

神奈川県衛生研究所研究報告

第46号（平成28年9月）

目 次

総説

感染症の監視と予防に関する調査研究

結核集団感染事例にみる分子疫学調査の必要性

高橋智恵子 ----- 1

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

添加物の分析

岸 弘子 ----- 7

短報

感染症の監視と予防に関する調査研究

感染性胃腸炎患者便からの薬剤耐性菌の検出状況

鈴木美雪, 古川一郎, 政岡智佳, 石原ともえ, 相川勝弘, 黒木俊郎 ----- 14

ふきとり検体におけるノロウイルスの検出について

鈴木理恵子, 高橋淳子, 金城恵子, 近藤真規子, 黒木俊郎 ----- 18

手足口病, ヘルパンギーナ患者の発生動向およびウイルスの検出動向に関する解析

佐野貴子, 篠崎聡子, 嘉手苺将, 伊達佳美, 渡邊寿美, 近藤真規子, 黒木俊郎 ----- 22

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

食品中のエチレンジアミン四酢酸およびその塩類の分析法について

関戸晴子, 田中由紀子, 岸弘子 ----- 27

薄層クロマトグラフィーを用いた健康食品等に含有されるシルデナフィル及びその類似成分等の分析条件の検討

熊坂謙一, 羽田千香子, 外館史祥, 甲斐茂美 ----- 32

資料

感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（平成27年度）

古川一郎, 政岡智佳, 石原ともえ, 相川勝弘, 黒木俊郎 ----- 37

神奈川県域におけるインフルエンザの流行状況（2015/2016シーズン）

渡邊寿美, 嘉手苺将, 佐野貴子, 近藤真規子, 黒木俊郎 ----- 41

感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成27年度）

鈴木理恵子, 金城恵子, 高橋淳子, 近藤真規子, 黒木俊郎 ----- 43

資料

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

神奈川県における過去 10 年間のアレルギーを含む食品の検査結果について（平成 18～27 年度）

秋山晴代，渡邊裕子，甲斐茂美，宮澤真紀 ----- 46

農産物中の残留農薬検査結果（平成 19 ～ 27 年度）

垣田雅史，日比和美，林 孝子，横溝 香，松阪綾子，佐藤久美子，仲野富美，
殿原真生子，中口幹雄，小澤まゆみ，丸山範明，大木良子，北出杏子，山崎直美 ----- 53

くらしの安全・安心に関する調査研究

神奈川県における第 4 回北朝鮮核実験に伴う放射能影響調査

山口千尋， 勝部貢治， 飯島育代， 辻清美， 仲野富美， 桑原千雅子， 上村仁 ----- 49

他誌掲載論文抄録（平成 27 年 4 月～平成 28 年 3 月） ----- 57



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所（平成 28 年度）

高 崎 智 彦	松 永 裕
梶 晴 美	中 村 廣 志
櫻 井 隆	高 橋 智恵子
黒 木 俊 郎	宮 澤 真 紀
山 崎 直 美	

神奈川県衛生研究所研究報告編集員（平成 28 年度）

櫻 井 隆（編集長）	関 口 達 也
田 坂 雅 子	鈴 木 美 雪
渡 邊 寿 美	林 孝 子
羽 田 千香子	松 阪 綾 子
渡 邊 裕 子（事務局）	

神奈川県衛生研究所研究報告第 46 号

平成 28 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	株式会社 シーケン 〒244-0842 横浜市栄区飯島町 1439 TEL 045-893-5171（代）

総説

結核集団感染事例にみる 分子疫学調査の必要性

高橋智恵子

The necessity of molecular epidemiological analysis on tuberculosis outbreaks

Chieko TAKAHASHI

Key Words：結核，分子疫学，VNTR法，QFT，集団感染

はじめに

結核はマラリア，エイズとともに世界三大感染症と呼ばれ，世界の3分の1の20-30億人が結核菌に感染し，960万人の患者が新たに発症し，150万人が命を失っている（2014年）¹⁾．日本の結核は明治時代から昭和20年代まで死亡原因の第1位であり，「不治の病」であった．しかし，抗生物質（ストレプトマイシン）やBCGワクチンの普及により死亡率は激減した．それでも未だに，罹患率（人口10万人当たりの結核新規登録患者数）が15.4人（2014年）²⁾と「中蔓延国」に分類されており，毎年約2万人（1日に54人）が新たに結核を発症し，3,000人あまり（1日に6人）が死亡している重要な感染症なのである．先進国の多くが10万人当たり10人以下の「低蔓延国」であり，2020年の東京五輪開催までに厚生労働省は低蔓延化を目指している（図1）．

日本の患者が減らない理由のひとつとして，若いときに結核に感染した人が高齢となり，免疫力が低下して発症することが挙げられる．現在，日本の結核患者の約60%が70歳以上である．神奈川県下では70歳以上の結核患者は50.2%（2014年）を占め10年前（31.5%）の1.6倍となっている．高齢者は典型的な症状が出なかったり認知症により発見が遅れることがある．また，都市部ではホームレスなどの生活困難者や対策が難しい外国人など社会的弱者に患者が多い状況となっている．

結核は結核菌が体内で増殖したことにより起こる細菌

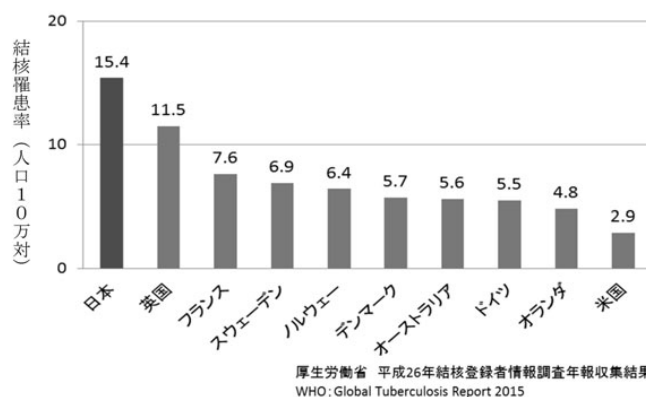


図1 先進国の結核罹患率（2014年）

感染症で，病巣部位により，肺結核，腸結核，腎結核となるが，結核患者の80%は肺結核が占めている．発症すると，風邪のような咳，痰，発熱，倦怠感などの症状が現れ，その症状が長く続くのが特徴である．体重減少，食欲減退が起こり，さらに進むと血痰が出る．

結核菌は1882年にロベルトコッホにより発見された．菌の大きさは $2\sim4\times0.3\sim0.6\mu\text{m}$ で，芽胞，鞭毛，荚膜はない．細胞壁にミコール酸などの脂質を多く含んでいるため，酸やアルカリに強く，その性質を利用した抗酸菌染色（チールネルゼン法）があり，結核菌は赤い糸くずのように染色される．痰を染色して顕微鏡下で菌が見つかる*と人に感染させる危険性があるので，入院することになり，顕微鏡下では見つからないが培養で痰から菌が検出された場合は通院で投薬治療となる．

*ガフキー号数（G）で表す：視野の中の菌数を数え，G0(0/300視野)～G9($\geq 10/1$ 視野)で表記される

結核の接触者健康診断

発症者の周囲で生活している人に対しては，その接触度合いにより結核の接触者健康診断（接触者健診）が実施される．接触者健診は発症者と接触度の高い（濃厚接触）集団にまず検査を行い，その集団の陽性率が高い場合は段階的に検査対象を広げていき，感染者を発見するように進められる．また，時間をおいて検査をするなど，漏れの無いように実施し，感染拡大防止に努めている．接触者健診により，新たな発症者及び見かけ上の臨床症状やX線画像に結核を疑う所見はみられないが結核に感染している状態（潜在性結核感染症）を早期に発見する．

潜在性結核感染症とは，Latent tuberculosis Infection (LTBI)を邦訳したもので，感染が成立したもののまだ発症には至っていない状態であり，最近の感染である場合は発症予防のため，1種類の薬を6～9ヶ月内服することが勧められている．

結核感染の有無を判定する方法には，インターフェロ

ン γ (IFN- γ) 遊離検査 (IGRA) がある。現在, IGRA には2つの方法があり, 1つは採血した血液をそのまま用いて結核菌特異抗原 (ESAT-6,CFP10,TB7.7) と混合し一晩反応後, 産生されたINF- γ 量を定量する方法 (クオンティフェロン-TBゴールド:QFT検査), もう1つは, 採血した血液から一定量のリンパ球を分離し結核菌特異抗原 (ESAT-6,CFP10) と混合し一晩反応後, IFN- γ を産生する細胞数をスポットとして数える方法 (T-スポット,TB:T-SPOT検査) である。

これらの検査はツベルクリン反応検査 (ツ反) と異なり, BCGワクチン接種や非結核性抗酸菌による影響を受けずに結核菌による感染の有無が判定できる。ただし, 現在の感染だけでなく過去の感染についてもとらえてしまっている。神奈川県衛生研究所 (当所) では2005年からQFT検査を実施しており, 2009年から2015年では検査数が増加傾向にある (表)。

表 QFT検査結果 (2009-2015年)

年	検査数	陽性	判定保留	陰性	判定不可
2009	261	22	13	226	0
2010	480	43	36	401	0
2011	776	91	81	600	4
2012	1156	126	95	930	5
2013	1151	99	100	944	8
2014	1546	161	142	1229	14
2015	1414	130	128	1150	6
計	6784 (100%)	672 (9.9%)	595 (8.8%)	5480 (80.8%)	37 (0.5%)

結核菌の分子疫学検査

感染源・感染経路の解明には, 菌検査, ツ反, QFT, 胸部X線所見などの臨床情報に加え, 実地疫学調査を用いて推定している。さらに, 結核菌の分子疫学研究の進展に伴い, 患者から分離した結核菌を遺伝子レベルで解析することにより結核菌の由来や感染経路をかなり正確に確認することができるようになった。

1993年にIS6110制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) 法³⁾が報告され, 遺伝子型別の標準分析法となった。しかし, この解析方法は手技が煩雑で時間がかかることに加え, 結果が画像データとなる。その短所を解決できたのが, 反復配列多型 (Variable numbers of tandem repeats: VNTR) 法⁴⁾である。これは, 結核菌ゲノム上にあるミニサテライト中の繰り返し配列数を算出する。手技も簡便・迅速で結果が数値化されるので, 他機関で解析したデータとの比較が容易となった。VNTR法に利用できる

解析領域は数十カ所が存在しており, どの領域を用いるかの検討がなされてきた。

当所においてはMIRU領域10カ所, ETR領域6カ所, 追加領域7カ所の計23カ所で取り組み始め, その後, 結核研究所が確立したJapan Anti-Tuberculosis Association(JATA)12⁵⁾に変更し, 必要に応じて追加領域の解析をしている。JATA12の解析領域は, Mtub04, MIRU10, Mtub21, Mtub24, QUB11b, VNTR2372, MIRU26, QUB15, ETR-E, VNTR3336, QUB26, VNTR4156の12カ所である。

結核集団感染事例

わが国における結核患者は減少傾向にはあるものの, 結核に対する免疫保有率が低下していることや非常に強い病原性を持つ株が存在していることから, 集団感染を起こし易くなっている。患者発生時において実施された接触者健診対象者の中から患者が発症すると, 同一結核菌による患者の発生かどうか確認するために, 患者から分離した結核菌の遺伝子型別を実施している。県域で発生した結核集団感染事例の概要, QFT検査および遺伝子型別結果を示す。

事例1 職場内感染

概要: 職場健診で50歳代男性がX線所見から精密検査を勧められたが, そのまま放置。症状が進み, 約1年後に受診し, 塗抹検査がガフキー(G)9となり, 結核と診断され入院。接触者健診は家族と職場同僚について実施。同僚は同じフロアで働く人を対象としたが, その後, 違うフロアで働く同僚が結核を発症し, さらに, 1ヶ月後に1名が発症。そこで, 職場同僚全員 (52名: 24~61歳) を対象とした接触者健診に拡大。この事例は患者2名, 感染者12名, 経過観察2名と国へ報告。

QFT検査: 初発患者の家族の結果は, 陽性1名, 判定保留2名。同僚の結果は, 陽性8名, 判定保留5名, 陰性39名。同僚においてはツ反も実施しQFT検査結果と比較したところ, ツ反最大径30mm以上を示した6名の中にQFT陽性は2名のみ。逆に, 他のQFT陽性者 (6名) のツ反の径は10~20mm。

遺伝子型別: 初発患者と発症者2名のうち1名の結核菌分離菌株について, VNTR法およびRFLP法による遺伝子型別を実施。VNTR法では, MIRU領域10カ所とETR領域6カ所に追加領域7カ所の計23領域の全てが一致し, RFLP法での解析パターンも一致。これらの結果から, 同一型と判定。

事例2 病院内感染

概要：県内のある病院の入院患者において、2004～2007年の4年間に6名の結核の届出。2008年5月には70歳代女性（G2）が発症し、同月に60歳代男性（G7）が発症。病院は院内感染を疑い対策委員会を設置し、入院患者（242名）および職員（182名）計424名を対象に接触者健診を実施。潜在性結核感染症は46名、経過観察は86名、要精検者は7名で、そのうち1名が発症。2004年に遡ると計9名の発症。

QFT検査：病院で実施した411名の結果は、陽性62名（入院患者38名、職員24名）、判定保留41名（入院患者27名、職員14名）、陰性300名、判定不可8名。

遺伝子型別：結核を発症した9名のうち、6名の結核菌分離菌株について、VNTR法およびRFLP法による遺伝子型別を実施。VNTR法の解析領域は23領域とJATA12の二つの方法を実施し比較したところ、二つの方法の各領域の繰り返し配列数は6株すべてが一致。一方、RFLP法での解析パターンは1株にバンド1本の違いが認められた。この違いは変異によるものと考えられ、同一型の結核菌による感染と判定。

事例3 病院内感染

概要：病院の入院患者60歳代男性（G5）が結核と診断され、続いて同じ病棟に入院する60歳代女性（G0）、70歳代女性（G0）も結核性胸膜炎と診断。そこで、同じ病棟の入院患者69名及び当該病棟に勤務する職員24名の合計93名に対して、X線検査を実施。経過観察となった入院患者70歳代女性が結核と診断され、その後も患者が発生し、最終的には発症14名、潜在性結核感染症15名と報告。

QFT検査：104名の結果は、陽性26名、判定保留6名、陰性72名。

遺伝子型別：結核を発症した14名のうち、9名の結核菌分離菌株について、JATA12領域を用いたVNTR法を実施。その結果、3つのパターン（6、2、1株）に分けられ、他と異なる1株のみのパターンを示した1名は20歳代の職員で入院患者との接触はなく、7領域が異なっていたことより、異なる型の結核菌による発症であり、感染源は別であると判断。6株と2株のパターンは1領域のみの違いで、疫学的な関係からもこの1領域は変異と考え、同一型の結核菌による感染と判定。

事例4 高齢者施設内感染

概要：特別養護老人ホームに入居していた80歳代の男性（G3）と80歳代の女性（G3）が同時期に結核を発症。職員等90名のうち48名の接触者健診を実施。その後、

接触者健診を受けた中から4名が発症し、対象外とされた50歳代の女性職員も結核と診断。この事例は発症8名、潜在性結核感染症27名と報告。

QFT検査：職員48名の結果は、陽性16名、判定保留8名、陰性24名。その後、陽性16名の中から4名が発症。

遺伝子型別：結核を発症した8名のうち、7名の結核菌分離菌株について、JATA12領域を用いたVNTR法を実施し、7株すべてが一致し、同一型と判定。

集団事例から見たこと

感染症法に基づく結核接触者健康診断の手引き（改訂第5版）⁶⁾では、IGRAは結核感染の有無の検査法として第一優先と位置づけされた。事例1⁷⁾ではツ反とQFT検査を実施し比較したところ、ツ反が強陽性を示してもQFTが陽性とは限らず、QFT陽性者のツ反の径の大きさにはかなりのばらつきがみられた。年齢が24～61歳と成人であったので、ツ反の大きさに関係なくQFT検査結果を優先させ、潜在性結核感染症として治療が行われた。

当所では、迅速・簡便な遺伝子型別法であるVNTR法を2004年から導入し、従来法のRFLP法と比較しながら、型別精度の向上を図ってきた⁸⁾。前述の結核感染事例においても遺伝子型別を行い、同一型と判定したことが、国への結核集団感染報告の根拠となっている。臨床情報と実地疫学調査に加えて、分子疫学調査の情報を加えることにより、より正確な集団感染の実像を確認することが可能となった。

事例2⁷⁾においては長期間にわたる患者の発生にもかかわらず菌株が確保できたことにより、同一型と確認することができた。当初は散発事例としていたが、院内での集団感染が解明された事例であった。

VNTR解析で領域のうち1か所でも反復数が異なると異なる遺伝子型とみなされるが、同一型株でも変異は偶発的に起こる。事例3において2つのパターン（6株、2株）の違いは1領域で1反復数の差であったが、疫学的に考慮し同一感染源と判定した。濃厚接触が疑われる事例にもかかわらずJATA12で不一致を示したときには、多変性を示す領域の追加解析及びRFLP法での確認も必要と考える。

事例2～4は、高齢者が多い集団であった。高齢者は結核の既感染率が高い上に免疫力が低下しているので、ひとたび患者が発生すると集団感染になるリスクが高くなる。集団感染を防ぐには患者の早期発見が重要となるので、症状の出にくい高齢者に対しては、細心の注意を払って観察することが必要である。

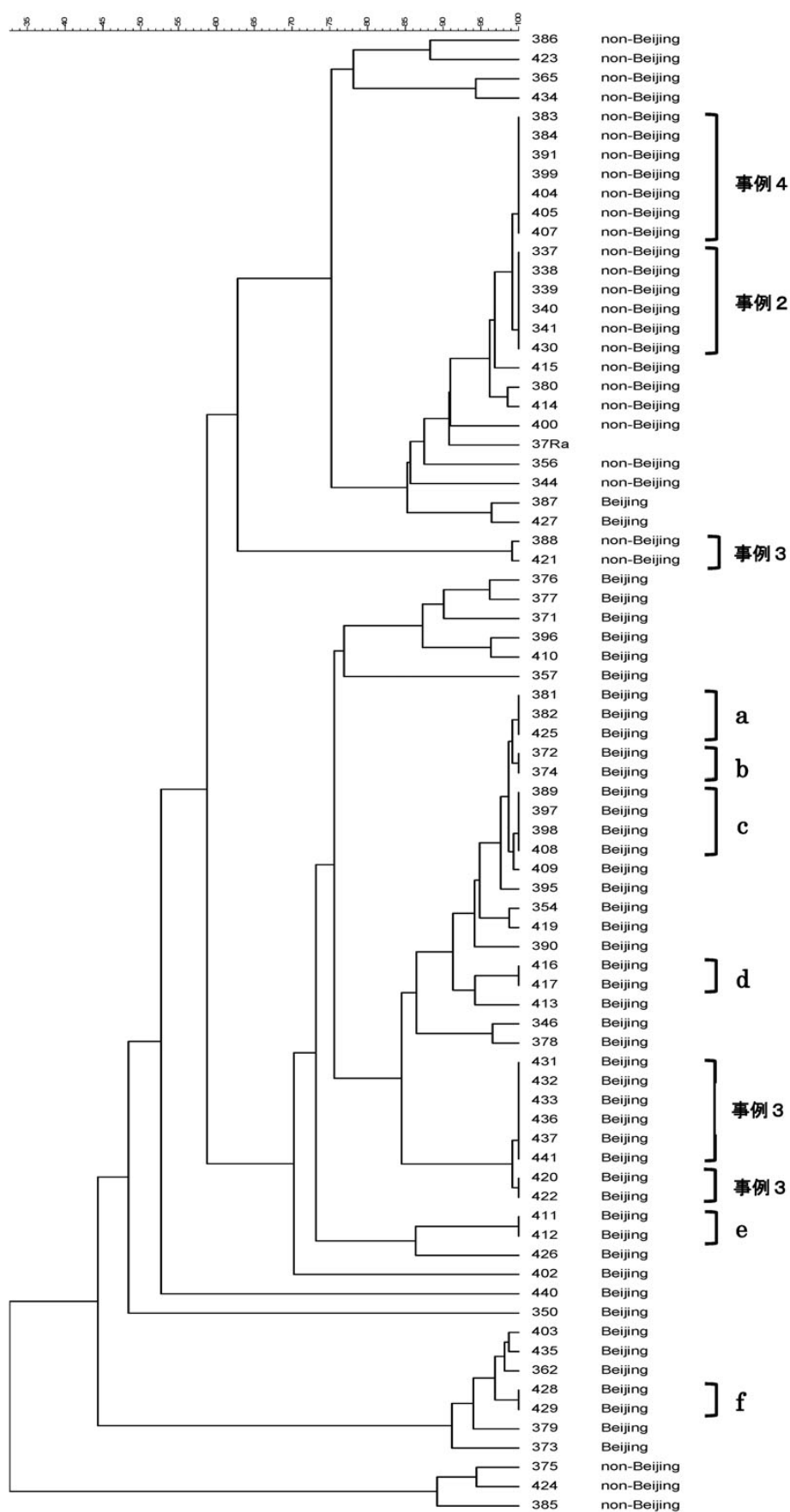


図 2 JATA12を用いたVNTR解析の結核菌樹形図 (77株)

結核菌分子疫学調査事業

2013年4月1日に神奈川県結核菌分子疫学調査事業実施要領⁹⁾が施行され、保健福祉事務所に登録された結核患者からの分離菌株調査が開始された。

遺伝子型別による結核菌分子疫学調査については、感染症法第15条に基づく調査の一環として、感染源・感染経路等の究明のために積極的に実施すべきと考える。その場合、患者の同意を得ることが検査を行うための必須条件ではないが、情報公開等の観点から、患者本人に説明しておくことが望ましいとされている。それには、患者との初回面接時に、服薬の重要性、接触者健診等の実施、個人情報取扱等に関する説明をするとともに、分子疫学調査を実施する可能性についても触れておくことで速やかに同意を得ることができると考えられる。

2008～2012年に当所で収集した77株について、JATA12を用いたVNTR解析をクラスター分析し、樹形図を作成した結果（図2）、51パターンに分けられた。

前述の集団感染事例は、事例2が6株で1つのパターン、事例3は6株、2株、1株の3つのパターンに分かれ（うち1株は異なる型と判定）、事例4が7株で1つのパターンであった。事例1はJATA12で解析していないのでこの樹形図には表していない。

その他に2株以上でクラスターを形成したのは、6つ（a～f）あった。そのうち、d、e、fは家族や職場など疫学的な関連が判明しているが、a、b、cはそれぞれの患者の居住地が離れているなど疫学上の共通点は見られなかった。aは2003～2004年にかけて首都圏で広く流行した株¹⁰⁾と同一型を示し、それらとの関連性が推察され、b、cについてもaと類似度が高く、近年の流行株であると考えられた。

東アジアで分離される結核菌の多くが特徴的な遺伝子型を示し、これに属する株はBeijing型株と名付けられた¹¹⁾。Beijing型かnon-Beijing型かの分類を77株について実施したところ、48株（62.3%）がBeijing型株であった（図2）。国内は70%程度がBeijing型株であると報告されている¹²⁾。Beijing型株は、感染力が強いとされており、前述のa、b、cがBeijing型株であったことから、接触機会が少なくても感染が拡大することが示唆された¹³⁾。

感染経路の解明や集団感染の把握には遺伝子型別検査は欠かすことはできず、結核分離菌株の確保が必要となる。ところが、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年法律第114号）の一部改正が平成18年にあり、病原体等の管理に係る制度が新たに創設され、医療機関・検査機関では菌株所持が難しくなり、短期間で菌株を処分するようになった。菌株から

は感染症対策に資する重要なデータを多く得られるため、地域分子疫学を進めるにはより多くの菌株を医療機関等より速やかに収集する体制づくりが重要となる。

今後は、解析した菌株データをさらに蓄積することで、地域における状況把握や疫学的関連が確認できない未知の例においての感染経路の解明、さらには、年次的に観察することで流行株の把握や薬剤耐性株の早期発見などへの応用が期待されている。

おわりに

結核集団感染が疑われた時には、結核感染の広がりや感染経路を迅速かつ正確に把握することが重要で、そのためには、衛生研究所は保健福祉事務所および健康危機管理課と密接な連携を取りながら、より効率的な接触者健診を進める必要がある。さらに、県内のみならず、自治体間での情報共有も図ることが求められている。

そして、低蔓延になったときこそ、分子疫学調査の体制を一層強化し、分離された結核菌全株について遺伝学的解析を実施し、感染経路の解明や株の由来を確実に把握することで、感染拡大などの結核対策に活用するべきと考える。

謝辞

稿を終えるにあたり、微生物部 細菌・環境生物グループとともに検査・研究に携わった皆様に深謝します。

参考文献

- 1) WHO : Global tuberculosis report 2015
- 2) 平成26年結核登録者情報調査年報集計結果（概況）
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou03/14.html>
- 3) Takahashi,M., Y.Kazumi, Y.Fukasawa, K.Hirano, T.Mori, W.Dale et al.: Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related Mycobacterium tuberculosis isolates, Microbiol. Immunol., **37**, 289-294(1993)
- 4) Forthingham,R., and W.A.,Meeker-O'Connell : Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats, Microbiology, **144**, 1189-1196 (1998)
- 5) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤 誠也 : 国内結核菌型別のための迅速、簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム, 結核, **83**, 673-678(2008)

- 6) 感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引き
(改訂第5版) : 厚生労働科学研究 (新興・再興感
染症研究事業) 「地域における効果的な結核対策の
強化に関する研究班」, 2014
- 7) 高橋智恵子, 近内美乃里, 大屋日登美, 渡辺祐子,
岡崎則男: 結核集団感染事例におけるクオンティフェ
ロンTB-2Gと結核分離菌株の遺伝子型別, 神奈川衛
研報告, **39**, 1-3(2009)
- 8) 高橋智恵子, 富岡敏昭, 綿貫祐司, 西森 敬, 岡崎
則男: VNTR法を利用した結核菌の遺伝子型別. 神
奈川県衛研報告, **36**, 4-7 (2006)
- 9) 健康危機管理課長通知: 神奈川県結核菌分子疫学調
査事業実施要領の策定について, 平成25年3月28日
- 10) Ohkado,A., Y.Murase, M.Mori, N.Hasegawa,
G.Otsuka and M.Nagamine : Transmission of
specific genotype streptomycin resistant strains
of M ycobacterium tuberculosis in the Tokyo
metropolitan area in Japan, BMC Infect.Dis.,
138, 1-9 (2009)
- 11) Van Soolingen D, et al.: Predominance of a
single genotype of Mycobacterium tuberculosis
in countries of east Asia. J Clin Microbiol,
33, 3234-3238 (1995)
- 12) 岩本明忠: 結核菌北京型ファミリーの集団遺伝学的
解析から推察される日本国内定着型遺伝系統群の存
在と遺伝系統別薬剤耐性化傾向の違い, 結核, **84**,
755-759 (2009)
- 13) 高橋智恵子, 近内美乃里, 古川一郎, 浅井良夫, 大
屋日登美, 黒木俊郎, 古屋由美子: 神奈川県にお
いて分離された結核菌のVNTR法による遺伝子型別
について, 神奈川衛研報告, **41**, 16-19(2011)

The necessity of molecular epidemiological analysis on tuberculosis outbreaks

Chieko TAKAHASHI

Four cases of tuberculosis(TB) outbreaks were reported here from 2004 to 2012. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis using VNTR(Variable numbers of tandem repeats) method is more simple and convenient than RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Our institute analyze genotype using VNTR,RFLP and so on as necessary. TB patients with matching genotypes share known epidemiologic linkages, the results provide good evidence that those patients were involved in the same chain of recent transmission.

