

# 神奈川県衛生研究所研究報告

## 第39号 (平成21年 9月)

### 目 次

#### 短報

##### 感染症の監視と予防に関する調査研究

- 結核集団感染事例におけるクォンティフェロン®TB-2G と結核分離菌株の遺伝子型別  
高橋智恵子, 近内美乃里, 大屋日登美, 渡辺祐子, 岡崎則男 ..... 1

##### 食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

- 凍結鶏肉からのカンピロバクター検出のための選択培地に関する検討  
伊達佳美, 浅井良夫, 古川一郎, 相川勝弘 ..... 4
- 食品中で発見された種子様異物の鑑定について  
大森清美, 岸 弘子, 藤巻照久 ..... 8

##### くらしの安全・安心に関する調査研究

- 相模川水系河川水中の有機フッ素化合物 (PFOS, PFOA) の分析  
上村 仁, 仲野富美 ..... 14
- 室内空気汚染化学物質濃度調査について (平成13~20年度)  
仲野富美, 上村 仁, 辻 清美, 伏脇裕一, 渡辺貞夫, 長谷川一夫 ..... 18

#### 資料

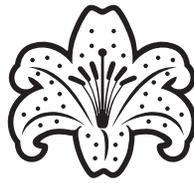
##### 感染症の監視と予防に関する調査研究

- 神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況 (平成20年度)  
石原ともえ, 伊東久美子, 黒木俊郎 ..... 23
- リアルタイム PCR 法による散発性下痢症患者便検査の迅速スクリーニングの実施  
伊東久美子, 石原ともえ, 黒木俊郎 ..... 27
- 感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況 (平成20年度)  
片山 丘, 原田美樹, 宮原香代子, 古屋由美子 ..... 30
- 神奈川県におけるつつが虫病の発生状況 (平成20年度)  
片山 丘, 古屋由美子 ..... 33

##### 食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

- 遺伝子組換え食品の分析結果 (平成20年度)  
大森清美, 服部愛希, 酒井康宏, 関戸晴子, 岸 弘子 ..... 37
- 苦情食品に対する理化学検査の実施状況 (平成20年度)  
酒井康宏, 藤巻照久, 岸 弘子, 甲斐茂美, 大森清美, 関戸晴子,  
佐藤久美子, 赤星 猛, 宮澤眞紀, 渡邊裕子, 上村 仁, 佐藤修二 ..... 41

- 他誌掲載論文抄録 (平成20年 4月~平成21年 3月) ..... 44



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所（平成21年度）

玉井 拙 夫	田 中 幸 夫
加山 讓 治	森 康 明
丹羽 加代子	三宅 裕 子
岡崎 則 男	藤 卷 照 久
伊藤 伸 一	

神奈川県衛生研究所研究報告編集調整会議構成員（平成21年度）

丹羽 加代子（座長）	木 内 久美子
折原 直 美	齋 藤 隆 行
稲田 貴 嗣	関 戸 晴 子
脇 ますみ	寺 西 大
中 村 廣 志（事務局）	

神奈川県衛生研究所研究報告第39号

平成21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 0467-83-4400
印 刷	ポータサイド印刷 〒236-0002 横浜市金沢区鳥浜町16-2

## 短報

### 結核集団感染事例における クオンティフェロン®TB-2G と 結核分離菌株の遺伝子型別

高橋智恵子<sup>1</sup>, 近内美乃里<sup>2</sup>, 大屋日登美<sup>1</sup>,  
渡辺祐子<sup>1</sup>, 岡崎則男<sup>1</sup>

#### Use of QuantiFERON® TB-2G and Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Tuberculosis Outbreak

Chieko TAKAHASHI<sup>1</sup>, Minori KONNAI<sup>2</sup>,  
Hitomi OHYA<sup>1</sup>, Yuko WATANABE<sup>1</sup>  
and Norio OKAZAKI<sup>1</sup>

#### はじめに

わが国における結核患者は年々減少傾向をたどっているが、結核に対する免疫保有率が低下しているため、ひとたび患者が発生すると、集団感染を起し易くなっている。集団感染発生時には、感染範囲を把握し、その拡大を防止する目的で、接触者健診の中で感染者を見つける結核菌特異抗原刺激全血インターフェロン $\gamma$ 測定(QFT)検査等が実施されている。また、同一菌による感染であることを証明するため、分離結核菌の遺伝子型別が必要となる。

今回我々は、県域で発生した2事例の結核集団感染事例について報告する。

#### 事例概要

##### 1. 職場内感染事例

初発患者は50歳代後半の男性で、2005年6月に職場健診のX線所見から精密検査を勧められ、その頃から咳嗽の症状がみられたがそのまま放置した。約1年後に医療機関を受診し、塗抹検査はG9、PCR検査は陽性で、結核と診断され入院となり、接触者健診が、初発患者の家族および同じ階で働く職場同僚に対して

実施された。職場同僚の接触者健診は、結核感染を疑う例は見られなかった。しかし、4ヶ月後初発患者との接点がほとんど無いと判断され、当初の接触者健診の対象外であった職場同僚から1人目の結核患者が発生し、さらに、1ヶ月後に2人目の患者が発生した。そこで、改めて職場同僚全員を対象とした接触者健診が実施された。

##### 2. 病院内感染事例

県内某病院(310病床、高齢者の長期入院患者が多い)で、2004年~2007年までの4年間に6名の入院患者が結核を発症し、ついで2008年には2名の入院患者が同時期に発症した。病院は院内感染を疑い対策委員会を設置し、入院患者(退院患者も含む)および医療従事者等425名の接触者健診を実施した。QFT検査は院内感染疑いのため病院が民間検査機関で実施し、QFT検査結果(412名)は、陽性64名、判定保留42名、陰性301名、判定不能5名であった。

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)第12条第1項に基づく届出<sup>1)</sup>により結核医療の必要がある潜在性結核感染症を無症状病原体保有者として届けることとなった。本事例が、集団感染として2008年9月厚労省に報告された時点の潜在性結核感染症患者は46名の届出であったが、その後、93名に増加し、治療としての投薬が実施された。健診により7名の要精検者がみつきり、その中から1名が発症し、合計9名の患者が発生した。

#### 方 法

##### 1. QFT 検査

接触者健診で結核感染を疑う被験者より採血し、クオンティフェロン®TB-2G(日本ビーシージーサプライ)を用いて所定の方法<sup>2)</sup>に従い実施した。職場内感染事例のQFT検査を家族3名および職場同僚52名について実施した。

##### 2. 遺伝子型別

患者から分離された結核菌株を供試し、Variable Numbers of Tandem Repeats(VNTR)法およびRestriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)法による遺伝子型別を実施した。供試菌株は、職場内感染事例の2株および院内感染事例の6株を用いた。

VNTR法による遺伝子解析は、結核菌のDNA抽出をインスタジーンマトリックス(バイオラッド)を用いて行い、解析領域はETRの6領域(A, B, C, D, E, F), MIRUの10領域(2, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 39, 40)および追加解析領域としてMtub21, Mtub31, QUB11a, QUB11b, QUB18, VNTR3232,

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  
chieko.vvme@pref.kanagawa.jp

2 企画情報部

VNTR4156c の 7 領域を加えた計23領域とした<sup>3)</sup>。各領域を PCR 増幅後、増幅産物のアガロースゲル電気泳動を行い、産物サイズの大きさから繰り返し塩基の反復数を求めた<sup>4)</sup>。

RFLP 法による遺伝子解析は結核菌の DNA 抽出をアイソプラント (ニッポンジーン) で行い、その後の操作は既法<sup>5)</sup>に従った。結核菌 DNA を制限酵素 *Pvu* II で消化後、アガロースゲル電気泳動、ナイロンメンブレンへの転写および UV 固定を行った後、ハイブリダイゼーションを実施した。DNA 断片の検出には *IS6110* プロンプを用いた。

結果および考察

1. 職場内感染事例

1-1 QFT 検査

初発患者の家族 3 名の QFT 検査結果は、陽性 1 名、判定保留 2 名で、初感染結核として取り扱い予防内服 (2006 年当時) が実施された。初回の職場同僚の接触者健診 (17 名) については、結核感染を疑う例は見られなかったため、QFT 検査は行わなかった。しかし、その後、2 名の続発患者が発生した。そこで、改めて職場同僚全員 (52 名: 24~61 歳) を対象とした接触者健診を実施し、ツベルクリン反応 (ツ反) 最大発赤径が 30mm 以上、硬結や 2 重発赤を指標とし、接触度合いも条件に、16 名について QFT 検査を実施した。その結果、陽性 4 名、判定保留 3 名、陰性 9 名であった。陽性率が高かったため、残り 36 名についても検査し、陽性 4 名、判定保留 2 名、陰性 30 名となり、合計では陽性 8 名 (35~61 歳)、判定保留 5 名 (50~57 歳)、陰性 39 名であった。

性であった。これらのツ反発赤径 30mm 以上 QFT 陰性例は BCG 接種の影響を受けていると判断され不要の予防内服を防ぐことができた。ツ反は BCG 接種の影響を受けるため、結核の感染を正確に反映していないことを示すものと思われる。一方で、ツ反発赤径 29mm 以下を示した 44 名の内 QFT 陽性 6 名、判定保留 4 名が含まれており、結核感染を疑うと判定され、ツ反では見逃された予防内服対象者を発見することができた。しかし、QFT 陽性および判定保留であった 13 名の内 9 名が 50 歳以上であり、過去の感染をみている可能性も否定できないが、中高齢者であっても結核発病の高危険因子 (免疫抑制剤使用・糖尿病など) を有する場合は QFT 検査を行い、陽性を示し予防内服となる場合は症状や画像所見の有無等を考慮し総合的に判定する必要があると思われた。今回の事例では、QFT 陽性率が高く、続発患者も発生したことから、QFT 陽性者および判定保留者 (13 名) のうち承諾が得られた 12 名に予防内服が行われた。

感染症法に基づく結核接触者健康診断の手引き (改訂第 3 版)<sup>6)</sup> によると、接触者健診の対象集団が大きい場合はツ反の発赤径 20mm 以上の人に QFT 検査を実施し、QFT 陽性率が明らかに高い場合には 10mm 以上に杵を拡大して行う方式も考えるべきと記載されている。今回の事例ではツ反が 10mm 未満には QFT 陽性者はみられなかった。

1-2 遺伝子型別

初発患者と続発した患者 2 名の内 1 名から分離された結核菌 2 株について、VNTR 法および RFLP 法による遺伝子型別を実施し、それぞれの解析パターンは一致したため (図 2)、同一結核菌による感染であることが確認できた。この結果より、集団感染であることが判明し、厚生労働省に報告された。

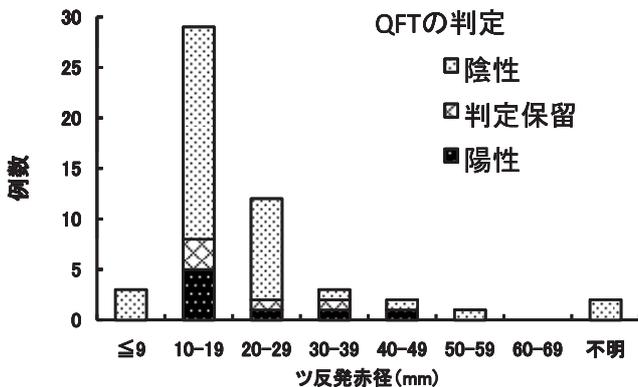


図 1 事例 1 における QFT とツ反発赤径

ツ反発赤径と QFT 検査結果を比較してみると (図 1)、従来のツ反の判定では予防内服の対象となるツ反発赤径 30mm 以上を示した 6 名の内 3 名が QFT 陰

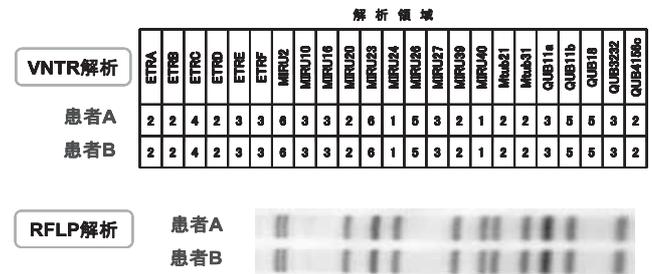


図 2 事例 1 における分離結核菌 (2 株) の遺伝子型別結果

続発患者は、当初の健診時には初発患者との接触度合いが低かったことから、対象外となっていたが、初発患者は発症してから長期間治療していなかったこと、

家族全員が予防内服になったことなどを考え合わせると、他にも発見されていない隠れた感染経路がある可能性が考えられた。

2. 病院内感染事例

遺伝子型別

結核を発症した9名のうち、6名から分離された結核菌株について、VNTR法およびRFLP法による遺伝子型別を実施した。その結果、VNTR法では、23解析領域の全ての反復数が一致した。RFLP法での解析パターンは、患者C、E、FおよびG由来の株は同一パターンを示したが、患者DおよびH由来の2株においてバンド1本の違いがみられた(図3)。RFLP法はVNTR法に比べ安定性が低く、短時間でバンドに変異が見られる<sup>7)</sup>ため、この2株のRFLP法での1本のバンドの違いは変異によるものと考えられた。この病院は高齢者が多く入院しており、遺伝子型別を行った6名(59~74歳)も中高齢者であり、過去の感染による再発(再燃)ではないかと考えられたが、VNTR法の遺伝子型別により、6名は、同一結核菌による感染であることが確認された。

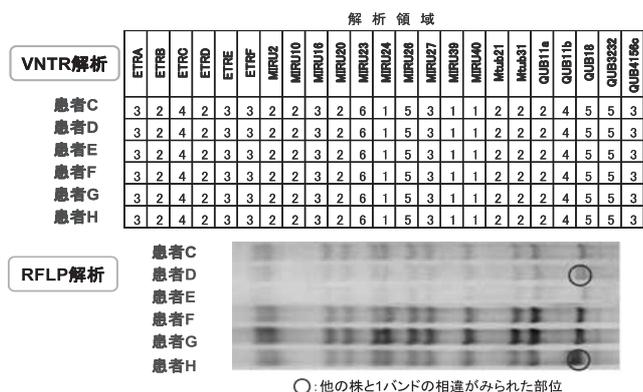


図3 事例2における分離結核菌(6株)の遺伝子型別結果

今回の2事例における患者は、それぞれVNTR法での解析により同一菌による感染であると判断された。一般的にRFLP法はVNTR法に比べ型別能が高い<sup>8)</sup>が、変異する時間が速くVNTR法に比べて安定性が低い。加えて、VNTR法は結果が数値化されるので、データベース作成にはVNTR法がRFLP法より有用であると思われた。

結核集団感染事例においては結核感染の広がりや感染経路を迅速かつ正確に把握することが重要で、そのためには、保健福祉事務所、病院および健康増進課など関係機関との密接な連携を図りながら、より効率的な接触者健診を進める必要がある。当所では、迅速・

簡便な遺伝子型別法であるVNTR法を早くから導入し、従来法のRFLP法と比較しながら、型別精度の向上を図ってきた。既に、いくつかの結核感染事例においてVNTR法を利用している。

今後、結核感染事例の接触者健診におけるQFT検査および感染症法で定める積極的疫学調査に基づく結核菌分離株の遺伝子型別を積極的に進める必要があると思われる。その中で、結核感染の実態を迅速かつ正確に把握して、感染拡大を防止し、さらに、結核菌遺伝子型のデータベース構築により、地域における結核伝播状況の把握および隠れた感染経路の発見も可能になるとと思われる。

謝 辞

今回の調査にあたり、ご協力いただきました県健康増進課および関係保健福祉事務所保健予防課の方々に深謝します。

(平成21年8月11日受理)

参考文献

- 1) 日本結核病学会予防委員会：クオンティフェロン<sup>®</sup> TB-2Gの使用指針，結核，81，393-397(2006)
- 2) 高橋智恵子，富岡敏昭，綿貫祐司，西森 敬，岡崎則男：VNTR法を利用した結核菌の遺伝子型別，神奈川衛研報告，36，4-7(2006)
- 3) 西森 敬，内田郁夫，田中 聖，西森知子，今井邦俊，柏崎佳人ほか：VNTR(Variable Number of Tandem Repeats)型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル，動衛研研究報告，109，25-32(2003)
- 4) Takahashi, M., Y. Kazumi, Y. Fukasawa, K. Hirano, T. Mori, W. Dale et al.: Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates, Microbiol. Immunol., 37, 289-294 (1993)
- 5) 石川信克：感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引き，改訂第3版，pp. 11-13，東京(2008)
- 6) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知：感染症法の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第12条第1項に基づく届出の基準等の一部改正について，平成19年6月7日付け健感発第0308001号
- 7) 森 亨：地域分子疫学の結核対策への応用，資料と展望，51，45-57(2004)
- 8) 高橋光良：結核症の分子疫学，呼吸器科，7，76-94(2005)

## 短報

### 凍結鶏肉からのカンピロバクター検出の ための選択培地に関する検討

伊達佳美, 浅井良夫, 古川一郎, 相川勝弘

#### Selective Media for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Frozen Chicken

Yoshimi DATE, Yoshio ASAI, Ichiro FURUKAWA  
and Katsuhiro AIKAWA

#### はじめに

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni* /*coli*) を原因とする食中毒は、近年、我が国の食中毒の発生件数の上位を占めるが、その約9割が原因食品不明事例である。(厚生労働省：平成16-20年食中毒発生事例より)。その理由の一つとして、カンピロバクターは、凍結・解凍によりその生残性が著しく減少するため、凍結保存されることの多い検食からの分離が困難であることが知られている<sup>1) 2)</sup>。

食品における分布では、鶏肉のカンピロバクターの汚染率は非常に高く、分離されるほとんどが *C. jejuni*<sup>3)</sup> である。市販鶏肉のうち、輸入鶏肉は冷凍で流通しており、主に生で流通している国産鶏肉に比べてカンピロバクターの汚染率および菌数は低い<sup>4)</sup>。検出結果に影響を与える要因として、流通形態の違いや凍結の有無が重要であり、検体の状況に応じた培地の選択で結果が異なると想定される。食品中のカンピロバクター分離には、選択増菌培地として、国内では Preston 培地が汎用されている<sup>5)</sup>。この培地には発育サプリメントが添加されるが、これにはピルビン酸やメタ重亜硫酸ナトリウムのような発育を支持する因子が含まれる。一方、国際標準化機構 (ISO) では Bolton 培地が採用されており<sup>6)</sup>、この培地には発育を支持する因子が多く含まれている。これら発育支持因子が含まれた Preston 培地や Bolton 培地はいずれも菌の損傷が予想される食品に対して有効であるとされているが、検体の状況と組み合わせる培地により、検出さ

れる菌種や菌数が異なることが予想される。

そこで、菌種における Preston 培地と Bolton 培地での発育態度の違いや、凍結による影響を確認する目的で、*C. jejuni* と *C. coli* について、温度勾配培養装置を用いて発育状況を確認した。また、検体の状況(冷蔵・冷凍)に適した培養法の検討のため、市販鶏肉を用いて選択増菌培地と分離平板培地を組合せ、培地の組合せごとに *C. jejuni* と *C. coli* の検出率と菌数を比較した。

#### 材料および方法

##### 1. 温度勾配培養装置を用いた菌接種試験

##### 1) 供試菌株

供試菌株は、*C. jejuni* 3株 (ATCC33560, EK07-086, EK07-074,) および *C. coli* 3株 (ATCC 43478, EK07-250, EK07-228) 計6株を使用した。

##### 2) 試験菌液の調製

凍結保存された各供試菌株を血液寒天培地に塗抹し、42℃ 2日間微好気培養後、典型的な集落を BHI broth (DIFCO) 10ml に接種し、37℃ 24時間微好気培養したものを「未凍結」試験菌液とした。また、「未凍結」試験菌液を -20℃ で1日、4日間凍結したものをそれぞれ「1日凍結」、「4日凍結」試験菌液とした。これらの試験菌液を0.1%ペプトン加生理食塩水で段階希釈し、血液寒天培地にて37℃ 48時間微好気培養し、菌数を計測した。

##### 3) 温度勾配培養装置における発育の確認

増菌培地の選択性が無い状態での発育を確認するため、選択サプリメント無添加の Preston 培地 (カンピロバクター発育サプリメント [Oxoid SR084] 加ニュートリエントブロス No.2 [Oxoid CM067]) と Bolton 培地 (ボルトンブイヨン [Oxoid CM983]) を用い、また、各培地に添加される選択サプリメントの影響を確認するため、前記抗生物質無添加 Preston 培地にプレストンカンピロバクター選択サプリメント [Oxoid SR117] を添加した Preston 培地とボルトンブイヨンにボルトン選択サプリメント [Oxoid SR208] を加えた Bolton 培地を用いた。

「未凍結」、「1日凍結」および「4日凍結」試験菌液それぞれについて、選択増菌培地10ml 入りの L 字型培養管に100μl ずつ接種し、微好気混合ガス噴入後ゴム栓をし、振盪温度勾配培養装置 TVS126MA (アドバンテック東洋) を用いて42℃ 48時間60rpm で振盪培養し、660nm における吸光度を1時間ごとに自動測定した。培養開始の OD を0.00、1時間ごとの測定において OD が0.02以上を示し、かつ次の測定

時の OD が0.005以上上昇したときの時間をその菌株の発育開始時間とした。

## 2. 市販鶏肉におけるカンピロバクターの検出

### 1) 供試材料

平成19年6月から平成20年10月に、県域の小売店で販売されていた国産生鶏肉31検体、国産冷凍鶏肉6検体、輸入冷凍鶏肉31検体、計68検体を用いた。

### 2) 試験原液の作製

試験原液の作製と定量試験に用いた選択増菌培地は、5%馬脱繊維血液と選択サプリメントを添加したものを使用した。各検体について、鶏肉の皮部分25gずつを2枚のストマッカー袋に量り取り、一方にPreston培地、もう一方にBolton培地を各100ml加え、1分間ストマッキングし、5倍乳剤（試験原液）を作製した。

### 3) 最確数（MPN）3本法による定量試験

試験原液と、試験原液をPreston培地あるいはBolton培地で希釈した10倍段階希釈液（10倍～1000倍）を3本ずつ作製し、42℃24時間微好気培養した。それぞれの培養液の1白金耳をmCCDA培地（CCDAサプリメント〔Oxoid SR115〕加カンピロバクター血液無添加選択培地〔Oxoid CM739〕およびPreston平板培地（プレストンカンピロバクター選択サプリメント〔Oxoid SR117〕および5%馬脱繊維血液加カンピロバクター寒天基礎培地〔Oxoid CM689〕）に塗抹し、42℃48時間微好気培養した。培地の組合せを表1に示す。各分離平板培地に発育した疑わしい集落を1平板あたり1～3集落釣菌し、常法に従いカンピロバクターの同定を行った。各検体について、*C. jejuni*あるいは*C. coli*が検出されたものをその菌種の陽性とした。また、MPN法の同じ希釈段階3本のうち、いずれかで検出された場合、その希釈段階での陽性とした。定量試験では、各段階希釈における試験管のカンピロバクターの陽性本数を最確数表にあてはめ、検体100g当たりのMPN値を求めた。

表1 選択増菌培地と分離平板培地の組合せ

培地の組合	選択増菌培地	分離平板培地
BC	<b>Bolton</b> 培地	mCCDA培地
BP	<b>Bolton</b> 培地	<b>Preston</b> 平板培地
PC	<b>Preston</b> 培地	mCCDA培地
PP	<b>Preston</b> 培地	<b>Preston</b> 平板培地

\*選択増菌培地は全て5%馬脱繊維血液加・選択サプリメント添加

## 結 果

### 1. カンピロバクターの選択増菌培地における発育態度と凍結による影響

#### 42℃における各試験菌液の発育

試験菌液の菌数測定の結果を図1に示す。「未凍結」ではいずれの菌株でも $10^7$ CFU/mlレベル、「1日凍結」は $10^5$ CFU/mlレベル、「4日凍結」は*C. jejuni*が $10^3\sim 10^4$ CFU/mlレベル、*C. coli*が $10^2\sim 10^3$ CFU/mlレベルと、凍結期間が長いほど菌数が低下する傾向がみられた。

