回、その後約

表1 平成18年度食中毒事例

事例 番号	発生年月	管轄保健 福祉事務所	原因施設	原因食品	検 体	ノロウイルス定量PCR			電子顕微鏡観察	
						検体数	陽性数	検出遺伝子	検体数	陽性数
1	H 18. 3	厚 木	飲食店	不明	患者便	20	16	G II	10	6
					調理従事者便	19	1	G II	N.T.	
2	H 18.11	茅ヶ崎	仕出し屋	不明	患者便	39	39	G II	13	10
					調理従事者便	17	3	G II	N.T.	
					食品	5	0		N.T.	
3	H 18.11	小田原	旅 館	不明	患者便	3	3	G II	3	0
					調理従事者便	52	6	G II	N.T.	
					ふきとり	5	0		N.T.	
4	H 18.11	茅ヶ崎	仕出し屋	不明	患者便	7	6	G II	5	1
					調理従事者便	10	2	G II	N.T.	
5	H 18.11	三 崎	旅 館	不明	患者便	2	2	G II	2	0
					調理従事者便	58	4	G II	N.T.	
					食品	2	0		N.T.	
6	H 18.11	大 和	飲食店	不明	患者便	10	10	G II	4	1
					調理従事者便	2	1	G II	N.T.	
7	H 18.11	茅ヶ崎	給食施設	不明	患者便	17	17	G II	8	8
					調理従事者便	19	4	G II	N.T.	
8	H 18.12	厚 木	給食施設	不明	患者便	16	16	G II	5	5
					調理従事者便	12	1	G II	N.T.	
9	H 18.12	平 塚	飲食店	不明	患者便	49	40*	G II	4	2
					調理従事者便	31	9	G II	N.T.	
10	H 19. 1	鎌 倉	飲食店	不明	患者便	8	7	G II	2	2
					調理従事者便	8	3	G II	N.T.	
					食品	6	0		N.T.	

G II : genogroup II

N.T. : 検査せず

* : 1検体よりノロウイルスgenogroup I、genogroup IIを検出

1週間ごとに検査を行った。検出例Kについては2週間後の検体が得られず、3週間後の検査ではノロウイルスが検出されなかったため、排泄されていた期間を確認することができなかった。その他の11名について2週間（10～14日）後に行った検査では、6名からノロウイルスが検出された。さらに3週間（17～20日）後の検査でも、前回ノロウイルスが検出された6名中2名から検出された。この検出例DとHの2名については、4週間（26、28日）後の検査においても検出が続き、Dは36日後、Hは39日後の検査でノロウイルスは検出されなくなった。今回は検査対象が少ないものの、4週間もの長期間にわたり便中にノロウイルスが排泄される場合があることが確認された。

以上の結果より、食中毒予防の観点から調理従事者は、一度ノロウイルスが体内に入ると長期間ウイルスが排泄される可能性があることを認識して、自己の健康管理および手洗いの励行や調理用手袋着用など、さらなる注意が必要であると考えられた。

感染性胃腸炎14事例において検出されたノロウイルス遺伝子は、全てgenogroup IIであった（表3）。また定量PCRと同時に行った発症者便の電子顕微鏡観察では、13事例の37検体から小型球形ウイルス粒子が検出され、これらの粒子はノロウイルスであると確定された。

表2 経過日数による便中ノロウイルス遺伝子の検出状況

検出例	初回検出後の経過日数			
	2週間 (10～14日)	3週間 (17～20日)	4週間 (26、28日)	5週間 (36、39日)
A	+	—		
B	—			
C	+	—		
D	+	+	+	—
E	—			
F	—			
G	—			
H	+	+	+	—
I	+	—		
J	+	—		
K		—		
L	—			

+ : 検出 — : 不検出

感染性胃腸炎の発生施設は、高齢者施設が8事例で最も多く、小学校が2事例、病院・宿泊施設、保育園、幼稚園がそれぞれ1事例であった。感染性胃腸炎が疑われた場合には施設内の感染拡大を防ぐために、発症者だけではなく施設職員等を含む広い範囲で検査を行った。今年度は高齢者施設での発生が多く認められたが、そのうちの事例11では、利用者10名中10名、症状のある職員7名中6名、さらに症状のない職員3名中1名からノロウイルスが検出された。また発症者数が多い事例6においても、園児だけでなく職員も発症し、症状のない職員15名中6名からノロ

表 3 平成18年度感染性胃腸炎事例

事例 番号	発生年月	管轄保健 福祉事務所	発生施設	検 体	ノロウイルス定量PCR			電子顕微鏡観察	
					検体数	陽性数	検出遺伝子	検体数	陽性数
1	H 18. 4	平 塚	小学校	発症者便	11	10	GⅡ	10	3
2	H 18. 5	厚 木	小学校	発症者便	3	3	GⅡ	3	2
3	H 18.10	秦 野	病院	発症者便	5	4	GⅡ	5	2
4	H 18.11	平 塚	宿泊施設	発症者便	1	1	GⅡ	1	0
				非発症者便	3	1	GⅡ	N.T.	
				利用者	3	1	GⅡ	N.T.	
				調理従事者	3	1	GⅡ	N.T.	
5	H 18.11	茅ヶ崎	高齢者施設	発症者便	6	6	GⅡ	4	4
				非発症者便	8	0		N.T.	
				園児	38	35	GⅡ	8	7
				職員	6	5	GⅡ	N.T.	
6	H 18.11	小田原	保育園	非発症者便	15	6	GⅡ	N.T.	
				調理従事者	3	0		N.T.	
				ふきとり	8	0		N.T.	
7	H 18.12	三 崎	高齢者施設	発症者便	2	2	GⅡ	2	1
8	H 18.12	小田原	幼稚園	発症者便	3	3	GⅡ	3	2
9	H 18.12	茅ヶ崎	高齢者施設	発症者便	7	4	GⅡ	6	2
				非発症者便	7	1	GⅡ	N.T.	
10	H 18.12	秦 野	高齢者施設	発症者便・吐物	4	4	GⅡ	3	3
				利用者	10	10	GⅡ	6	6
				職員	7	6	GⅡ	N.T.	
				調理従事者	1	1	GⅡ	N.T.	
11	H 18.12	茅ヶ崎	高齢者施設	非発症者便	3	1	GⅡ	N.T.	
				調理従事者	9	0		N.T.	
12	H 18.12	茅ヶ崎	高齢者施設	発症者便	2	2	GⅡ	2	2
13	H 19. 3	三 崎	高齢者施設	利用者	1	1	GⅡ	1	1
				職員	1	1	GⅡ	1	0
14	H 19. 3	鎌 倉	高齢者施設	発症者便	7	7	GⅡ	4	2
				非発症者便	17	2	GⅡ	N.T.	
				食品	6	0		N.T.	

GⅡ：genogroupⅡ

N.T.：検査せず

ウイルスが検出された。高齢者施設や保育園などの職員は、発症者の便や吐物の処理を行うため感染する危険性が高い。また聞き取り調査で症状がないとする職員からもノロウイルスが検出されたことから、このような施設で働いている職員は汚染を広め二次感染を引き起こす可能性があると考えられた。よって施設内でノロウイルスによる胃腸炎が発生した場合は、発症者のみならず症状のない職員等を含む施設全体の感染状況を早期に把握し対応することが、汚染拡大防止のために重要であると考えられた。

今年度は全国的なノロウイルスの大流行があり、県

域においてもウイルス性胃腸炎の集団発生は、全てノロウイルスを原因とするものであった。ノロウイルスによる胃腸炎の集団発生は毎年増加し、今後も今シーズンのような大流行が起こる可能性が懸念される。集団発生時には速やかに原因ウイルスを検出し感染の拡大を防止するとともに、集団発生を予防するために感染源および感染経路の解明が重要であると考えられた。

最後に、衛生研究所への検体搬入や情報提供にご尽力いただいた各保健福祉事務所、県生活衛生課および健康増進課の方々に深謝いたします。

(平成19年7月20日受理)

資料

感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成18年度）

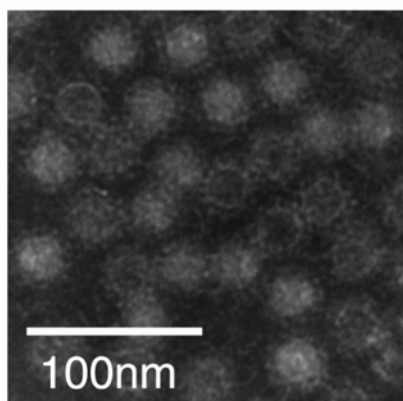
片山 丘, 宮原香代子, 古屋由美子

Surveillance of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2006～March, 2007)