Key Words : tuberculosis, molecular epidemiology,
VNTR method, QFT, outbreaks

総説

食品添加物の分析

岸弘子

Examination of food additives

Hiroko KISHI

Key Words：食品添加物，分析法，輸入食品

はじめに

我が国で食品添加物として使用できるものは、食品衛生法に基づき厚生労働大臣が指定したものに限られ、その規格と食品中の使用基準が定められている¹⁾。地方自治体や検査機関では、基準が守られているかの確認のために検査を行っている。検査結果は行政的判断の根拠として使用されるため、使用される分析法は、信頼性が高く、普遍的であることが求められる。また、新しい添加物の指定や分析技術の発展に伴い、分析法の開発、改良を行うことが必要である。

分析法の検討は国立医薬品食品衛生研究所を中心に、地方衛生研究所、登録検査機関、大学等が協力し継続して行われている。作成された分析法は「食品中の食品添加物分析法」として公表され、公定法として行政検査に使用されている。

神奈川県衛生研究所では、「食品中の食品添加物分析法」の検討班に参加する他に、食品衛生、環境衛生等の衛生化学的試験法を収載した「衛生試験法・注解」²⁾の食品添加物試験法委員会に参加している。また、日常の行政検査からも問題点を把握し、分析法の開発、改良を行っている。本稿では、食品添加物の規制及び当所でこれまでに行ってきた分析法の検討状況について紹介する。

食品添加物の規格試験及び製剤の分析

神奈川県では食品添加物の品質確保を目的に、平成21年度まで神奈川県内の食品添加物製造業による製品の検査を行っていた。食品添加物の成分規格は食品添加物公定書³⁾に収載されており、行政検査もこれに従って行う。

クエン酸の純度試験で製造時の副生物であるイソクエン酸の規格が設けられている。公定書（第8版）³⁾はろ紙クロマトグラフィーで分離、検出する方法であるが、標準品を用いない方法であるため検出下限の確認ができず、検査精度の確保が困難である。近年、一部の食品添加物の純度試験にHPLCが用いられており、有機酸はHPLCで高感度に分析可能であることから検討を行い、再現性良く分析する方法を作成した⁴⁾。食品添加物公定書は第9版の改正に向けて現在作業中であり、既存添加物の収載、問題点等の見直し、他規格との整合性を図るとの方針で検討されている。

当所では食品添加物単体以外に、食品添加物製剤の検査も行っていた。食品添加物製剤については、食品衛生法でその成分名称及び配合割合を表示することとされており、製剤が表示通りに正しく配合されているか確認することが必要である。表示と異なる成分であった場合には、期待される効果が得られない場合や、食品への使用基準を遵守できない恐れが生じる等の影響がある。食品添加物製剤はその使用目的に合わせ、多数の製品が流通し、その成分組成は多様であり、食品添加物単品のように規定された分析法はない。製剤には多種類の成分が配合されているため、製品毎に前処理法、共存物質の影響等を検討し、有機酸⁵⁾、酸化防止剤⁶⁾、単糖類および二糖類の分析法⁷⁾を作成した。神奈川県内で製造された製剤中の有機酸を測定したところ表示値と定量値の差が大きい製品があった⁵⁾。この製剤について製造過程の検体を採取し調査を行ったところ、同一ロット内でも検体採取場所により配合成分の割合が異なった。この製品は粉体を混合した製剤であり、配合成分の流動性が異なることにより、試料中で不均一になったと考えられた。そこで、製造方法の一部を変更したところ、均一な製品が得られるようになり、添加物製剤の品質向上に役立つことができた。

食品中の食品添加物の分析

1. 指定外添加物の分析

食品衛生法に基づき厚生労働大臣が定めた添加物以外には指定外添加物と呼ばれ、食品に使用することはできない。神奈川県衛生研究所の理化学部では、輸入食品の食品添加物の検査において、主に指定外添加物を検査対象としている。

指定外添加物には2種類あり、ひとつは原産国では食品添加物として使用されているが、日本で許可されていないものであり、安全性に問題はなくても、法規制の差

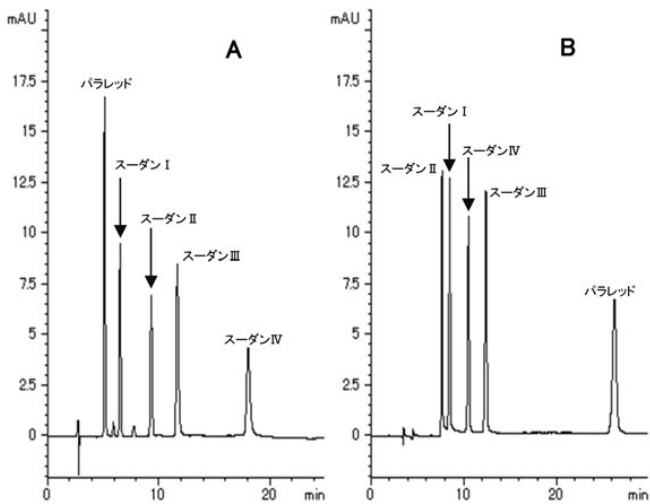


図 1 タバコ中のスーダン色素及びパラレッドのHPLCクロマトグラム 添加量：各5 μ g/g

(A) 逆相HPLC
カラム：Inertsil ODS-3V (4.6 mm i.d.×250 mm)
移動相：アセトニトリル/水混液(95:5) カラム温度：40℃
流速：1.0mL / min 測定波長：500 nm (350～600 nm)
注入量：50 μ L

(B) 順相HPLC
カラム：Inertsil SIL 100A (4.6 mm i.d.×250 mm)
移動相：ヘキサン/酢酸エチル混液(95:5) カラム温度：40℃
流速：1.0mL / min 測定波長：480 nm(350～600 nm)
注入量：20 μ L

により違反となる。原産国では食品添加物として使用されているが、日本では指定されていないため違反となる事例は、その食品を摂取しても健康には影響ない物質である。添加物の国際的な評価は、国際連合食糧農業機関（FAO）/世界保健機関（WHO）合同食品添加物専門家会議（JECFA）により行われている。もうひとつは、原産国でも食品添加物ではない工業用の物質を食品に不正に使用する場合である。ジエチレングリコールやメラミンが食品の品質をごまかすために使用された事例があり、健康被害を起こすこともある。

スーダン、パラレッドは工業用の油溶性赤色色素で食品への使用は認められていない。平成15年にフランスで唐辛子製品からスーダン I が検出され、その後、世界各地で検出事例が報告され^{8,9)}、食品中の分析法も報告されている^{10,11)}。我が国でも平成18年5月1日に、厚生

労働省から試験法が通知された¹²⁾。これを受け、当所で検査を行うために通知法を検討し、精製法等試験法の改良を行い¹³⁾、平成18年度から輸入食品の検査項目に加えることができた。

これまでの当所で検査により発見された違反事例を表1に示す。当所で検出された指定外添加物であるポリソルベート、TBHQ、サイクラミン酸はJECFAによる安全性評価が済みADIが設定されている物質で、多くの国で使用されている食品添加物である。なお、平成20年4月にポリソルベート20、60、65、80が食品添加物として指定されたため、現在ではポリソルベートが検出された場合、この4種で使用基準に適合していれば違反とはならない。

2. 国際汎用添加物

平成14年に食品添加物の指定制度の見直しが行われ、国際的に安全性評価が確立して広く使用されているものは、国際的な整合性を図る方向となり、必要性が高いと考えられる添加物については、企業からの要請がなくとも指定に向け国が主体的に検討することになった¹⁴⁾。45

表 2 平成27年9月までに指定された国際汎用添加物	
添加物名	用途
亜酸化窒素	製造用剤
アルギン酸塩類(3品目)	糊料
ステアリン酸カルシウム	強化剤、製造用剤
ナタマイシン	チーズの表面処理剤
ヒドロキシピルセース	製造用剤
レーアスコルビン酸カルシウム	酸化防止剤
ケイ酸カルシウム	固結防止剤
ポリソルベート 20	乳化剤
ポリソルベート 60	乳化剤
ポリソルベート 65	乳化剤
ポリソルベート 80	乳化剤
水酸化マグネシウム	食品製造用
加エデンプン(11品目)	食品製造用
ナイシン	保存料
ステアロイル乳酸ナトリウム	乳化剤
ソルビン酸カルシウム	保存料
レーグルタミン酸アモニウム	調味料
ケイ酸マグネシウム	ろ過助剤
リン酸一水素マグネシウム (リン酸二マグネシウム)	強化剤
サッカリンカルシウム	甘味料
乳酸カリウム	調味料、酸味料、pH調整剤
硫酸カリウム	食塩代替品
酸化カルシウム	pH調整剤、製造用剤
酢酸カルシウム	保存料、安定剤、pH調整剤
イソプロパノール	溶剤
β -アポー-8'-カロテナール	着色剤
ポリビニルピロドン	賦形剤、安定剤
カンタキサンチン	着色剤
クエン酸三エチル	乳化剤、安定香料

表 1 輸入食品の検査で発見された違反事例			
検査年度	検出添加物	食品	原産国
平成13年	ポリソルベート(乳化剤)	レトルトカレー	タイ
平成14年	ポリソルベート(乳化剤)	コチュジャン	韓国
平成17年	TBHQ(酸化防止剤)	クラッカー、ビスケット	ブラジル
	サイクラミン酸(甘味料)	ヌクナム(魚醤)	ベトナム
平成18年	TBHQ(酸化防止剤)	アンチョビー	アルゼンチン
平成24年	TBHQ(酸化防止剤)	カレールー	インド

品目について検討が行われ、平成27年9月までに41品目が指定されている（表2）。

ポリソルベート類は乳化剤として広く使用されており、日本では平成20年4月にポリソルベート20、60、65、80が食品添加物として指定された¹⁵⁾。それ以前は指定外添加物だったため違反事例が多数報告されていた。当所でも平成13年度にタイ産のレトルトカレー、平成14年度に韓国製のコチュジャンからポリソルベートが検出された。また、ポリソルベートは食品添加物として指定された4種類以外に40、85も知られている。40、85は指定外であるため食品には使用できず、平成20年4月以降は、検出された場合に種類の特定が必要となった。

ポリソルベートは理論上の構造式は示されているが混合物であり、食品中からの定性、定量が困難な物質である。定量には比色法が用いられるが、ポリソルベートの種類、メーカーにより発色の強度が異なる¹⁶⁾。表3に吸光度の比較を示した。食品中に使用されているポリソルベートは由来は特定できないため、同じポリソルベートを標準品として使用することはできない。検査する場合には、標準品として選択したポリソルベートによって定量値が異なる恐れがある。

平成20年4月30日に新規指定された際に、各食品に使用基準が定められ¹⁵⁾、分析法も通知された¹⁷⁾。使用基準はポリソルベート80として設定され、定量の標準品として使用するポリソルベートについても定められた。これにより統一された基準での定量が可能となった。この分析法は川崎らの薄相クロマトグラフィーによる定性、比色法による定量¹⁸⁾と建部らのLC/MSによる確認¹⁹⁾を基礎データとしている。当所では、行政検査を行うため、分析法の検討を行った。LC/MSの確認では、構成脂肪酸の種類と結合数が異なる分子種の混合物であるため、混合標準液ではなく、6種類の標準溶液を各々測定しなければならない。通知に示された分析条件では測定に長時間かかり、当所の装置では検出感度も十分ではなかった。そこで、LC/MS法の検討を行い、LC/TOFMSを用いた確認法を確立し、測定時間の短縮と検出感度の向上が可能となった²⁰⁾。

3. 分析法の改良

日常の行政検査に使用している分析法の中にも問題点があり、改良が必要なものがある。また、分析装置、器具等の進歩に伴って分析法を変更する必要もあり、これらの検討を行い改良試験法の提案を行い、検査に生かしている。

保存料は、ソルビン酸、安息香酸、デヒドロ酢酸及びパラオキシ安息香酸（PHBA）エステル類が代表的な物

表3 ポリソルベート(PS)の試薬メーカー別吸光度比較

	メーカー名	試薬	
		ドラージェンドルフ	チオシアン酸コバルト
PS20	A	0.623	0.430
	K	0.494	0.442
	T	0.600	0.430
	W	0.550	0.434
PS40	K	0.502	0.399
	S	0.594	0.409
	T	0.542	0.427
	W	0.470	0.406
PS60	K	0.534	0.401
	N1	0.671	0.430
	N2	0.664	0.415
	S	0.635	0.411
	T	0.688	0.435
	W	0.536	0.407
PS65	S	0.198	0.273
	W	0.165	0.281
PS80	A	0.826	0.410
	K	0.740	0.404
	T	0.753	0.413
	W	0.772	0.396
PS85	A	0.202	0.258
	K	0.185	0.246
	T	0.224	0.223
	W	0.164	0.234

A：アルドリッチ，S：シグマ，K：関東化学，

T：東京化成，W：和光純薬工業，

N：国立医薬品食品衛生研究所分与品

質であり、食品衛生検査機関で検査をする機会が多い。使用される分析法は水蒸気蒸留後にHPLCで定量する方法が汎用されている^{2,21)}。しかし、高タンパク質食品や高脂肪食品の場合、保存料の回収率が悪いという欠点があった²²⁾。そこで試料をメタノールで抽出し、固相抽出による精製後にHPLCで測定する方法を作成し、回収率の向上を図ることができた²³⁾。表4に作成した方法による回収率を示した。現在の通知法²⁴⁾では、試料の採取量を50gから5gに変更することにより回収率の向上を図り、PHBAエステル類の高タンパク食品及び高脂肪食品に対しては溶媒抽出法すなわちメタノールで抽出し、固相抽出による精製を行う方法が収載されている。

甘味料はサッカリンやアスパルテームに加え、近年、スクラロース、アドバンテーム、ネオテーム等の高甘度甘味料が開発され、キシリトール等の糖アルコールやカンゾウ、ステビア等の天然甘味料も使用されている。甘

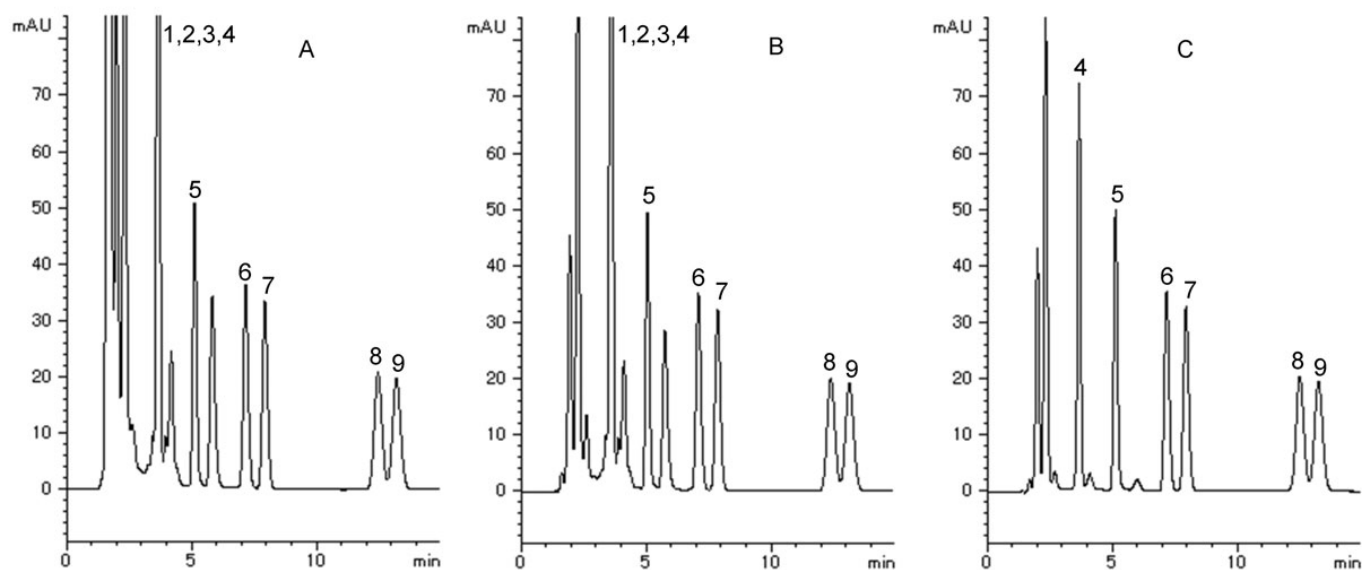


図2 みそ中の保存料のHPLCクロマトグラム 添加量：各0.10g/kg

A：カートリッジ未処理； B：Oasis HLBカートリッジ処理； C：Oasis HLB, Bond Elut PSA処理

1; 安息香酸, 2; ソルビン酸, 3; デヒドロ酢酸, 4; PHBA-メチル, 5; PHBA-エチル, 6; PHBA-イソブチル, 7; PHBA-プロピル, 8; PHBA-イソブチル, 9; PHBA-ブチル

HPLC測定条件： カラム：Inertsil ODS-3V (4.6 mm i.d.×150 mm)

移動相：メタノール/ 5 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH4.0) (6:4) カラム温度：40℃

流速：1.0mL / min 測定波長：254 nm (350～600 nm) 注入量：10 μL

表4 食品からのパラオキシ安息香酸エステル類の回収率

食品	添加量 (g/kg)	回収率 (%) [*]					
		PHBA-メチル	PHBA-エチル	PHBA-イソブチル	PHBA-プロピル	PHBA-イソブチル	PHBA-ブチル
マヨネーズ	0.01	96.0±0.5	97.3±0.9	96.5±1.2	96.9±1.2	96.1±1.0	96.4±0.9
	0.10	98.5±0.2	97.7±1.5	98.6±1.3	98.2±1.4	97.6±1.3	97.6±1.3
チーズ	0.01	92.8±1.0	92.4±1.1	97.1±5.6	95.7±5.8	95.6±6.9	93.5±5.1
	0.10	94.2±1.5	94.3±1.2	95.1±1.2	94.7±1.6	94.0±0.9	94.2±1.0
みそ	0.01	92.5±0.3	98.9±0.2	104.6±0.4	94.5±0.5	95.2±1.3	96.5±3.0
	0.10	96.8±0.8	100.7±0.8	99.8±0.8	98.6±0.8	98.5±1.1	98.3±1.0
かまぼこ	0.01	95.5±0.7	95.3±0.6	95.8±0.8	95.7±0.7	95.7±0.8	95.9±1.0
	0.10	97.7±1.0	97.7±0.9	97.9±0.7	97.8±0.6	97.4±0.7	97.3±0.6
ハム	0.01	92.4±1.5	96.9±2.3	95.2±3.5	101.7±6.8	94.1±6.7	93.3±4.8
	0.10	97.1±2.2	94.1±2.1	94.5±1.8	94.6±1.9	93.7±2.1	93.8±1.9
クリームウエハース	0.01	96.6±2.2	98.4±2.3	96.2±2.9	97.3±4.6	101.1±1.6	99.0±2.2
	0.10	97.6±0.1	99.7±0.7	99.1±0.2	99.0±0.2	100.6±0.8	100.1±0.2

^{*}平均±S.D. n=3

味料は多様な性質の物が含まれ、様々な前処理法、測定法が報告されており、測定対象物質によって適切に選択する必要がある²⁾。

スクラロースは平成11年に指定された甘味料で、ショ糖の600倍の甘味度を有する。他の高甘味度甘味料との併用や、不快な味のマスキング効果を目的として使用されるため、食品に低濃度で使用される場合もある。紫外外部吸収を持たない物質であるため、示差屈折検出器やパルスドアンペロメトリー検出器を用いる方法^{25,26)}が報告

されている。しかし、示差屈折検出器は検出感度が低く、低濃度の測定には適さず、一方、検出感度の高いパルスドアンペロメトリー検出器は高価であり、検査機関が通常所有している装置ではない等の欠点がある。そこで汎用性のある装置を使用する方法として、紫外外部吸収を有する誘導体にする方法²⁷⁾、LC/MS/MSを用いる方法^{28,29)}が報告されている。

多種類の甘味料を効率よく分析するには、LC/MSを使用した一斉分析法が有効と考えられ、アドバンテーム

等の高甘味度甘味料の分析には必須である³⁰⁾。甘味料が使用される食品、使用濃度は多様であり、食品に応じた抽出、精製法の検討、各甘味料の使用濃度を考慮した分析が検討課題となっている。

着色料は世界中で広く食品に使用され、国によって許可されている種類が異なるため、輸入食品での違反事例が多い³¹⁾。食品に使用される主な合成着色料である酸性タール色素の日常検査は薄相クロマトグラフィー及びHPLCが用いられている³²⁾。しかし、酸性タール色素は種類が多く、主成分以外の付随色素や食品中で生成された分解物が含まれる可能性もある。そのため、HPLCの分離、フォトダイオードアレイ検出器による吸収スペクトルの確認だけでは定性確認が不十分となる場合がある。特に基準違反が疑われる場合はさらに確実に同定を行うことが求められる。

当所では、行政検査を実施している酸性タール色素について、指定色素12種及び指定外色素5種（アゾルビン、グリーンS、オレンジII、パテントブルーV、キノリンイエロー）のLC/MSを使用した確認方法を作成した³³⁾。キノリンイエローは、スルホン酸基の数が異なる異性体の混合物であり、製品によってその割合が異なるため、HPLCクロマトグラムのピーク数、面積比が異なった。モノスルホン化体とジスルホン化体由来のMSスペクトルを確認に使用することが有効であった。以前に当所でキノリンイエローが検出されたりキニリンを分析したところ、MSスペクトルによる確認を行うことができた。

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は漂白剤や酸化防止剤として使用され、その食品中の二酸化硫黄としての残存量で規制されている。この検査法は、アルカリ滴定法と比色法が一般的であるが³⁴⁾、酢酸等の揮発性の酸の影響や定量範囲が狭い等の問題がある。そこで、紫外吸収検出器と電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフィーについて検討し、揮発性有機酸等の影響が少なく、定量範囲の広い分析法を確立した³⁵⁾。

プロピレングリコール（PG）は品質保持剤として生めん、ギョウザの皮等に使用され、チューインガム軟化剤としても使用される。従来はパックドカラムのGC法³⁶⁾が用いられてきたが、分析装置の進歩によりキャピラリーカラムを用いたGC及びGC/MSによる方法に変化してきた^{2,37,38)}。これらのメタノール抽出による試料液の調製法では、一部のチューインガムで妨害成分によりPGの測定が困難なことが判明した。抽出精製法を検討し、試料を希釈メタノールで抽出することにより、食品由来の妨害成分の影響を受けずに分析する方法³⁹⁾を確立した。抽出溶媒で比較したクロマトグラムを図3に示す。

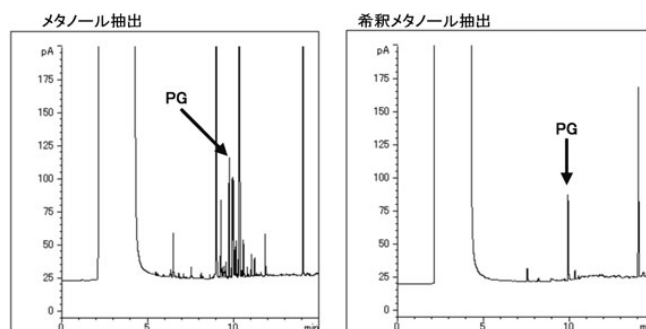


図3 チューインガムの抽出溶媒による差(FID-GC)
添加量：0.1%

装置：Agilent 6890 カラム：SUPELLOWAX10 0.25mm i.d. ×30m, 膜厚0.25 μm
カラム温度：60℃(2分)→(15℃/分)→200℃ 注入口温度：220℃
検出器温度：250℃ カラム流量：He 1mL/min
注入量：1 μL(スプリットレス)

おわりに

近年、食品の流通は広範囲となり様々な食品が輸入され、各国の食品衛生の状況が異なることから、日本の規制に適合しない食品や、安全性に問題がある食品が流通する可能性が増加している。また、次々と新しい商品が開発され、食品添加物の使用方法が多様になってきた。基準に適しているか否かを判定するために行政検査を行うが、食品添加物の分析は、加工食品を対象とするため製品毎に成分のマトリックスが異なり、広範囲の食品に適用できる分析法の開発が求められている。分析法は法規制の変更や、流通する食品の変化に対応できるように、常に開発改良を続けなければならない。今後も当所では行政検査を精度良く効率的に実施できるように、分析法の開発、改良等で食品衛生に貢献して行くことが必要である。

文献

- 1) 厚生労働省：食品添加物ホームページ
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuten/index.html>
- 2) 日本薬学会：衛生試験法・注解2015, pp.329-406, 金原出版株式会社, 東京 (2015)
- 3) 谷村顕雄：第8版食品添加物公定書解説書 廣川書店, 東京 (2007)
- 4) 岸弘子, 川名清子：食品添加物クエン酸中のイソクエン酸の分析法, 食品衛生学雑誌, 42, 45-47(2001)
- 5) 岸弘子, 川名清子, 谷孝之：食品添加物製剤中の有機酸の分析, 神奈川衛研報告, 28, 43-46 (1998)
- 6) 山田利治, 川名清子：食品添加物製剤の主成分分析-

- 酸化防止剤-, 神奈川衛研報告, 31, 100-102 (2001)
- 7) 山田利治: 食品添加物製剤中の単糖類および二糖類の分析, 神奈川衛研報告, 32, 82-84 (2002)
- 8) 四方田千佳子: 唐辛子製品中の違反色素Sudan, 食品衛生学雑誌, 45, J-22-230(2004)
- 9) 伊藤澄夫: スーダンレッドの違反事例について, 食品衛生学雑誌, 47, J-273-275(2006)
- 10) 中里光男, 粕谷陽子, 松本ひろ子, 安田和夫: 唐辛子を使用した加工食品中のスダン I 及びその同族体の分析, 東京都健康安全研究センター研究年報, 55, 107-110 (2004)
- 11) 天川映子, 萩原勉, 都田路子, 永山敏寛: TLC及びHPLCによるオイスターソース中のスダン色素の分析, 東京都健康安全研究センター研究年報, 56, 141-144 (2005)
- 12) 「食品中のスーダン色素およびパラレッドの試験法について」(食安監発第0501007号, 平成18年5月1日付)
- 13) 岸弘子: 輸入食品中の着色料, スーダン, パラレッドの分析, 神奈川衛研報告, 37, 31-34 (2007)
- 14) 厚生労働省: 国産汎用添加物の指定
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/enkou_iryuu/shokuhin/syokuten/hanyo/index.html>
- 15) 厚生労働省医薬食品局安全部長通知「食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件について」(食安発第0430001号, 平成20年4月30日)
- 16) 岸弘子: 食品中の乳化剤, ポリソルベートの分析, 神奈川衛研報告, 38, 26-29 (2008)
- 17) 厚生労働省医薬食品局安全部基準審査課長通知「食品中の食品添加物分析法」の改正について(食安基発第0430001号, 平成20年4月30日)
- 18) 川崎裕美, 建部千絵, 高木繁行, 川崎有記, 原貴彦, 飯塚太由ほか: 食品中のポリソルベートの分析, 日本食品化学学会誌, 15, 122-128 (2008)
- 19) 建部千絵, 川崎裕美, 杉本直樹, 佐藤恭子, 棚元憲一: LC/MSによるポリソルベート類の分析, 日本食品化学学会誌, 15, 129-134 (2008)
- 20) 関戸晴子, 田中由紀子, 清水碧, 岸弘子: ポリソルベート分析における飛行時間型高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC/TOFMS)を用いた確認法の検討, 神奈川衛研報告, 44, 15-19 (2014)
- 21) 厚生労働省監修 食品衛生検査指針・食品添加物編 2003, 東京, 日本食品衛生協会, 2003, pp.12-15
- 22) 関戸晴子, 山崎直美, 藤本玲子, 市川晴貴, 須賀顕子: 精度管理における保存料検査の問題点, 神奈川衛研報告, 37, 38-40 (2007)
- 23) 岸弘子, 山田利治: HPLCによる食品中の9種保存料の一斉分析, 食品衛生学雑誌, 48, 58-63 (2007)
- 24) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知: 528第3号(平成22年5月28日)
- 25) 岸弘子, 川名清子: イオン交換クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーによる食品中のスクラロースの分析, 食品衛生学雑誌, 42, 133-138 (2001)
- 26) 小林千種, 中里光男, 山嶋裕季子, 大野郁子, 河野美幸, 安田和夫: HPLCによる食品中のスクラロースの分析法, 食品衛生学雑誌, 42, 139-143 (2001)
- 27) 石井達三, 武井伸一: 紫外吸収誘導体化による食品中のスクラロースのHPLC分析, 埼玉県衛研所報 39, 137-140 (2005)
- 28) 畑野和広, 中尾朱美: LC/MS/MSによる食品中のスクラロースの測定, 食品衛生学雑誌 43, 267-272 (2002)
- 29) 大橋正孝, 田中健, 大前壽子, 森居京美, 安村浩平, 北田善三: LC/MS/MSによる食品中のスクラロースの分析, 奈良県保健環境研究センター年報, 38, 95-96 (2003)
- 30) 小林美紀, 寺田久屋, 中島正博: HPLCおよびLC-MS/MSによる加工食品中の超高甘味度甘味料アロバンテーム定量法, 食品衛生学雑誌, 56, 14-18 (2015)
- 31) 厚生労働省: 違反事例
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html>
- 32) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針 食品添加物編 2003, pp.169-199, 日本食品衛生協会, 東京 (2003)
- 33) 関戸晴子, 岸弘子: 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた食品中の合成着色料の分析, 神奈川衛研報告, 38, 35-38 (2008)
- 34) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針 食品添加物編 2003, pp.100-109, 日本食品衛生協会, 東京 (2003)
- 35) 関戸晴子, 田中由紀子, 酒井康宏, 岸弘子, 藤巻照久: イオンクロマトグラフを用いた食品中の亜硫酸分析, 神奈川衛研報告, 41, 24-37 (2010)

- 36) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編
2003, pp519-524 日本食品衛生協会, 東京
(2003)
- 37) 森谷昌幸, 関根百合子, 今西龍馬, 戸羽智子, 米田
真知子, 小野寺みゆきほか：食品添加物一日摂取量
調査－加工食品中の品質保持剤（プロピレングリコー
ル）について－, 仙台市衛生研究所報, **34**, 78-
83(2004)
- 38) 大橋正孝, 米田正樹, 素輪善典：食品中のプロピレ
ングリコールの分析, 奈良県保健環境研究センター
年報, **39**, 79-80 (2004)
- 39) 岸弘子, 関戸晴子：チューインガム中の品質保持剤,
プロピレングリコールの分析, 神奈川衛研報告, **37**,
35-37 (2007)

Examination of food additives

Hiroko KISHI

The examinations of food additives are carried out to confirm whether the Japanese national regulatory standards were complied in Japan. Kanagawa Prefectural Institute of Public Health evaluated those methods on componential analyses and specification tests of food additives and also evaluated the analysis methods on colorant, emulsifiers, preservatives and sweeteners etc. According to the evaluations, some analytical methods were improved.

Key Words : food additives, analytical method,
imported foods

短報

感染性胃腸炎患者便からの
薬剤耐性菌の検出状況

鈴木美雪, 古川一郎, 政岡智佳, 石原ともえ,
相川勝弘, 黒木俊郎

Detection of drug-resistant bacteria
from stools of patients with
infectious gastroenteritis

Miyuki SUZUKI, Ichiro FURUKAWA,
Tomoka MASAOKA, Tomoe ISHIHARA,
Katsuhiro AIKAWA and Toshiro KUROKI

1 はじめに

近年, 細菌性疾患の治療で多用されるセフェム系抗生物質が効かなくなる薬剤耐性菌の出現が問題となっている. 基質特異性拡張型βラクタマーゼ (extended spectrum β-lactamase: 以下, ESBL) は, それまで感受性を示していた菌に主に第三世代, 第四世代セフェム系薬剤耐性を発現させる酵素であり, AmpC型β-ラクタマーゼ (以下, AmpC) は, 感受性菌に主に第二世代, 第三世代セフェム系薬剤耐性を発現させる酵素である¹⁾. ESBL産生菌及びAmpC産生菌は, 腸内細菌等のグラム陰性桿菌に認められ, ESBL及びAmpC関連耐性遺伝子の多くはプラスミド上に存在し²⁾, 菌種を超えて伝達されるため, 市中における蔓延が懸念されている¹⁻⁴⁾.