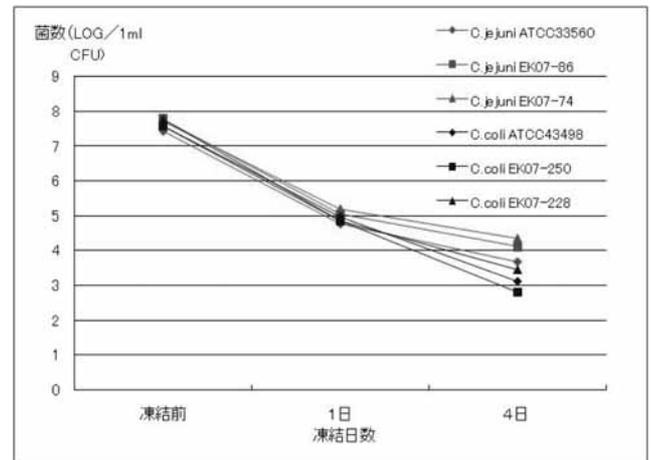


図1 凍結（-20℃）における菌液の保存日数と菌数の推移

Preston培地およびBolton培地の42℃における各試験菌液の発育開始時間を表2に示す。6株の「未凍結」試験菌液を、選択サプリメント無添加培地で培養した場合、菌株により発育開始時間に差がみられたが、培地による差はなかった。選択サプリメント添加により、Preston培地では*C. coli*3株と*C. jejuni*1株（ATCC33560）の発育開始時間が遅延したが、Bolton培地では差がみられなかった。

一方、試験菌液の凍結により、全ての株の発育開始時間が遅延もしくは発育不能となった。Preston培地では選択サプリメント添加により発育開始時間に影響しなかったのは*C. jejuni*2株（EK07-74, EK07-86）のみで、他の4株は、「1日凍結」で発育開始時間が大幅に遅延もしくは発育不能となり、「4日凍結」では選択サプリメント無添加培地でも2株が、選択サプリメント添加によりさらに2株が発育不能となった。Bolton培地では、*C. jejuni*1株（ATCC33560）の「4日凍結」で発育開始時間が遅延したが、他の5株は選択サプリメント添加の有無による発育開始時間の差はみられず、発育不能となる株もなかった。

表2 42℃における試験菌液の発育開始時間

菌株番号	未凍結試験菌液(発育開始時間:h)				凍結試験菌液(発育開始時間:h)							
	Bolton培地		Preston培地		1日凍結				4日凍結			
	選択サプリメント		選択サプリメント		Bolton培地		Preston培地		Bolton培地		Preston培地	
	無	添加	無	添加	無	添加	無	添加	無	添加	無	添加
<i>C.coli</i> ATCC43478	6	8	6	26	16	16	21	40	19	19	24	NG
<i>C.coli</i> EK07-250	5	6	6	38	19	19	24	NG	21	21	28	NG
<i>C.coli</i> EK07-228	6	6	6	20	15	16	32	NG	19	19	NG	NG
<i>C.jejuni</i> ATCC33560	11	13	11	22	31	32	29	36	34	47	NG	NG
<i>C.jejuni</i> EK07-86	8	8	7	7	17	17	17	17	21	21	23	24
<i>C.jejuni</i> EK07-74	7	7	7	7	14	14	16	17	15	15	20	20

NG:no growth

2. 培地の組合せによる市販鶏肉からのカンピロバクターの分離状況

1) 各希釈段階における分離状況

検体の状態別の各希釈段階におけるカンピロバクターの分離状況を表3に示す。生鶏肉からの検出率は、*C. jejuni* 67.7% (21/31検体)、*C. coli* 19.4% (6/31検体)、冷凍鶏肉からの検出率は、*C. jejuni* 48.6% (18/37検体)、*C. coli* 35.1% (13/37検体)であった。培地の組合せ別では、生鶏肉から *C. jejuni* の検出率が最も高かったのはPPで64.5% (20/31検体)であったが、*C. coli* は、いずれの組合せでも同じく16.1% (5/31検体)であった。冷凍鶏肉からは選択増菌培地がPreston培地の場合 *C. jejuni*、Bolton培地の場合 *C. coli* の検出率が高い傾向を示したが、いずれも大きな差はみられなかった。培地の組合せ別の陽性検体数をみると、カンピロバクターは主に試験原液から検出されているが、BCの組合せ、特に生鶏肉では試験原液からの検出は少なく、*C. jejuni* の61.1% (11/18検体)、*C. coli* の60.0% (3/5検体)が段階希釈液からの検出であった。

表3 市販鶏肉におけるカンピロバクターの分離状況

検体の状態(検体数)	分離菌株	陽性検体数(検出率%)	培地組合せ*	陽性検体数				
				試験原液(×5)	×10 <sup>-1</sup> (×50)	×10 <sup>-2</sup> (×500)	×10 <sup>-3</sup> (×5000)	
生(31)	<i>C.jejuni</i>	21(67.7)	BC	18 (58.1)	7	18	11	4
			BP	17 (54.8)	15	13	8	3
			PC	18 (58.1)	17	16	8	4
			PP	20 (64.5)	20	13	5	4
			PP	5 (16.1)	2	4	4	0
<i>C.coli</i>	6(19.4)		BC	5 (16.1)	5	3	1	0
			BP	5 (16.1)	4	1	0	0
			PC	5 (16.1)	4	1	0	0
			PP	5 (16.1)	4	1	0	0
			PP	8 (21.6)	7	4	2	1
冷凍(37)	<i>C.jejuni</i>	18(48.6)	BP	10 (27.0)	8	3	1	0
			PC	13 (35.1)	11	5	1	1
			PP	12 (32.4)	11	2	0	0
			BC	11 (29.7)	7	8	3	0
			BP	9 (24.3)	7	5	3	0
<i>C.coli</i>	13(35.1)		PC	7 (18.9)	6	1	0	0
			PP	7 (18.9)	7	1	0	0

\*培地の組合せについては表1を参照

2) 培地の組合せによるカンピロバクターの菌数分布

MPN法による菌数分布を表4に示す。いずれの培地の組合せでも *C. jejuni* の陽性検体数および菌数

(MPN/100g)は、国産生鶏肉が輸入冷凍鶏肉よりも高い傾向を示した。国産生鶏肉の検出菌数が10<sup>3</sup>以上の組合せは、BC33.3% (6/18検体)、BP47.1% (8/17検体)、PC55.6% (10/18検体)、PP45% (9/20検体)で、輸入冷凍鶏肉はいずれの培地の組合せでも10<sup>3</sup>以下であった。一方、*C. coli* の陽性検体数は、輸入冷凍鶏肉が国産生鶏肉よりも多く、検出菌数は国産生鶏肉・輸入冷凍鶏肉ともにそのほとんどが10<sup>3</sup>以下であった。

表4 培地の組合せと菌数の分布

検出菌種	種類	保存状態(検体数)	培地の組合せ*	陽性検体数	菌数(MPN/100g)			
					>15-10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>
<i>C.jejuni</i>	国産	生(31)	BC	18	4	8	4	2
			BP	17	7	2	6	2
			PC	18	2	6	7	3
			PP	20	8	3	8	1
			BC	2	0	0	2	0
			BP	0	0	0	0	0
	輸入	冷凍(31)	PC	2	0	1	1	0
			PP	0	0	0	0	0
			BC	6	5	1	0	0
			BP	10	7	3	0	0
			PC	11	8	3	0	0
			PP	12	8	4	0	0
<i>C.coli</i>	国産	生(31)	BC	5	3	2	0	0
			BP	5	1	2	2	0
			PC	5	3	2	0	0
			PP	5	4	1	0	0
			BC	2	2	0	0	0
			BP	0	0	0	0	0
	輸入	冷凍(31)	PC	0	0	0	0	0
			PP	0	0	0	0	0
			BC	9	4	4	1	0
			BP	9	5	3	1	0
			PC	7	6	1	0	0
			PP	7	6	0	1	0

\*培地の組合せについては表1を参照

考 察

本実験では、従来から使用されているPreston培地と日本で標準検査法への導入が検討されているBolton培地の培地成分や選択サプリメントが、*C. jejuni* と *C. coli* の発育にどのような影響を与えるのか、温度勾配培養装置を用いて検証した。その結果、*C. coli* はPreston培地に添加する選択サプリメントで発育が抑制されるが、Bolton培地では影響を受けないことが示された。選択サプリメントには、数種の抗生物質が含まれており、Preston培地はポリミキシンB・

リファンピシン・トリメトプリム・シクロヘキシミド、Bolton 培地はセフォペラゾン・バンコマイシン・トリメトプリム・アンフォテリシン B で、Preston 培地の選択サプリメントの成分またはその組合せに *C. coli* が感受性をもち、検出されにくい可能性が考えられた。

試験菌液の凍結により、全ての菌株の発育に影響がみられたが、菌の死滅による菌数の減少か、あるいは菌が損傷しその回復に時間を要したのか、いずれかを判断することは困難であった。しかし、選択サプリメント無添加培地の発育において、Preston 培地では発育不可能な菌株がみられたが Bolton 培地では全て発育したことから、凍結による損傷菌の培養には Preston 培地より Bolton 培地が優れていると考えられた。

一方、市販鶏肉のカンピロバクターの分離状況では、培地の組合せによる検出率に大きな差はみられなかった。検体が生の場合、Preston 培地では夾雑菌の発育が少なく、カンピロバクターの分離がいずれの分離平板培地でも容易であったが、Bolton 培地と mCCDA 培地との組合せでは、試験原液からは夾雑菌の発育によりカンピロバクターが分離されず段階希釈液からの分離が多かったことから、この組合せでは試験原液の希釈が必要であろう。冷凍鶏肉の場合、全体の検出率に対して、個々の培地の組合せによる検出率が低く(表 3)、また、特定の組合せが優れているという結果は得られなかった。冷凍により菌が死滅もしくは損傷し、発育可能な菌が減少したため、あるいは冷凍の条件により菌株の損傷度が異なるため、数種類の選択増菌培地で培養することで全体の検出率が高くなったと考えられる。輸入鶏肉は、冷凍で流通しているため国産鶏肉よりもカンピロバクターの検出率が低いとされているが、今回の検討では *C. coli* の検出率は国産鶏肉よりも高く、菌数も同レベルであった。鶏肉の冷凍前の菌数 (MPN/100g) が  $10^3$  レベル以上の場合には 90% 以上で菌の生存が認められることから<sup>3)</sup>、冷凍前の

輸入鶏肉の *C. coli* による汚染率や菌数は、国産鶏肉よりも高い可能性が考えられた。国内での感染事例では、臨床で分離されるカンピロバクターのほとんどが *C. jejuni* のため、食品からのカンピロバクターの検出に関する検討は *C. jejuni* を対象としたものが主であるが、海外渡航者からは国内よりも *C. coli* の分離率が高いとの報告もあり<sup>3)</sup>、*C. coli* の検出の動向にも注目すべきと考える。

今回の実験から、カンピロバクターの検査の際、菌種によって培地を使い分ける必要があり、凍結サンプルの場合は従来の Preston 培地に加え Bolton 培地を併用すべきと考える。検体の保存状況や損傷菌を考慮した検査方法を採用することで検出率の上昇が期待できるとともに、原因不明となる食中毒事例の減少に寄与するものと考えられる。

(平成21年8月11日受理)

## 文 献

- 1) 品川邦汎：カンピロバクター食中毒の発生とその対応，日本食品微生物学会誌，23(3)，124-128 (2006)
- 2) 三澤尚明：増加傾向にあるカンピロバクター食中毒について，食品衛生研究，56(8)，9-16，(2006)
- 3) 坂崎利一編集：新訂 食水系感染症と細菌性食中毒，pp. 336-355，中央法規出版，東京 (2000)
- 4) 小野一晃・安藤陽子・川森文彦・尾関由姫恵・柳川敬子：冷凍保存鶏肉における *Campylobacter jejuni* の生存性とパルスフィールド・ゲル電気泳動法による分離菌株の遺伝子解析，日本食品微生物学会誌，22 (2)，59-65 (2005)
- 5) 伊藤 武：食品衛生検査指針 微生物編，pp. 225-235，(社)日本食品衛生協会，東京 (2004)
- 6) ISO10272-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.

## 短報

### 食品中で発見された種子様異物の 鑑定について

大森清美, 岸 弘子, 藤巻照久

#### Analytical method on the discrimination of a foreign matter looked like a seed in food.

Kiyomi OHMORI, Hiroko KISHI  
and Teruhisa FUJIMAKI

#### はじめに

異物試験は、通常、目視および実体顕微鏡などを用いた形態観察の後に、理化学試験として、赤外分光光度計を用いた有機物等の分析ならびに蛍光 X 線分析装置を用いた無機元素等の分析が行われる<sup>1,2)</sup>。しかし、形態観察により動物由来もしくは植物由来の一部であることが疑われ、さらに異物が微小である場合には、生物種に特異的な成分を分析し、種の特定を行うことは極めて困難となる。そのような場合、種の特定に結びつく特徴的な器官、組織および細胞等を観察することにより生物種の鑑別を行うことになる。しかしながら、その手法により鑑別を行うためには、豊富な知識と経験を要するとともに、異物の状態として、種の特定につながる特徴的な形態が保持されていることが必須条件となる。一方、近年、目覚ましく発展した遺伝子増幅反応 (PCR) 法では、試料が微小である場合、また形態が保持されていない場合でも、PCR で増幅可能な DNA が採取され、種に特異的な DNA 配列を増幅するプライマーなどの適切な PCR 条件が決定されれば、客観的に種の鑑定を行うことができる。厚生労働省の食品検査に係る通知試験法においても PCR 法が採用されており、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(食安発第0618001号, 平成20年6月18日)、「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」(食安監発0220001号, 平成19年2月20日) および「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食安発第0122001号, 平成21年1月22日) では、種に特異的な DNA 配列を PCR 法により検出する方

法が用いられている。これらの試験法は、異物試験における種の鑑別法としても応用が可能であると考えられる。実際に平成20年度には、当所での異物試験において PCR 法により種の鑑別を行った事例があった。異物は、苦情者が食品を喫食中に発見した一粒の種子様異物であり、苦情者が在住する県の衛生研究所では、形態観察により「トマトの種子」に類似している結果が得られていたが、「トマト」であることの鑑別には至っていなかった。本県では、種の特定を植物の専門家に依頼した。しかし、形態観察のみにより「トマト」であることを同定することは不可能との回答であったことから、当所において、PCR 法を用いることにより、異物が「トマト」に由来する物質であることの証明を試みた。本報では、その事例における検討事項および試験結果について報告する。

#### 材料および方法

##### 1. 異物および対照品

異物：発酵乳 (ヨーグルト) を喫食中に発見された種子様異物 (図 1 a)。

対照品 1 : トマト栽培用種子 (図 1 b)。

対照品 2 : トマト青果から採取した種子 (トマト青果種子, 図 1 c)。

対照品 3 : ピーマン青果から採取した種子 (ピーマン青果種子, 図 1 d)。

対照品 4 : ナス青果から採取した種子 (ナス青果種子, 図 1 e)。

対照品 5 : シシトウ青果から採取した種子 (シシトウ青果種子, 図 1 f)。

対照品 6 : キュウリ青果から採取した種子 (キュウリ青果種子, 図 1 g)。

上記のトマト栽培用種子は、神奈川県立かながわ農業アカデミーより譲渡を受けた。また、トマト青果は、自家栽培の完熟トマトを使用し、ピーマン、ナス、シシトウおよびキュウリは、横浜市内の青果店から購入したものをを用いた。

##### 2. 方法

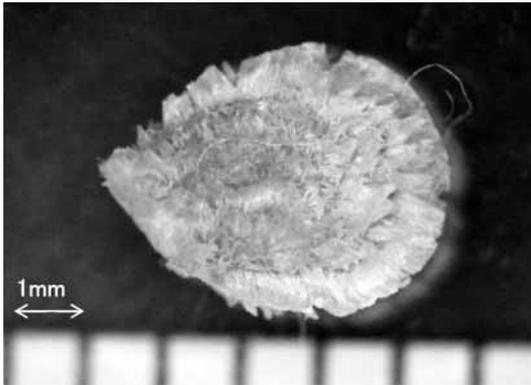
###### (1) 形態観察

異物および対照品について、肉眼および実体顕微鏡 (SZX9, オリンパス社製) を用いて観察を行った。

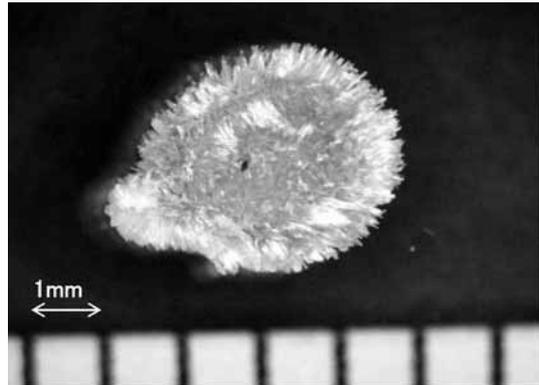
###### (2) PCR 法による植物 DNA およびトマト DNA の検出

GM quicker 2 (ニッポンジーン社製) プロトコール、「ナタネ一粒からの DNA 抽出」を参考とし、より高濃度な DNA 試料原液を得るために、65℃での抽

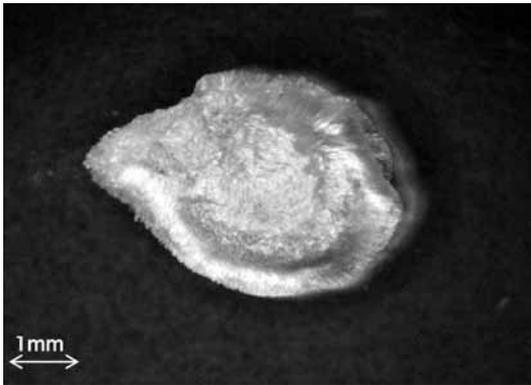
a. 異物



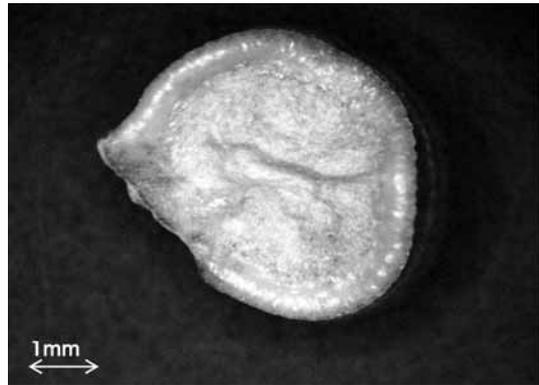
b. 対照品 1 : トマト栽培用種子



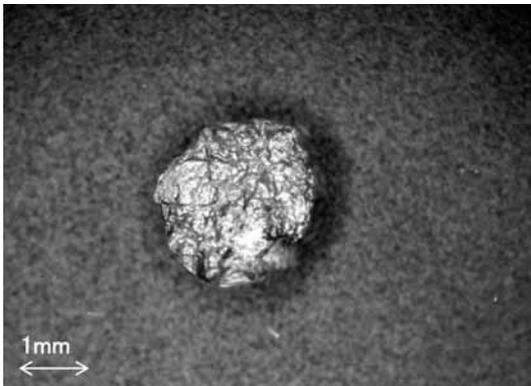
c. 対照品 2 : トマト青果種子



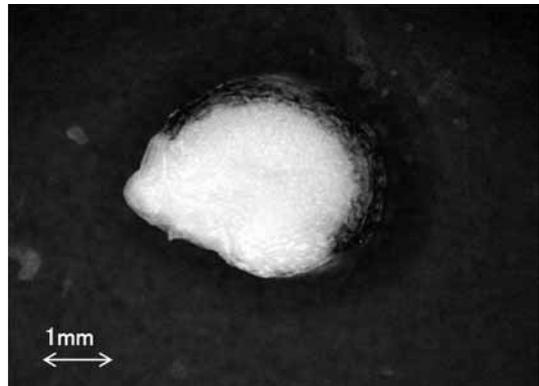
d. 対照品 3 : ピーマン青果種子



e. 対照品 4 : ナス青果種子



f. 対照品 5 : シシトウ青果種子



g. 対照品 6 : キュウリ青果種子

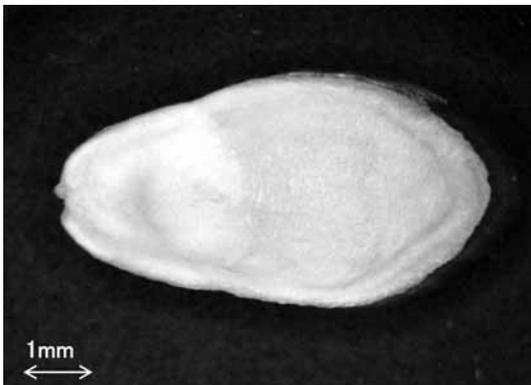


図 1 異物および対照品の実体顕微鏡像

出時間を15分から30分に延長した。異物および対照品から DNA の抽出精製は、以下のとおり行った。異物は、滅菌水1.5ml で10回洗浄し、250 $\mu$ l の GE 1 Buffer を加えてよくすりつぶした。10 $\mu$ l の Proteinase K, 2  $\mu$ l の  $\alpha$ -Amylase, 5 $\mu$ l の RNase A をそれぞれ添加し、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌した。30分間、65 $^{\circ}$ C で加温した後、40 $\mu$ l の GE 2 -K Buffer を添加しよく混和した。以下、GM quicker 2 プロトコル、「ナタネ一粒からの DNA 抽出」に従った。対照品は、滅菌水1.5ml で5回洗浄し、以下、異物と同様に DNA の抽出精製を行った。トマト栽培用種子およびトマト青果種子については、それぞれ1粒から DNA の抽出精製を行い、ピーマン青果種子については5粒、ナス青果種子については10粒から DNA の抽出精製を行った。得られた DNA 試料原液は、DNA の濃度および純度 (260nm/280nm 吸光度比) を測定後、10ng/ $\mu$ l に TE 緩衝液で希釈し、PCR に用いる DNA 試料液とした。DNA 試料原液が10ng/ $\mu$ l に満たないものについては、原液のまま PCR に用いた。PCR プライマー、PCR 反応組成および PCR 条件を次ぎに記す。

植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対は、「アレルギー物質を含む食品の検査法について(一部改正)」(食安発第0122001号, 平成21年1月22日)に掲載されているプライマー配列に従った。なお、PCR 増幅 DNA の長さは124bp である。

トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対 (Lat 1 および Lat 2)<sup>3)</sup> は以下のとおりであり、PCR 増幅 DNA の長さは92bp である。

F-primer (Lat 1) : 5' - AGA CCA CGA GAA CGA TAT TTG C - 3'

R-primer (Lat 2) : 5' - TTC TTG CCT TTT CAT ATC CAG ACA - 3'

PCR 反応液の組成および PCR 条件は、植物 DNA 検出用プライマー対およびトマト DNA 検出用プライマー対ともに、「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」(食安監発0220001号, 平成19年2月20日)の Bt コメ検出用プライマー対を用いた場合の条件に従った。PCR のブランク反応液として、プライマー対を加えないもの (プライマー (-)) 及び DNA 試料液を加えないもの (DNA (-)) についても同時に調製し、PCR 増幅を行った。

PCR 後の DNA 増幅産物は、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(食安発第0618001号, 平成20年6月18日), 2.1.1.2.1.2. アガロースゲル電気泳動に従い、3%アガロースゲルを用いて検出を行っ

た。

試薬類は PCR buffer II, dNTP, 塩化マグネシウム溶液, AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼはアプライドバイオシステムズジャパン(株), 植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対は(株)ベックスへの合成依頼品, トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対はアプライドバイオシステムズジャパン(株)への合成依頼品を用いた。

機器類は、DNA 濃度および純度の測定装置として NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologie (株)), 遺伝子増幅装置として GeneAmp PCR System9700 (アプライドバイオシステムズジャパン(株)), 電気泳動装置に Mupid ミニゲル泳動装置 (アドバンス(株)), ゲル撮影装置として BIOINSTRUMENT AE-6905H Image Saver HR (ATTO (株)), 遺伝子定量装置として ABI PRISM7900HT (Applied Biosystems (株)) を用いた。

### 結果および考察

異物は、長径約 4 mm 径の涙型の平板状物質であり、淡黄褐色を呈していた。表面には一面に細かい毛状形態が認められた (図 1 a)。トマト栽培用種子 (図 1 b) およびトマト青果から採取した種子 (図 1 c) も異物と同様の形態および色を呈し、表面には一面に細かい毛状形態が認められた。トマトと同様のナス科に属するピーマン、ナス、シシトウ、キュウリの青果から種子を採取し形態観察を行った結果、ピーマン青果種子については、大きさ、形態および色は異物と類似していたが、実体顕微鏡観察の結果、表面に毛状形態は認められなかった (図 1 d)。ナス青果種子、シシトウ青果種子およびキュウリ青果種子 (図 1 e, f および g) は、いずれも大きさおよび色ともにトマト種子とは異なり、表面の毛状形態も認められなかった。よって、異物の形態および色は、ナス科の種子5種の中でトマトに極めて類似しており、他の4種の種子とは異なっていた。