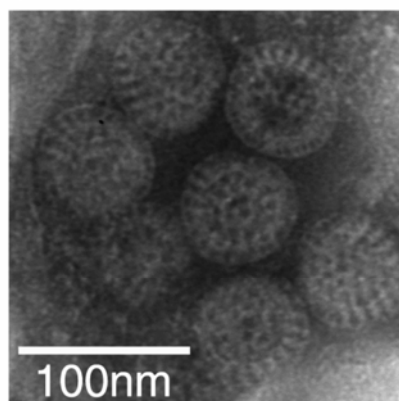
Takashi KATAYAMA, Kayoko MIYAHARA
and Yumiko FURUYA

感染症予測監視事業の一環として、感染性胃腸炎の原因ウイルスの動向を把握する目的で、県域の小児科定点医療機関から得られた感染性胃腸炎患者の検体から原因ウイルスの検索を行っている。一般的にウイルスを原因とする感染性胃腸炎は主に冬期の前半を中心に流行がみられるノロウイルス（図1-1）による乳幼児から学童の胃腸炎と、冬期の後半を中心に流行がみられるロタウイルス（主にA群：図1-2）による乳幼児の胃腸炎が良く知られている。県域ではこれらのウイルスの他にアデノウイルス（図1-3）やサポウイルス（図1-4）による胃腸炎も見られている。さらに、県域において平成16年には10月に一ヶ所の幼稚園でノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生が確認された。また平成17年には5月に二ヶ所の学校でサポウイルス、一ヶ所の学校でC群ロタウイルス、一ヶ所の老人福祉施設でA群ロタウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生が、さらに6月に一ヶ所の

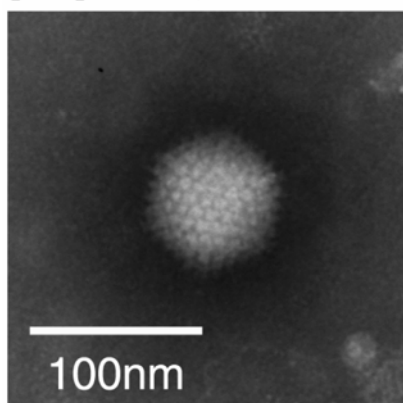
【1-1】 ノロウイルス



【1-2】 ロタウイルス



【1-3】 アデノウイルス



【1-4】 サポウイルス

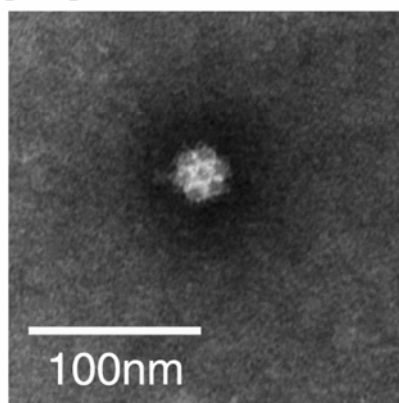


図1 平成18年度に検出されたウイルスの電顕像

学校でノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生が確認された。そこで、感染性胃腸炎の原因ウイルスの動向を探るため、小児科定点を受診し感染性胃腸炎と診断された患者について、その時期・年齢に関わらず原因ウイルスの検索を行った。

平成18年4月から平成19年3月に感染性胃腸炎と診断された患者の便186検体を用いた。ウイルスの検出はノロウイルス、A群ロタウイルス、アデノウイルスおよびサポウイルスを対象とした。ノロウイルスには定量PCR、A群ロタウイルスおよびアデノウイルスにはラピッドテストローターアデノ（Orion Diagnostica社製）、サポウイルスにはPCRを用いた。また電子顕微鏡によるウイルス検索も併せて行った。

検査の結果、186検体中106検体から感染性胃腸炎の原因ウイルスが検出された。検出されたウイルスは、ノロウイルスが71検体、A群ロタウイルスが18検体、アデノウイルスが5検体、サポウイルスが12検体であった。

（表1）. 検出されたノロウイルスのgenogroupをみると、71検体のうち69検体がgenogroup II、2検体がgenogroup Iであった。また同一の検体からノロウイルスとA群ロタウイルスの2種類のウイルスが検出されたものが1例あった。

患者の年齢を6歳以下、6歳から12歳、13歳から22歳、23歳から64歳および65歳以上に分け、ウイルスの検出状況を年齢別にみると、A群ロタウイルスとアデノウイルスは6歳以下からの検出数が多く、僅かながら23歳以上からも検出されている（表1）。ノロウイルスは全ての年齢層で検出された。サポウイルスはノロウイルスと同様に低年齢層に次いで、23歳から64歳からも検出されている。またノロウイルス以外のウイルスは、13歳から22歳では検出されなかった。

月別の検出状況をみると、平成18年4月には昨年度の流行の最後と思われるA群ロタウイルスが8例検出され、年間を通じて検出数が少なく散発的に検出されてい

表 1 年齢別ウイルス検出状況

	ノロウイルス	A群ロタウイルス	アデノウイルス	サポウイルス
6歳以下	33 ^{*1,*2}	16 ^{*1}	3	8
7～12歳	9	0	1	1
13～22歳	7	0	0	0
23～64歳	21	1	0	3
65歳以上	1	1	1	0
合 計	71	18	5	12

*1：同時に2種類のウイルスが検出された1検体を含む。

*2：genogroup I が検出された2検体を含む。

表 2 発病月別ウイルス検出状況

年 月	陽 性 数				
	ノロウイルス		サポウイルス	A群ロタウイルス	アデノウイルス
	genogroup I	genogroup II			
平成18年 4月	0	0	0	8	1
5月	0	1	1	0	0
6月	0	0	0	0	2
7月	0	0	0	0	0
8月	0	0	0	0	0
9月	0	0	0	0	0
10月	0	0	0	0	0
11月	0	14	0	0	1
12月	0	24	4	1	0
平成19年 1月	1	15	2	1	1
2月	1	10	4	2	0
3月	0	5	1	6	0
小 計	2	69	12	18	5

表3 家族内および同一患者におけるウイルス検出状況

患者番号	発 病 日	年 齢		性 別	検 査 結 果	
		歳	ヶ月		検出ウイルス	電 顕
A-1	平成18年 4月 8日	6	0	男	A群ロタウイルス	+
A-2	平成18年 4月10日	1	1	男	A群ロタウイルス	+
A-3	平成18年 4月18日	34		男	A群ロタウイルス	+
A-4	平成19年 2月14日	4	9	男	ノロウイルスgenogroup II	+
A-5	平成19年 2月15日	36		女	ノロウイルスgenogroup II	+
B-1	平成18年12月27日	6	5	男	サポウイルス	
B-1	平成19年 2月10日	6	7	男	ノロウイルスgenogroup II	
C-1	平成18年12月 5日		2	男	ノロウイルスgenogroup II	
C-1	平成18年12月28日		3	男	ノロウイルスgenogroup II	
C-1	平成19年 3月12日		6	男	ノロウイルスgenogroup II, A群ロタウイルス	十*

*: A群ロタウイルスのみ観察された

るアデノウイルスも1例検出された。5月にはノロウイルスとサポウイルスが1例ずつ検出された。6月にはアデノウイルスが2例検出され、それ以後、夏期には感染性胃腸炎からウイルスは検出されなかった。平成18年11月にノロウイルスが14例、アデノウイルスが1例検出されると、それ以降は12月にノロウイルスが24例、サポウイルスが4例、A群ロタウイルスが1例、平成19年1月にノロウイルスが16例、サポウイルスが2例、A群ロタウイルスが1例、アデノウイルスが1例、2月にノロウイルスが11例、サポウイルスが4例、A群ロタウイルスが2例、平成19年3月にノロウイルスが5例、サポウイルスが1例、A群ロタウイルスが6例と多数検出されている(表2)。

ノロウイルスの流行は平成18年11月から平成19年2月であり、ノロウイルスのgenogroup Iは、genogroup IIの流行が終盤に近づいてきた平成19年1月と2月に1例ずつ散発的に検出されている。サポウイルスは一ヶ月遅れて平成18年12月から平成19年2月であった。A群ロタウイルスは昨年と同様に平成19年も3月からであった。アデノウイルスは検出数も少なく流行は見られなかった(表2)。