そこで本稿では, ESBL産生菌及びAmpC産生菌の保有実態及びこれら薬剤耐性菌の耐性遺伝子の保有状況を調査するため, 神奈川県内の医療機関を受診した感染性胃腸炎患者便よりESBL産生菌及びAmpC産生菌を分離し, その耐性遺伝子の保有状況を調査したので報告する.

2 材料及び方法

2013年4月から2016年3月までに, 神奈川県内の小児科1医療機関を受診し, 感染性胃腸炎と診断された患者便288検体を対象とした.

神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

(1) 薬剤耐性菌の検出

薬剤耐性菌のスクリーニングとして, マッコンキー培地 (栄研化学) にセフトキシム (CTX) (SIGMA) を4 mg/Lになるように添加した培地⁵⁾, 及びマッコンキー培地にセフトジジム (CAZ) (SIGMA) を2mg/Lになるように添加した培地⁶⁾に, 緩衝ペプトン水 (Oxoid) にて36℃で18時間増菌培養した患者便を一白金耳塗抹し, 36℃で18時間培養後, 発育した集落を鈎菌し, 生化学的性状試験により菌種を同定した. 分離した耐性菌について, 感受性試験用ディスクCTX (BD) を用い, CLSI (米国臨床検査標準協会)⁷⁾法に準拠した薬剤感受性試験を実施した. 阻止円直径 (mm) が≤23mmであった菌株について, AmpC/ESBL鑑別ディスク (関東化学) を用い, ESBL産生菌及びAmpC産生菌の確認試験を行った.

(2) PCR法による遺伝子の検出

分離した菌をアルカリ熱抽出 (25mM NaOH溶液100 μLに懸濁, 100℃, 10分間加熱) し, 1M Tris-HCl (pH8.0) 8 μLを添加して, 14,000rpmで10分間遠心した上清をDNAテンプレートとし, Taqポリメラーゼ (TaKaRa Taq Hot Start Version (タカラバイオ)) を使用し, 各種耐性因子を対象としたPCRを実施した. ESBL産生菌の5種類の耐性因子TEM, SHV, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 groupの増幅には表1の各プライマー⁸⁾を用い, 94℃で5分後, 94℃で1分, 53℃で1分, 72℃で1分30秒を30回繰り返した後, 72℃で7分間の反応を行った. AmpC産生菌の6種類

表1 ESBLの耐性因子増幅用プライマーの塩基配列			
耐性因子	プライマー名	塩基配列 (5'→3')	増幅サイズ (bp)
TEM	T1	CCG TGT CGC CCT TAT TCC	824bp
	T2	AGG CAC CTA TCT CAG CGA	
SHV	S1	ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC	1,051bp
	S2	TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC	
CTX-M-1 group	M1	CGG TGC TGA AGA AAA GTG	354bp
	M2	TAC CCA GCG TCA GAT TAC	
CTX-M-2 group	Th1-1	ACG CTA CCC CTG CTA TTT	780bp
	Th1-2	CCT TTC CGC CTT CTG CTC	
CTX-M-9 group	Th2-1	GCA GAT AAT ACG CAG GTG	393bp
	Th2-2	CGC CGT GGT GGT GTC TCT	

表2 AmpC型βラクタマーゼの耐性因子増幅用プライマーの塩基配列			
耐性因子	プライマー名	塩基配列 (5'→3')	増幅サイズ (bp)
MOX	MOXMF	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520bp
	MOXMR	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	
CIT	CITMF	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462bp
	CITMR	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	
DHA	DHAMF	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405bp
	DHAMR	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	
ACC	ACCMF	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346bp
	ACCMR	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	
ACT	EBCMF	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302bp
	EBCMR	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	
FOX	FOXMF	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190bp
	FOXMR	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	

の耐性因子MOX, CIT, DHA, ACC, ACT, FOXの増幅には表2の各プライマー⁹⁾を用い、94℃で3分後、94℃で30秒、64℃で30秒、72℃で1分を30回繰り返した後、72℃で7分間の反応を行った。

3 結果

288検体のうち61検体 (21.2%) からESBL産生菌及びAmpC産生菌が検出され、うち5検体からは2菌種の耐性菌が検出され、計8菌種 (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*), 66株が分離された。

ESBL産生菌は3菌種42株検出され、そのうちESBL及びAmpCの両方を産生する*E.coli*が2株あった (表3, 4)。ESBL産生菌42株のうち、40株 (95.2%) は*E.coli*であり、そのうちCTX-M-9グループ保有*E.coli*が35株 (CTX-M-1グループ及びTEM型を同時に保有していた株を含む) と最も多く、87.5%を占めた。その他、CTX-M-1グループ保有*C.amalonaticus*が1株、CTX-M-2グループ保有*P.mirabilis*がそれぞれ1株ずつ検出され、SHV型は検出されなかった (表3)。

AmpC産生菌は6菌種26株 (このうち*E.coli* 2株はESBL産生菌の耐性因子も保有) が検出された (表3, 4)。保有する耐性因子はCIT型が最も多く11株 (42.3%)、次いでDHA型が5株、ACT型とACC型がそれぞれ1株から検出されたが、MOX型及びFOX型は検出されなかった。また、8株からは6種類の耐性因子のいずれも検出されなかった (表4)。

4 考察

ESBL産生菌及びAmpC産生菌による薬剤耐性は、抗生物質による治療に影響を及ぼすため、世界的に問題となっており、院内感染だけでなく、市中における蔓延も懸念されている^{1,3)}。我々は、神奈川県域の医療機関を受診した感染症胃腸炎患者便よりESBL産生菌及びAmpC産生菌を分離し、耐性因子の保有状況を調査した。

ESBL産生遺伝子は、プラスミドにコードされており、菌種を超えて拡散する^{5,6,10)}。本調査で検出されたESBL産生菌は95.2%が*E.coli*であり、そのうちCTX-M-9グループ保有株が87.5%と半数以上を占めており、既報の結果と一致していた¹¹⁾。以前、欧米ではTEM型やSHV型が主流であったが、近年、CTX-M型が増加している^{1,3)}。本調査では異なる複数のESBLの耐性因子を保有している株、さらに、日本では珍しいとされていた^{12,13)}ESBLとAmpCの両方を保有している株も検出されており、今後、

表3 ESBL産生菌の耐性因子保有状況

菌種	耐性因子	株数
<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-1	4
	CTX-M-1, CTX-M-9	1
	CTX-M-1, TEM	1
	CTX-M-9	27 ^{*1}
	CTX-M-9, TEM	7 ^{*2}
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	CTX-M-1	1
<i>Proteus mirabilis</i>	CTX-M-2	1
計		42

*1 1株はCIT型も検出

*2 1株はAmpC型β-ラクタマーゼも検出

表4 AmpC産生菌の耐性因子保有状況

菌種	耐性因子	株数
<i>Escherichia coli</i>	CIT	3 ^{*2}
	DHA	2
	ND ^{*1}	2 ^{*3}
<i>Enterobacter cloacae</i>	ACT	1
	ND	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ND	1
<i>Citrobacter freundii</i>	CIT	8
<i>Morganella morganii</i>	DHA	3
<i>Hafnia alvei</i>	ACC	1
計		26

*1 ND:不検出

*2 1株はCTX-M-9も検出

*3 1株はCTX-M-9 及び TEMも検出

耐性因子を複数獲得した菌種が増加した場合、多剤耐性化が進み、使用できる薬剤が限定される可能性が考えられる。そのため、耐性因子の保有状況を調査し、国内のESBL産生菌の動向を把握し、迅速に対応できる体制を構築することが今後の課題として挙げられた。

AmpCは染色体性とプラスミド性のものがあり、プラスミド性AmpCの遺伝子は、染色体上に存在する*ampC*遺伝子がプラスミドに転移したと考えられている^{4,9,14)}。本調査で検出された6菌種は、染色体上に*ampC*遺伝子を持つとされ、*Enterobacter*属 (ACT型の由来)、*C.frendii* (CIT型の由来)、*M.morganii* (DHA型の由来)、*H.alvei* (ACC型の由来) は、セファマイシン系薬剤等の使用により、AmpC産生量が増加すると、耐性を示すようになる誘導型である^{4,15)}。また、*E.coli*は抗生

物質の使用にかかわらず、常にAmpCを産生している構成型であり、通常その産生量は低いが、*ampC*遺伝子の変異により、AmpCを大量に産生することがある^{4,9,16)}。誘導型AmpC保有菌種由来の耐性遺伝子が、プラスミドを介して他菌種へ伝達された報告があることから¹⁷⁾、本調査で検出された*E.cloacae*, *C.freundii*, *M.morganii*, *Halvei*の耐性因子は他菌種へ伝達される可能性がある。これら誘導型AmpCの耐性因子がプラスミドに転移し、拡散するのを防ぐために、これら菌種に対しては、セフェム系薬剤の使用を避けることが望ましいと考える。また、構成型AmpCを保有する*E.coli*において、プラスミド媒介の耐性因子が国内で検出された報告があり、CIT型が多数検出されている¹³⁾。本調査において検出されたAmpC産生 *E.coli* では、CIT型とDHA型が検出されており、これら耐性因子が他菌種から伝達された可能性が示唆された。国内におけるプラスミド性AmpCの分布に関する情報は少ないが^{1,4,13)}、世界ではCIT型が主流とされており^{4,14)}、今後もその動向に注目し、継続して調査することが重要であると考ええる。

今回の調査の結果、神奈川県内の医療機関を受診した感染性胃腸炎患者便から耐性菌が21.1%と高率に検出され、ESBL産生菌及びAmpC産生菌が確認されたことから、その原因について調査する必要がある。ESBL産生菌及びAmpC産生菌がどのように拡散していくのかは明らかになっていないが、食肉や環境からもESBL産生菌及びAmpC産生菌を分離した報告があり、耐性菌が食品や環境を汚染していること、畜産農場等における抗菌薬の使用等が耐性菌の拡大に関与している可能性が挙げられている²⁾。引き続きESBL産生菌及びAmpC産生菌の分布状況を監視するとともに、これら耐性菌の耐性遺伝子の由来及び環境中の汚染源を合わせて調査することにより、適切な薬剤選択だけでなく、これら耐性菌の拡大抑制にもつながると考える。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、多大なご協力をいただきましたかみやま小児科クリニックの神山務先生、神山明美先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 石井良和:基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌,AmpC型β-ラクタマーゼ産生菌,メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌,臨床と微生物, **36**, 615-622 (2009)
- 2) 白井優, 田村豊:ESBL/AmpC産生菌の環境からヒトへの伝播, 臨床と微生物, **42**, 361-366 (2015)

- 3) R. Canton, T.M. Coque: The CTX-M β-lactamase pandemic, Curr. Opin. Microbiol., **9**, 466-475 (2006)
- 4) 山崎勝利, 小松方:AmpC型βラクタマーゼ過剰産生菌, 臨床と微生物, **40**, 225-231 (2013)
- 5) A. Manzur, F. Tubau, M. Pujol, L. Calatayud, M.A. Dominguez, C. Pena et al.: Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit, J. Clin. Microbiol., **45**, 2365-2369 (2007)
- 6) C.H.P.M. Silva: Elaboration and evaluation of a new screening medium for detection and presumptive identification of extended-spectrum β-lactamase-producing organisms (ESBL), Braz. J. Microbiol., **31**, 271-274 (2000)
- 7) 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)
- 8) 畠山薫, 奥野ルミ, 遠藤美代子, 柳川義勢:集団下痢症事例由来ヒト糞便からのバンコマイシン耐性腸球菌および基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生菌の検出の試み, 東京健安研セ年報, **57**, 69-72 (2006)
- 9) F.J. Perez-Perez, N.D. Hanson: Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR, J. Clin. Microbiol., **40**, 2153-2162 (2002)
- 10) 宮崎博章:ESBL産生菌, 臨床と微生物, **40**, 213-218 (2013)
- 11) S. Suzuki, N. Shibata, K. Yamane, J. Wachino, K. Ito, Y. Arakawa : Change in the prevalence of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread, J. Antimicrob. Chemother., **63**, 72-79 (2009)
- 12) Y. Matsumura, M. Nagao, M. Iguchi, T. Yagi, T. Komori, N. Fujita et al.: Molecular and clinical characterization of plasmid-mediated AmpC β-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteraemia: a comparison with extended-spectrum β-lactamase-producing and non-resistant *E. coli* bacteraemia, Clin. Microbiol. Infect., **19**, 161-168 (2013)
- 13) K. Yamasaki, M. Komatsu, N. Abe, S. Fukuda, Y.

- Miyamoto, T. Higuchi et al. : Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the Kinki region of Japan, *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 3267-3273 (2010)
- 14) A. Philippon, G. Arlet, G. A. Jacoby: Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **46**, 1-11 (2002)
- 15) C. Jacobs, L. Huang, E. Bartowsky, S. Normark, J.T. Park: Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β -lactamase induction, *EMBO. J.*, **13**, 4684-4694 (1994)
- 16) E.C. Nelson, B.G. Elisha: Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **43**, 957-959 (1999)
- 17) N. Fortineau, L. Poirel, P. Nordmann: Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **47**, 207-210 (2001)

短報

ふきとり検体におけるノロウイルスの検出について

鈴木理恵子, 高橋淳子, 金城恵子, 近藤真規子,
黒木俊郎

Detection of Norovirus in environmental swab samples

Rieko SUZUKI, Junko TAKAHASHI,
Keiko KINJO, Makiko KONDO
and Toshiro KUROKI

はじめに

ノロウイルスによる食中毒事例は、近年、ノロウイルスに汚染された二枚貝を原因とする事例よりも、調理従事者を介して汚染された食品による事例が多い傾向にある。調理従事者を介した食品汚染を疑う場合には、施設環境等の汚染状況を調査する目的で、施設内のふきとり検査を実施することがあるが、ふきとり方法や処理方法が確立されておらず、ふきとり検体からのウイルス検出は難しい状況にある。2015年3月に食品衛生検査指針微生物編¹⁾が改訂され、はじめて食中毒発生時におけるウイルス用ふきとり検体の採取法および検査法が示されたが、操作が複雑なため緊急検査への導入が困難である。そこで、簡便で効率的なふきとり及び処理方法を検討するため、指針で示された方法と従来から当所で実施している方法との比較を行った。

材料および方法

ノロウイルスGⅠおよびGⅡの陽性検体を用いて添加回収用検体を作製し、ふきとり方法とその回収率の検討を行った。

1. ふきとり検体

ノロウイルスGⅠ (9.0×10^3 コピー/100 μ l) およびノロウイルスGⅡ (8.9×10^3 コピー/100 μ l) 混合液を原液とし10段階希釈系列を作製した。原液から1,000倍までの4段階の希釈液100 μ lを滅菌ステンレスバット10 $\times$ 10cm²区画に塗布後、乾燥させ模擬汚染区画(以下、

汚染区画とする)とし、ウイルス濃度別回収率について検討した。

また、同様に原液100 μ lを塗布し、20 $\times$ 20 cm², 30 $\times$ 30 cm²の汚染区画を作製し、ふきとり範囲について検討した。汚染区画は希釈系列、ふきとり範囲ごとに各3検体を作製し、測定を実施した。

2. ふきとり方法

汚染区画それぞれについて、下記の3つのふきとり方法を実施した(図1)。

1) A法(食品衛生検査指針に記載された方法)

滅菌カット綿(5 $\times$ 5cm 1枚)にPBS(-) 2mlを添加し、裏返したサンプルバック(滅菌袋)に手を入れてカット綿を持ち、汚染区画を縦と横に2回ふきとった。同じ場所をもう1枚の滅菌カット綿で拭き上げ、2枚をサンプルバックに入れ検体とした。

2) B法(食品衛生検査指針に記載された方法)

細菌検査用ふきとり検査キット(ふきふきチェック: 栄研化学)を用い、汚染区画をキット添付の綿棒で縦と横に2回ふきとり、キット容器に綿棒を戻し検体とした。

3) C法(当所で実施している方法)

B法と同様に、細菌検査用ふきとり検査キットを用い、汚染区画をキット添付の綿棒で縦と横に2回ふきとった後、キット容器内の緩衝液を捨て、容器内に綿棒を戻し検体とした。

3. ふきとり検体の処理方法

ふきとり検体の処理を図1に従い実施した。

1) A法

サンプルバックにPBS(-) 8mlを添加しもみほぐした後、添加したPBS(-)を50ml遠沈管に回収した。サンプルバックにさらにPBS(-) 10mlを添加し、同様の操作を行った。遠沈管に回収した液にPBS(-)を添加し、20mlになるように調整した。得られた溶液についてポリエチレングリコール濃縮を次のように実施した。2.5% Beef Extract加PBS(-)5ml, ポリエチレングリコール6000 3g, NaCl 1.45gを添加溶解後、4 $^{\circ}$ Cに一晩放置した。10,000rpm 4 $^{\circ}$ C 20分遠心後、上清を取り除き、沈渣をSDS-Tris Glycine緩衝液200 μ lに再溶解し、全量を核酸抽出材料とした。

2) B法

容器内の綿棒と緩衝液をよく混和し、緩衝液を50ml遠沈管に回収した。さらに容器内にPBS(-)10mlを添加し綿棒とよく混和し、遠沈管に回収後、PBS(-)で20mlにメスアップした。A法と同様にポリエチレングリコール濃縮を実施した。

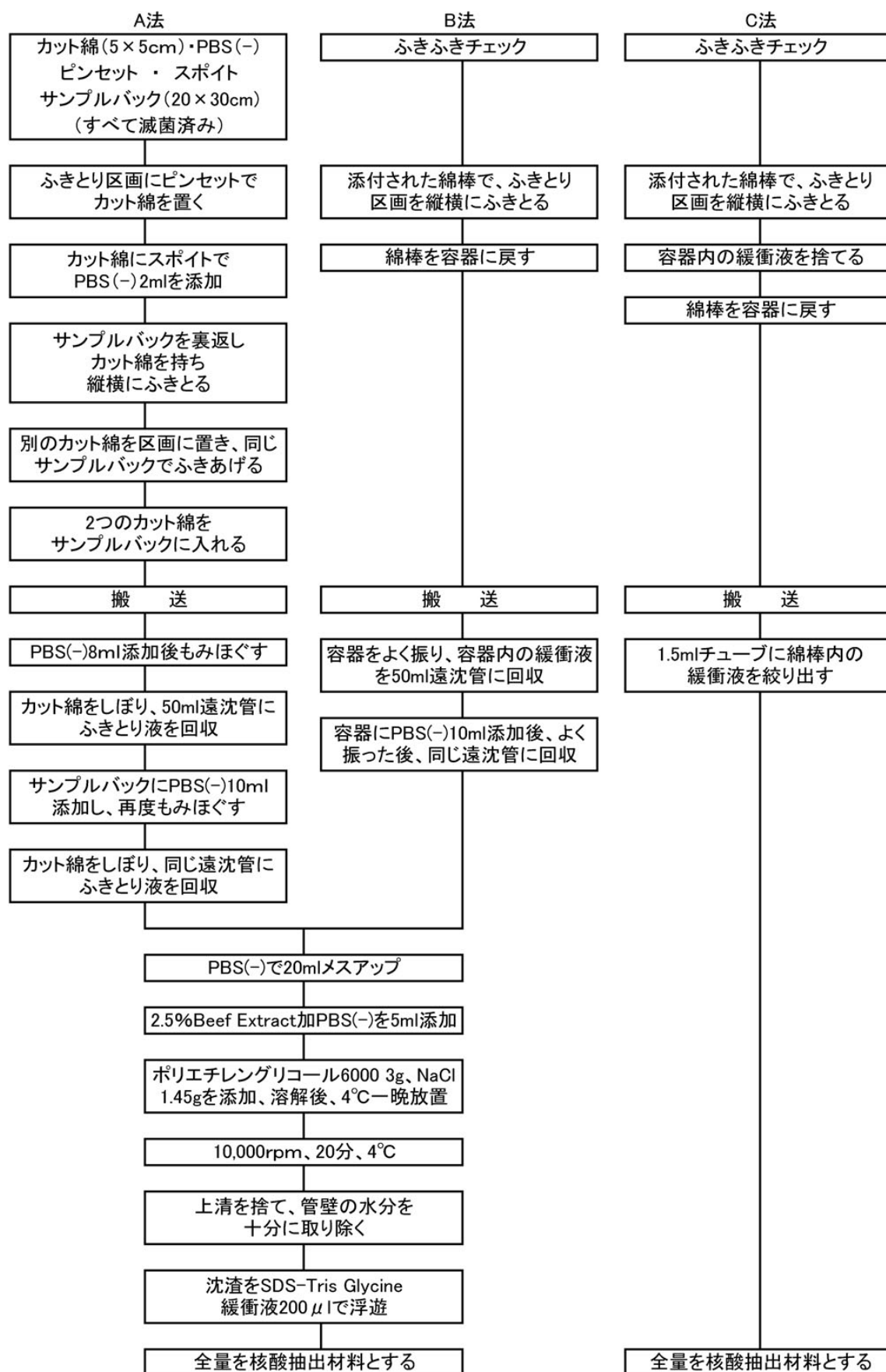


図1 ふきとり方法および検体の処理

表 1 ふきとり方法別のノロウイルスG I・G IIコピー数と回収率

方法		G I				G II			
		Control*	A 法	B 法	C 法	Control*	A 法	B 法	C 法
希釈倍率	原液	9000	4300 (47.8)	1733 (19.3)	3200 (35.6)	8933	3400 (38.1)	1933 (21.6)	2833 (31.7)
	10倍	2267	527 (23.2)	357 (15.7)	760 (33.5)	1057	407 (38.5)	427 (40.4)	737 (69.7)
	100倍	150	110 (73.3)	107 (71.3)	72 (48.0)	87	56 (64.4)	76 (87.4)	84 (96.6)
	1000倍	14	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	11	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)

*：模擬検体作製に使用したノロウイルス混合液100 μ lをControlとして測定上段：各汚染区画 (n=3) の平均コピー数 下段：回収率 (%) , ふきとり面積10 $\times$ 10cm²

表 2 検体別ウイルス検出状況

方法		G I				G II			
		Control*	A 法	B 法	C 法	Control*	A 法	B 法	C 法
ふきとり面積	100cm ²	9000	4300 (47.8)	1733 (19.3)	3200 (35.6)	8933	3400 (38.1)	1933 (21.6)	2833 (31.7)
	400cm ²		1103 (12.3)	1057 (11.7)	2300 (25.6)		1350 (15.1)	963 (10.8)	1733 (19.4)
	900cm ²		1650 (18.3)	583 (6.5)	2650 (29.4)		1733 (19.4)	360 (4.0)	2067 (23.1)

*：模擬検体作製に使用したノロウイルス混合液100 μ lをControlとして測定

上段：各汚染区画 (n=3) の平均コピー数 下段：回収率 (%)

3) C 法

綿棒に含まれる緩衝液を1.5mlエッペンドルフチューブ内に絞り出し、全量を核酸抽出材料とした。

4. ノロウイルス検出法

「ノロウイルスの検査法について」食安監発第0514004号(平成19年5月14日)²⁾に準じ、ノロウイルス遺伝子検出を行った。ウイルスRNAの抽出には、市販のウイルスRNA抽出キット(QIAamp Viral RNA mini kit, QIAGEN)を用いた。抽出RNA24 μ lに、DNase処理液6 μ l(RNase Free dH₂O 2.6 μ l, 5 $\times$ SSII Buffer 3.0 μ l, DNase I (5U/ μ l)0.4 μ l)を添加し、37 $^{\circ}$ C 30分, 75 $^{\circ}$ C 5分反応させDNase処理を行った。DNase処理後のRNA液15 μ lに、RT処理液15 μ l(RNase Free dH₂O 3.25 μ l, 5 $\times$ SSII Buffer 4.5 μ l, 10mM dNTPs 1.5 μ l, Random Primer(invitrogen) (1.0 μ g/ μ l) 0.75 μ l, 100mM DTT 1.5 μ l, RNase inhibitor (Applied Biosystems) (20U/ μ l) 2.0 μ l, Super Script II RT(invitrogen) (200U/ μ l) 1.5 μ l)を添加し、42 $^{\circ}$ C 60分, 99 $^{\circ}$ C 5分反応させcDNAを作製した。リアルタイムPCRのG I, G II各々の反応液量を1チューブ当たり20 μ lとし、各検体につ

き2ウェルを測定した。反応試薬は、G Iプライマー(COG1F, COG1R 各100pmol/ μ l), G Iプローブ(RING1-TPa, RIHG1-TPb 各4pmol/ μ l), G IIプライマー(COG2F, COG2R 各100pmol/ μ l), G IIプローブ(RING2-plateAL-TP 4pmol/ μ l), TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems)を混合し、cDNAまたはコントロールDNAを2 μ l添加した。リアルタイムPCR反応条件は、50 $^{\circ}$ C 2分, 95 $^{\circ}$ C 10分1cycle, 95 $^{\circ}$ C 15秒, 56 $^{\circ}$ C 1分45cyclesとした。「ノロウイルスの検査法について」に従い、2ウェルともに実測値10コピー以上をノロウイルス陽性と判定した。

結果および考察

ふきとり方法別にノロウイルスG IおよびG IIの3回測定の平均コピー数と回収率を表1に示した。ウイルス原液, 10倍および100倍希釈ウイルス液添加後の回収率は、G IはA法で23.2%~73.3%, B法で15.7%~71.3%, C法で33.5%~48.0%, G IIはA法で38.1%~64.4%, B法で21.6%~87.4%, C法で31.7%~96.6%であった。G IおよびG IIは1,000倍希釈では3方法とも検出限界値以下であり、検出感度は10~100コピー/100 μ l程度であると考えられる。回収率は、3方法と

もに100倍希釈が最も高かった。原液および10倍希釈の回収率が低い要因として、ノロウイルス混合液に含まれる夾雑物の影響が考えられ、今後は精製したノロウイルス混合液による検討を行う必要がある。

汚染区画10×10cm²、20×20 cm²、30×30 cm²をふき取った検体の測定値及び回収率を表2に示した。G IおよびG IIは3方法とも、ふき取り面積10×10cm²の回収率が最も高く、ふきとり面積が大きくなると回収率が減少する傾向にあった。

ふきとり採取器材を比較すると、A法は試薬が自家調製であることや、使用期限の設定等の問題の他、現場での操作に熟練が必要であり導入が困難である。B法とC法は市販品であるため必要に応じて購入でき、使用期限内の品質は保証されており、現場での操作も簡便である。A法とB法は検出感度を確保するため濃縮作業が必要であるが、C法は濃縮操作が不要である。ふき取り面積10×10cm²における希釈段階ごとの回収率をみると、3方法で大きな差は認められなかった。他機関で行ったふきとり方法の検討でも、カット綿と綿棒での回収率に、大きな差は認められていない³⁾。また、細菌検査用ふきとりキット内の緩衝液量は10mlよりも1mlの方が回収率が高い⁴⁾との報告もある。検体の濃縮方法には、50,000回転2時間による超遠心分離濃縮法がよく用いられ、その回収率は、58.7%から85.7%であると報告されている⁵⁾。しかし、超遠心分離機による濃縮は特別な機器を要し、処理数の制約を受けることから、今回の検討では、比較的簡便なポリエチレングリコール濃縮法を用いた。回収率は検体希釈倍数により異なり、超遠心濃縮法より低い値を示す検体もあったが、ポリエチレングリコール濃縮法でも、ふきとり検体中に10~100コピー/100μl程度のノロウイルスが存在する場合、検出が可能であった。

ふきとり検査で採取面積を拡大することは、回収率の低下に繋がることが今回の結果で示された。市販の細菌検査用ふきとりキットの適切な採取面積は10×10cm²であり、広範囲にふきとる場合には、採取場所を適切な面

積に区画し、複数の容器で採取する等の工夫が必要である。

2015年3月に食品衛生検査指針 微生物編により、初めて食中毒発生時のふきとり検体の検査方法が示された。食品衛生検査指針に示されたA法、B法と当所で従来から採用している方法であるC法を比較した。細菌検査用ふきとりキットを用いて、面積10×10cm²をふきとり、容器内の緩衝液を捨てた容器に採取後の綿棒を入れ搬送、検体処理を行うC法が、準備、採取、処理工程、処理時間ともに簡便で良好な結果が得られることが確認できた。このことから、今後もC法で検体処理を行うことにより、食中毒発生時には迅速で信頼性の高い結果を提供が可能となり、食中毒事例調査に貢献することが期待できる。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、多大なご協力を頂きました保健福祉事務所職員の皆様に深謝いたします。

本研究の一部は、平成27年度神奈川県公衆衛生協会調査研究助成金を受けて実施しました。

文 献

- 1) 公益社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針 微生物編 2015, pp.607-622, 東京(2015)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全監視安全課長通知：食安監発第0514004号（平成19年5月14日）「ノロウイルスの検出法について」
- 3) 溝口嘉範, 木田浩二, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男ほか：ふきとり検体のノロウイルス検査法の改良, 病原体検出情報(IASR), **32**, 358-359 (2011)
- 4) 上村晃秀, 濱田まどか, 御供田睦代, 吉國謙一郎, 蓑田祥子ほか：食中毒原因食品からのノロウイルス遺伝子検出法の確立（第Ⅱ法）, 鹿児島県環境保健センター所報, **12**, 65-67 (2011)
- 5) 東京都健康安全センター：「ノロウイルス対策緊急タスクフォース」最終報告, pp.30, (2010)

短報

手足口病、ヘルパンギーナ患者の 発生動向およびウイルスの検出動向 に関する解析

佐野貴子¹, 篠崎聡子^{2*}, 嘉手苅将¹, 伊達佳美¹,
渡邊寿美¹, 近藤真規子¹, 黒木俊郎¹

Sentinel surveillance and virus detection trends of hand, foot and mouth disease and herpangina cases in Kanagawa Prefecture

Takako SANO, Satoko SHINOZAKI,
Sho KADEKARU, Yoshimi DATE,
Sumi WATANABE, Makiko KONDO
and Toshiro KUROKI