さらに異物の特定を行うため、植物 DNA 検出用プライマー対およびトマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対を用いて、異物がトマト由来の物質であることの証明を行うこととした。その際、異物が一粒のみであり、繰り返し試験を行えないことから、まず、対照品 1 および 2 (トマト栽培用種子およびトマト青果種子) を用いて、それぞれトマト種子一粒から3抽出 (n = 3) で実験を行った。その結果、それらの DNA 試料原液の濃度は、トマト栽培用種子は4.7~6.8ng/ $\mu$ l, 青果種子は7.5~9.4ng/ $\mu$ l であった。純度の指標

とされる260nm/280nm 吸光度比は、260nm および280nm における吸光度が0.1以上の DNA 試料原液では、良好な精製状態の目安とされる1.7から2.0の範囲内にあった。また、いずれの DNA 試料原液についても濃度は10ng/μl 以下であったことから、原液をそのまま PCR 用 DNA 試料液とし、植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対およびトマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対を用いて PCR を行った。その結果、トマト青果および栽培用種子の各1粒から抽出精製された DNA 試料原液では、それぞれ3抽出とも CPO の124bp および Lat52の92bp の PCR 増幅バンドが検出され、植物特異的 DNA およびトマト特異的 DNA の PCR 増幅が可能な状態で DNA が抽出されていることが確認された (図2 a および図2 b)。

そこで、この DNA 抽出精製法を用いて、異物、対照品3および4 (ピーマン青果種子およびナス青果種子) から DNA を採取した。その際、試料を用いずに試薬のみで操作を行う抽出ブランクの調製も同時に行った。その結果、異物から得られた DNA 試料原液の濃度は、21ng/μl、260nm/280nm 吸光度比は1.9であった。また、ピーマン青果種子およびナス青果種子から得られた DNA 試料原液の濃度は、68および23 ng/μl、260nm/280nm 吸光度比は1.8および1.7であり、いずれも PCR 反応に供する DNA 試料原液として良好な値であった。これらの DNA 試料原液を10ng/μl に希釈した DNA 試料液と、前述の検討で得られた対照品1および2 (トマト栽培用種子およびトマト青果種子) の DNA 試料原液について、それぞれ植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対による PCR 増幅を行った (図3 a)。その結果、異物および対照品1~4 (トマト栽培用種子、トマト青果種子、ピーマン青果種子およびナス青果種子) から得られた DNA 試料液については、124bp 付近に植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対による明瞭な PCR 増幅バンドが検出され、異物および対照品1~4の DNA 試料液は、PCR 増幅が可能な状態の植物 DNA を含むことが示された。また、抽出ブランク、DNA (-) およびプライマー (-) では、124bp 付近に PCR 増幅バンドは検出されず、DNA 抽出精製および PCR 反応において植物 DNA 等のコンタミネーションが無いことも確認された。

次いで、トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対によるトマト DNA の検出ならびに Lat52検出用プライマーによる PCR 増幅の特異性について検討を行った。Litao らの報告では<sup>3)</sup>、Lat52検出用プライマー対の特異性として、16品種のトマトすべてにおいて92

bp の PCR 増幅バンドが検出され、大麦、綿実、トウモロコシ、米、菜種、小麦、ヒマワリ、大豆、ジャガイモ、唐辛子、コショウおよびタバコ等では PCR 増幅バンドは検出されないことが確認されている。しかし、同報告では、トマトが属するナス科の植物種子については、Lat52検出用プライマー対による PCR 増幅の特異性について検討が行われていない。そこで、異物および対照品1および2 (トマト栽培用種子およびトマト青果種子) の DNA 試料原液での Lat52検出用プライマー対による PCR と同時に、ナス科の植物種子における PCR 増幅の特異性検討として、ピーマンおよびナス青果から得られた DNA 試料液についても PCR を行った。その結果、Lat52検出用プライマー対による PCR 増幅バンド (92bp) は、異物および対照品1および2 (トマト栽培用種子およびトマト青果種子) のみで検出され、ピーマンおよびナス青果では検出されなかった。したがって、Lat52検出用プライマー対による PCR 増幅は、トマトに特異的な反応であることが確認され、異物はトマトに由来する物質であることが明らかとなった (図3 b)。その際、抽出ブランク、DNA (-) およびプライマー (-) では92bp 付近に PCR 増幅バンドは検出されず、DNA 抽出精製および PCR 反応におけるトマト DNA のコンタミネーションが無いことも確認された。

#### まとめ

発酵乳中で発見された種子様異物について、肉眼および実体顕微鏡により形態観察を行い、対照品1~4 (トマト栽培用種子、トマト青果種子、ピーマン青果種子およびナス青果種子) との比較を行った結果、大きさ、色、形および表面の毛状形態などの特徴から、異物はトマト種子に極めて類似していた。さらに、PCR 法により種の特特定を行うため、GM quicker 2を用いて DNA の抽出精製を行い、植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対およびトマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対により PCR 増幅を行った。その結果、異物はトマトに特異的な DNA を含むことが確認された。以上の形態観察および PCR 法による結果から総合的に判断し、異物はトマト種子であることが鑑定された。

#### 謝 辞

対照品として、栽培用のトマト種子を譲渡いただきました神奈川県立かながわ農業アカデミーに深謝いたします。

(平成21年8月11日受理)

a. 植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対

b. トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対

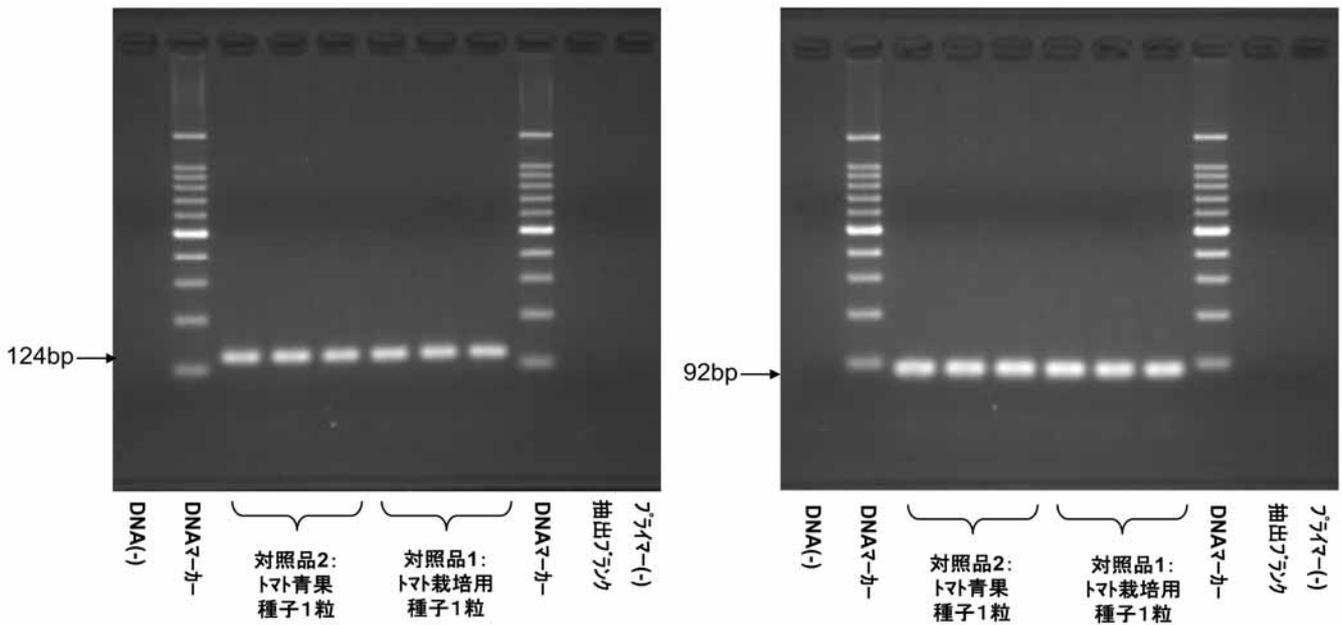


図2 1粒の種子からの植物 DNA (CPO) 検出およびトマト DNA (Lat52) 検出に関する検討結果

a. 植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対

b. トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対

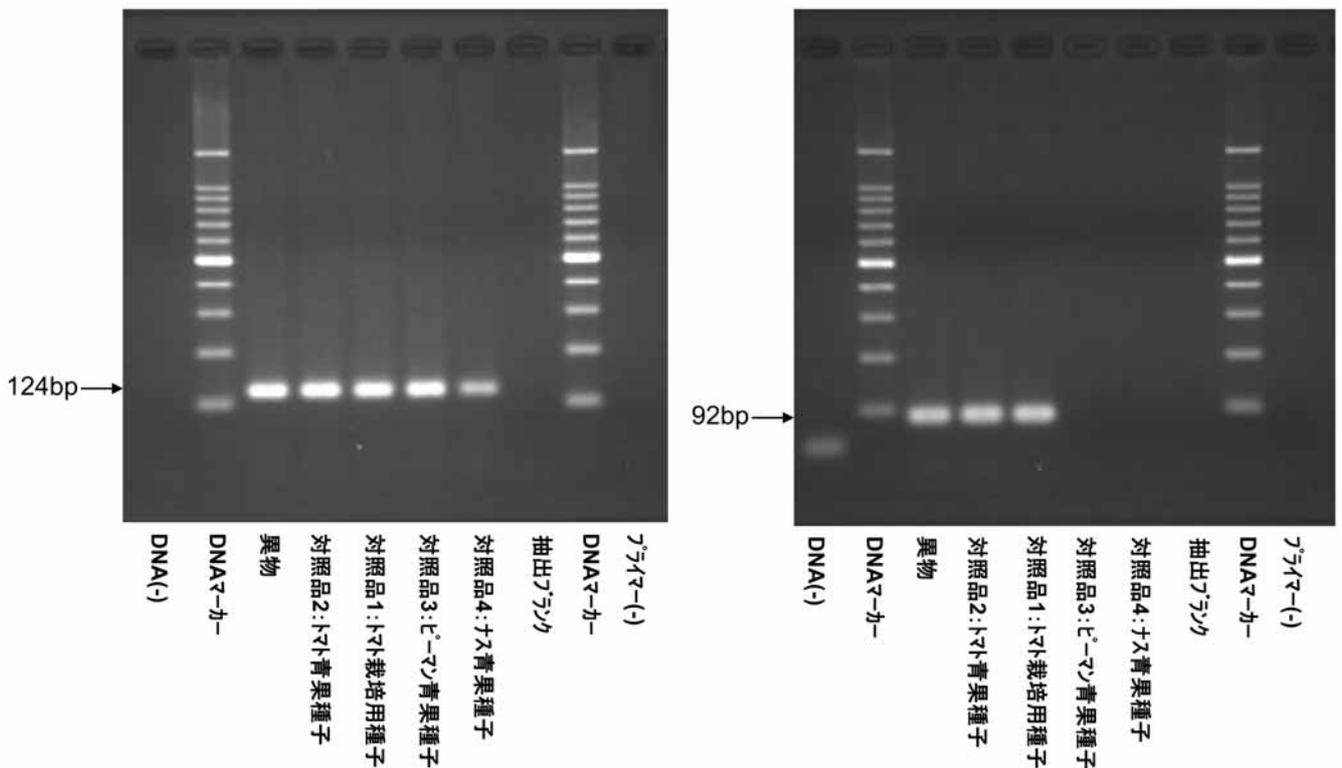


図3 異物および対照品からの抽出 DNA における植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対およびトマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対による PCR 増幅結果

文 献

1) 大森清美, 土屋久世, 岸 弘子, 山田利治, 平山クニ: 食品中の異物検査結果について (平成15年

度・16年度), 神奈川県衛生研究所研究報告, 35, 33-35 (2005)

2) 大森清美, 渡邊裕子, 関戸晴子, 岸 弘子, 土屋

久世, 山田利治: 食品中の異物検査結果について  
(平成17年度・18年度), 神奈川県衛生研究所研究  
報告, 37, 45-49 (2007)

3) Litao, Y. *et al.*: Validation of a tomato-specific

gene, LAT52, used as an endogenous reference  
gene in qualitative and real-time quantitative  
PCR detection of transgenic tomatoes, *J. Agric.  
Food Chem.*, 53, 183-190 (2005)

短報

相模川水系河川水中の  
 有機フッ素化合物 (PFOS, PFOA) の分析

上村 仁, 仲野富美

Analysis of PFOS and PFOA  
 in river water of Sagami drainage system

Hitoshi Uemura and Fumi Nakano

はじめに

パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS), パーフルオロオクタン酸 (PFOA) に代表される有機フッ素化合物は, 難分解性で環境や体内における残留性が高く, 動物実験で発がんとの関連が指摘されている<sup>1)</sup>. これまでは, 一部の研究者の間でのみ, その環境中の存在が認識されていたが, 欧米における河川水中からの検出事例<sup>2)</sup>に引き続き, 国内においても京阪神地域で PFOA による河川水及び水道水汚染が報道され<sup>3)</sup>, 最近になって急速に問題視されるようになってきた.

これらの化合物はフッ素樹脂, 撥水剤, 消火剤の原料として使用されており, 不純物 (残留物) として製品中に存在したり, 製品からの分解産物として放出される可能性が指摘されている<sup>4)</sup>.

PFOS については, 「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs 条約)」に基づく審査委員会で POPs (Persistent Organic Pollutants) 物質に加えられるかの審査が開始され, これに基づき, 国内でも早ければ平成21年11月にも化審法 (化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律) 1種に指定され, 製造・輸送・使用が禁止される可能性がある.

このような情勢を受け, 主たるメーカーは使用を中止したが, 製品が広く出回っているために汚染は相当長引くことが懸念される. そこで, 神奈川県内に供給される水道水の主要水源となっている相模川水系について, 有機フッ素化合物による汚染実態を把握するため, 分析法の確立及び実態調査を行った.

方 法

1. 試料の採取

河川水試料は2008年7月29日および30日に表1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.

2. 試薬

PFOS は東京化成社製品を, PFOA は fluoro chem 社製品を標準物質として使用した. メタノールは和光

表1 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)

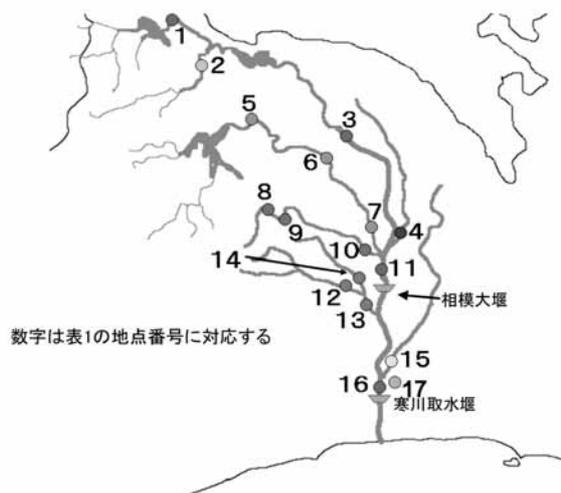


図1 試料採取地点

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  
 Kanagawa Prefectural Institute of Public Health,  
 1-3-1, Shimomachiya, Chigasaki 253-0087

純薬社製の残留農薬試験用（5000倍）及び LC/MS 用、メルク社製 LC/MS 用を、アセトニトリル及びギ酸は和光純薬社製 LC/MS 用を使用した。添加回収実験用及び溶離液用の水は和光純薬社製蒸留水（HPLC 用）を固相カラム（ウォーターズ社製 AC-2 及び tC18）に通して水中の PFOS, PFOA を除去したものを使用した。

抽出用固相カートリッジとして Oasis WAX plus（ウォーターズ社製；以下 WAX と記す）及び Presep-C PFC（和光純薬社製；以下 PFC と記す）を使用した。

### 3. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ（HPLC）条件

装置：AQUITY UPLC（ウォーターズ社製）

カラム：AQUITY UPLC BEH C18 (2.1mmφ×100 mm, 1.7μm)（ウォーターズ社製）

カラム温度：50℃

移動相：A：20mM 酢酸アンモニウム水溶液／アセトニトリル（9：1）

B：アセトニトリル

B（35%）→（3 min）→B（80%）（1 min 保持）

流速：0.35ml/min

注入量：10μl

質量分析計（MS/MS）条件

装置：Quattro Ultima Pt（マイクロマス社製）

イオン化法：ESI（negative）

キャピラリー電圧：3kV

その他の条件は表2の通り。

表2 MS/MS パラメーター

化合物	MRM trace (m/z)	cone電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
PFOS	499→80	60	40
PFOA	413→369	45	10

### 4. 試験溶液の調製

調製法 A（WAX カートリッジによる抽出）

検体100ml をギ酸で pH 3 に調製し、あらかじめメタノール、水各 5 ml で洗浄、コンディショニングした WAX カートリッジに 20ml/min で通水し（吸引モード）、カラムを 2% ギ酸 4 ml 及びメタノール 5 ml

で洗浄後、1% アンモニア水含有メタノール 5 ml で溶出した。溶出液を窒素気流下で乾固し、アセトニトリルで 1 ml にメスアップし、これを LC/MS 用試験溶液とした。

調製法 B（PFC カートリッジによる抽出）

検体100ml を、あらかじめメタノール、水各 5 ml で洗浄、コンディショニングした PFC カートリッジに 20ml/min で通水し（吸引モード）、メタノール 5 ml で溶出した。溶出液を窒素気流下で乾固し、アセトニトリルで 1 ml にメスアップし、これを LC/MS 用試験溶液とした。

### 結果と考察

#### 1. 分析装置からのコンタミネーションについて

HPLC 部にウォーターズ製 Alliance HPLC2695 を用いたところ、多大な装置由来のコンタミネーションの影響で検量線を作製することが困難であった。送液ライン中に PFOS/PFOA 吸着用のカラムを装備した UPLC を用いたところ、ブランク測定において PFOS 及び PFOA は検出されなくなった。

PFOS, PFOA（特に PFOA）はテフロンなどのフッ素樹脂製品から溶出してくると考えられ、送液用チューブ、インジェクターやバルブ周りの材質によっては装置由来のコンタミネーションが激しくなる可能性が考えられた。また、サンプルバイアルのセプタムに用いられるテフロンもコンタミネーションの原因となる恐れがあることから、測定にはポリプロピレン製のバイアル及びキャップを用いた。

#### 2. 試験溶液の調製法について

ウォーターズ製 WAX と和光製 PFC の 2 種類の固相カートリッジを用いて抽出法の検討を行った。その結果を表 3 に示した。PFOS, PFOA とともに PFC カートリッジの方が回収率（添加濃度 10ng/l）は良好であり、再現性については、WAX カートリッジの方が良好であった。ブランク値は PFC カートリッジの方が低かった。

表3 2種の固相カートリッジによる抽出法の比較

化合物	回収率(%) n=4		ブランク値(ng/l)	
	WAX	PFC	WAX	PFC
PFOS	67.6±3.6	91.1±6.4	<5	<5
PFOA	91.2±2.7	95.8±8.4	5.8	<5

回収率が良好なこと、前処理操作が少ない（固相への吸着後の洗浄操作が不要）ことから、河川水調査に

ついては、PFC カートリッジを固相抽出に用いる方法を採用した。

固相抽出を行う際の送液装置（ウォーターズ製コンセントレーター）は送液ラインにテフロン製品を用いているため、通常用いられる加圧通水は行わず、吸引モードで固相に通水し、検水がテフロン部に接触することを回避した。

固相からの溶出を行うメタノールについて、メーカーやグレードの違いにより含有するPFOSやPFOAがどのように異なるか調べたところ、和光純薬製残留農薬試験用（5000倍）及びメルク製LC/MS用からはいずれも検出されなかった。一方、和光純薬製LC/MS用は若干PFOAが含まれていた。ただし、今回は1ロットの製品のみしか調査しておらず、全てのロットにおいて同一の結果が得られるかは不明である。

3. 河川水中のPFOS, PFOAの分布

各河川水試料の分析結果を表4及び図2に示した。定量下限値はそれぞれ5ng/lとした。

PFOS, PFOAともに同じような濃度分布の傾向を示した。相模川本川上流部や比較的人口の少ない地域を流れる支川（中津川, 小鮎川）において濃度が低く、住宅や工場の多い地帯を流れる支川（鳩川, 玉川, 恩曾川, 永池川）において濃度が高かった。濃度が高い支川水流入の影響を受けて、本川の下流部において濃度が上昇する傾向が見られた。

住宅や工場地帯を流れる支川において濃度が高いと

いう傾向は、アセトアミノフェンやトリクロサンといったヒト用に用いられる医薬品や家庭で多用される殺菌剤の河川水中の濃度分布<sup>5)</sup>と類似した傾向である。支川についてPFOAやPFOS濃度の詳細な流域調査を行っていないため発生源の特定は不可能であるが、医薬品類と同様、下水道に未接続の施設や家庭から河川に排出された可能性が高いものと考えられた。

(平成21年8月11日受理)

表4 各試料のPFOS, PFOA含有量

単位:ng/L

採水地点(河川)		PFOS	PFOA
1	弁天橋	N.D.	N.D.
2	青山(道志川)	N.D.	N.D.
3	高田橋	9.4	5.0
4	さくら橋(鳩川)	28	17
5	日向橋(中津川)	N.D.	N.D.
6	才戸橋(中津川)	N.D.	N.D.
7	鮎津橋(中津川)	N.D.	N.D.
8	清川村役場下(小鮎川)	N.D.	N.D.
9	片原橋(小鮎川)	N.D.	N.D.
10	第二鮎津橋(小鮎川)	N.D.	N.D.
11	旭町スポーツ広場	7.5	6.7
12	八木間橋(玉川)	7.8	11
13	酒井橋(玉川)	11	12
14	新八木間橋(恩曾川)	9.7	12
15	平泉橋(永池川)	27	13
16	寒川取水堰直上	9.7	9.9
17	寒川系浄水	5.1	N.D.

