

神奈川県衛生研究所研究報告

第40号(平成22年9月)

目 次

総説

衛生化学分野における中性子放射化分析法を利用した元素の定量 飯島育代	1
---	---

短報

感染症の監視と予防に関する調査研究

イヌのジアルジア保有状況 稲田貴嗣, 古川一郎, 泉山信司, 外谷由紀, 臼井和彦, 黒木俊郎	11
腸管出血性大腸菌感染症事例における LAMP 法の活用 鈴木理恵子, 山本陽子, 永井 裕	14

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

日常精度管理試料の作製と精度管理の実施について 鈴木理恵子, 山本陽子, 永井 裕, 佐藤修二	17
高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いたリンゴ果汁中のパツリンの分析 甲斐茂美, 赤星 猛, 脇ますみ, 藤巻照久	21
食品中のアレルギー物質検査における精度管理の検討 - II 可溶化剤を用いた抽出法による定量・定性 渡邊裕子, 赤星千絵, 津田清隆, 橋口成喜, 関戸晴子, 渡部健二郎, 田中幸生	24

くらしの安全・安心に関する調査研究

標準添加法を用いたヘッドスペースガスクロマトグラフィー質量分析法による化粧品中のメタノールの分析 松阪綾子, 熊坂謙一, 仲野富美, 小島 尚	29
--	----

資料

感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県域の結核接触者健康診断における QFT 検査を用いた結核感染診断 (平成 17 ~ 21 年度) 高橋智恵子, 近内美乃里, 大屋日登美, 伊達佳美, 渡辺祐子, 岡崎則男	33
神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況 (平成 21 年度) 古川一郎, 石原ともえ, 黒木俊郎	36
神奈川県域における新型インフルエンザの流行状況 渡邊寿美, 齋藤隆行, 近藤真規子, 佐野貴子, 片山 丘, 宮原香代子, 原田美樹, 古屋由美子, 岡崎則男	39
感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況 (平成 21 年度) 片山 丘, 原田美樹, 宮原香代子, 古屋由美子	43
神奈川県におけるつつが虫病の発生状況 (平成 21 年度) 片山 丘, 古屋由美子	46

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

ガスクロマトグラフィー / 質量分析法による畜水産物中残留農薬試験法の適用について
甲斐茂美, 赤星 猛, 脇ますみ, 藤巻照久 50

遺伝子組換え食品の分析結果 (平成 21 年度)
大森清美, 服部愛希, 酒井康宏, 関戸晴子, 岸 弘子 53

高速液体クロマトグラフィー / タンデム型質量分析法による農産物中残留農薬試験法の適用について
脇ますみ, 赤星 猛, 甲斐茂美, 藤巻照久 57

苦情食品に対する理化学検査の実施状況 (平成 21 年度)
酒井康宏, 赤星 猛, 佐藤久美子, 脇ますみ, 関戸晴子,
大森清美, 宮澤真紀, 甲斐茂美, 岸 弘子, 小島 尚, 藤巻照久 60



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所 (平成 22 年度)

玉 井 拙 夫	田 中 幸 夫
鈴 木 健 一	岡 崎 則 男
中 村 廣 志	三 宅 裕 子
古 屋 由美子	藤 巻 照 久
丹 羽 加代子	

神奈川県衛生研究所研究報告編集調整会議構成員 (平成 22 年度)

中 村 廣 志 (座長)	木 内 久美子
近 内 美乃里	齋 藤 隆 行
稲 田 貴 嗣	小 島 尚
飯 島 育 代	寺 西 大
渡 辺 祐 子 (事務局)	

神奈川県衛生研究所研究報告第 40 号

平成 22 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	(株)コスミック 藤沢営業所 〒 251-0872 藤沢市立石 2-3-19-504

総説

衛生化学分野における 中性子放射化分析法を利用した元素の定量

飯島育代

Application of neutron activation analysis for determination of elements in field of public health science

Ikuyo Iijima

Key Words : Instrumental neutron activation analysis,
gamma-ray spectrometry, radioactive nuclide,
trace element

1. はじめに

宇宙に存在する物質は生命体を含め、種々の原子が結合して構成された多数の分子の集合体として成り立っている¹⁾。ある原子の原子核内の陽子数が等しく、化学的に同じ性質を有する物質を元素と称し、元素記号で表される。陽子数が同じで質量の異なるものを同位体と称する。人類はその黎明期に食物を得る手段として石器を利用し、やがて青銅(銅(Cu)とスズ(Sn)の合金)、鉄(Fe)という金属を利用して文明を発展させた。更に経済的な交換手段としての貨幣あるいは装飾品として、Cuの他、金(Au)、銀(Ag)という貴金属の需要が高まった。これらを含む鉱石が盛んに発掘され、新たな鉱脈を発見すべく、多数の人々が山野の採掘を行った。ヒ素²⁾(以下、As)や水銀²⁾(Hg)などは薬品として古代から知られていた。日本でも2007年7月に世界遺産に登録された島根県の石見銀山遺跡は、江戸時代には、貨幣として重用された、銀の豊富な鉱山として著名であった。一方で、「石見銀山」は殺鼠剤「石見銀山猫いらず」の代名詞であった。原料の砒石(亜ヒ酸)は、同じ島根県、津和野町の笹ヶ谷鉱山で銅の副産物として産出されたものであったが、

「笹ヶ谷」は知られていないため、「石見銀山」としたところ、たちまち一般に広まり、「石見銀山」の知名度の高さを示した³⁾。近代になり、科学的な視野が一段と開け、様々な工業がめざましく発達してくると、エネルギー源、貴金属源として、様々な元素が発見されて、利用の開発が進められてきた。その需要が時代に呼応して高まるにつれ、新しい鉱脈の開発と、鉱石の精錬過程で、金属あるいはその不純物としての元素により、周辺住民や、労働者への中毒症状を発現させた。明治25年に日本における最初の公害として、原因が解明されたのは、栃木県の足尾銅山の廃水による鉱毒事件であった⁴⁾。

第2次世界大戦後、日本の経済復興の源となる鉱工業が隆盛になるにつれ、その排煙、廃水処理の未熟さから、各地で公害問題が勃発した。Hgによる熊本県水俣湾周辺の水俣病事件、阿賀野川流域の有機水銀中毒事件、富山県神岡鉱山から神通川に排出されたカドミウム(Cd)により、水田土壤が汚染され、高濃度のCdを含むコメを摂取した住民に見られたイタイイタイ病事件、などである⁵⁾。これらはやがて、公害病として国が認定するようになった。また、1953年から乳質安定化剤としてリン酸2ナトリウムを用いた粉ミルク中が販売され、安定化剤の不純物として混入していたAsにより、摂取した乳幼児に重篤な症状を発現させ、社会的な問題となった、森永ヒ素ミルク事件がある⁶⁾。これらは、一企業の責任ばかりではなく、政府機関ならびに地方自治体が法体系の整備とともに、組織的に公害問題として取り組み、大気、水質等の環境監視、食品のモニタリング等を行うようになり、現在に至っている。

元素分析はまさに、このような公害病の原因究明を目的とする手段として、多くの研究者によって、より精密かつ正確な分析値を求めるべく、地道な研究が続けられた。同時により迅速で簡便な新しい分析法あるいは分析機器の開発・改良が続けられてきた。

ここでは、さまざまな元素の定量方法の一手法としての、中性子放射化分析(Neutron activation analysis : NAA)法について概略をまとめた。さらに、この方法が食品・環境の安全性の確保のために、どのように利用されたか、また衛生化学的な問題の解決に向け、どのように貢献したかについて述べる。

2. 中性子放射化分析(NAA)法とは

NAA法⁷⁾は少量の試料で、微量の元素を精度よく分析することが可能な分析手法である。近年、元素の一斉分析法としては、誘導結合プラズマ発光分光法(ICP-

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
ijijima.nzut@pref.kanagawa.jp

AES), 誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS), 蛍光 X 先分析法(XRF)等^{8)~10)}様々な優れた機器を用いた手法が確立されてきた。これらは、核反応を伴わず、試料の廃棄等が簡便である。これに対し、放射化分析法は原子炉内に試料を入れ中性子や荷電粒子を照射し、試料中の元素に放射能を運びさせ、その放射能分析により、元素を定量する手法である。このため、RI 施設が必要となる。また、定量後の試料は放射能の減衰を待つため、長期保管が必要となる。その一方で、試料分解等の前処理を必要としない、いわゆる非破壊分析が可能であり、分解試薬等が不必要なため、試薬からのコンタミネーションを避けることができる。特に、機器中性子放射化分析(Instrumental neutron activation analysis: INAA)法では所定量の試料を原子炉内に入れ、中性子照射する。炉内では(n, γ)反応が起き、生成した放射性核種を含む試料を取り出して、そのままゲルマニウム(Ge)半導体検出器- γ 線スペクトロメーターにより、透過性の高い γ 線を測定し、マルチチャンネルアナライザーにより γ 線エネルギースペクトルを得る。この γ 線スペクトルをパーソナルコンピュータ上で専用 γ 線解析ソフトウェアにより、多元素の一斉分析が実施される。中性子等の照射時間や原子炉内での照射位置を変えるなどの条件設定を工夫すれば、より多くの元素の定量が可能となるといった利点がある。化学分離放射化分析(RNAA:radiochemical neutron activation analysis)法はいったん試料を放射化した後、目的核種を含む元素を化学分離することで、INAA 法より更に分析感度が向上し、ごく微量まで定量することができ¹¹⁾、有用である。その反面目的核種の分離に時間と労力を有するとともに、分析者の被曝のリスクが高い。また、定量可能な元素は当然ながら絞られるため、何をどのレベルまで測るか、実験計画の綿密なデザインが肝要である。

ここでは、多元素同時分析が可能な INAA 法を中心に述べる。

3. INAA 法における精度管理

時間と労力を費やして得た分析値の正確性ならびに適用した分析方法での分析精度(再現性)が担保されないと、その分析データは全く意味のないものになる。滴定法など、直接的な分析方法でも用いる試薬、指示薬の純度等により分析値にはある揺らぎが伴う。また、終末点の判定など、個人差による揺らぎも加わり、分析値は常に一定の統計誤差を含めたある範囲の中に真値が含まれることになる。これは全ての分析方法について言えることであるが、機器分析になると更に、機

器の性能、電気的な変換操作に伴う揺らぎといった、間接的な誤差が加味される。特に、INAA 法においては、上記の系統誤差に加え、中性子照射により生成する核種の確率、(n, γ) 反応以外の副反応の確率、生成核種が放射性壊変する割合、壊変による γ 線の放出率など、種々の物理現象が全てある確率で起きるため、一般的に、測定される放射能値にはこの揺らぎを踏まえた誤差が併記される。さらには、生成放射エネルギーを低く抑えるため、照射用試料量が小さく、試料の代表性、均一性の確認が重要である。これらの点を踏まえ、分析値の正確性、精度を担保するために、試料と同じ条件で平行して値付け値を伴う標準物質を分析し、得られた分析値と値付け値を比較することで分析全体の質の確保を図る必要がある。

3-1. 標準物質を用いた精度管理

標準物質^{12),13)}は米国国立標準技術研究所(National Institute of Standards and Technology, NIST)やカナダ, IAEA 等、各国で作成され頒布されている。日本でも独立行政法人 国立環境研究所(National Institute for Environmental Studies: NIES)が提供する NIES シリーズなどが知られている¹⁴⁾。元素濃度や様々な有機物濃度、放射能濃度等、分析目的に沿って、値付けのされた種々の標準物質が作成されている。いずれも複数の分析機関で分析した結果から統計処理等を施し、保証値が決定されている。また分析数が少ない、あるいは分析方法が限定的などで、統計的な処理ができないまでも、参考値が付されている場合もある。標準物質は動物試料、植物試料、鉱物、土壌等様々あるが、通常分析対象試料とマトリックスの近い種類が選ばれる。ここでは、植物試料および食品試料を INAA 法により分析した際、標準物質として、前述の NIST 作成の SRM 1571 Orchard Leaves (OL)¹⁵⁾、SRM1548 TOTAL DIET (TD)¹⁵⁾ 及び NIES 作成の¹⁶⁾、NIES No.1 Pepperbush (PB)を用いた結果について述べる¹⁷⁾。分析結果を Table 1 に示す。各標準試料は概ね保証値と一致している。分析値が保証値と 10% 以内で一致しているのは、SRM1571 OL では 12 元素中、As, カルシウム (Ca), Fe, カリウム (K), マグネシウム (Mg), マンガン (Mn), ルビジウム (Rb), アンチモン (Sb), ストロニウム (Sr) の 9 元素、SRM1548 TD では 8 元素中 Ca, 塩素 (Cl), ナトリウム (Na), 亜鉛 (Zn) の 4 元素、NIES No.1 PB では 10 元素中、Ca, コバルト (Co), Fe, Mg, Rb, Zn の 6 元素である。分析値が 10% を超えるが、保証値の不確かさを加えた範囲内の元素は SRM1571 の Cr, Zn である。保

Table 1 Analytical results of elements in certified reference materials

Element	NIST SRM1571 Orchard Leaves					NIST SRM1548 Total Diet					NIES No.1 Pepperbush				
	Analytical value	SD	CV(%)	n	Deflection with certified value, %	Analytical value	SD	CV(%)	n	Deflection with certified value, %	Analytical value	SD	CV(%)	n	Deflection with certified value, %
Ca	20,500 ± 20,900 ±	1650 300	8.05 6	6	1.91	1600 ± 1740 ±	150 70	9.38 4	4	8.05	13,400 ± 13,800 ±	832 700	6.21 2	2	2.90
Cl	784 ± (690)	51	6.51	6		8690 ± 8700 ±	402 400	4.63 4	4	0.11	155 ±	1.2	0.77	2	
Cr	2.3 ± 2.6 ±	0.24 0.30	10.43 6	6	11.54	ND .					0.65 ± (1.3)	0.20	31.18	2	
Cs	0.045 ± (0.04)	0.019	42.22	5		0.027 ± (0.014)	0.012	44.44	4		1.2 ± (1.2)	0.028	2.33	2	
Fe	287 ± 300 ±	43 20	14.98 6	6	4.33	41 ± 32.6 ±	7.8 3.6	19.02 4	4	25.77	208 ± 205 ±	5.9 17	2.82 2	2	1.46
K	13,900 ± 14,700 ±	726 300	5.22 6	6	5.44	4130 ± 6060 ±	2050 280	49.64 4	4	31.85	12,100 ± 15,100 ±	340 700	2.81 2	2	19.87
Mg	5700 ± 6200 ±	750 200	13.15 6	6	8.06	ND 556 ±					4150 ± 4080 ±	587 200	14.13 2	2	1.72
Mn	84 ± 91 ±	3.1 4	3.69 6	6	7.69	ND 5.2 ±					1810 ± 2030 ±	11 170	0.60 2	2	10.84
Na	103 ± 82 ±	27 6	26.21 6	6	25.61	5820 ± 6250 ±	360 260	6.19 4	4	6.88	91 ± 106 ±	12 13	13.62 2	2	14.15
Rb	11 ± 12 ±	1.6 1	14.55 6	6	8.33	4.6 ± (4.8)	0.78	16.96	4		73 ± 75 ±	0.78 4	1.08 2	2	2.67
Sc	0.060 ± [0.047-0.066]	0.0049	8.17	6		ND					ND				
Zn	22 ± 25 ±	2.1 3	9.55 6	6	12.00	30.7 ± 30.8 ±	1.2 1.1	3.91 4	4	0.32	322 ± 340 ±	33 20	10.17 2	2	5.29

Upper row: our result
Lower row: certified value
(): uncertified or reference value
[]: literature value⁽¹⁾
ND: not detectable

証値の不確かさを加えた範囲からはずれるが分析値に対する統計誤差範囲内で保証値と一致している元素はSRM1571のNa, SRM1548のFe, K, NIES No.1のNaである。スカンジウム (Sc) は保証値, 参考値がないため, 文献値¹⁸⁾を示す。分析値と保証値等との比較評価においては, 財団法人日本分析センターと全国地方分析機関との放射能分析確認調査事業の精度管理基準を準用し, 標準試料における放射性核種の添加値と分析値の差が10%以内であるとき, また, 環境試料においては差の10% + 分析値の計数誤差の3倍以内, 元素分析の場合は添加値もしくは分析センター値付け値との差が20%以内であれば, 分析値は検討基準内で一致するとした¹⁹⁾。したがって, 標準物質中の元素分析値と保証値あるいは参考値の間では, 多くの場合この基準を満たしていることからINAAによる元素分析値の質は確保されたと判断できる。

3-2. 試料における個体間の変動の確認

試料採取量を定めるに当たり, 試料の個体別元素濃度の分布状況を確認する必要がある。ここではニンジンを用いて調べた事例²⁰⁾を紹介する。市販のニンジン10本を個別に灰化しINAA用試料を作成した。INAA法により17元素の分析を行った。元素分析結果をTable 2に示す。今回, 分析したニンジン試料中17元素の平均値に対する変動係数 (coefficient of variation; CV) は7.5 ~ 70%の範囲にあり, 10%を下回る元素

はCa (CV=7.5%) のみであった。多くの元素のCVは10% ~ 50%程度にあり, 個体間における濃度分布の大きいことが認められた。特に, FeのCVは70%で, Max/Minも5.6と大きく, 17元素の中でも個体間での濃度分布が一番大きいことが示された。ニンジン試料1本あたりの平均重量は97.7 ± 12.2 g (平均値 ± σ), 根端, 葉柄基部および皮を廃棄した平均重量77.5 ± 9.90 gと重量の個体差は小さく育成状況は同等とみられたが, 上記のとおり結果であった。このように, 試料の個体間に由来する元素濃度分布の差を平均化するためには試料の採取重量は1kg以上が望ましい。

Table 2 Content of elements in ashed samples (Carrots)

		Unit: mg kg ⁻¹						
Classification		Avg.	SD	CV%	Number of samples	Range		Max/Min
		Min				Max		
Minerals	Mg	120	22	17	10	99	170	1.7
	Ca	270	20	7.5	10	230	300	1.3
Trace elements	Cr	0.027	0.004	14	2	ND	0.031	1.3 ^b
	Mn	1.3	0.4	31	10	0.8	1.8	2.2
	Fe	3.6	2.5	70	10	2.0	11	5.6
	Zn	1.7	0.31	19	10	1.2	2.1	1.7
Electrolytes	Na	310	110	36	10	160	610	3.8
	K	3,700	510	14	10	2,700	4,200	1.6
Other trace elements	Al	1.5	0.4	29	10	1.0	2.6	2.6
	Se	0.00008	0.00002	23	2	ND	0.00010	1.6 ^b
	Co	0.0019	0.0005	26	10	0.0014	0.0033	2.3
	Rb	2.0	0.20	10	10	1.7	2.4	1.4
	Sr	1.6	0.23	15	10	1.2	2.0	1.6
	Cs	0.0036	0.0017	47	10	0.0014	0.0063	4.7
	Ba	2.4	0.8	34	10	1.5	4.1	2.8
Halogen elements	Cl	120	21	18	10	90	160	1.8
	Br	0.89	0.25	28	10	0.62	1.5	2.3

1): Calculated without ND data

Table 3 Content of elements in an ashed sample (Bamboo shoots)

Unit: mg kg^{-1}

Classification		Avg.	SD	CV%	Number of analysis	Range		Max/Min
						Min	Max	
Minerals	Mg	71	5.7	8.0	8	64	80	1.3
	Ca	44	3.2	7.2	8	40	50	1.3
Trace elements	Cr	0.0052	0.0013	25	8	0.0034	0.0070	2.1
	Mn	3.3	0.084	2.6	8	3.1	3.4	1.1
	Fe	2.0	0.11	5.5	8	1.9	2.2	1.2
	Zn	3.0	0.056	1.9	8	2.9	3.1	1.1
Electrolytes	Na	17	0.78	4.6	8	15	18	1.2
	K	2,800	45	1.6	8	2,800	2,900	1.0
Other trace elements	Al	2.6	0.10	4.1	8	2.5	2.8	1.1
	Sc	0.000090	0.000014	16	8	0.000076	0.00012	1.6
	Co	0.0011	0.00063	57	8	0.00062	0.0027	4.3
	Rb	3.0	0.061	2.1	8	2.9	3.0	1.1
	Sr	0.62	0.041	6.6	8	0.55	0.70	1.3
	Cs	0.0044	0.00020	4.5	8	0.0041	0.0047	1.1
	Ba	0.19	0.020	10	8	0.17	0.23	1.3
	Br	0.59	0.014	2.4	8	0.57	0.61	1.1
Halogen elements	Cl	400	11	2.7	8	390	420	1.1
	Br	0.59	0.014	2.4	8	0.57	0.61	1.1

3-3. INAA 用試料の均一性

INAA 法では前述のように生成放射能を低く抑え、測定器の軸中心に点線源に近似するような幾何条件での位置取りとするため、照射用試料重量は 50～300mg と少量である⁷⁾。試料の均一性は分析値の変動に大きく寄与するため、同じ試料を複数作成して平均値を求める。また、ターゲットとなる元素が微量の場合には、揮散しない程度に灰化し、濃縮したものをを用いる場合がある。ここでは、灰化物試料の均一性について検討した事例²⁰⁾を述べる。

市販のタケノコ 2kg (生重量) を灰化、混合攪拌し、INAA により安定元素分析を行った。17 元素の分析結果 (生重量あたりの濃度) を Table 3 に示す。灰化試料から任意に分取した 8 試料の分析平均値に対する CV は Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, K, アルミニウム (Al), Rb, Sr, セシウム (Cs), Cl, 臭素 (Br) の 13 元素で 10% 以内にある。Mn, Zn, K, Al, Rb, Cs, Cl, Br の 8 元素は最小値に対する最大値の比 (以下, Max/Min と表記) が 1.1 と 10% の差の範囲にあり、灰化試料の混合均一性が評価された。一方、クロム (Cr) と Co の 2 元素の Max/Min はそれぞれ 2.1, 4.3 と他の元素より大きく、CV は 25%, 57% と他の元素より明らかに大きいことが示された。他の多くの元素では試料内の均一性が認められていることから、この 2 元素については、分析法に起因する要因あるいはタケノコ組織内での元素分布要因が関連することと考えられる。INAA における ^{51}Cr ²¹⁾ は中・長半減期核種の中では半減期 (27.7 日) が短く、しかも γ 線放出比が 9.9% と低いため、減衰により放射能が小さくなり、定量値に対する計数誤差も大きくなることから分析値の変動が大きくなったと考えられる。一方、 ^{60}Co ²¹⁾ は半減期 (5.27 年) が長いものの試料中の Co 含量が低い ($0.0006\text{--}0.0027 \text{ mgkg}^{-1}$) ため生成放射能の小ささに起因したと考えられる。

4. 衛生化学分野での NAA 法による元素分析例

4-1. 食品中の有害とされる元素類の分析への適用

ヒトの元素摂取量は、人体に対してある範囲で必須であったり、有害となったりする²²⁾が、一般的には重金属は多く有害元素と定義づけられている。例えば、Cd は日本では現行、玄米中 1.0 mgkg^{-1} 未満とされている。国際基準では精米中 0.4 mgkg^{-1} 以下で、現行は高い設定になっている。このため、平成 22 年 4 月に関係告示が公布され、平成 23 年 2 月 28 日から玄米及び精米中 0.4 mgkg^{-1} 以下とされる²³⁾。食品の元素分析は食品汚染物質としての重金属の分析を中心に実施された。特に、当時、人体に対し許容濃度範囲の狭い有害金属として、鉛 (Pb), Cd, Hg 等は主に原子吸光光度法で分析されている^{24), 25)}。缶詰加工品においては、缶の主成分である Fe, スズ (Sn) 等は缶の内側のコーティングが不十分であったり、開封後、内部の食品を取り出さないで保管し、食品が弱酸性である場合などは、缶の金属が溶出し、食品中に高濃度に移行する可能性が指摘された。また、輸入品においては、全くコーティングが施されておらず、缶が腐食した事例もあり、缶詰中の食品の元素濃度を定量することが必要であった。高城は缶詰ジュースの Sn 分析に放射化分析法の適用を試み、定量限界 $3 \mu\text{g}$ まで定量が可能であることを示すとともに、pH が低い試料においては、規制値に近い濃度のものがあることを示した²⁶⁾。

また、水田土壌の汚染から、コメの Cd 汚染が問題となり、食品衛生法で、コメ中 Cd 濃度の規制値が制定された。Yamagata らは、コメ試料中の Cd の分析法を確立するために、国際共同測定に用いられた高濃度ならびに低濃度の 2 種類の標準玄米試料および全国各地で生産された玄米試料を用いて、RNAA による Cd の定量を試みた。標準玄米試料では両試料とも平均値は原子吸光光度法による分析値と良く一致したが、高濃度 Cd を含む試料では若干濃度がばらついた。低濃度 Cd を含む試料では、溶媒抽出-原子吸光光度法での分析と同程度のバラツキの小さい分析値が得られている²⁷⁾。これは、後の U の分析で触れるが、試料中に ^{114}Cd (n, γ) ^{115}Cd の核反応により ^{115}Cd が多量に生成し、その自己吸収により γ 線計数率の低下を引き起こしたことが考えられる。また、従来までの有機溶剤による抽出操作を行わない、新しい原子吸光光度法を提案した。ここでは、NAA 法は原子吸光光度法による新しい分析法で得た分析値の質を確保するために用いられている。

NAA法を全国の分析機関で導入するのは、研究炉の利用、RI施設の保有状況等の条件で難しいが、提案された原子吸光光度法改良法は、多機関で利用され、間接的ではあるが、NAA法の貢献度は高かったと言える。

食品中の有害元素としては、他にHg, As等があげられる。田口らは海洋での食物連鎖の頂点に位置するサメ類の筋肉部の粉末試料を作成し、海産生物のHg, As汚染実態調査用に、標準物質として適用すべく、INAA法及びAAS法との実験室間の分析値の比較検討を行い、室間格差も少なく、INAA法とAAS法共に正確かつ精度良い分析結果を得た。さらにこの試料の標準物質としての有効期間が約1年間であることを明らかにしている²⁸⁾。これに先立ち、高城らはHgのINAA法による新しい分析手法として、高純度アルミニウムホイルを用いたHg分析方法を開発するための基礎実験結果を報告している²⁹⁾。さらには、ムラサキイガイを試料として、その前処理方法・保存方法等が元素濃度に与える影響について検討し、その最適条件下で作成したムラサキイガイ試料について、NISTのカキ組織標準物質 (SRM1566: Oyster tissue) および国際原子力機関 (International Atomic Energy Agency: IAEA) が作成したカキ標準物質 (MA-M-1: Oyster homogenate) とともに種々の元素濃度をINAA法で調べ、両者間の微量元素濃度分布が近似していることを明らかにした。ムラサキイガイは生育領域の広範な生物であり、海洋汚染の指標生物となり得るため、本法で作成した粉末試料が標準物質として適用可能であることを示した³⁰⁾。

4-2 環境放射能分野でのINAA利用例

環境放射能分野で利用された事例としては、杉山らによるウラン(U)分析例がある。杉山らは神奈川県横須賀市内にある核燃料加工工場周辺環境の河川水、海水、土壌等の試料について固体蛍光光度法によりUの継続的なモニタリング調査を実施する中で、土壌、大気浮遊じん、日常食についてINAA法を用いてU濃度を定量している³¹⁾。Uの定量は、試料をCd筒で覆い、原子炉中に投入し、低速の熱中性子をCdに吸着させ、透過した熱外中性子を用いた、エビサーマル中性子放射化分析法と称される方法で実施された。本法により、²⁴Naなどの妨害核種の生成を押さえ、自然界の存在比が約99.3%と圧倒的に多い²³⁸Uから²³⁹Uを生成させ、その娘核種であるネプツニウム-239 (²³⁹Np) が放出する γ 線の光電ピークから定量値を求めている。²³⁹Uから放出される γ 線は97keVとエネルギー帯がX線領

域に重なり、定量が困難である。さらに半減期が23.45分と短いため、照射後定量までの時間間隔が空けられない反面、²³⁹U以外の放射化生成物が多数存在するため、試料の放射線量が高く、分析者の被曝線量管理上、照射直後の処理は不適切である。また、Ge半導体検出器- γ 線スペクトロメーターは、高感度であるが、大線量の場合は、入射線量に対し、波高分析が追いつかない、いわゆる数え落としが多すぎ、測定不能になる。このため照射後、試料を約1週間冷却(放置)し、生成した²³⁹Uの娘核種²³⁹Np(半減期: 2.36日)を生成させ、その228.2keV, 277.6keVの γ 線を計測し定量した。同時に、土壌起源と言われるSc, トリウム(Th)についても定量した。Thは²³²Th(n, γ)²³³Paで生成したプロトアクチニウム-233 (²³³Pa)の312keVの γ 線計測により定量した。この分析方法は煩雑な化学操作が無く、かつ環境試料というマトリックスの大きい試料における妨害元素の生成が少なくすむため、非常に有効であることを明らかにした。さらに、一連の分析結果から、核燃料加工工場周辺住民のウラン吸入量を求め、経口摂取量の1/1700と評価している。また、大気浮遊じんと表層土壌のTh/Uは両者とも約2で良く一致したことから、大気浮遊じん中のUが土壌起源であると結論づけた。施設から、Uの予期しない放出があった場合は、大気浮遊じん中のU濃度が高まり、Th/U比は明らかに小さくなるため、核燃料としてのウランを取り扱う施設において、緊急事態が生じた場合は、大気浮遊じんのモニタリングがきわめて有用であることの科学的な根拠となった。しかし、緊急時においては迅速なU量の把握が必要となるため、第1段階のモニタリング³²⁾としては、採取した浮遊じんについて総 α を測定することで汚染の程度やその範囲を特定し、第2段階のモニタリング³¹⁾以降に、本法などによりU,Thの定量に臨むことになる。

現在、環境中に存在する人工放射性核種の大半は列強国による大気中核実験の産物である。また、1986年の旧ソ連ウクライナ地方のチェルノブイリ原子力発電所事故の影響により、北半球の大半が地域による規模の大小はあるが、放射性降下物により汚染された³³⁾。また、原子力発電所等の稼働により、ごく微量ながら、人工放射性核種の放出がある。原子炉で発生する人工放射性核種は炉内で²³⁵Uが核分裂して生成される核分裂生成物と原子炉内で発生する中性子により放射化された放射化生成物、および²³⁵Uが中性子を吸収した、さらに質量の大きい超ウラン元素(プルトニウム-239 (²³⁹Pu), ²⁴¹Pu, アメリシウム-241 (²⁴¹Am))等に大別される。人工放射性核種は、核種ごとに文部科学省が

策定した、一連の放射能測定シリーズにより、分析方法が定められており、概ね放射性核種から放出される放射線を直接あるいは放射化学的な処理の後に測定する。ヨウ素 (I) は人や動物にとって必須であり、甲状腺にとどまり、その機能に重要な役割を果たしている元素である。原子炉内では核燃料物質の ^{235}U の核分裂により、 ^{131}I 等、ヨウ素の放射性同位体が生成し、原子炉内に貯留している。放射性ヨウ素は万一事故等で炉中から漏れるなど、大気中に放出されると、甲状腺被曝を起こす、非常にクリティカルな核種である。 ^{131}I は半減期が 8.02 日と、 ^{133}I (半減期 20.8 時間) よりは比較的長寿命であるため、万一の事故時には人体への被曝線量への寄与が高い。災害対策基本法および原子力災害対策特別措置法等により、各自治体が策定している地域防災計画 (原子力災害対策編) では医師が必要と認めた場合は、対策本部長の指示により 40 才未満の住民、緊急時対応者等に安定ヨウ素を摂取させる措置がとられる。また、 ^{131}I と同じ核分裂生成物の ^{129}I は半減期が 1.57×10^7 年と非常に長く、使用済み燃料棒の冷却保管中の減衰はほとんど期待できない。青森県六ヶ所村にある核燃料再処理工場では、本年 10 月に使用済み核燃料について再処理の本格始動を目指し、現在実証試験が行われている。大量に生成した核分裂生成物を含む燃料棒の裁断により、現段階ですでに、環境中において ^{129}I の上昇が確認されている。本格稼働になれば、半減期が長い ^{129}I の放出量が確実に増加していくことになる。原子力発電所並びに核燃料再処理工場周辺では、所定の処理後、大気および海中へ定められた限度以下の人工放射性核種の放出があり、所管の自治体による環境放射線モニタリングが実施されている。 ^{129}I は海中に放出されると安定ヨウ素と同様に、海藻類に取り込まれ、食物連鎖により、甲殻類や魚類等の体内で濃縮され、人体に摂取される。半減期が長いので、人体での去就は安定ヨウ素と同じ生物学的半減期で収支される。ヨウ素に限らず、半減期の長い放射性核種は環境中に拡散した後、環境では圧倒的に高濃度に存在する非放射性の安定元素と化学的に近い挙動をとると考えられている。安定ヨウ素の分析は高城らにより、RNAA 法による分析手法が確立されている³⁴⁾。本法は予め対象となる試料に含まれる安定ヨウ素 (^{127}I) を中性子放射化し、アルカリ性とし、ヨウ素イオン (^{128}I) を還元剤でヨウ酸イオン ($^{128}\text{IO}_3^-$) とした後、パラジウム (Pd) イオンを添加し、得られたヨウ化パラジウム沈殿物をろ紙上にろ過捕集し γ 線スペクトロメトリにより定量する。 ^{128}I の半減期は 24.99 分であり、照射から一連の化学分離操作まで 30 ~ 60 分

程度、試料の測定時間が 10 分程度ときわめて短時間であり、化学的な技術と修練が必要な手法である。また、分析者が非密封の RI を扱うため RI 使用施設と被曝管理が必要である。高城らは本法を適用し、水田土壌からコメへのヨウ素の移行について調べ、土壌中の存在レベルやコメ中のヨウ素の 60% が米ぬかに存在することなどを明らかにしたり³⁵⁾、雨水中のヨウ素の形態別分布等も明らかにした³⁶⁾。