はじめに

手足口病およびヘルパンギーナは、乳幼児を中心に夏季に流行するウイルス性疾患である。手足口病、ヘルパンギーナともに、年によって流行するウイルスが入れ替わり、流行規模にも違いが見られることが分かっている。手足口病は口腔粘膜および手や足などに現れる水疱性発疹を主症状とし、コクサッキーウイルスA16型 (CV-A16) またはエンテロウイルス71型 (EV-A71) が主な原因ウイルスとされてきたが、2011年にはこれまでヘルパンギーナの原因ウイルスの一つとされてきたコクサッキーウイルスA6型 (CV-A6) による手足口病の大流行が発生した¹⁻³⁾。ヘルパンギーナは口腔粘膜に現れる水疱性発疹と発熱を特徴とする急性ウイルス性咽頭炎であり、コクサッキーウイルスA2型 (CV-A2), A4型 (CV-A4), A5型 (CV-A5), CV-A6, A10型 (CV-A10) 等の感染によるものが多い⁴⁾。

今回、神奈川県域 (横浜市、川崎市、相模原市、横須賀市および藤沢市を除く：以下、県域と略) における

2012～2015年の4年間の手足口病およびヘルパンギーナ患者の発生動向と患者検体から検出されたウイルス株について解析を行ったので報告する。

方 法

1 患者発生動向調査

神奈川県感染症情報センターにおいて「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」に基づいて行われている感染症発生動向調査のうち、五類定点把握疾患として定点医療機関から報告された手足口病およびヘルパンギーナ患者数を「定点当たり患者報告数」として週別に集計したデータを用いた。それらのデータから2012～2015年の流行状況の解析を行った。

2 ウイルス分離・同定

県域の小児科病原体定点医療機関から得られた手足口病およびヘルパンギーナ患者の咽頭ぬぐい液について、2012～2014年はRD-A, HEp-2, VeroおよびVeroE6, 2015年はRD-A, A549, VeroおよびVeroE6の各4種類の培養細胞を用いて3代継代培養を行い、細胞変性効果を示したのものについて同定を行った。同定法としては各ウイルスに対する中和用抗血清を用いた中和反応あるいは直接蛍光抗体法を実施した。A群コクサッキーウイルスは培養細胞での分離困難例が多いことから、一部の検体については哺乳マウスを用いたウイルス分離を実施し、免疫腹水を用いた補体結合反応による同定を行った。また、咽頭ぬぐい液から遺伝子増幅法 (PCR) を用いて、直接ウイルスゲノムの検出を行った。エンテロウイルス属、ライノウイルス属の同定については、5'NTR-VP4部分領域を標的としたP3 (1st), P4 (2nd) /P5⁵⁾あるいはVP4-VP2部分領域を標的とした60-80F (1st), EVP4 (2nd) /OL68-71R⁶⁾のプライマーセットを用いてRT-seminested PCRを行った。また、VP4領域において同定不能であった検体については、VP1部分領域を標的とした187, 188, 189/011⁷⁾のプライマーセットを用いたRT-PCR法あるいはCODEHOP VP1 RT-snPCR法⁸⁾を用いて同定を行った。細胞分離株において中和試験で同定不能となったパレコウイルス属株については、VP3/VP1部分領域を標的としたRT-nested PCR法を実施した⁹⁾。PCR産物は1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線下で増幅バンドの有無を確認した。増幅バンドが見られたPCR産物については、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、米国生物工学情報センター (NCBI) が提供する塩基配列データベース (GenBank) に登録されている遺伝子配列との相同性検索を行い、塩基、アミノ酸配列とも最も高い一致度を示す標準株の血清型に

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
sano.ipn@pref.kanagawa.jp

2 神奈川県衛生研究所 企画情報部
神奈川県感染症情報センター

* 現 精神保健福祉センター

に基づき同定を行った。また、CV-A6で遺伝子解析が可能であった株については、VP1部分領域の369bpを用いて、2007～2011年に検出されたCV-A6株とともに系統解析を行った。遺伝距離はkimura-2-parameter法を用いて推定し、ブートストラップサンプリングを1,000回行い、近隣結合法にて系統樹を作成した。解析にはMEGA version 6 ソフトウェア¹⁰⁾を使用した。

結果および考察

1 手足口病、ヘルパンギーナ患者の発生動向

2012～2015年の県域における手足口病患者の定点当たり患者報告数（以下、定点当たり報告数と略）の週別推移を図1に、ヘルパンギーナ患者の定点当たり報告数の週別推移を図2に示した。

手足口病では、警報レベルの開始基準値である定点当たり報告数5を超えていた年は、2013年と2015年の2年で、定点あたり報告数のピーク値は、2013年は10.65（第30週）、2015年は12.74（第31週）であった。これらは、2003～2011年のピーク値（1.51-9.10）³⁾と比較しても過去最高値となった。CV-A6による流行が起きた2011年のピーク値は7.57（第31週）であり³⁾、2011年から1年おきに流行が発生しており、且つ流行規模が拡大傾向にあることから、今後の動向には注意が必要である。ヘルパンギーナでは、警報レベルである定点当たり

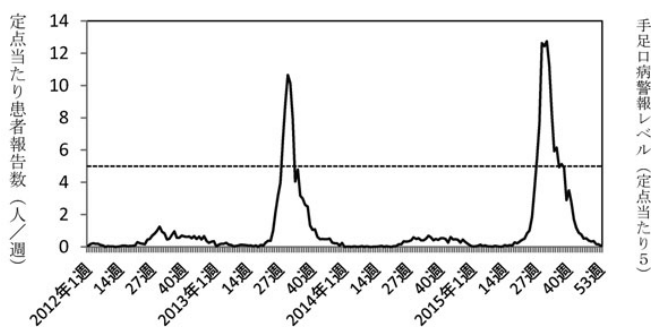


図1 手足口病患者の定点あたり報告数の週別推移（2012～2015年）

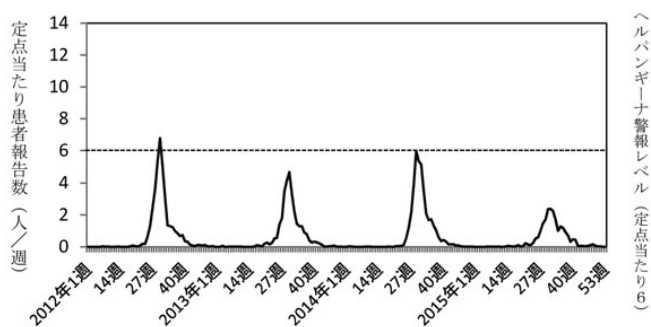


図2 ヘルパンギーナ患者の定点あたり報告数の週別推移（2012～2015年）

表1 手足口病患者検体からのウイルス検出状況

検出ウイルス*	2012年	2013年	2014年	2015年	合計
CV-A2				1	1
CV-A4			5		5
CV-A5	1	1		2	4
CV-A6	8	70	2	59	139
CV-A9	1			2	3
CV-A10			1	7	8
CV-A14				2	2
CV-A16	21	15	9	61	106
CV-B4		2			2
CV-B5				1	1
EV-D68				2	2
EV-A71	7	24			31
E-7	1	2			3
HRV	4	6		4	14
HPeV-3			1		1
HPeV-6				1	1
AdV-1	1				1
AdV-2				1	1
AdV-5		2			2
HSV-1		2		2	4
検出株数	42 (2)**	120 (4)	17 (1)	140 (5)	319 (12)
陰性数	19	44	23	53	139
検体数	61	164	40	193	458
検出率(%)	69	73	43	73	70

*検出ウイルス名

CV：コクサッキーウイルス、EV：エンテロウイルス、E：エコーウイルス、HPV：ヒトライノウイルス、HPeV：ヒトパレコウイルス、AdV：アデノウイルス、HSV：単純ヘルペスウイルス

** カッコ内数字は重複検出数

表2 ヘルパンギーナ患者検体からのウイルス検出状況

検出ウイルス*	2012年	2013年	2014年	2015年	合計
CV-A2	5	1	1	2	9
CV-A4	34	1	29	1	65
CV-A5	19	2	3		24
CV-A6	4	12	1	8	25
CV-A8	1		1		2
CV-A9	1				1
CV-A10		1	6	3	10
CV-A12		1			1
CV-A16				4	4
CV-B2	1				1
CV-B4		2	1	1	4
CV-B5		1			1
EV-A71		1			1
E-6	2				2
PV-1	1				1
HRV	2		1	1	4
AdV-2		1			1
AdV-5		2			2
HSV-1	1	1			2
検出株数	70 (1)**	23 (3)	42 (1)	20	155 (5)
陰性数	10	11	8	3	32
検体数	80	34	50	23	187
検出率(%)	88	68	84	87	83

*検出ウイルス名

CV：コクサッキーウイルス、EV：エンテロウイルス、E：エコーウイルス、PV：ポリオウイルス、HPV：ヒトライノウイルス、AdV：アデノウイルス、HSV：単純ヘルペスウイルス

** カッコ内数字は重複検出数

報告数6を超えた年は2012年の1年で、定点あたり報告数のピーク値は、2012年の6.78（第30週）であった。2014年は5.97（第29週）と若干下回っていたが、手足口病の流行が見られない年にヘルパンギーナの流行が見られる傾向にあることから、継続した監視が必要と考える。

2 手足口病，ヘルパンギーナ患者のウイルス検出状況および検出ウイルス株の解析

県域における手足口病患者検体からのウイルス検出状況を表1に、ヘルパンギーナ患者検体からのウイルス検出状況を表2に示した。手足口病では、全検体の70%からウイルスを検出しており、検出したウイルス株は、主因ウイルスとされるCV-A6、CV-A16、EV-A71で87%を占めていた。その他、CV-A6、CV-A16以外のA群コクサッキーウイルス、ヒトライノウイルス、B群コクサッキーウイルス、エコーウイルス、ヒトパレコウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルスが検出された。また、2015年には急性弛緩性麻痺との関連が疑われるエンテロウイルス68型（EV-D68）¹¹⁾が2株検出された。主因ウイルスのCV-A6、CV-A16、EV-A71について検出数および検出率を年別で比較したところ、流行が大きかった2013年と2015年では、CV-A6の検出数が多く、且つ検出率が高かった（図3）。このことから、近年の手足口病の流行にはCV-A6が係わっていることが示唆された。さらに2015年では、CV-A16の検出数はCV-A6とほぼ同程度であったことから、CV-A6とCV-A16の混合流行により、過去最大の流行に繋がったと推察された。

ヘルパンギーナでは、検体数の83%からウイルスを検出し、検出株数のうち、主因とされるA群コクサッキーウイルスの検出が91%を占めた。その他、B群コクサッキーウイルス、ヒトライノウイルス、エコーウイルス、EV-A71、ポリオウイルス（ワクチン由来株）、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルスが検出された。A群コクサッキーウイルスのうち検出数の多かったCV-A2、CV-A4、CV-A5、CV-A6、CV-A10について検出数と検出率を年別で比較したところ、流行の大きかった2012年と、比較的流行が大きかった2014年ではCV-A4の検出率が高くなっていた（図4）。一方、ヘルパンギーナの流行が比較的小規模であった2013年と2015年では、CV-A6の検出率が高くなっていた。

我々はこれまでに、従来ヘルパンギーナの主因ウイルスであったCV-A6による手足口病の大規模な流行が2011年に起き、その流行株が2009年以前の主流株とは異なるバリエーションであったことを報告している³⁾。今回、2011年以降の手足口病流行の起因となっているCV-A6

の遺伝子的動向を継続して把握するため、2007～2015年に手足口病およびヘルパンギーナ患者検体から検出されたCV-A6株のうち、遺伝子解析が可能であった87株（2007年2株、2008年12株、2009年15株、2010年19株、2011年12株、2012年4株、2013年8株、2014年3株、2015年12株）について、VP1部分領域369bpを用いた系統解析を行った（図5）。その結果、2012年以降に検出された株は、2011年流行株と同じクラスターのGroup A（ブートストラップ値：90%）に分類され、2009年以前の主流株であるGroup B（ブートストラップ値：99%）とは異なっていた。また、Group Aの中では、年別にサブクラスターを形成する傾向が見られた。これらのことから、2011年以降、近縁のバリエーションが手足口病の主因ウイルスとなっていることが分かった。

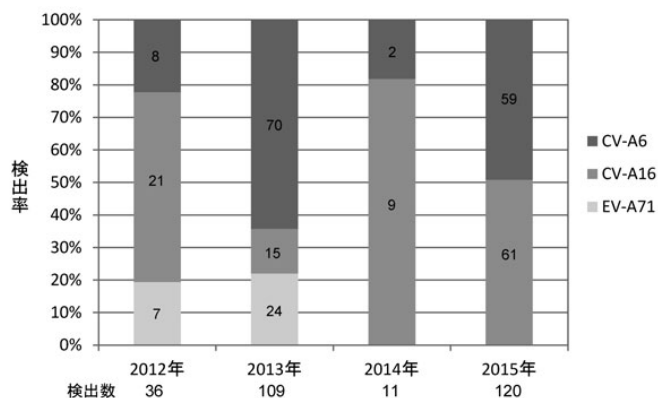


図3 手足口病患者検体からのCV-A6、CV-A16、EV-A71検出数と検出率（2012-2015年）

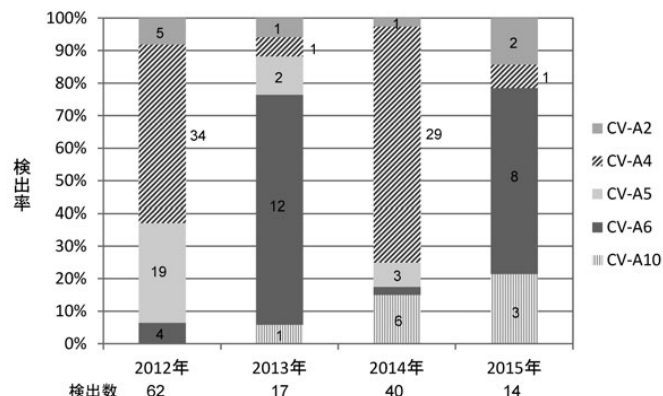


図4 ヘルパンギーナ患者検体からのCV-A2、CV-A4、CV-A5、CV-A6、CV-A10検出数と検出率（2012-2015年）

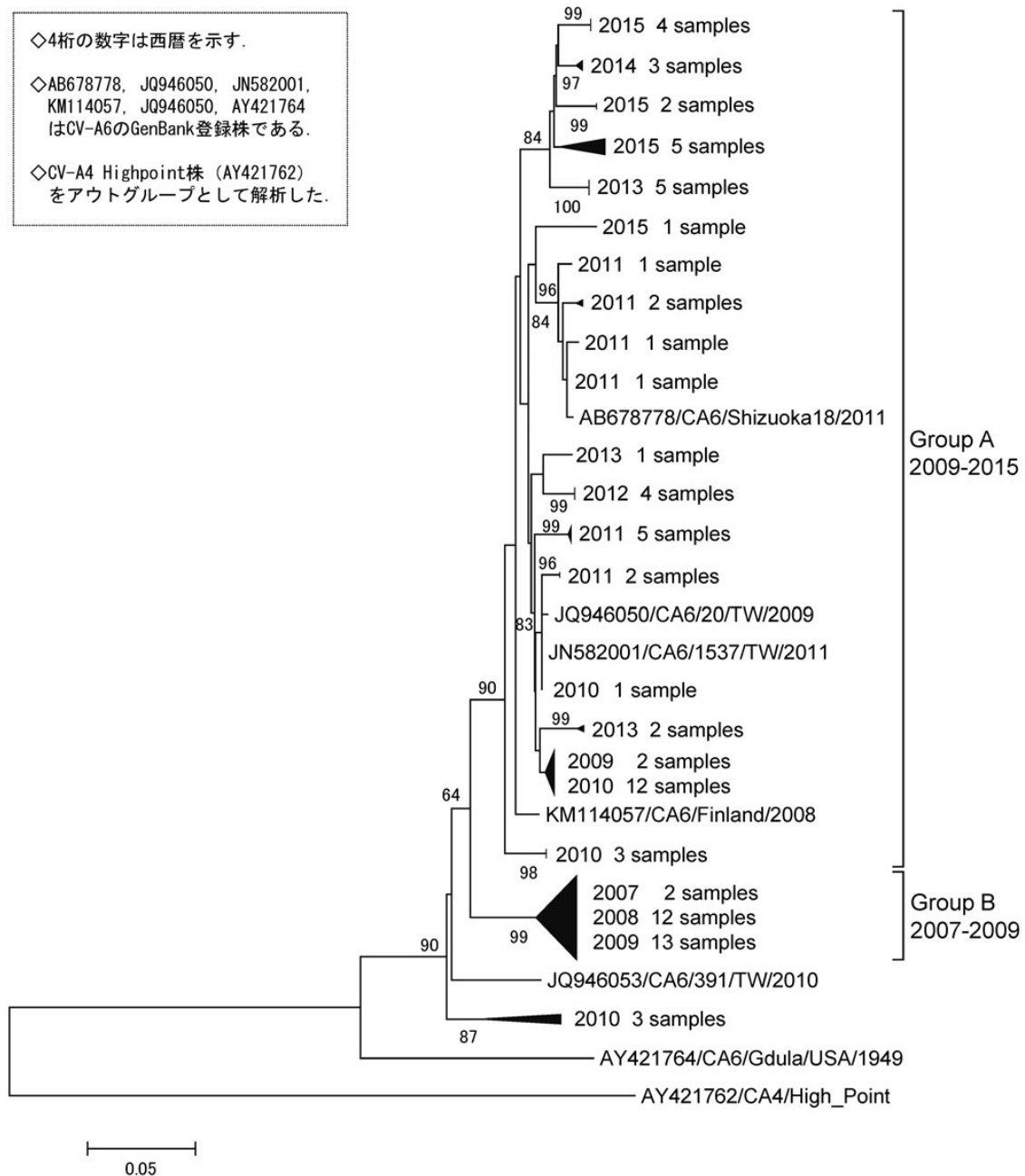


図5 CV-A6のVP1部分領域 (369bp) を用いた系統樹

まとめ

手足口病は近年1年おきに流行が発生しており、流行規模が拡大傾向にあることから、今後も監視が必要である。ヘルパンギーナは手足口病の流行が小さい年に流行が起きており、どちらかの疾患が毎年流行している状況にある。近年、手足口病の流行株はCV-A6が主流となっているが、2015年にはCV-A6とCV-A16による混合流行が見られ、大規模な流行が発生した。手足口病とヘルパンギーナは基本的には予後が良好な疾患であるが、手足口病の原因ウイルスの1つであるEV-A71は無菌性髄膜炎を併発することもあり、死亡例も報告されている¹²⁾。

近年、県域ではEV-A71の流行は見られていないが、今後の発生動向には注意が必要である。また、急性弛緩性麻痺との関連が疑われるEV-D68の検出動向も注視すべきである。毎年の流行状況および原因ウイルスの解析は、疾病の流行を監視する上で極めて重要と考える。今後も感染症発生動向調査を継続していく中で、経年的な流行状況の把握と迅速な情報還元に努めていきたい。

謝辞

本調査を実施するにあたり、多大なご協力を頂きました小児科病原体定点医療機関の先生方および県健康危機

管理課の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Fujimoto, T., Iizuka, S., Enomoto, M., Abe, K., Yamashita, K., Hanaoka, N., et al.: Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011, *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 337-339 (2012)
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：＜特集＞手足口病2002～2011年，病原微生物検出情報，**33**, 55-56 (2012)
- 3) 佐野貴子，近内美乃里，近藤真規子，渡邊寿美，齋藤隆行：神奈川県における手足口病，ヘルパンギーナ患者の発生動向および検出ウイルス株の解析，神奈川県衛生研究所研究報告，**42**, 11-16 (2012)
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター：感染症の話「ヘルパンギーナ」，国立感染症研究所感染症発生動向調査週報，2003年第8号，10-11 (2003)
- 5) 川俣 治：RT-PCR法によるエンテロウイルス及びライノウイルスの検出系，新潟医学会雑誌，**111**, 633-646 (1997)
- 6) 宗村徹也，藤本嗣人，近平雅嗣，木村博一，西尾治，吉田 弘ほか：エンテロウイルス遺伝子診断法における市販RNA抽出キット選択の影響，感染症学雑誌，**82**, 55-57 (2008)
- 7) Oberste, M.S., Maher K., Flemister M.R., Marchetti G., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A.: Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses, *J Clin Microbiol*, **38**, 1170-4 (2000)
- 8) Nix, W.A., Oberste, M.S., Pallansch, M.A.: Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens, *J Clin Microbiol*, **44**, 2698-2704(2006)
- 9) Harvala, H., Robertson, I., McWilliam Leitch, E.C., Benschop, K., Wolthers, K.C., Templeton, K., et al.: Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections, *J Clin Microbiol*, **46**, 3446-53(2008)
- 10) Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729 (2013)
- 11) 国立感染症研究所感染症情報センター：エンテロウイルスD68 型 (EV-D68) に関する国内の疫学状況のまとめ（更新）（2016年1月20日現在）病原微生物検出情報，**37**, 33-35 (2016)
- 12) 篠原美千代，内田和江，島田慎一，瀬川由加里，星野庸二：埼玉県における2002年のエンテロウイルス71型分離株について，感染症学雑誌，**75**, 490-494 (2001)

短報

食品中のエチレンジアミン四酢酸 およびその塩類の分析法について

関戸晴子, 田中由紀子, 岸弘子

Determination of ethylene diamine tetra- acetic acid and its salts in foods

Haruko SEKIDO, Yukiko TANAKA
and Hiroko KISHI

はじめに

エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム (EDTA-CaNa_2) およびエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-Na_2) は、種々の金属イオンと結合し、塩を作るキレート剤である。この性質を利用して変色の防止、酸化防止の目的で、缶・瓶詰清涼飲料水およびその他の缶・瓶詰食品について我が国でも食品添加物として使用が認められている。また、 EDTA-Na_2 については人体に摂取されたとき、体液中に比較的多く、かつイオンの形で存在するCaと結合して体外に排泄する作用があり、体内Caの減少を起こす危険性があるため最終食品完成前にキレート型である EDTA-CaNa_2 にしなければならないとされている¹⁾。

食品中の EDTA-CaNa_2 および EDTA-Na_2 の分析法として、食品衛生検査指針食品添加物編2003 (検査指針)²⁾では透析法により抽出し、カラムクロマトグラフィーにより EDTA-CaNa_2 (キレート型EDTA) と EDTA-Na_2 (遊離型EDTA) を分別し、銅を加えてCu-EDTAとして各々を液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量する方法を採用している。しかし、透析に時間を要する、操作が煩雑であり遊離型EDTAの回収率が悪い等の問題点がある。衛生試験法・注解2010 (衛生試験法)¹⁾では、水を加えてホモジナイズしたもの (直接抽出法) をカラムクロマトグラフィーにより妨害物を除去した後に、キレート型EDTAと遊離型EDTAを分別せずに鉄を加えて鉄キレート (Fe-EDTA) として定量する方法を採用している。しかし、分別しないため最終製品に遊離型EDTAが存在するかどうかの確認はできない。

そこで、寺田らの方法³⁾を元にトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を用いた直接抽出法を採用し、市販の固相抽出カラムを用いて、遊離型EDTAとキレート型EDTAを合算してFe-EDTAとして定量する方法を検討した。さらに、 EDTA-Na_2 使用表示のある試料における遊離型EDTAの残存確認法として、遊離型のみをCu-EDTAとして検出する方法も検討した。日常検査に適用可能な分析法が確立できたので報告する。

方 法

1. 試料

神奈川県内で購入したマヨネーズ、リンゴジュース、マッシュルーム缶詰、キャベツの酢漬け (瓶詰)、カニ缶詰 (EDTA-CaNa_2 表示有)、ドレッシング (EDTA-CaNa_2 表示有) を用いた。

2. 試薬および試液等

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-Na_2)・ $2\text{H}_2\text{O}$ 、エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム (EDTA-CaNa_2)・ $2\text{H}_2\text{O}$ 、エチレンジアミン四酢酸鉄ナトリウム (EDTA-FeNa)・ $3\text{H}_2\text{O}$: (株) 同仁化学研究所製を使用した。メタノールは和光純薬社製のHPLC用、水は水道水を超純水製造装置で処理した水、その他の試薬はすべて和光純薬社製の特級品を使用した。標準溶液および主な試液の調製法は以下のとおりである。

(1) 標準溶液

$\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 276mg および $\text{EDTA-CaNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 274.0mgを水に溶かしてそれぞれ全量50mLとした (各5000 $\mu\text{g/mL}$)。 $\text{EDTA-FeNa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 114.7mgを水に溶かして100mLとした (1000 $\mu\text{g/mL}$)。これらの溶液を標準原液とし、適宜水で希釈して使用した。

(2) 0.2mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5)

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン24.2gを量り、水500mLを加えて溶かし、2mol/L塩酸でpH8.5に調整した後、水を加えて1,000mLとした。

(3) 0.0025mol/L塩化第二鉄0.05mol/L塩酸溶液

塩化第二鉄・6水塩0.68gに0.5mol/L塩酸100mLを加えて溶かした後、この液10mlを量り、水を加えて100mLとした。

(4) 0.25%硫酸銅溶液

無水硫酸銅0.25gを水に溶解して100mLとした。

(5) 0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0)

0.2mol/Lリン酸一カリウム水溶液を調製した後、0.2mol/Lリン酸を加えてpH4.0に調整した。

(6) 固相抽出カラム : OASIS MAX (6mL, 150mg) Waters社製

あらかじめメタノール5mL、水5mL、0.02mol/Lトリ

ス塩酸緩衝液 (pH8.5) 10mLの順でコンディショニングした後使用した。

(7) ガラスフィルター：ワットマン934AHフィルター

3. 装置および測定条件

装置：Waters社製 Alliance 2695/2996

カラム：Inertsil ODS-3V (4.6×150mm, 5 μ m), 移動相：メタノール・水・0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) を2:7:1に混合した後、臭化テトラ-n-ブチルアンモニウムを0.005mol/Lになるように溶解した。

流速：1.0mL/min, カラム温度：40℃, 注入量：20 μ L, 検出：フォトダイオードアレイ検出器 (検出波長210~370nm, 定量255nm)

4. 試料液の調製

寺田らの方法³⁾に従った。

＜高脂肪食品 (マヨネーズ・油性ドレッシング等)＞

試料約5gを精密に量り、50mLの遠沈管に入れ、0.2mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 10mL, 水20mLおよびヘキサン15mLを加え超音波水浴中に10分間放置後、2,500rpmで5分間遠心分離を行い、水層を駒込ピペットで分取した。残ったヘキサン層に水25mLを加えて混和し、超音波水浴中に10分間放置後、2,500rpmで5分間遠心分離を行い、水層を駒込ピペットで分取した。この操作を2回繰り返し、分取した水層を100mLのメスフラスコ中に合わせて水で全量100mLとした。この溶液をガラスフィルターでろ過し、試料抽出液とした。

＜低脂肪食品 (清涼飲料水・魚・野菜等)＞

固形の食品はフードプロセッサーで粉碎したものを試料とした。試料約5gを精密に測り100mLの共栓メスシリンダーに入れ、0.2mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 10mL及び水を加え全量100mLとした。これを超音波水浴中に10分間放置後ガラスフィルターでろ過し、試料抽出液とした。

5. 定量用試料液の調製

試料抽出液5mLに0.0025mol/L塩化第二鉄0.05mol/L塩酸溶液1mLを加えて混和し、5分間放置した後0.2mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 1mLおよび水3mLを加え混和した。OASIS MAXに負荷後、0.02mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 5mLを流してカートリッジを洗浄し、0.2mol/L塩酸10mLでEDTA-Feキレートを出した。溶出液を100mLのナス型フラスコに採り、50℃に加温しながらロータリーエバポレータで塩酸を蒸発乾固し、残った塩酸蒸気を窒素気流を用いて十分除去し、水2.5mLを加えて超音波水浴中で溶解したものを定量用試料液 (Fe-EDTA) とした。

6. 遊離型EDTA確認用試料液の調製

試料抽出液10mLをOASIS MAXに負荷後0.1mol/Lト

リス塩酸緩衝液 (pH8.5) 15mLを流してカートリッジを洗浄し、0.2mol/L塩酸10mLで遊離型EDTAを溶出した。溶出液に0.25%硫酸銅溶液0.5mLを加え、EDTA-Cuキレートとした後、50℃に加温しながらロータリーエバポレータで塩酸を蒸発乾固し、残った塩酸蒸気を窒素気流を用いて十分除去し、水5mLを加えて超音波水浴中で溶解したものを遊離型EDTA確認試料液 (Cu-EDTA) とした。

結果および考察

1. 試料液の調製

寺田らの方法³⁾に従った。トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を抽出溶媒として、低脂肪食品は超音波水浴中に放置して抽出し、ガラスフィルター濾過後使用した。マヨネーズ等の高脂肪食品はヘキサンを加えて脱脂後、超音波抽出、遠心分離して水層を分取し、ガラスフィルター濾過後使用した。EDTA-CaNa₂使用の表示のあるカニ缶詰を用いて、低脂肪食品の抽出を行い、定量用試料液調製法により作製したFe-EDTAおよびEDTA-FeNa標準溶液 (10 μ g/mL) をそれぞれHPLC測定したところ、どちらも8分付近にピークを検出した。透析法よりも短時間で抽出できるため、検査にかかる時間短縮が示唆された。