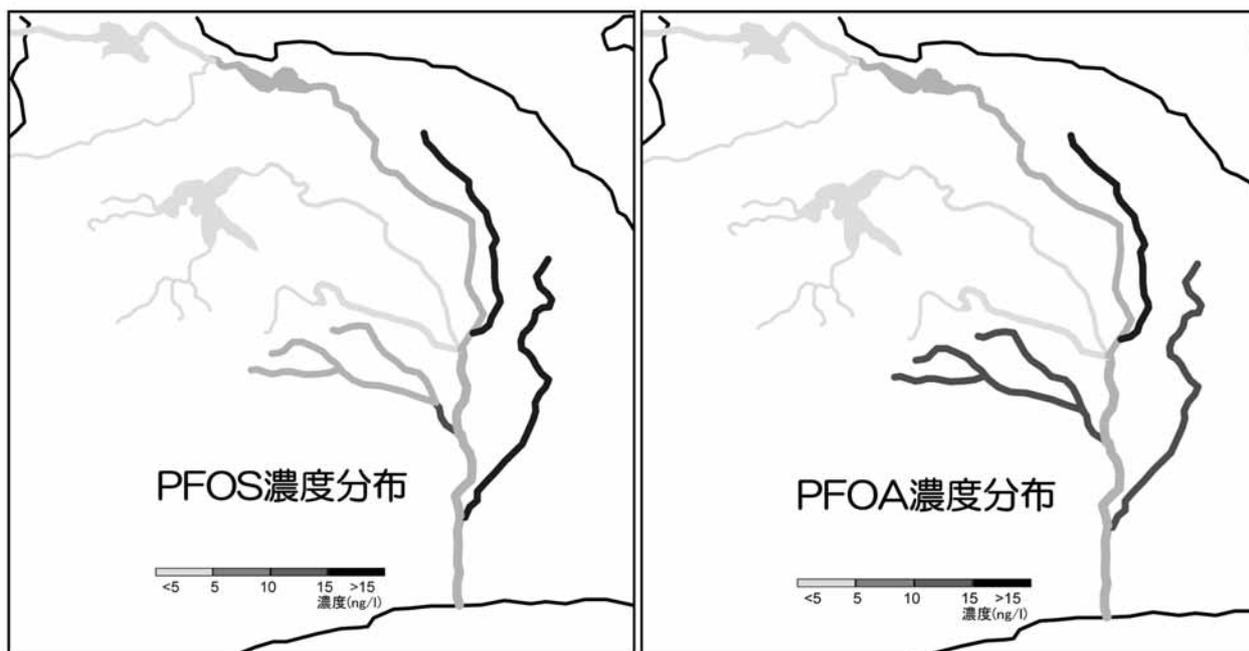


図2 PFOS, PFOAの濃度分布

## 文 献

- 1) アメリカ環境保護局科学諮問委員会：Per-fluorooctanoic Acid Human Health Risk Assessment Review Panel (PFOA Review Panel)  
([http://www.epa.gov/sab/panels/pfoa\\_rev\\_panel.htm](http://www.epa.gov/sab/panels/pfoa_rev_panel.htm))
- 2) Hansen, K. J., Johnson, H. O., Eldrige, J. S., Butenhoff, J. L. and Dick, L. A.: Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River, Environ. Sci. Technol., 36, 1681-1685 (2002)
- 3) 共同通信社：高濃度の有機フッ素汚染 大阪市周辺, 京大が確認  
(<http://www.47news.jp/CN/200705/CN2007052201000005.html>)
- 4) 柴田康行ほか：有機フッ素化合物等 POPs 様汚染物質の発生源評価・対策並びに汚染実態解明のための基盤技術開発に関する研究, 国立環境研究所特別研究報告 (SR-67-2006), 3-7 (2006)
- 5) 上村 仁：相模川水系河川水中の医薬品類の分布, 神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 60-64 (2007)

## 短報

### 室内空気汚染化学物質濃度調査について (平成13~20年度)

仲野富美<sup>1</sup>, 上村 仁<sup>1</sup>, 辻 清美<sup>1</sup>, 伏脇裕一<sup>1</sup>,  
渡辺貞夫<sup>2</sup>, 長谷川一夫<sup>1</sup>

#### Survey of indoor air chemicals (2001-2008)

Fumi NAKANO<sup>1</sup>, Hitoshi UEMURA<sup>1</sup>,  
Kiyomi TSUJI<sup>1</sup>, Yuichi FUSHIWAKI<sup>1</sup>,  
Sadao WATANABE<sup>2</sup> and Kazuo HASEGAWA<sup>1</sup>

#### はじめに

室内における化学物質汚染が居住者に健康被害を及ぼすシックハウス症候群が社会問題化している。厚生労働省は現在までに13物質（アルデヒド2物質、揮発性有機化合物（VOC）6物質、農薬3物質及びフタル酸2物質）について室内空気濃度指針値を策定している<sup>1)</sup>。神奈川県では居住環境が及ぼす健康被害の未然防止や軽減を図り、快適な居住環境を確保するため、「住まいと健康サポート推進事業」を実施しており、保健福祉事務所において住まいが原因と考えられる体調不良について県民からの相談に応じている。さらに、相談者への助言を行うために、必要によって、衛生研究所では住宅の室内化学物質濃度、ダニ、カビアレルゲンの量等の調査を実施した。その中で、平成13年度から20年度に実施した室内汚染化学物質の調査結果について報告する。

#### 方 法

##### 1. 調査対象

平成13年4月から平成21年3月までに居住者などの体調不良による相談があった個人住宅112カ所及び学校・事業所11カ所であった。調査は相談があつてから概ね1ヶ月以内に実施した。

##### 2. 測定物質

測定物質はアルデヒド類11物質及びVOC43物質と

した。さらに、検出したVOCの濃度を合計し、総揮発性有機化合物（TVOC）量を求めた。調査対象1カ所において、アルデヒド類及びVOCを両方測定したが、一部、相談の内容によってはいずれか一方のみの測定を行った。なお、調査数はアルデヒド類114件、VOC122件であった。

##### 3. 空気試料の採取

室内空気のサンプリングは原則、居住状態の室内空気を、床上1.2から1.5mの高さで、サンプリングポンプを用いて流量100ml/minで、24時間、捕集管（アルデヒド類：Sep-Pac DNPH-Silica short body, ウォーターズ社製, VOC:ORBO-91Lあるいは91T, スペルコ社製）に採取した。但し、平成13年度のアルデヒド類の測定は約20ml/minの流量で24時間採取した（n=28）。また、ポンプが設置できなかった場合は、パッシブサンプリング法により、捕集管（アルデヒド類：DSD-DNPH, スペルコ社製, VOC:VOC-SD, スペルコ社製）を用いて24時間室内空気を採取した。

##### 4. 試薬

アセトニトリルは和光純薬社製 HPLC 用試薬を、二硫化炭素は和光純薬社製作業環境測定用試薬を用いた。標準物質はスペルコ社製 DNPH 誘導体化アルデヒド混合標準溶液及び和光純薬製 VOCs 混合標準溶液を用いた。内部標準はアイソテック社製のトルエン-d8を用いた。

##### 5. 測定用試料の調製

アルデヒド類は捕集管をアセトニトリル5mlで溶出し、HPLC用試料とした。VOCは捕集剤を二硫化炭素5mlで溶出して、内部標準溶液（トルエン-d8, 試料中濃度0.5μg/ml）を混和し、2時間静置したものをガスクロマトグラフ-質量分析計（GC/MS）用試料とした。

##### 6. 定量

アルデヒド類は測定用試料20μlをHPLCに注入し、あらかじめ作成した検量線からピーク面積法により定量した。測定条件は、カラム：Discovery RP Amide C16, 5μm, 250mm×4.6mm, 移動相：アセトニトリル：水（55：45）、流量：1.0ml/min, カラム温度：40℃, 検出器：UV検出器（測定波長360nm）とした。

VOCは北原らの方法<sup>2)</sup>に従い、定量した。キシレンはm-, p-, o-キシレンの合算値とした。なお、ノナール及びデカールはアルデヒドであるが、VOCの分析法で測定を行うため、VOCに分類した。

#### 結果及び考察

##### 1. アルデヒド類

1 Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, 1-3-1, Shimomachiya, Chigasaki 253-0087

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

結果を表1に示した。室内空気濃度指針値が設定されているホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドは調査した114件のうち109件及び103件で検出され、検出数が多かった。ホルムアルデヒドは4.1~260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で検出され、11件で室内空気濃度指針値100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

$\text{m}^3$ を上回った。アセトアルデヒドは4.0~120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で検出され、12件で指針値48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を上回った。指針値のない物質では、アクロレイン及びトルアルデヒドが他のアルデヒドに比べて高濃度（最大値90及び120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）で検出された。

表1 室内空气中アルデヒド類の検出結果 平成13年~20年度

物質名	調査数	検出数	室内空气中濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )			指針値 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	指針値 超過件数
			最小値*	最大値	中央値		
ホルムアルデヒド**	114	109	4.1	260	37	100	11
アセトアルデヒド**	114	103	4.0	120	19	48	12
アクロレイン	114	17	4.4	90	24		
プロピオンアルデヒド	114	23	4.1	13	5.4		
ブチルアルデヒド	114	17	4.0	25	4.8		
ベンズアルデヒド	114	28	4.0	23	6.4		
クロトンアルデヒド***	40	0					
イソバレルアルデヒド***	40	0					
バレルアルデヒド***	40	4	4.4	23	4.9		
トルアルデヒド***	40	6	8.2	120	13		
ヘキサアルデヒド***	40	20	4.2	66	8.2		

\* 定量下限値は4.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。但し、平成13年度調査分については20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (n=28)。

\*\* 厚生労働省が室内空气中濃度の指針値を設定している物質。

\*\*\* 平成16年度より測定対象物質に追加した。

指針値を超過した事例の年度別検出数は、表2に示すようにホルムアルデヒドはほぼ毎年、指針値を超過した事例があった。アセトアルデヒドは平成13年度に最も多く、8件で指針値を超過した。アセトアルデヒドは平成14年2月に厚生労働省により指針値が定められた物質であるため、平成13年度は調査時にはまだ指針値が示されていなかった。指針値が示されたことで建材や家具等でのアセトアルデヒドの使用が減少した可能性が推察された。

表2 指針値を超過した事例の年度別検出数 (検出数 / 調査数)

調査年	ホルムアル デヒド	アセトアル デヒド	トルエン	p-ジクロロ ベンゼン
平成13年度	2/28	8/28	0/34	3/34
平成14年度	2/23	1/23	0/25	4/25
平成15年度	3/20	2/20	1/20	1/20
平成16年度	2/13	0/13	1/13	1/13
平成17年度	0/11	1/11	0/11	0/11
平成18年度	1/12	0/12	0/12	0/12
平成19年度	1/5	0/5	0/5	1/5
平成20年度	0/2	0/2	0/2	0/2

指針値を超過した事例の検出数を季節別 (4~6月, 7~9月, 10~12月及び1~3月) に区分して表3に示した。ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドは、7~9月にそれぞれ8件で指針値を超過した。ホルムアルデヒドが指針値を超過した事例では、毎年、夏に体調が悪化するといったケースもあり、締め切った室内には放散したホルムアルデヒドなどの化学物質が高濃度に残留するため、十分に換気してから生活することが健康被害を防ぐために非常に重要であると思われた。一方、築年数が古い住宅であってもホルムアルデヒドが高濃度に検出された事例があった。室内において一旦、内装材等に高濃度のホルムアルデヒドが使用されると、長期間にわたりホルムアルデヒドは放散し続けると推察された。

表3 指針値を超過した事例の季節別検出数 (検出数 / 調査数)

調査月	ホルムアル デヒド	アセトアル デヒド	トルエン	p-ジクロロ ベンゼン
4~6月	2/23	2/23	0/25	2/25
7~9月	8/37	8/37	1/39	3/39
10~12月	1/31	0/31	1/35	3/35
1~3月	0/23	2/23	0/23	2/23

## 2. VOC

結果を表4に示す。調査した122件のうち、芳香族炭化水素類のうち指針値が設定されているトルエンは116件（濃度4.2~390 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）、エチルベンゼンは70件（濃度4.1~130 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）、キシレンは86件（濃度4.0~200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）、スチレンは19件（濃度4.2~100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）で検出された。トルエンが検出数、濃度ともに最も高く、2件で指針値260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を上回った。エチルベンゼン、キシレン、スチレンは指針値（それぞれ3800, 870, 220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）を超過しなかった。指針値以下ではあるが、トルエン、エチルベンゼン、キシレン、スチレンは同時に検出されることも多かった。これらの物質は塗料や接着剤の溶剤などに多く使用される成分であり、同一の発生源から放散する可能性も考えられた。指針値のない物質では、ナフタレンが高濃度（150~300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）で5件検出され、家庭内で衣類用防虫剤として使用していると推察された。

脂肪族炭化水素類で指針値が設定されているテトラデカン<sup>3)</sup>は、26件（濃度4.0~50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）で検出され、指針値（330 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）を超過しなかった。脂肪族炭化水素類は調査した住宅によって、ほとんど検出されない場合と、ノナン、デカン、ウンデカンを含む数種類の物質が同時に検出される場合があった。これらの物質の発生源のひとつとしては灯油があり、石油ストーブ用灯油の保管容器から漏れ出た空気が室内VOCの汚染源となった住宅ではウンデカン、デカン、ノナン、1, 2, 4-トリメチルベンゼン及びキシレンの室内空気中濃度が高かったという報告がある<sup>3)</sup>。今回の調査において、ノナン、デカン、ウンデカン、1, 2, 4-トリメチルベンゼン及びキシレンが高濃度（51~210 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）で検出された事例が2件あり、これらの住宅では石油ストーブを使用していた。灯油容器の保管場所から空気が流入して居室の空気を汚染した可能性があり、保管場所を変えるなどの配慮をすることで室内空気濃度を低減化できると考えられた。

ハロゲン類で指針値が設定されているp-ジクロロベンゼン（p-DCB）は77件（濃度4.0~1600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）で検出された。10件で指針値（240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）を超過し、その検出濃度は指針値の約1~7倍（260~1600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）と高かった。p-DCBと同時にナフタレンも検出された事例もあり、これらの物質は居住者が持ち込む衣類用防虫剤が原因であることが推定された。室内空気汚染を避けるために、居住者は必要以上の量の防虫剤を使用しないような注意が必要である。しかし、家庭内で衣類用防虫剤を使用していないにもかかわらず、p-DCBが検出された事例が数例あった。p-DCBは

非常に残留性が高い物質であるため<sup>4)</sup>、中古住宅や賃貸住宅の場合、以前の居住者が使用した防虫剤が押入れやクローゼットに残留している可能性も考えられる。指針値を超過した事例の年度別検出数は表2に示すように、平成13年から16年度は毎年超過事例があったが、それ以降は平成19年度に1件であった。現在、ピレスロイド系農薬を有効成分とした無臭タイプの衣類用防虫剤も広く市販されているため、p-DCB以外の防虫剤を使用する家庭が増えている可能性も考えられた。指針値を超過した事例の季節別検出数は表3に示すように、p-DCBはホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドに比べ、年間を通して検出される傾向であった。

トリクロロエチレン（TCE）及びテトラクロロエチレン（PCE）は室内空気中濃度について指針値がない物質であり、今回の調査において検出数は少なかったが、高濃度（TCE120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、PCE580 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）で検出された事例が1件あった。TCE及びPCEは皮膚、中枢神経、肝臓及び腎臓への毒性があるため、大気汚染に係わる環境基準においても大気中の1年平均値がいずれも0.2mg/ $\text{m}^3$ 以下であることと定められている<sup>5)</sup>。今回検出された室内空気中濃度はPCEが環境基準値を超える濃度であり、居住者の健康影響が懸念された。また、この住宅ではホルムアルデヒド、アセトアルデヒド（指針値超過）、トルエン、エチルベンゼン、キシレン、スチレン、アセトンと、非常に多種類の物質が検出され、TVOCは1800 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。この住宅は新築一戸建ての住宅で、店舗と住居を兼ねていた。空気のサンプリングは住居部分の居室で行われたが、住宅の建材、内装材、住居に持ち込まれた家具、店舗に持ち込まれたもの等、多種類の発生源があると思われる。居住者の生活スタイルによって室内で検出される物質は多種多様であり、相談者の住まい方等を詳細に聞き取り調査し、さらに室内空気濃度を測定することは、居住空間の空気質の改善に有用であると考えられる。

TVOCは暫定目標値400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を32件（濃度410~1800 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）が超過した。そのうち10件は指針値のある物質のうちいずれかが指針値を超過していた。それ以外の22件は、複数のVOCが検出され、合計値として高濃度となったものであった。防虫剤由来の成分であるp-DCB及びナフタレンがTVOCのうちのほとんどを占める事例や、トルエン等の芳香族炭化水素類や脂肪族炭化水素類の多種類の物質が検出された事例もあった。居住者の配慮によって、衣類用防虫剤や灯油などの使用や保管を工夫することでTVOCを減少できるケースも多いと考えられた。

表4 室内空气中のVOC検出結果 (n=122)

分類	物質名	検出数	室内空气中濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )			指針値 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	指針値 超過件数
			最小値*	最大値	中央値		
芳香族炭化水素類	ベンゼン	22	4.0	14	5.0		
	トルエン**	116	4.2	390	20	260	2
	エチルベンゼン**	70	4.1	130	11	3800	0
	キシレン**	86	4.0	200	5.9	870	0
	スチレン**	19	4.2	100	6.4	220	0
	1,3,5-トリメチルベンゼン	14	4.0	33	11		
	1,2,4-トリメチルベンゼン	42	4.2	120	9.8		
	1,2,3-トリメチルベンゼン	18	4.2	21	7.4		
	ナフタレン	17	4.0	300	41		
脂肪族炭化水素類	ヘキサン	41	4.2	73	5.9		
	ヘプタン	30	4.1	27	6.1		
	オクタン	26	4.1	51	8.8		
	ノナン	45	4.5	210	14		
	デカン	56	4.1	180	13		
	ウンデカン	50	4.0	130	13		
	ドデカン	36	4.0	90	11		
	トリデカン	27	4.3	83	9.3		
	テトラデカン**	26	4.0	50	11	330	0
ペンタデカン	6	4.5	10	8.2			
ヘキサデカン	2	4.1	7	5.6			
ハロゲン類	ジクロロメタン	42	4.0	56	7.1		
	トリクロロエチレン	2	4.2	120	63		
	テトラクロロエチレン	6	5.0	580	8.6		
	p-ジクロロベンゼン**	77	4.0	1600	27	240	10
テルペン類	$\alpha$ -ピネン	60	4.2	120	13.6		
	リモネン	72	4.1	190	8.3		
エステル類	酢酸エチル	80	4.1	32	7.7		
	n-酢酸ブチル	34	4.1	59	7.7		
ケトン類	アセトン	115	5.4	320	24		
	2-ブタノン	37	4.1	46	6.5		
	4-メチル-2-ペンタノン	16	4.2	89	8.0		
アルコール類	1-ブタノール	27	4.2	62	8.4		
アルデヒド類	ノナナール	102	4.1	69	13		
	デカナール	32	4.0	590	8.7		
総揮発性有機化合物(TVOC)**		120	14	1800	250	400***	32

1,2,4,5-テトラメチルベンゼン, 2,4-ジメチルペンタン, 2,2,4-トリメチルペンタン, クロロホルム, 1,2-ジクロロエタン, 1,1,1-トリクロロエタン, 四塩化炭素, 1,2-ジクロロプロパン及びジブromokクロロメタンは定量下限値未満.

\* 定量下限値は $4.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

\*\* 厚生労働省が室内空气中濃度の指針値または暫定目標値を設定している物質.

\*\*\* TVOCは暫定目標値.

国土交通省はシックハウス対策として、平成15年7月、ホルムアルデヒドを放散する建材の使用制限や24時間換気設備の設置を義務付ける建築基準法改正を行った。平成12年度から17年度に実施された新築住宅を対象とした実態調査では、ホルムアルデヒド、トルエンについて指針値超過住宅の割合は年々減少し、平成16年度以降は非常に低い数値となったと報告されている<sup>6)</sup>。しかし、その一方で、国民生活センターに寄せられるシックハウスに関連した相談件数は依然減少していない<sup>7)</sup>。今後、居住者が持ち込む家具や生活用品等から放散される化学物質や指針値が示されていない物質による室内空気汚染対策への取り組みが重要な課題であると考えられた。

(平成21年8月11日受理)

## ま と め

平成13年度から20年度において、神奈川県内で室内空気が原因と疑われる体調不良の発生した個人住宅及び学校・事業所123カ所について室内汚染化学物質の調査を行った。指針値を超過した事例はホルムアルデヒド11件、アセトアルデヒド12件、トルエン2件及びp-DCB10件で、ほぼ毎年指針値を超過した住宅があった。室内空気中の化学物質は新築・リフォームで使用された建材や内装材から発生するもの以外に、居住者が持ち込む生活用品等が発生源となるケースも多く、健康被害を防ぐために、その適切な使用方法について啓蒙することも重要であると考えられる。また、指針値はないが、ナフタレン、TCE、PCEのように高濃度に検出された物質もあった。室内空気中に発生する化学物質は多岐にわたり、今後、室内空気汚染に係わ

る対策がさらに整備されることが望まれる。

本調査は神奈川県保健福祉部生活衛生課「住まいと健康サポート推進事業」により実施された。

## 文 献

- 1) 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について、厚生労働省通知医薬発第0207002号、平成14年2月7日
- 2) 北原節子, 梁川有紀, 高田絵里, 森 康明: 室内環境中の揮発性有機化合物 (VOC) 濃度の調査研究, 大妻女子大学紀要社会情報学研究, 11, 45-54 (2002)
- 3) 長谷川一夫, 仲野富美, 辻 清美: VOC パッシブサンプラーを用いた室内 VOC 汚染源調査, 神奈川県公衆衛生学会誌, 51, 5 (2005)
- 4) 長谷川一夫, 仲野富美, 辻 清美, 伏脇裕一: 木造住宅室内空気中におけるパラジクロロベンゼン濃度の推移, 神奈川県衛生研究所研究報告, 36, 30-32 (2006)
- 5) ベンゼン等による大気汚染に係わる環境基準について, 環境省告示4号, 平成9年2月4日
- 6) 国土交通省: 平成17年度室内空気中の化学物質濃度実態調査  
〈[http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha06/07/071130\\_.html](http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha06/07/071130_.html)〉
- 7) 国民生活センター: 消費生活相談データベースシックハウス  
〈[http://datafile.kokusen.go.jp/wadai/sick\\_house.html](http://datafile.kokusen.go.jp/wadai/sick_house.html)〉

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20年度)

石原ともえ, 伊東久美子, 黒木俊郎

Occurrence of enterohemorrhagic  
*Escherichia coli*  
 in Kanagawa Prefecture (2008)

Tomoe ISHIHARA, Kumiko ITOH  
 and Toshiro KUROKI

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: 以下, EHEC と略す) 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」(平成10年10月2日法律114号) (以下, 感染症法と略す) 第1章, 総則で三類感染症に分類され, EHEC 症の患者と診断した医師は, 保健所長を経由して都道府県知事に届け出なければならない。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 (以下, 地研と略す) 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, 通知<sup>1,2)</sup>により国立感染症研究所 (以下, 感染研と略す) 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 (以下, PFGE と略す) 解析を実施して, 全国レベルの大規模な集団発生や散発的集団発生 (diffuse outbreak), すなわち「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」を探知し, 感染の拡大と大規模化の抑止に力を注いでいる。また, 感染研で得られた PFGE の結果は, 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防止のため, 送付されたすべての EHEC 菌株について PFGE 解析を実施した。また, 新たに, マルチプレックス PCR を用いた IS (Insertion Sequence) - Printing System (以下, IS 法と略す) による解析もあわせて実施した。

平成20年度の菌株受領状況の内訳は, 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ヒト由来30株, 食肉衛生検査所から送付されたウシ由来1株, 藤沢市で分離されたヒト由来22株の計53株であった (表1)。血清型および Vero 毒素 (VT) の違いによる内訳は, O157 (VT 1 & 2) 17株, O157 (VT 2) 9株, O26 (VT 1) 23株, O55 (VT 1) 1株, O103 (VT 1) 1株, および, O121 (VT 2) 2株であった。藤沢市22株および食肉衛生検査所1株を除くヒト由来30株の性別および年齢構成を比較すると, 男性がやや多いものの, 1歳から68歳までの年齢層から分離された (表2)。

表1 施設別菌株受領状況 (53株)

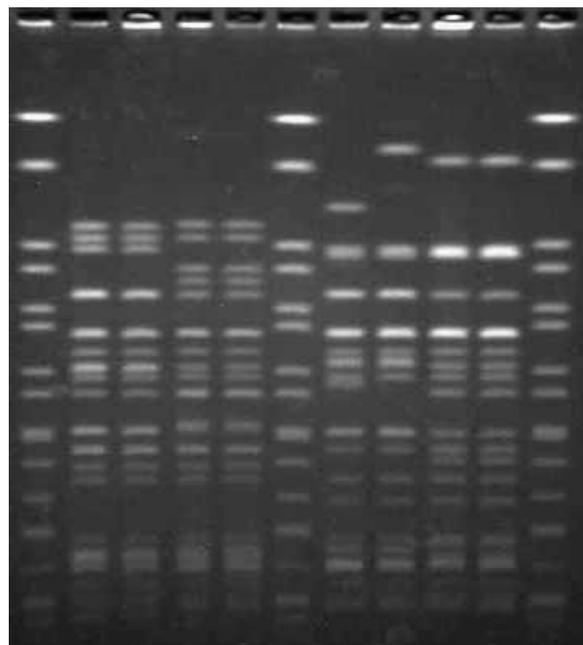
施設	O157		O26	その他	菌株数
	VT1&2	VT2	VT1		
厚木保健福祉事務所	6	1		O55 (VT1), O103 (VT1)	9
大和保健福祉事務所	2	1			3
秦野保健福祉事務所	1	3			4
茅ヶ崎保健福祉事務所	2		1		3
平塚保健福祉事務所	1	2			3
鎌倉保健福祉事務所	1				1
小田原保健福祉事務所	4	1	2		7
藤沢市保健所			20	O121 (VT2)-2株	22
食肉衛生検査所		1			1
計	17	9	23	4	53

表2 患者・保菌者の年齢構成および性別  
(藤沢市を除く30株)

年 齢	男性	女性	計
1 - 5	5	1	6
6 - 10	1	2	3
11-20	2	3	5
21-30	4	2	6
31-40		1	1
41-50	1	1	2
51-60	2	1	3
61-70	2	2	4
計	17	13	30

PFGE を実施する際に制限酵素として *Xba* I を使用し、6 V、2.2-54.2秒、12°Cの条件で20時間泳動を行った。まず、飲食店での感染事例と家族内感染事例を示した(図1)。レーン1~4はO157(VT2)による2事例4株、レーン5~8はO157(VT1&2)の2事例4株である。レーン1、2は平成20年8月に1日違いで同じ飲食店を利用した2名から検出された菌株のパターンである。喫食調査の結果では共通の食材が認められなかったことから、異なった原因であることを証明する目的で、PFGE 検査の依頼があった。しかし、2株のPFGE パターンが一致したことから、この飲食店を原因とした感染事例であることが推測された。レーン3、4は家族内感染事例で2株のパターンは一致しており同一の菌による感染が予測された。レーン5、6も家族内感染事例の結果であるが、このパターンでは数本のバンドの違いが認められた。小児と母親で、同一食材を喫食していることから同じ感染源であることが予測されており、部分的な変異によるものと考えられた。レーン7、8は横浜市内の飲食店における集団発生(患者15名)に関連した県域在住2名からの分離菌株のパターンである。この2株のパターンは一致しており、さらに、横浜市衛生研究所に菌株を送付した結果、横浜市の分離株とすべて一致したとの報告を得た。家族内感染以外の散発事例のPFGE は異なったパターンを示した(図2)。また、O157(VT1&2)10株についてIS法による解析を実施した(図3)。PFGE で数本のバンドの不一致が認められた家族の事例(図1:レーン5、6)はIS法ではレーン1、2に、また、横浜市の飲食店事例(図1:レーン7、8)はIS法ではレーン3、4に示した。この2事例4株は、IS法ではそれぞれ一致したパターンを示した。IS法はスタンダードと同じ位置のバンドの有無で判定し結果を数値化して、1stセットと2ndセットを合わせて比較する。2種類の