一方、放射性の ^{129}I の分析法には放射化学分析法、NAA 法、ICP-MS 法などが用いられている。現在、迅速かつ最も低レベルの濃度まで定量可能な分析法は NAA 法である。分析手法は前述の安定ヨウ素分析法と同様に、試料を中性子照射により、 ^{129}I (n, γ) ^{130}I の核反応で生成した ^{130}I (半減期 12.36 時間) について、アルカリ性とし、ヨウ素イオン ($^{130}\text{I}^-$) を還元剤でヨウ酸イオン ($^{130}\text{IO}_3^-$) とした後、 Pd^{2+} イオンを添加し、ヨウ化パラジウムの沈殿を濾過捕集し、得られた $\text{Pd}^{130}\text{I}_2$ 沈殿物について γ 線スペクトロメトリにより定量する。試料中の ^{129}I の濃度がごく微量であることから、 ^{130}I の生成量を増加させるため中性子照射は 40 分と長く、また ^{128}I に比べ、 ^{130}I の半減期が長いので、照射後、短半減期の副生成物を減衰させるまで、1 日放置する³⁷⁾。高城らの安定ヨウ素分析法に比べ、照射後の処理は時間的な余裕がある。分析所要時間が長いということは、日常的なモニタリングには適しているが、原子力災害等緊急時には別の方法が望ましい。緊急時の ^{129}I 迅速分析法では ICP-MS 法を採用している³⁸⁾。また、NAA 法は先に述べたように、分析者の被曝管理が必要であることから、分析感度がクリアできれば日常分析も各分析機関に普及してきた ICP-MS 法に変更になる可能性がある。また、NAA 法より高感度な分析法として、加速器質量分析法や多重 γ 線検出法を用いた INAA 法なども提案されている³⁷⁾。多重 γ 線検出器を用いる方法は化学分離の必要がなく、画期的ではあるが、前者は加速器、後者は多重 γ 線検出器という特殊な設備・機器が必要で、未だ汎用とはなりにくい。

環境放射能分析に関して INAA 法を用いたもう一例を示す。チェルノブイリ原発事故の後、環境中に放出された放射性セシウムがキノコ類に高濃縮されることが明らかとなり、汚染地域住民を中心に北部ヨーロッパ住民が野生のキノコを摂取することによる、内部被曝が懸念された。桑原らはキノコの一つであるヒラタケの菌糸を培地で繁殖させ、培地に所定量のアルカリ金属である非放射性のセシウムすなわち安定セシウム (^{133}Cs) を添加し、菌糸への取り込み過程を ^{133}Cs -NMR と INAA 法を用いて調べた。キノコ類は放射性ばかり

でなく、安定セシウムも特異的に取り込むことを明らかにした³⁹⁾。

4-3. 食品栄養学上の必須元素および微量元素の定量例

日本人の食事摂取基準2010年版⁴⁰⁾には、平成22年から5年間に用いる栄養素等の摂取基準が示されている。また、人体に必要な元素を多量ミネラルとしてNa, K, Ca, Mg, リン(P)の5元素、微量ミネラルとして、Fe, Zn, Cu, Mn, I, セレン(Se), Cr, モリブデン(Mo)の8元素を提示している。各基準値はミネラルのみならず、すべての栄養素に対して、推定平均必要量、推奨量、目安量、耐用上限量、目標量の5タイプの指標値が示されている。人体の維持には様々なミネラルが必要であるが、何をどれくらい摂取すべきかは、時代とともに分析方法の変遷や、人体の生理学的なデータの蓄積等を反映しつつ、見直されている。日本人のミネラル摂取基準も基準値の変遷がみられる。例えばMgは日本人の食事摂取基準2005年版⁴¹⁾に比べ全般的に基準量が上昇している。Caは2005年版では目安量、目標量、上限量が設定されていたが、2010年版では推定平均必要量、推奨量、目安量、耐用上限量が設定されている。Na, Kは2005年版では電解質として分類されているが、2010年版では多量ミネラルという分類に変わっている。

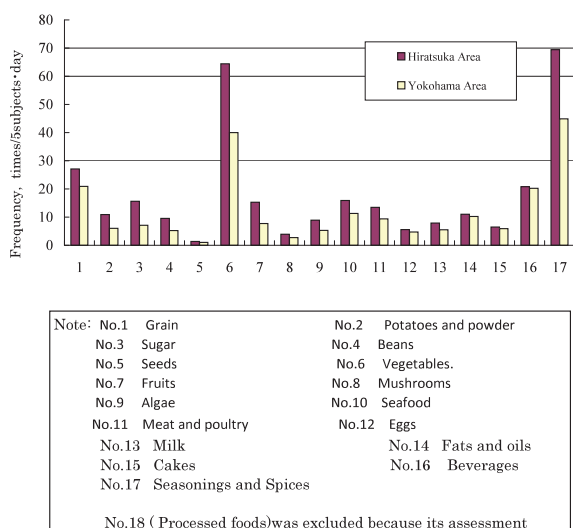


Fig. 1 Average use frequency of ingredients in a sample (for 5 subjects)

元素の栄養学的なアプローチとして、Iijima らは、神奈川県民の1日食事量(日常食)中の元素分析をINAA法により定量し、県民の元素1日摂取量を求め、神奈

川県域では都市部住民の元素摂取量が低い傾向にあると報告した。その日常食の献立表について、住民の摂取食品を14食品群に分別したところ、Fig. 1に示したように県内2地域住民のうち、平塚地区住民の野菜類の摂取頻度が高いことが明らかになり、野菜類の摂取頻度と必須元素摂取量との関連性が高いことを指摘した⁴²⁾。この結果を受け、飯島らは種々の農作物の元素濃度について検討している。県内生産あるいは流通の種々の農作物中の8無機質とその他9元素の定量を実施し、食品群別に元素濃度を把握した。多くの農作物中のMg, Ca等、無機質類は五訂増補食品成分表⁴³⁾と同程度の濃度を示したが、大部分の元素の濃度分布は広く、同一品目内でのMax/Minは1.0-60倍であった。また、品目間ではSc, Co, Csなどの極低濃度レベル($n \times 10^{-3} \text{ mgkg}^{-1}$)元素のMax/Minは100倍を超えて分析値の広がり大きいことを示した。緑黄色野菜の葉菜類(ホウレンソウ、シュンギク、モロヘイヤ)は他の農作物に比べ元素濃度が高く、その他野菜(ダイコン、タマネギ、ナス)は元素濃度が低い傾向を認めた。土壌燻蒸剤としての臭化メチル等、農薬を使わない家庭菜園の農作物に比べて市販品のBrは高濃度を示したが、試料採取時期は臭化メチルの規制が決定(1995年)し、使用量の規制が開始された時期であったことと関連するものと推定している。土壌起源のFe, Al, Scはホウレンソウ中で濃度相関が認められ、植物体内への移行に関し、同一挙動性が示唆された。シイタケはCs濃度が他の農作物に比べ特異的に高く、Csを取り込む際に¹³⁷Csも取り込んでいるものと推察された。Fig.2にシイタケ中のCsと¹³⁷Cs濃度相関を示した。また、シイタケ中のCsとRbも高い正の相関が認められ、その同一挙動性を示唆するものとしている。また、農作物の分析値と既報⁴²⁾の献立を供した住民の平均年齢から、平成19年度国民健康・栄養調査結果による50~59才の女性の農作物摂取量をもとに元素の摂取寄与を調べ、日本人の食事摂取基準に対して最も農作物からの寄与が高いのはKであり、以

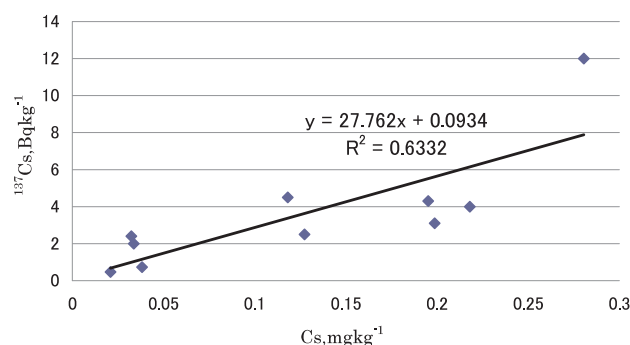


Fig. 2 Correlation between Cs and ¹³⁷Cs in mushroom

下, Mg, Fe, Zn, Ca 摂取に対し, 農作物の寄与が高いことを示した²⁰⁾. 本論文で基準値が未策定の種々の農作物中の微量元素濃度も提示し, 今後の基準値策定に向け有用な資料の提供を行った.

5. おわりに

これまで述べたように, 元素分析の重要性は時代のニーズとともに, 分析手法, 分析感度, 精度が変遷してきた. 今後も社会ニーズの変遷とともに分析対象となる元素も変遷し, それに伴い新たな分析方法も開発されるだろう. 今後, 新たな環境問題になる可能性がある元素としては, 希土類があげられる. これらは, 電子機器の基盤, 半導体部品等として, 急速に需要が高まっており, 現在新たな鉱脈の発見に各国が躍起となっている. 生産段階では大変貴重である一方で, 電子媒体として, 消費者の手に渡った製品の廃棄についてはまだ規制が無く, メーカー等による自主回収に委ねられており, 一般廃棄物として環境放出されているのが現状である. これらが環境汚染物質として問題になれば, 当然種々の環境・食品試料について分析要求が寄せられよう. また, 食品については含有する微量元素の組成比によって, 生産地の特定につなげ, 産地偽装の阻止に利用しようという試みもなされている⁴⁴⁻⁴⁷⁾. こうした中, 分析の精度, 確度については, 分析機器のハード面の向上はさることながら, サンプルングから前処理まで, また分析機器およびソフトウェアに対する深い認識, 保守管理等, ソフト面に関しても分析者に負うところが大きく, より一層の資質の向上に向けた研鑽が望まれる.

NAA に利用できる研究用原子炉 (TRIGA MARK II) は神奈川県内に2ヶ所存在していたが, いずれも2000年代初頭に廃炉となった. 現在, 日本では茨城県東海村の日本原子力開発機構が運営する原子炉と, 京都大学原子力実験所のみで, 利用者にとっては狭き門であり, また出力が大きいので, NAA 利用にも条件が難しい. 韓国ではハナロ (HANARO (High-flux Advanced Neutron Application Reactor)) が稼働し, 工業利用等のための様々な研究計画が進められている⁴⁸⁾. この研究炉は TRIGA MARK II の出力が100kW 前後であったのに対し, 30MW と大きい. 日本の研究用原子炉施設は両者とも, NAA 利用の研究者向けに低出力運転日を設けている. HANARO においても実際 NAA 法に利用するためには, 今後種々の工夫が必要となろう. 放射化分析研究会では, 韓国原子力研究所, 韓国放射化分析研究会とともに HANARO の日韓共同利用に向けて, 学会誌で韓国原子力研究所

特集を組んだり^{49), 50)}, 日韓合同研究会等を開催するなど, 積極的な活動がなされている. NAA 法活用の新たな方向性が打ち出されることを望む.

(平成22年8月20日受理)

引用文献

- 1) Gregory R. Choppin, Jan-Olov Liljenzin, Jan Rydberg: 放射化学, 柴田誠一訳 (代表), 486-488, 丸善, (2005).
- 2) 桜井弘編: 元素 111 の新知識, 176-180, 326-331, 講談社, (2001).
- 3) 経済産業省 中国経済産業局: 中国地域知的財産戦略本部メールマガジン 第47号, 2008. 11. 17
http://www.chugoku.meti.go.jp/chizai/mail_mz/index.html
- 4) 北川隆司: 足尾の鉱毒とウラルにおける足尾, 資源地質, **56** (1), 101-109, (2006).
- 5) 厚生白書 (昭和44年版) 各論第3章第3節1 (4) 微量金属対策
<http://www.env.go.jp/wpdocs/hpaz196901/b0129.html>
- 6) 中島貴子: 森永ヒ素ミルク中毒事件50年目の課題, 社会技術研究論文集, **3**, 90-101, Nov. (2005).
- 7) 伊藤泰男, 海老原充, 松尾基之: 放射化分析ハンドブック—確度の高い多元素同時微量分析への実践—, 丸善, (2004).
- 8) 紀杉, 藪谷智規, 毛利文彦, 木全千泉, 伊藤彰英, 千葉光一, 原口紘丞: 誘導結合プラズマ発光分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法による天日塩中不溶粒子の多元素分析とその地球化学的考察, 分析化学, **48** (10), 897-908, (1999).
- 9) 佐藤比奈子, 石山大三, 水田敏夫: プラズマイオン源質量分析法 (ICP-MS 法) による岩石試料および熱水試料の希土類元素分析, 秋田大学工学資源学部研究報告, **20**, 1-8, (1999).
- 10) 新城竜一, 宮本正雪: 蛍光X線分析装置 (XRF) による1:5希釈ガラスビードを用いた全岩主成分・微量成分元素の定量分析, 琉球大学理学部紀要 **84**, 5-13, (2007).
- 11) 飯島育代, 高城裕之: 化学分離放射化分析法による環境標準物質中のカドミウムの定量, 神奈川県衛生研究所研究報告, **17**, 22-28, (1987).
- 12) 久保田正明: 標準物質活用ガイド, 丸善, (2009).
- 13) M. Stoeppeler, W. R. Wolf, P. J. Jenks: "Reference Materials for Chemical Analysis." Wiley-VCH, (2001).

- 14) 岡本研作, 不和敬一郎: 環境標準試料 NIES No.7 「茶葉」について, 季刊環境研究, **62**, 167-172, (1986).
- 15) Cali, J. P.: The NBS Standard Reference Materials Program: An update, Anal. Chem., **48** (11), 802A-818A, (1976).
- 16) Okamoto, K., Fuwa, K.: Certified Reference Material Program at national Institute for Environmental Studies, Analytical Sciences, **1**, 206-207, (1985).
- 17) 飯島育代: 食品からの安定元素と放射性核種の摂取量評価に関する研究, H21 年度東京家政大学大学院学位論文, (2010).
- 18) 浜口博, 沼田祐一, 岩田志郎, 小山陸夫, 笹島和久, 片山幸士, 武内孝之, 志野木正樹, 真室哲雄, 日下譲, 辻治雄, 玉利祐三, 佐川直史, 大森佐興子, 永塚澄子, 谷崎良之, 鈴木隆司, 戸村健児, 橋本芳一, 板東昭次, 今橋強: 環境生物試料の放射化分析の精度. 分析化学, **26**, (8) T24-T28. (1977).
- 19) 平成 16 年度 放射能分析確認調査技術検討会資料 (平成 17 年 3 月 18 日 財団法人 日本分析センター)
- 20) 飯島育代, 高城裕之, 戸村健児, 杉山英男: 農作物中の濃度分布に関する検討, 日本食品化学学会誌, **16** (3) 123-136, (2009).
- 21) C. M. Lederer and V. S. Sherley: Table of Isotopes Seventh Edition, New York, (1978).
- 22) 山県 登: 微量元素 - 環境科学特論 -, (株) 産業図書, (1977).
- 23) 厚生労働省ホームページ「食品に含まれるカドミウムに関する Q&A」厚生労働省医薬品食品局食品安全部, 平成 22 年 7 月改訂
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/12/h1209-lc.html>
- 24) 池辺克彦, 田中之雄, 田中涼一, 国田信治: 魚介類および獣鳥鯨肉類の重金属の含有量, 食品衛生学雑誌, **18** (1), 86-97, (1977).
- 25) 田中涼一, 池辺克彦, 田中之雄, 国田信治: 加工食品中の重金属の含有量及び重金属の 1 日摂取量, 食品衛生学雑誌, **24** (5), 488-499, (1983).
- 26) 高城裕之: 放射化分析の衛生分野における研究 (1) 缶ジュース中のスズの分析, 神奈川県衛生研究所研究報告, **5**, 41-42, (1975).
- 27) Yamagata N., Takagi H., Furuya R. and Iwashima K.: Comparative studies of analytical method for rice grain, Special project research on detection and environmental pollution, Ministry of Education, Japan. **1**, 179-182, (1979).
- 28) Taguchi M., Takagai H., Iwashima K. and Yamagata N.: Metal content of shark muscle powder biological reference material, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **64** (2), 260-264, (1981).
- 29) 高城裕之: 高純度アルミニウムホイルを用いたサメ粉末試料中の水銀の放射化分析, 神奈川県衛生研究所研究報告, **10**, 63-64, (1980).
- 30) Takagi H., Yasuda K. and Taguchi M.: Metal content of mussel powder proposed for biological reference material. Bull. Kanagawa P. H. Lab., **16**, 16-22, (1986).
- 31) 杉山英男, 小山包博, 岩島 清, 山縣 登: ウランの環境影響評価, 公衆衛生院研究報告, **32**, 82-87, (1983).
- 32) 原子力安全委員会: 環境放射線モニタリング指針, 平成 20 年 3 月.
- 33) Saari, H., Luokkanen, S., Kulmaia, M., Lehtinen, S. and Raunemaa, T.: Isolation and characterization of hot particles from Chernobyl fallout in southwestern Finland. Health Physics, **57** (6) 975-984, (1989).
- 34) 高城裕之, 木村敏正, 岩島清, 山縣登: 放射化分析によるコメ中のヨウ素の簡易・迅速定量法, 分析化学, **32** (9), 512-516, (1983).
- 35) 高城裕之, 木村敏正, 小林宏信, 岩島清, 山縣登: 水田土壌から米への安定ヨウ素の移行について, 保健物理, **20**, 251-257, (1985).
- 36) 高城裕之, 飯島育代, 岩島 清: 分別捕集/放射化分析による降水中ヨウ素の化学形態別定量, 分析化学, **32** (9), 512-516, (1983).
- 37) 文部科学省: ヨウ素 -129 分析法, 放射能測定シリーズ 26, 平成 8 年.
- 38) 文部科学省: 環境試料中ヨウ素 129 迅速分析法, 放射能測定シリーズ 32, 平成 16 年.
- 39) Kuwahara C., Watanuki T., Matsushita K., Nishina M. and Sugiyama H.: Studies on uptake of cesium by mycelium of the mushroom (*Pleurotus ostreatus*) by ¹³³Cs-NMR, J. Radioanal. & Nuc. Chemistry, **235**, 191-194, (1998).
- 40) 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討会: 日本人の食事摂取基準 [2010 年版], 第一出版, (2010).
- 41) 厚生労働省: 日本人の食事摂取基準 [2005 年版], 第一出版, (2007).
- 42) Iijima I., Takagi, H., Tomura, K., Watanuki, T., Sugiyama, H.: Evaluation of cesium-137 (¹³⁷Cs)

- and elements intake from daily diets in residents of Kanagawa Prefecture, Japan. *Journal of Health Science*, **55**, 192-205, (2009).
- 43) 香川芳子：五訂増補食品成分表 2009, 女子栄養大学出版部, (2008).
- 44) 梁田陽子, 保倉明子, 松田賢士, 水平学, 中井泉：蛍光 X 線分析法によるホウレンソウ中の無機元素の高感度定量及び産地判別への応用, *分析化学*, **56**, 1053-1061 (2007).
- 45) Ariyama, K., Aoyama, Y., Mochizuki, A., Homura, Y., Kadokura, M., Yasui, A., : Determination of the geographic origin of onions between three main production areas in Japan and other countries by mineral composition, *J. Agric Food Chem.* **55**, 347-354, (2007).
- 46) 北村晃, 古山雄一, 谷池晃, 岡村秀雄, 福士恵一, 服部賢志：海洋環境関連物質及び農作物の微量分析, *神戸大学海事科学部紀要*, **4**, 147-154, (2007).
- 47) 小田久男, 川崎晃：微量元素の同位対比測定による米の産地国判別, *ぶんせき*, **12**, 678-683, (2002).
- 48) 韓国原子力研究所ホームページより
<http://hanaro.kaeri.re.kr/english/index.html>
- 49) Moon J., Cho H., Kim S., Baek S. and Chung Y. : Utilization and Facilities for a neutron activation analysis at the HANARO research reactor in Korea, *放射化分析*, **19**, 3-10, (2006).
- 50) Cho H., Kim S., Moon J., Kim H. and Chung Y. : PGAA Facility in the HANARO research reactor of Korea, *放射化分析*, **19**, 11-15, (2006).

短報

イヌのジアルジア保有状況

稲田貴嗣¹, 古川一郎¹, 泉山信司²,
外谷由紀³, 白井和彦^{3*}, 黒木俊郎¹

Prevalence of *Giardia* infection in dogs

Takatsugu INADA, Ichiro FURUKAWA,
Shinji IZUMIYAMA, Yuki TOYA,
Kazuhiko USUI and Toshiro KUROKI

はじめに

Giardia lamblia (syn. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*) はジアルジア症（五類感染症）の原因となる消化管寄生原虫の一種で、ヒトでは無症状のこともあるが、多くの場合不定の下痢、腹痛を起こし、その症状は一般に小児、特に低栄養乳幼児で著明で、脱水症の原因になることが知られている。日本で報告されている症例数は年間100例前後で、その60%以上は海外での感染と推測されている。日本での集団感染事例は知られていないが、先進諸国では水系感染による集団発生事例などが問題になっている。

Giardia 属の原虫の多くは、哺乳類、鳥類、ハ虫類などから検出されており、種による宿主特異性が強いと考えられてきた。しかし、ヒトに寄生する唯一の種として知られている *G. lamblia* は、イヌ、ネコ、有蹄類、齧歯類などからも検出されており、ヒトと同様の症状を示す人獣共通感染症の原因としても知られている。*G. lamblia* には7遺伝子型（assemblage A-G）があることが明らかにされており¹⁾、それらのうち、ヒトが宿主となる遺伝子型は assemblage A I（ヒト、イヌ、ネコ、家畜類由来）、assemblage A II（ヒトのみ由来）および assemblage B（ヒト、イヌ、ラットなど由来）であるとされてきた。そのためジアルジア症の原因として assemblage A と B が注目されてきた

が、近年、ヒト検体の中からイヌに特異的とされる遺伝子型（assemblage C, D）が検出された。イヌはペット、コンパニオンアニマルとしてヒトの生活と密接した動物であり、イヌのジアルジア保有状況とその遺伝子型を明らかにすることは、イヌからヒトへの感染を防御するための対策を考えるうえで重要である。さらに、日本国内の浄水場の水源からイヌ由来と推測される *G. lamblia* が検出されており²⁾、イヌを介する *G. lamblia* の水源汚染も考えられることから、神奈川県内のイヌの *G. lamblia* 保有状況とその遺伝子型の調査を行った。

材料および方法

2008年から2009年に、神奈川県動物保護センターに保護されたイヌ180匹（表1）の糞便から *G. lamblia*（シスト）の検出を行った。採取された糞便は検査に用いるまで冷蔵保存した。

表1 調査犬種の匹数と年齢

犬種	年齢(推定)					合計
	≤0.5	≤1	2	3	4≤	
雑種	10 ^{*1}	12	9	10	52	93
秋田犬					1	1
アフガンハウンド [†]					1	1
アメリカンコッカースパニエル				1	1	2
アラスカマラミュート					1	1
ウエルシュコーギー			1		1	2
紀州犬					1	1
ゴールデンレトリバー					2	2
シーズー					6	6
シェパード [†]					1	1
シェルティー					1	1
柴犬	1	1	2	1	12	17
セッター					1	1
チワワ			1 ^{*2}	1	2	4
トイプードル					2	2
日本スピッツ				1		1
バーニーズ [†]					1	1
パグ [†]					2	2
パセットハウンド [†]					1	1
パピヨン		1		2		3
ビーグル			1	1	7	9
ポインター			2	1		3
プラットハウント [†]					1	1
ボーダーコリー			1		1	2
ポメラニアン					2	2
ミニチュアシュナウザー [†]			1		2	3
ミニチュアダックス		1	1	4	2	8
ミニチュアピンシャー			1		1	2
ヨークシャーテリア					2	2
ラブラドル・レトリバー		1			4	5
合計	11	16	20	22	111	180
年齢構成(%)	6.1	8.9	11.1	12.2	61.7	

*1: *G. lamblia*陽性4例を含む

*2: *G. lamblia*陽性

1 神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
2 国立感染症研究所 寄生動物部
3 神奈川県動物保護センター 業務課
* 現 食肉衛生検査所

適量の糞便を用いてホルマリン・酢酸エチル遠沈法によりシストを精製した。得られた沈渣をスライドガラスに適量塗抹して、恒温器（37℃）中で乾燥後にメタノールで固定し、FITC（fluorescein isothiocyanate）標識抗 *Giardia* 抗体（Aqua-Glo G/C, Waterborne）による蛍光染色30分とDAPI（4', 6-diamino-2-phenylindole）染色5分を暗箱内にて行った。PBSで洗浄後、2% DABCO（1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane）PBSで封入し作製した標本を、落射型蛍光顕微鏡を用いてB励起光下で観察した。*G. lamblia*（シスト：長径約10 μ mの楕円形）が疑われるFITC陽性粒子は、UV励起光下でのDAPIで染色された核の確認を行った。

鏡検によって *G. lamblia*（シスト）が見つかった検体は、18S rRNAを標的としたnested polymerase chain reaction（nested-PCR）を行った。DNAの抽出は、沈渣からDynabeads GC-Combo（Invitrogen）を用いてシストを濃縮・精製し、凍結融解（-80℃～37℃）を5回繰り返した後、1×Proteinase K 20 μ l添加、インキュベート60℃ 30分、超音波処理2分、インキュベート75℃ 10分、インキュベート95℃ 5分、氷上冷却を行った。1st PCRでは抽出DNA溶液4 μ lをtemplateとして使用した。PCR反応液の組成は、2mM MgCl₂, 0.2mM dGTP, 0.2mM dATP, 0.2mM dTTP, 0.2mM dCTP, 40pMの各プライマー（RH11/4³）、5% dimethyl sulfoxide（DMSO）、5 unit HS EX Taq（TaKaRa EX Taq Hot Start Version：タカラバイオ）で、反応容量は50 μ lとした。nested-PCRは、1st PCR産物1 μ lをtemplate、GiarF/R⁴をプライマーとして、他の組成は1st PCRと同様とした。PCR条件は、96℃ 2分後に、96℃ 20秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとして40サイクル繰り返し、その後72℃ 7分とした。PCR産物をQiaquick PCR purification kit（QIAGEN）で精製後、BigDye Terminator v1.1（ABI）を用いて、ABI 310 Prismにより塩基配列を決定し、GenBank（NCBI）を利用した相同性解析によって遺伝子型別を行った。

結果および考察

2008年から2009年に保護されたイヌ180匹のうち、2008年に保護された雑種で生後6ヶ月以下の4匹（No. 2008-1～4）と2歳のチワワ1匹の糞便から *G. lamblia* が検出された。調査したイヌ全体における *G. lamblia* 感染率は2.8%で、生後6ヶ月以下のイヌでは36.4%（4/11匹）、生後7ヶ月以上のイヌでは0.6%（1/169匹）であった。

Itoh et al⁵ は、生後6ヶ月以下のイヌの *G. lamblia* 感染率（21.7%）が、7ヶ月以上のイヌの感染率（7ヶ月～1歳：7.5%、2～5歳：4.5%、6歳以上：2.4%）よりも明らかに高いことを報告している。また、荒島ら⁶ も生後1年以下のイヌの感染率（6ヶ月以下：22.0%、7ヶ月～1歳：22.2%）が1歳以上のイヌの感染率（1歳～3歳：12.6%、3～5歳：1.8%、5歳以上：1.7%）よりも高いことを報告している。本調査においても生後6ヶ月以下のイヌの感染率が高く、Itoh et al⁵ や荒島ら⁶ と同様に幼犬の *G. lamblia* 感染率が高いことが示された。

Itoh et al⁵ は青森・秋田で調査したイヌ全体に対する *G. lamblia* 感染率が14.6%であったと報告しており、荒島ら⁶ は日本全国を対象に調査したイヌ全体に対する感染率が10.8%であったと報告しているが、本調査において神奈川県内のイヌの感染率は2.8%と低い値を示した。Itoh et al⁵ が調査したイヌは感染率の高かった生後6ヶ月以下のイヌの占める割合が57.1%、荒島ら⁶ が調査したイヌは感染率の高い1歳齢以下のイヌの占める割合が33.4%であるのに対して、本調査では生後6ヶ月以下のイヌの占める割合が6.1%であった（表1）。イヌの年齢によって *G. lamblia* 感染率が大きく異なることが明らかであり、調査したイヌの年齢構成が、全調査個体あたりの感染率の評価に影響を与えた可能性がある。イヌの *G. lamblia* 感染率を明らかにする場合、年齢を考慮した調査が必要であると考えられる。

下痢をしているイヌは正常便を排出しているイヌよりも *G. lamblia* 保有率が高いと報告されている⁶ が、本調査で *G. lamblia* の感染が確認されたイヌはすべて正常便を排出しており、下痢をしているイヌからは確認されなかった。このことはイヌが *G. lamblia* に感染していることに気づかず、感染を広めている可能性があることを示すものと考えられる。ブリーダー由来のイヌの *G. lamblia* 感染率が約20%であったことが報告されており^{5, 6}、売買などにより感染したイヌが広範囲に分散する可能性があることから、下痢などの症状を示していないイヌでも *G. lamblia* が感染していないか確認する必要があると考えられる。

本調査において鏡検により *G. lamblia* が確認されたイヌの検体のうち、雑種2匹（2008-1,2）の検体からnested-PCRで増幅産物が得られた。それらの遺伝子解析の結果、遺伝子型はともに *G. lamblia* の assemblage D と100%一致した（図1）。Assemblage D はイヌ特異的な遺伝子型とされているが、ヒトから検出された *G. lamblia* の遺伝子型が assemblage D に

D*	1	ACAAGCCATGCATGCCCCGACACCCGGGAAGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCAC	60
2008-1	1	ACAAGCCATGCATGCCCCGACACCCGGGAAGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCAC	60
2008-2	1	ACAAGCCATGCATGCCCCGACACCCGGGAAGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCAC	60
D	61	CCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCG	120
2008-1	61	CCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCG	120
2008-2	61	CCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCG	120
D	121	CAAGTGCGGACGCCCCGCGGG	140
2008-1	121	CAAGTGCGGACGCCCCGCGGG	140
2008-2	121	CAAGTGCGGACGCCCCGCGGG	140

図1 *Giardia lamblia* 遺伝子型解析結果

* : assemblage D

分類された例が報告され, assemblage D のイヌからヒトへの感染の可能性が示唆されている⁷⁾.

日本で飼育されているイヌにおいて遺伝子型解析まで行った *G. lamblia* 感染状況の調査例は少なく, イヌにおける遺伝子型別 *G. lamblia* 感染状況は明らかになっていない. これまでは, イヌからヒトへの感染についてヒト, イヌともに宿主となることが明らかにされている assemblage A と B が問題にされてきたが, イヌに由来する assemblage D など他の遺伝子型もヒトに感染する可能性があること, また, 日本国内の浄水場の水源からイヌ由来と推測される assemblage C が見つかっており²⁾, イヌ由来の *G. lamblia* が水系を介した集団感染の原因になる可能性もあることから, 今後さらにイヌの *G. lamblia* 保有状況調査と遺伝子型解析を行い, イヌからヒトへの *G. lamblia* 感染の危険性を明らかにする必要があると考えられる.

まとめ

神奈川県内で保護されたイヌの *G. lamblia* 保有状況と, その遺伝子型の調査を行った. イヌ 180 匹のうち 5 匹 (2.8%) から *G. lamblia* が確認された. これら 5 匹のうち 4 匹は生後 6 ヶ月以下の幼犬であり, 幼犬の感染率が高いことが明らかになった.

感染が確認された雑種 2 匹の遺伝子型は, とともに assemblage D であった. Assemblage D はイヌ特異的な遺伝子型とされているが, ヒト検体から見つかったとする報告もあることから, イヌの *G. lamblia* 保有状況と遺伝子型を調査し, イヌからヒトへの感染の危険性を明らかにすることが重要であると考えられた. そして身近な動物であるイヌが, 人獣共通感染症の病原体である *G. lamblia* を保有していることを飼育者などに啓発する必要がある.