2. HPLC条件

寺田らの条件³⁾は、ODSカラム (4.6×250mm, 5 μ m) を用いて、メタノール・水・0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) の混合比率を6:39:5としたものに、臭化テトラ-n-ブチルアンモニウムを0.005mol/Lになるように溶解した移動相でFe-EDTAを測定していた。同条件を用いてFe-EDTAとCu-EDTAを測定したところ、Fe-EDTAのピークは8分付近で良好なピーク形状を示したが、Cu-EDTAを測定したところ、30分以降にピークが出現し、形状も悪かった。そこでFe-EDTAとCu-EDTAの両ピークが良好に検出できる条件を検討することにした。カラムにInertsil ODS-3V (4.6×150mm, 5 μ m) を採用し、移動相のメタノール・水・0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) の混合比率を6:39:5から2:7:1に変更し、臭化テトラ-n-ブチルアンモニウムを0.005mol/Lになるように溶解した溶液で測定したところFe-EDTAの保持時間が少し早めではあるが3分付近に、Cu-EDTAの保持時間は10分付近に検出でき、2つの成分を分析条件を変えずに測定することが可能であった。そこでこの条件を採用することにした。検出器としては吸収スペクトルによるピーク確認が可能なフォトダイオードアレイを使用し、定量には255nmの波長を選択した。HPLCクロマトグラムを図1, 2に示す。

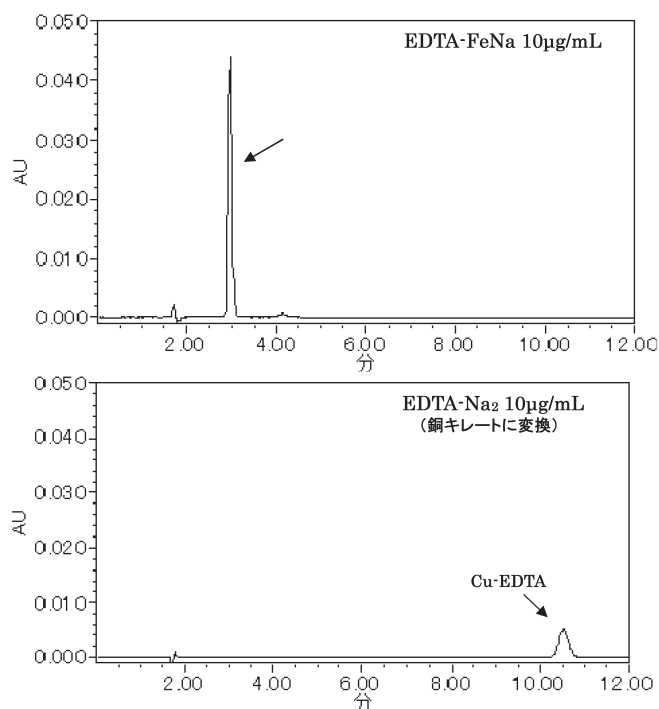


図1 HPLCクロマトグラム (UV255nm)

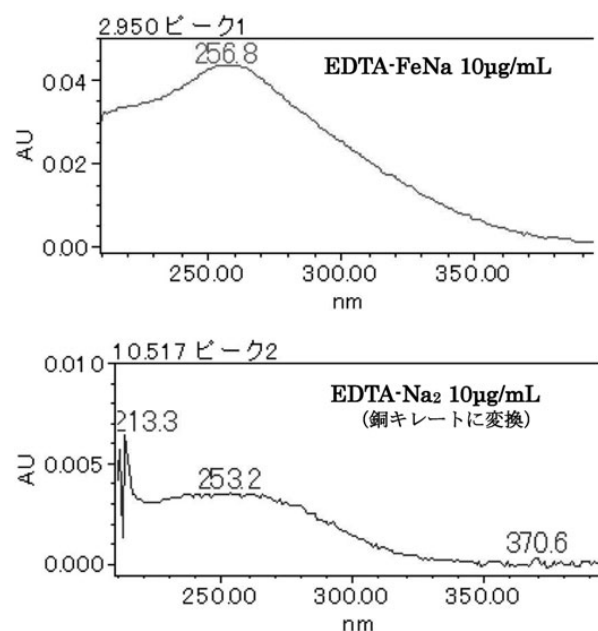


図2 UV吸収スペクトル

3. 検量線

衛生試験法¹⁾ではEDTA- Na_2 標準原液を希釈後、塩化鉄によりFe-EDTAを生成させた溶液を用いて検量線を作成していた。しかし、操作が煩雑であることから、ピーク形状および保持時間に相違なかったEDTA-FeNa標準原液を希釈したものを使用することを検討した。EDTA-FeNa検量線を作成し、EDTA- Na_2 およびEDTA- CaNa_2

表1 EDTA- CaNa_2 の各種食品での添加回収率

食品	試料量 (g)	添加量 (g/kg)	検出量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
マヨネーズ	5	0.25	0.199	79.6	5.5
リンゴジュース	5	0.035	0.029	82.9	1.1
マッシュルーム缶詰	5	0.25	0.244	97.6	4.6
キャベツの酢漬(瓶詰)	5	0.25	0.209	83.6	5.5

* 5 試行の平均値

表2 EDTA- Na_2 の各種食品での添加回収率

食品	試料量 (g)	添加量 (g/kg)	検出量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
マヨネーズ	5	0.25	0.183	73.2	6.1
リンゴジュース	5	0.035	0.029	82.9	1.8
マッシュルーム缶詰	5	0.25	0.242	96.8	4.6
キャベツの酢漬(瓶詰)	5	0.25	0.209	83.6	3.6

* 5 試行の平均値

標準溶液 (各 $10 \mu\text{g/mL}$) より調製したFe-EDTAを測定後、換算して回収率を求めたところ、96.5%および108%とほぼ良好な結果が得られたことから、EDTA-FeNaを検量線に使用することとした。0.1~ $30 \mu\text{g/mL}$ の溶液を調製し、検量線を作成したところ相関係数(R) 0.999以上の良好な直線性を示した。

4. 定量用試料液調製法の検討

寺田らの方法³⁾に従い、EDTA- Na_2 およびEDTA- CaNa_2 標準溶液 (各 $10 \mu\text{g/mL}$) を試料抽出液として、Bond Elute SAX (3 mL, 500mg) による精製を行ったところ、ロットの違いにより回収率にばらつきが見られた。そこで、湿潤性があり操作しやすい、イオン交換と逆相のモードを併せ持つOASIS MAX (6 mL, 150mg) を用いて再検討することにした。Fe-EDTAとして定量する際、寺田ら³⁾はBond Elute SAXに負荷した後、0.02mol/L塩酸10mLで洗浄して妨害物質及び過剰な鉄を除去し0.2mol/L塩酸で溶出していた。しかし、OASIS MAXで同様の操作を行ったところ0.02mol/L塩酸10mLの洗浄時にFe-EDTAが溶出してしまった。洗浄溶液のpHに原因があると考え、水および0.01~0.2mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 10mLを用いて洗浄を実施したところ、水を用いた場合のみ溶出が認められた。トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を用いた場合はFe-EDTAの溶出は認められなかったことから、トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) の濃度と液量を検討した。液量を10mLとして、0.02, 0.05, 0.1mol/Lの3濃度で検証したところ、ほぼ相違ない結果が得られたため、試料抽出液の液性と同じ0.02mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) とすることにした。しかし、液量が10mLの場合、わずかではあるがFe-EDTAの溶出が認められたため5mLに変更した。洗浄液量を変更しても、HPLCクロマトにおけるFe-EDTAのピーク形状等に影響は認められなかった。

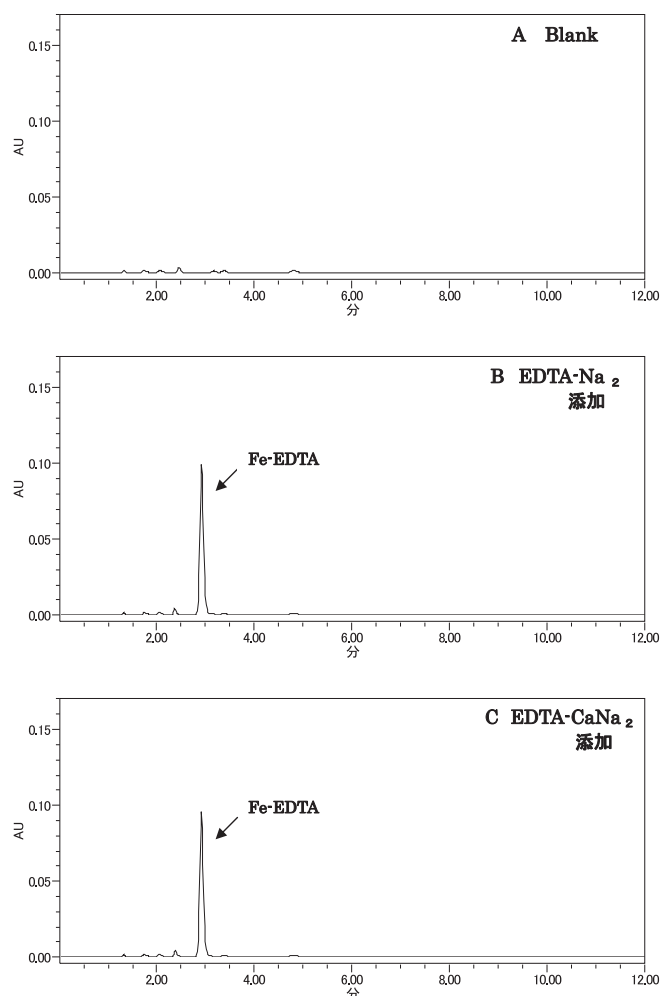


図3 マヨネーズのクロマトグラム（鉄キレートとして測定）

5. 添加回収試験

高脂肪食品としてマヨネーズ，低脂肪食品としてリングジュース，マッシュルーム缶詰，キャベツの酢漬け（瓶詰）を用いて添加回収試験を実施した．EDTA-CaNa₂およびEDTA-Na₂を各試料に基準値量を添加することとし，清涼飲料水であるリングジュースは0.035g/kg，それ以外は0.25g/kgとした．添加回収の結果を表1，2にマヨネーズおよびリングジュースのHPLCクロマトグラムを図3，4に示す．回収率はEDTA・CaNa₂が79.6～97.6%（RSD1.1～5.5%），EDTA・Na₂が73.2～96.8%（RSD1.8～6.1%）とほぼ満足できる値であった．実際にEDTA-CaNa₂使用表示のあったカニ缶詰およびドレッシングについて繰り返し試験（n=5）を実施したところ，カニ缶詰0.097g/kg（RSD4.2%），ドレッシング0.030g/kg（RSD6.8%）という良好な結果が得られた．

本法における定量は0.005g/kgから可能であったが，食品によっては妨害成分と分離しにくい可能性があるため定量下限を0.01g/kgとした．

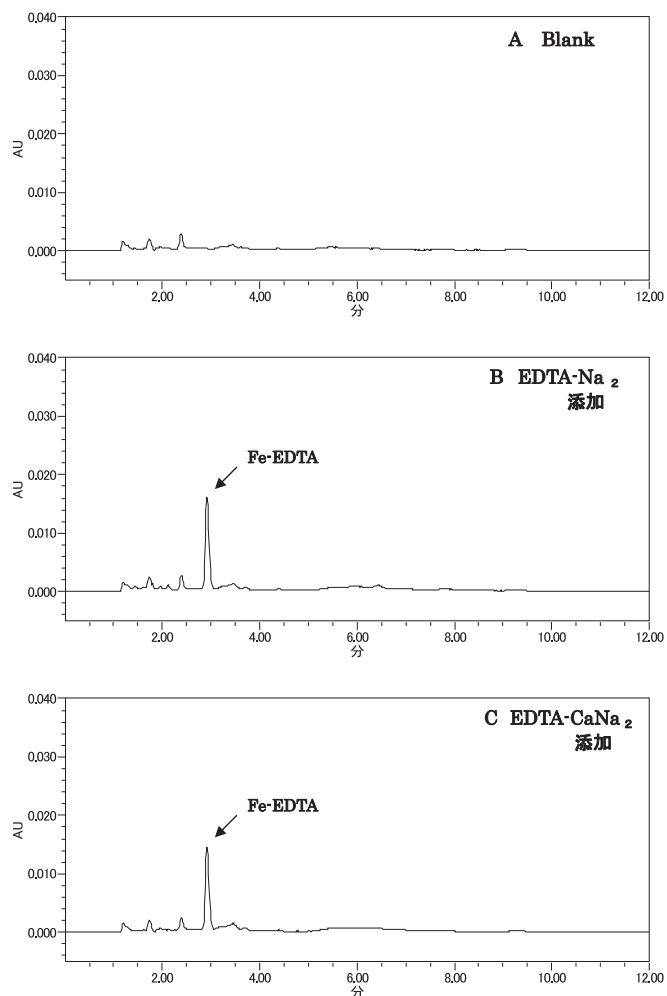


図4 リングジュースのクロマトグラム（鉄キレートとして測定）

6. 遊離型EDTAの確認

EDTA-CaNa₂およびEDTA-Na₂の標準溶液（各10 μg/mL）を負荷しOASIS MAXによるキレート型と遊離型の分別を検討した．試料中には種々の金属とキレート化したEDTAの存在が考えられる¹⁾．もともと試料中に存在しているFe-EDTAとの分別をはかるため，遊離型の確認は硫酸銅を用いてCu-EDTAとすることとした．試料抽出液をOASIS MAXに負荷し0.1mol/Lトリス塩酸緩

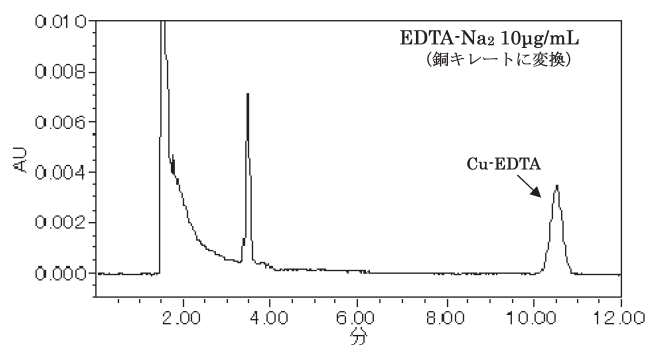


図5 遊離型EDTA標準液のクロマトグラム（銅キレートとして測定）

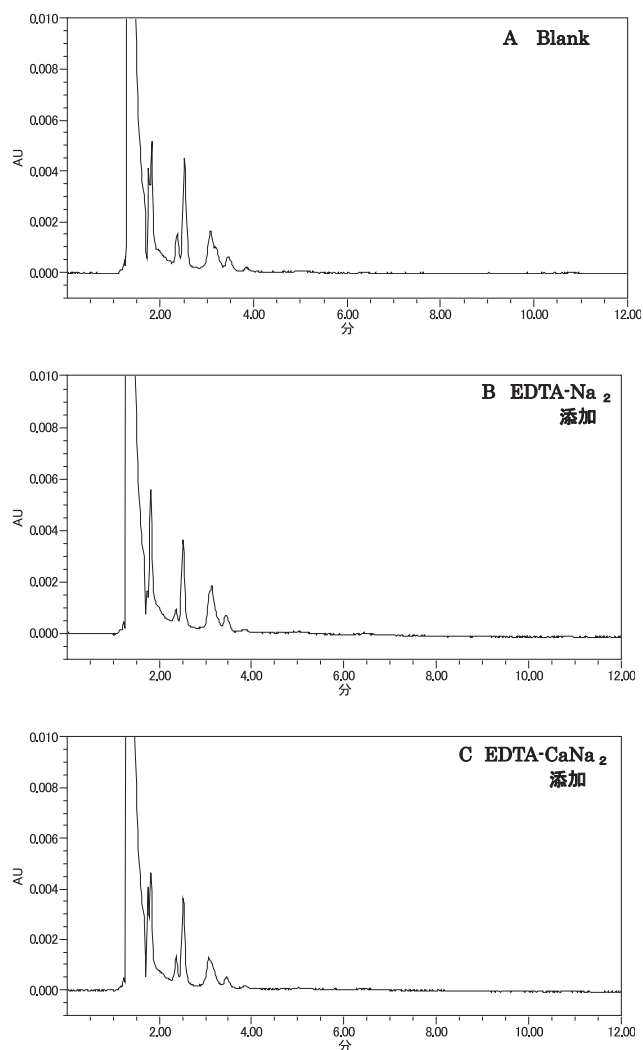


図6 マヨネーズのクロマトグラム（銅キレートとして測定）

衝液（pH8.5）で洗浄後、0.2mol/L塩酸で溶出した液に0.25%硫酸銅溶液を加えてCu-EDTAとしたものをHPLCで測定した。

洗浄に用いたトリス塩酸緩衝液（pH8.5）は、0.02, 0.05, 0.1mol/Lの3濃度で検討し、EDTA-CaNa₂の洗浄に要した液量が最も少量であった0.1mol/Lを採用した。

試料抽出液の代わりにEDTA-Na₂（10 μg/mL）標準溶液をOASIS MAXに負荷し、同様の操作を実施して得られたCu-EDTAと比較した。

添加回収試験で用いたEDTA-CaNa₂およびEDTA-Na₂を添加した試料ならびにEDTA-CaNa₂使用の表示のあるカニ缶詰およびドレッシングの試料抽出液を用いて遊離型EDTAの確認操作を行ったところ、すべての試料からCu-EDTAのピークは検出されず、遊離型EDTAの残存は認められなかった。EDTA-Na₂標準溶液を負荷したものからはCu-EDTAのピークが検出された。EDTA-Na₂標準溶液、マヨネーズ、カニ缶詰のHPLCクロマトグラ

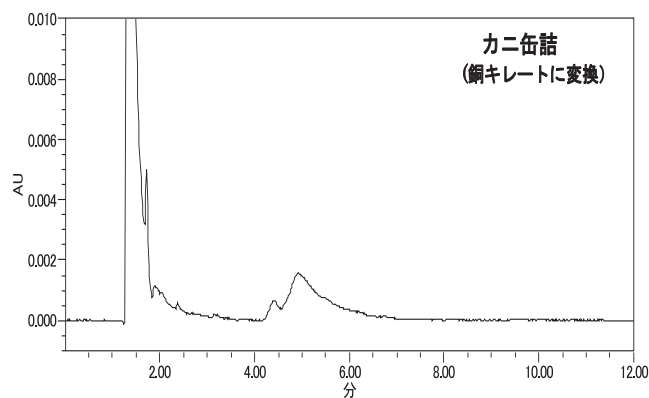


図7 カニ缶詰のクロマトグラム（銅キレートとして測定）

ムを図5～7に示す。本確認法における検出限界は0.01 g/kgであった。

EDTA-Na₂を添加した試料から遊離型EDTAは確認されなかったことから、食品にEDTA-Na₂を添加しても、食品中では遊離型EDTAとしては存在しないことが推測された。

まとめ

食品中のEDTA-CaNa₂およびEDTA-Na₂の分析法として、2種類を分別せずに、トリス塩酸緩衝液（pH8.5）を加えて直接抽出後、鉄キレート（Fe-EDTA）を生成させ、市販のイオン交換と逆相のモードを併せ持つ固相抽出カラムによる前処理後、HPLCで定量する方法を検討した。検査指針²⁾と比べて、前処理操作が簡便となり、短時間で結果を出すことができた。検量線用標準液はEDTA-FeNa標準原液を希釈したものを使用することが可能であった。検討した試験法は、行政検査に十分適用できると考えられた。

また、遊離型EDTAの確認法として、固相抽出カラムを用いて遊離型のみを銅キレート（Cu-EDTA）として検出する方法を検討した。本確認法は最終製品に残存するEDTA-Na₂の確認が可能であった。しかし今回、使用したすべての試料からCu-EDTAが検出されなかったことから、食品中では遊離型EDTAとしては存在しないことが推測された。

参考文献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，337-338，2010，金原出版(株)
- 2) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編 2003，38-45，2003，日本食品衛生協会
- 3) 寺田久屋，田村征男：食品中EDTAの分析法について，名古屋市衛生研究所事業年報，第14号，63，平成17年度

短報

薄層クロマトグラフィーを用いた健康食品等に含有されるシルデナフィル及びその類似成分等の分析条件の検討

熊坂謙一, 羽田千香子, 外館史祥, 甲斐茂美

Studies on analytical conditions for sildenafil analogs and other undisclosed active ingredients found in tainted products using thin-layer chromatography

Kenichi KUMASAKA, Chikako HADA,
Fumiaki SOTODATE and Shigemi KAI

緒言

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、最近の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及びガスクロマトグラフィー (GC) からすれば分離性能及び検出感度は劣るものの、操作の簡便性、迅速性及び分析結果の視認性に優れるほか、検出方法として対象物質に応じた様々な手法を選択できるといった利点があり、汎用性の高い分析手法である。そのため、いわゆる健康食品及び危険ドラッグの検査では製品表示にない違法な医薬品成分や薬物を検査対象とすることから、TLCはガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) 及び液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) などの分析の前段階として、機器汚染の懸念や検出法に伴う検出成分の制限もなく、未知の新規成分も含めて試料抽出成分の全体像を視覚的に把握し易い重要なスクリーニング法として使用されている¹⁻⁶⁾。

健康食品から検出される医薬品成分として、勃起不全治療薬バイアグラの有効成分シルデナフィルクエン酸塩に代表される強壮強精医薬品成分やその構造類似成分が世界的に数多く報告されており⁶⁻⁹⁾、最近では危険ドラッグ形状の製品からの検出事例も公表されている⁹⁾。また、近年ではシルデナフィルなどと共に、異なる作用を持つダボキセチンやグリベンクラミドなどの医薬品成分が検出される事例も散見されている⁹⁾。しかし、このような

薬効が異なる医薬品成分まで対象に含めたTLCの分析条件を検討した事例はほとんどない。

そこで、健康食品等への意図的混入医薬品成分のスクリーニング法の改良を念頭に置き、本報告ではシルデナフィル及びその構造類似成分の化学構造依存的な R_f 値の挙動について検討を行った。また、これらの成分のほか、ダボキセチン、グリベンクラミド、既承認の勃起不全治療薬成分のバルデナフィル及びタダラフィルも対象に含めたTLCの分析条件として、展開溶媒組成と特徴的な呈色を示す発色試液等の検出条件の検討を実施した。

方法

1. 試薬

酢酸エチル、メタノール、アンモニア水 (28) 及びその他の試薬は和光純薬工業製の試薬特級を使用した。

2. 標準品及び標準溶液

シルデナフィルクエン酸塩、チオデナフィル (チオシルデナフィル)、ダボキセチン塩酸塩及びタダラフィルはToronto Research Chemicals社製、ホモシルデナフィル、ヒドロキシホモシルデナフィル、ホモチオデナフィル (チオホモシルデナフィル)、ホンデナフィル (アセチルデナフィル)、ヒドロキシホンデナフィル (ヒドロキシアセチルデナフィル) 及びバルデナフィルはSanta Cruz Biotechnology社製、メチソシルデナフィル (アイルデナフィル、ジメチルシルデナフィル)、チオアイルデナフィル (スルホアイルデナフィル、チオジメチルシルデナフィル) 及びヒドロキシチオホモシルデナフィルはTLC Pharmaceutical Standards社製、グリベンクラミドはSigma-aldrich社製及びカフェインは和光純薬工業製を使用した。なお、上記の括弧内の名称は当該成分の別名を示している。各標準品はそれぞれメタノールに溶解し、濃度1 mg/mLの溶液とした。なお、シルデナフィル及びダボキセチンは対塩を含む濃度とした。

3. 器材等

TLCプレートとしてHPTLCガラスプレート シリカゲル 60 F₂₅₄ (10×20 cm, メルク製) を用いた。なお、事前に120℃、30分間の加熱処理を行い、デシケーター内で放冷後に使用した。展開槽には二槽式展開槽 (CAM AG製) を使用した。また、紫外線照射及び撮影装置としてUVP社製 ChromaDoc-It TLC Imaging Systemを使用した。

4. 分析方法

展開溶媒は、厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知「ヒドロキシチオホモシルデナフィルの分析方法について」¹⁰⁾に示された酢酸エチル/メタノール/アンモニア水 (28) 混液 (90:10:1) を初期条件とし、

その他に混合比率を変更した混液（70：30：1）及び（90：10：3）について検討を行った。各標準溶液はHP TLCプレートの底辺から2 cm及び左端から2 cmの位置より10 mm間隔にて直径3 mm程度になるよう、マイクロシリッジにより1 μ Lをスポットした。その後、HPT LCプレートは展開溶媒及びろ紙を入れた展開槽内で30分間飽和したのち、約7 cm展開した。展開後、HPTLCプレートを十分に風乾したのち、各スポットの検出を次の①～③の条件により行った。検出条件①；紫外線照射（主波長254 nm）、検出条件②；10%硫酸噴霧及び105℃10分間加熱後紫外線照射（主波長365 nm）、検出条件③；ドラージェンドルフ試液及び10%硫酸の噴霧。なお、ドラージェンドルフ試液は第16改正日本薬局方の一般試験法の試薬試液、噴霧用ドラージェンドルフ試液¹¹⁾により調製した。

5. 検出限界の確認

検出限界は目視により十分にスポットを確認できる量とし、各標準溶液1 mg/mLをメタノールで希釈して100 μ g/mLとした液につき、スポット量を0.5 μ L、0.75 μ L、1.0 μ L及び2.5 μ Lとして上記の方法により検討した。なお、シルデナフィル及びダボキセチンには対塩があることから、希釈溶液中のシルデナフィル及びダボキセチン濃度は、それぞれ71 μ g/mL及び89 μ g/mLとなる。また、ダボキセチン塩酸塩及びグリベンクラミドは低濃度では検出できない可能性があったことから、各標準溶液1 mg/mLにつき、スポット量0.25 μ L、0.50 μ L、0.75 μ L及び1.0 μ Lを追加して検討を行った。

結果及び考察

1. 分離挙動の確認

シルデナフィルはホスホジエステラーゼ-5（PDE-5）阻害剤の一種であり、そのクエン酸塩は勃起不全治療薬パイアグラ錠として承認された医薬品成分である。また、図1に示した通り、分析対象とした構造類似成分の化学構造の違いはわずかであるが、TLCにて各スポットを十分に分離し、化学構造依存的なスポット挙動を把握できれば、新規の構造類似成分であってもその構造推定に役立つものと考えられる。

表1に示したとおり、シルデナフィルのスポットの R_f 値に対する構造類似成分の挙動を比較した場合、 R_f 値の増大要因として、チオデナフィルに代表されるピラゾロピリミジン環のケトンのチオケトンへの変換、及びホモシルデナフィル等におけるピペラジン環部位へのメチル基の結合等の影響が考えられた。なお、いずれもメチル基の付加体であるホモシルデナフィル及びメチソシルデナフィルを比較した場合、N-メチル基が延伸してN-エチル基となったホモシルデナフィルがより大きな R_f 値を示した。一方、 R_f 値の低下要因として、ヒドロキシホモシルデナフィル等に代表されるピペラジン環のアルキル鎖への水酸基の結合、及びホンデナフィル等におけるスルホニル基のアセチル基への変換が考えられた。

展開溶媒の初期条件とした酢酸エチル/メタノール/アンモニア水（28）混液（90：10：1）では、シルデナフィル及びチオデナフィルに対する各ヒドロキシホモ体との分離、及びホンデナフィル及びヒドロキシホンデナフィルの原点からの移動距離と分離が不十分であったことから、展開溶媒の混合比の検討を行った。

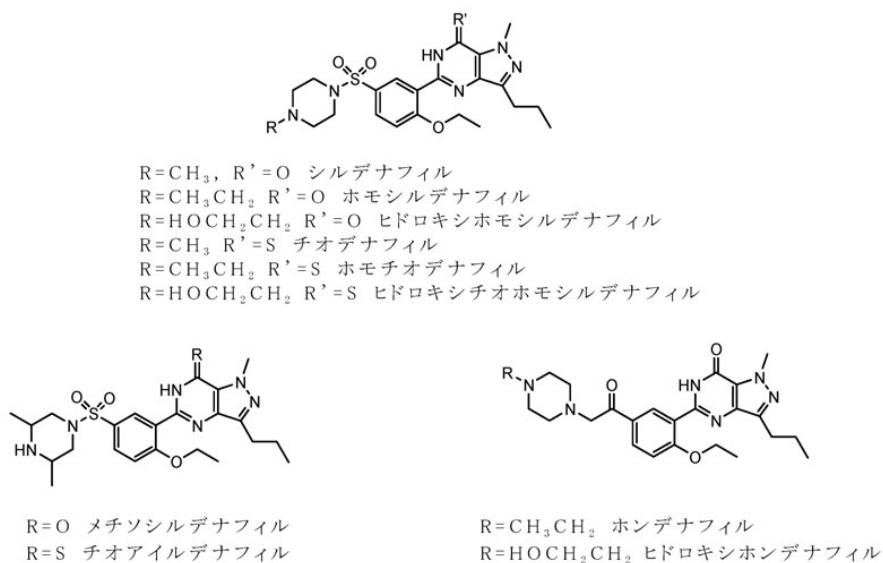


図1 シルデナフィル及びその類似成分の化学構造

メタノールの比率を高めて酢酸エチル/メタノール/アンモニア水 (28) 混液 (70 : 30 : 1) としたところ, 分析対象成分のスポットの R_f 値が増大して全体的に分離が悪化した。そのため, メタノールの比率は変更せずにアンモニア水 (28) の比率を高め, 酢酸エチル/メタノール/アンモニア水 (28) 混液 (90 : 10 : 3) を展開溶媒として分析を行った。グリベンクラミド以外の分析対象成分のスポットの R_f 値は増大し, シルデナフィル及びその類似成分の分離がより明瞭となった。特に, ヒドロキシホモシルデナフィル及びヒドロキシチオホモシルデナフィルの R_f 値は, それぞれシルデナフィル及びチオデナフィルよりも低下し, 水酸基の結合の影響がより明瞭に確認された。また, ホンデナフィル及びヒドロキシホンデナフィルの R_f 値も増大し, 併せて水酸基の結合による R_f 値の低下も明確に確認された。

なお, ダボキセチン及びグリベンクラミド, 加えて勃起不全治療薬として承認のあるバルデナフィル及びタダラフィルの各スポットの R_f 値の挙動についても検討を行った。その結果, ダボキセチンは分析対象成分の中では最も大きな R_f 値を示した。バルデナフィルとタダラフィルもシルデナフィルに対して大きな R_f 値を示したが, 一部のシルデナフィル類似成分と近似した R_f 値を示したことから,