今年度の調査において興味深い事例が3例見られた(表3)。1例目は同一家族内で平成18年4月にA群ロタ

ウイルス、平成19年2月にノロウイルスの家族内感染(発病日より子どもから大人への感染)と思われる事例、2例目は平成18年12月にサポウイルスに感染した患者が、平成19年2月にノロウイルスに感染した事例、3例目は同一患者が、ノロウイルスに平成18年12月に2回感染し、更に平成19年3月には、ノロウイルスとA群ロタウイルスの2種類のウイルスが同時に検出された事例であった。これらの事例でもわかるように低年齢層の子どもは、感染性胃腸炎の原因ウイルスに一シーズンに複数回感染することや、シーズン毎に異なったウイルスに感染することが確認され、さらに感染性胃腸炎の原因ウイルスが感染した子どもから大人へと家族内で広まっている事例が確認された。各事例ともに検出されたウイルスの遺伝子等を解析する事により、さらに詳しく症例の解析が可能となると考えられた。

今後も引き続き本調査を継続するにあたり、検査結果の迅速な還元など情報の提供に努めていきたい。

最後になりましたが、検体および患者情報の収集にご協力いただきました小児科定点医療機関の先生方に深謝いたします。さらに本事業にご尽力いただきました県健康増進課の方々に深謝いたします。

(平成19年7月20日受理)

資料

神奈川県におけるつつが虫病の 発生状況 (平成18年度)

古屋由美子, 片山 丘

Occurrence of Tsutsugamushi disease in Kanagawa Prefecture (April, 2006-March, 2007)

Yumiko FURUYA and Takashi KATAYAMA

つつが虫病は秋田県、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的な型と、日本各地で春期や秋期にアカツツガムシ以外の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年代後半には全国の子患者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つつが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402名と減少し、2004年は313名、2005年は345名、2006年は397名となり、近年、毎年300名から400名で推移している。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、再び2001年7名、2002年4名、2003年5名と減少した。その後2004年18名、2005年19名と増加し、2006年は15名であった(図1)。

神奈川県では、つつが虫病的病原体である *Orientia tsutsugamsuhi* について、immunofluorescence assay (IF) による血清抗体検査に加え、polymerase chain reaction (PCR) による遺伝子検査および感染株の型別を行い、医療機関へ迅速に検査結果の報告を行い、医療現場へ県内の発生状況などの情報還元も行っている。

2006年4月から2007年3月(平成18年度)につつが虫病を疑われた患者は、足柄上保健福祉事務所管内23例、秦野保健福祉事務所管内1例で合計24例であった。IFによる急性期と回復期の血清抗体価の上昇(4倍以上の差)および急性期の抗体検出(IgM抗体価が80倍以上)により15例がつつが虫病患者と診断された(表1)。急性期の血液のみの搬入で、抗体が検出されず、判定保留となった4例は遺伝子も検出されず、つつが虫病患者ではないと判

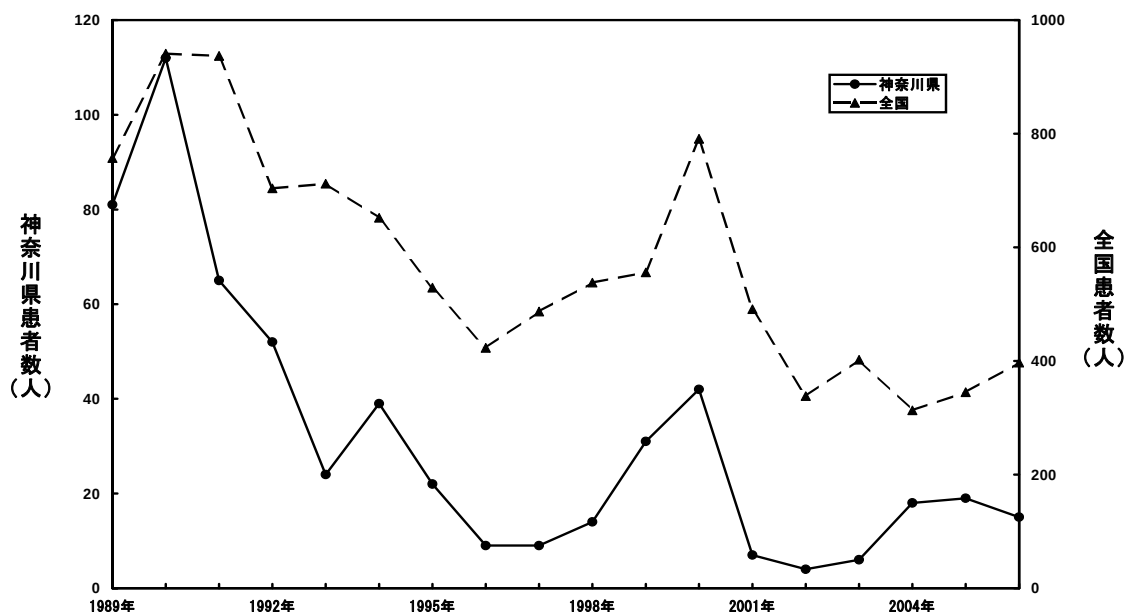


図1 つつが虫患者発生状況

表2 PCRによる患者感染株

期間	検体数	型別			
		Karp	Kawasaki	Kuroki	不明
2002年4月～2003年3月	3	0	3	0	0
2003年4月～2004年3月	5	1	3	1	0
2004年4月～2005年3月	14	0	10	4	0
2005年4月～2006年3月	13	1	10	2	0
2006年4月～2007年3月	11	0	7	3	1
合計	46	2	33	10	1
		4.3	71.7	21.7	2.2 (%)

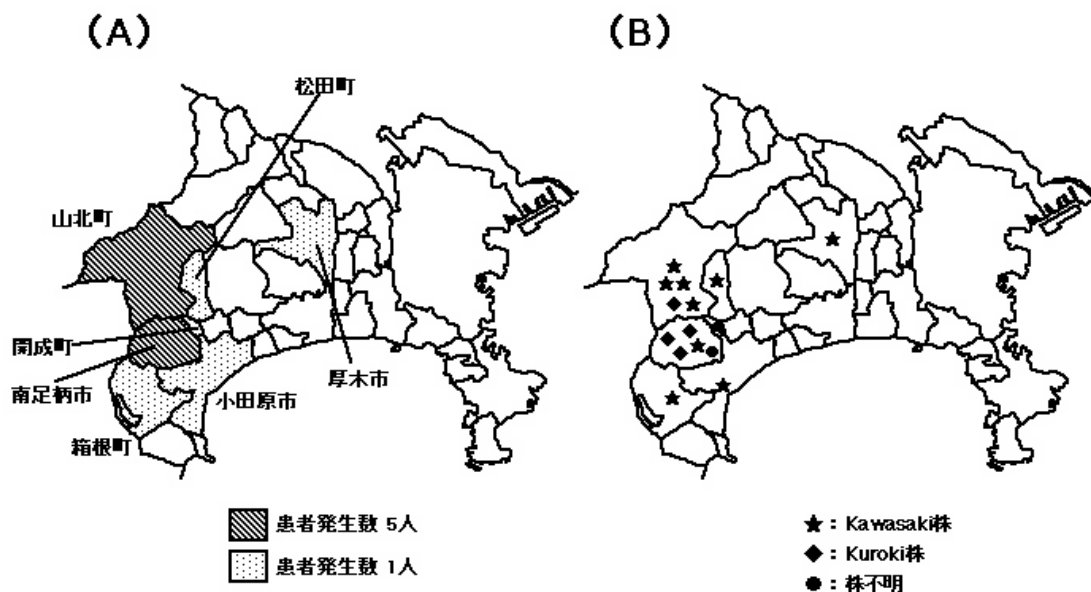


図2 つつが虫病発生地域と感染株

かったことから感染株は決定しなかった。このようにPCRにより型別できなかった例では、従来の感染株とは異なる株の可能性も考えられ、今後詳細な遺伝子解析を行う必要があると思われる。

これらのつつが虫病と確定診断された患者15名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とその周辺に集中していたが、過去5年間に患者発生がみられなかった厚木市と箱根町でも発生がみられた(図2)。

つつが虫病患者の発生時期は10月6名(40%)、11月7名(46.7%)、12月2名(13.3%)で10月と11月がおおよそ90%を占めていた。また感染時の行動は、山地の畑での農作業が多く、次に山地での山菜取りやレジャーなど、