(平成 22 年 8 月 20 日受理)

参考文献

- 1) Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. and Ey, P. L. : Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin, *Infect. Genet. Evol.*, **3**, 29-38 (2003)
- 2) 肥塚利江 : 環境水の原虫汚染とヒトへの感染性に関する調査研究, 第 14 回「地域保健福祉研究助成」報告集, 205-209 (2009)
- 3) Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A. and Thompson, R. C. A. : Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality, *J. Parasitol.*, **83** (1), 44-51 (1997)
- 4) Read, C., Walters, J., Robertson, I. D. and Thompson, R. C. A. : Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhea, *Int. J. Parasitol.*, **32**, 229-231 (2002)
- 5) Itoh, N., N. Muraoka, M. Aoki and T. Itagaki : Prevalence of *Giardia lamblia* infection in household dogs, *J. J. A. Inf. D.*, **75** (8), 671-677 (2001)
- 6) 荒島康友, 熊坂一成, 河野均也, 浅野隆司, 保刈成男, 村杉栄治ほか : Zoonosis としてのジアルジア症に関する研究Ⅲ. 本邦におけるイヌおよび飼育者のジアルジア保有状況, *感染症学雑誌*, **66** (8), 1062-1066 (1992)
- 7) 所正治, Amjad, I. A. H., 春木宏介, 木村憲司, Din, S., Tudor, R. O. ほか : 多地域由来のジアルジアの遺伝子型解析 : 複数遺伝子座による系統樹解析, *Trop. Med. Health*, (Suppl.), 109 (2006)

短報

腸管出血性大腸菌感染症事例における LAMP 法の活用

鈴木理恵子*, 山本陽子, 永井 裕

Study of LAMP method in infections by enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Rieko SUZUKI, Youko YAMAMOTO
and Yutaka NAGAI

はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 以下 EHEC) を原因とする感染事例が世界で初めて報告されたのは、1982 年米国で発生したハンバーガーによる事例であった。我が国では、1990 年の埼玉県の幼稚園で給水設備が原因となった事例、1996 年の岡山県、大阪府の給食施設を原因とする大規模な集団発生事例があり、いずれも血清型 O 157 による事例であるが、O 157 以外の O 26, O 111 等による事例報告もある。1996 年の事例発生後は、食品の衛生管理の徹底や給食施設の改善など様々な安全対策がとられ大規模な集団発生はなく、小規模または散発的な EHEC 患者発生が報告されている。

患者発生に伴う防疫・食中毒検査として、接触者調査や原因施設特定のための調査依頼がある。調査依頼の対象は主に非発症者や投薬後の患者の陰性確認検査であるため、患者および発症者と比べ保有菌数が少ないことが想定される。このような場合、直接培養法では菌が検出されにくい状態であるため、直接培養法に加え増菌培養法の併用を行っている。増菌培養法を併用すると検査の正確性は向上するが、結果報告に要する日数は、直接培養法で検査開始日を含め 2 日～3 日に対し、増菌培養法で 3 日～4 日と長くなる。EHEC が検出された場合には、届け出が必要な三類感染症と

なるため、行政サイドからは検査結果の正確性と迅速性が望まれる検査である。

地域調査部では、厚生労働省医薬食品局安全部監視安全課長からの「腸管出血性大腸菌 O 157 及び O 26 の検査法について」の通知¹⁾を受け、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を食品 GLP 検査に導入するための検討²⁾を行い、平成 19 年より LAMP 法によるベロ毒素 (VT) 遺伝子検出を実施してきた。LAMP 法は従来の遺伝子増幅 (PCR) 法と比べ感度も高く操作も簡便で、短時間で遺伝子検出ができることから、迅速性が望まれる EHEC 検査への導入を試みた。平成 21 年度に地域調査部厚木分室に調査依頼のあった EHEC 感染症関連検査について、従来の培養法に加え LAMP 法による培養液中の VT 遺伝子検出を実施し培養法との成績を比較し、その有用性について報告する。

検査材料と方法

1. 検査材料

平成 21 年度の地域調査部厚木分室への細菌性食中毒菌検査依頼数は、51 事例 388 検体 (ヒト 166 検体、食品 143 検体、環境 79 検体)、三類感染症患者発生に伴う防疫検査依頼数は 9 事例 29 検体 (ヒト) であった。このうち、EHEC 患者 (O 157, O 26) 発生に伴う調査または臨床症状等から EHEC 感染症の疑いのある検体は、ヒト 54 検体、環境 23 検体、食品 6 検体 (計 83 検体) であった。このうち、食品 6 検体はすべて、通知¹⁾において VT 遺伝子による検索対象外としている食肉であったことから、この 6 検体を除く 77 検体について分離培養同定検査と併せ LAMP 法による培養液中の VT 遺伝子の検索を実施した (表 1)。

2. 分離培養法

各々の検体について定法³⁾に準じて検査を実施した。大腸菌全般を対象とする DHL 寒天培地 (栄研化学) に加え、選択培地として O 157 を対象としてセフェキシム亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー (CT-SMAC) 寒天培地 (OXOID)、O 26 を対象としてセフェキシム亜テルル酸加ラムノースマッコンキー (CT-RMAC) 寒天培地 (BD)、セフェキシム亜テルル酸加 RX O 26 寒天培地 (栄研化学) を状況に応じて用いた。検体塗抹後 36℃、18～24 時間好気培養を行った (直接培養法)。

また、ノボビオシン加 mEC 培地 (栄研化学) に検体接種後 42℃、18～24 時間培養後 (培養液)、直接培養法と同様の培地で分離培養を行った (増菌培養法)。

3. DNA 抽出法

培養液 50 μ l を 15,000rpm で 5 分遠心後上清を

神奈川県衛生研究所 地域調査部
〒243-0004 厚木市水引 2-3-1
suzuki.s3df@pref.kanagawa.jp

* 現 微生物部

表1 平成 21 年度 LAMP 法による検査実施数

検体種別	食中毒疑い検査				防疫検査				合計
	秦野	厚木	大和	(小計)	秦野	厚木	大和	(小計)	
ヒト	1	20	4	25	3	16	10	29	54
環境	0	15	8	23	0	0	0	0	23
計	1	35	12	48	3	16	10	29	77

取り除き、精製水 50 μ l を加えたのち、Extraction Solution for Foods (栄研化学) 50 μ l を添加し、転倒混和後軽く遠心した。95℃、5 分間加熱処理後、簡易遠心分離器で 1 分間遠心し、氷上等に移し上清をテンプレートとした。直ちに使用しない場合には 0～4℃ で保存し 4 時間以内に使用した。

4. VT 遺伝子検出法 (LAMP 法)

Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学) を用いて、添付書に従い試薬調製を行った後、作製したテンプレート 5 μ l を加えた。遺伝子増幅の設定条件は添付書に従い、温度：反応ブロック 65℃、ホットボンネット 75℃、測定時間：60 分、酵素失活処理：80℃、2 分間とした。

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

5. 同定法

各々の分離平板に疑わしい集落を観察された場合は、TSI 寒天培地、SIM 培地、リジン脱炭酸塩培地、VP 半流動培地等の生化学的性状試験用培地およびハートインフュージョン寒天培地に釣菌接種後、36℃、18～24 時間培養し、大腸菌の生化学的性状を確認するとともに、O 抗原等の血清型別、Loopamp ペロ毒素 (VT) タイピング試薬キット (栄研化学) を用いて VT 遺伝子の型別を行った。

結果および考察

今回、対象となったヒトおよび環境由来 77 検体中 5 検体から EHEC O 157 が分離され、いずれもヒトからの分離であった。血清型および毒素型は O 157 (VT1 & VT2) が 3 検体、O 157 (VT2) が 2 検体であった。

直接培養法で EHEC O 157 を疑う集落が確認され同定試験の結果、陽性と判定されたのは 3 検体であった。いずれも LAMP 法および増菌培養法ともに陽性であった。

直接培養法で分離平板上には疑わしい集落の発育を認めず陰性と判定されたのは 74 検体であった。そのうち 3 検体が、LAMP 法で陽性となり、増菌培養法による成績は陽性 2 検体、陰性 1 検体であった (表 2)。

LAMP 法の陽性判定は、濁度およびその増加速度

表2 平成 21 年度 EHEC の検出結果

検体	直接培養法	LAMP法	増菌培養法	血清型および毒素型
①	+	+	+	O157(VT2)
②	+	+	+	O157(VT2)
③	+	+	+	O157(VT1&VT2)
④	-	+	+	O157(VT1&VT2)
⑤	-	+	+	O157(VT1&VT2)
⑥	-	+	-	不検出

により機械的に判定される。検体に目的菌が存在していた場合、一夜培養すると 10⁸CFU/ml 程度に増殖する³⁾ことが知られており、これを検体とした場合 LAMP 法では 20 分程で濁度が増加し陽性と判定される。LAMP 法で陽性、増菌培養法で陰性となった 1 検体は、測定開始から約 50 分経過後に判定が陽性となったものの、濁度上昇速度が遅く測定終了時の最終濁度が低かったことから、明らかに目的菌が存在する場合と様相が異なっていた。この検査対象者は下痢、腹痛等の症状のない患者家族であったことから、接触者調査対象者であるため培養液中の対象とする VT 遺伝子の DNA 量 (菌量) が少ない、または非特異反応によるものと考えられた。この検体の培養液の分離培養には、Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットの DNA 抽出に用いる培養液量 (50 μ l) と同量を用い、CT-SMAC 寒天培地 5 枚に培養液 10 μ l を各々塗抹し (計 50 μ l) 分離培養を行った。CT-SMAC 寒天培地上には EHEC O 157 を疑う集落の発育は認められなかったため、O 157 以外の EHEC を想定し、併せて培養していた DHL 寒天平板上に発育した大腸菌様集落について、LAMP 法により VT 遺伝子の検索を実施したが確認はできなかったため、偽陽性と判定した。

増菌培養法を従来法とし、評価する方法を直接培養法、LAMP 法として感度および特異度を求めた。直接培養法の感度は 60%、特異度 100% であり、直接培養法による検査だけでは見落としが起る可能性が示唆された (表 3)。

LAMP 法の感度は 100%、特異度 99% であり、LAMP 法は偽陽性を検出する可能性があるものの、LAMP 法で陰性と判定され、増菌培養法でも陰性となる期待陰性率は 100% である。LAMP 法で陰性と判定された検体は、培養液の分離培養 (増菌培養法) を行わずに陰性と判定しても、増菌培養法と同等の成績が得られることが示唆され、検査日数の短縮も可能であった (表 4)。

培養液に対するスクリーニング法として、今までも簡便なイムノクロマト (IC) 法や PCR 法が行われてきた。検出感度は IC 法で 10⁴～10⁶CFU/ml、PCR 法で

表3 直接培養法と増菌培養法の結果の比較

		増菌培養法		合計
		陽性	陰性	
直接培養法	陽性	3	0	3
	陰性	2	72	74
合計		5	72	77

$$\text{感度} = 3 / (3+2) \times 100 = 60\%$$

$$\text{特異度} = 72 / (0+72) \times 100 = 100\%$$

表4 LAMP法と増菌培養法の結果の比較

		増菌培養法		合計
		陽性	陰性	
LAMP法	陽性	5	1	6
	陰性	0	71	71
合計		5	72	77

$$\text{感度} = 5 / (5+0) \times 100 = 100\%$$

$$\text{特異度} = 71 / (1+71) \times 100 = 99\%$$

$10^3 \sim 4$ CFU/ml, LAMP法で 10^2 CFU/ml, 所要時間は, IC法が約20分, PCR法は約3～4時間, LAMP法は約1時間である. LAMP法は検出感度, 所要時間ともに他の方法より優れ, EHEC培養液中のVT遺伝子のスクリーニング法として有用であると思われる.

正確性と迅速性が求められるEHEC感染症事例調査における検査では, 直接培養法のみだけでなく増菌培養法を実施し, 培養液はLAMP法によるVT遺伝子のスクリーニング検査を実施する. 直接培養法, LAMP法で共に陰性であった場合は, 従来の増菌培養と同等の精度を保ちながら検査2日目で陰性の結果報告が可能となり, 正確性と迅速性の両面での改善が図られた. また, LAMP法陽性であった検体については分離培養を継続して行うことで, 作業効率は向上すると考えられた.

本検討にあたり, ご協力いただきました秦野保健福祉事務所, 厚木保健福祉事務所および大和保健福祉事務所の担当の皆様に深謝いたします.

(平成22年8月20日受理)

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知: 腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法について, 平成18年11月2日付食安監発第1102004号
- 2) 鈴木理恵子, 永井裕, 原みゆき, 小松祐子, 小泉明子, 小儀國太郎: 「腸管出血性大腸菌O157及びO26検査実施標準作業書」作成のための基礎的検討, 神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 9-11, (2007).
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 2005

短報

日常精度管理試料の作製と 精度管理の実施について

鈴木理恵子*, 山本陽子, 永井 裕, 佐藤修二

Production of quality control samples and practice of quality control

Rieko SUZUKI, Youko YAMAMOTO,
Yutaka NAGAI and Shuji SATOH

はじめに

平成9年1月16日の食品衛生施行令等の改正に伴い「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」¹⁾により検査, 試験に関する管理基準が示され, 都道府県, 政令市等の設置する食品検査施設においても管理要領に従って検査を実施することになった。続いて示された平成9年4月1日付「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」(別添)「精度管理の一般ガイドライン」²⁾では, 精度管理の実施方法についての基本的事項が示され, 効果的な精度管理の実施を確保することとなっている。食品検査における信頼性確保のために, 日常の内部精度管理は重要であるが, 微生物学的検査においては, 精度管理用試料の材料や方法等の実施方法は確立されていない。

地域調査部厚木分室の内部精度管理は, 「通常検出される微生物を対象とした検査等」として一般細菌数を実施することが多いが, 市販枯草菌芽胞液を用いて行うため, 日常的な検査工程とは異なり, 検査工程の管理ではなく, 希釈操作の精度が主な評価対象となっている。そこで, 実際に使用する細菌数検査実施標準作業書に基づいた, 細菌数の日常内部精度管理を実施するため, 「精度管理の一般ガイドライン」に示された, 「添加量が明らかな試験品」を作製するための検討を

行った。

試験品の作製にあたっては, 基になる試験品は入手や作製が容易であること, 添加菌数のコントロールが可能なこと, 菌数の変動が少なく, 良好な回収率であること, 作製後数ヶ月間安定なこと, 検査における操作が煩雑にならないことに留意した。作製した試験品について実際の標準作業書に従った方法で内部精度管理を実施したので報告する。

検査材料と方法

1. 寒天基材の検討

試験品は, Agar (BD) および Agarose (TaKaRa) をリン酸緩衝水 (以下, PB) で溶解した寒天基材を用いた。

試験品を作製するにあたり, Agar 濃度 1.0%, 0.7%, 0.5% および 0.2% の 4 段階, Agarose 濃度 0.4% および 0.2% の 2 段階の寒天基材 200g を各々作製し冷却後冷蔵保管した。その後, 寒天基材の外観, 秤量時の混和状態, 採取時の扱いやすさ, ストマッカー処理後の均一性, 希釈時の抵抗性について評価を行い, 以下の寒天基材濃度について菌を添加した試験品を作製した。

2. 試験品の作製

250ml ねじ口瓶に Agar0.7%(以下, A), Agar0.5%(以下, B), Agarose0.2% (以下, C) の各寒天基材を 200g 各々 6 本作製し, 121℃ 15 分高圧蒸気滅菌した。滅菌後, 寒天基材を恒温水槽 (44.5 ± 0.2℃) で保持した後, 枯草菌芽胞液 (栄研化学) (1.1×10^7 CFU/ml) 1ml を各々添加し, 均一となるように良く攪拌し, 冷却後冷蔵保管した。枯草菌芽胞液を添加した寒天基材 (以下, 試験品 A, B, C) は, 洋生菓子の模擬食品と想定し, 細菌数の測定を実施した。

3. 精度管理の実施方法

細菌数の検査は, 平成 21 年度地域調査部微生物検査実施標準作業書のうち細菌数検査実施標準作業書 (SOP No. 15-40-11100 および SOP No. 15-40-11132) に準拠し, 試験品 A, B, C について平成 21 年 10 月から平成 22 年 3 月まで毎月 1 回 (計 6 回), 2 名の検査員で各々の試験品について 5 重測定を実施した。

試験品 A, B, C 各 1 本を室温に戻し, 滅菌した薬さじで良くかき混ぜ, 25g を無菌的にストマッカー袋に量りとった。PB225ml を加えてストマッカーで 30 秒間細砕し, これを試料原液 (10 倍希釈液) とした。

試料原液 1ml を PB9ml に加えて混合し, 10 倍段階希釈を行った。同様に 3 段階まで希釈し, 試料液は, 試料原液及び段階希釈液とし, 滅菌ピペットで各試料液 1ml を滅菌シャーレ 2 枚に採取した。

神奈川県衛生研究所 地域調査部
〒243-0004 厚木市水引 2-3-1
suzuki.s3df@pref.kanagawa.jp

* 現 微生物部

43～45℃に保持した標準寒天培地を約15mlずつ滅菌シャーレに分注し、回転混和後室温に放置し冷却凝固させた。平板を倒置して35±1.0℃で24±2時間培養した。

試料原液及び各倍率希釈の集落数30～300のものを計測し、1希釈倍数につき複数の平板を計数した場合、それらの算術平均を求め、その希釈倍数を乗じて試料中の細菌数とした。

結果および考察

寒天基材6種類を作製し、検体と想定した。外観、扱いやすさ等について実際に検査を行っている検査員複数で評価を行った。

評価項目は、①冷蔵保管した寒天基材の状態および他の検査機関で実施する場合の輸送の適正度（外観）、②秤量時の薬さじで細砕した場合の細かさ（混和）、③薬さじで採取する時の扱いやすさ（採取）、④希釈液を添加しストマッカー処理後の状態（均一性）、⑤ストマッカー処理後のピペットによる希釈作業時の抵抗性（希釈）の5点について、各々の評価基準（表1）を定め、「○」「△」「×」で評価した。総合評価は評価項目の中で「×」がある場合は「×」とし、「○」「△」が混在する場合にはその数の多い方を総合評価とした（表2）。

表1 寒天基材の評価基準

表記	外 観	混 和	採 取	均 一 性	希 釈
○	輸送適 表面に水分がなく 形状が保持される	5mm程度に 細砕される	容 易	均一な状態	容 易
△	—	1cm程度に 砕ける	若干 難あり	小さな固形物は あるが均一な状態	若干 抵抗あり
×	輸送不適 表面に水分があり 形状が保持できない	砕くことが できない	困難	固形物があり 不均一（沈殿あり）	抵抗あり

表2 寒天基材の評価

寒天基材	濃度	外 観	混 和	採 取	均 一 性	希 釈	総合評価
Agar	1.0%	○	×	△	×	×	×
	0.7%	○	△	○	△	△	△
	0.5%	○	○	○	○	△	○
	0.2%	×	○	×	○	○	×
Agarose	0.4%	○	×	×	×	×	×
	0.2%	○	○	○	△	○	○

寒天基材の外観は、Agar0.2%で冷蔵保管後の寒天表面に水分が確認され、ねじ口瓶を軽く振ると寒天基材が崩れ形状を保持することができなかった。寒天基材を輸送後、他の施設で精度管理を実施することを考慮し、輸送不適と判定した。その他の5種類の寒天基

材は、いずれも寒天基材の形状が保持できたことから輸送可能と判定した。

薬さじで混和するとAgarose0.4%は弾力が強く、薬さじでは混和不能、Agar1.0%は弾力が強く、大きな固まりとなり細砕ができなかった。Agar0.7%は弾力が強いものの1cm程度に砕くことは可能であった。Agar0.5%、0.2%およびAgarose0.2%は薬さじで容易に5mm程度に細砕され試験品を均一化とすることが可能であった。

寒天基材の採取は、Agar1.0%およびAgarose0.4%は細砕できないため秤量が困難、Agar0.2%は水分が多く薬さじで採取しにくいなどの問題があった。

希釈液を加えストマッカー処理した後は、Agar1.0%およびAgarose0.4%では固形物が沈殿して不均一な状態、Agar0.7%およびAgarose0.2%では、小さな固形物はあるが均一な状態、Agar0.5%、0.2%では固形物が見られない均一な状態であった。

ピペットによる希釈では、Agar1.0%およびAgarose0.4%で抵抗があり希釈に注意が必要で、Agar0.7%および0.5%でやや抵抗があるが希釈可能、Agar0.2%およびAgarose0.2%で抵抗がなく希釈可能であった。

今回、6種類の寒天基材を5項目で評価した結果、総合評価で「○」または「△」であったAgar0.7%、0.5%およびAgarose0.2%の3種類の寒天基材が輸送、検査過程の採材、ストマッカー処理等の工程において適当であると思われ、これらについて試験品の作製を行った。

一般細菌数など通常検出する微生物を添加し試験品を作製する場合、食品中に基準値程度と基準値の1/5程度に調整した2種類の菌量について試験を行うこと²⁾とされている。しかし、通常業務と並行し、日常精度管理として2種の試験品について5重測定を実施することは容易ではない。今回は、2種類の濃度のうち細菌数基準値の1/5程度の濃度の1種類を選択し、試験品の作成を行った。「洋生菓子の衛生規範について」³⁾をはじめとして細菌数基準値の多くが、製品1gにつき10万個と設定されていることから、試験品の濃度は、基準値の1/5程度である10⁴CFU/gとした。実際には、寒天基材200gに対し市販枯草菌芽胞液を1ml添加し、試験品A、B、Cの細菌数が5.5×10⁴CFU/gとなるように作成した。

試験品A、B、Cを2人の検査員で5重測定を6回（6ヶ月間）実施した結果、細菌数の平均値はそれぞれ、3.1×10⁴CFU/g、5.1×10⁴CFU/g、3.2×10⁴CFU/gで回収率は56.4%、92.7%、58.2%であった（表3）。

表3 各試験品に対する枯草菌芽胞液の回収率

試験品	添加量 (CFU/g)	細菌数 (CFU/g)	回収率 (%)
A (Agar0.7%)	5.5×10^4	3.1×10^4	56.4
B (Agar0.5%)	5.5×10^4	5.1×10^4	92.7
C (Agarose0.2%)	5.5×10^4	3.2×10^4	58.2

表4 細菌数の精度管理成績

試験品	測定月	測定数	菌数平均値 ($\times 10^3$ CFU/g)	標準偏差 (SD)
A (Agar0.7%)	10月	10	29.70	2.79
	11月	10	35.60	3.24
	12月	10	29.00	3.97
	1月	10	35.50	2.84
	2月	10	27.60	2.72
	3月	10	31.10	3.28
	平均	60	31.42	4.35
B (Agar0.5%)	10月	10	56.60	6.59
	11月	10	47.10	5.02
	12月	10	47.50	6.55
	1月	10	52.30	3.37
	2月	10	50.40	4.84
	3月	10	53.20	2.90
	平均	60	51.18	5.80
C (Agarose0.2%)	10月	10	28.60	3.20
	11月	10	35.80	3.55
	12月	10	32.60	2.55
	1月	10	27.30	3.13
	2月	10	40.90	3.00
	3月	10	25.00	1.94
	平均	60	31.70	5.87

細菌数データの集計は、1,000 で除した数値を用いて標準偏差を算出し（表4）、統計ソフトウェア SPSSVer.11.5 を用いて xbar- R 管理図を作製した（図1）。

xbar- R 管理図は、平成 21 年度食品衛生外部精度管理調査結果報告書⁴⁾においても、一般細菌数測定検査の評価に用いられている。今回は1回毎の日常精度管理を一つの群と見なし、この群内変動（測定値のばらつき）と6回の日常精度管理における群間変動（平均値のばらつき）とを比較するために xbar- R 管理図を用いた。

測定値のばらつきを xbar 管理図（図1：上段）で

見ると、 $\pm 2SD$ 値は試験品 A, B, C それぞれ 8.71, 11.60, 11.73 で、いずれの試験品も6回の測定値は $\pm 2SD$ 範囲内の変動であった。細菌数は、6ヶ月間の冷蔵保存においても大きな変動はなく、中でも試験品 A の $\pm 2SD$ 値が最も低く安定していた。

平均値のばらつきを R 管理図（図1：下段）で見ると、試験品 A, B, C はいずれも管理限界線（UCL, LCL）内の標準的なばらつきの範囲内にあり、その点の散らばり方に偏りは見られなかった。管理限界線幅は試験品 C が最も小さかった。

試験品の作製については、大島ら⁵⁾がろ紙に枯草菌芽胞液をしみこませたバイオロジカルインジケータ、自然汚染食品または寒天基材を用いた一般細菌数測定試験品の作製を試みている。ろ紙では、輸送が簡単で安定性、均一性であることなど利点も多いが、実際の検査手順と異なること等の問題点があり、自然汚染食品では実際の食材ではあるが、試料中に種々の微生物が混入しているなど、菌数コントロールの難しさ等の問題点があった。寒天基材を用いた試験品では、安定した成績が得られ、添加菌数のコントロールが容易であることから、平成 13 年以降の食品衛生外部精度管理調査にも用いられている。

今回の試験品は、素原料が入手し易く、作製は容易であり、滅菌処理により他の微生物の除去が可能であること、表1に示した各評価項目が「○」または「△」であることを条件に作製を行った。素材の寒天基材 Agar および Agarose はともに実験室内に常備されており、素原料が入手し易く、作製は容易で他の微生物を除去できる。表1に示した作業工程の条件を満たす、Agar0.7%、0.5%および Agarose0.2%では、添加菌として枯草菌芽胞液を用いることで、菌数コントロールが可能であり、菌数変動も少ない安定した試験品を作製できた。

「精度管理の一般ガイドライン」に示された精度管理に必要な目標値の設定（1）回収率等の確認の中に、試験品中の濃度と検査結果の差を最小限とするため、添加した既知の微生物の回収率を少なくとも70%～120%を目安として確保することと記載されている。試験品 A, B, C を用いて日常精度管理を実施した場合の回収率は56.4%～92.7%であった。同じ素材の試験品（Agar）であっても濃度の違いにより回収率に差が認められ、3種類の試験品の中でガイドラインに示された回収率が確保されたのは試験品 B のみであった。良好な回収率である試験品 B を模擬食品として日常精度管理を実施することにより、日常精度管理の目標値を確保することが可能であると思われる。

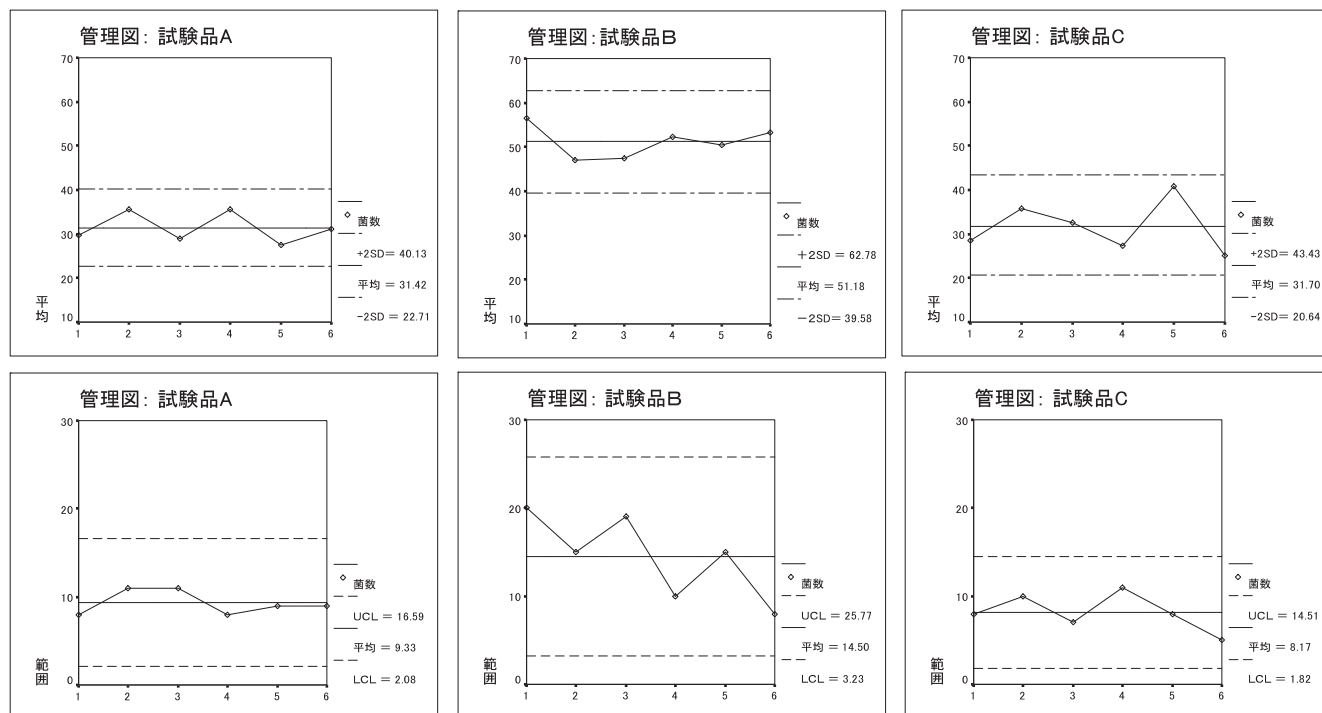


図1 試験品 xbar-R 管理図 (上段: xbar 管理図 下段: R 管理図)

今回の検討で、寒天基材による試験品は、実際の食品と生菌の分布や性状の点で異なるが、実際に使用している細菌数検査実施標準作業書に基づき、一連の検査手順に従って実施でき、添加菌量のコントロールが容易である。また、均一性、安定性に優れ、6ヶ月間の保存でも同様な結果が得られることが明らかとなった。今後は、さらに寒天基材濃度および添加菌量を変化させ、均一性および安定性に優れた試験品の検討を行っていききたい。

本検討にあたり、データ解析にご協力いただきました地域調査部茅ヶ崎分室の寺西大氏に深謝いたします。

(平成 22 年 8 月 20 日受理)

文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知：食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領，平成 9 年 1 月 16 日衛食第 8 号，(1997)
- 2) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知：食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について，平成 9 年 4 月 1 日衛食第 117 号，(1997)
- 3) 厚生省環境衛生局食品衛生課長通知：洋生菓子の衛生規範について，昭和 58 年 3 月 31 日環食第 54 号，(1983)
- 4) 財団法人食品薬品安全センター：平成 21 年度食品衛生外部精度管理調査結果報告書－総括報告書－，(2010)

- 5) 大島赴夫，鈴木達也，山田健一，高野恵美，山本奈々美，中阪聡亮他：一般細菌数検査に関わる調査試料と調査成績，食品衛生研究，54，7-14，(2004)

短報

高速液体クロマトグラフィー / タンデム質量分析法を用いた リンゴ果汁中のパツリンの分析

甲斐茂美, 赤星 猛*, 脇ますみ, 藤巻照久

Analysis of patulin in apple juice using liquid chromatography / tandem mass spectrometry

Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI,

Masumi WAKI and Teruhisa FUJIMAKI

はじめに

パツリンは、ペニシリウム属やアスペルギルス属等の真菌によって産生されるカビ毒であり、その毒性は急性毒性として、消化管の充血、出血、潰瘍等である。パツリンの構造式を図1に示した。原因菌としては、リンゴの腐敗菌の *Penicillium expansum* 等が知られている。

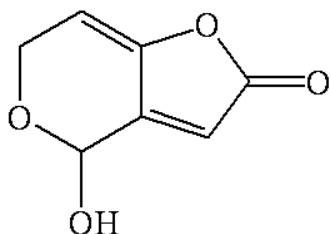


図1 パツリンの構造式 (分子量 154.03)

これらのカビは、りんごの収穫、包装、輸送時等に受けた損傷部から侵入すると考えられている。特に、台風等により落下して傷が付くとともに、土壌に直接触れた果実は、パツリン汚染のリスクが高いといわれている。また、湿度が高ければ、低温でもパツリンを作ることが知られており、日本の気候条件でも十分に作られる可能性があることから、不適切な貯蔵等によりパツリンを産生する恐れがある^{1, 2)}。このため、わが国では平成16年より、りんごジュース及び原料用りんご果汁について「パツリンの含有量が0.050ppm

を超えるものであってはならない」との規格基準を設定した^{3, 4)}。パツリンの試験法は、定性及び定量試験として紫外分光光度型検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法が、確認試験として液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC/MS) またはガスクロマトグラフィー / 質量分析法 (GC/MS) が厚生労働省告示^{3, 4)} に示されている。当所では、平成17年度より HPLC 及び LC/MS を用いてリンゴジュース中のパツリン検査を実施してきた。しかし、パツリンの HPLC での測定では、パツリンの溶出時間付近にリンゴジュースに含まれる糖分等に由来するピークが検出されるため、定量の際にはこれらの妨害物質による影響を受けないよう、サンプルの状況に合わせて分析条件を変更する必要がある。また GC/MS 法ではパツリンを誘導体化して測定するため、抽出、精製等の前処理操作が煩雑である。

一方、近年普及してきた高速液体クロマトグラフ / タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) は、食品由来の夾雑成分中から多数の目的物質を精度よく検出することが可能であり、LC/MS 以上の性能を有することから、パツリンの分析において非常に有効であると思われる⁵⁾。著者らは、従来からイオントラップ機能を有する LC/MS/MS が、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) による定量に加え、エンハンスドプロダクトイオンスキャン (EPI) の機能により、高感度測定と構造解析能を合わせ持ち、高い選択性を有することに着目し、検査の確認に活用してきた。

そこで今回、パツリンの分析法としてイオントラップ LC/MS/MS による確認法及び定量法を確立し、日常検査への適用について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料及び試薬

試料は神奈川県内で販売されていたリンゴジュースを分析対象とした。

パツリン標準品は和光純薬工業 (株) 製を用いた。標準品 5mg を精秤し、酢酸エチル 25ml に溶解して 200 μ g/ml としたものを標準原液とした。標準原液を正確に 1ml 採り、窒素気流下で乾固した後、酢酸溶液 (pH4.0) で段階的に希釈し各濃度の標準溶液とした。

酢酸エチルは和光純薬工業 (株) 製残留農薬分析用、アセトニトリルは和光純薬工業 (株) 製 LC-MS 用を用い、他は特級を用いた。液層分離ろ紙は Whatman 社製 1PS を用いた。

2. 装置及び分析条件

LC/MS/MS は エービー・サイエックス 社 製

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
* 前 理化学部

3200QtrapTMLC/MS/MS を用い、イオン源はESI、イオン化モードはネガティブで測定した。イオンスプレー電圧 -4.0kV、イオン源温度 600℃、ネブライザーガス圧 50psi、ターボガス圧 80psi で測定した。MRMモードではプレカーサイオンは m/z 153、プロダクトイオンは定量イオン m/z 109 (コリジョンエネルギー (CE) -12V)、参照イオン m/z 81 (CE -16V) で測定した。分析カラムは関東化学社製 MightysilRP-18GP (2.1mm i.d. $\times$ 150mm, 3 μ m) を用い、カラム温度 40℃、移動相はアセトニトリル-2mM 酢酸アンモニウムを用い、0-15min : (5 : 95) から (90 : 10) までの直線グラジエント、流速 0.2ml /min で送液し、注入量 5 μ l で分析した。