スポットの呈色による識別が必要と考えられた。一方, グリベンクラミドのスポットの R_f 値は小さく, その pK_a は 6.8 ± 0.15 とされることから¹²⁾, 展開溶媒組成として, わずかなアンモニア水の増加のみでは R_f 値に影響しないものと考えられた。

2. 検出条件の検討

今回検討を行った検出条件①～③について, 対象成分のスポットの呈色を確認した結果を表1に示した。検出条件①である紫外線254 nm照射では, 使用したHPTLCプレートには蛍光指示薬マンガニン活性化ケイ酸亜鉛が含まれているため, 一般的に共役二重結合や芳香族化合物などを持つ有機化合物は黄緑色蛍光の背景に黒紫色のスポット (吸収) として検出される。今回の分析対象成分ではバルデナフィルが特徴的な水色のスポットを示したほか, その他の対象成分については, ダボキセチンの検出感度に難があるものの, 黒紫色のスポットとして検出された。

次に検出の選択性を高めるため, 10%硫酸噴霧及び105℃10分加熱後紫外線365 nm照射 (検出条件②) による検出を検討した。従来の検出方法^{3,10)}では主波長254 nmの紫外線を照射していたが, 10%硫酸の噴霧状態と加熱により生じる黒色のバックグラウンドがスポッ

表1 HPTLCにおける各成分スポットの R_f 値及び各種検出方法における呈色

成分名	R_f 値 — 展開溶媒 ^{a)}			呈色 — 検出方法 ^{b)}		
	A	B	C	①	②	③
シルデナフィル	0.17	0.41	0.35	吸収	青色	黄赤色
ホモシルデナフィル	0.31	0.51	0.48	吸収	青色	黄赤色
メチソシルデナフィル	0.26	0.49	0.43	吸収	青色	黄赤色
ヒドロキシホモシルデナフィル	0.17	0.44	0.25	吸収	青色	黄赤色
チオデナフィル	0.34	0.49	0.50	吸収	青色	黄赤色
ホモチオデナフィル	0.47	0.58	0.60	吸収	青色	黄赤色
チオアイルデナフィル	0.42	0.55	0.55	吸収	青色	黄赤色
ヒドロキシチオホモシルデナフィル	0.31	0.52	0.39	吸収	青色	黄赤色
ホンデナフィル	0.09	0.30	0.28	吸収	青色	鮮やかな 黄赤色
ヒドロキシホンデナフィル	0.05	0.24	0.11	吸収	青色	鮮やかな 黄赤色
バルデナフィル	0.28	0.51	0.43	水色	nd. ^{c)}	鮮やかな 黄赤色
タダラフィル	0.48	0.59	0.57	吸収	くすんだ 青色	nd.
ダボキセチン	0.52	0.58	0.67	吸収 (淡黒紫色)	くすんだ 黄色	鮮やかな 黄赤色
グリベンクラミド	0.06	0.41	0.06	吸収	淡い青色	nd.
カフェイン	0.35	0.49	0.45	吸収	nd.	淡い赤みの 黄赤色

a) 展開溶媒の組成は酢酸エチル/メタノール/アンモニア水 (28) 混液とし, その混合比は展開溶媒Aは (90 : 10 : 1), 展開溶媒Bは (70 : 30 : 1), 展開溶媒Cは (90 : 10 : 3) とした。

b) 検出方法として, ①は紫外線254 nm照射, ②は10%硫酸噴霧及び105℃10分間加熱後紫外線365 nm照射, ③はドラージェンドルフ試液噴霧及び10%硫酸噴霧とした。

c) 「nd」: 不検出

トの検出を阻害したことから、加熱時間を5分から10分に延長して十分に加熱し、併せて主波長365 nmの紫外線を照射することとした。その結果、シルデナフィル及びその類似成分のスポットでは、視覚的に特徴的な青色の発光が認められたほか、ダボキセチンではくすんだ黄色の発光が確認され、検出条件①よりも明瞭なスポットとして確認された。また、グリベンクラミドについては、過去の報告⁵⁾では検出条件②に類似した30%硫酸噴霧及び加熱後の紫外線254 nm照射によって水色の発光が明瞭に確認されているが、今回、紫外線照射の主波長を365 nmに変更したところ発光が弱く、微量の検出確認は困難と考えられた。なお、結果には示していないが、タダラフィルのスポットは10%硫酸噴霧後の加熱時に可視光下に特徴的な紫色を呈した。この呈色は過去の報告^{3,6)}と一致した。

検出条件③にて使用したドラーゲンドルフ試液はアミン及びアルカロイド等の検出に有効とされる発色試液であり、塩基性物質が多い医薬品成分の検出方法として選択性と有用性が高い。シルデナフィル、チオデナフィル及びそれらの構造類似成分のスポットは黄赤色を呈したが、ホンデナフィル、ヒドロキシホンデナフィル、ダボキセチン及びバルデナフィルのスポットはより鮮やかな黄赤色を呈し、呈色の状況にわずかな差異が見られた。また、カフェインは検出条件①のスポットとは異なり必ずしも明瞭ではないが、淡い赤みを帯びた黄赤色の呈色が観察された。一方、タダラフィルのスポットは明瞭な

スポットとしては検出されなかった。

なお、桑山らの報告¹³⁾によれば、ドラーゲンドルフ試液噴霧後の硫酸噴霧の効果については感度の向上等への影響はないとされている。しかし、我々の検討では分析対象成分のうちドラーゲンドルフ試液のみでスポットが呈色したのはダボキセチンのみであり、その他の成分は10%硫酸噴霧により初めてスポットの呈色が確認されたことから、検出の高感度化とスポットの色調の安定化に10%硫酸噴霧が有用であると考えられた。この要因として、ドラーゲンドルフ試液の調製方法の違いによる可能性がある。日本薬局方のドラーゲンドルフ試液の調製では酸として薄めた酢酸を用いているが、桑山らが最適化を行ったドラーゲンドルフ試液の調製では塩酸を使用しており、もともと試液としての酸性度が高いことも一因として考えられる。

以上の通り3種類の検出条件を検討したが、検出条件①はその簡便性及び汎用性の高さ故に、検出方法として第一選択となりうると考えられた。また、検出条件②及び③におけるスポットの呈色挙動は、シルデナフィル類似成分と R_f 値が近似したバルデナフィル及びタダラフィルとの識別などに有用であると考えられた。

検出限界については上記の検出条件のうち、検出条件①及び特徴的な青色の発光を示した検出条件②について検討を行った。その結果は表2のとおりであり、小数点以下第二位までの値とし、シルデナフィル及びダボキセチン是对塩を含まない値として示した。TLCによるスクリーニング用途としては、分析対象としたシルデナフィル及びその類似成分についてはいずれの検出方法でも十分な検出感度を有すると考えられた。また、前述のとおり、ダボキセチンについては検出条件②におけるくすんだ黄色のスポットが特徴的かつ高感度であり、検出条件①による感度不足を補うことができると考えられた。

まとめ

HPTLCシリカゲルプレートによるシルデナフィル及びその類似成分等の分離挙動について検討を行い、その化学構造への修飾によるスポットの R_f 値への影響を確認した。また、展開溶媒として、酢酸エチル/メタノール/アンモニア水(28)混液(90:10:3)の組成が分離に最適であった。さらに、スポットの検出方法として紫外線254 nm照射のほか、発色試液の使用により特徴的な検出が可能であった。

本検討にて得られた展開溶媒組成及び検出条件については、今後、分析対象とする医薬品成分を拡大してデータを蓄積していく上で基本条件とし、いわゆる健康食品及び危険ドラッグの検査におけるスクリーニング法とし

表2 分析対象成分の検出限界

成分名	検出方法 ^{a)} (μ g)	
	①	②
シルデナフィル	0.05	0.05
ホモシルデナフィル	0.08	0.05
メチソシルデナフィル	0.08	0.08
ヒドロキシホモシルデナフィル	0.08	0.08
チオデナフィル	0.05	0.05
ホモチオデナフィル	0.05	0.05
チオアイルデナフィル	0.08	0.08
ヒドロキシチオホモシルデナフィル	0.08	0.05
ホンデナフィル	0.05	0.08
ヒドロキシホンデナフィル	0.05	0.08
バルデナフィル	0.08	— ^{b)}
タダラフィル	0.10	0.05
ダボキセチン	0.45	0.05
グリベンクラミド	0.25	0.25
カフェイン	0.08	—

a) 検出方法①は紫外線254 nm照射、②は10%硫酸噴霧及び105℃10分間加熱後紫外線365 nm照射とした。いずれの値も小数点以下第三位を四捨五入して小数点以下第二位まで示した。

b) 「—」：検討対象外

て活用できると考えている。

謝 辞

実験にあたりご協力をいただきました当所理化学部の鈴木麻希氏に深謝いたします。

参考文献

- 1) 守安貴子, 重岡捨身, 岸本清子, 石川ふさ子, 中嶋順一, 上村尚ほか: 健康食品中に含有するシルデナフィルの確認試験, 薬学雑誌, **121**, 765-769 (2001)
- 2) Mikami, E., Ohno, T. and Matsumoto, H.: Simultaneous identification/determination system for phentolamine and sildenafil as adulterants in soft drinks advertising roborant nutrition, Forensic Science International, **130**, 140-146 (2002)
- 3) 熊坂謙一, 松阪綾子, 麻生順子, 宮澤真紀, 小島尚: 薄層クロマトグラフィーを活用した医薬品成分を含有する健康食品の分析, Chromatography, **28**, 37-42 (2007)
- 4) Do, T.T.K., Theocharis, G. and Reich, E.: Simultaneous detection of three phosphodiesterase type 5 inhibitors and eight of their analogs in lifestyle products and screening for adulterants by high-performance thin-layer chromatography, Journal of AOAC International, **98**, 1226-1233 (2015)
- 5) Kumasaka, K., Kojima, T., Honda H. and Doi, K.: Screening and quantitative analysis for sulfonylurea-type oral antidiabetic agents in adulterated health food using thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography, Journal of Health Science, **51**, 453-460 (2005)
- 6) 守安貴子, 蓑輪佳子, 岸本清子, 坂本美穂, 門井秀郎, 中嶋順一ほか: 健康食品に含有される医薬品成分の分析, 東京都健康安全研究センター研究年報, **62**, 25-39 (2011)
- 7) 合田幸広: 国立医薬品食品衛生研究所における痩身や強壯を標榜する健康食品中の医薬品成分の分析と同定, 薬学雑誌, **134**, 197-202 (2014)
- 8) 厚生労働省:健康被害情報・無承認無許可医薬品情報 <<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyounin.html>>
- 9) 国立健康・栄養研究所:「健康食品」の安全性・有効性情報－安全情報・被害関連情報 <<https://hfnet.nih.go.jp/contents/index1.html>>
- 10) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知: ヒドロキシチオホモシルデナフィルの分析方法について, 薬食監麻発0301第8号 (平成22年3月1日)
- 11) 厚生労働省告示第65号: 第十六改正日本薬局方 (平成23年3月24日)
- 12) 医薬品インタビューフォーム 経口血糖降下剤オイグルコン錠 中外製薬株式会社
- 13) 桑山健次, 辻川健治, 宮口 一, 金森達之, 岩田祐子, 井上博之ほか: 薄層クロマトグラフィーにおけるドラージェンドルフ試液調製法の違いによる検出感度への影響, 法科学技術, **10**, 127-133 (2005)

資料

神奈川県における腸管出血性大腸菌の
検出状況（平成27年度）

古川一郎，政岡智佳，石原ともえ，相川勝弘，
黒木俊郎

Occurrence of enterohemorrhagic
Escherichia coli in Kanagawa
Prefecture (April, 2015-March, 2016)

Ichiro FURUKAWA, Tomoka MASAOKA,
Tomoe ISHIHARA, Katsuhiro AIKAWA
and Toshiro KUROKI

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*：以下，EHECと略す）感染症は、「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10年10月2日法律第114号）で三類感染症に分類され，EHEC感染症の患者と診断した医師は，保健所を経由して都道府県知事に届け出なければならない¹⁾。さらに，分離された菌株はそれぞれの地方衛生研究所（以下，地研と略す）に集められ，生化学的性状，血清型，毒素型等を確認したのち，地研は「病原性大腸菌O-157の検体

提供依頼について」（平成8年6月19日付，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）細菌第一部に菌株を送付している。感染研は，全国から送付された菌株について分子疫学的調査を実施し，全国レベルの大規模な集団発生や散発的集団発生を探知することにより感染の拡大防止に努めている。2014年度から，感染研で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）に代わり，EHECの主要な血清型であるO157，O26およびO111についてMLVA；Multilocus variable-number tandem-repeat analysisを用いた解析が実施され，その結果は各自自治体へ報告されている。

さらに，溶血性尿毒症症候群（以下，HUSと略す）発症者については，便からのベロ毒素（以下，VTと略す）の検出，血清中のO抗原凝集抗体あるいはVT抗体の検出によって診断された場合も届出の対象となっており¹⁾，当所においても搬入された血清について，EHEC加熱死菌により抗体の確認を行っている。

当所では，毎年神奈川県域（横浜市，川崎市，相模原市および横須賀市を除く神奈川県内，以下，県域と略す）から集まったEHECについては，血清型別，VT型別，薬剤感受性試験およびPFGE解析を，またO157についてはスクリーニング法として用いられているIS-printing法（以下，IS法と略す）も実施し，HUS発症者の血清についてはEHEC加熱死菌による抗体の確認を行っている。本報では，平成27年度に収集したEHEC57株とHUS発症者血清1検体の結果について報告する。

表1 EHEC 57株の血清型およびVero毒素型（平成27年度）

施 設	O157			O26	O111	O103	OUT※		菌株数
	VT1&2	VT1	VT2	VT1	VT1&2	VT1	VT1&2	VT1	
厚木保健福祉事務所	2	1	3			1			7
同上 大和センター	2								2
平塚保健福祉事務所	5		1		2				8
同上 秦野センター				1					1
茅ヶ崎保健福祉事務所	4								4
小田原保健福祉事務所	3			8	1				12
同上 足柄上センター	1			4					5
鎌倉保健福祉事務所			1					1	2
食肉衛生検査所				2		1	1		4
藤沢市保健所	6		3	3					12
計（割合）	23 (40.4%)	1 (1.8%)	8 (14.0%)	18 (31.6%)	3 (5.3%)	2 (3.5%)	1 (1.8%)	1 (1.8%)	57

※ UT； 型別不能（市販血清に凝集せず）

表2 患者・保菌者の年齢構成および性別

年齢層	男性	女性	計
0-5	5	2	7
6-10	2	0	2
11-20	4	7	11
21-30	3	8	11
31-40	1	4	5
41-50	2	3	5
51-60	1	3	4
61-70	1	3	4
>70	2	3	5
計	21	33	54

EHEC57株の内訳は、県域の医療機関や保健福祉事務所からのヒト由来株44株、当所地域調査部において患者家族および一般の検便から分離された9株、食肉衛生検査所からのウシ由来の4株であった。HUS患者血清は県域の医療機関から1検体搬入された。これら57株

の血清型およびVT型は、O157(VT1&2) 23株、O157(VT2) 8株、O157(VT1) 1株、O26(VT1) 18株、O111(VT1&2) 3株、O103(VT1) 2株、O型別不能(以下、UTと略す)(VT1&2) 1株、OUT(VT1) 1株であった(表1)。このうちO26(VT1) 1株およびO111(VT1&2) 1株は同時期に同一患者から分離された。HUS患者血清1検体については、O121の血清抗体が確認された。菌株が分離された患者および保菌者について、性別および年齢構成を表2に示した。年齢の範囲および人数は、男性が0～85歳で21人、女性が1～94歳で33人、年齢の平均は男性27.5歳、女性は36.9歳であった。

PFGE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時間行った。泳動の結果はBioNumerics (Applied Maths社)を用いてクラスター解析を行い、デンドログラムを作成した。O157については、IS-printing system (TOYOBO)を用いて解析し、付属の説明書に従ってPCR法を実施した後、32箇所の遺伝子の有無により菌株の識別を試みた。菌株数の多いO157(VT1&2)、O157(VT2)およびO26(VT1)について、PFGEパターンを基にデンドログラムを作成し、IS法の結果を記号で表記した(図1、図2、図3)。

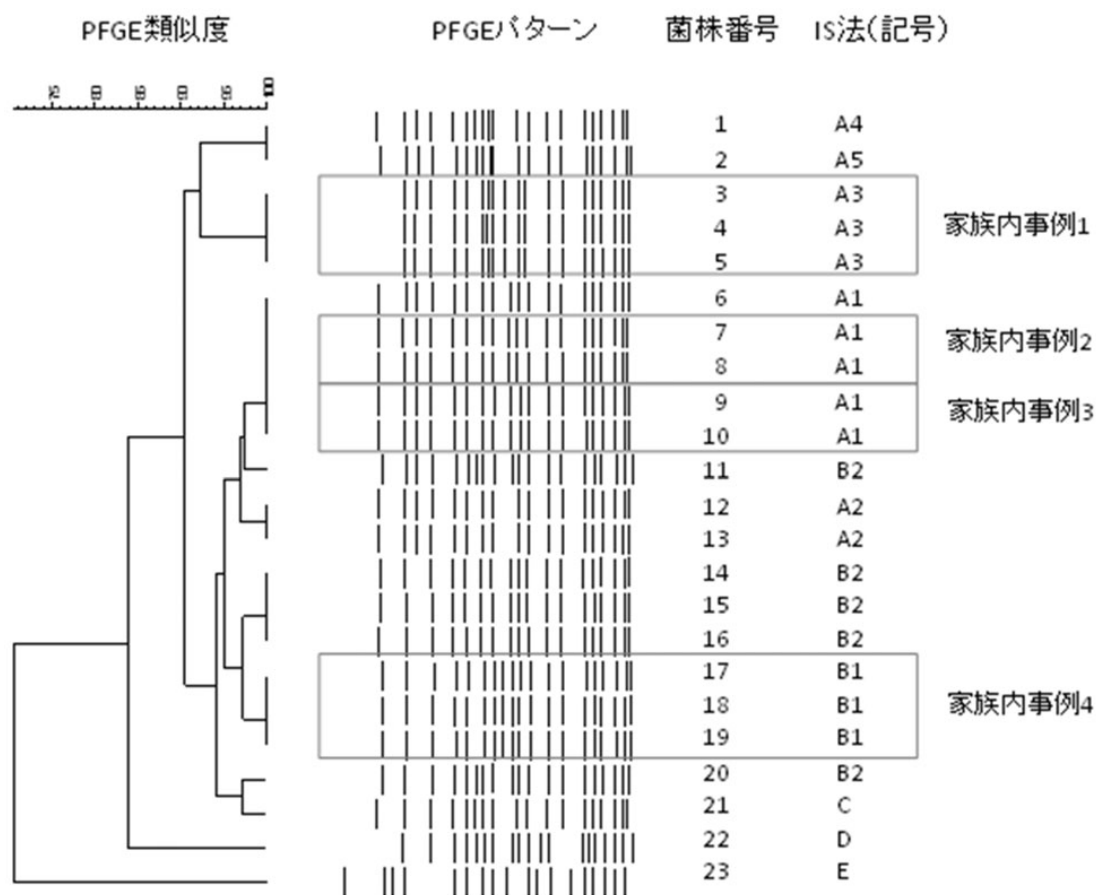


図1 EHEC O157 (VT1&2) の遺伝子解析結果

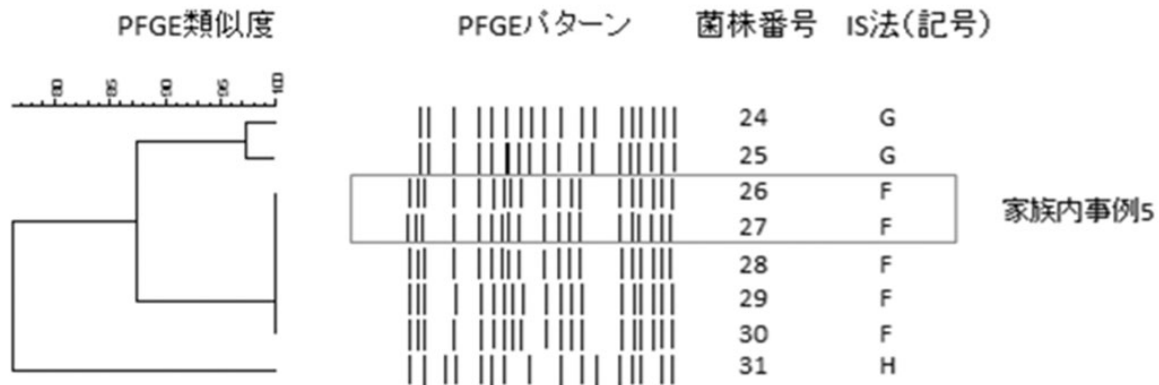


図2 EHEC O157 (VT2) の遺伝子解析結果

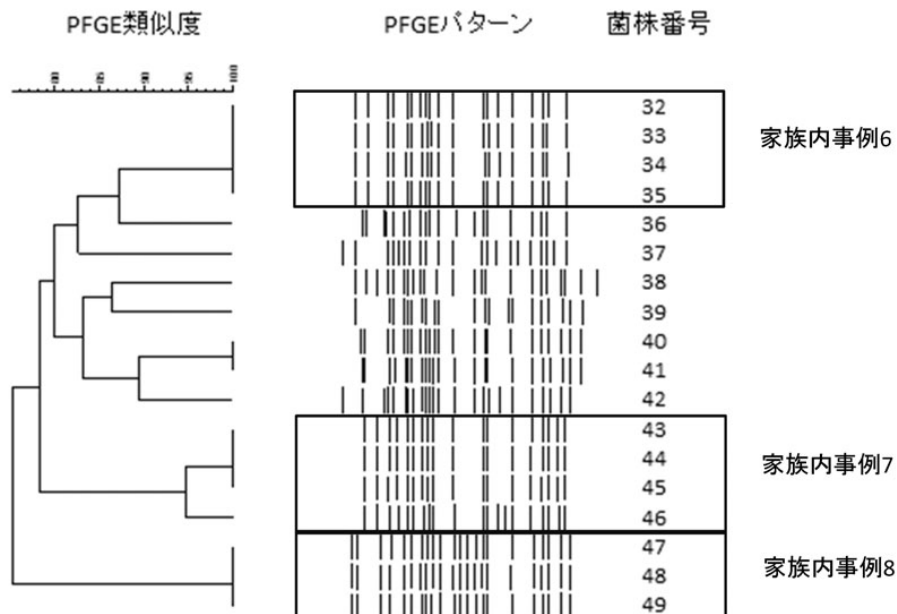


図3 EHEC O26 (VT1) の遺伝子解析結果

O157(VT1&2)の遺伝子解析の結果、4つの家族内での感染事例においては、いずれの事例もPFGEおよびIS法の遺伝子パターンはそれぞれの事例ごとに一致していた。家族内事例2および3の分離株を含む菌株No.6～No.10の5菌株については、同一家族以外に疫学的関連は認められなかった。菌株No.12およびNo.13、さらに菌株No.14～No.16は、PFGEおよびIS法の結果がそれぞれ一致していたが、いずれも疫学的な関連は認められなかった。

O157(VT2)の遺伝子解析の結果、家族内事例5から分離された2菌株を含むNo.26～No.30の5菌株は、PFGEおよびIS法の結果が一致していたものの、疫学的な関連は認められなかった。

平成27年度に搬入されたEHECの菌株数は、平成26年度の77菌株から57菌株と全体としては減少したが、O26(VT1)は平成26年度の7株を上回り18菌株であった。

表3 患者・保菌者の年齢構成および性別

	耐性薬剤	血清型	菌株数
5剤	ABPC, KM, SM, ST, TC	O111 VT1&2	1
3剤	ABPC, SM, ST	O26 VT1	3
	ABPC, SM, TC	O26 VT1	1
2剤	SM, TC	O157 VT2	1
	ABPC, SM	O26 VT1	1
単剤	CP	O26 VT1	1
	ST	O157 VT1&2	1
中間値	SM	O157 VT1	1
		O157 VT2	1
		O26 VT1	1
	CP	O157 VT1&2	1
	FOM	O26 VT1	1
感受性			43
計			57

PFGEによるO26(VT1)の遺伝子解析の結果、家族内事例6および8は、事例ごとにPFGEパターンが一致していた。家族内事例7から分離されたNo.43～46の4菌株は、菌株No.46のみPFGEのバンド2本分が異なっていたが、他の3菌株との類似度は約95%と高い値を示しており、同一感染源由来の可能性が強く示唆された。また、食肉衛生検査所から搬入されたウシ由来の2株(No.40, No.41)は同時期に分離されており、PFGEパターンも一致していた。

この他、O111(VT1&2)の2株は、疫学調査の結果から同一店舗の焼肉店を利用した患者2名から分離されており、PFGEが一致していた。O103(VT1)の2株は、ヒト由来とウシ由来であったが、PFGEパターンの類似度が95%と高い値を示した。

次に、EHEC57株について、アミノベンジルペニシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、クロラムフェニコール(CP)、ホスホマイシン(FOM)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、ストレプトマイシン(SM)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST)およびテトラサイクリン(TC)の11薬剤についてCLSI(米国臨床検査標準化協会)法²⁾に準拠して薬剤感受性試験を実施した(表3)。その結果、9株がいずれかの薬剤に耐性を示し、この内7株は多剤耐性であった。5株は中等度耐性を示した。57株中43株が供試した11薬剤に感受性であった。

今回、大規模な集団事例は起きなかったものの、家族内における感染事例が8例確認され、一般家庭に対してEHECの感染防止に向けた啓発が改めて必要と思われた。血清型別に見ると、O26の感染事例が増加し、さらに、

市販の血清では判定できないEHECが2株確認され、O157等の主要な血清型はもちろんであるが、これら以外の血清型についても動向を注視する必要がある。

EHECの散発および集団事例に対しては迅速に原因菌を探知して拡大を防止しなければならない。当所ではEHECの遺伝子解析の結果が一致した場合は、直ちにEHEC感染症の届出のあった保健福祉事務所にこの結果を報告して情報の共有化を図っている。今後もPFGEを中心とした遺伝子解析を行うことにより、EHEC感染症の原因究明および広域的な集団発生の把握に努めたいと考える。

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、衛生研究所地域調査部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、食品衛生課、健康危機管理課ならびに藤沢市保健所の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) 腸管出血性大腸菌感染症：病原微生物検出情報. 27, 149(2006)
- 2) 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

神奈川県におけるインフルエンザの 流行状況 (2015/2016シーズン)

渡邊寿美, 嘉手苅将, 佐野貴子, 近藤真規子,
黒木俊郎

Epidemic of influenza in Kanagawa Prefecture(2015/2016 season)

Sumi WATANABE, Sho KADEKARU,
Takako SANO, Makiko KONDO
and Toshiro KUROKI

神奈川県域（横浜市，川崎市，相模原市および横須賀市を除く神奈川県内，以下県域）における季節性インフルエンザ（AH1pdm09, AH3, B）の動向を把握するため，通年で季節性インフルエンザ調査を行っている．また，AH5, AH7等の鳥インフルエンザのヒト感染事例が報告されている地域からの帰国者等，鳥インフルエンザ感染が疑われる患者に対しては，季節性インフルエンザの他に鳥インフルエンザのAH5とAH7も組み込んだ病原体検査対応を行っている．2015/2016シーズン（以下本シーズン）におけるインフルエンザウイルスの動向を報告する．

本シーズンの患者報告数は，2016年1週（1/4～10）に流行開始の目安となる定点あたり患者報告数1.0人を超えた後，3週（1/18～24）に注意報レベルの10.0人を，5週（2/1～7）に警報レベルの30.0人を超えた．その後患者報告数は減少に転じ，12週（3/21～27）には8.01人となって注意報レベルを下回り，流行は終息に向かっていると思われた．なお，患者発生のピークは5週の46.71人であった．本シーズンのインフルエンザ患者報告数は，例年と同様に推移した（図1）．本シーズンのウイルス調査は，2015年36週（8/31～9/6）～2016年13週（3/28～4/3）の間にウイルスサーベイランス（県域の病原体定点調査）と入院サーベイランス（県域のインフルエンザと診断された入院症例），集団かぜ調査（県域保健福祉事務所・保健所管内の初発事例）および鳥インフル

エンザ感染疑い症例として採取された検体を対象に行った．ウイルスサーベイランスの検体は392例，入院サーベイランスの検体は14例，集団かぜの検体は10集団39例，鳥インフルエンザ感染疑い症例1例，計446例であった．検査はリアルタイムRT-PCR法による遺伝子検出とMDCK細胞によるウイルス分離を行った（一部の検体については，ウイルス分離あるいは遺伝子検出のどちらか一方のみを実施した）．遺伝子検出はインフルエンザウイルスのHA遺伝子を対象とし，AH1pdm09, AH3, Bの型別を行った．また，ウイルス分離株は，国立感染症研究所から配付された標準抗血清とモルモット血球を用いた血球凝集抑制反応を実施し，AH1pdm09, AH3, Bビクトリア系統，B山形系統に型別した．

インフルエンザウイルスの検出状況を図1に示した．本シーズンに入ってからすぐの2015年36週に鳥インフルエンザ感染疑い症例の検査依頼があった．該当患者は中国からの帰国者で，検査の結果AH3が検出された．また，37週（9/7～13）には早くも初発集団かぜの発生があり，この集団からはAH3が検出され，43週（10/19～25）に発生した2例目の集団からはAH1pdm09が検出された．定点医療機関の検体からは9月～10月にかけてAH1pdm09, AH3, Bが検出されており，本シーズンは，AH1pdm09とAH3とBの混合流行になると思われたが，12月以降はAH1pdm09の検出が増え，本シーズンの主流となった．検出されたインフルエンザウイルスは397例で，その内訳は，AH1pdm09が223例（56%）で最も多く，Bが125例（32%），AH3が49例（12%）であった（図2）．インフルエンザウイルス検出例のうちウイルスが分離できたのは288例で，AH1pdm09が190株，Bが74株，AH3が24株であった．