平地での庭仕事や畑、田圃などでの農作業となっており、日常生活での感染の機会が多かった。

つつが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。今後も迅速に診断可能なPCRによる遺伝子検出とIFによる抗体検出を併用し、つつが虫病の診断をより確実にする必要があると思われる。

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

(平成19年7月20日受理)

資料

食品汚染物質残留実態調査結果
(平成18年度)

—動物用医薬品、カビ毒、農薬、重金属等—

佐藤久美子, 赤星 猛, 林 孝子, 甲斐茂美,
中村廣志, 藤巻照久

On the residual levels of food chemical
contamination in Kanagawa Prefecture
(2006)

Kumiko SATO, Takeshi AKABOSHI
Takako HAYASHI, Shigemi KAI
Hiroshi NAKAMURA and Teruhisa FUJIMAKI

我々は、食品の安全性を確保する目的で、残留農薬、
残留動物用医薬品等について残留実態調査を、水銀、有機
スズ化合物等に代表される環境汚染物質について汚染実
態調査を継続して行っている。本報では平成18年度の結
果を報告する。

1. 食肉、魚介類中の動物用医薬品・抗生物質残留検査
結果

動物用医薬品・抗生物質の収去検査を平成8年度より
継続して行っている。平成18年度は食肉17検体、魚介

類23検体について検査を行った。結果を表1および2に
示した。すべての検体で不検出であった。

2. 輸入香辛料、ナッツ類、穀類のカビ毒（アフラトキシ
ン、デオキシニバレノールおよびパツリン）検査結果
県域流通の輸入香辛料およびナッツ類31検体について
アフラトキシン、国産小麦3検体についてデオキシニバ
レノール、輸入りんご果汁6検体についてパツリンの収
去検査を行った。結果を表3に示した。アフラトキシ
ン、デオキシニバレノールはいずれも不検出であった。
濃縮りんご果汁2検体から（いずれも中国製）パツリン
が0.019, 0.038ppm検出された。検出値はいずれも規格
基準（0.050ppm）以内であった。パツリンの暫定耐用
一日摂取量（PTDI）は0.4μg/体重kg/日であり、体重
50kgのヒトが0.038μg/gのパツリンが検出されたりん
ごを食品群別摂取量（果実類）の119.2g¹⁾摂取した場
合、パツリンの摂取量はPTDIの22.6%であり、濃縮果
汁はさらに希釈して飲用されるので、安全性には問題な
いと考えられた。

3. トータルダイエットスタディによる有機塩素系一日
摂取量調査結果

有機塩素系農薬（総BHC、総DDT、エンドリン、ディ
ルドリン、アルドリン、エンドスルファンおよびヘプタク
ロール）について、食生活を通じて一日に摂取する量を推
計する目的で、残留調査を行った。試料は神奈川県内の
食品をマーケットバスケット方式で購入し調製した。結
果を表4-1および4-2に示した。

表 1 食肉中の動物用医薬品・抗生物質残留検査結果

検体名	検体数	生産地(検体数)	検出頻度 (検出数/検体数)				
			スビラマイシン ^{*1}	チルミコシン	ニューキノロン ^{*2}	アルベンダゾール ^{*3}	チアベンダゾール ^{*4}
国産牛肉	2	鹿児島(1), 北海道(1)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
輸入牛肉	2	オーストラリア(1), ニュージーランド [*] (1)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
国産豚肉	3	群馬(2), 宮崎(1)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
輸入豚肉	3	アメリカ(2), カナダ [*] (1)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
国産鶏肉	4	鹿児島(2), 岩手(1), 宮城(1)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
輸入鶏肉	2	アメリカ(1), 不明(1)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
輸入羊肉	1	オーストラリア(1)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

*1: ネオスビラマイシンを含む

*2: エンロフロキサシン, シプロフロキサシン, ダノフロキサシン, サラフロキサシンおよびオフロキサシン

*3: アルベンダゾールの代謝物の5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミンを測定

*4: チアベンダゾールの代謝物の5-ヒドロキシチアベンダゾールを含む

定量限界: スビラマイシン, ネオスビラマイシンおよびチルミコシン 0.05ppm

ダノフロキサシン 0.001ppm

上記以外の動物用医薬品 0.005ppm

表 2 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	生産地(検体数)	検出頻度 (検出数/検体数)	
			オキシテトラサイクリン	エンロフロキサシン
サケ	7	チリ(5), ノルウェー(2)	0/7	0/7
ブリ	3	愛媛(1), 大分(1), 香川(1)	0/3	0/3
マダイ	2	愛媛(1), 和歌山(1)	0/2	0/2
カンパチ	1	国産(1)	0/1	0/1
ヒラマサ	1	国産(1)	0/1	0/1
エビ	4	インドネシア(2), インド(1), タイ(1)	0/4	0/4
うなぎ加工品	5	中国(4), 不明(1)	—	0/5

—：未実施

定量限界：オキシテトラサイクリン0.02ppm, エンロフロキサシン0.05ppm

表 3 輸入香辛料, ナッツ類, 穀類のカビ毒検査結果

検体名	検体数	生産地(検体数)	検出頻度 (検出数/検体数)		
			アフラトキシン ^{*1}	デオキシニパレノール	パツリン
香辛料					
ブラックペッパー	2	マレーシア(2)	0/2	—	—
ホワイトペッパー	4	マレーシア(2), ニュージーランド [*] (1), 不明(1)	0/4	—	—
トウガラシ(レッドペッパー)	2	中国(2)	0/2	—	—
ナツメグ	3	インドネシア(2), 不明(1)	0/3	—	—
混合品	1	ドイツ(1)	0/1	—	—
乾燥果実および穀類・豆類					
イチジク	2	アメリカ(2)	0/2	—	—
落花生	6	中国(6)	0/6	—	—
ピスタチオ	8	アメリカ(7), イラン(1)	0/8	—	—
ポップコーン	3	アメリカ(3)	0/3	—	—
小麦	3	国産(3)	—	0/3	—
濃縮果汁およびジュース					
濃縮りんご果汁	2	中国(2)	—	—	2/2 ^{*2}
りんごジュース	4	オーストラリア(2), 南アフリカ(1), 不明(1)	—	—	0/4

—：未実施

*1 アフラトキシンB₁, アフラトキシンB₂, アフラトキシンG₁およびアフラトキシンG₂を含む

*2 0.019ppmおよび0.038ppm

定量限界：アフラトキシンおよびパツリン 0.01ppm, デオキシニパレノール 0.1ppm

表 4-1 トータルダイエットスタディによる有機塩素系農薬一日摂取量調査結果

	総BHC*1	総DDT*2	エンドリル	ディルドリン	アルドリル	エンドスルファン*3	ヘプタクロル*4
I 群 (米)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
II 群 (米以外の穀類・種実類・いも類)	ND	ND	ND	0.7	ND	ND	ND
III 群 (砂糖・菓子類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IV 群 (油脂類)	ND	1.8*5	ND	0.6	ND	1.2*6	ND
V 群 (豆類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VI 群 (果実類)	ND	ND	ND	ND	ND	0.6*7	ND
VII 群 (緑黄色野菜)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VIII 群 (その他の野菜類・きのこ類・藻類)	ND	0.5*8	ND	ND	ND	ND	ND
IX 群 (嗜好飲料)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
X 群 (魚介類)	ND	4.3*9	ND	0.8	ND	0.7*10	ND
X I 群 (肉類・卵類)	ND	1.3*11	ND	ND	ND	ND	ND
X II 群 (乳・乳製品)	ND	0.9*12	ND	0.6	ND	ND	ND
X III 群 (調味料・香辛料類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
X IV 群 (水道水)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