M 1 2 3 4 M 5 6 7 8 M

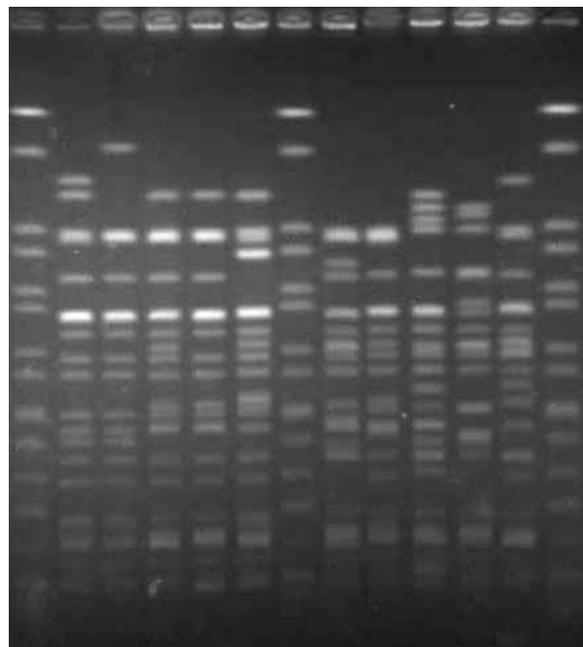


M: マーカー: *Salmonella* Braenderup  
泳動条件: 6V, 2.2-54.2s, 12°C, 20h

レーン1~4 O157(VT2), レーン5~8 O157(VT1&2)

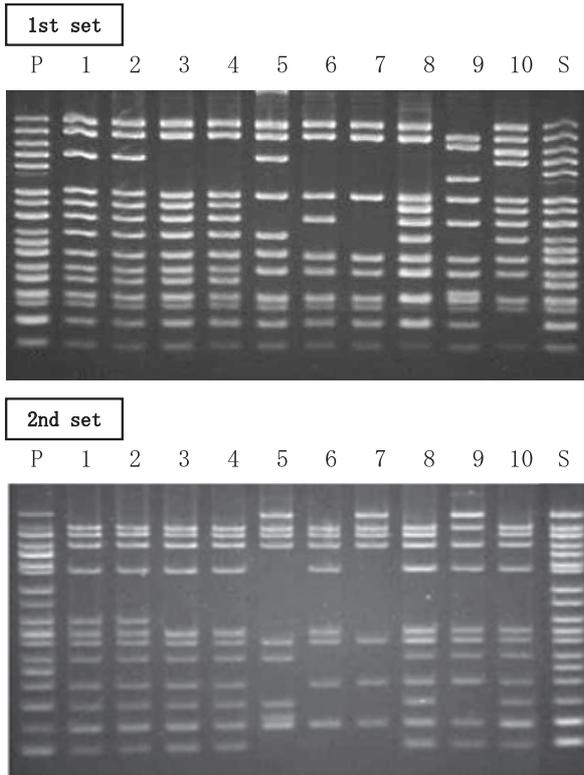
図1 EHECO157による小規模事例および家族内感染事例

M 9 10 11 12 13 M 14 15 16 17 18 M



M: マーカー: *Salmonella* Braenderup  
泳動条件: 6V, 2.2-54.2s, 12°C, 20h

図2 EHECO157による散発事例(10株)



P : 陽性コントロール : すべてのプライマーのテンプレート DNA を混合  
 S : スタンダード DNA : 増幅バンドのサイズマーカー : 18 本

図 3 IS-Printing System による解析

セットには、18種類のプライマーが含まれており、合計36種類のプライマーを用いているため、より、詳細な比較が可能である。

図には示していないが、藤沢市で分離された O121 (VT 2) の 2 株については相次いで分離された菌株であるが、相互の関連がなく PFGE パターンも異なったことから、散發事例であることが確認された。また、同市での血清型 O26 による感染事例の詳細は病原微生物検出情報で報告されている<sup>3)</sup>。

つぎに、受領した53菌株について、アミノベンジルペニシリン (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)、スルファメトキサゾール・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<sup>4)</sup>に準拠して薬剤感受性試験を実施した。この結果 (表 3)、3 剤 (ABPC, SM, TC) 耐性は 5 株、2 剤 (SM, ST あるいは SM, TC) 耐性 2 株、単剤 (TC) 耐性 1 株で、53 株中 45 株が供試した 11 薬剤に感受性であった。耐性株のうち 1 株は O55 で 3

表 3 薬剤感受性試験結果 (53株)

耐性数	耐性薬剤				株数
3 剤	ABPC	SM		TC	5
2 剤		SM	ST		1
		SM		TC	1
単 剤				TC	1
感受性					45
計	5	7	1	7	53

剤耐性株であったが、他の 7 株は O157 であった。O103 (1 株)、O121 (2 株) および O26 (23 株) はすべて薬剤感受性株であった。

平成20年度も、全国的には EHEC の事例が多数報告されたが、大規模な感染事例は認められなかった。

近年、EHEC 感染の原因食品として食肉が多数報告されていることから、食中毒予防にあたって食肉取扱関係者への衛生管理の指導と、消費者への注意喚起を行うよう通知がなされている<sup>2)</sup>。

原因施設としては焼肉店での感染事例が多く、また、バーベキューによる感染等で牛肉と何らかの関連が確認された事例<sup>5)</sup>も報告されていることから、今後も菌株を収集し、PFGE 以外の解析法も用いて感染源の特定と感染拡大防止のための迅速な対応が必要であると考えられる。

なお、この報告の一部は、厚生労働科学研究費補助金 (広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 新興・再興感染症研究事業) において実施した。

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に深謝いたします。

(平成21年 8 月11日 受理)

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品健康課長：病原性大腸菌 O-157 の検体提供依頼について、平成 8 年 6 月 19 日、衛食第 160 号 (1996)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：飲食店における腸管出血性大腸菌食中毒対策について、平成 19 年 5 月 14 日、食安監発第 0514001 号 (2007)
- 3) 寺田直樹, 佐藤 健, 平井有紀, 沖津忠行, 小出元子, 宮崎晃子ほか：修学旅行先において腸管出血性大腸菌 O26 に感染したと思われる事例—藤沢市, 病原微生物検出情報, 29, 256 (2008)

- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute; Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline, CLSI Document M45-A1, Wayne, Pa.,(2007)
- 5) 石原ともえ他：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），神奈川県衛生研究所研究報告37, 68-69（2007）

## 資料

### リアルタイム PCR 法による 散発性下痢症患者便検査の 迅速スクリーニングの実施

伊東久美子, 石原ともえ, 黒木俊郎

#### Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of pathogens in Stools

Kumiko ITOH, Tomoe ISHIHARA  
and Toshiro KUROKI

神奈川県衛生研究所では、感染症発生動向調査の一環として県域内の小児科定点医療機関で感染性胃腸炎と診断された散発性下痢症患者便の腸管系病原菌検査を実施している。散発性下痢症患者便から分離された病原菌については、分子疫学等性状や薬剤感受性試験などを実施しその情報を集積しており、異なった散発事例間の関連性を推測し、集団発生の予防や疾病の治療等の基礎データとして活用したいと考えている。それには病原菌を効率よく確実に検出することが重要になる。

当所に医療機関から搬送される患者便の多くは採取される便の量が少なく、また週1回の回収日まで医療機関で保管されていた検体であるため、検査日までの間に菌の活性が落ちていたり、菌が死滅していることも考えられ、検出率が低下している可能性がある。従来から患者便の病原菌検査は培養法で行っており、病原菌ごとに異なる選択分離培地による培養や性状試験を必要とするため、作業が煩雑で病原菌の確定までに1週間近くを要する。近年は培養法以外に、糞便から直接に病原菌のDNAを抽出し、PCR法を利用して細菌の推定を迅速に行う方法が発表されている<sup>1,2)</sup>。特にリアルタイムPCR法は従来のPCR法より短時間で検出でき、菌数の定量もできることから、食中毒の原因菌推定の迅速スクリーニングとして福島<sup>3)</sup>はリアルタイムPCR法の有効な活用法を報告している。

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

そこで今回、菌の生存性が少ないと思われる散発性下痢症糞便においても、糞便から直接、病原菌の遺伝子を検出することで迅速に菌をスクリーニングできるリアルタイムPCR法を従来の培養法と並行して実施し、培養法から効率よく確実に菌を検出するための手法として活用できるか、その有用性を検討した。

検体である散発性下痢症患者便は平成19年7月から平成20年12月に医療機関から搬送された278件で、リアルタイムPCR法の対象にした病原菌はカンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、カンピロバクター・コリ (*Campylobacter coli*)、サルモネラ (*Salmonella* spp.) およびウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) とした。

患者便は綿棒にて採取して滅菌生理食塩水1ml中に懸濁し、リアルタイムPCR法および培養法の試料とした。

培養法は成書<sup>4)</sup>に従って直接培養と増菌培養を行い、菌の分離・同定を実施した。

DNAの抽出はQIAamp DNA Stool Mini kitを用い、リアルタイムPCR法はSmart Cycler<sup>®</sup> II System (Cepheid社)を使用して測定した。検出方法は福島<sup>3)</sup>のDuplexリアルタイムPCR法(以下、リアルタイムPCR法)を参考にし、SYBR Greenを用いたインターカラー法で、反応試薬はSYBR Premix EX Taq<sup>™</sup> (タカラバイオ)を用いた。

表1 陽性コントロールとして使用した病原菌と検出用プライマー

病原菌	検出用プライマー		
	標的遺伝子	シーケンス	
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>gyrA</i>	JL238	TGGGTGCTGTTATAGGTCGT
		JL239	GCTCATGAGAAAGTTACTC
<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	CCceuE-F	ACGCGCACAAAGGCATACCT
		CCceuE-R	CCAGTATTCAGGATCAAGATAAATGATTT
<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>invA</i>	invA-F	CATTGTGGGGCCCAAGA
		invA-R	ACAAATATAACGCGCCATTGC
<i>Clostridium perfringens</i>	enterotoxin	CPE-F	CTGCAGATAGCTTAGGAAATATTGATCA
		CPE-R	GCAGCTAAATCAAGGATTTCTTTTTCT

表1に陽性コントロールとして使用した病原菌と検出用プライマーを示した。陽性コントロールは当所の分離菌株を使用し、プライマーは論文<sup>5)</sup>より選択した。PCR反応終了後、融解曲線分析による $T_m$ 値(melting temperature)を確認し、陽性コントロールと同一の $T_m$ 値を示した検体を陽性と判定した。増菌培養液についてもDNAを抽出してリアルタイムPCRを行った。

2種類の菌を組み合わせたDuplex-PCRはサイク

表2 リアルタイム PCR および培養法による病原菌の検出状況

検体 No.	検出病原菌	試料液		増菌培養液	
		リアルタイム* PCR法	培養法*	リアルタイム* PCR法	培養法*
1	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
2	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
3	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
4	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
5	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
6	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
7	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
8	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
9	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
10	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
11	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
12	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
13	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
14	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
15	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
16	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+
17	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	+	+
18	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	+	+
19	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	+	+	+
20	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	+	+	+
21	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	-	+	+
22	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	-	-	-
23	<i>Salmonella</i> Poona	-	+	+	+
24	<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	+	+	+
25	<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	+	+	+
26	<i>Salmonella</i> Abony	-	+	+	+
27	<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	-	+	+	+
28	<i>Clostridium perfringens</i>	+	+	+	+
29	<i>Clostridium perfringens</i>	+	+	+	+

\* リアルタイムPCR法 : 陽性(+), 陰性(-)  
培養法

ル数が増えるに従ってプライマーダイマーが出来やすくなり、目的とする DNA 産物の検出を妨げる原因となったため適正サイクル数を検討し、一律35サイクルで実施した。さらに  $T_m$  値の違いによる菌の組み合わせを考慮して、Duplex-PCR はカンピロバクター・ジェジュニとウエルシュ菌およびカンピロバクター・コリとサルモネラのセットで測定した。

リアルタイム PCR 法による対象菌の添加回収試験は、糞便の滅菌生理食塩水10倍懸濁液に陽性コントロールとして使用した病原菌の段階希釈液をそれぞれ接種し、検体と同様に DNA 抽出して測定したところ、4 菌種ともに検出感度は糞便 1g あたり、 $10^5$  個であった。

リアルタイム PCR 法および培養法による病原菌の検出状況を表2に示した。カンピロバクターについては試料液からのリアルタイム PCR 法と培養法の両方法またはどちらか一方で菌の確認が出来たのは22検体 (No. 1~22) であり、全てカンピロバクター・ジェジュニであった。試料液では、リアルタイム PCR 法と培

養法の両方法が陽性となった検体は16検体 (No. 1~16)、リアルタイム PCR 法と培養法の両方法が陰性となった検体は2検体 (No. 17, 18) であった。両方法における結果が一致しなかったのは、リアルタイム PCR 法陰性で培養法陽性の2検体 (No. 19, 20) と、リアルタイム PCR 法陽性で培養法陰性の2検体 (No. 21, 22) であった。増菌培養液では No. 1~21 はリアルタイム PCR 法と培養法ともに陽性であったことから、No. 17, 18 の2検体は糞便中の菌量がリアルタイム PCR 法の検出限界以下であり、菌の活性も落ちていたと考えられた。No. 19, 20 の2検体は糞便中の菌量がリアルタイム PCR 法の検出限界以下であったと推察され、No. 21 の検体はリアルタイム PCR 法の検出限界以上の菌量はあるものの、菌の活性が落ちていた可能性があると考えられる。さらに、No. 22 の検体は試料液のリアルタイム PCR 法陽性で培養法は陰性であった。この検体の DNA 抽出液を用いて Linton ら<sup>6)</sup> および Inglis ら<sup>7)</sup> の方法で通常の PCR 法を行い、増幅産物を泳動後、バンド位置を確認したところ、両方法ともにカンピロバクター・ジェジュニ陽性コントロールと一致し、通常の PCR 法でもカンピロバクター・ジェジュニであると判定された。この検体の増菌培養液からのリアルタイム PCR 法と培養法の両方法が陰性であったことにより、No. 22 は菌が死滅していた可能性が考えられた。

サルモネラは試料液からの培養法で5検体 (検体 No. 23~27) から検出されたが、リアルタイム PCR 法は全て陰性であった。増菌培養液からはリアルタイム PCR 法と培養法の両方法が陽性であった。これら5検体は糞便中の菌量がリアルタイム PCR 法の検出限界以下であると推察された。

ウエルシュ菌は、2検体 (検体 No. 28, 29) ともに試料液からのリアルタイム PCR 法と培養法の両方法が陽性であった。この2検体の糞便直接からのエンテロトキシン産生試験を PET-RPLA (デンカ生研) で実施したところ、エンテロトキシンの産生が確認された。さらに2検体から分離した菌株について、ウエルシュ菌毒性遺伝子検出用プライマー (タカラ) で通常の PCR 法を行ったところ、エンテロトキシン産生

遺伝子の保有も確認された。この2検体から検出されたウエルシュ菌分離株はいずれも Hobbs の血清型別（デンカ生研）では型別不能であった。

糞便の試料液からのリアルタイム PCR 法は、カンピロバクター・ジェジュニでは培養法と結果がほぼ一致し、菌の活性が落ちていたり、死滅していると思われる検体でもリアルタイム PCR 法は有用であった。一方、リアルタイム PCR 法陰性で培養法陽性となった検体はカンピロバクター・ジェジュニ検出の2検体とサルモネラ検出の5検体であったが、増菌培養液から DNA 抽出することにより、検出限界以下の菌を検出できた。

ウエルシュ菌はエンテロトキシン遺伝子を標的としたプライマーを使用しており、リアルタイム PCR 法陽性の検体は、同日中に糞便中のエンテロトキシン産生試験を実施して、翌日判定することができる。また、急性期の患者便には1グラム当たり $10^6$ 個以上の菌が排泄され<sup>3)</sup>るが、健康な人からも少量ではあるが排泄される。リアルタイム PCR 法陽性であることは菌量が検出限界以上であることを示しており、健康な人との鑑別が容易になり、下痢症の原因菌推測の指標となった。

散発性下痢症患者便は便量が少量であることが多い。このため、患者便から直接的に病原菌をスクリーニングするリアルタイム PCR 法においては、菌量が検出限界以下であることも多く、糞便からのリアルタイム PCR による直接検出は困難であった。このような検出限界以下の菌でも増菌培養液からの DNA 抽出により、菌の検出は可能であった。特に菌の発育が遅く培養に長時間かかるカンピロバクターの検索にはリアルタイム PCR 法は有効であると思われた。ウエルシュ菌のリアルタイム PCR 法陽性の検体は、培養検査での確実な菌の分離とその後に続く性状検査や病原因子の確認検査の迅速な対応が可能となる。健康な人からも検出されるウエルシュ菌のように菌量と病原因子を証明する必要がある菌の検索にはこのスクリーニング

法は有効であると考えられた。

今後の課題としては、菌量が少ない検体の DNA をいかに効率よく抽出するか、さらに特異性の高い検出方法で、しかも安価で簡便な方法の確立が必要となると考える。

最後に、本調査にご協力いただきました小児科定点医療機関および健康増進課の方々、ならびに Duplex リアルタイム PCR 法について貴重なご助言をいただきました島根県保健環境科学研究所保健科学部長の福島博先生に深謝いたします。

(平成21年8月11日受理)

#### 参考文献

- 1) 田栗利紹, 野口栄太郎, 平山文俊: マルチプレックス PCR を用いた食中毒起因細菌一括検出方法, 長崎県衛生公害研究報, 48, 43-56 (2002)
- 2) 江崎孝行, 大楠清文: 腸内フローラの同定: DNA プローブとプライマー, 腸内細菌学雑誌, 20, 245-258, (2006)
- 3) 福島 博, 角森ヨシエ: リアルタイム PCR 法による食中毒菌の迅速スクリーニングの検討, 感染症学雑誌, 79, 644-655, (2005)
- 4) 坂崎利一編: 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒, 中央法規出版, pp. 90-118, 336-362, 396-407, (2000)
- 5) 福島博: 食中毒検査・診療のコツと落とし穴, 渡辺治雄編, 中山書店, pp. 52-54, (2006)
- 6) 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)
- 7) Inglis G. Douglas, Lisa D. Kalischuk: Use of PCR for Direct Detection of Campylobacter Species in Bovine Feces, Applied and Environmental Microbiology, 69, 3435-3447 (2003)

## 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20年度）

片山 丘, 原田美樹, 宮原香代子, 古屋由美子

#### Surveillance of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2007~March, 2008)

Takashi KATAYAMA, Miki HARADA,  
Kayoko MIYAHARA and Yumiko FURUYA

我々は、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を把握する目的で、神奈川県内（鎌倉市、茅ヶ崎市、平塚市、厚木市、小田原市）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。ウイルスを原因とする感染性胃腸炎は、冬期の前半を中心に乳幼児から成人に至るまで幅広い年齢層で流行がみられるノロウイルス（図1-1）による胃腸炎と、冬期の後半を中心に乳幼児に流行がみられるロタウイルス（主にA群：図1-2）による胃腸炎が良く知られている。定点医療機関からの検体では、これらのウイルスの他にアデノウイルス（図1-3）、サポウイルス（図1-4）、アストロウイルス（図1-5）、C群ロタウイルス（図1-6）も検出されている。さらに、神奈川県（川崎市、横浜市、横須賀市、相模原市および藤沢市を除く）の過去には5月、6月、10月に幼稚園や小学校および老人福祉施設での感染性胃腸炎の集団発生から、ノロウイルス、A群ロタウイルス、サポウイルスおよびC群ロタウイルスが検出された。そこで、時期・年齢に関わらず原因ウイルスの検索を行った。

平成20年4月から平成21年3月に感染性胃腸炎と診断された患者の便247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

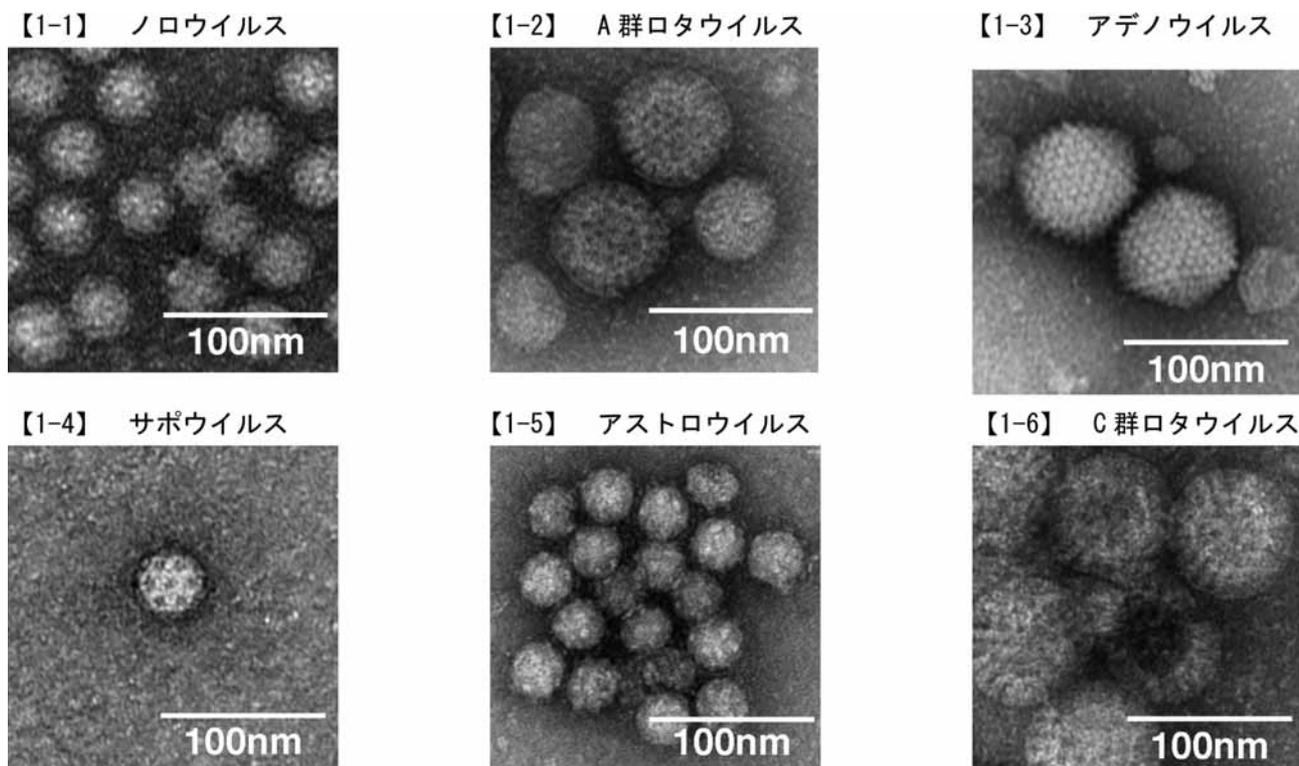


図1 平成20年度に検出されたウイルスの電顕像

ス、サポウイルス、アストロウイルスおよびC群ロタ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アデノ（積水メディカル株）、サポウイルスおよびアストロウイルスにはPCR、C群ロタウイルスにはC群ロタウイルス検出用試薬（デンカ生研株）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、247検体中153検体から感染性胃腸炎の原因ウイルスが検出された。検出数は、ノロウイルスが86検体、A群ロタウイルスが17検体、アデノウイルスが13検体、サポウイルスが17検体、アストロウイルスが16検体およびC群ロタウイルスが4検体であった（表1）。定点医療機関からの検体において感染性胃腸炎の患者よりC群ロタウイルスが複数検出されたのは初めてのことであった。

患者の年齢を6歳以下、7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、ノロウイルスとアストロウイルスは全ての年齢層で検出された。A群ロタウイルスは6歳以下からの検出数が多く、A群およびC群ロタウイルスは13歳から22歳では検出されなかったが、23歳以上から僅かながら検出された。アデノウイルスは6歳以下のみで検出された。サポウイルスは64歳以下の各年齢層から検出された（表1）。