3. 試験溶液の調製

試験溶液の調製法は告示法³⁾ に準じて行った。試料 5.0 g (濃縮した原料用果汁では、濃縮した倍数の水で希釈したもの) を正確に採り、酢酸エチル 10ml で3回抽出した。得られた酢酸エチル層を 1.5%炭酸ナトリウム溶液 2ml で速やかに洗浄し、液層分離ろ紙を用いて脱水しながら、減圧濃縮器中にろ過した。40℃以下で濃縮した後、窒素気流下で酢酸エチルを除去した。残留物に酢酸水溶液 (pH4.0) 1.0ml を正確に加えて溶解し、13000rpm で5分間遠心分離し、上澄液を試験溶液とした。

結果と考察

1. LC/MS/MS 測定条件について

1) EPI 分析条件

分析の選択性を高めるために、構造情報の得られる、イオントラップLC/MS/MS特有の機能のEPIモードの測定条件について検討した。パツリンはイオン源をESIとし、ネガティブモードでイオン化が可能であった。パツリン標準溶液について、[M-H]⁻の m/z 153 プレカーサイオンと、それぞれ複数のプロダクトイオンが測定できる条件を求めた。CE= -10V のとき [M-H-CO]⁻ の m/z 125, [M-H-CO₂]⁻ の m/z 109, [M-H-C₂O₃]⁻ の m/z 81 の各フラグメントイオンが得られた (図2A)。EPIによる分析では0.25ngまでの範囲で同様のスペクトルが得られた。これらのスペクトルは化合物の構造情報を反映しており、定性分析の指標として有効であると考えられた。

2) MRM 分析条件

EPIモードよりさらに高感度な測定による定量、確認のためMRMモードによる分析条件について検討した。イオン源をエレクトロスプレーイオン化法と

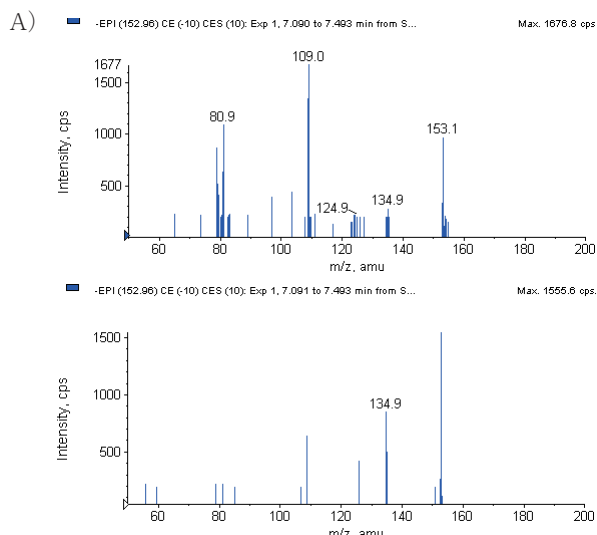


図2 EPI分析によるスペクトル

A) パツリンの標準溶液 (50ppb)

B) パツリンの検出が疑われた検体の抽出液

し、ネガティブモードでイオンソースの最適化を行った。[M-H]⁻である m/z 153 をプレカーサイオンとし、[M-H]⁻ から派生するプロダクトイオンのうち、最も感度が強く得られた m/z 109 を定量イオン、次に感度が強く得られた m/z 81 を参照イオンとした。定量イオンで検量線を作成したところ、0.025 ~ 2.5ng の範囲で良好な直線性を示し、検量線の相関係数 (r) は 0.999 であった。MRMモードにおいて、S/Nが10を与える定量限界値を、エービー・サイエックス社の解析ソフト Analyst を用いて求めたところ、試料中濃度で 0.001 μ g/g であった。これは、告示法に示された定量限界値 (0.01 μ g/g) に対し、十分に満足する値であった。

3) マトリックスの測定値への影響

LC/MS/MSにおける分析では、試料中のマトリックスが目的成分のイオン化に影響を与えることが懸念される。そこで、リンゴジュースの抽出溶液で標準原液を希釈して調製したマトリックス添加標準溶液と、酢酸溶液で調製した標準溶液 (以下溶媒標準溶液) の測定値を比較し、マトリックスの測定値への影響を検討した。溶媒標準溶液のピーク面積 (b) に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積 (a) の比 (a/b) は、0.7 ~ 1.2 の範囲を超え、目的物質のイオン化にマトリックスによる影響が認められた。そこで、定量にはマトリックス添加標準溶液による検量線の作成が有効であることがわかった。

4) 添加回収試験及び確認試験

LC/MS/MSのMRM分析を用いて、リンゴジュースにパツリンを告示法の定量限界値の2倍である 0.02 μ g/g になるよう添加して回収試験 (n=5) を

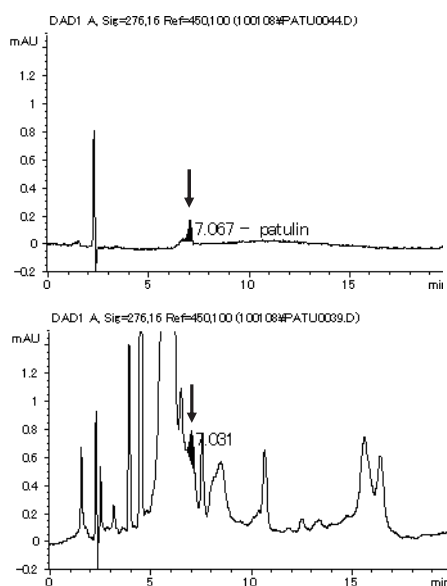


図3 HPLC 分析によるクロマトグラフ

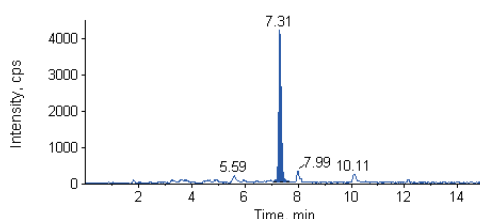
A) パツリンの標準溶液 (50ppb)

B) パツリンの検出が疑われた検体の抽出液

装置: Agilent 社製 1100 シリーズ, カラム: Mightysil RP-18 GP (4.6mm i. d. ×150mm, 5 μm), カラム温度 40℃, 検出器: UV276 nm, 移動相: アセトニトリル・水 (4 : 96), 流速: 1.0ml/min, 注入量: 20 μl

A) sp50_3 - 153.0 / 108.9 (Standard) 153.0/108.9 amu - sample 6 of 23 from 100510.wiff

Area: 2.62e+004 counts Height: 4.18e+003 cps RT: 7.31 min



B) A2 - 153.0 / 108.9 (Unknown) 153.0/108.9 amu - sample 22 of 23 from 100510.wiff

Area: 8.34e+002 counts Height: 1.18e+002 cps RT: 7.41 min

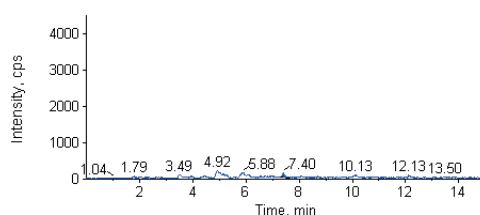


図4 MRM 分析によるクロマトグラフ

A) パツリンの標準溶液 (50ppb)

B) パツリンの検出が疑われた検体の抽出液

行った。定量にはマトリックス添加標準溶液による検量線を用いた。回収率は $80.1 \pm 3.4\%$, 変動係数は 4.3% と良好な結果が得られた。

また、平成 21 年度の検査において、HPLC による分析でパツリンの検出が疑われた検体について、確認のため LC/MS/MS を用いて分析を行った。HPLC の分析で得られたクロマトグラムを図 3 に、LC/MS/MS の MRM 分析の定量イオンによるクロマトグラム

を図 4 に示した。HPLC の分析では、試験溶液のクロマトグラムには、パツリンのピークの保持時間付近にリンゴジュース由来の妨害物質のピークが検出され、定量結果に影響を与えていることが懸念された(図 3B)。この試験溶液を LC/MS/MS の MRM モードで分析したところ、試験溶液のピーク (図 4B) は、告示法の定量限界値に相当する標準溶液のピーク (図 4A) をはるかに下回ることが確認された。さらに、LC/MS/MS の EPI モードで測定し、標準溶液のスペクトル (図 2 A) と比較したところ、試験溶液からは特異的なプロダクトイオンが観察されず、パツリンの検出は確認できなかった (図 2 B)。

まとめ

リンゴの腐敗菌の *Penicillium expansum* 等により産生されるカビ毒のパツリンについて、LC/MS/MS による定量・確認法を確立し、日常検査への適用を検討した。LC/MS/MS による測定では、誘導体化等の複雑な前処理を行うことなく、簡便な抽出法で得られたサンプルでの測定が可能であった。また、イオントラップ LC/MS/MS の EPI や MRM による分析は、高感度であると共に、妨害物質の影響を排除することが可能であり、分析精度を飛躍的に向上させることができることが明らかになった。

カビ毒の食品汚染に対する対策は、海外では規制があるものの、我が国ではまだ残留基準値が定められておらず、食品への汚染が懸念されるカビ毒が数多く存在している。今後はこのようなカビ毒に対しても、LC/MS/MS 等を用いた分析法を導入し、流通食品のモニタリング調査を進めていきたいと考える。

(平成 22 年 8 月 20 日受理)

文献

- 1) 横田栄一：りんごジュースおよび原料用りんご果汁に含まれるパツリンに関する規格基準の設定, 食品衛生研究, 54 (3), pp7-10 (2004)
- 2) 田端節子：食品分析インフォメーション Vol.12, 食品衛生研究, 55 (11), pp29-35 (2005)
- 3) 厚生労働省告示第 369 号 (平成 15 年 11 月 26 日)
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について (食安発第 126001 号, 平成 15 年 11 月 26 日)
- 5) 赤木浩一, 畑野和広：LC/MS/MS によるリンゴジュース中のパツリンの残留分析, 福岡市保健環境研究所報, 29, pp145-147 (2004)

短報

食品中のアレルギー物質検査における 精度管理の検討 - II 可溶化剤を用いた 抽出法による定量・定性

渡邊裕子¹, 赤星千絵², 濟田清隆³,

橋口成喜², 関戸晴子¹, 渡部健二郎³, 田中幸生²

Study of managing accuracy methods for detection of foods containing allergic substances - II Quantification and Qualitation by using extraction buffer containing a surfactant

Hiroko WATANABE, Chie AKABOSHI, Kiyotaka SAITA,
Shigeki HASHIGUCHI, Haruko SEKIDO,
Kenjiro WATABE and Kouki TANAKA

緒言

平成 14 年より施行された食品表示制度におけるアレルギー物質検査¹⁾の信頼性を確保するため、神奈川県内の行政検査機関である川崎市、横浜市、神奈川県の 3 機関が共同で精度管理について検討を行い、その結果を既報²⁾において報告した。既報では、県内 3 機関の ELISA 法における手法や技量が同等であることを確認し、室内精度が確保されていることを示すことができたが、標準品が公開されていないことや食品によりその抽出効率が大きく異なるなど、精度管理を行うにあたり安定した試料の確保や実サンプルの真度の把握などの課題が明らかとなった。

一方、検査法においては食品加工によるタンパク質の変性により、使用した原材料の抽出効率が低下する状況を受けて、平成 17 年に ELISA 抽出液に変性剤等を用いた検査法^{3, 4)}への改訂が行われた。しかし、改訂後の検査法においても、その精度管理においては従

来法と同様の課題が残こされたままとなった。ゆえに、改訂される検査法の特定原材料検知法開発者⁵⁾(日本ハム(株)、(株)森永生科学研究所)が行う試験室間バリデーションに共同参画し、各機関における定量・定性室間バリデーションを把握し、検査の信頼性の確認を行った。

方法

1. 試料の調製

試料は、特定原材料検知法開発者が作製した加工食品を用いた。加工食品には各特定原材料の一次標準粉末をタンパク質濃度として 10 μ g/g 添加している。定性では特定原材料タンパク質を含まない陰性サンプルについても分析を行った。

2. 試薬および機器

ELISA 法による定量には、(株)森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 落花生測定キット、そば測定キット、日本ハム(株)製 FASTKIT エライザ Ver. II 卵キット、同牛乳キット、同小麦キット、同落花生キット、同そばキットを用いた。

ウエスタンブロット法による定性には、(株)森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 卵ウエスタンブロットキット(オボアルブミン(以下 OVA)およびオボムコイド(以下 OVM))、同牛乳ウエスタンブロットキット(カゼイン(以下 CN)および β -ラクトグロブリン(以下 β -LAG))、その他の試薬は、すべて試薬特級を用いた。水は超純水を用いた。

抽出操作には、振とう機 TAITEC SR-2 s を用いた。ELISA 法には、マイクロプレートウオッシャー バイオラッド(株)製モデル 1575 及びマイクロプレートリーダー バイオラッド(株)製モデル 680(主波長 450 nm, 副波長 630 nm)を用いた。ウエスタンブロット法には、電気泳動装置 テフコ製セイフティーセルミニ、パワーサプライ インビトロジェン製 MP250、転写装置 バイオラッド(株)製トランスブロット SD セルおよびアトー製 AE6110 を用いた。pH の測定には東亜電波工業社製 HM-30G を用いた。

3. 特定原材料の定量

試験溶液の調製はキットのプロトコルに従い、均質化されたサンプル 1g にキット付属の抽出用緩衝液を 19ml 加えた後、攪拌し、pH6 ~ 8 に調整する。その後、15 時間振とう抽出を行い、3000 $\times$ g、室温で 20 分間遠心分離し、上清を採取した。ELISA 法は既報⁶⁾⁻¹⁰⁾およびキット付属のプロトコルに従い行っ

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

2 川崎市衛生研究所

3 横浜市衛生研究所

た。検量線はマイクロプレートマネージャー 5.2 PC データ解析ソフトウェアを用いて、4 係数 logistic 解析により作成した。試験は 2 回繰り返して行った。

4. 特定原材料の定性

試験溶液の調製は ELISA 法と同様に行い、ウエスタンブロット法は既報⁶⁾と同様に行った。結果の判定には卵および乳の標準品 10, 1, 0.5 μ g/g のバンドを確認し、サンプルのバンドの有無を判定した。試験は 2 回繰り返して行った。

5. データ解析

県内 3 機関のデータ解析はバリデーション参加機関

全体のデータと比較するため、データ数は満たないが全体のデータ解析と同様に AOAC の室間共同試験ガイドライン¹¹⁾ および JIS Z8402-2 の手順に従い、添加回収率の平均値 (%), 併行精度 (%) および室間精度 (%) を求めた。さらに 3 機関の変動係数 (%) を求めた。

なお、比較データとして用いた機関全体のデータは特定原材料検知法開発者が解析したデータを参照した。データ解析は AOAC の室間共同試験ガイドラインおよび JIS Z8402-2 の手順に従い、外れ値を除外するために Cochran 検定および Grubbs 検定 (両者とも有意水準 2.5%) を行っている。

表 1 FASTKIT エライザ Ver. II 卵キットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	92.1	85.1	4.4	4.3	12.4	9.4	11.2
おしるこ	104.0	96.0	3.1	3.4	10.4	9.2	9.4
オレンジジュース	91.7	83.7	4.7	3.6	6.9	9.0	6.5
肉団子	94.0	86.1	3.0	3.7	4.3	8.8	2.8
コーヒーゼリー	101.2	98.3	2.2	3.1	11.7	8.5	10.5
みそ汁	88.5	88.7	4.5	3.1	13.2	8.8	12.0

表 2 FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳キットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	89.3	89.2	3.1	3.4	5.7	4.4	5.3
おしるこ	101.1	100.3	4.4	3.4	6.3	5.6	6.0
かまぼこ	75.2	74.4	3.2	3.7	3.3	4.0	3.2
オレンジジュース	82.4	80.8	3.4	3.2	7.1	8.3	6.5
コーヒーゼリー	95.8	96.7	5.1	4.1	7.2	4.5	4.2
みそ汁	69.0	73.6	7.1	4.0	8.7	9.9	8.4

表 3 FASTKIT エライザ Ver. II 小麦キットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	140.5	138.9	2.0	4.5	13.7	9.0	12.3
おしるこ	135.1	126.9	2.1	3.4	6.7	9.9	6.0
かまぼこ	127.0	124.4	2.0	4.2	12.0	5.3	10.8
肉団子	112.8	111.4	5.8	5.0	8.2	9.0	7.8
コーヒーゼリー	126.2	129.0	1.6	5.1	7.3	9.2	6.6
みそ汁	110.1	110.5	4.9	5.7	9.5	10.4	8.8

表 4 FASTKIT エライザ Ver. II そばキットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	128.3	117.5	8.2	5.8	21.3	18.0	19.4
おしるこ	148.8	137.2	3.9	6.7	11.7	13.3	10.6
かまぼこ	128.6	123.0	2.4	3.5	9.6	10.0	8.7
肉団子	81.5	91.1	2.7	7.8	8.3	12.7	7.5
コーヒーゼリー	118.3	112.2	2.4	6.6	16.3	10.8	14.6
みそ汁	89.6	93.8	6.7	5.4	15.6	12.9	14.3

表5 FASTKIT エライザ Ver. II 落花生キットのバリデーション結果

試料	回収率(%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	75.9	74.9	1.2	2.5	5.1	7.9	4.6
おしるこ	90.3	88.9	4.5	3.4	8.3	7.3	7.7
かまぼこ	94.4	100.5	2.2	2.5	3.1	12.9	1.8
肉団子	97.3	104.1	2.6	3.2	3.6	12.6	2.5
コーヒーゼリー	74.6	75.6	3.1	3.5	5.4	9.7	5.0
みそ汁	50.4	52.1	2.2	2.8	3.2	7.8	3.0

表6 モリナガ FASPEK 小麦測定キットのバリデーション結果

試料	回収率(%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
鶏肉団子	94.1	92.2	8.3	6.2	11.7	16.2	8.0
かまぼこ	88.1	115.0	12.6	10.9	17.9	12.9	12.2
オレンジジュース	113.2	111.7	8.8	5.4	15.8	11.7	14.7
プリン	106.6	129.6	8.6	6.4	16.2	10.6	15.0
寄せ鍋	113.9	128.3	8.0	6.7	19.8	12.0	18.1
トマトソース	102.9	122.4	6.7	7.0	13.4	10.2	12.4

表7 モリナガ FASPEK 落花生測定キットのバリデーション結果

試料	回収率(%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
みそ汁	80.0	86.8	3.9	2.8	5.5	4.8	3.4
鶏肉団子	80.5	87.5	1.5	2.0	2.6	4.9	2.4
ゼリー	78.6	89.1	3.0	4.2	7.7	5.5	7.1
オレンジジュース	75.9	84.6	3.7	3.0	4.9	5.7	4.6
コーンスープ	94.4	104.7	2.8	2.4	2.9	5.7	2.9
トマトスープ	97.5	109.6	3.5	3.5	4.0	6.2	3.9

表8 モリナガ FASPEK ウェスタンブロットキットのバリデーション結果

試料	陽性率(8機関による2回繰り返し回数)							
	OVA		OVM		CN		β -LAG	
	添加卵濃度		添加卵濃度		添加牛乳濃度		添加牛乳濃度	
	(0 μ g/g)	(10 μ g/g)	(0 μ g/g)	(10 μ g/g)	(0 μ g/g)	(10 μ g/g)	(0 μ g/g)	(10 μ g/g)
ジュース	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16
ゼリー	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16
おしるこ	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16
トマトソース	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16
コンソメスープ	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16

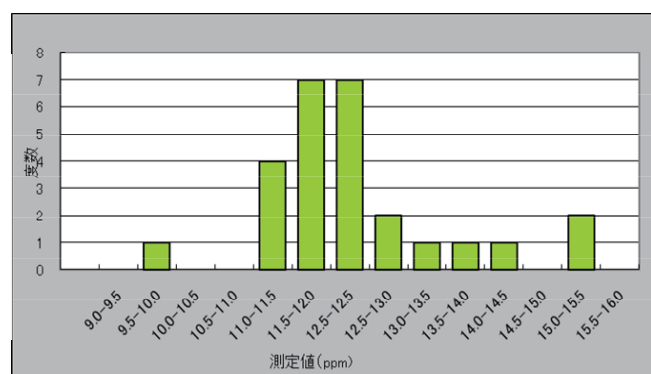
OVA:卵白アルブミン, OVM:オボムコイド, CN:カゼイン, β -LAG: β -ラクトグロブリン

図1 FASTKIT エライザ Ver. II そばキットのバリデーション結果 (かまぼこ) 度数分布

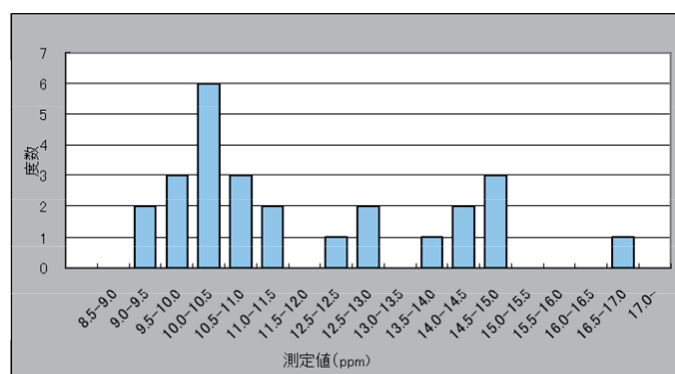


図2 FASTKIT エライザ Ver. II そばキットのバリデーション結果 (白がゆ) 度数分布

結果及び考察

1. ELISA 法による定量

平成 17 年に行われた検査法の一部改正において、「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」が参考として示された⁵⁾。定量法の試験室間バリデーションは試験室数 8 以上、試料数 5 以上としている。また、試料はタンパク質濃度レベルの一つに 10 μ g/g を含んだ特定原材料を添加し、加熱等の製造方法で作製したモデル加工品としている。本バリデーションはその基準を満たすべく行われた。

定量結果は県 3 機関の結果とバリデーションに参加した全体の機関の結果（日本ハムキットでは 13 機関、モリナガキットは 10 あるいは 12 機関）を比較し、表 1～7 に示した。ELISA 法の性能として、ガイドラインでは添加回収率は 50% 以上 150% 以下であること、併行精度は吸光度 1 付近の同一試験溶液の繰り返し測定では、5% を大きく超えるような場合には措置が必要とされ、室間精度は 25% 以下であることが提言されている⁵⁾。

FASTKIT エライザ Ver. II（表 1～5）では 3 機関におけるデータ解析の結果、添加回収率、併行精度、室間精度ともにすべて基準を満たした。また、3 機関の変動係数においても、試験結果の採用の基準である 20% 以下を満たし¹⁾、データの信頼性が確保されていることが確認された。

13 機関全体のデータでは、乳キットの白がゆ、おしるこ、コーヒーゼリーで 1 機関、かまぼこで 2 機関のデータが棄却され、小麦キットではかまぼこで 2 機関、落花生キットではおしるこで 1 機関のデータが棄却された。その結果、添加回収率、併行精度、室間精度ともに特定原材料 5 品目の ELISA キットの全体の結果はバリデーションの基準を満たした。

5 種類のキット間の性能を併行精度および室間精度の平均値で比較すると、卵の併行精度は 3.5%、室間精度 9.0%、牛乳 3.6%、6.1%、小麦 4.7%、8.8%、そば 6.0%、13.0%、落花生 3.0%、9.7% となり、牛乳が最もよく、そばが最もばらつきが大きかった。特に室間精度はそばが牛乳の 2 倍の値を示した。一方、精度管理に用いる食品サンプルの選定も重要であることを既報²⁾で課題として挙げた。試料によるデータのばらつきを示す例として、そばキットのかまぼこと白がゆの結果を度数分布（図 1、2）で示した。かまぼこは 26 データのうち 18 データと全体の 69% が 11～12.5ppm にほぼ正規分布しているが、白がゆでは 10～10.5ppm を中心とした分布と 12.0ppm 以上に散漫な分布がみられる。このように食品試料によってデー

タのばらつきに違いがあることがわかる。白がゆの場合、3 機関の室間精度および変動係数をみると、データの採用の基準である室間精度 25%、変動係数 20% に近い値を示している。ゆえに、ばらつきの大きい場合はデータ数が少ないとその室間のばらつきが試料によるものか、キットの性能に起因するものか、あるいは検査技能によるものか判断できないため、できるだけ多くのデータを取る必要があると考えられた。ゆえに、日常の精度管理では安定した効率の良い方法が必要とされることから、試料によるばらつきについても考慮する必要があると考えられた。

モリナガ FASPEK キットの結果を表 6, 7 に示した。3 機関の結果は、回収率、併行精度、室間精度のいずれも基準を満たし、FASTKIT エライザ Ver. II キットと同様にデータの信頼性が確保されていることを確認した。

全体の結果では、落花生キットの鶏肉団子とオレンジジュースで 1 機関のデータが棄却され、その結果モリナガキットにおいても同様にガイドラインの基準を満たした。キットの性能では小麦キットと落花生キットの室間精度の平均がそれぞれ 12.3% と 5.5% と大きく異なり、さらに小麦の寄せ鍋では 3 機関の室間精度、変動係数がそれぞれ 19.8%、18.1% と精度管理の基準に近い値を示したこと、モリナガキットにおいても同様に食品とキットの組み合わせによるばらつきの違いを把握することが精度管理において重要と考えられた。

2. ウエスタンブロット法による定性

定性法のガイドラインでは⁵⁾、試験室数 6 以上、試料数 5 以上としている。試料の条件は定量と同様とし、同一の試料・濃度のサンプルを各試験室ごとに 2 サンプル以上について判定率を評価するとしている。判定基準は陽性率が 90% 以上、ブランク試料の陰性率も 90% 以上とし、95% 以上が望ましいとされている。

卵・乳の定性におけるウエスタンブロットキットのバリデーションの結果を表 8 に示した。ELISA 法において陽性の判定基準である 10 μ g/g 添加された 5 食品の判定結果は、3 機関および 10 機関いずれも OVA、OM、CN、 β -LAG の陽性率 100%、陰性率 100% となり、判定基準を満たす良好な結果となった。アレルギー物質検査では定性検査法として、現在 PCR 法とウエスタンブロット法が示されている。ガイドライン⁵⁾ではこれらの定性法に対し、特定原材料検知法開発者の試験室において、少なくとも 20 種類以上の性質・加工程度の異なるマトリクスの中での

誤判定率を確認し、誤判定率が50%以上となると推定される濃度を判定限界として示すことが望ましいとされている。今後、これらのデータを蓄積し、判定限界の基準を明確に定義することが必要と考えられた。

まとめ

以上、特定原材料検知法開発者によるバリデーション結果から、ELISA 法による定量およびウエスタンブロット法による定性法について、神奈川県内の3機関の検査精度が確保されていることを確認することができた。しかし、多様な市販食品に対する日常の検査においては製品間のデータのばらつきや定性での判定限界など課題も多く、今後もデータを蓄積して検査精度の向上に努めていきたい。

(平成 22 年 8 月 20 日受理)

文献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知：アレルギー物質を含む食品の検査方法について、平成 14 年 11 月 6 日付け食発第 1106001 号
- 2) 渡邊裕子, 児玉千絵, 関戸晴子, 済田清隆, 宮沢啓貴, 渡部健二郎, 田中幸生, 山田利治：食品中のアレルギー物質検査における精度管理の検討 - I 酵素免疫測定法 (ELISA) による定量, 神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 53-55 (2007).
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知：アレルギー物質を含む食品の検査方法について、平成 17 年 10 月 11 日付け食発第 1011002 号
- 4) Watanabe, Y., Aburatani, K., Mizumura, T., Sakai, M., Muraoka, S., Mamegosi, S., Honjoh, T., Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. J. Immunol. Methods, 300, 115-123 (2005).
- 5) 厚生労働省医薬局食品安全部長通知：アレルギー物質を含む食品の検査方法について、平成 18 年 6 月 22 日付け食発第 0622003 号
- 6) 穂山浩：アレルギー物質を含む食品の検査方法について, 食衛誌, 44, J168-J177 (2003).
- 7) 穂山浩, 豊田正武：食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の概要, 食品衛生研究, 52, 65-73 (2002).
- 8) 穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝, 渡邊裕子, 飯島賢, 山川宏人他：特定原材料 (卵) 測定の厚生労働省通知 ELISA 法の複数機関による評価研究, 食衛誌, 44, 213-219 (2003).
- 9) 高畑能久：ELISA による特定原材料の検出について (1), 食衛誌, 44, J275277 (2002).
- 10) 豆越真一：ELISA による特定原材料の検出について (2), 食衛誌, 43, J277-J279 (2002).
- 11) AOAC Int, : Appendix D : Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis, Official Methods of Analysis of AOAC Int. 18 ed. 2005.

短報

標準添加法を用いた ヘッドスペースガスクロマトグラフィー －質量分析法による化粧品中のメタノールの分析

松阪綾子*, 熊坂謙一, 仲野富美**, 小島 尚

Analysis of Methanol in Cosmetics by Headspace Gas Chromatography – Mass Spectrometry using Standard Addition Method

Ayako MATSUZAKA, Kenichi KUMASAKA,
Fumi NAKANO and Takashi KOJIMA

緒言

化粧品基準¹⁾において、防腐剤、紫外線吸収剤及びタール色素以外の成分の配合は禁止されており、化粧品にはメタノールは配合してはならないと定められている。しかし国により製造や配合基準が異なることから、インターネット等で流通する個人輸入化粧品や並行輸入品では、この化粧品基準が必ずしも満たされていない場合がある。

化粧品の分析は試料中にマトリックスとなる成分が含有されていることが多く、(1) 分析対象成分を抽出することが困難なこと、(2) 揮発性成分の多い分析において、直接注入のガスクロマトグラフ (GC) ではメタノールの測定は妨害ピークの影響を受けやすい等の問題点が報告されている²⁾。そのため過去の化粧品中のメタノールの分析法は蒸留等の前処理が用いられている³⁾。また、化粧品原料中のメタノールの分析法⁴⁾は GC 法が規定されているが、(1) 一般的に化粧品を溶かすために用いられるテトラヒドロフラン (THF) を内部標準物質として用いていること、(2) 検出器として水素炎イオン化検出器 (FID) が用いられており、選択性に劣る等の難点がある。そこで今回、マトリッ

クスの影響を避けるために有効とされている標準添加法²⁾によるヘッドスペースガスクロマトグラフィー－質量分析法 (HS-GC-MS) を用い、内部標準物質としてアセトニトリルを使用した、簡便で選択性に優れた化粧品中のメタノールの分析法を検討したので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試料

あらかじめメタノールが含有されていないことを確認した市販されている化粧品 11 検体 (化粧水 4 検体、乳液 4 検体、ファンデーション 1 検体、口紅 1 検体、アイシャドー 1 検体) および過去にメタノールの含有が認められた化粧品 2 検体 (シャンプー、洗顔料各 1 検体) を用いた。

2. 試薬

メタノールは標準品として和光純薬製の特級を用いた。その他の試薬については、市販の試薬特級品を用いた。

3. 測定条件

3. 1 装置

本分析には質量分析計として Agilent 製 5973MSD を接続した Agilent 製 6890N GC を使用した。なお、ヘッドスペースサンプラー (HSS) は Combi-PAL (エーエムアール(株)、東京) を使用した。

3. 2 HSS 条件

オープン温度: 50℃, バイアル平衡時間: 60 分間, サンプルループ温度 80℃, トランスファーライン温度: 210℃, バイアル容量 20ml

3. 3 GC-MS 条件

カラム: AQATIC-2 (長さ 60.0m, 内径 0.25mm, 膜厚 1.40 μ m, ジーエルサイエンス製), カラム温度: 50℃ (2min) – 10℃ /min–200℃ (10min), キャリヤーガス: ヘリウム (流量 1.0 ml /min), 検出器: 質量分析計 (イオン源: EI), 注入口温度: 200℃, イオン源温度: 230℃, 注入量 1000 μ l, 測定モード: SCAN および SIM, スプリット注入 (スプリット比 1:10), SIM イオン: m/z 31, 15 (メタノール), m/z 41 (アセトニトリル)

4. 標準添加試料の調製

試料 2g を容量 20 ml のバイアル瓶に量り取り、600

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

* 現 茅ヶ崎分室

** 現 小田原分室

℃, 6時間加熱した塩化ナトリウム 1.5g 及び内部標準物質としてアセトニトリル 100 μ g/ml を含有するメタノール標準溶液 2 ml を添加し, 直ちに密封した。なお, メタノール添加量はサンプル 1g あたり 0, 50, 100 μ g とし, 標準溶液の組成は各試料に合わせて変更した。

5. 分析条件の検討

5. 1 バイアル瓶の保温温度及び平衡時間

試料として化粧水及び乳液約 2g を各々容量 20 ml のバイアル瓶に量り取り, 100 μ g/ml の標準溶液 2 ml を添加し直ちに密封した。このバイアル瓶について, 保温温度 30℃, 40℃, 50℃, 60℃ 及び 70℃, 平衡時間 15 分, 30 分, 45 分及び 60 分の範囲で, メタノールのピーク面積値に対する影響を検討した。

5. 2 塩析効果を目的とした塩の種類と添加量の選択

塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムを対象とし, それぞれ無添加, 0.5g, 1g, 1.5g, 2g, 2.5g 及び 3g を添加し, メタノールのピーク面積値に対する影響を検討した。

5. 3 標準溶液組成の検討

添加する標準溶液組成として, 水, エタノール (10%, 25%, 50 及び 100%), 及び THF (10%, 25%, 50%, 100%) を用いて標準溶液を調製し, メタノールのピーク面積値に対する影響を検討した。

6. 直線性および検出限界

予めメタノール不含であることを確認した化粧水, 乳液, ファンデーション, 口紅, アイシャドーを試料として, 各々 2g に, 各試料に合わせて適切な溶媒で調製されたメタノール標準溶液を用いて, サンプル 1g あたり 1, 10, 50, 100, 500 及び 1000 μ g のメタノールを添加し, 分析を行った。なお, 各標準添加試料の調製は前述の「4. 標準添加試料の調製」に示した通りとした。また, 検出限界は S/N 比 5 とした。