インフルエンザウイルス検出者の年齢構成は，5～9歳が最も多く31%，次いで10～14歳が16%，0～4歳が11%となっており，14歳以下が58%を占めた．他の年齢群は3～10%であった（図3）．検出型別の年齢構成を見ても，AH1pdm09, AH3, B共に全体の年齢構成と同様の傾向を示し，0～14歳が多かった．

入院症例14例の鼻咽頭拭い液についてインフルエンザウイルスの検出を行ったところ，9例からAH1pdm09, 3例からBが検出され，2例は不検出であった．14例の入院患者は，2016年1～10週に発生しており，流行のピーク時期と一致する．入院患者の年齢構成は，小児が12例（0～11歳），高齢者が2例（81歳と90歳）であり，AH1pdm09が検出された小児7例のうち4例は，脳症，意識障害等の中枢神経系症状を呈していた（表1）．

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県域保健福祉事務所・保健所職員の皆様には深謝いたします。

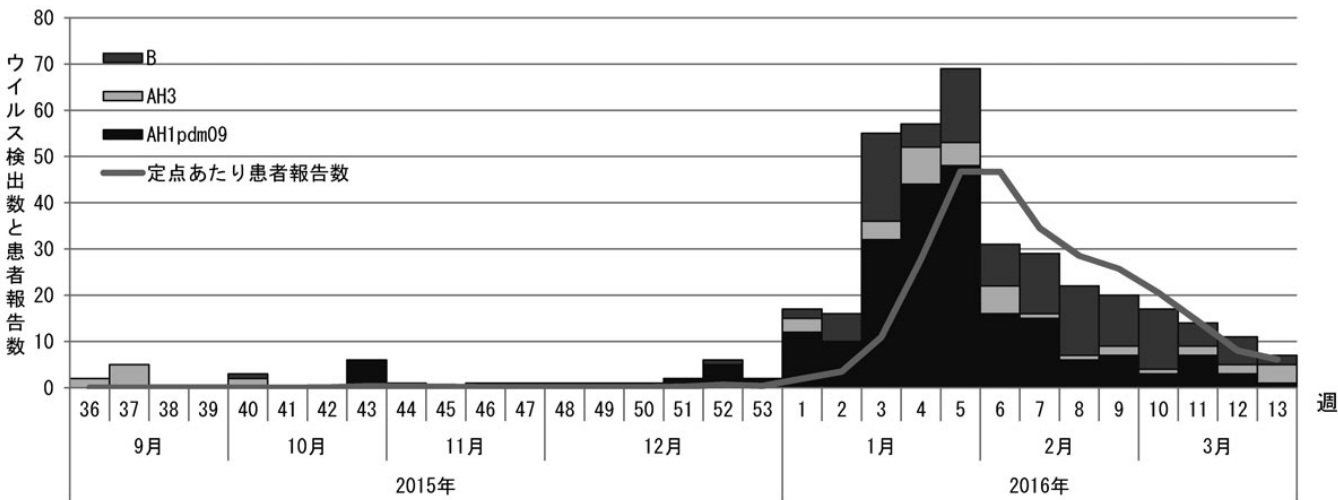


図 1 インフルエンザウイルス検出数と患者報告数の推移

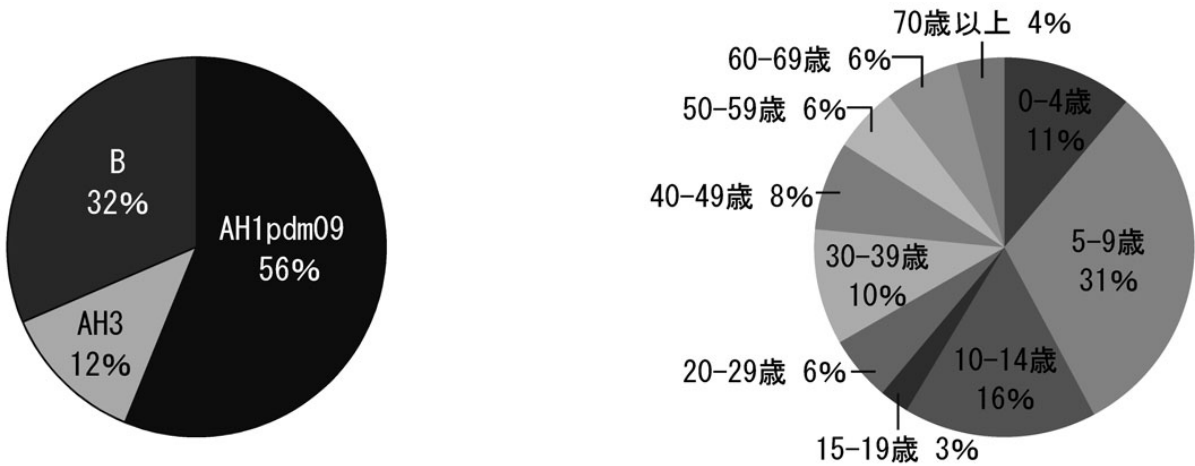


図 2 インフルエンザウイルス検出割合

図 3 インフルエンザウイルス検出者の年齢構成

表 1 入院症例のインフルエンザウイルス検査成績

症例	検体採取週	年齢	臨床症状	インフルエンザウイルス検出
1	2016年1週	5歳	発熱（39℃）、上気道炎、脳炎、脳症	AH1pdm09
2	3週	7歳	発熱（40℃）、胃腸炎	B
3	4週	4歳	発熱（38℃）、肺炎	AH1pdm09
4	4週	11歳	発熱（40.2℃）、上気道炎、意識障害、脳症	AH1pdm09
5	5週	0歳	上気道炎	B
6	5週	81歳	発熱（38.9℃）、胃腸炎	AH1pdm09
7	5週	90歳	発熱（39.5℃）	AH1pdm09
8	6週	3歳	発熱（40.5℃）、意識障害、痙攣	AH1pdm09
9	7週	10歳	発熱（40℃）、脳症	AH1pdm09
10	8週	1歳	発熱（40℃）、上気道炎、下気道炎	不検出
11	8週	6歳	発熱（40℃）、上気道炎	B
12	8週	4歳	発熱（40℃）、上気道炎、肺炎、結膜炎	AH1pdm09
13	9週	8歳	発熱（40℃）、上気道炎	AH1pdm09
14	10週	1歳	発熱（39.1℃）、気管支炎	不検出

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27年度）

鈴木理恵子，金城恵子，高橋淳子，
近藤真規子，黒木俊郎

Surveillance of viral gastroenteritis in
Kanagawa Prefecture
(April, 2015－March, 2016)

Rieko SUZUKI, Keiko KINJO, Junko TAKAHASI,
Makiko KONDO and Toshiro KUROKI

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、神奈川県域（川崎市，横浜市，相模原市，横須賀市および藤沢市を除く）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。ウイルスを原因とする感染性胃腸炎は、例年冬期に多くの流行がみられ、冬期前半には乳幼児から成人に至るまで幅広い年齢層でノロウイルスによる胃腸炎、冬期後半を中心に乳幼児にみられるA群ロタウイルスによる胃腸炎の流行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，サポウイルス，アストロウイルス，C群ロタウイルスも検出されている。また、冬期以外でも幼稚園や小学校および老人福祉施設でノロウイルス，A群ロタウイルス，サポウイルスおよびC群ロタウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生報告

があることから、時期・年齢に関わらず複数のウイルスの検索を行っている。

平成27年4月から平成28年3月に感染性胃腸炎と診断された患者の便86検体について、ノロウイルス，サポウイルス，アストロウイルス，アデノウイルス，A群ロタウイルスおよびC群ロタウイルスの検索を行った。ウイルスの検出は、ノロウイルスには定量PCR，サポウイルス，アストロウイルス，アデノウイルス，A群ロタウイルスおよびC群ロタウイルスはRT-PCRによる遺伝子検出を行った。また、検出された各種ウイルスの一部について、ダイレクトシークエンス法を用いて塩基配列を決定し、系統樹解析（NJ法）による型別を実施した。

表1に年齢別ウイルス検出状況を示した。86検体中25検体から原因ウイルスが検出され、その内訳は、ノロウイルス20株（80.0%），アストロウイルス5株（20.0%）であり、サポウイルス，アデノウイルス，A群ロタウイルス及びC群ロタウイルスは検出されなかった。ノロウイルスは全ての年齢群から検出され、アストロウイルスは検体数が少ない13歳～22歳および65歳以上の年齢群からは検出されなかった。

月別のウイルス検出状況を表2に示した。25株のウイルスのほとんどは冬期に検出され、平成27年5月，7月，8月および10月には検出されなかった。ノロウイルス25株の遺伝子型はすべてGⅡで、ノロウイルスに汚染された貝類等に起因する食中毒事例に多いGⅠとGⅡの同時検出例はみられなかった。

今回検出されたノロウイルスGⅡ20株のうち遺伝子型の解析が可能であった17株について、VP1領域の系統樹を図1に、月別の遺伝子型別状況を表3に示した。ノロウイルスGⅡの遺伝子型はGⅡ.1からGⅡ.22の22種類に分類される。系統樹解析の結果、GⅡ.17が9株，GⅡ.4が4株，GⅡ.3が3株，GⅡ.2が1株であった。GⅡ.17の9株は、平成26年秋に川崎市で報告されたGⅡ.17変異型（GⅡ.P17－GⅡ.17）株と同じクラスター

表1 年齢別ウイルス検出状況（平成27年4月～平成28年3月）

	検体数	陽性検体数	検出ウイルス数(%)						合計(%)
			ノロウイルス	サポウイルス	アストロウイルス	アデノウイルス	A群ロタウイルス	C群ロタウイルス	
6歳以下	35	8	7	0	1	0	0	0	8
7歳～12歳	15	6	4	0	2	0	0	0	6
13歳～22歳	3	1	1	0	0	0	0	0	1
23歳～64歳	31	9	7	0	2	0	0	0	9
65歳以上	2	1	1	0	0	0	0	0	1
合計	86	25	20 (80.0)	0	5 (20.0)	0	0	0	25 (100.0)

表 2 発病月別ウイルス検出状況

年 月	検出ウイルス数							合計
	ノロウイルス		サポウイルス	アストロウイルス	アデノウイルス	A群ロタウイルス	C群ロタウイルス	
	GⅠ ¹⁾	GⅡ ²⁾						
平成27年 4月	0	1	0	2	0	0	0	3
5月	0	0	0	0	0	0	0	0
6月	0	0	0	2	0	0	0	2
7月	0	0	0	0	0	0	0	0
8月	0	0	0	0	0	0	0	0
9月	0	1	0	0	0	0	0	1
10月	0	0	0	0	0	0	0	0
11月	0	1	0	0	0	0	0	1
12月	0	3	0	0	0	0	0	3
平成28年 1月	0	6	0	1	0	0	0	7
2月	0	5	0	0	0	0	0	5
3月	0	3	0	0	0	0	0	3
小計	0	20						
合計	20		0	5	0	0	0	25

1: genogroupⅠ
2: genogroupⅡ

を形成し、G II.4の4株は、平成24年9月以降に全国で流行したG II.4変異型（G II.4 Sydney2012）と同じクラスターを形成していた。神奈川県域におけるG II.17変異型は、平成27年4月、11月、平成28年2月、3月に検出され、平成27年度の主要流行株であった。全国のノロウイルス主要流行株は、平成26年12月まではG II.4変異型であったが、その後、G II.17変異型に入れ替わりが起きた。G II.17変異型ノロウイルスの出現は、ノロウイルスによる感染性胃腸炎の大流行を予測させたが、感染性胃腸炎患者発生数は、例年になく少なく推移し大流行に至らなかった（図2）。

アストロウイルスは、平成27年4月と6月に2株ずつ、平成28年1月に1株、計5株が検出され、遺伝子型は全て1型であった。

平成23年度以降、検出数の多いノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス等について系統樹解析（NJ法）による型別を実施し、流行ウイルスの遺伝子学的特徴を調査している。感染経路の推定や流行の動向を把握するためには、系統樹解析による型別が有効である。さらに新型ウイルスを探知できた場合には、予防対策を早期に講じ、感染症の発生を未然に防ぐために、今後も継続して実施する予定である。また、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、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および本事業にご尽力いただきました県健康危機管理課の方々に深謝いたします。

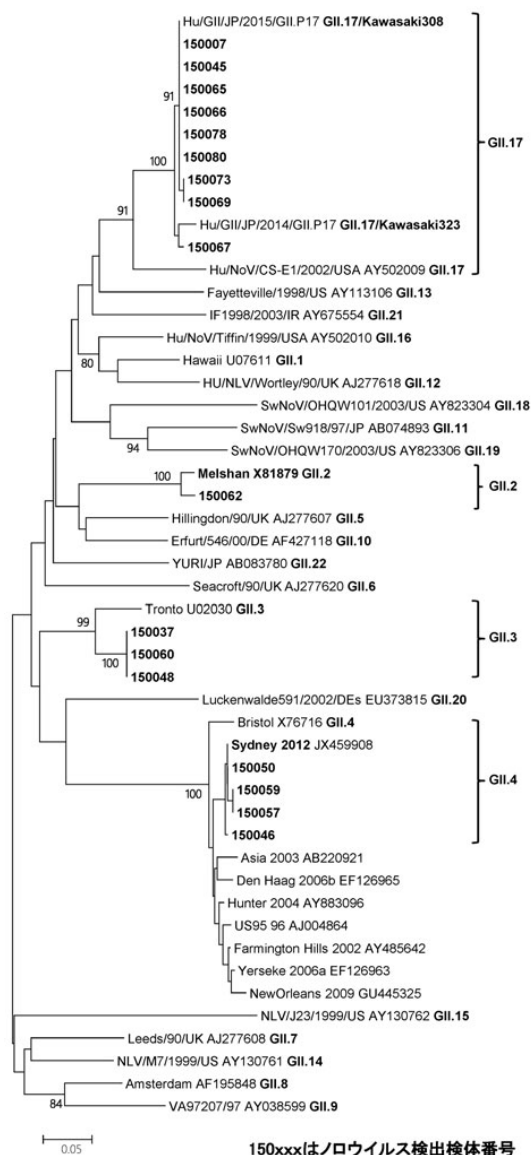


図1 ノロウイルスのV P1領域の系統樹(340bp)

表3 ノロウイルスGⅡ遺伝子型別状況

年 月	型別実施数	遺伝子型			
		GⅡ. 2	GⅡ. 3	GⅡ. 4	GⅡ. 17
平成27年 4月	1				1
5月					
6月					
7月					
8月					
9月	1		1		
10月					
11月	1				1
12月	3		1	2	
平成28年 1月	4	1	1	2	
2月	5				5
3月	2				2
合計	17	1	3	4	9

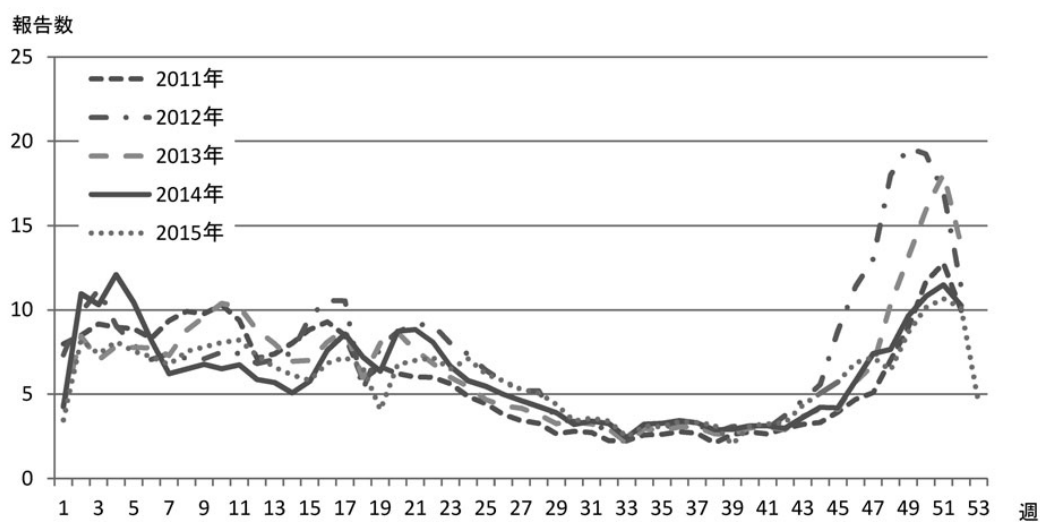


図2 感染性胃腸炎患者定点あたりの報告数（全国）

資料

神奈川県における過去10年間のアレルギーを含む食品の検査結果について
(平成18～27年度)

秋山晴代, 渡邊裕子*, 甲斐茂美, 宮澤眞紀

Summary of inspection of allergen-containing foods in Kanagawa prefecture accumulated in past 10 years (fiscal year 2006-2015)

Haruyo AKIYAMA, Hiroko WATANABE,
Shigemi KAI and Maki MIYAZAWA

市販の加工食品や添加物などアレルギーを含む食品については、食物アレルギー患者の健康被害発生を防止する目的で「特定原材料」の表示が食品表示法¹⁾により義務づけられている。平成28年5月現在、食物アレルギーを引き起こすことが明らかになった食品のうち、症例数が多いものや症状が重篤な7品目(えび、かに、卵、乳、小麦、そば、落花生)が食品表示基準²⁾により特定原材料として規定されている。アレルギーを含む食品の検査方法については、平成14年に食発第1106001号厚生労働省医薬局食品保健部長通知において「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」が示されており、食品表示の所管が消費者庁に移管された後も、検査技術の進歩に対応して順次見直しが行われている(平成22年9月10日消食表第286号)。平成17年の検査法改正では³⁾、変性タンパク質を可溶化する目的でドデシル硫酸ナトリウム(SDS)及び2-メルカプトエタノール(2-ME)を含有した抽出液を用いた方法が提示されているが⁴⁾、従来標準品規格として用いていた2-MEが平成20年に毒物指定されたことを受け(毒物及び劇物指定令の一部を改正する政令(平成20年政令第199号))、平成26年3月26日消食表第36号により亜硫酸ナトリウムに変更となっ

ている。

神奈川県衛生研究所では、特定原材料の表示欠落やコンタミネーションを監視する目的で平成15年より加工食品におけるアレルギーの調査を行っており⁵⁾、平成17年の検査法改正にも適切に対応してきた⁶⁾。検査では通知で規定された性能基準を満たした特性の異なる2種類の検査キットを用いて判定している。今回、平成26年の検査法改正⁷⁾の前後である、平成18年度から27年度までの10年間の県内アレルギー(卵、乳、そば、えび・かに)検査結果のほか、卵に関しては平成26年度に同一サンプルを用いて2-MEを使用する旧検査法と亜硫酸ナトリウムを使用する新検査法の両方を実施したのでその結果について報告する。

試料は神奈川県内で流通した食肉製品、水産物加工品、菓子類等でいずれも特定原材料表示がないものを用いた。検査キットは旧検査法では(株)森永生化学研究所製FASTKITエライザVer.IIシリーズ卵、同シリーズ乳、同シリーズ

表1 神奈川県衛生研究所における平成18年度から27年度までの各種アレルギーの検査結果

アレルギー	年度	検体数	検出検体数 ¹⁾	陽性検体数 ²⁾	測定キット
乳	H18(2006)	20	2	0	旧
	H19(2007)	19	1	0	旧
	H20(2008)	20	1	0	旧
	H21(2009)	20	1	0	旧
	H22(2010)	20	0	0	旧
	H23(2011)	20	0	0	旧
	H25(2013)	20	1	1	旧
	H27(2015)	20	0	0	新
計		159	6(3.8%)	1(0.6%)	
卵	H19(2007)	19	1	1	旧
	H20(2008)	20	2	0	旧
	H21(2009)	19	1	0	旧
	H22(2010)	20	0	0	旧
	H24(2012)	20	0	0	旧
	H26(2014)	20	0	0	新
計		118	4(3.4%)	1(0.8%)	
そば	H21(2009)	20	0	0	旧
えび・かに	H23(2011)	20	4	0	旧
	H24(2012)	20	1	1	旧
計		40	5(12.5%)	1(2.5%)	
全て	合計	337	15(4.5%)	3(0.9%)	

1) (株)森永生化学研究所製、日本ハム(株)製キットいずれかで1μg/g以上を示した検体数(検出率%)
2) 両キットで10μg/g以上の陽性を示した検体数(陽性率%)
定量限界値: 1μg/g, 判定基準: 10μg/g以上

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
akiyama.uik@pref.kanagawa.jp
*現 企画情報部

表2 平成26年度に実施した特定原材料（卵）における新・旧検査方法の比較結果

No.	検体	検体分類	日本ハム(株)製キット ¹⁾		(株)森永製キット ²⁾	
			卵 (μg/g)		卵白アルブミン (μg/g)	
			旧	新	旧	新
1	牛乳菓子原料	その他の菓子 菓子原料	0	0	0	0
2	プリン原料	その他の菓子 菓子原料	0	0	0	0
3	魚肉ソーセージ	魚肉ねり製品	0.5	0.5	0	0.1
4	笹かまぼこ	魚肉ねり製品	0.3	0.3	0	0
5	かに風味かまぼこ	魚肉ねり製品	0.3	0.3	0	0
6	クリスピーピザ	その他の穀類加工品	0	0	0	0
7	パン	その他の穀類加工品	0	0	0	0
8	チョコビスケット	その他の菓子	0	0	0	0
9	卵なしマヨネーズ	その他の食品	0	0	0	0.1
10	玉ねぎボール	魚肉ねり製品	0.5	0.5	0	0
11	皮なしウインナー	加熱後包装食肉製品	0.1	0.1	0	0
12	チョコプリン	洋菓子	0	0	0	0.1
13	さつま揚げ	魚肉ねり製品	0.1	0.1	0	0
14	かまぼこ	魚肉ねり製品	0.4	0.4	0	0
15	焼そば	めん類	0	0	0	0
16	チルドシウマイ	その他の食品	0.2	0.2	0	0
17	ちくわ	魚肉ねり製品	0.5	0.5	0	0
18	かまぼこ	魚肉ねり製品	0.1	0.1	0	0
19	なると巻	魚肉ねり製品	0.1	0.1	0	0
20	梅がゆ	容器包装詰加圧加熱殺菌食品	0	0	0	0

1) 旧：FASTKITエライザVer.Ⅱシリーズ卵／新：FASTKITエライザVer.Ⅲシリーズ卵

2) 旧：FASPEK特定原材料キット卵白アルブミン／新：FASPEKエライザⅡ卵（卵白アルブミン）

アルブミン）、同牛乳（β-ラクトグロブリン）及び日本ハム（株）製FASTKITエライザVer.Ⅲシリーズ卵、同牛乳を用いた。使用機器及び測定条件は既報⁵⁾及びそれぞれの検査キットの取扱説明書に従った。

表1に平成18年度から27年度までの各種アレルギーの検査結果をまとめた。乳に関しては、159検体中陽性（10μg/g以上）と判定されたのは1検体（0.6%）（どら焼き（和生菓子））で、乳表示の欠落が原因だった。この他に1μg/g以上を示した検体が5検体（ふがし、ロースハムスライス、あらびきウインナー、こんにやくラーメン、ロースハム）あったが、いずれも日本ハム（株）製キットでのみ検出され定量限界値に近い値だった。卵に関しては、118検体中1検体で陽性と判定された（20μg/g）（ごぼうちらし（魚肉ねり製品））。この他に1μg/g以上を示した検体は3検体あり（かまぼこ、チルド肉シウマイ、せんべい）、1検体は日本ハム（株）製での検出、残りは両キットでの検出であった。検出頻度は乳と同程度だった。そばは平成21年度にめん類（おもにうどん）を中心とした20検体に関して検査を行い、いずれも陰性だった。えび・かにに関しては、魚介類加工品（おもににぼし）やねり製品（かまぼこ）等40検

体のうち10μg/g以上の陽性を示したものが1検体あり（食べるにぼし）、定性検査PCR法を実施したところ、えび遺伝子が確認された。この他にも1μg/g以上を示すものが4検体あり検出頻度としては高めであったが（12.5%）、いずれもにぼしや小女子だった。これらの原料魚はえび等を捕食していたために、高頻度で検出された可能性が示唆された。

平成26年度は亜硫酸ナトリウムを使用する新キットを用いて卵の測定を実施したが、20検体いずれも陰性だった。2-MEを使用する旧検査法と亜硫酸ナトリウムを使用する新検査法で抽出効率に違いがある可能性も考えられたことから、（株）森永生化学研究所製及び日本ハム（株）製の新・旧両キットを用い、同等の結果が得られるかどうか比較検討した（表2）。その結果、いずれも1μg/g未満の低い値ではあるが、日本ハム（株）製キット及び（株）森永製キットとも、新・旧ほとんど差がない測定値だった。今回測定した加工食品においては、抽出液中に2-MEを使用する場合と、亜硫酸ナトリウムを使用する場合とでほとんど同等の抽出効率を望めるものと示唆された。

以上のことから神奈川県衛生研究所で実施した平成

18年度から27年度までのアレルギー（卵、乳、そば、えび・かに）検査では、延べ337検体のうち表示違反疑い事例は乳で1件、卵で1件、えび・かにで1件の計3件であった。1 μ g/g以上を示した検体も15検体（4.5%）存在した。特定原材料検査は、食品添加物検査や残留農薬検査に比べ表示違反疑いの検出率が高いと言われて⁸⁾いる。引き続き少なくとも年間20件程度の検査を実施し、特定原材料表示の監視指導体制を整えておく必要性が示唆された。さらに、ELISA法だけでなく定量PCR法等、検査技術の進歩に対応して順次検査法の見直しが想定されることから、迅速・柔軟な対応も求められる。今後も食物アレルギーによる健康被害の防止に向けて、情報収集・調査研究に励みたい。

- 1) 食品表示法（平成25年6月28日法律第70号）
<<http://www.caa.go.jp/foods/index18.html>>
- 2) 食品表示基準（平成27年3月20日内閣府令第10号）
<<http://law.e-gov.go.jp/announce/H27F10001000010.html>>
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知（平成17年10

月11日食安発第1011002号）

- 4) Watanabe Y, Aburatani K, Mizumura T, Sakai M, Muraoka S, Mamegosi S. et al.: 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) 渡邊裕子, 甲斐茂美, 三谷智雄, 横山洋司, 岸 美智子.: 食肉加工品および冷凍食品からのアレルギー物質（卵・乳）の検出に関する検討, 食品衛生学雑誌, **46**, 139-147 (2005)
- 6) 渡邊裕子, 赤星千絵, 濟田清隆, 関戸晴子, 橋口成喜, 渡部健二郎ほか: 特定原材料検査（卵・乳）における新・旧検査方法の比較, 食品衛生学雑誌, **52**, 71-77 (2010)
- 7) 消費者庁次長通知（平成27年3月30日消食表第139号）
- 8) 赤星千絵: 地方衛生研究所における食物アレルギー対策への取組み, 小児科, **56**, 1783-1790 (2015)

資料

神奈川県における第4回北朝鮮核実験に伴う放射能影響調査

山口千尋, 勝部貢治, 飯島育代, 辻清美,
仲野富美, 桑原千雅子, 上村仁

Radioactive survey in Kanagawa Prefecture after the fourth North Korean nuclear test

Chihiro YAMAGUCHI, Kouji KATSUBE,
Ikuyo IJIMA, Kiyomi TSUJI, Fumi NAKANO,
Chikako KUWAHARA and Hitoshi UEMURA

2016年1月6日、北朝鮮は朝鮮中央通信を通じ、「朝鮮で初の水素爆弾実験を成功させた」と発表した。北朝鮮による核実験は、2013年2月に続き4回目である。また、日本では気象庁が10時30分頃、北朝鮮付近を震源とする通常の波形とは異なる地震波を探知し、過去3回の核実験時の波形と似ていることから、自然地震ではない可能性に言及した¹⁾。

これらの情報を受けて、国外で発生する原子力関係事象に対応するため、同日付の放射能対策連絡会議申合せ²⁾に基づき、原子力規制庁より各都道府県等にモニタリング強化の協力依頼があった。

神奈川県衛生研究所では、当日午後よりモニタリング強化体制を敷き、大気浮遊じん、定時降下物及び空間放射線量率について調査した。

大気浮遊じん、定時降下物は、当所（神奈川県衛生研究所：茅ヶ崎市下町屋）構内にて採取し、分析及び測定方法は、2013年の北朝鮮地下核実験影響調査の方法³⁾及び既報⁴⁾に準拠した。大気浮遊じんは、前日9:00から当日9:00まで24時間、ダストモニター用ろ紙HE-40T上に捕集した。定時降下物は、ステンレス製雨水採取器（面積500cm²）で前日15:00から当日15:00まで24時間採取した。各調整試料は、ゲルマニウム半導体検出器（PGT社製IGC40200）により、 γ 線スペクトロメトリ

を行った。測定時間は20,000秒とした。調査結果について、大気浮遊じんは当日17時まで、定時降下物は翌日10時までに電子メールで、原子力規制庁、県保健福祉局及び同安全防災局に報告した。空間放射線量率は、既設の茅ヶ崎市（当所）に加え、東京電力（株）福島第一原子力発電所（以下、福島第一原発）事故後、2012年4月に環境放射能水準調査事業にて整備した、横浜市、逗子市、海老名市、相模原市、小田原市の県内5地点、計6地点のモニタリングポストにより、24時間連続測定した。データは、原子力規制庁に自動送信され、同庁のホームページ（<http://radioactivity.nsr.go.jp/map/ja/>）にリアルタイムで公表された。