月別の検出状況をみると、平成20年4月には19年度の流行の最後と思われるノロウイルスが2例、A群ロタウイルスが8例、アデノウイルスが1例、サポウイルスが4例検出された。5月にはノロウイルスが6例（食中毒疑いの5例を含む）、A群ロタウイルスとアストロウイルスが1例ずつ、アデノウイルスが4例、サポウイルスが2例検出された。6月にはアデノウイルスとサポウイルスが1例ずつ、アストロウイルスが3例検出され、7月にサポウイルスとアストロウイルスが2例ずつ検出された。19年度にはウイルスが検出されなかった8月にも、今年度はアデノウイルスが1

例とアストロウイルスが4例検出された。その後9月にA群ロタウイルス2例、10月にノロウイルス1例とアストロウイルス2例が検出され、11月のノロウイルス6例、アデノウイルスとアストロウイルス1例ずつ、サポウイルス2例を皮切りにそれ以降は12月にノロウイルス27例、アデノウイルスとアストロウイルスが1例ずつ、サポウイルス2例、平成21年1月にノロウイルス23例（生食用カキを食べた2例を含む）、アデノウイルス3例、サポウイルス1例、2月にノロウイルス14例、A群ロタウイルス2例、サポウイルス1例、アストロウイルス2例、3月にノロウイルス7例、A群ロタウイルス4例、アデノウイルス1例、サポウイルス2例、C群ロタウイルス4例と一年を通じてウイルスが検出された（表2）。

検出されたノロウイルスのgenogroupをみると、86検体のうち80検体がgenogroup II、4検体がgenogroup Iであった。また生食用のカキを食べた2日後に下痢と嘔吐の症状を呈した2症例からは、genogroup Iとgenogroup IIが検出された。ノロウイルスの流行は、平成20年11月から平成21年3月であったが、genogroup Iは、平成21年1月に1例、2月に1例、3月に2例検出された。A群ロタウイルスの流行は、平成21年2月からであった。アデノウイルスは、年間を通して検出された。サポウイルスは、今年度は流行期が見られず、8月から10月を除きウイルスが検出され、アデノウイルス同様に年間を通して検出されていた。アストロウイルスは6月から8月に流行していたが、その後もアデノウイルスやサポウイルス同様ウイルスが検出されていた（表2）。

平成20年度の調査において興味深いのはC群ロタウイルスが平成21年3月に4例見られたことであった。神奈川県（川崎市、横浜市、横須賀市、相模原市および藤沢市を除く）においてC群ロタウイルスは小学校などでの集団発生の場合が多く、それ以外ではあまり確認されていない。C群ロタウイルスの検出された4例について検体情報と臨床症状をまとめた（表3）。

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	アストロウイルス	C群ロタウイルス
6歳以下	55	15	13	10	10	2
7～12歳	7	0	0	4	2	1
13～22歳	2	0	0	1	2	0
23～64歳	17	1	0	2	1	1
65歳以上	4	1	0	0	1	0
年齢不詳	1	0	0	0	0	0
合計	86	17	13	17	16	4

検出されたのは小田原と茅ヶ崎地域で、1例を除き小学校低学年以下の年齢であった。小田原地域では平成21年3月の月上旬に3症例から検出され、茅ヶ崎地域では平成21年3月の中旬に1症例から検出された。小田原地域ではこの時期にC群ロタウイルスの流行が起こり、茅ヶ崎地域では散発的な発生であった可能性が考えられた。今後遺伝子解析等をする事によりこれらウイルスの詳細が明らかになると考えられる。また臨床症状は嘔吐が無く、下痢のみの軽い症例は1例で、下痢・嘔吐が続き、痙攣や中枢神経症状を引き起こしてしまう症例もあった。比較的軽い症例と重篤な症例

があることがウイルス株の違いによるものなのかなどは今後の検討課題である。

今後も引き続き本調査を継続するにあたり、定点医療機関への検査結果の迅速な還元や病原微生物検出情報等により広く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々に深謝いたします。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21年8月11日受理)

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			A群ロタウイルス	アデノウイルス	サポウイルス	アストロウイルス	G群ロタウイルス
	genogroup I	genogroup II	genogroup I & II					
平成20年 4月	0	2	0	8	1	4	0	0
5月	0	6 <sup>※1</sup>	0	1	4	2	1	0
6月	0	0	0	0	1	1	3	0
7月	0	0	0	0	0	2	2	0
8月	0	0	0	0	1	0	4	0
9月	0	0	0	2	0	0	0	0
10月	0	1	0	0	0	0	2	0
11月	0	6	0	0	1	2	1	0
12月	0	27	0	0	1	2	1	0
平成21年 1月	1	20	2 <sup>※2</sup>	0	3	1	0	0
2月	1	13	0	2	0	1	2	0
3月	2	5	0	4	1	2	0	4
合計	4	80	2	17	13	17	16	4

※1：食中毒疑いの5症例を含む。

※2：発症の2日前に生食用カキを食べた症例。

表3 感染性胃腸炎患者に対する臨床症状（C群ロタウイルス検出事例）

検体情報							臨床症状						備考	
定点地域	発病日	検体採取日	病日	年齢		性別	発熱	最高℃	胃腸炎					
				歳	ヶ月				下痢	血便	嘔気	嘔吐		腹痛
小田原	2009/3/5	2009/3/6	2	4	11	女			+					
小田原	不明	2009/3/9		8	5	男			+		+			
小田原	2009/3/9	2009/3/14	6	50		女			+			+		
茅ヶ崎	2009/3/18	2009/3/19	2	3	9	男	+	38.9	+				+	痙攣、中枢神経症状

資料

神奈川県におけるつつが虫病の発生状況  
(平成20年度)

片山 丘, 古屋由美子

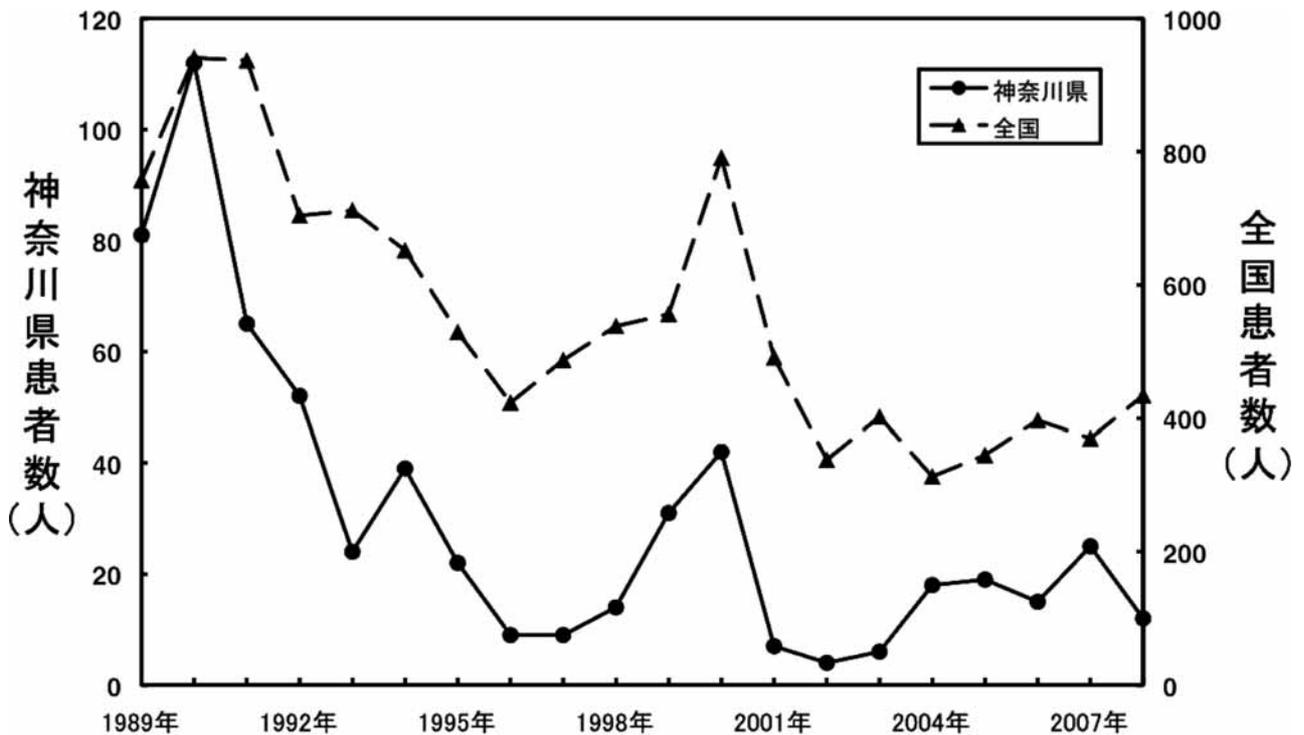
Occurrence of Tsutsugamushi  
Disease in Kanagawa Prefecture  
(2008)

Takashi KATAYAMA and Yumiko FURUYA

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型と, 日本各地で春期や秋期に非アカツツガムシが媒介する新型が知られているが, 全国的に1951年をピークに1960年代後半には発生数が一桁となりほぼ制圧された

と考えられていた. しかし1980年代になり各地で新型つつが虫病患者が再び急増し, 1984年には全国で約1,000名の患者発生に至った. その後患者数は徐々に減少する傾向であったが, 2000年には一時増加がみられ, 2002年からの3年間の患者数は300から400名で推移している. 神奈川県での患者発生数の推移は, 全国の患者発生数とほぼ同じ傾向がみられ, 1990年に112名の患者が報告された後減少傾向を示し, 1996年, 1997年には9名となった. 1998年より増加傾向に転じ, 1999年35名, 2000年42名の患者が報告された. その後再び減少傾向を示し, 2001年7名, 2002年4名, 2003年5名となったが, 2004年から2007年はやや増加して18名, 19名, 15名, 25名と推移した. 2008年の患者数は, 前年のおよそ半分である12名に減少したが, 全国の患者発生数は前年に対し増加した(図1).

神奈川県では, 1990年から1992年の3年間に神奈川県希少感染症対策事業として, 県健康増進課, 足柄上保健福祉事務所, 足柄上医師会, 衛生研究所が協力してつつが虫病の検査体制の整備, 地域の医療機関およ



(全国患者数の1999年3月までは「厚生省伝染病統計」、1999年4月以降は「感染症発生動向調査」より)

図1 つつが虫病患者発生状況

び住民への啓発を行った。検査体制は従来行っていた immunofluorescence assay (IF) による血清診断に加え、1994年より polymerase chain reaction (PCR) によるつつが虫病の迅速診断および感染株の型別を行うことにより、医療機関に早期に診断結果の報告が行われるなど、情報が速やかに還元されている。

2008年4月から2009年3月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22例、小田原保健福祉事務所管内1例、秦野保健福祉事務所管内1例、茅ヶ崎保健福祉事務所管内1例の合計25例であった。

これらの検体について検査結果を表1にまとめた。10例がIFによる急性期・回復期の血清抗体価の上昇(4倍以上の差)から陽性と判定され、つつが虫病患者と診断された。10例は急性期の血液のみの検査で、IF

表1 つつが虫病を疑われた患者のIFとPCRによる検査結果

検体番号	性別	年齢	採血日	Gilliam		Karp		Kato		Kawasaki		Kuroki		IF判定	PCR結果	総合判定
				IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG			
H20-1	女	44	2008/6/27	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H20-2	男	52	2008/8/26	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H20-3	女	77	2008/10/12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H20-4※	女	11	2008/10/15 2008/10/22 2008/11/7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(R.j)	陽性(R.j)	日本紅斑熱
H20-5	男	39	2008/9/17 2008/9/20 2008/9/30	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	NT	陰性
H20-6	男	59	2008/10/24 2008/11/5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kw)	陰性	陽性
H20-7	女	41	2008/10/28	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H20-8	男	64	2008/10/30	40	<10	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性 分離陽性
H20-9	女	78	2008/11/5 2008/11/18	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
H20-10	男	35	2008/11/7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kr)	陽性
H20-11	男	49	2008/11/9 2008/11/16	80	<10	20	<10	40	<10	≥320	20	20	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
H20-12	男	59	2008/11/11 2008/11/15	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
H20-13	女	64	2008/11/11 2008/11/21	≥320	160	80	160	80	160	≥320	160	80	160	陽性	陽性(Kw)	陽性
H20-14	男	59	2008/11/12 2008/11/19	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	陽性	陽性(Kw)	陽性 分離陽性
H20-15	女	77	2008/11/19 2008/11/26	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
H20-16	男	78	2008/11/26 2008/12/11	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
H20-17	男	33	2008/11/26	40	20	40	20	40	20	≥320	80	40	20	陽性	陽性(Kw)	陽性
H20-18	女	68	2008/11/26	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H20-19	男	78	2008/11/27 2008/12/11	≥320	<10	≥320	<10	≥320	<10	≥320	<10	≥320	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
H20-20	男	74	2008/12/2	160	80	≥320	≥320	≥320	80	160	40	<10	≥320	陽性	陽性(Kp)	陽性
H20-21	男	33	2008/12/10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H20-22	男	65	2008/12/26	20	40	20	10	20	<10	10	<10	40	40	保留	陽性(Kp)	陽性
H20-23	男	12	2009/2/10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H20-24	女	58	2009/3/1 2009/3/14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
H20-25	男	28	2009/3/14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性

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

※ : 日本紅斑熱患者

では判定できず判定保留となった。4例は抗体が検出されず陰性と判定された。検体番号 H20-4 はつつが虫病検査は陰性であったが、同時に行った紅斑熱群リケッチアを検出するプライマーを用いた PCR により *Rickettsia japonica* の DNA が検出された。

IF で陽性であった10例のうち、PCR による急性期の血液を用いた *Orientia tsutsugamushi* DNA の検出では9例から DNA が検出された。また IF で判定保留の2例からも DNA が検出され、陽性と判定され

たことから、合わせて11例が DNA 検出でつつが虫病と診断された。しかし IF で陽性であった10例中1例で DNA が検出されなかった。以上のことから IF と PCR の検査を併用することにより、早期に診断が可能なおうえ IF で判定保留の例や PCR で DNA が検出されない例についても診断が可能であった。

つつが虫病はテトラサイクリン系薬剤の投与により完治する病気であるが、適切な治療が行われないと死亡する例もあり、他の病気との鑑別のためにも早期に

Kawasaki	1	CCTCAACCTACTATAATGCCTATAAGTATAGCGGATCGTGATTTGGGAGTTGATACTGAC	60
H20-8-1p	1	CCTCAACCTACTATAATGCCTATAAGTATAGCGGATCGTGATTTGGGAGTTGATACTGAC	60
H20-14-1p	1	CCTCAACCTACTATAATGCCTATAAGTATAGCGGATCGTGATTTGGGAGTTGATACTGAC	60
Kawasaki	61	ATTCTTGCTCAGGCTGCTGTTGGACAACAACAGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGAAGAT	120
H20-8-1p	61	ATTCTTGCTCAGGCTGCTGTTGGACAACAACAGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGAAGAT	120
H20-14-1p	61	ATTCTTGCTCAGGCTGCTGTTGGACAACAACAGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGAAGAT	120
Kawasaki	121	AGGATTGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGGTCCCAGATTCTCAGAAT	180
H20-8-1p	121	AGGATTGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGGTCCCAGATTCTCAGAAT	180
H20-14-1p	121	AGGATTGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGGTCCCAGATTCTCAGAAT	180
Kawasaki	181	CCTAATGCTAGAGTTGTAATCCTGTATTGTTAAATATTACTCAAGGGGCACCTAATGTA	240
H20-8-1p	181	CCTAATGCTAGAGTTGTAATCCTGTATTGTTAAATATTACTCAAGGGGCACCTAATGTA	240
H20-14-1p	181	CCTAATGCTAGAGTTGTAATCCTGTATTGTTAAATATTACTCAAGGGGCACCTAATGTA	240
Kawasaki	241	AATCCTAGACCTCGGCAAAATCTTAATATACTTGATCATGATCAATGGAGGTATTTGGTA	300
H20-8-1p	241	AATCCTAGACCTCGGCAAAATCTTAATATACTTGATCATGATCAATGGAGGTATTTGGTA	300
H20-14-1p	241	AATCCTAGACCTCGGCAAAATCTTAATATACTTGATCATGATCAATGGAGGTATTTGGTA	300
*			
Kawasaki	301	GTTGGTGTACC GCATTGTCAAATGCTAATAAACCTAGCGTTTCTTCTGTTAAAGTATTA	360
H20-8-1p	301	GTTGGTGTACC GCATTGTCAAATGCTAATAAACCTAGCGTTTCTTCTGTTAAAGTATTA	360
H20-14-1p	301	GTTGGTGTACC GCATTGTCAAATGCTAATAAACCTAGCGTTTCTTCTGTTAAAGTATTA	360
Kawasaki	361	AGTGACAAAATTACTCAGATATATAGTGATATAAGGCAATTCGCTAAGATAGCTAATATT	420
H20-8-1p	361	AGTGACAAAATTACTCAGATATATAGTGATATAAGGCAATTCGCTAAGATAGCTAATATT	420
H20-14-1p	361	AGTGACAAAATTACTCAGATATATAGTGATATAAGGCAATTCGCTAAGATAGCTAATATT	420
Kawasaki	421	GAAGTTCCTGGCGCTCCTTTGCCTAATAGTGCATCTGTTG	460
H20-8-1p	421	GAAGTTCCTGGCGCTCCTTTGCCTAATAGTGCATCTGTTG	460
H20-14-1p	421	GAAGTTCCTGGCGCTCCTTTGCCTAATAGTGCATCTGTTG	460

図2 分離株と Kawasaki 株との遺伝子の比較

確定診断することが重要である。今後も PCR と IF 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考えられた。PCR による DNA の検出においては、DNA 抽出キットや PCR に用いる酵素の検討を行い、遺伝子の検出率が向上しているが、未だに DNA が検出されない場合があることから、さらなる試薬の変更や改良が今後の課題と考える。

PCR により *O. tsutsugamushi* DNA の検出された 11 例について、型別用のプライマーを用いた PCR を行い、神奈川県内で発生しているつつが虫病の感染株について検索を行った (表 1)。今回県内で感染が見られた株は、Kawasaki, Kuroki, Karp の 3 株であり、それぞれ 8 例 (72.7%)、1 例 (9.1%) および 2 例 (18.2%) であり、例年と同様にその大部分が Kawasaki 株による感染であることが判明した。

昨年度と同様に培養細胞によるつつが虫病患者血液からの病原体の分離を実施した。急性期の PCR で DNA が検出された検体について、分離培養を行ったところ、今年度は 2 検体 (H20-8, H20-14) より病原体 *O. tsutsugamushi* が分離された。この病原体は、患者血清と高い反応性を有していることからこれら患者の病因であることが示唆された。また PCR による型別により *O. tsutsugamushi* の Kawasaki 株であることが示唆されたが、遺伝子解析の結果、分離株では 251 番目の C が T に変化していることが確認された

ため (図 2)、さらに詳細な検討が必要である。病原体を分離し遺伝子の解析を行うことは、県内で発生しているつつが虫病的解析や検討を行う上で重要なことであり、今後も病原体の分離を実施していく必要がある。

つつが虫病患者より聞き取り調査で得られた感染推定地域は、足柄上郡山北町と南足柄市に集中しており過去の発生状況と同じであった (図 3-A)。また感染推定地域に型別された病原体の株を示すと、山北町は Kawasaki 株 2 例および Kuroki 株 1 例、南足柄市は Kawasaki 株 3 例および Karp 株 1 例、小田原市、秦野市および二宮町は Kawasaki 株が 1 例ずつ、大井町は Karp 株 1 例であった (図 3-B)。発生時期は 10 月から 12 月で、11 月が 64% を占めていた。感染時の行動は、田畑などでの農作業が多く、次に山菜取りなどの山作業であり日常生活での感染の機会が多かった。県内におけるつつが虫病発生数の増減とツツガムシの発生数に関連性があるか検討を行うためにも、今後ツツガムシの発生数を現地調査し、患者発生数との関連性を調べるということが重要であると思われた。

最後になりましたが、患者情報の収集に御協力いただきました医療機関の先生方々および衛生研究所への迅速な検体輸送に御尽力いただきました保健福祉事務所保健予防課、県健康増進課の方々に深謝いたします。

(平成 21 年 8 月 11 日受理)

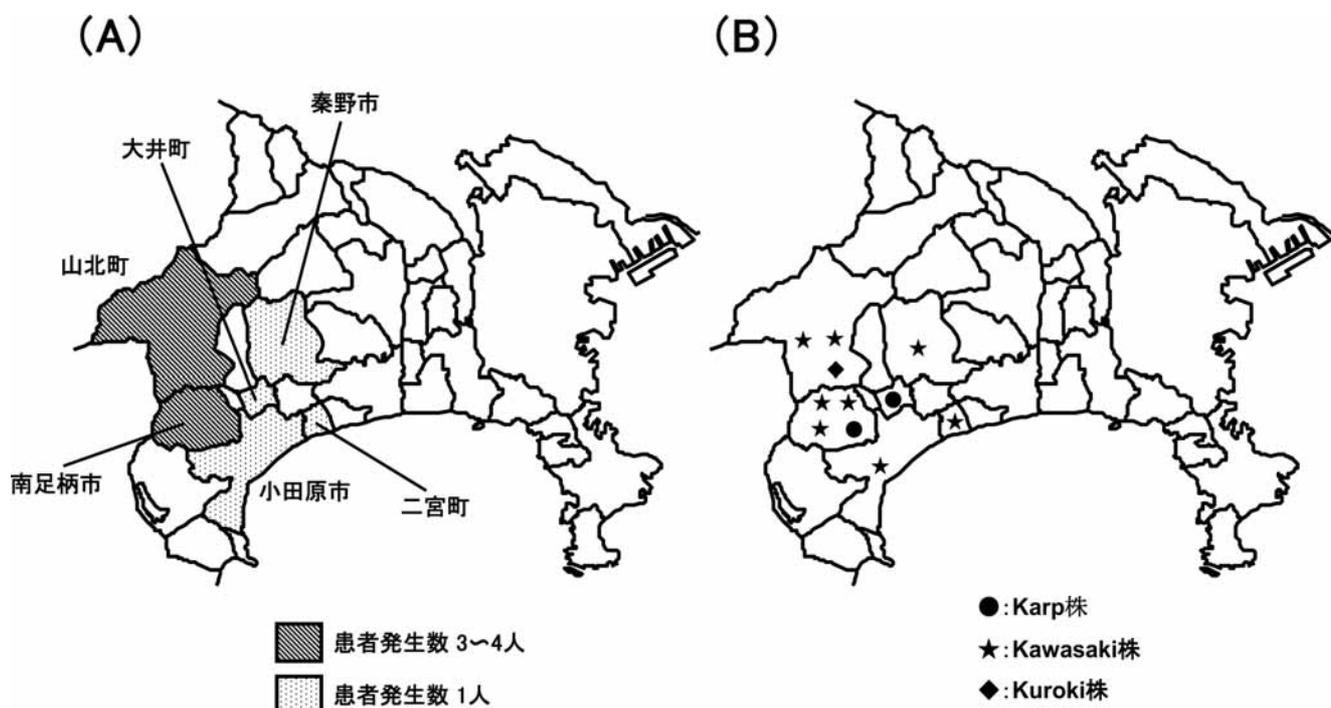


図 3 つつが虫病発生地域と感染株 (2008年)

## 資料

### 遺伝子組換え食品の分析結果 (平成20年度)

大森清美, 服部愛希, 酒井康宏,  
関戸晴子, 岸 弘子

#### Investigation on the qualitative and quantitative analysis of genetically modified foods in Kanagawa Prefecture (2008)

Kiyomi OHMORI, Aki HATTORI, Yasuhiro SAKAI,  
Haruko SEKIDO and Hiroko KISHI

#### はじめに

2009年現在, 25カ国で遺伝子組換え (GM) 作物の商業栽培が行われており, その耕地面積は年々増加の一途をたどっている<sup>1)</sup>. 最も広い耕地面積で栽培されている GM 作物は大豆であり, 次いでトウモロコシとなっている<sup>1)</sup>. 近年, 日本における食糧の海外依存率は増大<sup>2)</sup>しており, 大豆穀粒は95%以上, トウモロコシ穀粒は100%を海外からの輸入に頼っている<sup>2)</sup>. それらの大豆およびトウモロコシの最大生産国であるアメリカでは, 大豆耕地面積の90%以上が GM 大豆, トウモロコシ耕地面積の70%以上が GM トウモロコシを栽培しており, 意図的もしくは非意図的にかかわらず, 非遺伝子組換え (non-GM) 作物への GM 作物混入が危惧されている. また, GM パパイアについては, 開発および生産国であるアメリカ (ハワイ州) では商業栽培や流通が許可されているが, 日本では安全性審査が終了していないため, 食品としての流通が許可されていない. このように生産・輸出国と輸入国での承認状況が異なる GM 作物については, 収穫や梱包時における GM 作物の混入も危惧される. その他, 開発国においても安全性未審査の GM トウモロコシ (種子) や GM コメが, 市場に流出もしくは流通した事件もあった<sup>3, 4)</sup>. 我が国においては, 安全性未審査の GM 作物は, 食品としての流通が禁止されており, 安全性審査済みの GM 作物については

原料表示が義務付けられている. それらの事項が正しく行われていることを確認する方法として, 厚生労働省は, 試験法に関する通知を発令している<sup>5, 6)</sup>. 神奈川県では, GM 食品の表示が義務化された2001年 (平成13年) 4月から検査を開始し, 以来, GM 食品の表示および安全性未審査の GM 作物混入を監視するための検査を続けている. 本報では, 2008年度 (平成20年度) に神奈川県が実施した GM 食品検査の結果について報告する.