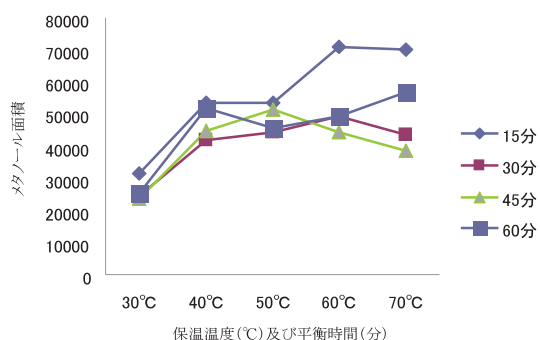


図1 保温温度及び平衡時間におけるメタノール面積値

7. 添加回収試験

上記の試料 11 検体にメタノールを 100 μ g/g 添加した試料を作成し, その試料を用いて試験を実施した (n=3)。なお, 各標準添加試料の調製法は, 前述の「4. 標準添加試料の調製」に示した通りとした。

8. 実製品への適応

メタノールの含有が認められた化粧品 2 検体について, 前述の「4. 標準添加試料の調製」に示した方法により標準添加試料を作成し, 定量した (n=3)。

結果および考察

1. 分析条件の検討

1. 1 バイアル瓶の保温温度及び平衡時間

試料中のメタノールについて, 気相・液相間での分配平衡が安定する至適条件を検討するため, 試料バイアル瓶の保温温度及び平衡時間について検討を行った。

その結果, 図 1 に示す通り, 保温温度が上昇するに伴い, 感度はよくなったが (1) 保温温度の上昇により夾雑物成分のピークが増加すること, (2) メタノールの沸点が約 65℃であることを考慮し, バイアル瓶の保温温度は 60℃を用いることにした。また保温時間による感度の異なりは見られなかったが, 標準溶液と試料が十分混和し平衡化することを考慮し, 保温時間は 60 分間を用いることにした。

1. 2 塩析効果を目的とした塩の種類と添加量の選択

アルコール類の HSS 分析においては塩析効果による感度の改善が期待できる⁴⁾ことから, 塩化ナトリウム及び米国薬局方 (USP) の医薬品残留溶媒分析において用いられる無水硫酸ナトリウムを試料バイアルに添加し, メタノールの感度への影響を検討した。

その結果, 図 2 に示す通り, 塩化ナトリウムでは 1.5g, 無水硫酸ナトリウムでは 2.0g まで添加量依存的な感度の上昇が認められた。このことから, 添加する塩は, 使用量が少なく, 安価な塩化ナトリウム 1.5g を用いることにした。

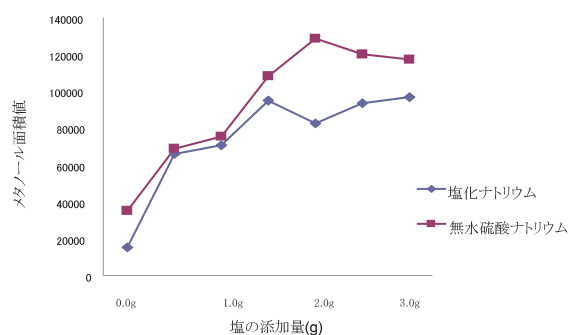


図2 塩とその添加量におけるメタノール面積値

1. 3 標準溶液組成の検討

今回分析に用いた標準添加法は試料に標準溶液を添加し、十分に混和するよう保温・攪拌することから、標準溶液の調製に用いる溶媒は、保温・攪拌されることにより試料を溶解または懸濁化するものを用いる必要がある。そこで、標準溶液を調製する希釈溶媒として水、エタノール、THFを用い、メタノールの感度に対する影響を検討した。

その結果、図3に示す通り、水と比較しエタノールを添加した標準溶液は、エタノールの添加の増量に伴い、メタノールの感度の減少が見られた。また、水を用いた場合、水への溶解性の良い化粧水及び乳液が試料であった場合、夾雑成分の影響を受けることなく、メタノールを検出することができた。さらに、ファンデーション等の固形化粧品では、一般的に水での溶解性が低いことから、溶媒としてTHFを用いることにした。しかし、THFは添加の増量に伴い、メタノールの感度は改善するが、夾雑物成分のピークも増加した。そのため、固形化粧品では標準溶液組成として、10% THF 溶液を選択した。

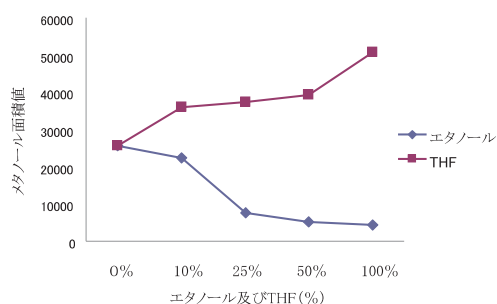


図3 エタノール及びTHFの組成の異なりによるメタノール面積値

2. 直線性および検出限界

メタノール不含の試料各2g用い、標準溶液を1～1000 $\mu\text{g/g}$ の濃度範囲で添加し分析を行った。メタノール添加量とクロマトグラム上のピーク面積値との間には、化粧水及び乳液において相関係数0.999以上、ファンデーション、口紅及びアイシャドーにおいて相関係数0.995以上の良好な直線性が見られた。

また検出限界はS/N比5で1 $\mu\text{g/g}$ であり、良好な感度であると考えられた。

3. 添加回収試験

試料11検体について添加回収試験を行った。各試料のトータルイオンクロマトグラム(TIC)では、メタノールのピーク保持時間は約4.1分、内標準物質ア

セトニトリルの保持時間は約6.2分であり、また、各成分及び夾雑成分ピークとの分離も良好であった。

また、表1に示したとおり、回収率はいずれの試料でも良好であると考えられた。また、精度は化粧水D及び乳液Aでは他の試料と比較して劣る値となった。この要因の一つとして、化粧品では香料等揮発性成分を多く含む製品があることから、製品配合成分の影響による可能性が考えられた。このような試料では試料量を減量するなどの対応が必要と考えられる。

表1 標準添加法を使用した添加回収試験(%) *

製品	添加回収率(%)
化粧水A	101.7 $\pm$ 5.3
化粧水B	103.0 $\pm$ 5.7
化粧水C	94.6 $\pm$ 1.4
化粧水D	97.1 $\pm$ 10.5
乳液A	89.2 $\pm$ 11.8
乳液B	87.9 $\pm$ 3.0
乳液C	103.9 $\pm$ 1.8
乳液D	100.1 $\pm$ 6.9
ファンデーション	97.5 $\pm$ 3.2
口紅	92.5 $\pm$ 3.0
アイシャドー	94.6 $\pm$ 3.6

*:平均 $\pm$ 標準偏差(n=3)

3. 実製品への適応

過去にメタノールの含有が認められた化粧品2検体について定量を行ったところ、シャンプーは90.8 $\mu\text{g/g} \pm 1.9$ 、洗顔料は115.9 $\mu\text{g/g} \pm 1.3$ であった。また、図4に示すように、各TIC上では夾雑物成分ピーク等の他成分との分離も良好であり、実製品でも分析が可能であると考えられた。また、化粧品中のメタノールの分析法では(1)蒸留等の煩雑な前処理が必要とされているが、本法は前処理が不要であり、(2)USPの医薬品残留溶媒分析において水に不溶な試料に用いられるN、N-ジメチルホルムアミドの代用として10% THFを用いる事ができ、(3)GC法に比べ、MSを併用することにより構造解析が可能となり、信頼性の高い分析が行える等の利点があり、化粧品中のメタノールの分析に適用可能と考えられる。

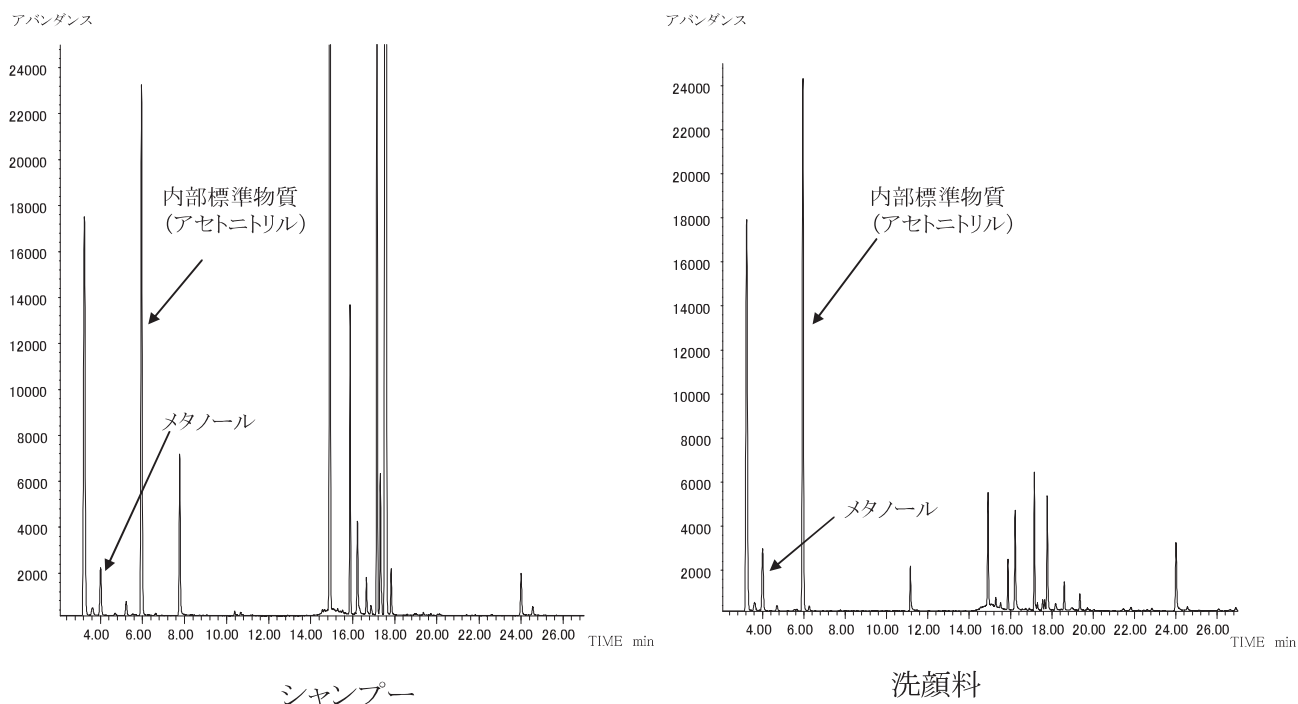


図4 メタノールが含有されていた TIC クロマトグラフ

結語

標準添加法を用いた HS-GC-MS 法による化粧品中のメタノール分析法を検討した。その結果、水に懸濁化する試料については溶媒として水を、懸濁化が困難な試料は溶媒として 10%THF を用いることにより、夾雑物成分のピークの影響を受けることなく分離することができた。また本法は抽出等の前処理を必要とせず、簡便に化粧品中のメタノール分析に適用可能であると考えられる。

メタノールが含有された化粧品は、現在までに国内において、2007 年に自主回収のあった化粧品以外に見受けられない。しかし化粧品に用いられる成分の中には、溶媒抽出により得られるものもあり、安価なメタノールが抽出溶媒として使用され、溶媒が残留する可能性が考えられる。このことから本法は今後の化粧品や化粧品原料等の分析に有効に活用されるものと考えられる。

(平成 22 年 8 月 20 日受理)

文献

- 1) 厚生省：“化粧品基準”，平成 12 年 9 月 29，告示第 331 号 (2000)
- 2) 佐藤恭子，植松洋子，伊佐川聡，他：標準添加法を用いたヘッドスペース GC による天然香料中残留溶媒分析。食品衛生学 2004；45：302-306
- 3) 観 照雄：ホルムアルデヒド等の有害物質の分析，フレグランスジャーナル臨時増刊，5，211-222 (1984)

- 4) 薬事日報編：医薬部外品原料規格 2006，第 1 版，pp. 111，薬事日報社，東京 (2006)
- 5) 島津製作所編：ヘッドスペース GC による医薬品残留溶媒分析，改訂版，pp. 9，株式会社島津製作所，京都 (2009)

資料

神奈川県域の結核接触者健康診断における QFT 検査を用いた結核感染診断 (平成 17 ～ 21 年度)

高橋智恵子¹, 近内美乃里², 大屋日登美¹,
伊達佳美^{1*}, 渡辺祐子^{1**}, 岡崎則男^{1**}

Detection of tuberculosis infection using a whole blood interferon gamma assay in a contact investigation in Kanagawa Prefecture (November,2005-March,2010)

Chieko TAKAHASHI, Minori KONNAI,
Hitomi OHYA, Yoshimi DATE,
Yuko WATANABE and Norio OKAZAKI

結核菌特異抗原刺激による全血インターフェロン γ を測定する (QFT) 検査は, 「感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引き (接触者健診の手引き)」(改訂第 4 版 平成 22 年) では, 結核の接触者健康診断 (接触者健診) において結核感染者を見つけるために第一優先の検査法と位置づけられ, 国内で広く実施されるようになった。神奈川県衛生研究所では平成 17 年 11 月より QFT 検査を開始しており, 今回は, 神奈川県域で実施した平成 21 年度までの QFT 検査による結核感染診断結果について報告する。

神奈川県域の保健福祉事務所からの依頼により, 接触者健診で結核感染を疑う被験者に対して, 857 検体の QFT 検査を実施した (表 1)。検査は被験者血液について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に従い実施した。その結果, 陽性が 75 検体 (8.7%), 判定保留が 58 検体 (6.8%), 陰性が 724 検体 (84.5%) であった。検体数は平成 19 年度については少なかったものの, 年々増加傾向がみられた。また, 当初は大半がツベルクリン反応 (ツ反) 検査を併用していたが, その後, QFT 検査のみの実施が増加した (表 1)。ツ反検査の発赤の大きさと QFT 検査結果を比較してみると (表 2), ツ反検査の径が大きくなると QFT 検査の陽性率が高くなる傾向が認められた。しかしながらツ反検査結果が 30mm 以上の 76.3% が QFT 検査陰性であったことから, ツ反検査は結核感染の診断を過剰に判定していたことがうかがえた。結核接触者健診における QFT 検査は, 今後も第一優先検査として増加して

表 1 年度別 QFT 検査結果およびツ反検体数 (平成 17 - 21 年度)

年度	QFT検体数	陽性数 (%)	判定保留数 (%)	陰性数 (%)	ツ反検体数	QFTに対するツ反実施率(%)
平成17*	168	5 (3.0)	9 (5.3)	154 (91.7)	160	(95.2)
平成18	164	26 (15.8)	18 (11.0)	120 (73.2)	109	(66.5)
平成19	58	7 (12.1)	4 (6.9)	47 (81.0)	22	(37.9)
平成20	233	14 (6.0)	14 (6.0)	205 (88.0)	66	(28.3)
平成21	234	23 (9.8)	13 (5.6)	198 (84.6)	74	(31.6)
計	857	75 (8.7)	58 (6.8)	724 (84.5)	431	(50.3)

* : 11～3月

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

* 現 地域調査部

** 現 企画情報部

表2 ツ検査結果と QFT 検査結果の比較

ツ反の発赤径 mm	QFT検査結果			合計
	陽性 (%)	判定保留 (%)	陰性 (%)	
0～9	0 (0)	0 (0)	5 (100)	5
10～19	7 (4.4)	2 (1.3)	145 (94.2)	154
20～29	5 (5.8)	3 (3.5)	78 (90.7)	86
30～	25 (13.4)	19 (10.2)	142 (76.3)	186
	37 (8.6)	24 (5.6)	370 (85.8)	431

いくものと考えられる。ただし、接触者健診の手引きにも述べられているように、18歳未満の接触者に対する検査は、3段階に分け、5歳以下はツ反検査を優先し、6から12歳はツ反検査を優先しながらQFT検査を行い、12から17歳はQFT検査を第一優先とするがツ反検査も必要に応じて併用することを考慮することが必要である。

QFT検査を実施した接触者健診の事例数は年々加し続けている（図1）。平成17年は8事例しかなかったにもかかわらず168検体を検査しているが（図2）、これは、当初、QFT検査は集団感染疑い事例について主に実施したため、1事例あたりの検体数が多かったためである。このような事例では、濃厚接触者の人数が多いため大規模な接触者健診となった。

被験者と患者の接触場所を大きく5つに分けて見ると（図1、2）、家庭内感染を疑う接触者健診は、ここ

2年間（平成20年度19事例40検体、21年度46事例93検体）で増加した。家庭内事例は5年間平均で1事例あたり2.1検体（82事例176検体）と小規模であったが、学校が26.1検体（7事例183検体）、医療機関が10.2検体（17事例174検体）と1事例あたりの検体数は多かった。

全事例の1事例あたりの検体数は1から75検体と広い分布を示しているが、181事例のうち検体数が多くかつQFT検査結果の陽性率が高かった3事例を挙げる。1事例目は、医療機関において最も大規模な接触者健診で、45名について実施したところ、陽性が13名（28.9%）、判定保留が9名（20%）と非常に高かった。また、医療機関全体のQFT検査結果でも、陽性が13.8%、判定保留が13.2%を示し、他の接触場所に比べて高率であった。医療機関内では接触度も高いうえ基礎疾患を伴う易感染者が多いので、結核患者発生時には迅速な対応と経過観察が必要と思われる。

2事例目は、家族を含む12名の事例で、家族4名のうち3名が陽性、1名が判定保留を示し、家族以外の8名のうち、1名が陽性、2名が判定保留であり、合わせて、陽性が4名（33.3%）、判定保留が3名（25.0%）となった。家族以外に陽性を示した1名は、1日あたりの接触時間が3時間程で、1ヶ月に5～6回の接触であったことより、高い感染力をもつ結核菌の可能性が推察された。実際、この初発患者は患者情報によれば喀痰塗抹検査で塗抹陽性（ガフキー9号）を示して

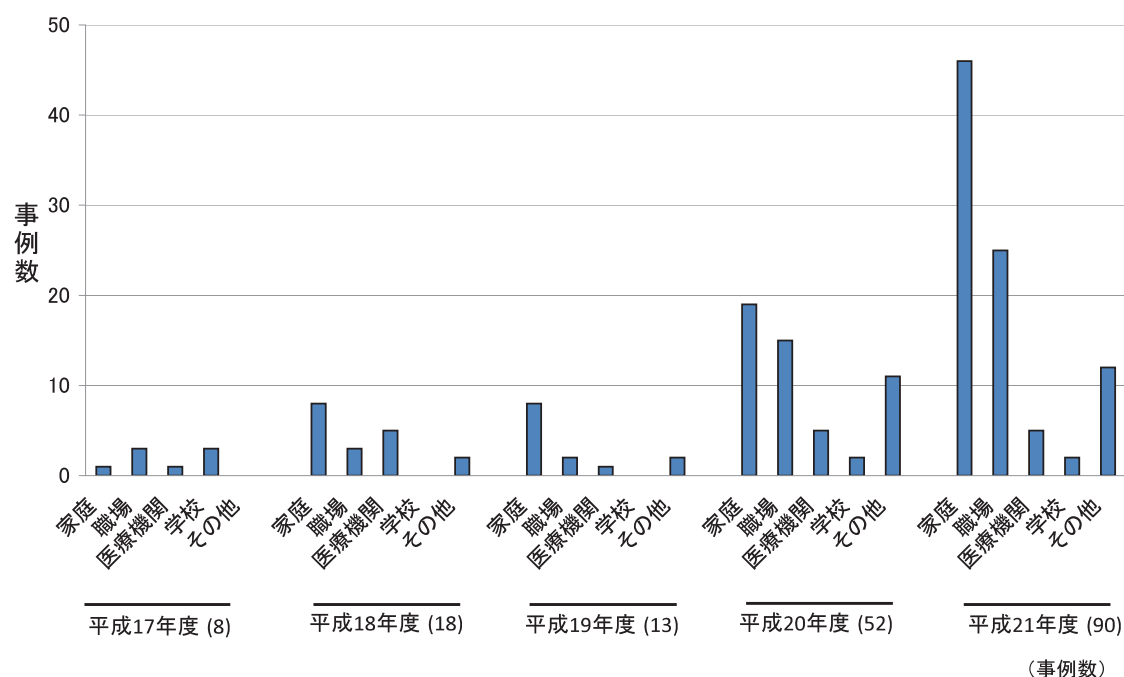


図1 被験者と患者の接触場所別事例数（平成17～21年度）

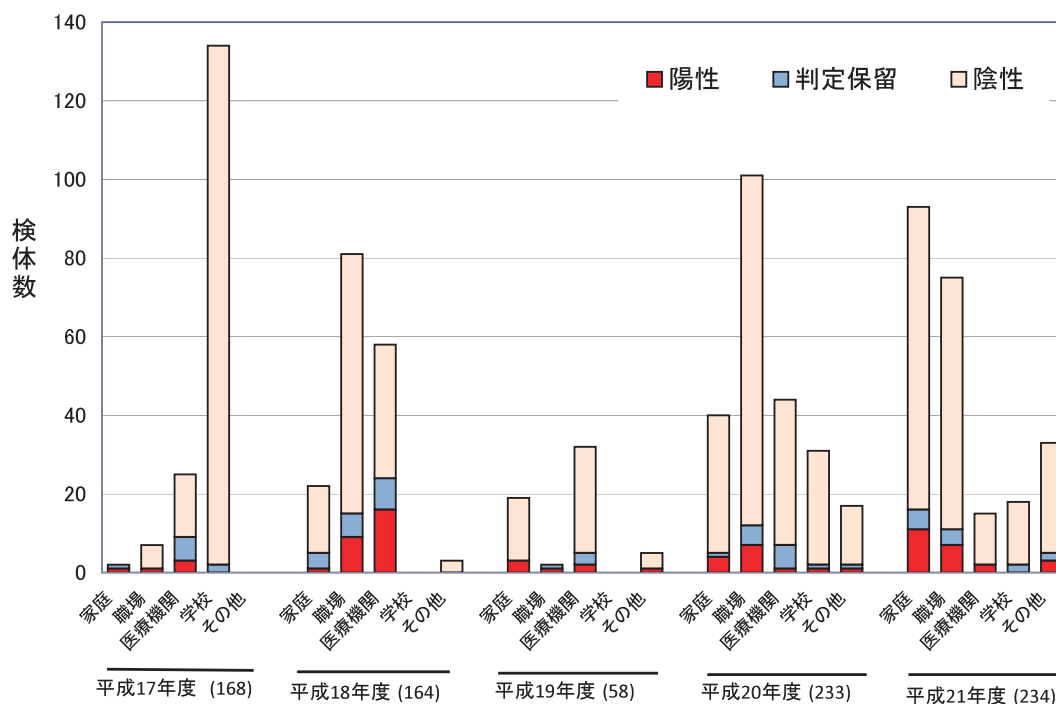


図2 被験者と患者の接触場所別 QFT 結果 (平成 17 - 21 年度)

おり、患者側の感染危険度の評価は高感染性に区分されていた。

3事例目は、職場（52名）を対象とした接触者健診で、ツ反検査（最大発赤径が30mm以上、硬結および2重発赤を有する）や接触度合い等を指標とした優先接触者の16名についてQFT検査を実施したところ、陽性が4名（25.0%）となったため、残り36名についても実施し、合計で陽性が8名（15.4%）、判定保留が5名（9.6%）であった。陽性を示した8名のツ反検査結果は、30mm以上が4名、10～19mmが4名で、判定保留を示した5名のツ反検査結果は、30mm以上が3名、20～29mmが1名、10～19mmが1名であった。接触者健診の手引きによると、接触者健診の対象集団が大きい場合はツ反検査の発赤径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以上に枠を拡大して行う方式も考えるべきと記載されている。この事例では、まず、ツ反検査結果が30mm以上の16名についてQFT検査を実施し、陽性が4名、判定保留が3名であったが、接触者健診の手引きで述べられているように20mmで区切った場合は、陽性が4名、判定保留が4名であった。結核感染の有無を判定する方法として、QFT検査はBCG接種の影響を受けない有用な検査ではあるが、対象集団が大きい場合にすべてをQFT検査の対象にすべきかどうかは、今後の接触者健診のあり方を含めて検討していかなければならない課題である。

QFT検査の結果が「陽性」と判定された場合、精査し、結核の臨床的特徴を呈していない無症状病原体保有者と診断し、かつ、医療が必要と認められた場合は、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（平成19年改正）の第12条第1項の規定による届出を行うとともに、「潜在性結核感染症」として治療を行うこととなったため、今後もQFT検査の必要性は高まり増加すると考えられる。

最後になりましたが、初発患者および疫学情報の収集にご協力いただきました県健康増進課（現在の健康危機管理課）および関係保健福祉事務所保健予防課の方々に深謝いたします。

（平成22年8月20日受理）

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 21 年度）

古川一郎，石原ともえ，黒木俊郎

Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April, 2009 March, 2010)

Ichiro Furukawa, Tomoe ISHIIHARA
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，「病原性大腸菌 O-157 の検

表 1 施設別菌株受領状況（38 株）

施 設	O157		O26	その他	菌株数
	VT1&2	VT2	VT1		
厚木保健福祉事務所	8		1	O121 (VT2)	10
大和保健福祉事務所	1	3	1		5
秦野保健福祉事務所	2	1			3
茅ヶ崎保健福祉事務所	4		2		6
平塚保健福祉事務所	2	1			3
鎌倉保健福祉事務所	1		3	O103 (VT1)	5
小田原保健福祉事務所	1			O124 (VT1&2), OUT (VT1)	3
藤沢市保健所		1			1
食肉衛生検査所	1	1			2
計	20	7	7	4	38

体提供依頼について」（平成 8 年 6 月 19 日付，衛食第 160 号）および「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 日付，食安監発第 0514001）に基づき，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 Polymerase Chain Reaction を用いた 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 21 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 35 株，食肉衛生検査所から送付されたウシ由来 2 株，藤沢市で分離されたヒト由来 1 株の計 38 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（VT1&2）20 株，O157（VT2）7 株，O26（VT1）7 株，O121（VT2）1 株，O103（VT1）1 株，O124（VT1&2）1 株および OUT（VT1）1 株であった。食肉衛生検査所分離株 2 株，

表 2 患者・保菌者の年齢構成および性別
（藤沢市を除く 33 株）

年 齢	男性	女性	計
1 - 5	4	1	5
6 - 10	1	4	5
11-20	2	2	4
21-30	3		3
31-40	3	1	4
41-50		2	2
51-60	2	3	5
61-70		3	3
>70		2	2
計	15	18	33

藤沢市分離株 1 株および年齢が確認できなかった 2 株を除くヒト由来 33 株における患者および保菌者の性別および年齢構成を比較した（表 2）。年齢の範囲は男性 3～56 歳，女性 3～82 歳，平均は男性 23.8 歳に対し，女性は 39.7 歳であった。21～40 歳では女性 1 例に対し男性 6 例，41 歳以上では男性 2 例に対し女性が 10 例となり，21 歳以上の男女構成比に差が認められた。

PFGE には制限酵素として *Xba* I を使用し，6V/cm，パルスタイム 2.2 - 54.2 秒，12℃ の条件で 19 時間電気泳動を行った。PFGE パターンの解析には BioNumerics（Applied Maths 社）を用い，Pearson の相関係数で類似度を算出し，UPGMA によりクラスター解析を行った。

O157（VT1&2）20 菌株について PFGE パターンを解析した結果（図 1），家族内および関係者間の 3 つの事例から分離された菌株（事例 1；菌株 No.1 および 2，事例 2；菌株 No.4 および 5，事例 3；菌株 No.15 および 16）は，クラスター解析の結果，いずれも 98% 以上の類似度を示し，IS 法においてもそれぞれ電気泳動パターンは一致していた。一方，類似度 95% 以上を示した菌株 No.8 および 9 は，PFGE パターンの相違は高かったものの，IS 法では 3 カ所のバンドの不一致が確認された。さらに，事例 3 から分離された 2 菌株と類似度の高かった菌株 No.17 についても，IS 法ではまったく異なる結果が得られ，これらの菌株間における関連性は低いものと推測された。

O157（VT2）7 菌株の解析では（図 2），家族内感染における分離株 No.21，22 及び 23 は 97% 以上の類似度を示し，No.23 の PFGE パターンは他の 2 菌株と 1 本のバンドの相違が認められたが，IS 法における 3

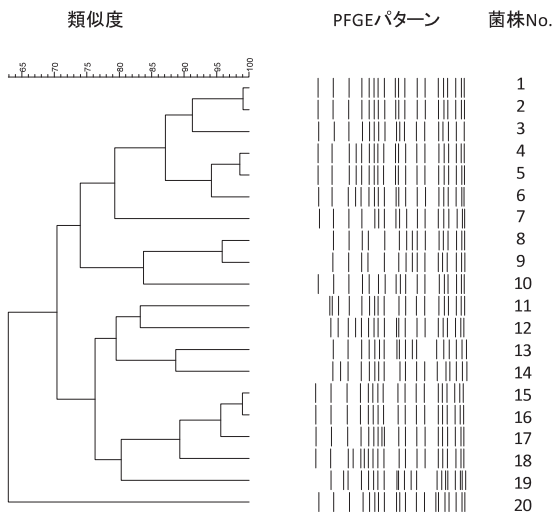


図1 EHEC O157（VT1&2）のデンドログラムおよび PFGE パターン

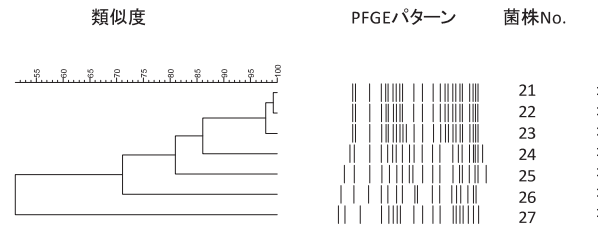


図2 EHEC O157（VT2）のデンドログラムおよび PFGE パターン

表3 薬剤感受性試験結果（38 株）

耐性薬剤					菌株数	
3 剤	ABPC	CP	SM			3
	ABPC		SM	TC		1
		CP	SM	TC		1
2 剤			SM	TC		1
単剤					FOM	2
感受性						30
計	4	4	6	3	2	38

菌株の電気泳動パターンはすべて一致していた。今回，食肉衛生検査所で分離された EHEC 2 菌株（菌株 No.20 および No.24）は，ヒト由来株と同様に解析を行ったが，いずれも PFGE におけるヒト由来株との類似性は認められず，IS 法の結果も同様であった。

次に，受領した 38 菌株について，アミノペニシリン（ABPC），セフトキシム（CTX），クロラムフェニコール（CP），ホスホマイシン（FOM），ゲンタマイシン（GM），カナマイシン（KM），ナリジクス酸（NA），シプロフロキサシン（CPFEX），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¹⁾に準拠して薬剤感受性試験を実施した（表 3）。その結果，ABPC，CP，SM の 3 剤耐性は 3 菌株，同様に ABPC，SM，TC あるいは CP，SM，TC 耐性がそれぞれ 1 菌株，SM，TC の 2 剤耐性が 1 菌株，FOM の単剤耐性 2 菌株で，38 株中 30 株が供試した 11 薬剤に感受性であった。さらに，ABPC，CP，SM の 3 剤耐性株のうち 2 菌株は，前述の PFGE パターンの解析結果において類似度 98% 以上を示した関連株（菌株 No.1 および 2）であり，他の 1 菌株は散発事例株であった。

県内保健所設置市を除く県域内において，平成 21 年度の EHEC の集団感染事例は，家族内および関係者間の事例以外は認められなかったが，国内では飲食チェーン店における EHEC O157 の集団感染事例が

報告され、厚生労働省は「飲食店における腸管出血性大腸菌 O157 食中毒対策について」（平成 21 年 9 月 15 日付け食安監発 0915 第 1 号）により食中毒を防止するよう各自治体に通知した。

EHEC の集団感染事例では、広域的な事例も多く、迅速に探知して拡大を防止しなければならない。PFGE による解析は、菌株を識別し共通の菌株を探知する有効な手段であり、さらに今回の IS 法の併用は PFGE の結果を確認および評価する方法として有効であった。

今後も菌株を収集するにあたり、IS 法等 PFGE 以外の解析法についてもデータを蓄積し、事例発生時に感染源および感染拡大防止に迅速に対応できるよう検討が必要と考える。

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、食肉衛生検査所、県生活衛生課および健康増進課、藤沢市保健所の方々に感謝いたします。

（平成 22 年 8 月 20 日受理）

文献

- 1) 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)

資料

神奈川県域における 新型インフルエンザの流行状況

渡邊寿美, 齋藤隆行, 近藤真規子, 佐野貴子, 片山 丘,
宮原香代子*, 原田美樹, 古屋由美子, 岡崎則男**

Epidemic of pandemic influenza A (H1N1) 2009 in Kanagawa Prefecture

Sumi WATANABE, Takayuki SAITO, Makiko KONDO,
Takako SANO, Takashi KATAYAMA, Kayoko MIYAHARA,
Miki HARADA, Yumiko FURUYA and Norio OKAZAKI

2009年4月に北米で流行が確認された新型インフルエンザは、5/9に成田空港でカナダからの帰国者から検出された後、兵庫県や大阪府で高校生を中心に流行した。関西における流行は、一旦は患者数が減少したものの確実に広がりを見せ、7月中には全都道府県で患者が確認されるに至った。神奈川県内では、5/20に川崎市、6/6に横浜市、6/9に県域で患者が確認され、7月上旬までにほぼ全域で新型インフルエンザ患者が確認された。