単位：ppb

ND：定量限界未満により不検出 定量限界：0.5ppb

*1 α-BHC, β-BHC, γ-BHCおよびδ-BHCの総和

*2 op'-DDT, pp'-DDT, op'-DDD, pp'-DDDおよびpp'-DDEの総和

*3 α-エンドスルファン, β-エンドスルファンおよびエンドスルファンスルフェートの総和

*4 ヘプタクロルエポキシドを含む

*5, 11, 12 pp'-DDE

*6, 10 エンドスルファンスルフェート

*7 β-エンドスルファン

*8 pp'-DDT

*9 pp'-DDE：3.0ppb, pp'-DDT：1.3ppb

表 4-2 検出された有機塩素系農薬の ADI に対する摂取割合について

検出された 農薬名(物質名)	検出値 ($\mu\text{g/g}$)	検出食品群		農薬の一日 摂取量(μg)	ADI		
		食品群	食品の一日摂取量(g)		ADI ($\mu\text{g/kg}$ 体重)	体重50kgの人が ADIに達する 一日量(μg)	50kg体重のADIに対する 摂取割合 (%)
DDT	0.0018	IV	10.9	0.020	5	250	0.0078
DDT	0.0005	VIII	195.8	0.098	5	250	0.039
DDT	0.0043	X	83.4	0.36	5	250	0.14
DDT	0.0013	XI	122	0.16	5	250	0.063
DDT	0.0009	XII	157.3	0.14	5	250	0.057
ディルドリン	0.0007	II	190.3	0.13	0.1	5	2.7
ディルドリン	0.0006	IV	10.9	0.0065	0.1	5	0.13
ディルドリン	0.0008	X	83.4	0.067	0.1	5	1.3
ディルドリン	0.0006	XII	157.3	0.094	0.1	5	1.9
エンドスルファン	0.0012	IV	10.9	0.013	6	300	0.0044
エンドスルファン	0.0006	VI	145.5	0.087	6	300	0.029
エンドスルファン	0.0007	X	83.4	0.058	6	300	0.019

検出値の濃度範囲(0.5~4.3ppb)は、定量下限に近い低濃度であり、体重50kgのヒトのADI(一日許容摂取量)に対する摂取割合は0.004~2.7%であることから、食品衛生上問題ないと考えられた。

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。平成18年度は15検体についてTBTO、TPT、DBTの調査を行った。

表 5 海産魚介類の有機スズ化合物の汚染実態調査結果

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)		
		TBTO	TPT ^{*1}	DBT ^{*2}
アジ	3	0/3	0/3	1/3 ^{*3}
サバ・ゴマサバ	2	1/2 ^{*4}	0/2	0/2
イサキ	1	0/1	0/1	0/1
イナダ	1	0/1	0/1	0/1
サゴシ	1	1/1 ^{*5}	0/1	0/1
シタビラメ	1	0/1	0/1	0/1
ソウダカツオ	1	0/1	0/1	0/1
トビウオ	1	0/1	0/1	0/1
ホウボウ	1	0/1	0/1	0/1
マイワシ	1	0/1	0/1	1/1 ^{*6}
レンコダイ	1	0/1	0/1	1/1 ^{*7}
ワラサ	1	0/1	0/1	0/1

*1 TPTC(塩化トリフェニルスズ)として算出

*2 DBTC(塩化ジブチルスズ)として算出

*3 0.028ppm

*4 0.013ppm

*5 0.014ppm

*6 0.035ppm

*7 0.024ppm

定量限界: TBTO 0.010ppm, TPTおよびDBT 0.020ppm

結果を表5に示した。15検体中2検体からTBTO(0.013, 0.014ppm)が、3検体からDBT(0.024~0.035ppm)が検出された。TPTはすべての検体から検出されなかった。検出値はいずれも定量限界に近い濃度範囲であった。

5. 魚介類加工品の総水銀調査結果

厚生労働省は平成15年6月に「水銀を含有する魚介類等の摂食に関する注意事項」を発表し、妊婦を対象に水銀濃度が高い傾向にあるとされるサメ、カジキ、キンメダイおよびクジラ類²⁾について摂食注意を呼びかけている。魚介類摂取量の約36%は加工品によるものであるが、加工品についての分析報告は少ないことから、平成16年度から総水銀調査を実施している。結果を表6に示した。

加工食品には水銀の基準は設定されていない。生鮮魚介類において暫定的規制値(総水銀として0.4ppm)が定められているが、今回の結果で0.4ppmを超えたものはなかった。比較的濃度が高かったのは大型回遊魚のカツオ、マグロ、海底または深海に棲息するカニ、キンメダイ、カサゴ、カレイ、メロ、アンコウを原材料とする加工品であり、水銀濃度が高いとされる魚介類²⁾であった。加工食品の水銀濃度についても原料の種類による影響が大きいと考えられた。いずれも昨年度の調査結果³⁾と同様の傾向を示した。

6. イカ及びその加工品の重金属汚染実態調査結果

近年、海産物由来の重金属汚染について注目されていることから、県域に流通する生イカ(胴体および内臓)と加工品(塩辛および乾燥品)のカドミウムおよび鉛の汚染実態調査を実施した。結果を表7に示した。

一部の生イカの肝臓でカドミウムの濃度が高かったも

表 6 魚介類加工品の総水銀調査結果

原料海産物	検体数	検出範囲 (ppm)		最小値 (ppm)	最大値 (ppm)
		0.10未満	0.10～0.40		
サバ (マサバ含む)	11	7	4	0.017	0.14
イワシ (ウルメイワシ、カタクチイワシ、マイワシ含む)	8	8	0	0.0027	0.054
カツオ	8	3	5	0.0098	0.27
マグロ (キハダマグロ・メバチマグロを含む)	7	4	3	0.015	0.30
アジ (マアジ含む)	5	5	0	0.014	0.071
カマス	5	5	0	0.027	0.059
クジラ (ミンククジラ・イワシクジラ含む)	5	2	3	0.045	0.10
イカ (スルメイカ、ホタルイカ含む)	4	4	0	0.016	0.042
マルズワイガニ (オオエンコウガニ)・ベニズワイガニ	4	0	4	0.17	0.26
キンメダイ	4	1	3	0.093	0.27
サンマ	4	3	1	0.078	0.14
ホッケ (シマホッケ含む)	4	4	0	0.032	0.053
ニシン	4	4	0	0.0036	0.044
カサゴ (アカウオ、メヌケ含む)	3	0	3	0.11	0.38
カレイ (カラスガレイ含む)	3	0	3	0.11	0.17
カラフトシシャモ (カペリン)	3	3	0	0.015	0.034
サケ (シロザケ含む)	2	2	0	0.017	0.082
タラ (スケソウダラ含む)	2	2	0	0.0092	0.069
ハタハタ	2	2	0	0.039	0.046
メロ (マジェランアイナメ)	2	0	2	0.16	0.21
アサリ・イオスダレガイ混合	1	1	0	0.019	0.019
アンコウ	1	0	1	0.40	0.40
イイダコ	1	1	0	0.006	0.006
ウニ	1	1	0	0.0052	0.0052
エボダイ (イボダイ)	1	1	0	0.0028	0.0028
カキ	1	1	0	0.024	0.024
カニ・タラ・エソ混合	1	1	0	0.016	0.016
カワハギ	1	1	0	0.024	0.024
サワラ	1	1	0	0.014	0.014
めかぶ (ワカメ)	1	1	0	0.0028	0.0028

表 7 イカ及びその加工品の重金属 (カドミウム (Cd), 鉛 (Pb)) 汚染実態調査結果

	検体数	検出頻度 (検出数/検体数)		濃度範囲 (ppm)	
		Cd	Pb	Cd	Pb
生イカ (胴体)	10	10/10	0/10	0.02	ND
生イカ (肝臓)	10	10/10	5/10	1.00～41.2	ND～0.60
イカ塩辛	5	5/5	2/5	0.46～3.68	ND～0.17
スルメイカ	5	5/5	1/5	0.24～1.70	ND～0.18

ND: 定量下限未満により不検出

定量下限: Cd 0.02ppm Pb 0.05ppm

のも見られたが、検出濃度は水産庁が平成15年に公表した調査結果⁴⁾より低い濃度範囲であり、通常の食生活の中では食品衛生上問題のない濃度範囲であると考えられた。

なお、本調査は県保健福祉部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19年7月20日受理)

文 献

- 1) 健康・栄養情報研究会編：平成16年国民健康・栄養調査報告，第一出版，p.65
- 2) 「魚介類に含まれる水銀の調査結果（まとめ）」
薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会（平成17年8月12日）配布資料
- 3) 赤星 猛，佐藤久美子，林 孝子，渡邊裕子，甲斐茂美，藤巻照久，岸 美智子：食品汚染物質残留実態調査結果（平成16年度，17年度結果），神奈川県衛生研究所報告，**36**，56-58
- 4) 「水産物に含まれるカドミウムの実態調査結果について」水産庁，平成15年5月2日プレスリリース

他誌掲載論文抄録

(平成18年4月～平成19年3月)

肺炎マイコプラズマの分離培養と薬剤感受性試験

岡崎則男, 大屋日登美 (神奈川衛研), 佐々木次雄 (国立感染研), 成田光生 (札幌鉄道病院), 日本マイコプラズマ学会雑誌, **33**, 60-63 (2006)

神奈川県内において, 患者咽頭スワブを検体とし寒天平板培地およびメチレンブルー加二層培地を併用して肺炎マイコプラズマ分離を実施した. 1976～2005年までの2370検体中, 分離陽性は559例 (23.6%) であった. 陽性数と陽性率が共にピークを示した年は, 1980, 1984, 1988, 1992, 1996, 1998および2003年で, 1990年代後半からは4年周期性のピークが見られなくなった. 肺炎マイコプラズマ分離株 (県外分離株を含む) につき, 微量液体希釈法による薬剤感受性試験を実施した. 2000年に札幌鉄道病院から送付された分離株中にマクロライド耐性株が初めて検出され, 以後2005年までに神奈川県内における計140株の分離株中, 耐性株が21株 (15%) 検出された. 従って, 国内では2000年以降にマクロライド耐性菌が急増したものと推定される.