#### 方 法

試験方法は, 厚生労働省から発令されている通知<sup>5, 6)</sup> および農林水産消費技術センターにより公表されている JAS 分析試験ハンドブック<sup>7)</sup> に従い, 安全性未審査の組換え遺伝子については定性試験を, 安全性審査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, 平成20年に実施した検査項目及び品目ごとの試験方法を示した.

大豆の組換え遺伝子検査については, 通知<sup>5)</sup> では大豆穀粒のみを対象とした定量試験が提示されており, 大豆加工食品については対象外となっている. しかし, 大豆加工食品への GM 大豆「非表示」混入に対する消費者の不安が大きいことから, 神奈川県では, 比較的加工程度が低いと考えられる大豆加工食品については通知法に準じた定量試験を実施している. ただし, それらの加工食品の定量結果において表示違反が疑われた場合には, 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, DNA 測定装置に NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologie 株), 遺伝子増幅装置に GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 株), 電気泳動装置に Mupid ミニゲル泳動装置 (アドバンス株), ゲル撮影装置に BIOINSTRUMENT AE-6905H Image Saver HR (ATTO 株), 遺伝子定量装置に ABI PRISM7900HT (Applied Biosystems 株) を用いた.

#### 結果および考察

##### 1. 安全性未審査組換え遺伝子の定性試験結果

安全性未審査の組換え遺伝子であるパパイア組換え系統: 55-1, トウモロコシ組換え系統: CBH351お

表 1 平成20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	4	定性	PCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	55-1	Papain
	ライスベーパー	1					
	ビーフン	2		PCR-			
	白玉粉	3	定性	アガロースゲル電気泳動法	(NIPPON GENE) GM quicker2変法	Btコメ	SPS
	餅 煎餅	3 5					
トウモロコシ	トウモロコシ青果	4			(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	CBH351	
	トウモロコシ穀粒	4		PCR-		Bt10	
	コーンスナック菓子	6	定性	アガロースゲル電気泳動法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法		Zein
	コーンスープ	2			(QIAGEN) Genomic-tip Kit 法	CBH351	
	トウモロコシ缶詰 トウモロコシ青果 トウモロコシ穀粒	4 4 4	定量	リアルタイムPCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	35S・GA21	SS II b
大豆	大豆穀粒	12			(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法 /		
	冷凍枝豆	10			(QIAGEN) Genomic-tip Kit 法	RRS	Le1
	豆腐	12	定量	リアルタイムPCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法 /		
	厚揚げ	2			(QIAGEN) Genomic-tip Kit 法		
	豆乳	8					
	合計	38	定性				
		52	定量				

表 2 平成20年度 組換え遺伝子定性試験結果

検体No	品目	原料産地	試験項目	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
1	パパイヤ青果	ハワイ	定性試験	55-1	不検出	なし
2	パパイヤ青果	フィリピン	定性試験	55-1	不検出	なし
3	パパイヤ青果	フィリピン	定性試験	55-1	不検出	なし
4	パパイヤ青果	ハワイ	定性試験	55-1	不検出	なし
5	トウモロコシ青果	日本	定性試験	CBH351/Bt10	不検出	なし
6	トウモロコシ青果	日本	定性試験	CBH351/Bt10	不検出	なし
7	トウモロコシ青果	日本	定性試験	CBH351/Bt10	不検出	なし
8	トウモロコシ青果	日本	定性試験	CBH351/Bt10	不検出	なし
9	トウモロコシ穀粒	アメリカ	定性試験	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
10	トウモロコシ穀粒	アメリカ	定性試験	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
11	トウモロコシ穀粒	アメリカ	定性試験	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
12	トウモロコシ穀粒	アメリカ	定性試験	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
13	コーンスナック菓子	不明	定性試験	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
14	コーンスナック菓子	不明	定性試験	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
15	コーンスナック菓子	不明	定性試験	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	定性試験	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	定性試験	CBH351	不検出	遺伝子組換えコーンが混じらないよう栽培し、分別管理された
18	コーンスナック菓子	オーストラリア	定性試験	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
19	コーンスープ	不明	定性試験	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
20	コーンスープ	アメリカ	定性試験	CBH351	不検出	なし
21	トウモロコシ缶詰	不明	定性試験	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
22	トウモロコシ缶詰	不明	定性試験	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
23	トウモロコシ缶詰	不明	定性試験	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
24	トウモロコシ缶詰	アメリカ	定性試験	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
25	ライスベーパー	ベトナム	定性試験	Btコメ	不検出	なし
26	ビーフン	タイ	定性試験	Btコメ	不検出	なし
27	ビーフン	タイ	定性試験	Btコメ	不検出	なし
28	白玉粉	日本	定性試験	Btコメ	不検出	なし
29	白玉粉	日本	定性試験	Btコメ	不検出	なし
30	白玉粉	日本	定性試験	Btコメ	不検出	なし
31	餅	日本	定性試験	Btコメ	不検出	なし
32	餅	日本	定性試験	Btコメ	不検出	なし
33	餅	日本	定性試験	Btコメ	不検出	なし
34	煎餅	不明	定性試験	Btコメ	不検出	なし
35	煎餅	不明	定性試験	Btコメ	不検出	なし
36	煎餅	不明	定性試験	Btコメ	不検出	なし
37	煎餅	不明	定性試験	Btコメ	不検出	なし
38	煎餅	不明	定性試験	Btコメ	不検出	なし

よび Bt10, コメ組換え系統; Bt コメの定性試験結果を表 2 に示した. いずれの検体から得られた DNA 試験原液についても, 組換え遺伝子は不検出であった.

2. 安全性審査済み組換え遺伝子の定量試験結果

安全性審査済みの組換え遺伝子であるトウモロコシ組換え系統; Event176, Bt11, T25, Mon810, GA 21, および大豆組換え系統; Roundup Ready Soybean (RRS) について定量試験を行った. ただし, トウモ

表3 平成20年度 組換え遺伝子定量試験結果

検体No	品目	原料産地	試験項目	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
1	トウモロコシ青果	日本	定量試験	35S-GA21	不検出	なし
2	トウモロコシ青果	日本	定量試験	35S-GA21	不検出	なし
3	トウモロコシ青果	日本	定量試験	35S-GA21	不検出	なし
4	トウモロコシ青果	日本	定量試験	35S-GA21	不検出	なし
5	トウモロコシ穀粒	アメリカ	定量試験	35S-GA21	不検出	遺伝子組換えでない
6	トウモロコシ穀粒	アメリカ	定量試験	35S-GA21	不検出	遺伝子組換えでない
7	トウモロコシ穀粒	アメリカ	定量試験	35S-GA21	不検出	遺伝子組換えでない
8	トウモロコシ穀粒	アメリカ	定量試験	35S-GA21	不検出	遺伝子組換えでない
9	大豆穀粒	カナダ	定量試験	RRS	不検出	なし
10	大豆穀粒	カナダ	定量試験	RRS	不検出	なし
11	大豆穀粒	カナダ	定量試験	RRS	不検出	なし
12	大豆穀粒	カナダ	定量試験	RRS	不検出	なし
13	大豆穀粒	カナダ	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.04%)	なし
14	大豆穀粒	アメリカ	定量試験	RRS	不検出	なし
15	大豆穀粒	アメリカ	定量試験	RRS	不検出	なし
16	大豆穀粒	アメリカ	定量試験	RRS	不検出	なし
17	大豆穀粒	アメリカ	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.05%)	なし
18	大豆穀粒	日本	定量試験	RRS	不検出	なし
19	大豆穀粒	日本	定量試験	RRS	不検出	なし
20	大豆穀粒	中国	定量試験	RRS	不検出	なし
21	冷凍枝豆	中国	定量試験	RRS	不検出	なし
22	冷凍枝豆	中国	定量試験	RRS	不検出	なし
23	冷凍枝豆	台湾	定量試験	RRS	不検出	なし
24	冷凍枝豆	台湾	定量試験	RRS	不検出	なし
25	冷凍枝豆	台湾	定量試験	RRS	不検出	なし
26	冷凍枝豆	タイ	定量試験	RRS	不検出	なし
27	冷凍枝豆	タイ	定量試験	RRS	不検出	なし
28	冷凍枝豆	不明	定量試験	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
29	冷凍枝豆	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.005%)	なし
30	冷凍枝豆	日本	定量試験	RRS	不検出	なし
31	豆腐	不明	定量試験	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
32	豆腐	不明	定量試験	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
33	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.005%)	遺伝子組換えでない
34	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.006%)	遺伝子組換えでない
35	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.007%)	遺伝子組換えでない
36	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.01%)	遺伝子組換えでない
37	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.01%)	遺伝子組換えでない
38	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	遺伝子組換えでない
39	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.04%)	遺伝子組換えでない
40	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.04%)	遺伝子組換えでない
41	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.07%)	遺伝子組換えでない
42	豆腐	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.1%)	遺伝子組換えでない
43	厚揚げ	不明	定量試験	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
44	厚揚げ	不明	定量試験	RRS	不検出	なし
45	豆乳	アメリカ	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.06%)	遺伝子組換えでない
46	豆乳	アメリカ	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.1%)	遺伝子組換えでない
47	豆乳	アメリカ	定量試験	RRS	検知不能	遺伝子組換えでない
48	豆乳	日本	定量試験	RRS	検知不能	遺伝子組換えでない
49	豆乳	日本	定量試験	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
50	豆乳	日本	定量試験	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
51	豆乳	不明	定量試験	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
52	豆乳	不明	定量試験	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	遺伝子組換えでない

ロコシ組換え系統4種 (Event176, Bt11, T25, Mon 810) については、通知法に記載されたスクリーニング試験である35S プロモーター配列の定量試験を行った(表3)。その結果、トウモロコシ組換え系統は、トウモロコシ青果および穀粒ともに、リアルタイムPCRにおける反応が終了する45サイクルまで35S および GA21 の PCR 増幅が全く検出されず、組換え遺伝子は不検出であった。

次に、大豆組換え系統の RRS 定量結果では、大豆穀粒12検体中、カナダ産およびアメリカ産の計2検体で0.04%および0.05%の微量混入が認められた。これらについては、定量下限値 (0.5%)<sup>8)</sup> 未満であり定

量値としての信頼性を満たす数値ではないが、定性的な目的によりおおよその値として求めた。冷凍枝豆についても、10検体中1検体で更に微量の混入 (0.005%) が認められ、豆腐でも、12検体中10検体で定量下限値未満の混入 (0.005~0.1%) が認められた。しかし、厚揚げ2検体についてはいずれも不検出であった。豆乳では、8検体中3検体で微量混入が認められ (0.02~0.1%)、そのうち2検体はアメリカ産の大豆を原料としていた。検体 No. 47および48の豆乳は、大豆内在性遺伝子 Le 1 のコピー数が、当所における下限値の目安である10000コピーを下まわったことから、検知 (定量) 不能の判定となった。これら検

知不能となった豆乳の DNA 試料原液の濃度は、125 ng/μL および 515 ng/μL と高濃度であり、DNA の精製度の指標とされる 260nm/280nm の吸光度比は 1.91~1.95、260nm/230nm の吸光度比も 2.1~2.2 といずれも良好な精製状態を示す値であった。しかし、DNA 試料原液を 20ng/μL に希釈後、定量 PCR を実施した結果では、Le 1 のコピー数は 4000 前後と低値であった。そこで、DNA 試料液の濃度を 4 倍 (80ng/μL) とし、定量 PCR を実施した結果、Le 1 は 18000~19000 コピーとなり、20ng/μL での Le 1 コピー数の 4~5 倍に増大した。したがって、検知不能となった豆乳 2 検体における Le 1 コピー数不足の原因は、豆乳の原料由来成分による PCR 反応の阻害によるものではなく、Le 1 遺伝子が断片化することにより PCR 増幅ができない状態になっていたか、もしくは大豆以外の食品に由来する DNA が DNA 試料原液中に混在することにより、20ng/μL に希釈後の DNA 試料液中の Le 1 遺伝子の量が少なかったことによる可能性が考えられた。

## ま と め

平成 20 年度の組換え遺伝子検査結果において、パパイヤ、トウモロコシおよびコメ加工食品の安全性未審査の組換え DNA 系統については、38 検体全てが不検出であった。

安全性審査済み組換え DNA 系統の定量試験については、トウモロコシ穀粒および青果の 35S (Mon810, T25, Bt11, Event176 のスクリーニング)、GA21 は不検出であったが、大豆穀粒の RRS は、定量下限値未満ながら、微量の混入が認められた。大豆加工食品の RRS 定量については、冷凍枝豆では平成 15 年度の検査開始以来、平成 19 年度まではすべて不検出であったが<sup>9-13)</sup>、平成 20 年度に初めて 1 検体で微量混入が認められた。豆腐および豆乳における RRS 微量混入は、平成 19 年度には検知不能の検体を除くすべて (20/20) で検出されたが<sup>13)</sup>、平成 20 年度は、豆腐で 10/12、豆乳は 3/6 (検知不能 2 検体を除く) で微量混入が認められた。大豆穀粒および大豆加工食品での RRS 微量混入は、年度により検出率の変動はあるものの、依然として検出は続いていることから、今後も GM 作物の混入に対する検査を実施し、GM 食品に関わる「表示」の監視を継続していく必要があると考える。

(平成 21 年 8 月 11 日受理)

## 文 献

- 1) Clive James, 2008 ISAAA Report on Global Status of Biotech/GM Crops, International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA), <http://www.isaaa>.
- 2) 農林水産省, 食料需給表 (平成 19 年度版) 活版本
- 3) Nature, 本日のニュース (2005 年 3 月 22 日付)  
〈<http://www.nature.com/news/2005/050321/full/nature03570.html>〉
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部: 遺伝子組換え食品ホームページ, 報道発表資料  
〈<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2007/01/h0126-3.html>〉
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(食安発第 0618001 号, 平成 20 年 6 月 18 日),
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」(食安監発第 0220001 号, 平成 19 年 2 月 20 日)
- 7) JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」(農林水産消費技術センター, 平成 14 年 6 月)
- 8) 米谷民雄: 遺伝子組換え体の検知に関する調査研究, 厚生労働科学研究費補助金 バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究 平成 15 年度総括・分担研究報告書 (H15-食品-003), 65-97 (2004)
- 9) 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)
- 10) 大森清美ほか: 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)
- 11) 大森清美ほか: 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)
- 12) 大森清美ほか: 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 -, 神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 41-44 (2007)
- 13) 大森清美ほか: 組換え DNA 検査における食品の特性と結果の動向 - 平成 19 年度 パパイヤ, コメ, トウモロコシおよび大豆の組換え DNA 検査結果より -, 神奈川県衛生研究所研究報告, 38, 30-34 (2008)

## 資料

### 苦情食品に対する理化学検査の実施状況 (平成20年度)

酒井康宏, 藤巻照久, 岸 弘子, 甲斐茂美,  
大森清美, 関戸晴子, 佐藤久美子, 赤星 猛,  
宮澤真紀, 渡邊裕子, 上村 仁, 佐藤修二

#### Execution condition of physics and chemistry inspection of complaint food

Yasuhiro SAKAI, Teruhisa FUJIMAKI, Hiroko KISHI,  
Shigemi KAI, Kiyomi OHMORI, Haruko SEKIDO,  
Kumiko SATO, Takeshi AKABOSHI,  
Maki MIYAZAWA, Hiroko WATANABE,  
Hitoshi UEMURA and Shuji SATO

#### はじめに

近年、食品に関する事件や事故が相次いで発生し、消費者の食に対する不安や不信感が高まっている。このため、平成20年度は苦情が増加し、異味や異臭を感じた、異物が混入していた、体調に異常を感じたといった苦情が多く寄せられ、その内容も様々であった。食品の安心安全を守るため、迅速に苦情の原因物質を特定し、混入等の原因究明に資することが重要である。本報では、平成20年度における苦情食品の検査状況を報告し、今後の苦情原因究明の一助とする。

#### 平成20年度苦情食品検査実施状況

理化学部における平成20年度苦情食品検査実施件数を表1、実施状況を表2に示した。本年度の理化学部における検査件数は55件であった。味や臭いに異常を感じた事例(異味・異臭)が17件、金属やゴム・プラスチック等の異物が混入していた事例(異物)が28件、喫食した後に体調に異常を感じた事例(有症)が8件、外観等に異常があった事例が2件であった(表2)。また、月毎の件数では、9月から10月にかけて食品の事件・事故に関連した報道が相次いでされたためか、10月に件数が増加した(表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

#### 異味・異臭について

異味の苦情のうち、ジャガイモのえぐみ<sup>\*1</sup>の原因究明では、苦情内容からソラニン類を疑い、衛生試験法・注解2005<sup>1)</sup>を参考に高速液体クロマトグラフィー(以下 HPLC)を用いて検査を行った。これは、検査実施前に苦情内容や衛生監視員の調査結果から検査項目を絞り込み、既存の試験法を参考に検査を行った事例である。また、農薬を検査した事例<sup>\*2</sup>では、ガスクロマトグラフィー(以下 GC)、ガスクロマトグラフィー質量分析法(以下 GC/MS)、高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(以下 LC/MS/MS)を用いた一斉分析法により数十から約二百の農薬を測定し、迅速に検査を行った。異臭の苦情では異味と同様に HPLC, GC, GC/MS, LC/MS/MS を用いる他、苦情食品の揮発成分<sup>\*3</sup>に対してヘッドスペースガスクロマトグラフィー質量分析法(以下 HS/GC/MS)を用いて検査し、異臭の原因物質の特定や異常の有無を確認した。異味・異臭の苦情では、その他の検査項目として、苦情食品が健康を害する可能性があるか確認するための毒性試験<sup>\*4</sup>、密閉された苦情食品に外部から薬品等が注入された可能性があるか確認するためのピンホール検査<sup>\*5</sup>、塩素臭がした事例において食品の残留塩素を測定するための DPD 試薬を用いた検査<sup>\*6</sup>も行った。また、苦情原因である可能性がある物質(例:果物のシンナー臭における酢酸エチル<sup>\*7</sup>、キャンディーの苦みにおけるポリフェノール<sup>\*8</sup>、苦情食品と同じロットの食品、苦情食品と同じ商品で異常のない食品等を対照として用いることにより、苦情の原因物質の特定や苦情食品に異常があるか判断することができた。苦情の原因究明には対照品との比較が有効であった。

#### 異物について

異物の検査では、まず肉眼や実体顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、異物に金属様の特徴がある場合<sup>\*9</sup>は、蛍光 X 線分析、ゴムやプラスチック様の特徴がある場合<sup>\*10</sup>は、フーリエ変換赤外分光光度分析(以下 FT-IR)により、異物の素材判定を行った。骨や歯と疑われる異物<sup>\*11</sup>は蛍光 X 線と FT-IR で検査を行い、プラスチック類、骨、歯、その他人工物のデータとの比較により、材質を判定した。異物が複数の素材から構成されている事例<sup>\*12</sup>では、素材により性質や構造が異なるため、素材同士の接着の様子をよく観察し、素材ごとに検査を実施することが必要であった。また、卵の混入を疑った事例<sup>\*13</sup>では、タンパク質の定性検査(ニンヒドリン反応、キサントプロテイン

反応)や卵タンパクの定性検査等で、物質特有の反応を確認した。その他、ガラスかプラスチックかを判別するための燃焼試験<sup>\*14</sup>、糖度が低くカビが発生した可能性があるか調べるための糖度測定<sup>\*15</sup>、対照品と形状を比較するための厚さ測定<sup>\*16</sup>も異物の検査の一助となった。異物の検査では、製造所で混入した疑いのある物質や、苦情の内容及び形態から異物と同じ、若しくは類似と考えられる物質等を対照品として異物と比較することで原因究明を行い、有益なデータを得ることが出来た。比較した結果、苦情の原因と推測した対照品と異物が類似した事例が多かったが、全く異なる物質であった事例<sup>\*17</sup>もあった。対照品がない事例<sup>\*18</sup>では、異物に含まれる物質や構造を判定するに止まった。

### その他の苦情

異味・異臭を伴わない有症の事例では、異味・異臭と同様に、農薬を検査する場合<sup>\*19</sup>は GC, GC/MS, LC/MS/MS を用いて、揮発成分を調べる場合<sup>\*20</sup>は HS/GC/MS を用いて検査を行った。ソーセイジ中のシアンを検査した事例<sup>\*21</sup>では、平成14年11月21日付け食基発第1121001号及び食監発第1121001号別添「タピオカ

でん粉中のシアン化合物試験法<sup>2)</sup>に準じた検査法を用いた。鍋から白色析出物が生じた事例<sup>\*22</sup>では、誘導結合プラズマ発光分光分析法(以下 ICP)を用いて、含有する金属元素の測定を行った。

### ま と め

食品に関する苦情は多様であり、苦情の原因物質の特定につながる検査法を定めることは容易ではなく、異常の原因が見つからない事例もある。苦情食品を注意深く観察すること、過去の苦情食品の事例から検査法選択の糸口を得ること、対照品と苦情食品を十分に比較することが、苦情の原因究明のために重要である。  
(平成21年8月11日受理)

### 文 献

- 1) 衛生試験法・注解2005, 日本薬学会編, pp. 256 - 257, 金原出版株式会社, 東京 (2005)
- 2) 厚生労働省通知食基発第1121001号及び食監発第1121001号「シアン化合物が検出されたタピオカでん粉の取扱いについて」別添「タピオカでん粉中のシアン化合物試験法」, 平成14年11月21日

表1 苦情食品検査実施件数(平成20年度)

		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
異味・異臭	異味のみ	1				1	1	1	2					6
	異臭のみ	1		1				4	2					8
	異味・異臭	1			1			1						3
異物	金属類						1				1		1	3
	ゴム・プラスチック			2			1						3	6
	その他	1	3	3	2	1	1	1	2	3	1		1	19
その他	有症	1						5	1	1				8
	外観異常等	1	1											2
検査件数月計		6	4	6	3	2	4	12	7	4	2	0	5	55

表2 苦情食品検査実施状況(平成20年度)