新型インフルエンザの検査対象は実施時期によって異なっており、7/23までの全数把握期間は新型インフルエンザが疑われた全ての症例を対象とし、7/24～8/28はクラスター（集団発生）サーベイランスと入院・重症例サーベイランス、8/29以降は入院・重症例サーベイランスを対象とした。また、ウイルスサーベイランス（通常の病原体定点調査）の検体については、期間を問わず全例を対象とした。全数把握、クラスターサーベイランスおよび入院（重症例）サーベイランスの対象検体は、県域各保健福祉事務所（298例）および藤沢市保健所（28例）から計326例であった。一方、ウイルスサーベイランスの対象検体は、県域の

感染症発生動向調査病原体定点（662例）および藤沢市保健所（115例）から計777例であった。

新型インフルエンザ検査は、主として遺伝子検出で行った。当初はRT-PCR（Reverse transcription-polymerase chain reaction）法で行っていたが、5/18からリアルタイム RT-PCR 法を併用し、6/14からはリアルタイム RT-PCR 法のみで行った。検出対象は、A 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子と3種類の HA 遺伝子（H1 新型、季節性 H1 型、H3 型）である。ただし、ウイルスサーベイランスの検体については、新型の流行が拡大し検体数が増加した後は M 遺伝子と H1 新型の HA 遺伝子のみの検出に切り替え、必要に応じて季節性 H1 型、H3 型および B 型の検査を行った。また、一部の検体については MDCK 細胞によるウイルス分離を行い、さらに分離株の一部について抗原性の変異や NA 遺伝子のオセルタミビル耐性マーカーの調査を行った。

感染症発生動向調査のインフルエンザ患者報告数の推移を見てみると、2009年24週（6/8～14）に県域で初めて新型インフルエンザに感染した患者が確認された後、徐々に患者数は増加して、33週（8/10～16）には流行開始の目安となる定点あたり報告数が1.0人を超えた。40週（10/28～11/4）までは比較的緩やかな増加傾向であったが、41週（11/5～11）以降は急激に増加し、本格的な流行となった。定点あたり報告数のピークは47週（11/16～22）の38.8人であった。53週（12/28～1/3）に定点あたり報告数が10.0人（注意報の目安）を下回った後は、再び10.0人を超えることはなく、2010年9週（2/22～28）には1.0人を下回り沈静化している。患者報告の推移を過去9年間の平均と比較してみると、2009/2010シーズンは、3か月程度速いペースで増減していたことがわかる（図1）。

インフルエンザウイルスの検出状況を見てみると、2009年23週（6/1～7）まではいわゆる季節性の A（H1）型と A（H3）型と B 型が検出され、24週以降徐々に A（H1）新型の検出割合が増えていき、28週（7/6～12）以降はほぼ全数が A（H1）新型であった。検出されたインフルエンザウイルスの内訳は、A（H1）型が3例、A（H3）型が33例、A（H1）新型が942例、B 型が4例となった（図2）。

全数把握時期の新型インフルエンザ陽性者（79名）の推定感染源は、海外渡航歴有り17名（21.5%）、海外渡航歴無し62名（78.5%）と、圧倒的に国内感染が疑われる症例が多かった。国内で新型インフルエンザ患者との接触が疑われた感染者のうち約半数は、学

神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

* 現 地域調査部

** 現 企画情報部

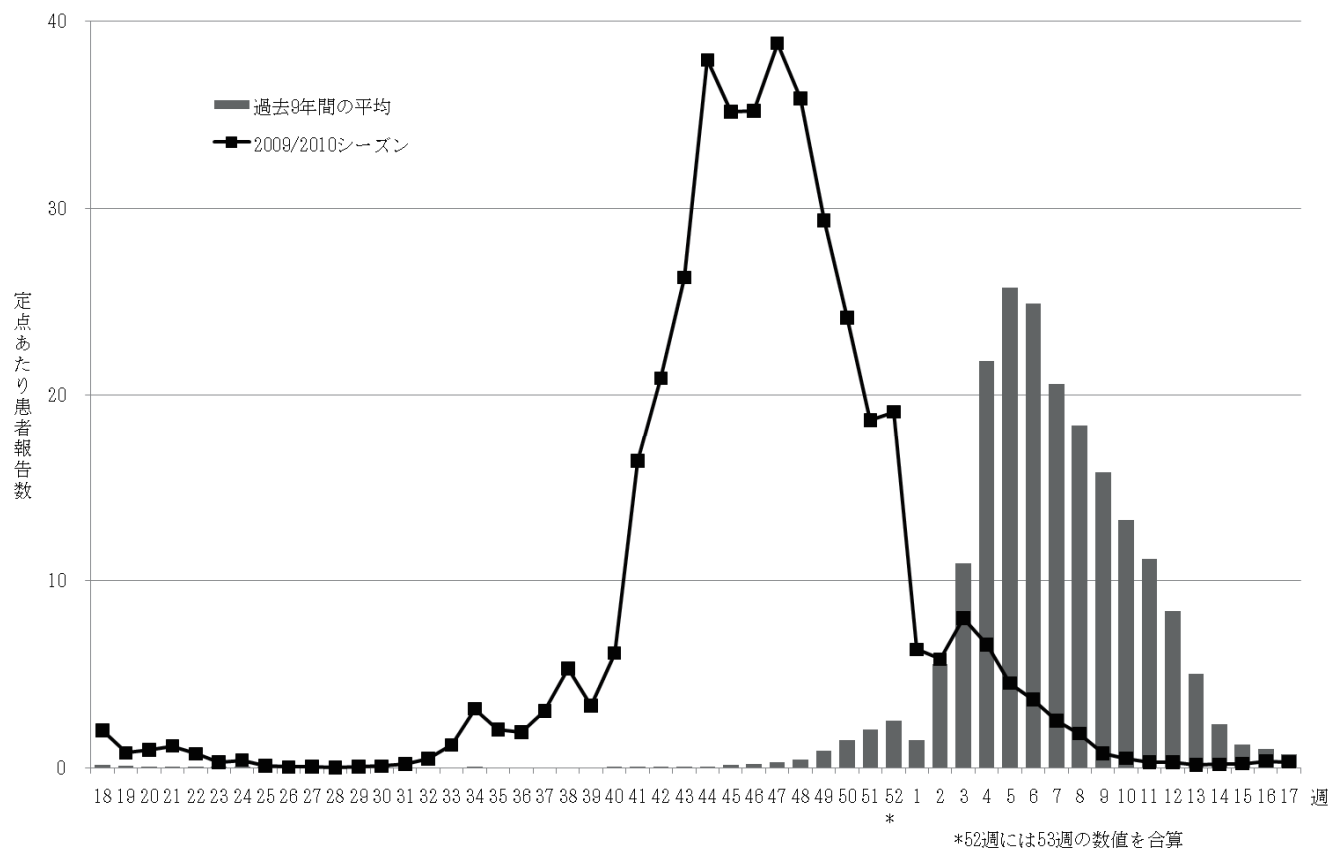


図1 インフルエンザ患者報告数の推移

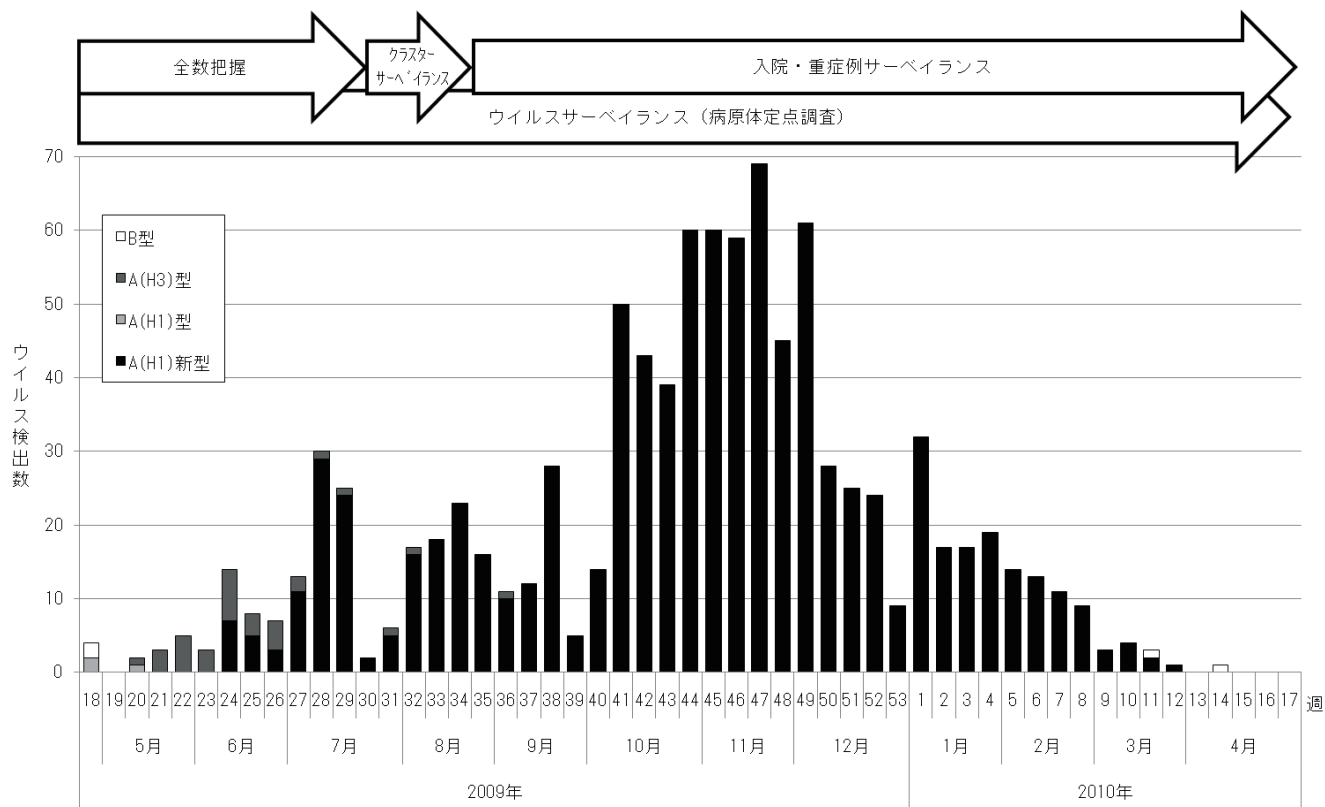


図2 インフルエンザウイルス検出状況

校における感染が疑われた。また、疫学調査において患者との接触歴が不明となる場合も多く、かなり早い段階で国内に新型インフルエンザが侵入し、感染拡大が進行していたのではないかと考えられる。海外渡航歴有りの感染者の渡航先の内訳は、ハワイ・グアム8名、アメリカ本土3名、オーストラリア・ニュージーランド2名、その他の地域4名となり、最も早く流行が確認されたアメリカからの帰国者が多かった。(図3)。

新型インフルエンザ陽性者の年齢構成は、全数把握時期(24～30週)には、0～9歳7.4%、10～19歳60.5%、20～29歳14.8%、30～39歳7.4%、40～49歳3.7%、50～59歳6.2%、60歳以上は0%であった(図4.a)。最も割合の高かった10～19歳の中でも14～18歳が特に多く、中学生・高校生に相当する年齢を中心に流行していた。クラスターサーベイランス期間(31～35週)には0～9歳の患者が23.0%に増加しており(図4.b)、その後患者発生のピーク時(36～47週)までの期間には、0～9歳が30.7%に増加し低年齢層へ感染が拡大した。さらに、35週以前にはいなかった60歳以上の感染者(60～69歳0.7%、70歳

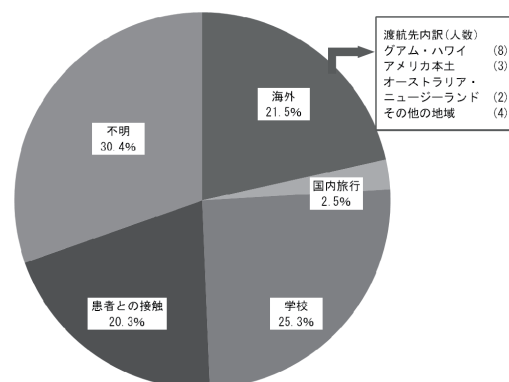


図3 新型インフルエンザ陽性者の推定感染源

以上0.9%)も確認された(図4.c)。全調査期間(2009年24週～2010年12週)でみると、0～9歳31.7%、10～19歳40.2%、20～29歳13.2%、30～39歳6.3%、40～49歳4.4%、50～59歳3.2%、60～69歳0.4%、70歳以上0.6%であった。新型インフルエンザ陽性者の7割が20歳未満で占められており、今回の流行は若年者が中心であったことがわかった(図4.d)。

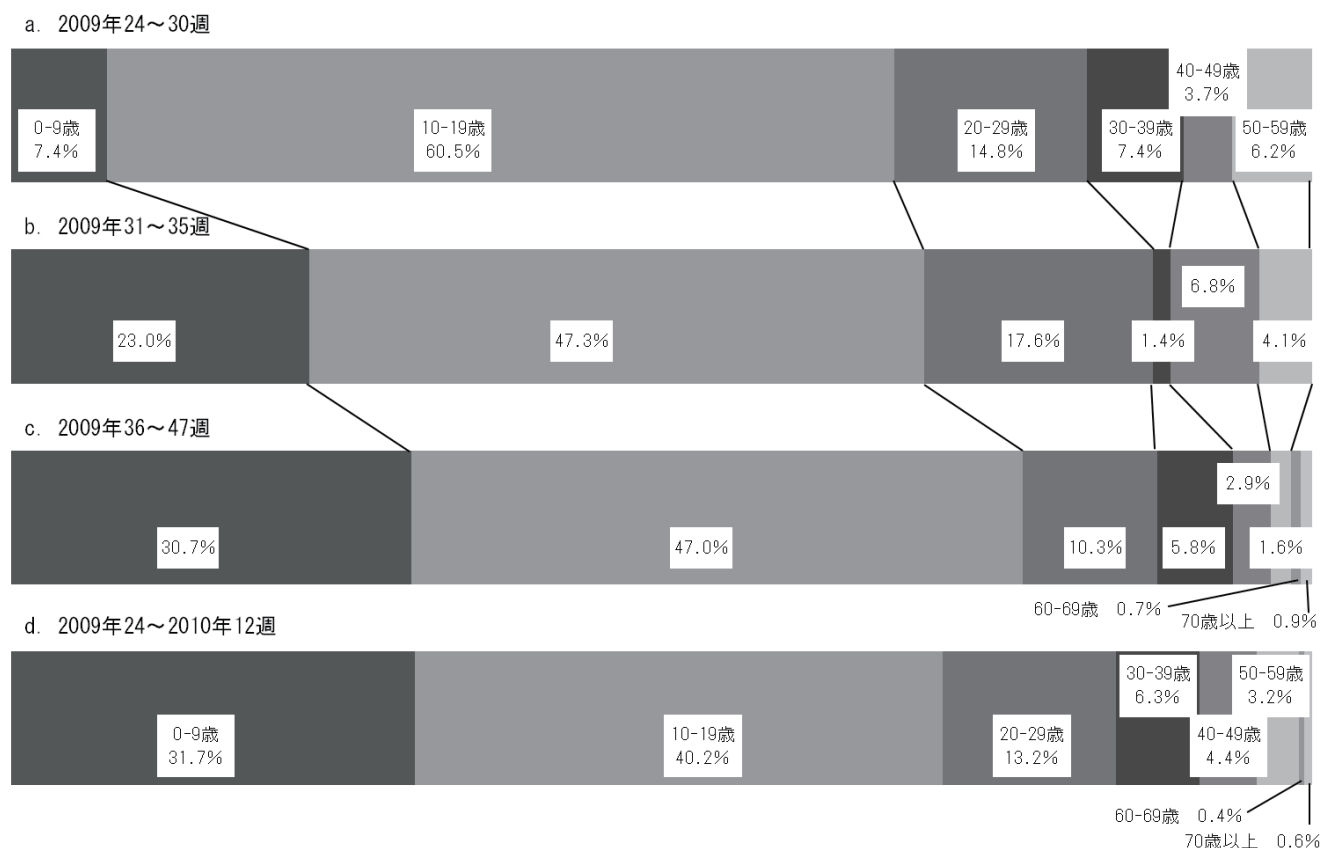


図4 新型インフルエンザ陽性者の年齢分布

新型インフルエンザ分離株 260 株について、A/カリフォルニア /7/2009 標準抗血清とモルモット赤血球を用いた血球凝集抑制反応（HI）により抗原性変異の解析を行った。A/カリフォルニア /7/2009 標準抗血清のホモ価（1280HI）と同等～2 倍差（1280～640HI）を示す類似株が 67.3%，4 倍差（320HI）を示す株が 28.1%，8～16 倍差（160～80HI）を示す株が 4.6% となり，多くの分離株が A/カリフォルニア /7/2009 標準株類似であった（図 5）。

2007/2008 シーズン以来，季節性 A（H1）型分離株のオセルタミビル耐性株が世界各国で高頻度に分離されようになり，日本においても 2008/2009 シーズンの季節性 A（H1）型分離株のほぼ全数がオセルタミビル耐性株であった。薬剤耐性株の出現は，治療に影響するため重大な問題である。そこで，新型インフルエンザ分離株 211 株について，NA 遺伝子の一部を増幅し，ダイレクトシーケンス法を用いて H275Y オセルタミビル耐性マーカーの有無を調査したが，耐性変異を持つ株は検出されなかった。

2009/2010 シーズンにおける県域の新型インフルエンザの流行は，2010 年 4 月末現在沈静化していると考えられ，流行期間中に標準株と抗原性の異なる変異株やオセルタミビル耐性株が流行して問題となることはなかった。しかし，南半球では 6 月以降新型出現後 2 回目のインフルエンザシーズンを迎えようとしており，季節性インフルエンザを含めた流行状況やウイルスの性状の変化など，注目すべき点が多い。さらに，流行地域からの輸入事例も含めて，今後の監視態勢を充実させていくことが重要である。

最後になりましたが，検体採取および患者情報の収集にご協力いただきました医療機関の先生方および検体搬送にご尽力いただきました保健福祉事務所職員の皆様に深謝いたします。

（平成 22 年 8 月 20 日受理）

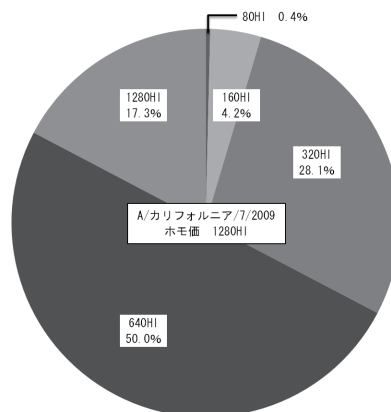


図5 新型インフルエンザ分離株の HI 試験結果

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 21 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, 2009 ~ March, 2010)

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）の各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

ルスの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 21 年 4 月から平成 22 年 3 月に感染性胃腸炎と診断された患者の便 259 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、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ターアデノ（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

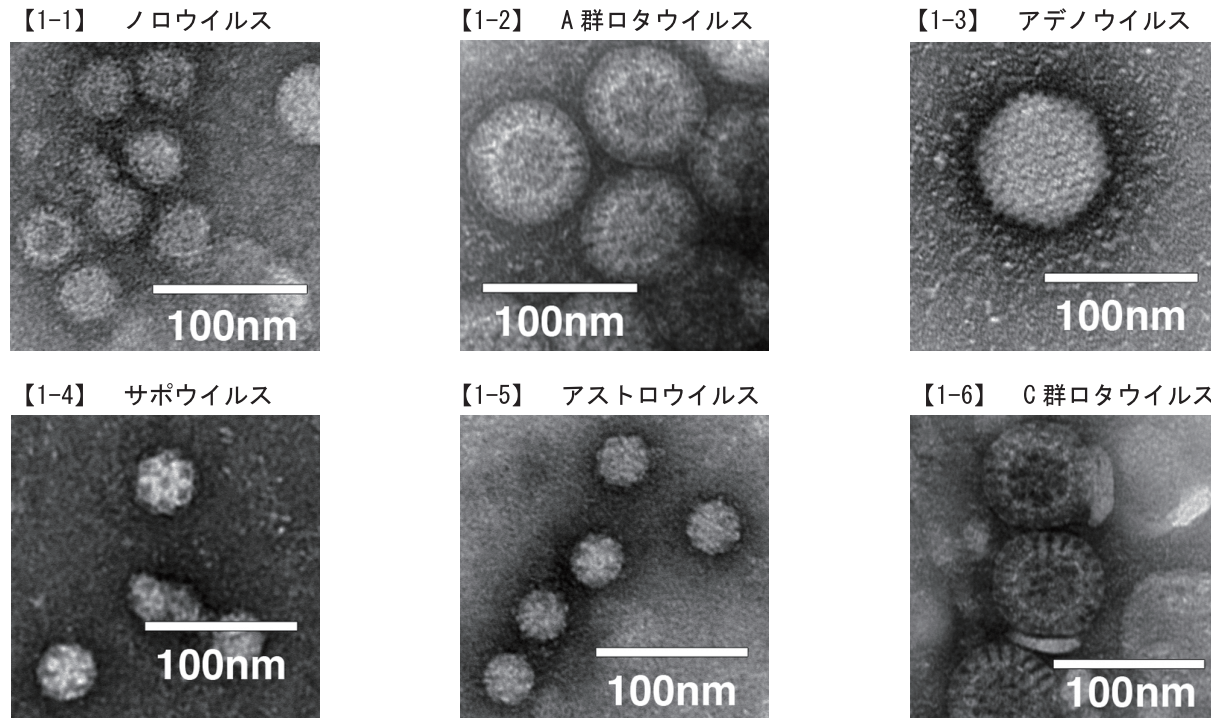


図 1 平成 21 年度に検出されたウイルスの電顕像

polymerase chain reaction (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、259 検体中 138 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 74 検体、A 群ロタウイルスが 27 検体、アデノウイルスが 18 検体、サポウイルスが 10 検体、アストロウイルスが 8 検体および C 群ロタウイルスが 1 検体であった(表 1)。

患者の年齢を 6 歳以下 (188 例)、7 歳から 12 歳 (17 例)、13 歳から 22 歳 (9 例)、23 歳から 64 歳 (33 例) および 65 歳以上 (8 例) に分け、ウイルスの検出状況を年齢別にみると、検出されたウイルスの大多数が 6 歳以下での検出であった。ノロウイルスは 64 歳以下の各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、65 歳以上からも 1 例であるが検出された。アデノウイルスは 6 歳以下、13 ～ 22 歳および 23 ～ 64 歳で検出された。サポウイルスおよび C 群ロタウイルスは 6 歳以下からのみ検出された。アストロウイルスは 6 歳以下および 23 ～ 64 歳の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 21 年 4 月にはノロウイルスが 1 例、A 群ロタウイルスが 7 例、アデノウイルスが 2 例、サポウイルスが 2 例、アストロウイルスが 7 例および C 群ロタウイルスが 1 例と 6 種類全てのウイルスが検出された。5 月にはノロウイルスが 1 例、A 群ロタウイルスが 5 例、アデノウイルスが 4 例およびサポウイルスが 2 例検出された。6 月にはノロウイルスが 2 例、A 群ロタウイルスとアデノウイルスが 3 例ずつおよびサポウイルスとアストロウイルスが 1 例ずつ検出され、7 月にノロウイルスとサポウイルスが 1 例ずつ検出された。8 月はウイルスが検出されず、その後 9 月にサポウイルス 1 例、10 月にアデノウイルス 1 例が検出され、11 月のノロウイルスとアデノウイルスが 3 例ずつおよび A 群ロタウイルス 1 例を皮切りにそれ以降は 12 月にノロウイルス 8 例、A 群ロタウイルス、アデノウイルスおよびサポウイルスが 1 例ずつ、平成 22 年 1 月にノロウイルス 28 例、A 群ロタウイルスとサポウイルスが 1 例ずつおよびアデノウイルス 2 例、2 月にノロウイルス 24 例、A 群ロタウイルス 4 例およびアデノウイルスとサポウイルス 1 例ずつ、3 月にノロウイルス 6 例、A 群ロタウイルス 5 例およびアデノウイルス 1 例と平成 21 年 8 月を除いた全ての月でウイルスが検出された(表 2)。

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	54	25	15	10	7	1
7～12歳	5	0	0	0	0	0
13～22歳	2	0	1	0	0	0
23～64歳	12	0	2	0	1	0
65歳以上	0	1	0	0	0	0
年齢不詳	1	1	0	0	0	0
合計	74	27	18	10	8	1

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	C群ロタウイルス
	genogroup I	genogroup II					
平成21年 4月	0	1	7	2	2	7	1
5月	0	1	5	4	2	0	0
6月	1	1	3	3	1	1	0
7月	0	1	0	0	1	0	0
8月	0	0	0	0	0	0	0
9月	0	0	0	0	1	0	0
10月	0	0	0	1	0	0	0
11月	0	3	1	3	0	0	0
12月	0	8	1	1	1	0	0
平成22年 1月	1	27	1	2	1	0	0
2月	1	23	4	1	1	0	0
3月	1	5	5	1	0	0	0
合計	4	70	27	18	10	8	1

検出されたノロウイルスの genogroup をみると、74 検体のうち 70 検体が genogroup II、4 検体が genogroup I であった。ノロウイルス genogroup II の流行は、平成 21 年 11 月から平成 22 年 3 月であったが、genogroup I は、平成 21 年 6 月に 1 例と平成 22 年 1 月から 3 月に 1 例ずつの検出であった。A 群ロタウイルスの流行は、平成 21 年 4 月から 6 月であったが、11 月以降、22 年 3 月まで毎月検出された。アデノウイルスは 7 月から 9 月を除き年間を通して検出された。サポウイルスも流行期が見られず、平成 21 年 8 月、10 月、11 月および平成 22 年 3 月を除き、アデノウイルスと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 4 月に小流行したが、6 月の 1 例を最後に平成 22 年 3 月まで検出されなかった（表 2）。

平成 21 年度の調査において興味深いのはアストロウイルスが平成 21 年 4 月に 7 例見られたことであった。平成 20 年度では年間を通じて検出されていたが、今年度は一回の小流行のみであった。アストロウイルスの検出された 8 例について検体情報と臨床症状をまとめた（表 3）。検出されたのは茅ヶ崎、厚木および

小田原地域で、平成 21 年 6 月 9 日発病の 1 例を除き 4 月 12 日から 4 月 22 日の 10 日間という短い期間での発生であった。小田原地域では 5 症例中 4 症例がこの時期の患者であり、流行があったことが示唆された。また茅ヶ崎地域では 2 症例、厚木地域では 1 症例ではあったが、両地域の患者調書には家庭内流行や保育園流行の記載があり、茅ヶ崎および厚木地域においてもアストロウイルスの流行が推測された。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、ノロウイルスやロタウイルスとは異なり、発熱や嘔吐が無く下痢のみの症例が 5 例で、下痢・嘔吐の症例は 3 例と比較的軽い症状であると考えられた。

今後も引き続き本調査を継続するにあたり、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各小児科定点医療機関の先生方に深謝いたします。さらに本事業にご尽力いただきました県健康増進課の方々に深謝いたします。

（平成 22 年 8 月 20 日受理）

表3 感染性胃腸炎患者に対する臨床症状（アストロウイルス検出事例）

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
茅ヶ崎	平成21年4月12日	平成21年4月13日	2	0	9	男			+					家庭内流行
厚木	平成21年4月18日	平成21年4月23日	6	1	8	女			+					
小田原	平成21年4月14日	平成21年4月24日	11	3	2	女			+			+		
小田原	平成21年4月17日	平成21年4月24日	8	0	7	男			+			+		
小田原	平成21年4月21日	平成21年4月25日	5	42		男			+		+	+		
小田原	平成21年4月22日	平成21年4月28日	7	3	1	女			+				+	
茅ヶ崎	平成21年4月20日	平成21年4月23日	4	0	11	男			+					保育園流行
小田原	平成21年6月9日	平成21年6月18日	10	3	3	女			+					

資料

神奈川県におけるつつが虫病の発生状況 (平成 21 年度)

片山 丘, 古屋由美子

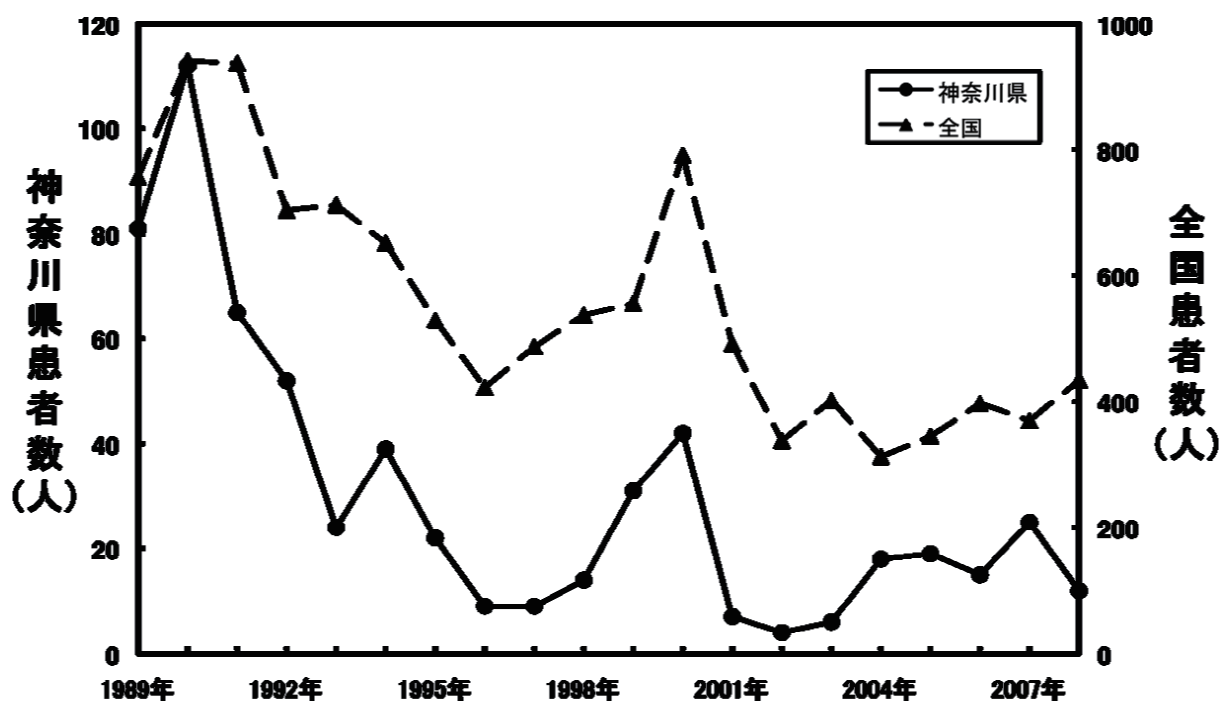
Occurrence of tsutsugamushi disease in Kanagawa Prefecture (April, 2009 ~ March, 2010)

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期間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。その後やや減少したものの 1990 年にはまた 1,000 名近くまで増加した。1991 年以降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 8 年間の患者数は 300 から 450 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 名となり、2004 年から 2008 年はやや増加して 18 名、19 名、15 名、25 名、12 名と推移し、2009 年は 18 名であった (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、つつが虫の検査体制の整備、地域の医療機関および住民への啓発を行った。検査体制は従来行っていた immunofluorescence assay (IFA) による血清診断に加え、1994 年より polymerase chain reaction (PCR) によるつつが虫の迅速診断および感染株の型別を行うことにより、医



(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

表1 つつが虫病を疑われた患者の IFA と PCR による検査結果

検体番号	性別	年齢	発病日	採血日	抗Gilliam株		抗Karp株		抗Kato株		抗Kawasaki株		抗Kuroki株		IFA判定	PCR判定	総合判定
					IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG			
H21-1	女	40	2009/5/10	2009/5/12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H21-2	男	53	2009/5/22	2009/5/22	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2009/5/29	2009/5/29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H21-3	女	61	2009/5/27	2009/5/28	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2009/6/8	2009/6/8	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H21-4	男	62	2009/6/29	2009/7/3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2009/7/17	2009/7/17	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H21-5	男	43	2009/7/24	2009/7/24	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H21-6	女	7	2009/7/17	2009/7/27	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2009/8/3	2009/8/3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H21-7	女	57	2009/8/6	2009/8/11	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2009/8/31	2009/8/31	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H21-8	女	53	2009/8/14	2009/8/17	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2009/8/27	2009/8/27	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H21-9	男	26	2009/10/10	2009/10/15	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H21-10	男	71	2009/10/24	2009/10/26	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H21-11※	女	79	2009/10/19	2009/10/27	10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	陽性	陰性	陽性
			2009/11/9	2009/11/9	≥320	160	10	80	10	80	≥320	160	10	40	陽性	陽性(Kw)	陽性
H21-12	男	48	2009/10/21	2009/10/27	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H21-13	男	63	2009/10/19	2009/10/28	160	20	20	<10	20	<10	≥320	20	20	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2009/11/6	2009/11/6	≥320	≥320	≥320	160	≥320	160	≥320	≥320	160	160			
H21-14	男	66	2009/10/29	2009/10/29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H21-15	女	68	2009/10/27	2009/11/4	≥320	≥320	80	80	<10	≥320	≥320	≥320	40	≥320	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2009/11/13	2009/11/13	≥320	≥320	≥320	≥320	160	≥320	≥320	≥320	160	≥320			
H21-16	男	79	2009/10/30	2009/11/4	160	<10	20	<10	20	<10	≥320	40	20	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2009/11/17	2009/11/17	640	40	160	40	160	40	2560	1280	160	40			
H21-17	女	61	2009/10/31	2009/11/6	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H21-18	男	79	2009/10/30	2009/11/6	10	20	<10	20	<10	20	<10	20	<10	20	保留	陰性	陰性
H21-19	女	59	2009/11/6	2009/11/9	≥320	≥320	≥320	80	≥320	≥320	≥320	≥320	160	160	陽性	陽性(Kw)	陽性
H21-20※	男	67	2009/11/9	2009/11/10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陰性	陽性
			2009/11/27	2009/11/27	40	20	160	40	10	40	20	<10	160	80	陽性	陽性(Kr)	陽性
H21-21	男	69	2009/11/9	2009/11/11	10	<10	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2009/11/20	2009/11/20	≥320	160	≥320	≥320	160	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320			
H21-22	男	60	2009/11/7	2009/11/10	40	<10	<10	<10	<10	<10	160	40	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
H21-23	女	81	2009/11/16	2009/11/16	40	<10	40	<10	40	<10	40	<10	40	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
H21-24	男	59	2009/11/9	2009/11/17	<10	20	<10	<10	<10	<10	10	20	<10	10	保留	陰性	陰性
H21-25	男	64	2009/11/13	2009/11/18	20	40	80	160	20	40	20	40	80	≥320	陽性	陽性(Kr)	陽性
			2009/11/30	2009/11/30	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	160	≥320	≥320	≥320			
H21-26	女	12	2009/11/18	2009/11/18	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H21-27	男	13	2009/11/20	2009/11/24	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2009/12/15	2009/12/15	≥320	40	160	20	80	20	≥320	≥320	160	20	陽性	陽性(Kw)	陽性
H21-28	男	82	2009/11/12	2009/11/21	40	<10	≥320	<10	40	<10	80	<10	≥320	<10	陽性(Kr)	NT	陽性
H21-29	男	61	2009/11/25	2009/11/28	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kr)	陽性
			2009/12/8	2009/12/8	≥320	40	≥320	80	≥320	80	160	40	≥320	≥320			
H21-30	男	41	2009/12/6	2009/12/7	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	10	陰性	陰性	陰性
			2009/12/25	2009/12/25	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	10			
H21-31	男	59	2009/11/24	2009/12/7	≥320	160	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	160	≥320	≥320	陽性(Kr)	NT	陽性
H21-32	男	68	2009/12/3	2009/12/8	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2009/12/22	2009/12/22	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
H21-33	女	47	2009/12/14	2009/12/18	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
H21-34	男	73	2009/12/11	2009/12/25	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kp)	陽性
			2010/1/4	2010/1/4	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	≥320	80	≥320	≥320			
H21-35	女	51	2010/2/20	2010/2/24	<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