HIV感染の診断法

今井光信, 嶋 貴子 (神奈川衛研), 治療, **88**, 2865-2874 (2006)

わが国のHIV感染者は年々増加を続けており, 2005年の一年間で新たに報告されたHIV感染者数は年間1,000名を超え, しかもそのおよそ3分の1の感染者はエイズ発症によりHIV感染が判明した, いわゆる「いきなりエイズ」と言われる感染者である. このため, HIV感染者の早期発見・早期治療とその感染拡大の防止が, エイズ対策の緊急課題の一つとなっている. 近年, 迅速検査キットの開発により, 保健所やクリニックなどの現場においてスクリーニング検査が可能となり, 現在多くの保健所で“即日検査”と呼ばれるHIV検査が広く行われつつある. また, STD患者を対象としたクリニックなどの一部でも即日検査が実施され, 非常に多くの検査希望者に利用されている. 本稿では, 病院やクリニックなどにおけるHIV感染の診断に必要なHIV検査について, その進め方や注意点を中心に解説を行った.

Enterovirus detection status from patients with Herpangina and hand, foot and mouth disease in Kanagawa Prefecture,

Japan

(神奈川県におけるヘルパンギーナ, 手足口病患者からのエンテロウイルス検出状況)

嶋 貴子, 齋藤隆行, 近藤真規子, 渡邊寿美, 尾上洋一, 新川隆康 (神奈川衛研), 水野桂子, 佐藤善博, 折原直美 (神奈川県感染症情報センター), Jan. J. Infect. Dis., **60**, 63-64 (2007)

2006年の神奈川県域でのヘルパンギーナの週別患者報告数は, 第22週に定点あたり1.0人を超え, 例年に比べ2週間ほど早くから流行が始まった. 2001年規模の大流行が予測されたが, 第25週に7.07人とピークを迎えたあと, 第31週には定点あたり1.0人を下回り, 収束に向かった. 一方, 手足口病の週別患者報告数は, 第27週から定点あたり1.0人前後で推移し大きな流行はみられなかったが, 県西地区では第23週から局地的流行が見られ, 特に小田原地区では第30週に8.00人となり, 流行が続いた. 2006年8月末までにおいて, ヘルパンギーナ患者検体からコクサッキーウイルス (C) A4型が20株, 単純ヒトヘルペスウイルス1型 (HSV-1) が1株, アデノウイルス (Ad) 3型が2株分離され, このことから今夏のヘルパンギーナ流行の主因ウイルスはCA4と推測された. 手足口病患者検体からはCA16が6株, CA4が3株, HSV-1が1株分離された. CA16が分離された6例中4例が小田原地区からであり, 県西地区の局地的流行はCA16によるものと推測された.

Analysis of a long-term discrepancy in drug-targeted genes in plasma HIV-1 RNA and PBMC HIV-1 DNA in the same patient

(血漿中HIV-1-RNAとプロウイルスHIV-1DNAにおける薬剤耐性遺伝子変異の長期にわたる不一致例の解析)

宇宿秀三, 野口有三 (横浜市衛研), 足立拓也, 相楽裕子 (横浜市立市民病院), 須藤弘二 (エイズ予防財団), 西澤雅子 (国立感染研), 近藤真規子, 今井光信 (神奈川衛研), 枡久保修 (横浜市立大学医学部), Jpn. J. Infect. Dis., **59**, 122-125 (2006)

HIV感染者の薬剤治療を有効に進めるうえで, 薬剤耐性変異の有無を解析することは重要である. 通常, 薬剤耐性株が出現する時は, 血中ウイルス (HIV-1-RNA) において薬剤耐性変異が検出され, その2～3ヵ月後リンパ球

中のプロウイルスHIV-1・DNAに変異が検出されるようになる。しかしながら我々は、HAART治療中患者において血中HIV・RNAに薬剤耐性変異を検出後も、長期間にわたりプロウイルスDNA中に薬剤耐性変異を検出できない症例を経験し、その詳細について解析した。血漿中とプロウイルス中の薬剤耐性遺伝子変異の不一致は3年上にわたり持続した。しかし、クローニング解析の結果、血漿中に薬剤耐性変異（215Y）が検出されてから2年後のプロウイルスDNA中に215Yの耐性変異は13クローン中3クローン認められた。本症例においては、血漿中HIV-1がほとんど耐性となった後もリンパ球中のプロウイルスのほとんどは感受性型であった。しかし、プロウイルス中に耐性型も極僅かながら存在しており、血漿中においては主として耐性型のプロウイルスからHIV粒子が複製し、耐性株が優位となっているものと考えられた。

Real-time PCRを用いたHIV-1RNAキットの基礎的検討

須藤弘二，嶋 貴子，近藤真規子，今井光信（神奈川衛研），加藤真吾（慶應義塾大学医学部），感染症学雑誌，81, 1-5（2007）

第2世代の血中HIV-1RNA定量法として開発されたリアルタイムPCR法を用いたコバスTaqMan HIV-1キットの基礎的検討を行った。希釈直線性は測定値の得られた $1.67 \times 10^2 \sim 1.73 \times 10^6$ copies/mlの範囲において良好であった（ $r^2=0.991$ ）。また、検出限界の検討の結果、検出限界は40 copies/mlであり、本キットは従来のアンブリコア法よりも高感度で広い測定範囲を持つことが確認された。再現性は、実験内変動係数が27.4～50.8%，実験間変動係数が29.3～81.5%であった。また、6種のサブタイプ（A, B, C, A/E, F, G）を用いて本法とアンブリコア法の測定値を比較した結果、両法の測定値は良好な相関を示したが（ $r^2=0.960$ ）、すべてのサブタイプで本法の測定値が有意に高くなった（平均3.1倍， $p=0.002$ ）。特にサブタイプCの試料ではその傾向が強かった（7.1倍）。コバスTaqMan法に移行する際には、この点に留意する必要がある。

Drug resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan

（日本の新規HIV感染者における薬剤耐性変異の動向）

潟永博之，岡 慎一（国立国際医療センター），伊部史郎（名古屋医療センター），松田昌和（三菱化学メディエンス），吉田 繁（北海道大学医学部），浅黄 司，伊藤俊弘（仙台医療センター），近藤真規子，今井光信（神奈川衛研），貞升健志，長島真美（東京都健康安全センター），下条文武（新潟大学医学部），正兼季季，

上田幹夫（石川県立中央病院），森 治代，小島洋子（大阪公衛研），高田 昇，木村昭郎（広島大学病院），南留美（九州医療センター），健山政男（琉球大学），白阪琢磨（大阪医療センター），杉浦 互（国立感染研），Antiviral Research, 75, 75-82（2007）

日本国内における薬剤耐性HIV-1の発生・伝播動向を把握するため、2003年から2004年の間に登録された新規HIV-1感染者575人について薬剤耐性変異の解析を行った。その結果、23例の逆転写酵素およびプロテアーゼ領域に薬剤耐性変異およびリバータント変異（T215X）が検出され、日本での新規感染者における薬剤耐性変異株の伝播レートは4.0%であった。また、HBVとの重複感染が8.8%，HCVとの重複感染が4.3%検出された。日本の新規感染者における薬剤耐性変異の保有率は欧米諸国に比べ非常に低いが、治療前に薬剤耐性検査を行うことは有効な薬剤治療を行ううえで重要である。

Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for HIV-1 in Japan

（HIV-1遺伝子型薬剤耐性検査のバリデーション）

藤崎誠一郎，藤崎彩恵子，伊部史郎，金田次弘（名古屋医療センター），浅黄 司（仙台医療センター），吉田 繁，小池隆夫（北海道大学医学部），大家正泰（新潟大学），渡邊香奈子（新潟保健環境科学研究所），正兼季季，上田幹夫（石川県立中央病院），潟永博之，岡慎一（国立国際医療センター），松田昌和（三菱化学メディエンス），貞升健志，長島真美（東京都健康安全センター），岡田清美（北里大塚バイオメディカル），近藤真規子（神奈川衛研），秦 真美（愛知衛研），溝上泰司，白坂琢磨（大阪医療センター），森 治代（大阪公衛研），南 留美（九州医療センター），杉浦 互（国立感染研），Jpn. J.Infect.Dis., 60, 113-117（2007）

HIV感染者において薬剤耐性検査は、有効な薬剤治療を行うために重要であり、HIV遺伝子の薬剤耐性変異を解析するgenotype検査が2006年4月より保険適用されるようになった。しかしながら、日本でgenotype検査を実施しているほとんどの施設では、独自のin-houseプロトコルを用いて検査を行っており、検査方法の確認および結果について信頼性を評価することが重要となってきた。そこで、我々は、日本で薬剤耐性検査を実施している主な施設、15施設について、検査手順の精度と信頼性を調べることを目的としてバリデーションを実施した。その結果、HIV-1遺伝子型薬剤耐性検査の質は、正解率が97.3%と、非常に高いことが明らかとなった。また、エラーの原因としては、不適切なプライマーの使用、エレクトロフォレグラムの乱れ、人為的エラーが存在することも

明らかとなった。日本で実施されているHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査の水準をより一層向上させる為に、今回明らかになった問題に対してトラブルシューティングを提案した。

Occurrence of Scrub Typhus (Tsutsugamushi disease) in Kanagawa Prefecture (2001-2005)

(神奈川県におけるつつが虫病患者発生状況(2001~2005年))

片山 丘, 原みゆき, 古屋由美子, 新川隆康(神奈川県衛研), 小笠原弘和(神奈川県保健福祉部), Jpn. J. Infect. Dis., **59**, 207-208 (2006)

2001年から2005年の5年間につつが虫病を疑われた患者87名(2001年13名, 2002年7名, 2003年17名, 2004年23名, 2005年27名)について, immunofluorescence assay (IF) による血清抗体検出およびPCRによる *Orientia tsutsugamushi* DNA検出により確定診断を行った。その結果, 58名(2001年7名, 2002年4名, 2003年10名, 2004年18名, 2005年19名)がつつが虫病と診断され, 2001年と2003年の患者よりL929細胞を用いて5株の *O. tsutsugamushi* 分離株が得られた。この5株のうち4株は県内で感染したと思われる患者からの分離株で, 1株は韓国で感染したと思われる患者からの分離株であった。

ハウスダストとフケ・アカを餌として生育させた条件下におけるコナヒョウダニの繁殖力とアレルゲン蓄積量の推移

竹田 茂, 稲田貴嗣(神奈川県衛研), 衛生動物, **58**, 1, 19-28 (2007)

掃除機で集めた10家屋のハウスダスト5gにコナヒョウダニのメス成虫20匹をそれぞれ加え, 25℃, 相対湿度65%の環境で飼育したところ, 多くの試験区でダニは指数関数的に繁殖し, それにともなってアレルゲン蓄積量, 特に糞由来アレルゲンであるDer f I が急激に増加した。栄養価が高いハウスダストを餌として与えることにより, ダニ数は15週後に初期値(細塵1gあたり4匹)の2,000倍以上に増加し, Der f I は20週後に細塵1gあたり780 μ g以上に達した。その場合, 乾燥酵母, 魚粉などの配合飼料を用いて飼育された既知の報告値よりもダニの繁殖力は優れていた。空き家のゴミから得たハウスダストでは栄養価が低いためダニの繁殖およびアレルゲン量の増加はほとんどなかった。ダニの繁殖が悪いハウスダストにフケやアカを加えて飼育すると, ダニは良く繁殖しアレルゲン量は急増した。これらのことから, 人が居住している家庭のハウスダストおよびフケ・アカはダニ

にとって非常に栄養価の高い餌になり, アレルゲンが多量に蓄積されることが確認された。

畜産物中の動物用医薬品の分析における高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法のデータ解析に関する一考察

甲斐茂美, 赤星 猛, 藤巻照久, 伊藤伸一(神奈川県衛研), CHROMATOGRAPHY, **28**, 29-35 (2007)

ポジティブリスト制度施行に際し, 食の安全・安心のため畜産物中の動物用医薬品の多成分一斉分析にはLC/MS/MSによる分析は有効な手法である。LC/MS/MSを畜産物中の動物用医薬品検査に活用するため, MRM法による定量・同定時におけるデータ解析手法について検討を試みた。

[M+H]⁺または[M-H]⁻のプレカーサーイオンから派生する2つのプロダクトイオンを選択し, 定量イオン及び参照イオンとした時のイオン強度比(R/T値)は, 薬剤濃度, マトリックスの違いにかかわらず一定の範囲内にあることがわかった。このことから, R/T値が目的物質の同定の指標になることが確認でき, 日常検査時への適用が期待された。

Food antigen causes Th2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T cell receptor transgenic mice

(T細胞受容体遺伝子導入マウスにおける食物依存性Th2型腸炎は傷害組織の再生を主体とする)

足立(中嶋)はるよ, 海老原あゆみ, 菊池 智(東京大学), 石田 剛(東日本関東NTT), 佐々木清美(東京大学), 平野清美(千葉大学), 渡邊裕子(神奈川県衛研), 浅井和美(東京大学), 高橋宜聖(感染研), 金森豊(東京大学), 下条直樹(千葉大学), 松田 幹(東京農工大学), 河野陽一(千葉大学), 八村敏志(東京大学), 上野川修一(日本大学), J Allergy and Clinical Immunol, **117**, 1125-32 (2006)

我々は食物依存性腸炎の発症機構を明らかにする目的で, T細胞受容体遺伝子導入マウスであるOVA23-3マウスを用いモデル系の作成を試みた。そして, このマウスへの卵白食投与が, マウスに有意な体重減少を誘導し, さらに空腸を中心とする小腸に絨毛の形態変化を伴う炎症を誘導することを発見した。組織学的変化は個体により様ではなく, 特に傷害組織の再生を主体とする炎症が観察される個体があり, 平均体重は投与期間中に回復傾向にあった。炎症はT細胞依存性に成立し, 組織中および腸間膜リンパ節CD4⁺T細胞のサイトカイン産生量の検討から, Th2型の応答によることを示した。一方空腸組織中では, ヒスタミン量の増加と共にIgE抗体結合マス

ト細胞の脱顆粒像が観察され、これらも何らかの機能を果たすことが予想された。このモデルは、体重回復傾向や傷害組織の再生などの他のモデルに類のない病態を示すが、この形成には寛容誘導機構が関わる可能性もある。

構造異性体を有するケミカルドラッグ成分の分析

土井佳代, 宮澤真紀 (神奈川衛研), 藤井 寿 (神奈川県産技センター), 小島 尚 (神奈川衛研), 薬学雑誌 **126** (9), 815-823 (2006)

快感や多幸感を目的とした化学物質や植物が違法ドラッグ (いわゆる脱法ドラッグ) として出回っているが、その実態は殆ど不明である。特に、麻薬や覚せい剤などのデザイナーズドラッグと呼ばれる化学物質の乱用による健康被害が報告され、危害性が明らかになったものは麻薬に指定されている。しかし、麻薬に指定された化学物質と違法ドラッグとして流通する化学物質は構造が類似するため化学物質を明確に区別する必要がある。本報告では類似する化学物質、特に、構造異性体に関する分析方法とその特徴を、トリプタミン系化合物、ピペラジン系化合物及びフェネチルアミン系化合物の代表的な事例についてTLC, HPLC, GC-MS, NMR等で検討し、その分析にはNMRによる分析が不可欠であることを報告した。

Combined intoxication with methylenedioxymethamphetamine and 5-MeO-MIPT.