区分	件名(内容)	検査項目	検査結果	主な使用機器	*	
異味	トマトの苦み	農薬183種	トルフェンピラド検出(0.04ppm), 基準値未満 フルバリネート検出(0.01ppm), 基準値未満 苦みの原因は不明	GC/FPD, GC/MS, LC/MS/MS	2	
	キャンディーの苦み(異物あり)	ポリフェノール類	緑茶ポリフェノール検出	実体顕微鏡, HPLC	8	
	キャンディーの苦み(異物あり)	ポリフェノール類	緑茶ポリフェノール検出	実体顕微鏡, HPLC	8	
異味 (有症)	ジャガイモのえぐみ	チャコニン, ソラニン	$\alpha$ -チャコニン, $\alpha$ -ソラニン検出	HPLC	1	
	豚カシラハラミの有症苦情	有機リン系農薬33種	不検出	GC/FPD	2	
	冷凍いんげんの異味	ジクロロボス含む農薬33種	不検出	GC/FPD	2	
異臭	ミネラルウォーターの異臭	溶出検査(ビスフェノールA), 蒸発残留物	ビスフェノールA, 蒸発残留物不検出	HPLC, 蒸発残留物		
	エビフライの異臭	揮発性物質	不検出	HS/GC/MS	3	
	梨の異臭	揮発性物質	酢酸エチル, エタノール検出(対照品より多量)	HS/GC/MS	3	
	清涼飲料水の異臭	揮発性物質	トルエン検出	HS/GC/MS	3	
	清涼飲料水の異臭	揮発性物質	ナフタレン, キシレン検出	HS/GC/MS	3	
	魚介類加工品の異臭検査	揮発性物質(酢酸エチル)	酢酸エチルを主体とするエステル類検出	実体顕微鏡, HS/GC/MS	3,7	
	清涼飲料水の有症苦情	有機リン系農薬20種, その他農薬3種 カフェイン, 毒性試験	有機リン系農薬20種, その他農薬3種不検出 カフェイン検出, 毒性認めず	GC/FPD, GC/MS, LC/MS/MS	2,4	
異臭 (有症)	即席カップ麺の異臭	揮発性物質(パラジクロロベンゼン)	不検出	HS/GC/MS	3	
	麻婆茄子の異臭, 苦み 弁当の異臭	有機リン系農薬33種, ピンホール試験 官能検査, 揮発性物質	不検出, ピンホール無し スチレン検出	GC/FPD HS/GC/MS	2,5 3	
異味 異臭 (有症)	シュークリーム	残留塩素, 揮発性物質	残留塩素陽性(DPD試薬を用いた検査) クロロホルム検出	HS/GC/MS	3,6	
異物 金属類	すじ鍋の針金状金属	形態観察, 材質検査	クロム, マンガン, 鉄及びニッケルを 主とするステンレスで対照品に類似	実体顕微鏡, 蛍光X線	9	
	歯科医院の飲料水の 黒色異物	形態観察, 材質検査	鉄を主とする物質	実体顕微鏡, 蛍光X線	9	
	ウーロン茶の金属片	形態観察, 材質検査	銅と亜鉛を主成分とする金属片(真鍮)	実体顕微鏡, 蛍光X線	9,18	
異物 ゴム・ プラスチック	冷凍食品のプラスチック片異物	形態観察, 材質検査	ナイロンと類似した物質	実体顕微鏡, FT-IR	10,18	
	煮魚のビニール状異物	形態観察, 材質検査, 厚さ	異物及び対照品全てポリエチレンを 主とする物質(対照品1と類似)	実体顕微鏡, FT-IR, シクネスゲージ	10,16	
	マーガリンの異物	形態観察, 材質検査	ポリプロピレン及びエチレン/酢酸ビニル 共重合体で構成されるもの	実体顕微鏡, FT-IR	10,12	
	生ハムのゴム手袋様異物	形態観察, 材質検査	対照品(ラテックスゴム手袋)と同一でない 可能性が高い, 素材は不明	実体顕微鏡, FT-IR	10,17	
	パンのゴム手袋様異物	形態観察, 材質検査	対照品(ニトリルゴム手袋)と よく類似していた	実体顕微鏡, FT-IR	10	
	チーズの透明繊維状異物	形態観察, 材質検査	対照品のポリエチレン部位と類似	実体顕微鏡, FT-IR	10	
	カレーパンの半透明 棒状異物	形態観察, 材質検査	鳥の骨に類似	実体顕微鏡, FT-IR, 蛍光X線	11	
異物 その他	がんもどきの銀紙状異物	形態観察, 材質検査	対照品(原料の袋)と極めて類似した物質	実体顕微鏡, FT-IR, 蛍光X線		
	焼き菓子の紙状異物	形態観察, 材質検査	異物はクッキーが付着した紙に類似したもの	実体顕微鏡, FT-IR		
	ウェハースの焦げ状異物	形態観察, 材質検査	ウェハースと類似した物質	実体顕微鏡, FT-IR		
	チーズの糸くず状異物	形態観察, 材質検査	動物の毛	実体顕微鏡, FT-IR		
	惣菜の着色異物	形態観察	ほ乳類の筋肉	実体顕微鏡		
	トルティーヤのカビ状異物	形態観察, 材質検査	アルミニウム及び鉄を含む物質	実体顕微鏡, 蛍光X線	18	
	発酵乳の異物	形態観察, DNA検査	トマトの種子	実体顕微鏡, PCR		
	パンの異物	形態観察, 材質検査, ニンヒドリン反応, キサントプロテイン反応, 卵タンパク定性検査	卵を主とした物質	実体顕微鏡, FT-IR	13	
	黒糖かりんとうの異物	形態観察, 材質検査	菌の詰め物, 義歯に近い成分検出	実体顕微鏡, 蛍光X線, FT-IR	11	
	リンゴジャムのカビ様異物	糖度	糖度:31%(糖度計), かび	糖度計	15,18	
	チーズの黒色糸状異物	形態観察, 材質検査	絹	実体顕微鏡, FT-IR		
	コーンポタージュの黒い異物	形態観察, 材質検査, HPLC	理化学検査では不明 (かび, 植物様小片)	実体顕微鏡, FT-IR, HPLC		
	弁当にビニールの 切れ端と髪の毛	形態観察, 材質検査	人毛, 対照品類似の高密度ポリエチレン	実体顕微鏡, FT-IR		
	牛乳の黒色異物	形態観察, 材質検査	牛乳の炭化物	実体顕微鏡, 蛍光X線		
	すじこおにぎりの異物	形態観察, 材質検査	鮭の骨に類似した物質	実体顕微鏡, FT-IR, 蛍光X線	11	
	あんまんの異物	形態観察, 材質検査	合金等の人工物とは考えにくい物質	実体顕微鏡, 蛍光X線	18	
	パンの毛髪用異物	形態観察, 材質検査	植物由来の繊維に苦情食品が付着した物質	FT-IR		
	麻婆豆腐中の異物	形態観察, 材質検査	ガラスの可能性が高い	実体顕微鏡 蛍光X線, 燃焼試験	14,18	
	その他 (有症)	清涼飲料水の有症苦情	有機リン系農薬20種, 毒性試験	不検出, 毒性認めず	GC/FPD, LC/MS/MS	16
		冷凍いんげんの有症苦情	ジクロロボス含む農薬33種	不検出	GC/FPD	16
しそ巻さらっきょうの有症苦情		有機リン系農薬33種	パラチオン検出(基準値未満), 原因は不明	GC/FPD	16	
冷凍いんげんの有症苦情		ジクロロボス含む農薬33種	不検出	GC/FPD	16	
ソーセージの有症苦情		シアン	不検出	吸光度法	21	
カップ麺の有症苦情		揮発性物質	不検出	HS/GC/MS	20	
鶏つみれ鍋を食べて下痢		有機リン系農薬33種	不検出	GC/FPD	19	
コーヒーの有症苦情		農薬89種	不検出	GC/FPD, GC/MS	16	
その他	鍋の白色物質析出	材質検査, 毒性試験	白い異物はアルミニウムが主成分	ICP	22	
	清涼飲料水に雑状の穴	形態観察, 有機リン系農薬20種, 色度, 官能検査, 毒性試験	有機リン系農薬20種不検出 蓋に穴あり, 毒性認めず	GC/FPD, GC/MS, LC/MS/MS		

\*:本文中の参照番号

## 他誌掲載論文抄録

(平成20年4月～平成21年3月)

### Occurrence of *Cryptosporidium* sp. in snakes in Japan.

Kuroki T, Izumiyama S, Yagita K, Une Y, Hayashidani H, Kuro-o M, Mori A, Moriguchi H, Toriba M, Ishibashi T, Endo T  
Parasitology Research 2008; 103: 801-805.

わが国のヘビにおける *Cryptosporidium* の保有状況を調査した。5種(シマヘビ, アオダイショウ, ヤマカガシ, ジムグリ, マムシ) 469匹のヘビの糞便あるいは腸内容物を対象とし, ヤマカガシのみから *Cryptosporidium* が検出され, 保有率は26%であった。病理学的所見として小腸に増殖性腸炎が認められた。SSrRNA 遺伝子の塩基配列解析では, ヘビから検出された *Cryptosporidium* の遺伝子型は New Guinea viper boa から検出された genotype W11と一致した。

### First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia.

Une Y, Kadokaru S, Tamukai K, Goka K, Kuroki T.  
Dis Aquat Organ. 2008; 82: 157-60.

日本においてアジアで最初のカエルツボカビ感染が認められた。外国産の18種45匹を飼育していたブリーダーのカエルのうち9種23匹に感染が認められ, 16匹が死に, 7匹は治療により回復した。感染が認められたのは, *Lepidobatrachus laevis*, *Ceratophrys cornuta*, *C. cranwelli*, *C. ornata*, *C. calcarata*, *Chacophrys pierotti*, *Occidozyga lima*, *Leptodactylus pentadactylus* および *Plethodontohyla tuberata* であった。

### 日本の地方衛生研究所, 保健所, 結核病床保有病院における結核菌の保管と輸送等の設備と技術

高橋智恵子(神奈川県衛生研究所), 大角晃弘(結核研究所), 堀場昌英(国立病院機構東埼玉病院), 村瀬良朗(結核研究所), 御手洗 聡(結核研究所)  
結核, 83(8), 591-598 (2008)

感染症法における結核菌の保管および輸送等に関して具体的に対応するための基礎的情報を提供することを目的とし, 全国76箇所の地方衛生研究所, 2005年新

肺結核菌陽性登録患者が35人以上であった145箇所の保健所, 2006年10月末時点の結核病床が21床以上の150箇所の病院を検査対象として, 厚生労働省が作成した「病原体等の施設の基準について(案)」と「病原体等の保管等の基準について(案)」の内容に基づく調査票を2007年1月に郵送し, 回収した。その結果, 施設の状況, 結核菌の保管と輸送法等に関して, ほとんどの地方衛生研究所は提案された基準に適合していたが, 保健所や結核病床保有病院では基準に適合している施設の割合にばらつきが認められた。

### 結核をめぐる諸問題

高橋智恵子(神奈川県衛生研究所)  
予防医学, 50, 49-55 (2008)

特集テーマ「いま, あらためて感染症を考える」において結核をめぐる諸問題について述べた。結核の歴史・現状・感染と発症についてふれた後, 今, 抱える問題点として, (1) 高齢者における結核患者の増加, (2) 青年層における結核, (3) 患者発見の遅れ, (4) 多剤耐性結核菌, (5) 国内における外国人の結核の5項目を挙げた。さらに, 衛研で実施している結核対策に結びつく検査として, 感染経路究明のための遺伝子型別検査および結核感染診断としての QFT 検査について解説した。

### 試験管内でセレクションされたマクロライド耐性 *Mycoplasma pneumoniae* について

大屋日登美(神奈川県衛生研究所), 鈴木五三男(茅ヶ崎市立病院), 成田光生(札幌鉄道病院), 岡崎則男(神奈川県衛生研究所)

日本マイコプラズマ雑誌, 35, 47-52 (2008)

試験管内において *Mycoplasma pneumoniae* のマクロライド系薬剤耐性菌のセレクション試験を臨床分離感受性株10株およびマクロライド系5薬剤を用い実施した。その結果, 10株中7株から, 用いた5薬剤すべてにおいて耐性菌がセレクションされた。これらの耐性菌について遺伝子変異とマクロライド系および類似薬剤に対する交差耐性を調べ, 臨床分離のマクロライド系耐性菌と比較したところ, 23Sr RNA 遺伝子塩

基配列における A2063G と A2064G が多いこと、遺伝子変異による MIC の傾向が同様であった。

### ノロウイルス感染症

古屋由美子, 片山 丘, 宮原香代子, 原田美樹 (神奈川県)

予防医学, 50, 23-28, (2008)

ノロウイルスは乳幼児から高齢者にいたる広い年齢層が感染し, 急性胃腸炎を起こすウイルスである。ノロウイルスによる感染は夏季には少数であるが, 年間を通じて患者がみられ, 冬季には多くの患者が発生している。ノロウイルスはヒトからヒトに直接感染するだけではなく, ウイルスに汚染された食品を飲食することによる食中毒の原因物質としても知られている。平成17年度から平成19年度の神奈川県域でのノロウイルスによる食中毒や感染症について調べてみると, 感染性胃腸炎患者からのノロウイルス検出数のピークと集団発生のピークはほぼ一致した。ノロウイルスによる感染性胃腸炎患者の発生状況を調べることにより, 集団発生が起きる可能性を予測できると考えられ, 年間を通じて感染性胃腸炎患者の原因ウイルスを調査することは重要であると思われた。

### 性感染症の検査体制の現状と課題—保健所等における HIV 検査体制を中心に—

中瀬克己 (岡山市保健所), 佐野 (嶋) 貴子, 今井光信 (神奈川県)

日本臨牀, 67 (1), 30-36 (2008)

我が国の性感染症検査体制は, HIV に関してはその他の性感染症と大きく異なり, 公的な検査相談体制が整えられている。HIV 感染の可能性のある未発症者に対し, 検査・相談を提供することで, HIV 感染症の早期発見・治療と感染拡大の防止を目的としている。これは諸外国と同じ考え方であり, 各国とも無料・匿名で行われることが多い。一方, HIV 感染症以外の性感染症の検査に関しては, 我が国では医療機関における発症者への検査が中心であり, 保健所などで提供している公的検査の役割は限られている。欧米の都市部では, 公的資金により HIV および性感染症に対するセンターを設置し, 相談から治療, 研究まで一貫した体制を整えているところがある。

本稿では, HIV 感染症および性感染症に対する検査体制に関して, 公的検査体制を中心に, 全国調査などを基に現状を示すと共に, 性感染症についての国の指針について概要を紹介した。

### 性感染症における母子感染対策—HIV—

塚原優己 (国立成育医療センター), 山田里佳 (石川県立中央病院), 嶋 貴子 (神奈川県), 外川正生 (大阪市立総合医療センター), 喜多恒和 (帝京大学), 稲葉憲之 (獨協医科大学), 和田裕一 (仙台医療センター)

日本性感染症学会誌, 19 (1), 63-68 (2008)

1987年に本邦で最初の妊婦の HIV 感染者が判明して以来, 2006年までに468例の HIV 感染妊娠例が報告されており, そのうち母子感染は42例において発生している。近年の疫学的特徴として, 日本国籍妊婦および日本国籍カップルの感染例が増加し, 毎年の報告例の多くを占めるに至っており, 20年前の外国籍妊婦に限った感染症から, 現在では一般的な日本人女性の問題にもなっている。一方で妊婦の HIV スクリーニング検査受検率は毎年増加傾向にあり, 現在ではほとんどの妊婦が妊娠初期検査の一環として HIV 検査を受検するに至っている。また, HIV 母子感染予防対策については, 選択的帝王切開術および人口乳哺育に加え, 抗ウイルス薬を妊娠期間中, 帝王切開時および出生児に投与することで, 母子感染はほぼ回避可能となっている。しかし, 育児をはじめ感染女性およびその家族の生涯にわたる社会的支援の必要性も増しており, 今後さらなる検討が必要と思われる。

### 妊婦 HIV スクリーニング検査の偽陽性に関する検討

山田里佳 (石川県立中央病院), 嶋 貴子, 今井光信 (神奈川県), 谷口晴記 (三重県立総合医療センター), 和田裕一 (仙台医療センター), 塚原優己 (国立成育医療センター), 稲葉憲之 (獨協医科大学)

日本性感染症学会誌, 19 (1), 122-126 (2008)

HIV 抗体検査キットの偽陽性率は0.2~1%といわれている。日本において妊婦 HIV 陽性者は0.02%程度であり, そのため HIV スクリーニング検査における陽性的中率は非常に低くなることが予想される。われわれは, 全国のエイズ拠点病院314施設と年間分娩数1,000件以上の一般病院・医院43施設を対象に, 郵送によるアンケート調査を行った。スクリーニング検査を実施している施設の全分娩数は拠点病院で58,825分娩, 一般病院で30,140分娩であり, 検査実施率は拠点病院で89.4%, 一般病院で98.5%であった。拠点病院での年間 HIV 確認検査実施数は58件, 真の陽性者数6人, 偽陽性者数52人であり, 有病率は0.0114%, 陽性的中率は10.3%であった。一般病院での確認検査実施数は26件, 真の陽性者数1人, 偽陽性者数25人であり, 有病率は0.0034%, 陽性的中率は3.8%であっ

た。

妊婦 HIV スクリーニング検査で陽性結果を得た場合、確認検査で陰性が明らかとなったとしても、検査結果が判明するまでの期間は、患者に重い精神的負担を強いることになる。これらのことより妊婦 HIV スクリーニング検査体制を再検証し、検体体制の改良や再構築を行う必要があると考えられた。

#### A DNA Extraction Method using Silica-base Resin Type Kit for the Detection of Genetically Modified Papaya

(遺伝子組換えパパイヤ検出のためのシリカベースレジタイプキットを用いた DNA 抽出精製法)

大森清美, 土屋久世 (神奈川衛研), 渡邊敬浩, 穂山浩, 米谷民雄 (国立医薬品食品衛生研究所), 山田利治, 平山クニ, 佐藤修二 (神奈川衛研)  
食品衛生学雑誌, 49, 63-69 (2008)

遺伝子組換え (GM) パパイヤ検出のための DNA 抽出精製法として、新たに Promega Wizard DNA Clean-Up Resin System を用いたパパイヤ生試料およびパパイヤ凍結乾燥試料からの DNA 抽出精製法 (WCR 法) を検討した。WCR 法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、WCR 法は、シリカゲル膜タイプキット法および CTAB 法よりも DNA 収量が著しく高く、様々な熟し度合いのパパイヤから、定性 PCR 用として十分な濃度の DNA 試料液を得ることが可能であった。よって、パパイヤからの有用な DNA 抽出精製法として、WCR 法を提案する。

#### In vitro assays for the prediction of tumorigenic potential of non-genotoxic carcinogens

(非変異発がん性物質の腫瘍形成能を予測するためインビトロ試験法)

大森清美 (神奈川衛研), Journal of Health Science, 55, 20-30 (2009)

化学物質の発がん性予測試験として従来から行われている遺伝毒性試験では検出できない発がん物質 (非変異発がん物質) が、少なからず存在することが明らかとなっている。非変異発がん性物質の腫瘍形成能は、発がんプロモーション活性と重なる要素が多く、非変異発がん物質または発がんプロモーターの検出法として、細胞形質転換試験法が国際的に注目されている。OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) では、細胞形質転換試験法をテストガイドラインへ採用するために、SHE 細胞形質転換試験、C3H10T1/2 細胞形質転換試験および Balb/

3T3 細胞形質転換試験の 3 法について評価を行っている。本報では、これら 3 法の細胞形質転換試験法を含めた発がんプロモーション試験法について解説するとともに、大森らによって開発され、Balb/3T3 細胞形質転換試験の高感度試験法として OECD の試験法評価レビューに記載されている Bhas42 細胞形質転換試験法について、その性能評価および環境面での応用例等について紹介した。

#### Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds (揮発性化合物によるラン藻類の溶藻)

尾崎恵子, 太田朱美, 岩田知恵子 (名城大学), 辻清美 (神奈川衛研), 伊藤恵美子 (千葉大学), 猪飼誉友 (愛知衛研), 原田健一 (名城大学)  
Chemosphere71, 1531-1538 (2008)

相模湖より単離された溶藻性細菌 (*Brevibacillus sp.*) の活性化化合物の探索を試みたところ、相当する化合物は見出せなかったが、ラン藻自身に由来する  $\beta$ -シクロシトラルを検出した。本化合物には溶藻活性があることが判明し、*Brevibacillus sp.* の溶藻活性の一部は  $\beta$ -シクロシトラルが寄与しているものと考えられた。また、他のラン藻が産生する揮発性化合物  $\beta$ -イオノン, ジュオスミン, 2-MIB にも溶藻活性があることが判明し、これらの化合物は添加後数時間で強い活性を示した。

#### Further investigation of microbial degradation of microcystin using advanced Marfey's method

(改良 Marfey 法によるミクロシスチンの微生物分解に関するさらなる研究)

E. H. Hashimoto, 加藤 創, 川崎好人 (名城大学), 野澤由利子 (大正製薬), E. Y. Hirooka (State University of Londrina) 辻 清美 (神奈川衛研), 原田健一 (名城大学)  
Chem. Res. Toxicol., 22, 391-398 (2009)

ラン藻毒であるミクロシスチン (MC) はある種の微生物により容易に分解し、3 種の分解生成物、直鎖状 MC, テトラペプチドと Adda を与えることが知られている。本研究では、微生物による分解反応を詳細に検討するために、まず MC 分解菌 B-9 株の細胞の前処理法について検討し、本菌を食塩水により洗浄することにより、目的に合った加水分解活性を有する分解菌を調製した。その後、これを用いることにより上述以外の分解生成物を取得した。さらに、これら生成物の確認のために Marfey 法と LogD を用いて、テトラペプチド, トリペプチド, ジペプチドおよびア

ミノ酸を分解生成物として同定した.

**Evaluation of Cesium-137 (<sup>137</sup>Cs) and Elements Intake from Daily Diets in Residents of Kanagawa Prefecture, Japan (神奈川県民の日常食からのセシウム-137と微量元素の摂取量評価)**

Ikuyo Iijima, Hiroyuki Takagi(神奈川県衛研), Kenji Tomura(立教大学原子力研究所), Tomohiko Watanuki(東京家政大学), and Hideo Sugiyama(国立保健医療科学院)

Journal of Health Science (JHS), 55 (2) 192-205 (2009)

神奈川県住民による人工放射性核種の食事からの摂取量を明らかにするために、県内の都市部と郊外部に在住する40~60代の女性の日常食(5人の混合試料)について、<sup>137</sup>Cs濃度調査を実施した。また、機器放射化分析法により、Ca, Cl, Cr, Cs, Fe, K, Mn, Na, Rb, Sc, Znの11種類の元素の定量を実施した。日常食からの<sup>137</sup>Cs摂取量はチェルノブイリ事故の起きた1986年に明らかに増加し、その後、漸減傾向が見られた。近年では漸減傾向が停滞していることがわかった。両地域の栄養元素摂取量を日本人の食事摂取基準(2005)値と比較すると、ほぼ基準を満たしているかやや少ない傾向が見られた。特にCa, Feは都市部では国の基準の52%, 64%と低い摂取率であった。多くの元素は郊外部在住の方が都市部に比べ、摂取量が高かった。被験者の献立表から、食事に供した食材を食品群別に分類したところ、郊外部在住者は都市部に比べ、野菜類を初め、全ての食品群で食材を多用した献立を組み立てていた。1日食事摂取量も郊外部の方が多かった。日常食試料を混合せず、個人別に<sup>137</sup>Csと安定元素摂取量を調べたところ<sup>137</sup>Cs、元素摂取量とも、混合試料に比べ、その変動が大きかった。日常食の<sup>137</sup>CsとCs摂取量との間には相関が認められなかった。



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

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

# Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health No.39 (September, 2009)

---

## CONTENTS

### Short reports

#### Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

Use of QuantiFERON<sup>®</sup>TB-2G and Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates  
in Tuberculosis Outbreak

Chieko TAKAHASHI, Minori KONNAI, Hitomi OHYA, Yuko WATANABE  
and Norio OKAZAKI ..... 1

#### Surveillance study to assure safety of food products and medicine

Selective Media for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Frozen Chicken

Yoshimi DATE, Yoshio ASAI, Ichiro FURUKAWA and Katsuhiro AIKAWA ..... 4

Analytical method on the discrimination of a foreign matter looked like a seed in food.

Kiyomi OHMORI, Hiroko KISHI and Teruhisa FUJIMAKI ..... 8

#### Surveillance study on the safety of living

Analysis of PFOS and PFOA in river water of Sagami drainage system

Hitoshi Uemura and Fumi Nakano ..... 14

Survey of indoor air chemicals (2001–2008)

Fumi NAKANO, Hitoshi UEMURA, Kiyomi TSUJI, Yuichi FUSHIWAKI,  
Sadao WATANABE and Kazuo HASEGAWA ..... 18

### Data

#### Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (2008)

Tomoe ISHIHARA, Kumiko ITOH and Toshiro KUROKI ..... 23

Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of pathogens in Stools

Kumiko ITOH, Tomoe ISHIHARA and Toshiro KUROKI ..... 27

Surveillance of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2007~March, 2008)

Takashi KATAYAMA, Miki HARADA, Kayoko MIYAHARA and Yumiko FURUYA ..... 30

Occurrence of Tsutsugamushi Disease in Kanagawa Prefecture (2008)

Takashi KATAYAMA and Yumiko FURUYA ..... 33

#### Surveillance study to assure safety of food products and medicine

Investigation on the qualitative and quantitative analysis of genetically modified foods in  
Kanagawa Prefecture (2008)

Kiyomi OHMORI, Aki HATTORI, Yasuhiro SAKAI, Haruko SEKIDO  
and Hiroko KISHI ..... 37

Execution condition of physics and chemistry inspection of complaint food

Yasuhiro SAKAI, Teruhisa FUJIMAKI, Hiroko KISHI, Shigemi KAI, Kiyomi OHMORI,  
Haruko SEKIDO, Kumiko SATO, Takeshi AKABOSHI, Maki MIYAZAWA,  
Hiroko WATANABE, Hitoshi UEMURA and Shuji SATO ..... 41

---

Abstracts of original papers by research staffs (April, 2008–March, 2009) ..... 44

---