NT : 検査せず

※:PCR検査が再検査により陽性となった症例

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。

2009年4月から2010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27例、小田原保健福祉事務所管内5例、秦野保健福祉事務所管内3例の合計35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。今年度衛生研究所の検査において陽性と判定されたのは18例であった。検査結果の詳細は、35例のIFA判定では、急性期・回復期の血清18例中、抗体価の上昇（4倍以上の差）から10例が陽性と判定された。急性期の血液のみの検査17例中4例（H21-19, H21-22, H21-28, H21-31）はIgM抗体価が80倍以上であったため陽性と判定され、計14例がつつが虫病と診断されたが、13例はIFAでは判定できず判定保留となった。また急性期・回復期の血清抗体価の上昇のない8例は陰性と判定された。

PCRによる急性期の血液を用いた *Orientia tsutsugamushi* DNA の検出では、IFAで陽性であった14例（血液検査のみの2例を含む）のうち、12例からDNAが検出された。またIFAで判定保留の13例中4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33例中16例がDNA検出でつつが虫病と診断された。2例は血清検査のみの事例であった。この2例を除いた12例のうち再検査の2例は最初の遺伝子検査ではDNAが検出されなかったため、条件を変更して再度検出を試みたところ、陽性と判定された。このことからIFA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IFA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となった。

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確定診断することが重要である。今後もPCRとIFAを併用しつつが虫病的診断をより確実にする必要があると考えられた。今年度はPCRによるDNAの検出において、昨年度に引き続きPCRに用いる酵素の検討を再検査の際に行った結果、遺伝子の検出率が更に向上し、IFAの陽性検体全てからDNAを検出することができた。しかしながら、検体の様々な条件に対応できるかは不明であるため、さらなる試薬の変更や改良が今後の課題として挙げられる。

PCRにより *O. tsutsugamushi* DNA の検出された16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的感染株について検索を行った（表1）。今回県内の患者に

感染が見られた株は、Kawasaki, Kuroki, Karpの3株であり、それぞれ12例（75.00%）、3例（18.75%）および1例（6.25%）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1検体（H21-27）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の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株であることが確認されたが、56kDaタンパク質をコードしている遺伝子のうち460塩基について解析した結果、今年度の分離株では昨年度（251番目のCがTに変化）と異なった318番目のGがA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。

Kawasaki	1	CCTCAACCTACTATAATGCTATAAGTATAGCGGATCGTGATTGGGAGTTGATACTGAC	60
H21-27	1	CCTCAACCTACTATAATGCTATAAGTATAGCGGATCGTGATTGGGAGTTGATACTGAC	60
Kawasaki	61	ATTCTTGCTCAGGCTGCTGTTGGACAACAACAGCTTACTGTTGAGCAGCGGCTGAAGAT	120
H21-27	61	ATTCTTGCTCAGGCTGCTGTTGGACAACAACAGCTTACTGTTGAGCAGCGGCTGAAGAT	120
Kawasaki	121	AGGATTGCTGTTGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGTTCCAGATTCTCAGAAT	180
H21-27	121	AGGATTGCTGTTGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGTTCCAGATTCTCAGAAT	180
Kawasaki	181	CCTAATGCTAGAGTTGTAATCTGTTATTGTTAAATATTACTCAAGGGGACCTAATGTA	240
H21-27	181	CCTAATGCTAGAGTTGTAATCTGTTATTGTTAAATATTACTCAAGGGGACCTAATGTA	240
Kawasaki	241	AATCTAGACCTCGGCAAAATCTTAATATACTTGATCATGATCAATGGAGTATTGGTA	300
H21-27	241	AATCTAGACCTCGGCAAAATCTTAATATACTTGATCATGATCAATGGAGTATTGGTA	300
Kawasaki	301	GTTGGTGTACCGCATTGTCAATGCTAATAAACCTAGCGTTTCTCTGTTAAAGTATTA	360
H21-27	301	GTTGGTGTACCGCATTGTCAATGCTAATAAACCTAGCGTTTCTCTGTTAAAGTATTA	360
		*	
Kawasaki	361	AGTGACAAAATTACTCAGATATATAGTGATATAAGGCAATTCGCTAAGATAGCTAATATT	420
H21-27	361	AGTGACAAAATTACTCAGATATATAGTGATATAAGGCAATTCGCTAAGATAGCTAATATT	420
Kawasaki	421	GAAGTTCTGGCGCTCCTTTGCTAATAGTGCATCTGTTG	460
H21-27	421	GAAGTTCTGGCGCTCCTTTGCTAATAGTGCATCTGTTG	460

図2 分離株とKawasaki株との遺伝子の比較

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、南足柄市と足柄上郡山北町に集中しており過去の発生状況と同じであったが、昨年度は6カ所に見られた患者発生が、今年度は3カ所であった（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、南足柄市はKawasaki株5例およびKuroki株

3例、山北町はKawasaki株7例、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、10月が7例で38.9%、11月が10例で55.5%、12月が1例で5.6%であった。感染時の行動は、田畑などでの農作業が多く、次に山菜採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ことが重要であると思われた。

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

(平成22年8月20日受理)

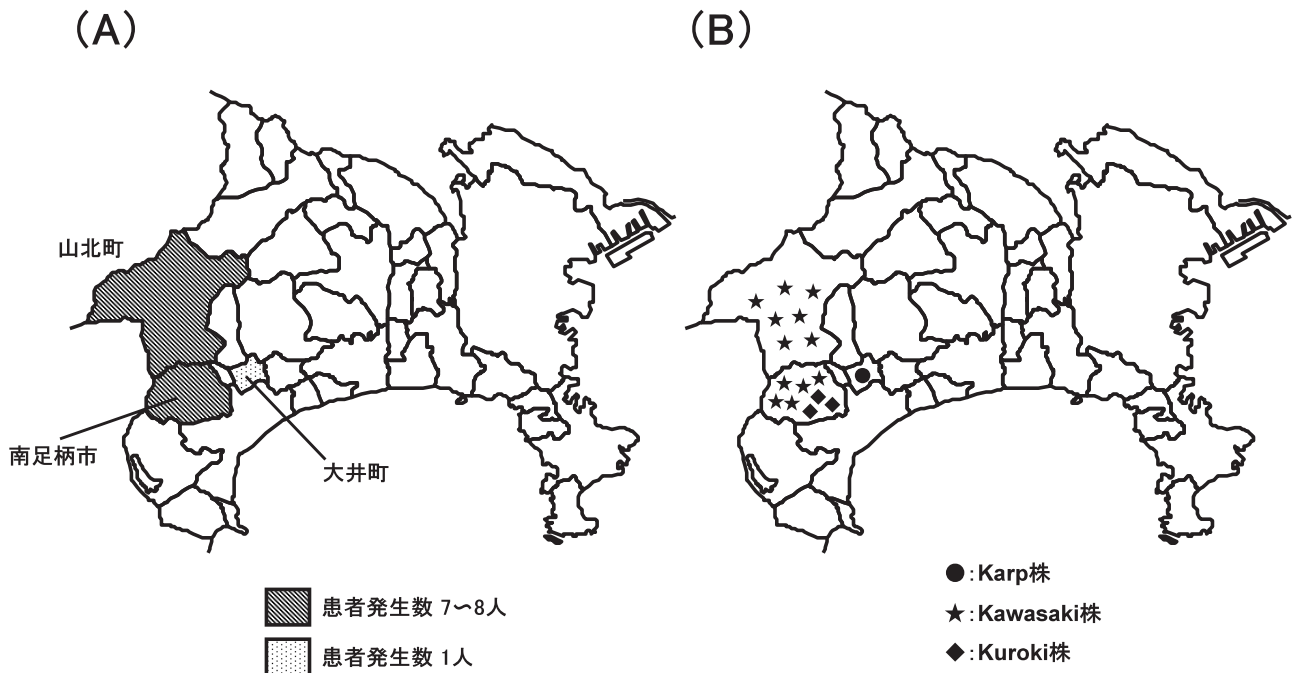


図3 つつが虫病発生地域と感染株(2009年)

資料

ガスクロマトグラフィー / 質量分析計による畜水産物中 残留農薬試験法の適用性について

甲斐茂美, 赤星 猛*, 脇ますみ, 藤巻照久

Applicability of analytical method for pesticide residues in livestock products and fish using gas chromatography / mass spectrometry

Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI,

Masumi WAKI and Teruhisa FUJIMAKI

我々は、食品の安全・安心の確保のため、食品の収去検査を行っている。検査に用いる試験法について、当所では検査実施標準作業書（SOP）作成ガイドライン理化学編を定め、適用性を評価した後にSOPを作成している。当所のガイドラインの概要を表1に示した。この度GC/MSによる農薬等一斉試験法（畜水産物）（以下通知法）¹⁾について、適用性の評価を実施したので報告する。

試験法の概要は、各農薬等を試料からアセトン：*n*-ヘキサン（1：2）混液で抽出（乳、卵及びはちみつの場合はアセトニトリルで抽出）し、ゲル浸透クロマトグラフィー（以下GPC）及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラム（以下PSA）で精製した後、ガスクロマトグラフ/質量分析計（以下GC/MS）で測定する方法である。詳細は通知法¹⁾に準じて実施した。

試料は、茅ヶ崎市内で市販されている牛筋肉、豚筋肉、鶏筋肉、サケおよび乳の5品目とした。分析対象農薬は表2に示した。標準品は和光純薬(株)、林純薬(株)の残留農薬試験用および関東化学(株)製 Pesticide-Mix1037を用いた。精製用のPSAカートリッジカラムはVarian社製 Bond Elut PSA(500mg)を用いた。GPCは島津製作所(株)製 ProminenceGPC クリーンアッ

プシステムを、分取用カラムはShodex社製 CLNpak EV-2000 AC（内径20mm、長さ300mm）を用いた。GC/MSはAgilent社製7890Aガスクロマトグラフ及び5975C質量分析装置、分析カラムはJ&W社製DB-5ms（内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m）を用いた。GC測定条件は、カラム温度：50℃（1分）-25℃/分-125℃（0分）-10℃/分-300℃（10分）、注入口温度：250℃、インターフェイス温度：300℃、キャリアーガス及び流量：ヘリウム1ml/min（線速度約36cm/sec）、注入方式：パルスドスプリットレス（高圧注入）法、注入量：2 μ l、MS測定条件は、イオン化法及びイオン化電圧：EI（電子衝撃イオン化）法70eV、イオン源温度：230℃、四重極温度：150℃で操作した。

添加量を残留農薬等の一律基準値である0.01 μ g/gと、その10倍の0.1 μ g/gの2濃度とし、試行回数5回の添加回収試験を実施した。なお、各試料を試験法に従って抽出・精製して得られた最終試験溶液を減圧乾固し、標準溶液を加えて調製したマトリックス添加標準溶液と、アセトン：*n*-ヘキサン（1：1）混液で調製した溶媒標準溶液との比較を行い、畜水産物中の夾雑物による影響について確認した。その結果、いくつかの農薬でマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液の面積比が0.7に満たないか1.2を超え、夾雑物による影響が見られたことから、定量はマトリックス添加標準溶液で作成した検量線で行った。真度（回収率）、精度（変動係数）、定量限界、その他（特異性等）について検証し、当所におけるガイドラインに照合し、検査に用いる試験法への適用について評価した。

分析対象農薬のGC/MSでの保持時間、定量イオン、確認イオン、定量限界について表2に示した。今回検討した26農薬は主に有機塩素系農薬を選定した。異性体を持つ農薬のBHC、クロルデン、エンドスルファン、DDE、DDD、DDTは、定量イオン、確認イオンが同一であったが、分析カラムDB-5msを使用した分析で、保持時間が重なることなく十分な分離が得られた。農薬の保持時間付近に試料由来の妨害ピークも見られなかったことから、特異性に問題はなかった。また、分析結果から得られたGC/MSでの定量限界を試料中の濃度に換算した値は、一律基準値の判定を十分に満たす値であった。

対象食品ごとの添加回収試験における真度と精度を表3に示した。真度は0.01 μ g/g添加では鶏筋肉のHCB、乳のHCB、アルドリン、トランスノナクロル、pp'-DDTで回収率が60%に、0.1 μ g/g添加では鶏筋肉の α -BHC、HCB、乳のHCB、アルドリンで回

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

* 前 理化学部

収率が70%に達しなかった。精度は0.01 μ g/g添加で豚筋肉の α -エンドスルファン、 β -エンドスルファンで変動係数が25%を超え、0.1 μ g/g添加で鶏筋肉のHCBが15%を超えた。

真度、精度、定量限界、特異性から評価し、牛筋肉では26項目、豚筋肉では24項目、鶏筋肉では24項目、サケでは26項目、乳では22項目の農薬について、試験法の適用性が確認された。

なお、本研究は神奈川県保健福祉部生活衛生課食品衛生専門監視班の、平成21年度先行調査事業により実施した。

(平成22年8月20日受理)

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発第1129002号（平成17年11月29日）

表1 SOP作成ガイドラインの判定基準

濃度 (μ g/g)	真度 (%)	精度 (%)	定量限界	その他
0.001~0.01	60~120	25以内	試験法に示された定量限界 または一律基準	クロマト上に妨害ピークがない 特徴のあるスペクトルパターンが得られる
0.01~0.1	70~120	15以内		

表2 GS/MSの測定条件

農薬名	分析条件			GC/MSの 定量限界 (μ g/mL)	試料あたり 換算値 (mg/kg)	目標 定量限界 (mg/kg)
	保持時間 min	定量イオン m/z	確認イオン m/z			
α -BHC	11.03	219	181	0.0056	0.0023	0.01
HCB	11.10	284	249	0.0038	0.0015	0.01
β -BHC	11.55	219	181	0.0048	0.0019	0.01
γ -BHC	11.71	219	181	0.0053	0.0021	0.01
δ -BHC	12.29	219	181	0.0067	0.0027	0.01
ピンクロゾリン	12.93	285	212	0.011	0.0042	0.01
ヘプタクロル	13.16	272	237	0.0051	0.0020	0.006
アルドリノ	13.87	263	293	0.0044	0.0017	0.006
オキシクロルデン	14.62	387	185	0.0044	0.0017	0.002
シスヘプタクロルエポキシド	14.62	353	317	0.0056	0.0022	0.01
トランスヘプタクロルエポキシド	14.70	253	183	0.0040	0.0016	0.01
トランスクロルデン	15.08	373	272	0.0046	0.0018	0.002
o,p'-DDE	15.11	246	318	0.0043	0.0017	0.01
シスクロルデン	15.32	373	272	0.0046	0.0018	0.002
α -エンドスルファン	15.37	241	339	0.0045	0.0018	0.004
トランスノナクロル	15.37	409	272	0.0048	0.0019	0.01
p,p'-DDE	15.71	246	318	0.0043	0.0017	0.01
ディルドリン	15.84	263	279	0.0051	0.0021	0.006
o,p'-DDD	15.86	235	165	0.0065	0.0026	0.01
エンドリン	16.24	263	243	0.0073	0.0029	0.005
β -エンドスルファン	16.45	241	339	0.0075	0.0030	0.004
シスノナクロル	16.52	409	263	0.0063	0.0025	0.01
p,p'-DDD	16.52	235	165	0.0090	0.0036	0.01
o,p'-DDT	16.56	235	165	0.0052	0.0021	0.01
エンドスルファンスルフェート	17.16	272	387	0.011	0.0042	0.01
p,p'-DDT	17.22	235	165	0.0090	0.0036	0.01

表3 適用試験結果

農薬名	牛筋肉				豚筋肉				鶏筋肉				さけ				乳			
	0.01 $\mu\text{g/g}$		0.1 $\mu\text{g/g}$		0.01 $\mu\text{g/g}$		0.1 $\mu\text{g/g}$		0.01 $\mu\text{g/g}$		0.1 $\mu\text{g/g}$		0.01 $\mu\text{g/g}$		0.1 $\mu\text{g/g}$		0.01 $\mu\text{g/g}$		0.1 $\mu\text{g/g}$	
	真度	精度	真度	精度	真度	精度	真度	精度	真度	精度	真度	精度	真度	精度	真度	精度	真度	精度	真度	精度
α -BHC	73.1	6.1	77.8	9.2	66.4	11.3	76.8	8.7	64.9	10.1	65.1	11.4	77.5	10.6	81.8	12.6	75.3	8.5	83.9	4.5
HCB	60.9	13.1	70.4	6.5	65.9	10.1	73.0	9.1	54.3	14.9	53.1	17.5	70.6	12.8	77.2	13.5	54.3	11.6	60.5	5.4
β -BHC	86.2	3.0	88.4	5.0	60.4	23.0	81.4	7.6	79.7	5.6	87.9	1.8	81.6	10.9	86.2	11.9	82.6	7.2	88.8	2.7
γ -BHC	80.2	3.4	83.5	5.0	69.8	11.7	78.1	7.9	77.8	5.3	74.8	6.4	82.8	11.2	84.1	12.4	77.3	9.7	86.0	3.9
δ -BHC	86.4	0.8	89.3	4.9	66.6	15.8	80.0	7.9	85.5	5.2	87.8	1.7	81.8	11.1	86.7	11.2	74.3	10.3	92.7	4.2
ビンクロゾリン	88.0	1.5	90.3	4.7	67.3	13.7	82.7	6.2	85.4	6.4	87.6	1.7	80.9	10.4	86.3	11.6	75.3	9.1	93.5	4.2
ヘプタクロル	77.5	3.6	83.3	4.9	66.2	12.9	78.3	8.9	70.7	7.9	73.0	7.5	79.6	10.6	84.4	12.9	63.5	10.7	74.0	4.0
アルドリノ	80.7	3.1	85.5	4.8	68.5	13.5	78.0	9.1	74.9	8.7	74.9	6.2	81.4	10.3	84.1	12.7	58.4	11.3	68.9	3.4
オキシクロルデン	84.5	2.2	88.6	5.3	68.8	13.5	79.4	9.3	83.6	7.9	85.1	2.5	81.1	10.2	86.2	11.9	62.6	10.3	76.7	3.6
シスヘプタクロルエポキシド	86.3	1.0	88.7	5.2	68.6	13.3	79.6	9.1	83.8	7.0	85.8	2.3	83.2	10.7	85.9	11.8	73.1	9.6	81.1	3.6
トランスヘプタクロルエポキシド	90.0	1.4	89.3	5.5	70.2	14.0	79.6	9.5	93.4	7.2	86.6	1.9	83.4	11.2	85.6	11.1	73.3	8.5	79.4	3.5
トランスクロルデン	88.5	1.2	89.4	5.1	66.5	7.9	80.0	9.0	87.1	9.2	87.6	1.4	77.7	11.6	86.0	11.8	61.6	11.0	76.3	3.2
o,p'-DDE	88.3	1.2	90.0	5.3	68.7	13.6	80.1	8.6	86.0	6.6	87.7	1.3	84.6	10.6	86.3	11.6	63.7	10.1	73.9	3.1
シスクロルデン	88.5	1.1	89.8	5.1	68.2	14.3	80.2	8.9	85.1	6.1	87.6	1.3	83.1	10.6	86.5	11.8	64.6	10.0	76.3	3.1
α -エンドスルフアン	89.8	2.4	90.0	5.5	77.4	29.9	81.1	8.8	87.1	6.4	87.1	1.7	96.7	15.1	86.4	12.1	67.9	10.3	74.5	3.4
トランスノナクロル	88.1	1.4	90.0	5.4	67.9	14.7	79.7	9.7	85.6	6.2	87.7	1.2	82.2	10.8	86.3	11.7	59.7	10.8	74.6	3.2
p,p'-DDE	88.3	1.2	90.0	5.3	68.7	13.6	80.1	8.6	86.0	6.6	87.7	1.3	84.6	10.6	86.3	11.6	63.7	10.1	73.9	3.1
ディルドリン	86.6	2.2	89.1	5.3	68.8	11.0	79.6	8.8	86.4	5.6	86.5	1.3	84.5	9.0	86.4	11.6	73.4	9.1	79.7	3.2
o,p'-DDD	88.7	0.7	90.2	5.2	68.1	14.7	80.8	8.0	86.4	6.1	89.8	0.8	84.3	10.9	87.2	11.2	70.2	9.0	79.9	3.0
エンドリン	88.6	2.1	89.7	5.1	67.2	12.4	79.0	8.4	82.4	3.8	88.0	1.2	81.5	11.9	85.7	11.8	70.1	8.0	80.9	4.0
β -エンドスルフアン	92.6	2.7	89.2	5.8	65.8	28.4	79.9	8.7	83.1	11.9	92.7	0.9	95.3	14.0	87.5	10.9	70.3	7.6	84.1	7.3
シスノナクロル	87.9	0.9	90.0	5.6	68.1	15.0	80.1	8.8	87.0	6.1	89.3	1.1	83.8	10.7	86.3	11.1	60.5	9.8	75.8	3.0
p,p'-DDD	87.6	1.4	90.6	5.1	64.1	19.4	76.7	10.8	87.4	5.5	90.5	0.8	83.1	10.7	87.1	10.7	68.7	14.8	74.7	11.7
o,p'-DDT	87.2	1.7	89.9	5.2	63.1	21.6	77.6	11.2	86.3	6.8	88.6	1.2	82.8	10.8	87.1	11.1	66.4	16.2	72.6	5.6
エンドスルフアンスルフェート	87.8	1.8	91.3	4.9	76.6	20.0	80.6	7.3	87.1	5.9	90.9	1.0	90.6	9.5	88.5	10.3	77.4	8.5	92.5	3.9
p,p'-DDT	82.7	1.1	92.1	4.7	67.4	18.4	82.7	6.3	87.0	6.9	91.0	1.5	93.4	10.6	88.1	10.3	56.7	10.2	78.6	3.0

試行回数 n=5 0.01 $\mu\text{g/g}$ 添加については、回収率が60%未満または120%を超えたもの、変動係数が25%を超えたものを灰色で示した

真度：平均回収率(%) 精度：変動係数(%) 0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加については、回収率が70%未満または120%を超えたもの、変動係数が15%を超えたものを灰色で示した

資料

遺伝子組換え食品の分析結果 (平成 21 年度)

大森清美, 服部愛希*, 酒井康宏, 関戸晴子,
田中由紀子, 岸 弘子

Analytical results of genetically modified foods in Kanagawa Prefecture (2009)

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

海外では、1996 年から遺伝子組換え (GM) 作物の商業栽培が開始され、その耕地面積は年々増加の一途をたどっている。また、複数の GM 作物を交配したスタック品種などの新たな GM 作物も次々と開発され、GM 作物の品種、栽培国、栽培面積のいずれもその増大は留まるところを知らない。日本では食品としての GM 作物の商業栽培は実施されておらず、国内で流通する GM 作物は、すべて輸入されたものである。日本において GM 作物を食品とする場合には、GM 作物の開発国が安全性を承認しているいにかかわら

ず、我が国の食品安全委員会で安全性が承認されることが必須となる。よって、国内での流通が許可されない安全性未審査の GM 作物が食品へ混入することのないよう監視を行うことが、日本における組換え遺伝子検査の第一の目的である。また、安全性が承認済みかつ分別生産流通管理 (Identity Preserved Handling : IP ハンドリング) を有する GM 作物に限っては、非意図的な混入として、上限として 5% の GM 作物が non-GM 作物と混在することが、日本では許可されている。しかしながら、安全性承認済みの GM 作物であっても、非意図的な混入ではなく食品原料として使用する場合には、表示を行うことが義務付けられていることから、その含有率を定量し、GM 作物の原料表示が正しく行われていることを確認する必要がある。これが、食品の組換え遺伝子検査を行う第二の目的である。これら二つの目的のために、厚生労働省および農林水産省は、種々の試験法を開発し公表している^{1~3)}。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実施している^{4~9)}。本報では、2009 年度 (平成 21 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。

試験方法は、厚生労働省通知^{1, 2)} および JAS 分析試験ハンドブック³⁾ 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 21 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。使用機器類は、前報のとおりである⁹⁾。

表 1 平成 21 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
コメ	米粉	3	定性	PCR- アガロースゲル電気 泳動法	(NIPPON GENE) GM quicker2変法	Btコメ	SPS
	餅	3					
	ライスペーパー	1					
	ビーフン	3					
トウモロコシ	煎餅	4	定性	PCR- アガロースゲル電気 泳動法	(QIAGEN) DNeasy Plant Mini Kit 法	CBH351 Bt10	Zein
	トウモロコシ青果	4					
	トウモロコシ穀粒	4					
	コーンスナック菓子	6					
	コーンスープ	4	定量	リアルタイムPCR法	(QIAGEN) Genomic-tip Kit 法	CBH351	SS II b
	トウモロコシレトルト	1					
	トウモロコシ缶詰	1					
大豆	トウモロコシ青果	4	定性	リアルタイムPCR法	(QIAGEN) DNeasy Plant Mini Kit 法	35S*・GA21	Le1
	トウモロコシ穀粒	4					
	大豆穀粒	13	定量	リアルタイムPCR法	(QIAGEN) DNeasy Plant Mini Kit 法 / (QIAGEN) Genomic-tip Kit 法	RRS	Le1
	冷凍枝豆	5					
	豆腐	11					
	厚揚げ	7					
合計	豆乳	8	定性 定量				
		38 52					

* Event176, Bt11, T25, Mon810のスクリーニング

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
* 前 神奈川県衛生研究所 理化学部

まず、安全性未審査組換え遺伝子の定性試験については、パパイヤ組換え系統；55-1、トウモロコシ組換え系統；CBH351 および Bt10、コメ組換え系統；Bt コメの試験を行った結果、いずれの検体から得られた DNA 試料原液についても、組換え遺伝子是不検出であった（表 2）。

次に、安全性審査済み組換え遺伝子の定量試験では、トウモロコシ組換え系統；Event176, Bt11, T25, Mon810, GA21, および大豆組換え系統；Roundup Ready Soybean (RRS) について試験を行った。トウモロコシ組換え系統 4 種（Event176, Bt11, T25, Mon810）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、トウモロコシ青果では、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、組換え遺伝子は認められなかった。しかし、トウモロコシ穀粒は、表示上の問題は無いが、アメリカ産の検体 No.5 で、35S プロモーターが定量下限値(0.5%)³⁾

未満の微量混入が認められた。

大豆組換え系統の RRS 定量試験結果では、大豆穀粒 13 検体中、カナダ産 1 検体およびアメリカ産 2 検体の計 3 検体で、定量下限値 (0.5%)¹⁰⁾ 未満の微量混入が認められた。大豆加工食品については定量試験の対象外となっているが¹⁾、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食品について、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。本年度試験を実施した大豆加工食品のうち、冷凍枝豆については、5 検体すべてが 45 サイクルまで RRS の PCR 増幅が全く検出されず、組換え遺伝子是不検出であった。豆腐は、定量下限値未満の微量混入の検出率が高く、11 検体中 10 検体で認められた。それらのうち 5 検体はカナダもしくはアメリカ産の大豆を原料とした豆腐であった。厚

表2 平成 22 年度 組換え遺伝子定性試験結果

検体No	品目	原料産地	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
1	パパイヤ青果	ハワイ	55-1	不検出	なし
2	パパイヤ青果	フィリピン	55-1	不検出	なし
3	パパイヤ青果	ハワイ	55-1	不検出	なし
4	パパイヤ青果	フィリピン	55-1	不検出	なし
5	米粉	日本	Btコメ	不検出	なし
6	米粉	日本	Btコメ	不検出	なし
7	米粉	記載なし	Btコメ	不検出	なし
8	餅	日本	Btコメ	不検出	なし
9	餅	日本	Btコメ	不検出	なし
10	餅	日本	Btコメ	不検出	なし
11	ライスペーパー	ベトナム	Btコメ	不検出	なし
12	ビーフン	ベトナム	Btコメ	不検出	なし
13	ビーフン	台湾	Btコメ	不検出	なし
14	ビーフン	タイ国	Btコメ	不検出	なし
15	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
16	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
17	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
18	煎餅	記載なし	Btコメ	不検出	なし
19	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
20	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
21	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
22	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
23	トウモロコシ青果	日本	CBH351/Bt10	不検出	なし
24	トウモロコシ青果	日本	CBH351/Bt10	不検出	なし
25	トウモロコシ青果	日本	CBH351/Bt10	不検出	なし
26	トウモロコシ青果	日本	CBH351/Bt10	不検出	なし
27	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
28	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
29	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
30	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
31	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
32	コーンスナック菓子	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
33	コーンスープ	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
34	コーンスープ	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
35	コーンスープ	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
36	コーンスープ	記載なし	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
37	トウモロコシレトルト	タイ	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
38	トウモロコシ缶詰	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない

表3 平成 21 年度 組換え遺伝子定量試験結果

検体No	品目	原料産地	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	35S・GA21	不検出	なし
2	トウモロコシ青果	日本	35S・GA21	不検出	なし
3	トウモロコシ青果	日本	35S・GA21	不検出	なし
4	トウモロコシ青果	日本	35S・GA21	不検出	なし
5	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S・GA21	35S定量下限値*未満検出	遺伝子組換えでない
6	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S・GA21	不検出	遺伝子組換えでない
7	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S・GA21	不検出	遺伝子組換えでない
8	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S・GA21	不検出	遺伝子組換えでない
9	大豆穀粒	カナダ	RRS	定量下限値**未満検出	IPハンドリングあり
10	大豆穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値**未満検出	IPハンドリングあり
11	大豆穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値**未満検出	IPハンドリングあり
12	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
13	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
14	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
15	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
16	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
17	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
18	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
19	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
20	大豆穀粒	中国	RRS	不検出	IPハンドリングあり
21	大豆穀粒	記載なし	RRS	不検出	なし
22	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	なし
23	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	なし
24	冷凍枝豆	タイ	RRS	不検出	なし
25	冷凍枝豆	タイ	RRS	不検出	なし
26	冷凍枝豆	記載なし	RRS	不検出	なし
27	豆腐	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
28	豆腐	カナダ	RRS	定量下限値**未満検出	なし
29	豆腐	カナダ・アメリカ	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
30	豆腐	カナダ	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
31	豆腐	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
32	豆腐	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
33	豆腐	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
34	豆腐	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
35	豆腐	カナダ	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
36	豆腐	アメリカ	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
37	豆腐	中国	RRS	不検出	なし
38	厚揚げ	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
39	厚揚げ	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
40	厚揚げ	カナダ	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
41	厚揚げ	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
42	厚揚げ	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
43	厚揚げ	日本	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
44	厚揚げ	記載なし	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
45	豆乳	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
46	豆乳	カナダ	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
47	豆乳	記載なし	RRS	定量下限値**未満検出	遺伝子組換えでない
48	豆乳	日本	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
49	豆乳	日本	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
50	豆乳	記載なし	RRS	検知不能	遺伝子組換えでない
51	豆乳	日本	RRS	検知不能	遺伝子組換えでない
52	豆乳	記載なし	RRS	検知不能	遺伝子組換えでない

* 0.5%、参考文献3による35S定量下限値

** 0.5%、参考文献10によるRRS定量下限値

揚げについても、7 検体中 5 検体で定量下限値未満の混入が認められ、1 検体ではカナダ産の大豆を原料としていることが記載されていた。豆乳では、8 検体中 3 検体で微量混入が認められ、そのうち 1 検体の原料大豆はカナダ産であることが記載されていた。これらカナダ産もしくはアメリカ産の大豆を使用した大豆

加工品では、全て RRS の微量混入が検出されているが、大豆穀粒については、必ずしも両国を産地とする大豆で RRS の微量混入が検出されているわけではないことから、カナダ産およびアメリカ産の大豆が特に高頻度に微量の RRS を含んでいるということではないものと考えられる。しかしながら、GM 大豆は GM

作物の中で一番耕地面積が広く、世界的には最も流通量が多い GM 作物である¹¹⁾ことから、輸入大豆を用いていることが明らかな加工食品については、引き続き監視を行う必要があると思われる。また、検体 No.50, 51 および 52 の豆乳については、大豆内在性遺伝子 Le1 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。これらの検知不能となった豆乳は、DNA 試料原液の濃度が 36 ~ 433ng/ μ L と、定量試験を実施する DNA 試料原液としては十分な濃度が得られており、DNA の精製度の指標とされる 260nm/280nm の吸光度比も 1.85 ~ 1.98 と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/ μ L に希釈後、定量 PCR を実施した結果では、Le1 のコピー数は検体 No.50 では 7000 前後、検体 No.51 は 4000 前後、検体 No.52 は 0 コピーであった。それらの原因として、共存する原料由来の成分による PCR 阻害、もしくは加工過程における大豆 DNA の断片化の可能性が考えられるが、詳細な原因究明は今後の課題である。

以上、平成 21 年度の組換え遺伝子検査結果において、トウモロコシ穀粒、大豆穀粒、豆腐、厚揚げおよび豆乳で、定量下限値未満であったが微量の組換え遺伝子の混入が認められた。特に、豆腐および厚揚げ RRS 微量混入は、10/11 および 5/7 と高頻度で検出され、豆乳でも 3/5 (検知不能 3 検体を除く) の検体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は、年度により検出率の変動はあるものの^{4~9)}、依然として RRS 微量混入の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 22 年 8 月 20 日受理)

参考文献

- 1) 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),
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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) - パパイア, 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)
- 8) 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 パパイア, 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)
- 9) 大森清美ほか：遺伝子組換え食品の分析結果 (平成 20 年度), 神奈川県衛生研究所研究報告, 39, 37-40 (2009)
- 10) 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)
- 11) Clive James, 2009 ISAAA Report on Global Status of Biotech/GM Crops, International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA), <http://www.isaaa>.