(メチロンと5-MeO-MIPTを併用した中毒事例)

清水栄司, 渡邊広幸 (千葉大学医学部), 小島 尚 (神奈川衛研), 萩原裕子, 藤崎美久, 宮武良輔, 橋本謙二, 伊豫雅臣 (千葉大学医学部), Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, **31** (1), 288-91 (2007)

麻薬や覚せい剤などに構造が類似したケミカル系違法ドラッグ (ケミカルドラッグ) が数多く流通しているが、その生体作用は殆ど報告されていない。本報告ではメチロン及び5-MeO-MIPTの混合物を服用した27歳男性の中毒症例である。患者は単一のメチロンとしてインターネットで購入したが、化学分析ではメチロン60%及び5-MeO-MIPT 38%の混合物であった。この症例から両化合物による中毒の救急での対応と、向精神化合物の併用による精神疾患の問題点を明らかにした。

薄層クロマトグラフィーを活用した医薬品成分を含有する健康食品の分析

熊坂謙一, 松阪綾子, 麻生順子, 宮澤真紀, 土井佳代, 小島 尚 (神奈川衛研), CHROMATOGRAPHY, **28**, 37-42 (2007)

「いわゆる健康食品」がインターネットなどで流通す

る中、一部の製品では、医薬品成分が添加されている場合がある。消費者の健康被害を防止するためには、市場に流通する製品について医薬品成分添加の有無を検査することが重要となる。しかし、このような製品に添加される医薬品成分は製品によって異なるという実情がある。そのため、効率的な医薬品成分のスクリーニング試験が求められる。そこで、勃起不全 (ED) 治療薬成分が検出された強壮強精用の健康食品の分析事例において、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法、液体クロマトグラフ-質量分析 (LC/MS/MS) 法による確認・同定分析に先立ち、添加医薬品成分のスクリーニング法として薄層クロマトグラフ (TLC) 法を活用した事例を報告する。本事例においてTLC法を活用した結果、HPLC法およびLC/MS/MS法分析における対象成分を絞り込む際に有効であると考えられた。

Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in an eutrophic lake

(富栄養湖より単離した微生物の固定化によるミクロシチンの分解)

辻 清美 (神奈川衛研), 浅川美紀 (東京家政大学), 安齊洋次郎 (東邦大学), 角野立夫 (日立プラント), 原田健一 (名城大学), Chemosphere, **65**, 117-124 (2006)

アオコが産生する有毒化合物 (ミクロシチン) を分解する微生物を富栄養化した湖から探索し、B-9 (*Sphingomonas sp* と同定) を単離した。湖沼浄化利用のため、この菌を担体 (ポリエステル担体) へ固定化し、バイオリアクターでの分解性を検討した。その結果、24時間でミクロシチンRRは90%以上分解した。2ヶ月以上もこの分解能が持続したことから、湖沼浄化への実用化の可能性が強く示唆された。

4, 4'-メチレンジアニリンの分析法の検討及び水道水中における消長

上村 仁 (神奈川衛研), 水道協会雑誌, **75**, 9, 31-36 (2006)

4, 4'-メチレンジアニリン (MDA) はtC18による固相抽出及びメタノール溶出、LC-MSによる測定によって感度よく定量することが可能であった。水道水中において、MDAは残留塩素により分解され、GC-MSのクロマトグラム上に3つの分解物のピークが検出された。このうちの1つのピークは2, 4-ジクロロアニリン、2, 5-ジクロロアニリンのいずれか又は混合物と推定された。他の2つのピークについては同定に至らなかった。

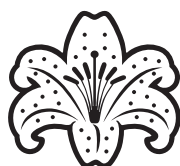
感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県域における病原微生物の検出動向（2002年～2006年）	
折原直美，佐藤善博	65
神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（平成18年度）	
石原ともえ，伊東久美子，黒木俊郎	68
県域の散発性下痢症患者から分離されたカンピロバクターの性状（平成18年度）	
伊東久美子，石原ともえ，黒木俊郎	70
神奈川県におけるウイルス性胃腸炎の集団発生状況（平成18年度）	
宮原香代子，原田美樹，片山 丘，古屋由美子	72
感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成18年度）	
片山 丘，宮原香代子，古屋由美子	75
神奈川県におけるつつが虫病の発生状況（平成18年度）	
古屋由美子，片山 丘	78

食の安全・安心を確保するための調査研究

食品汚染物質残留実態調査結果（平成18年度）－動物用医薬品，カビ毒，農薬，重金属等－	
佐藤久美子，赤星 猛，林 孝子，甲斐茂美，中村廣志， 藤巻照久	81

他誌掲載論文抄録（平成18年4月～平成19年3月）	85
---------------------------	----



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所研究報告編集委員（平成19年度）

今 井 光 信（委員長）	増 田 友 克
田 村 哲	佐 藤 善 博
高 橋 智恵子	古 屋 由美子
甲 斐 茂 美	熊 坂 謙 一
佐 藤 利 明	長 田 幸 郎（事務局）

神奈川県衛生研究所研究報告第37号

平成19年9月発行

編 集	神奈川県衛生研究所
発 行	〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1 TEL 0467-83-4400
印 刷	有限会社 長谷川印刷 〒232-0017 横浜市区南区宿町2-38 TEL 045-711-5286

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health No.37 (September, 2007)

CONTENTS

Originals

Surveillance study on healthy harm prevention with chemical

- Degradation of pesticides by chlorination on the process of water treatment for drinking
Sadao WATANABE, Hitoshi UEMURA and Kazuo MURAKAMI..... 1

Short reports

Surveillance study on watch and prevention of infectious disease

- Usefulness of QuantiFERON® TB-2G in diagnosis of tuberculosis infection among tuberculosis contacts
Hitomi OHYA, Norio OKAZAKI, Chieko TAKAHASHI, Yuko WATANABE
Yoichi ONOUE, Takayasu NIKKAWA and Mitsunobu IMAI..... 6
- Examination about a standard operation procedure of *Enterohemorrhagic Escherichia.coli* O157&O26
Rieko SUZUKI, Yutaka NAGAI, Miyuki HARA, Yuko KOMATSU
Akiko KOIZUMI and Kunitarou KOGI..... 9

Surveillance study to secure safety and safety of food

- Heat resistance of mold isolated from raw materials for soft drink
Katsuhiro AIKAWA, Yoshio ASAI and Yoichi ONOUE..... 12
- Analysis of heavy metals in soft drinks by ICP-OES
Takeshi AKABOSHI and Teruhisa FUJIMAKI..... 16
- Studies on the method for determination of Total Organic Carbon in Mineral water
Masaki IWABUCHI and Kazuo HASEGAWA..... 20
- Prevalence of *Campylobacter jejuni* from retail chicken and epidemiological study of isolates
Ichiro FURUKAWA, Yoshimi DATE, Katsuhiro AIKAWA, Yoshio ASAI and Yoichi ONOUE..... 24
- Analysis of deoxynivalenol in grain using liquid chromatography/tandem mass spectrometry
Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI and Teruhisa FUJIMAKI..... 28
- Analysis of Dyes, Sudan I, II, III, IV and Para Red in imported foods
Hiroko KISHI..... 31
- Analysis of Wetting Agent, Propylene Glycol in chewing gum
Hiroko KISHI and Haruko SEKIDO..... 35
- Problem of preservation fee inspection in accuracy control
Haruko SEKIDO, Naomi YAMAZAKI, Reiko FUJIMOTO
Haruki ICHIKAWA and Noriko SUGA..... 38
- Investigation on the qualitative and quantitative analysis of genetically modified foods
in Kanagawa Prefecture (2006)
Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA, Hiroko WATANABE,
Haruko SEKIDO, Hiroko KISHI and Toshiharu YAMADA..... 41
- Analytical method and case studies on contaminations of foreign matters in foods in 2005 and 2006
Kiyomi OHMORI, Hiroko WATANABE, Haruko SEKIDO
Hiroko KISHI, Hisayo TSUCHIYA and Toshiharu YAMADA..... 45
- #### Surveillance study on allergy
- Measurement of allergen content of Der f 1 yield from *Dermatophagoides farinae* and evaluation of its stability
Takatsugu INADA and Shigeru TAKEDA..... 50
- Study of managing accuracy methods for detection of foods containing allergic substances - I
Quantitation by ELISA
Hiroko WATANABE, Chie KODAMA, Haruko SEKIDO, Kiyotaka SAITA
Hirotaka MIYAZAWA, Kenjiro WATABE, Yukio TANAKA and Toshiharu YAMADA..... 53
- Examination about a statistical method in public health
— About the case of the theme based on questionnaire survey of food allergy —
Yoshihiro SATO, Yasuharu ITAGAKI and Hiroshi NAKAMURA..... 56
- #### Surveillance study on healthy harm prevention with chemical
- Distribution of pharmaceuticals in water of Sagami River
Hitoshi UEMURA..... 60