資料

高速液体クロマトグラフィー / タンデム型質量分析法による 農産物中残留農薬試験法の適用性について

協ますみ, 赤星 猛*, 甲斐茂美, 藤巻照久

Applicability of analytical method for pesticide residues in agricultural products using liquid chromatography / tandem mass spectrometry

Masumi WAKI, Takeshi AKABOSHI,

Shigemi KAI and Teruhisa FUJIMAKI

食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分の試験法については, 現在8種類の一斉試験法及び多種の個別試験法が通知されている¹⁾. 当所では, 検査実施標準作業書 (SOP) 作成ガイドライン理化学編を定め, 通知された試験法の適用性を評価した後に SOP を作成し, 行政検査を実施している. 今回, いちご, キャベツ, きゅうり, だいこんの根, トマト, ピーマンの6作物を用い, LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅱ (農産物)¹⁾ について, 適用性試験を実施したので, その結果を報告する.

試験は通知の方法に準じ, アセトニトリルで抽出, 塩酸酸性下塩析で水を除いた後, シリカゲルミニカラムで精製し, 液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) で測定した. 分析カラムはジエールサイエンス社製 ODS-4, 粒子径 $3\ \mu\text{m}$, 内径 2.1mm , 長さ 150mm を用い, LC/MS/MS は Agilent 1100 シリーズ及び Applied Biosystems 社製 API3000 を使用した. 添加量は一律基準値である $0.01\ \mu\text{g/g}$ とその10倍の $0.1\ \mu\text{g/g}$ の2濃度とし, 試行回数は5回とした. また, 試料を抽出, 精製後, 溶液中濃度が $0.05\ \mu\text{g/ml}$ となるように標準溶液を添加したマトリックス添加標準溶液を調製し, 溶媒

標準溶液との比較を行い, 農産物中の夾雑物の影響を確認した. その結果, いくつかの農薬でマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液の面積比が0.7未満または1.2を超え, 夾雑物の影響が考えられたことから, 定量にはマトリックス添加標準溶液による検量線を用いることとした. 適用性の評価は, SOP 作成ガイドラインに基づき, 真度 (回収率), 精度 (変動係数), 定量限界, その他 (特異性等) について実施した. 判定基準を表1, 対象農薬, LC/MS/MS の分析条件および定量限界を表2, 真度および精度の結果を表3に示す.

今回確認した26農薬については, プレカーサイオンおよびプロダクトイオンに重複はなく, 分析カラムによる分離も良好であり, 特異性に問題はなかった. また, 試料からも, 農薬の保持時間付近に夾雑物等のピークは見られなかった. 分析結果から得られた LC/MS/MS での定量限界値を試料中の濃度に換算した値は, 一律基準値の判定を十分に満たすものであった. 真度については, $0.01\ \mu\text{g/g}$ 添加では, いちご4項目, キャベツ10項目, だいこんの根1項目, トマト3項目, ピーマン5項目で60~120%の範囲を外れ, $0.1\ \mu\text{g/g}$ 添加では, いちご12項目, キャベツ, だいこんの根, トマト, ピーマンで1項目が70~120%の範囲を外れた. なお, きゅうりの真度については全ての農薬において判定基準内であった. 精度については, $0.01\ \mu\text{g/g}$ 添加でいちご2項目, だいこんの根, ピーマン1項目で25%を超え, $0.1\ \mu\text{g/g}$ 添加ではいちご, だいこんの根, トマト, ピーマン1項目で15%を超えた.

真度, 精度, 定量限界, 特異性から評価し, 6作物全てに適用可能となった項目は, シノスルフロン, ハロスルフロンメチル, ピラゾスルフロンエチル, フェンヘキサミド, フルアジホップ, ベンスルフロンメチル, メソスルフロンメチル, トリクロピルの8項目であった. また, 全ての作物に適用不可となった項目はなかったが, トリベヌロンメチルはきゅうり以外の5作物について, 適用不可となった.

今回の検討により, いちごでは12項目, キャベツでは16項目, きゅうりでは26項目, だいこんの根では25項目, トマトおよびピーマンでは21項目の農薬について, 試験法の適用性が確認された.

なお, 本検査は神奈川県保健福祉部生活衛生課食品衛生専門監視班先行調査事業により実施された.

(平成22年8月20日受理)

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

* 前 衛生研究所 理化学部

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発
第 1129002 号（平成 17 年 11 月 29 日）

表 1 SOP 作成ガイドライン判定基準

濃度 ($\mu\text{g/g}$)	真度 (%)	精度 (%)	定量限界	その他
0.001~0.01	60~120	25以内	試験法に示された定量限界 または一律基準	クロマト上に妨害ピークがない 特徴のあるスペクトルパターンが得られる
0.01~0.1	70~120	15以内		

表 2 農薬の LC/MS/MS における測定条件

農薬名	保持時間 (min)	MRM Trace (m/z)	DP (V)	CE (V)	LC/MS/MSの 定量限界 ($\mu\text{g/ml}$)
ポジティブイオン化					
イマザキン	16.3	312.2→199.1 312.2→86.0	56	39 39	0.000047
エタメツルフロメチル	20.5	411.2→196.1 411.2→168.1	36	23 39	0.000011
エトキシスルフロ	23.0	399.1→261.1 399.1→218.1	46	23 35	0.0000072
クロルスルフロ	16.7	358.0→141.0 358.0→167.2	41	25 25	0.00011
シクロスルフアムロン	27.2	422.2→261.1 422.2→218.3	31	23 39	0.000014
シノスルフロ	17.4	414.2→183.0 414.2→157.2	31	23 31	0.00011
スルホスルフロ	18.2	471.2→211.1 471.2→261.3	41	19 23	0.000047
チフェンスルフロメチル	15.1	388.1→167.2 388.1→204.9	26	21 37	0.000029
トリアスルフロ	18.8	402.1→167.1 402.1→141.1	41	25 31	0.000094
トリフルスルフロメチル	25.0	493.2→264.1 493.2→96.0	31	27 79	0.0000035
トリベヌロンメチル	19.6	396.1→155.1 396.1→181.1	31	19 29	0.000027
ハロキシホップ	27.6	362.0→316.1 362.0→90.9	56	25 51	0.00030
ハロスルフロメチル	21.0	435.1→182.1 435.1→83.2	36	29 79	0.000021
ピラゾスルフロエチル	20.9	415.2→182.1 415.2→83.1	36	25 69	0.000018
フェンヘキサミド	29.8	302.2→97.0 302.2→55.1	61	35 61	0.0039
フラザスルフロ	18.6	408.1→182.2 408.1→83.0	36	29 71	0.000012
フルアジホップ	24.4	328.2→282.0 328.2→254.1	46	27 35	0.00018
フルメツラム	12.1	326.1→129.1 326.1→109.1	56	35 75	0.00056
プロスルフロ	23.5	420.2→141.1 420.2→167.1	61	27 27	0.000035
ベンスルフロメチル	25.5	411.2→149.2 411.2→182.1	51	35 29	0.000044
ホルクロルフェニロン	26.7	248.1→129.0 248.1→92.9	26	25 47	0.00011
メソスルフロメチル	20.4	504.2→182.1 504.2→83.1	36	33 87	0.000019
ネガティブイオン化					
アイオキシニル	20.6	369.7→126.8 369.7→214.6	-36	-40 -42	0.0000082
ジクロルプロップ	22.9	232.0→160.9 232.0→124.8	-21	-16 -42	0.0011
ジベレリン	13.6	345.0→143.1 345.0→238.9	-36	-46 -22	0.0010
トリクロピル	21.9	253.0→195.9 253.0→217.8	-16	-16 -8	0.00012

イオン化モード:ESI

MRM Trace: マルチプルリアクションモニタリング測定時の選択イオン

プレカーサイオン→プロダクトイオン 上段; 定量イオン 下段; 確認イオン

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

CE: コリジョンエネルギー (Collision Energy)

表3 農葉の添加回収結果

農薬名	いちご				キャベツ				きゅうり				だいこんの根				トマト				ピーマン			
	0.01 μg/g		0.1 μg/g		0.01 μg/g		0.1 μg/g		0.01 μg/g		0.1 μg/g		0.01 μg/g		0.1 μg/g		0.01 μg/g		0.1 μg/g		0.01 μg/g		0.1 μg/g	
	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)	真度 (%)	精度 (%)
イマザキン	63.6	4.8	61.4	3.3	53.0	2.6	81.0	4.6	67.3	3.8	70.1	1.7	74.9	14.7	88.1	5.5	46.0	3.0	72.6	9.6	51.2	12.2	85.7	3.3
エタメツルフロンメチル	70.5	6.3	53.3	2.6	50.5	11.4	85.7	1.7	70.7	2.4	90.3	3.7	83.4	13.4	86.2	4.4	68.0	5.4	85.3	4.4	60.7	3.6	83.8	3.3
エトキシスルフロン	63.6	5.4	48.1	2.9	50.9	5.1	85.0	2.7	79.4	5.1	89.2	1.6	76.6	7.0	87.6	6.4	58.2	3.8	86.0	4.3	53.8	11.4	84.5	2.3
クロルスルフロン	64.9	2.4	50.6	5.3	76.5	2.7	84.5	4.2	75.5	5.4	85.4	3.5	85.2	12.6	89.5	5.5	74.0	4.0	81.4	2.6	62.3	2.6	85.6	4.3
シクロスルファメロン	72.8	3.8	86.9	3.1	58.6	5.2	80.1	1.9	79.5	3.0	82.4	1.7	85.6	4.8	84.2	3.0	92.5	4.0	86.7	5.3	80.1	4.0	83.1	1.7
シノスルフロン	76.4	11.6	90.5	3.7	70.1	4.1	84.6	4.0	77.9	7.9	87.2	2.3	84.7	12.6	82.4	6.4	83.0	4.7	84.8	8.1	69.8	8.3	91.5	4.5
スルホスルフロン	78.5	6.5	45.5	2.9	71.5	2.6	84.7	2.9	84.3	5.2	88.8	2.7	80.4	15.2	87.4	5.9	64.7	4.6	83.3	5.0	78.0	2.2	80.1	4.7
チフエンズルフロンメチル	69.9	5.6	48.6	3.0	72.0	3.5	80.1	1.9	80.0	4.7	82.8	2.3	91.5	11.4	73.4	3.6	74.8	6.6	82.9	4.1	76.9	6.2	77.1	3.8
トリアスルフロン	64.2	6.0	58.3	4.3	63.8	7.0	83.6	2.9	80.1	9.1	90.0	2.6	82.0	13.7	80.1	7.6	76.4	1.6	83.1	3.2	67.1	11.0	86.8	5.1
トリフルスルフロンメチル	64.6	1.7	49.5	3.7	60.8	2.1	76.1	3.8	72.4	4.2	85.1	3.0	79.5	8.1	90.6	4.9	71.6	4.7	82.2	3.3	62.3	4.2	75.3	3.4
トリベスロンメチル	68.5	26.0	62.2	18.7	58.0	16.1	63.9	2.7	93.6	16.3	110	4.9	25.3	26.4	22.4	55.8	12.9	15.7	112	11.6	42.4	60.7	59.8	17.3
ハロキシホップ	67.0	18.8	66.5	2.4	79.1	9.7	80.7	4.4	74.7	5.9	78.3	1.0	90.5	5.1	82.0	3.2	84.0	1.1	84.6	3.2	76.2	5.0	81.9	1.8
ハロスルフロンメチル	81.9	6.2	92.0	2.2	66.9	1.3	87.2	5.5	78.0	3.8	84.9	1.8	81.5	10.1	82.0	3.3	73.7	3.7	91.8	3.2	67.1	7.4	92.6	4.2
ピラソスルフロンエチル	78.9	5.4	93.5	2.3	74.8	2.7	85.6	4.8	72.5	2.3	86.8	2.3	73.2	11.7	83.9	2.9	79.0	4.0	86.5	6.9	61.9	9.3	90.9	4.0
フェンヘキサミド	88.6	3.6	88.1	1.8	85.8	7.5	79.1	4.4	76.8	4.5	82.7	2.1	77.2	9.3	84.2	1.4	89.7	5.4	87.1	2.9	73.6	6.7	86.8	3.1
フラザスルフロン	71.4	10.5	91.8	3.0	76.4	2.3	88.5	5.0	81.5	4.0	83.6	2.9	79.7	12.8	88.2	10.7	91.1	3.9	79.2	28.0	56.4	13.9	86.7	3.7
フルアジホップ	84.5	5.1	87.8	1.3	61.9	10.7	81.2	2.7	81.6	6.9	79.6	2.9	94.6	3.1	80.0	3.9	97.5	5.2	86.1	3.4	80.5	5.8	85.4	3.2
フルメツラム	57.3	36.5	55.5	2.6	29.3	19.0	81.1	5.7	70.5	7.5	76.3	3.7	74.9	18.1	77.5	3.9	65.6	10.9	70.6	10.9	44.1	14.0	78.9	3.3
プロスルフロン	83.3	1.6	89.8	3.4	52.9	5.2	81.6	1.1	83.1	5.4	84.5	3.4	82.9	4.1	83.3	4.7	84.7	3.2	88.5	3.2	70.6	6.1	90.5	2.5
ベンスルフロンメチル	73.7	3.6	88.5	3.1	74.9	1.1	84.6	3.8	76.0	4.6	85.5	3.2	80.6	5.0	86.3	3.7	77.7	7.1	87.4	5.7	74.9	4.4	87.2	3.4
ホルクロルフェニエロン	55.6	5.7	66.0	3.0	51.4	2.8	80.1	2.6	71.8	5.4	83.3	1.0	82.1	2.0	85.0	2.3	83.1	2.0	83.2	2.7	67.9	4.6	81.9	2.8
メスルフロンメチル	79.6	4.6	88.2	3.7	66.6	5.5	84.1	3.2	78.2	6.7	83.9	2.3	76.4	12.5	79.3	4.5	73.3	2.4	82.8	4.3	63.5	3.9	92.8	2.4
アイオキシニル	58.9	9.4	97.9	2.6	57.9	2.7	89.7	3.4	83.9	3.2	86.8	1.6	69.0	8.4	96.0	3.9	70.5	3.5	94.7	4.2	61.1	4.7	95.0	3.7
ジクロルフロップ	60.9	7.5	90.0	2.3	56.7	4.3	84.4	2.5	80.2	5.8	79.7	3.4	79.4	9.5	84.5	4.9	84.0	3.7	87.9	4.1	76.3	5.9	88.3	4.0
ジベレリン	58.6	13.5	82.7	5.3	61.1	3.7	70.5	1.9	73.3	2.5	70.2	4.4	64.1	12.9	70.1	5.1	66.9	2.5	67.8	5.1	65.2	4.3	75.9	4.6
トリクロピル	67.3	8.0	93.6	3.5	63.4	7.0	77.3	6.1	76.6	3.1	79.8	1.4	84.9	5.5	84.2	2.0	87.1	6.6	82.3	3.5	76.5	4.7	92.0	4.9

真度、精度が表1の判定基準から外れたものを灰色で示した。
試行回数 n=5

資料

苦情食品に対する理化学検査の実施状況 (平成 21 年度)

酒井康宏, 赤星 猛*, 佐藤久美子, 脇ますみ,
関戸晴子, 大森清美, 宮澤真紀, 甲斐茂美,
岸 弘子, 小島 尚, 藤巻照久

Execution condition of physics and chemistry inspection of complaint food (2009)

Yasuhiro SAKAI, Takeshi AKABOSHI,
Kumiko SATO, Masumi WAKI, Haruko SEKIDO,
Kiyomi OHMORI, Maki MIYAZAWA,
Shigemi KAI, Hiroko KISHI, Takashi KOJIMA and
Teruhisa FUJIMAKI

消費者から寄せられる食品に対する苦情・相談は後を絶たない。我々は食の安心・安全を守るため、苦情食品の検査及び原因物質の究明に取り組んでいる。本報では、平成 21 年度に実施した苦情食品の理化学検査の概要について報告する。

平成 21 年度における苦情食品の理化学検査実施件数は 30 件で、月別の実施件数を表 1 に示した。このうち、異味異臭の事例が 9 件、異物混入の事例が 15 件、その他の事例（体調不良、外観異常等）が 6 件だった、主な分析方法を表 2、主な苦情食品の検査結果概要については表 3 に示した。

異臭に関する苦情では、主に官能検査及び異臭の原因物質（揮発性物質）の検査を行った。揮発性物質の検査では、簡便かつ迅速な検査により揮発性物質の気散を防ぐため、また妨害物質の検出を避けるためにヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計（以下、HS/GC/MS）を用いた。豆腐を食べようとしたところ消毒薬のような臭いがしたという事例では、HS/GC/MS を用いて揮発性物質の検査をした結果、苦情品及び対照品（苦情品の別ロット品及び同ロット品）から n-ヘキサナールが検出された、n-ヘキサナールは青臭さの原因であり、大豆に含まれるリノール酸から生成することが知られている¹⁾。苦情品のトータルイオンクロマトグラムは対照品によく類似しており、異臭の原因と考えられる物質は確認できなかった。

異物の検査では、形態や大きさ等から機器分析が難しい場合や、明らかに外観から異物の同定ができる場合を除き、形態観察後に材質検査を行った。材質検査では、検査後に試料を破損せずに回収し易いことから、蛍光 X 線分析及びフーリエ変換赤外分光光度分析（以下、FT-IR 分析）の ATR 法を主に用いた。ただし、FT-IR 分析の

表 1 苦情食品に対する理化学検査実施件数（月別）（平成 21 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	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4
	異臭のみ	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	4
	異味・異臭	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
異物	金属類	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	プラスチック・ゴム	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	動植物由来	1	0	1	2	2	0	0	2	0	0	0	1	9
	その他	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	5
その他	有症	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	5
	外観異常等	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
検査件数月計		2	3	4	4	5	2	2	3	2	1	0	2	30

ATR 法は、試料の形態（硬く割れやすい固形物、もろい繊維等）によっては破損する場合があります。検査の際には注意が必要であった。太刀魚の切り身に動物の歯のような白い異物が入っていたという事例では、形態観察の結果、歯に特有の構造は確認できず、形態が太刀魚の骨腫に類似していた。また、蛍光 X 線分析を行ったところ、異物の主成分はカルシウム (Ca) 及びリン (P) で、検出された元素の種類と比率が対照品（別の太刀魚の骨）と類似していた。以上から、異物は太刀魚の骨腫と考えられた。なお、骨腫とは、骨成分が異常沈着したもの（良性）で、同様の事例が報告されている²⁾。納豆のパックを開けたところ納豆上部に異物を発見した事例では、製造所への聞き取り調査及び製造現場調査の結果、異物と類似した形態のもの（対照品とした）が原料の輸入大豆に混入していることがあり、使用前に取り除いていることが判明した。また、マメ類が菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) に感染すると、菌糸が白色菌糸塊となり、後に黒変してネズミ糞状の菌核が多数形成されることが報告されている³⁾。これらのことから、異物は対照品と同一のものの可能性があり、検査を行った。異物と対照品の表面及び中心部で切断した断面を観察したところ、異物と対照品は同様の形態であり、どちらも切断面に菌糸様物が集合した構造が認められた。また、FT-IR 分析による FT-IR スペクトル及び蛍光 X 線分析により検出された元素 (P, 硫黄 (S), カリウム (K) 及び Ca) が、異物と対照品でいずれも類似していたことから、異物と対照品は同様のものと考えられた。しかし、これらの検査結果では、異物が菌核病菌の菌核と特定できなかった。

喫食後に体調不良を感じた事例（有症）や苦情者が食品の外観に異常を感じた事例もあった。食堂で酢を使ったところ異常を感じ、その後体調不良を訴えた事例では、苦情者からの聞き取り調査及び苦情発生現場の調査結果から、陰イオン界面活性剤の混入が疑われ、飲料水の試験法⁴⁾に基づき高速液体クロマトグラフ（以下、HPLC）を用いて検査を行った。苦情品が泡立ったことから陰イオン界面活性剤の濃度が高いと推定されたため、固相抽出を行わずメタノールで希釈して測定した。検査の結果、陰イオン界面活性剤が検出され、その HPLC クロマトグラムのパターン及び各成分の比を、調理場で使用

した洗剤と比較したところよく類似していた。しかし、他の洗剤及び洗濯用洗剤と比較したところ、これらのクロマトグラムとも類似していたため、原因が調理場の洗剤であると断定はできなかった。

食品に関する苦情の原因は様々であり、迅速な原因究明のためには、多くの情報や技術が求められる。そのため、当所では苦情食品の検査を実施するにあたり、企画情報部、地域調査部、微生物部及び理化学部が協力して取り組んでいる。本報をまとめるにあたって、情報提供等ご協力いただいたことに感謝の意を表する。

（平成 22 年 8 月 20 日受理）

文献

- 1) 鈴木秀之、富山大輔：大豆の青臭さの原因である n-ヘキサナールを分解できるアルデヒドデヒドロゲナーゼのスクリーニング、大豆たん白質研究、11、67-70（2008）
- 2) 木村圭介、田端節子、岩崎由美子、飯田憲司、嶋村保洋、中里光男ほか：食品の苦情事例（平成 18 年度）、東京都健康安全研究センター研究年報、58、259-264（2007）
- 3) 清水基滋：北海道におけるマメ類菌核病および灰色かび病の防除とトップジン M 水和剤、農薬時代、190、22-27（2008）
- 4) 厚生労働省告示第 261 号「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」、平成 15 年 7 月 22 日

表2 主な分析方法

検査項目	前処理法	分析機器	分析条件
異味: 有機リン系農薬	*1及び*2参照	GC/FPD ^{*3}	カラム: HP-5(内径0.32mm,長さ30m,膜厚0.25 μ m) 昇温条件: 60°C(2min)→30°C/min→180°C→ 5°C/min→230°C(12min) 注入口温度: 235°C 検出器温度: 250°C キャリアーガス流量: 2.4mL/min 注入口: スプリットレス 注入量: 1 μ L
異臭: 揮発性物質	固体: ・試料1gを20mLバイアルに採取 ・水10mL添加 ・塩化ナトリウム4g添加 ・70°Cで20min加熱 ・気相1000 μ LをGC/MSに注入 液体: ・試料10mLを20mLバイアルに採取 ・塩化ナトリウム4g添加 ・70°Cで20min加熱 ・気相1000 μ LをGC/MSに注入	HS/GC/MS	カラム: AQUATIC-2 (内径0.25mm,長さ60m,膜厚1.40 μ m) 昇温条件: 40°C(2min)→10°C/min→250°C(5min) 注入口温度: 200°C 検出器温度: 250°C キャリヤーガス流量: 1.0mL/min 注入口: スプリット(18:1) 注入量: 1000 μ L
異物: 材質検査 (含有金属の 種類及び割合)	・水やエタノールで洗浄して汚れを除去 ・複数の素材からなる場合は分離 ・表面と内部で構造が一様でない場合 は切断	蛍光X線 分析計	1.全元素を測定する条件 試料室: 大気雰囲気 測定時間: 100秒 励起電圧: 50kV 管電流: Auto 2.軽元素(～Ca)の測定に適した条件 試料室: He雰囲気 測定時間: 100秒 励起電圧: 50kV 管電流: Auto
異物: 材質検査 (官能基等)		FT-IR	ATR法
陰イオン界面活性 剤	*4参照 変更点: ・固相抽出を行わずメタノールで希釈	HPLC	*4参照

*1: 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第0124001号

「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」平成17年1月24日

*2: 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡

「食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法について」平成20年3月7日

*3: 蛍光光度計付きガスクロマトグラフ

*4: 厚生労働省告示第261号

「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」平成15年7月22日

表3 主な苦情食品の検査結果概要（平成21年度）

区分	苦情食品	概要	検査項目(機器等)	対照品	検査結果
異臭	たこ焼き	カビ臭がする	カビ臭物質 (HS/GC/MS)	同ロット品	・2-メチルイソボルネオール及びジオスミン不検出。 ・苦情品のクロマトグラムは対照品によく類似しており、カビ臭の原因物質は確認できない。
	豆腐	漂白剤の臭いがする	pH (pH試験紙) 揮発性物質 (HS/GC/MS)	同ロット品 別ロット品	・苦情品及び対照品全て約pH6。 ・苦情品及び対照品全てからn-ヘキサナール検出。 ・苦情品のクロマトグラムは対照品によく類似しており、異臭の原因物質は確認できない。
	筋子	クレゾールの臭いがする	揮発性物質 (HS/GC/MS)	別ロット品	・クレゾール類不検出。 ・苦情品のクロマトグラムは対照品によく類似しており、異臭の原因物質は確認できない。
異物: プラスチック・ゴム	イカの塩辛	ガラス様片混入	形態観察 (実体顕微鏡) 材質検査 (蛍光X線分析装置)	塩辛容器 製造所内のガラス片	・異物はガラスの可能性が高い。 (異物は透明で弾性がなく、主成分がケイ素(Si)及びCa。) (異物の含有金属は対照品2検体と類似。)
異物: 動植物由来	アイスクリーム (フランボワーズ)	異物混入	形態観察 (実体顕微鏡)	フランボワーズの種子	・異物はフランボワーズの種子。
	レトルト食品	調理後、喫食中に硬い異物を発見	形態観察 (実体顕微鏡) (生物顕微鏡) 材質検査 (蛍光X線分析装置)	無し	・異物は筋肉及び骨から成る物質と考えられる。 (白色部に骨様組織、淡褐色部に筋肉組織確認。) (Ca,P及びK検出。)
	カップケーキ	ビニール片及び毛様異物混入	形態観察 (実体顕微鏡) (生物顕微鏡) 材質検査 (FT-IR)	ビニール6種 (製造所で使用)	・毛髪様異物は人毛。 ・ビニール片の外観が対照品のうち1つと類似。 ・ビニール片及び対照品6つはポリエチレンを主とする物質。 (ビニール片及び対照品6つのFT-IRスペクトルがポリエチレンに類似。)
	太刀魚	歯の様な異物混入	形態観察 (実体顕微鏡) 材質検査 (蛍光X線分析装置)	別の太刀魚の骨	・異物は太刀魚の骨腫と推定。 (異物の形態は歯と異なり、骨腫に類似。) (異物の主成分がCa及びP。)
	アンパン	楔形黄褐色の異物混入	形態観察 (実体顕微鏡) (生物顕微鏡) 材質検査 (蛍光X線分析装置) (FT-IR)	アンパンのパン部位 アンパンの餡部位 製造所のパン生地	・異物は非常に硬く、内部に空洞があり、細胞様の形態はない。 ・異物はアンパン(パン部位及び餡部位)及び製造所のパン生地とは異なる。 (FT-IR及び蛍光X線スペクトルが異なった。) ・異物は歯に類似した物質と考えられる。 (主にCa及びPからなり、歯に類似した組成。)
	挽肉	茶色を帯びた白色異物混入	形態観察 (実体顕微鏡) 材質検査 (蛍光X線分析装置)	挽肉(未調理品) ミートソース (挽肉を調理)	・異物に類似した固形物を挽肉及びミートソースから発見。 ・異物は発見した固形物と同様のもので、骨の可能性が考えられる。 (異物の蛍光X線スペクトルが発見した固形物に類似。) (異物は主にCa及びPからなり、組成が骨に類似。)
異物: その他	メープルシロップ	ガラス様異物混入	形態観察 (実体顕微鏡) 材質検査 (蛍光X線分析装置) (FT-IR)	無し	・糖と考えられる。 (異物は無色透明で水に溶解した。) (異物からSi不検出。) (異物のFT-IRスペクトルがスクロースに類似。)
	納豆	黒色異物混入	形態観察 (実体顕微鏡) (生物顕微鏡) 材質検査 (蛍光X線分析装置) (FT-IR)	原料の輸入大豆に混入していた黒色異物	・異物の表面及び切断面の様子が対照品に類似。 (表面が黒色で筋状の凹凸あり、弾力がなく硬い。切断面が黄褐色～茶褐色。) ・異物及び対照品の切断面に菌糸様物の集合した構造を確認。 ・異物のFT-IR及び蛍光X線スペクトルが対照品に類似。 (P,S,K及びCaを検出。)
その他: 有症	酢 (食堂内設置)	苦み、 胃の不快感	陰イオン界面活性剤 (HPLC)	食堂で使用していた酢及び洗剤	・苦情品から陰イオン界面活性剤検出。 ・苦情品のクロマトグラムは洗剤によく類似。

Data

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

Applicability of analytical method for pesticide residues in livestock products and fish using
gas chromatography / mass spectrometry
Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI, Masumi WAKI and Teruhisa FUJIMAKI 50

Analytical results of genetically modified foods in Kanagawa Prefecture (2009)
Kiyomi OHMORI, Aki HATTORI, Yasuhiro SAKAI,
Haruko SEKIDO, Yukiko TANAKA and Hiroko KISHI 53

Applicability of analytical method for pesticide residues in agricultural products
using liquid chromatography / tandem mass spectrometry
Masumi WAKI, Takeshi AKABOSHI, Shigemi KAI and Teruhisa FUJIMAKI 57

Execution condition of physics and chemistry inspection of complaint food (2009)
Yasuhiro SAKAI, Takeshi AKABOSHI, Kumiko SATO, Masumi WAKI,
Haruko SEKIDO, Kiyomi OHMORI, Maki MIYAZAWA, Shigemi KAI,
Hiroko KISHI, Takashi KOJIMA and Teruhisa FUJIMAKI 60

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

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

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health No.40 (September, 2010)

CONTENTS

Review

Application of neutron activation analysis for determination of elements
in field of public health science

Ikuyo Iijima 1

Short reports

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

Prevalence of *Giardia* infection in dogs

Takatsugu INADA, Ichiro FURUKAWA, Shinji IZUMIYAMA,
Yuki TOYA, Kazuhiko USUI and Toshiro KUROKI 11

Study of LAMP method in infections by enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Rieko SUZUKI, Youko YAMAMOTO, Yutaka NAGAI 14

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

Production of quality control samples and practice of quality control

Rieko SUZUKI, Youko YAMAMOTO, Yutaka NAGAI, Shuji SATOH 17

Analysis of patulin in apple juice using liquid chromatography / tandem mass spectrometry

Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI, Masumi WAKI and Teruhisa FUJIMAKI 21

Study of managing accuracy methods for detection of foods containing allergic substances - II

Quantification and Qualitation by using extraction buffer containing a surfactant

Hiroko WATANABE, Chie AKABOSHI, Kiyotaka SAITA,
Shigeki HASHIGUCHI, Haruko SEKIDO, Kenjiro WATABE, Kouki TANAKA 24

Surveillance study on the safety of living

Analysis of Methanol in Cosmetics by Headspace Gas Chromatography - Mass

Spectrometry using Standard Addition Method

Ayako MATSUZAKA, Kenichi KUMASAKA, Fumi NAKANO, Takashi KOJIMA 29

Data

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

Detection of tuberculosis infection using a whole blood interferon gamma assay in a contact
investigation in Kanagawa Prefecture (November, 2005 - March, 2010)

Chieko TAKAHASHI, Minori KONNAI, Hitomi OHYA,
Yoshimi DATE, Yuko WATANABE and Norio OKAZAKI 33

Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April, 2009 - March, 2010)

Ichiro Furukawa, Tomoe ISHIHARA and Toshiro KUROKI 36

Epidemic of pandemic influenza A (H1N1) 2009 in Kanagawa Prefecture

Sumi WATANABE, Takayuki SAITO, Makiko KONDO,
Takako SANO, Takashi KATAYAMA, Kayoko MIYAHARA, 39
Miki HARADA, Yumiko FURUYA and Norio OKAZAKI

Surveillance of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2009 ~ March, 2010)

Takashi KATAYAMA, Miki HARADA, Kayoko MIYAHARA and Yumiko FURUYA 43

Occurrence of Tsutsugamushi Disease in Kanagawa Prefecture (April, 2009 ~ March, 2010)

Takashi KATAYAMA and Yumiko FURUYA 46