モニタリング強化期間中の大気浮遊じん、定時降下物の主な人工放射性核種¹³¹I, ¹³⁴Cs, ¹³⁷Csと自然放射性核種⁷Be, ⁴⁰Kの結果を表1に示した。¹³¹I, ¹³⁷Csは核分裂生成物、¹³⁴Csは放射化生成物として、包括的核実験禁止条約（CTBT）における核爆発を検知するための監視対象放射性核種に含まれており^{5,6)}、核実験があった場合、調査試料から検出されうる核種である。大気浮遊じん、定時降下物ともに、人工放射性核種は検出限界値未満（Limit of detection, 以下<LOD）であった。自然放射性核種については、大気浮遊じんでは、⁷Beは検出されたが、⁴⁰Kは<LODであった。両核種の濃度は、表2aに示す2015年の大気浮遊じんの通常時調査の範囲内であった。定時降下物は、調査期間中、まとまった降雨が無く、全て乾性降下物として採取した。⁷Be, ⁴⁰Kともに<LODであった。大気上層で生成する⁷Beはちりなどに吸着して降下したり、雨滴などとともに地表に運ばれる。大気浮遊じんと異なり、定時降下物で⁷Beが<LODとなったのは、調査期間中は降雨が無く、降下量が少なかったためと考える。

近年、神奈川県では、福島第一原発事故の影響による人工放射性核種の検出はなくなりつつあるが、月間降下物や土壌など一部の試料ではいまだ検出され続けている。このような状況下で、調査中に人工放射性核種が検出されても、核実験によるものか否かを判断することは極めて困難である。そのため、通常時における精度の高い調査は重要である。比較対照として、表2に2015年の大気浮遊じん及び定時降下物の結果を示した。表2aに示した週1回の大気浮遊じんの調査試料では、人工放射性核種は<LODであった。なお、本試料から、各月2～3回分を選び、計8回分をまとめて1試料として測定する3か月調査を行っており、結果を表3に示した。この調査では週1回調査に比べ、さらに測定供試料量を増やし、長時間測定することにより、検出限界値が下がり、より精度の高い値を得ている。福島第一原発事故以降、

表 1 モニタリング強化時の大気浮遊じん、定時降下物の放射能濃度

a. 大気浮遊じん

採取月/日 採取期間:前日9:00～当日9:00	^{131}I	^{134}Cs	放射能濃度 ^{137}Cs mBq/m ³	$^7\text{Be}^{*3}$	$^{40}\text{K}^{*3}$
1/7 *1	< LOD *2	< LOD	< LOD	1.3	< LOD
1/8	< LOD	< LOD	< LOD	1.5	< LOD
1/9	< LOD	< LOD	< LOD	2.6	< LOD
1/10	< LOD	< LOD	< LOD	1.7	< LOD
1/11	< LOD	< LOD	< LOD	4.2	< LOD
1/12	< LOD	< LOD	< LOD	1.4	< LOD
1/13	< LOD	< LOD	< LOD	1.6	< LOD
1/14	< LOD	< LOD	< LOD	2.5	< LOD
1/15	< LOD	< LOD	< LOD	3.2	< LOD
1/16	< LOD	< LOD	< LOD	2.9	< LOD
検出限界値	0.070～0.14	0.084～0.14	0.065～0.15	0.78～1.2	1.2～1.8

採取場所：茅ヶ崎市下町屋 神奈川県衛生研究所構内

*1 採取期間：1/6 13:04～1/7 9:00

*2 < LOD: Limit of detection, 検出限界値未満

*3 ^7Be , ^{40}K : 自然放射性核種

b. 定時降下物

採取月/日 採取期間:前日15:00～当日15:00	^{131}I	^{134}Cs	放射能濃度 ^{137}Cs MBq/km ²	$^7\text{Be}^{*3}$	$^{40}\text{K}^{*3}$
1/7 *1	< LOD *2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
1/8	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
1/9	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
1/10	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
1/11	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
1/12	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
1/13	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
1/14	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
1/15	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
検出限界値	1.4～1.7	1.5～1.9	1.4～1.9	12～14	24～31

採取場所：茅ヶ崎市下町屋 神奈川県衛生研究所構内

*1 採取期間：1/6 12:59～1/7 15:00

*2 < LOD: Limit of detection, 検出限界値未満

*3 ^7Be , ^{40}K : 自然放射性核種

2011年4月から6月までの試料が ^{137}Cs 6.6 mBq/m³, ^{134}Cs 6.5 mBq/m³と最高値を示し、次の7月から9月までの試料は ^{137}Cs 0.068 mBq/m³, ^{134}Cs 0.060 mBq/m³と急激に減少した⁴⁾。その後の放射性セシウム濃度は漸減傾向にあり^{3,7)}、2015年1月から3月までの試料より ^{137}Cs が0.0079 mBq/m³検出されたのを最後に、翌4月以降、人工放射性核種は全て<LODとなった。北朝鮮核実験によるモニタリング強化期間を含む2016年1月から3月までの試料についても、人工放射性核種は全て<LODであった。表2bに示した定時降下物は通常、降雨時のみ採取し、調査している。2012年1月23日以降、人工放射性核種は<LODが続いていたが、2015年は、

111試料中2試料から ^{134}Cs 及び ^{137}Cs が検出された。この原因について、桑原らは2基設置している雨水採取器のうち、当所建物に近い採取器のみから検出されていること、当該試料の採取期間中に当所の外装金属部材の研磨による汚れの削り落としや塗装、天幕の張り替え等修繕工事が2003年の当所の移転後、初めて行われていたこと、他都道府県の調査では不検出であったことから、福島第一原発事故等に起因する新たな降下では無く、一度地表等に降下した ^{134}Cs , ^{137}Cs の再浮遊及び工事による飛散により混入したものと推察した⁸⁾。このように、新たな放出以外に起因する人工放射性核種の検出事例もあることから、核実験による放出か否かを判断するに当たっ

表2 2015年通常時調査における大気浮遊じん、定時降下物の放射能濃度

a. 大気浮遊じん

調査方法	試料数	^{131}I	^{134}Cs	放射能濃度 mBq/m^3 ^{137}Cs	$^7\text{Be}^{*2}$	$^{40}\text{K}^{*2}$
週1回調査	52	< LOD ^{*1}	< LOD	< LOD	< LOD~8.9	< LOD~0.74

b. 定時降下物

調査方法	試料数	^{131}I	^{134}Cs	放射能濃度 MBq/km^2 ^{137}Cs	$^7\text{Be}^{*2}$	$^{40}\text{K}^{*2}$
降雨毎調査	111	< LOD	< LOD~0.65	< LOD~2.0	< LOD~150	< LOD

採取場所：茅ヶ崎市下町屋 神奈川県衛生研究所構内

*1 < LOD：Limit of detection, 検出限界値未満

*2 ^7Be , ^{40}K ：自然放射性核種

表3 大気浮遊じん3ヶ月調査における放射能濃度

調査期間	^{131}I	^{134}Cs	放射能濃度 mBq/m^3 ^{137}Cs	$^7\text{Be}^{*2}$	$^{40}\text{K}^{*2}$
2015年1月~3月	< LOD ^{*1}	< LOD	0.0079	2.8	0.22
2015年4月~6月	< LOD	< LOD	< LOD	2.3	0.27
2015年7月~9月	< LOD	< LOD	< LOD	1.3	0.13
2015年10月~12月	< LOD	< LOD	< LOD	2.8	0.16
2016年1月~3月	< LOD	< LOD	< LOD	2.2	0.17

採取場所：茅ヶ崎市下町屋 神奈川県衛生研究所構内

*1 < LOD：Limit of detection, 検出限界値未満

*2 ^7Be , ^{40}K ：自然放射性核種

では、試料採取時の周辺環境など諸条件も考慮する必要がある。

次に空間放射線量率の結果を表4に示した。本調査期間中の空間放射線量率は、1時間値である。比較対照と

して2015年の1時間値の日平均値と年平均値を示した。県内6地点全てにおいて、本調査期間中の空間放射線量率は2015年の日平均値とほぼ同レベルであり、平常の変動の範囲内で推移していた。1月12日に横浜市、海

表4 県内6地点に設置したモニタリングポストによる空間放射線量率

月/日	茅ヶ崎市*1	横浜市	逗子市	海老名市	相模原市	小田原市
1時間値の最小値~最大値 nGy/h						
1/6	38~39	50~51	42	31~32	39~41	17
1/7	38~40	50~51	42	31~33	39~41	17~18
1/8	39~40	50~51	41~42	31~32	40~41	17
1/9	38~40	50~52	42~43	31~32	39~41	17
1/10	39~40	50~51	42	31~33	39~41	17
1/11	39~40	50~51	42	31~32	39~41	17
1/12	39~40	50~53	41~42	31~36	39~43	17~18
1/13	38~40	49~51	41~42	31~32	39~41	16~18
1/14	38~40	49~51	41~42	31~32	38~41	16~17
1/15	38~40	49~51	41~42	31~32	39~41	16~17
2015年の日平均値 最小値~最大値	37~46	49~58	41~51	30~40	39~50	16~27
年平均値	39±1.4	51±1.4	42±1.3	33±1.5	41±1.6	18±1.7

*1 神奈川県衛生研究所構内

表 5 これまでに神奈川県衛生研究所が実施した北朝鮮核実験に伴う放射能影響調査内容

	核実験実施日	調査期間	日数	調査項目	調査に関する変更点	本県への影響
第1回	2006年10月9日	10月9日～25日	17日間	空間放射線量率 大気浮遊じん 定時降下物	空間放射線量率測定1地点, データは手動収集	なし
第2回	2009年5月25日	5月25日～6月5日	12日間			なし
第3回	2013年2月12日	2月12日～22日	11日間		空間放射線量率測定6地点, データは自動収集	なし
第4回	2016年1月6日	1月6日～15日	10日間			なし

老名市、相模原市において、若干高い線量率が認められたが、当日、この3地域では、雨またはみぞれが観測されていたことから、降雨等による影響と考える。降雨、降雪の始めは、地表から発生した自然放射性核種であるウラン系列の²²²Rn、トリウム系列の²²⁰Rn及びこれらの壊変生成核種が雨滴とともに降下するため、空間放射線量率が上昇することが知られている。2015年の各地点における最大値についても降雨による影響であった。

今回の調査結果から、神奈川県では、北朝鮮による第4回核実験の影響は認められなかった。また、国内外においても核実験の影響はこれまで報告されていない。

国は、1月6日から1月15日まで、国内で異常値の検出が無かったことから、1月15日付けでモニタリングの強化を終了し、通常体制に戻した。なお、異常値が検出された場合は速やかに原子力規制庁に連絡することとした⁹⁾。

これまでに当所で実施した、北朝鮮の核実験に伴う影響調査の概要を表5にまとめた。過去3回の核実験においても、本県への影響は確認されなかった^{3,10,11)}。調査項目に変更は無いが、調査期間は実験回数を重ねる毎に短くなっている。第2回には、旧（独）日本原子力研究開発機構が開発した世界の原子力事故に対応可能な迅速大気拡散予測システム「WSPEEDI-II」が導入されたことと、1回目の調査経験から調査期間の短縮が図られたものと推察する。福島第一原発事故後は、全国にモニタリングポストが250基増設されるとともに、そのデータの自動収集、リアルタイム公表システムが構築され、より多くの地域での影響把握がこれまでより詳細かつ迅速に行えるようになったことも、期間の短縮に寄与していると考えられる。

今後も、想定される核実験や原発事故等の不測の事態に備えて、調査体制の整備、モニタリング技術の維持、向上と継承に努めていきたい。

参考文献

- 1) 気象庁：北朝鮮付近を震源とする地震波の観測について（平成28年1月6日）
- 2) 放射能対策連絡会議申合せ：北朝鮮による核実験に伴う当面の対応措置について（平成28年1月6日）
- 3) 神奈川県衛生研究所：神奈川県における放射能調査・報告書-2013-（2014）
- 4) 桑原千雅子，勝部貢治，飯島育代，佐藤学，林孝子，酒井康宏ほか：神奈川県における福島第一原子力発電所事故後の環境放射能レベルの推移，神奈川県衛生報告，44，1-8（2014）
- 5) 米沢仲四郎，山本洋一：核実験監視用放射性核種観測網による大気中の人工放射性核種の測定，ぶんせき，2011年8号，451-458（2011）
- 6) K.M. Matthews：The CTBT verification significance of particulate radionuclides detected by the International Monitoring System, NRL Report, 2005/1（2005）
- 7) 神奈川県衛生研究所：神奈川県における放射能調査・報告書-2011-，-2012-，-2014-（2012，2013，2015）
- 8) 桑原千雅子，勝部貢治，山口千尋，飯島育代：神奈川県における環境放射能の推移－降下物を中心に－，平成27年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第28回理化学研究部会総会・研究会資料，69-72（2016）
- 9) 原子力規制委員会ホームページ：北朝鮮による核実験実施発表に対する放射能影響の観測結果について
<<https://www.nsr.go.jp/activity/monitoring/monitoring5.html>>
（参照 2016-05-11）
- 10) 神奈川県衛生研究所：神奈川県における放射能調査・報告書-2006-（2007）
- 11) 神奈川県衛生研究所：神奈川県における放射能調査・報告書-2009-（2010）

資料

農産物中の残留農薬検査結果 (平成19～27年度)

垣田雅史*, 日比和美, 林 孝子*, 横溝 香,
松阪綾子, 佐藤久美子, 仲野富美*, 殿原真生子,
中口幹雄, 小澤まゆみ, 丸山範明, 大木良子,
北出杏子, 山崎直美

Survey report of pesticide residues in agricultural products (April, 2007-February, 2016)

Masashi KAKITA, Kazumi HIBI, Takako HAYASHI,
Kaori YOKOMIZO, Ayako MATSUZAKA,
Kumiko SATO, Fumi NAKANO,
Makiko TONOHARA, Mikio NAKAGUCHI,
Mayumi OZAWA, Noriaki MARUYAMA,
Ryoko OKI, Kyoko KITADE
and Naomi YAMAZAKI

神奈川県では、神奈川県食品衛生監視指導計画に基づき、神奈川県域に流通している農産物等の行政検査を実施している。このうち、残留農薬の検査にあたっては、国内での検出事例、国内外での使用（販売）実績のある農薬及び農薬による事件事故等を考慮し、対象食品や検査項目を選定している。また、当所では、平成18年5月、食品中の残留農薬等に関するポジティブリスト制度の施行¹⁾に伴い、平成19年度からは通知法である「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」及び「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」（以下、一斉試験法²⁾）に基づき、対応してきた。さらに、食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの改正³⁾に適応するため、平成25年12月からは妥当性ガイドラインに従って妥当性の確認を行った試験法により残留農薬検査を実施している。今回は、一斉試験法の

導入を開始した平成19年度から平成27年度の9年間で実施した、農産物中の残留農薬一斉試験の結果について報告する。

試料は平成19年4月から平成28年2月までに、神奈川県域（横浜市、川崎市、相模原市、横須賀市、藤沢市を除く）に流通している野菜類30品目、果実類17品目及び穀類2品目、全1275検体を対象農作物とした。検査検体数は年間計画により決定されており、年度による変動は少なく、平成19年度から平成27年度の国産検体数は平均100検体（95～105検体）、輸入検体数は平均41検体（40～43検体）であった。標準物質は関東化学社製、和光純薬工業社製及び林純薬工業社製の残留農薬分析用標準品またはその同等品を用い、試薬及び試液はいずれも和光純薬工業社製を用いた。試験溶液の調製は通知法の一斉試験法²⁾に基づき行った。試験部位については、厚生省の告示⁴⁾を基に採取した。野菜類または果実類⁴⁾は試料約1kgを量り採り乱切し、約半量をフードプロセッサで細切均一化した後、検査試料とした。穀類⁴⁾は試料約1kgのうち約半量をミキサーで均一化した後、粉碎器で425 μ mの標準網ふるいが通るように粉碎し検査試料とした。通常時の測定として、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）を用いたSCAN測定及びSIM測定、高速液体クロマトグラフータンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いたMRM測定を行い、検出確認時の測定として、必要に応じてGC-MS/MSによるMRM測定を行った。

平成19年度から平成27年度の農作物別の農薬検出状況を表1に示した。1275検体中、30品目204検体から定量限界値（0.01ppm）以上の農薬が258件（複数検出された農薬も含めた延べ検出農薬件数）検出され、検出率は16.0%であった。農作物の分類別に検出率をみると、果実類が22.9%（463検体中106検体）と最も高く、野菜類が12.2%（789検体中96検体）、穀類が8.7%（23検体中2検体）であった。農作物別の検出率では、茶が88.9%と最も高く、他の野菜では、小松菜、しゅんぎく、えだまめなど、果実では、りんご、ぶどう、レモン、日本なし、ももなどで検出率が高かった。複数の農薬が検出された検体は44検体で、国内産日本なしから最高4農薬が検出された。輸入検体では、371検体中、11品目59検体から定量限界値（0.01ppm）以上の農薬が66件検出された。検出率は15.9%であり、全体の検出率（16.0%）と同様の結果となった。輸入検体について、検出検体の多かった農作物の原産国をみると、野菜類では、えだまめ30検体（台湾15検体、タイ9検体、中国6検体）のうち、10検体（タイ6検体、台湾3検体、中国1検体）から検出され、タイ産の検出率が高かった。

神奈川県衛生研究所 地域調査部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
*現 理化学部

表 1 平成19～27年度 農作物別の農薬検出状況

分類	農作物名	検査検体数 ()内は輸入検体数	検出検体数 ()内は輸入検体数	検出農薬件数※ ()内は輸入検体	検出率※※(%) ()内は輸入検体
野菜類	えだまめ	52 (30)	13 (10)	14 (10)	25.0 (33.3)
	ほうれん草	63 (27)	12 (4)	16 (6)	19.0 (14.8)
	レタス	36	8	14	22.2
	茶	9	8	12	88.9
	小松菜	17	8	10	47.1
	ピーマン	30	7	10	23.3
	トマト	36	7	9	19.4
	なす	36	6	6	16.7
	しゅんぎく	14	5	5	35.7
	にら	24	4	6	16.7
	きゅうり	37	4	4	10.8
	長ねぎ	30	4	4	13.3
	未成熟いんげん	39 (24)	4 (2)	4 (2)	10.3 (8.3)
	ばれいしょ	32	4	4	12.5
	ブロッコリー	40 (21)	1 (1)	1 (1)	2.5 (4.8)
	白菜	32 (1)	1	1	3.1 (0.0)
	アスパラガス	11 (10)	0	0	0.0 (0.0)
	アボカド	16 (16)	0	0	0.0 (0.0)
	かぼちゃ	29 (10)	0	0	0.0 (0.0)
	きゃべつ	36	0	0	0.0
	ごぼう	6	0	0	0.0
	さつまいも	25	0	0	0.0
	さといも	13	0	0	0.0
	だいこんの根	34	0	0	0.0
	たまねぎ	28	0	0	0.0
	にんじん	36	0	0	0.0
	にんにく	2 (2)	0	0	0.0 (0.0)
	にんにくの芽	2 (2)	0	0	0.0 (0.0)
	水菜	6	0	0	0.0
	未成熟えんどう	18 (15)	0	0	0.0 (0.0)
	小計	789 (158)	96 (17)	120 (19)	12.2 (10.8)
果実類	りんご	36	18	23	50.0
	ぶどう	32	13	20	40.6
	日本なし	32	12	20	37.5
	レモン	25 (25)	10 (10)	11 (11)	40.0 (40.0)
	グレープフルーツ	29 (29)	10 (10)	10 (10)	34.5 (34.5)
	いちご	36 (2)	9 (1)	12 (2)	25.0 (50.0)
	マンゴー	24 (24)	8 (8)	10 (10)	33.3 (33.3)
	バナナ	36 (36)	8 (8)	9 (9)	22.2 (22.2)
	もも	16	6	9	37.5
	梅	18	5	5	27.8
	オレンジ	27 (27)	3 (3)	3 (3)	11.1 (11.1)
	温州みかん	30	2	2	6.7
	アメリカンチェリー	15 (15)	2 (2)	2 (2)	13.3 (13.3)
	かき	27	0	0	0.0
	キウイ	27 (27)	0	0	0.0 (0.0)
	スイカ	26	0	0	0.0
	パイナップル	27 (27)	0	0	0.0 (0.0)
	小計	463 (212)	106 (42)	136 (47)	22.9 (19.8)
穀類	玄米	21	2	2	9.5
	精米	2 (1)	0	0	0.0 (0.0)
	小計	23 (1)	2	2	8.7 (0.0)
合計		1275 (371)	204 (59)	258 (66)	16.0 (15.9)

※複数検出された農薬も含めた延べ数

※※検出検体の割合

ほうれん草では、27検体（中国23検体、台湾3検体、チリ1検体）のうち、4検体（中国3検体、台湾1検体）から検出された。果実類では、レモン25検体（米国13検体、チリ11検体、南アフリカ共和国1検体）のうち、

10検体（チリ6検体、米国4検体）から検出され、チリ産の検出率が高かった。グレープフルーツでは、29検体（南アフリカ共和国19検体、米国8検体、他2検体）のうち、10検体（南アフリカ共和国8検体、米国

表2 平成19～27年度 農薬種類別の検出状況

農薬名	種類	検出農薬 件数※	農作物名（ ）内は検体数
アゾキシストロビン	殺菌剤	23	マンゴー(7),ぶどう(4),レタス(2),レモン(2),バナナ(2),にら,トマト,なす,未成熟いんげん,きゅうり,ほうれん草
シベルメトリン	殺虫剤	20	えだまめ(6),日本なし(5),ほうれん草(3),りんご(3),にら(2),未成熟いんげん
ボスカリド	殺菌剤	18	りんご(8),レタス(2),ピーマン(2),日本なし(2),いちご,トマト,なす,しゅんぎく
イミダクロプリド	殺虫剤	18	グレープフルーツ(6),ほうれん草(3),トマト(2),ぶどう,マンゴー,きゅうり,茶,ピーマン,えだまめ,日本なし
クロルピリホス	殺虫剤	17	レモン(9),バナナ(3),オレンジ(3),グレープフルーツ(2)
テブコナゾール	殺菌剤	15	茶(8),ぶどう(4),日本なし(2),もも
フルフェノクスロン	殺虫剤	13	ほうれん草(4),小松菜(2),いちご,えだまめ,もも,しゅんぎく,茶,トマト,ピーマン
ジノテフラン	殺虫剤	11	日本なし(3),しゅんぎく(2),温州みかん(2),ぶどう(2),小松菜,レタス
シアゾファミド	殺菌剤	9	ほうれん草(5),小松菜(2),ピーマン,ぶどう
クレソキシムメチル	殺菌剤	9	梅(4),ぶどう,長ねぎ,にら,いちご,ピーマン
フェンバレーレート	殺虫剤	9	レタス(3),もも(2),梅,白菜,マンゴー,長ねぎ
フェンプロパトリン	殺虫剤	8	りんご(4),日本なし(2),いちご,グレープフルーツ
チアメトキサム	殺虫剤	7	ピーマン(2),レタス(2),バナナ(2),日本なし
ブプロフェジン	殺虫剤	6	もも(2),なす(2),茶,トマト
メタラキシル	殺菌剤	5	ばれいしょ(4),小松菜
ベルメトリン	殺虫剤	5	えだまめ(2),ぶどう,小松菜,日本なし
チアクロプリド	殺虫剤	4	りんご(2),トマト,ぶどう
ルフェヌロン	殺虫剤	4	トマト(2),いちご(2)
マラチオン	殺虫剤	4	レタス(2),いちご,マンゴー
ビフエントリン	殺虫剤	4	バナナ(2),りんご,日本なし
フルジオキシニル	殺菌剤	3	にら(2),未成熟いんげん
フルトラニル	殺菌剤	3	長ねぎ(2),レタス
フルバリネート	殺虫剤	3	ぶどう(2),日本なし
フェンピロキシメート	殺虫剤	3	えだまめ(3)
ピテルタノール	殺菌剤	3	もも(2),いちご
フサライド	殺菌剤	2	玄米(2)
ピリミホスメチル	殺虫剤	2	もも,ぶどう
ホスチアゼート	殺虫剤	2	小松菜(2)
トリフロキシストロビン	殺菌剤	2	りんご(2)
ピリプロキシフェン	殺虫剤	2	なす,グレープフルーツ
テブフェンピラド	殺虫剤	2	ピーマン,いちご
フロバルギット	殺虫剤	2	りんご(2)
ヘキシチアゾクス	殺虫剤	2	茶,なす
シハロトリン	殺虫剤	2	レタス,りんご
フェナリモル	殺菌剤	2	ピーマン,いちご
スピノサド	殺虫剤	1	小松菜
ジメトモルフ	殺菌剤	1	きゅうり
シラフルオフェン	殺虫剤	1	日本なし
ノバルロン	殺虫剤	1	いちご
シメコナゾール	殺菌剤	1	いちご
シプロジニル	殺菌剤	1	ぶどう
クロマフェノジド	殺虫剤	1	えだまめ
トリアジメノール	殺菌剤	1	未成熟いんげん
カルバリル	殺虫剤	1	アメリカンチェリー
フェンアミドン	殺菌剤	1	ブロッコリー
イブロジオン	殺菌剤	1	アメリカンチェリー
ジェトフェンカルブ	殺菌剤	1	きゅうり
フェントロチオン	殺虫剤	1	しゅんぎく
パラチオン	殺虫剤	1	ぶどう
合計		258件	(殺虫剤 157件, 殺菌剤 101件)

※複数検出された農薬も含めた延べ数

2 検体) から検出され, 南アフリカ共和国産の検査検体が多く, 検出率も高かった. マンゴーでは, 24検体(メキシコ9検体, フィリピン6検体, タイ4検体, 台湾3検体, 不明2検体)のうち, 8検体(フィリピン及び台湾3検体, メキシコ1検体, タイ1検体)から検出された. バナナでは, 36検体(フィリピン32検体, エクアドル4検体)のうち, 8検体(フィリピン8検体)

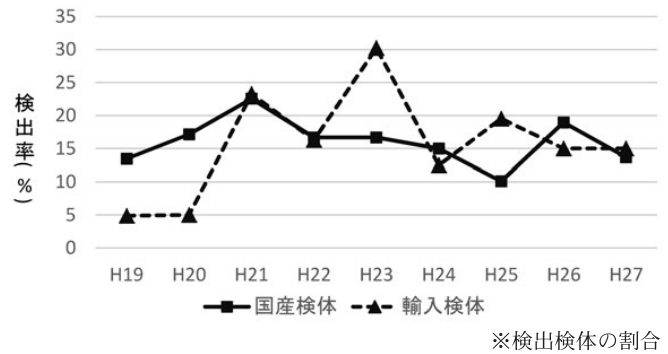


図1 平成19～27年度 農薬の原産地別の検出率*の推移

から検出された。

平成19年度から平成27年度の農薬種類別の検出状況を表2に示した。種類別では、殺虫剤及び殺菌剤の2種類のみが検出され、その割合は殺虫剤が157件（60.9%）、殺菌剤が101件（39.1%）であった。最も多く検出された農薬はアゾキシストロビンの23件であり、マンゴー、ぶどう、レモン、バナナの果実類から高頻度に検出された。他の農薬では、シベルメトリン、ボスカリド、イミダクロプリドなどの検出が多かった。シベルメトリンはえだまめ、日本なしから、ボスカリドはりんごから、イミダクロプリドはグレープフルーツ、ほうれん草から、テブコナゾールは茶、ぶどうから多く検出された。クロルピリホスはレモン、バナナ、オレンジなどから多く検出され、検出検体の全てが輸入品の果実類であった。茶は検査した全9検体のうち、8検体からテブコナゾールのみが検出された。基準値を超えて農薬が検出された事例は1件あり、平成24年度に県内産しゅんぎく1検体からボスカリドが一律基準を超過して検出され（ $0.18\mu\text{g/g}$ ）、食品衛生法違反となった。

平成19年度から平成27年度の農薬の原産地別の検出率の推移を図1に示した。輸入検体の検出率の推移をみると、平成19年度から平成23年度の期間に大きく変動（5～30%程度）していたが、平成26年度以降は15%程度で推移している。一方、国産検体の検出率では、輸入検体の検出率に比べて変動が小さく、平成21年度を除き、10～20%の範囲で推移している。

今後とも、残留農薬検査について、迅速かつ的確な行政措置に対応できるよう、行政ニーズの高い対象食品及び対象検査項目へと拡張し、検査技術の向上に取り組んでいく必要がある。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知：食品に残留する農薬等の監視指導に係る留意事項について（食安監発第0529001号、平成18年5月29

- 日)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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（食安発第0124001号，平成17年1月24日）
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中に
- 残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（食安発1224第1号，平成22年12月24日）
- 4) 食品添加物の規格基準（厚生省告示第370号，昭和34年12月28日）

他誌掲載論文抄録

(平成27年4月～平成28年3月)

Turtle-associated *Salmonella* infections in Kanagawa, Japan

(神奈川県で発生したカメ関連サルモネラ症)

黒木俊郎, 伊東久美子, 石原ともえ, 古川一郎 (神奈川県衛研), 金子紀子, 鈴木 裕, 瀬戸順次 (山形衛研), 神山務 (かみやまクリニック) Jpn. J. Infect. Dis. 68(4), 333-337 (2015)

2007年と2008年に2例のカメ関連サルモネラ症の症例に遭遇した。1例目では*S. Poona*が患者から分離された。患者宅ではミズガメを飼育していたが、詳細な情報およびカメの検査材料は得られなかった。患者由来株と山形県で2007年に発生した*S. Poona*感染事例の患者由来株の*XbaI* / *BlnI*を用いたPFGEパターンが一致したことから、両事例が疫学的に関連している可能性が示唆された。2例目では患者から*S. Abony*が検出された。患者宅ではギリシャリクガメを飼育しており、そのカメから*S. Abony*が分離された。患者由来株とカメ由来株の*XbaI* / *BlnI*を用いたPFGEパターンは一致し、カメが感染源であることが示された。

技術編1. *Mycoplasma pneumoniae* の培地, 分離培養, 保存法

大屋日登美 (神奈川県衛研), 岡崎則男 (神奈川県立看護専門学校), 最新マイコプラズマ学, 日本マイコプラズマ学会編, 近代出版, 166-175, (2016)

Mycoplasma pneumoniae の培養検査には, 国内外で様々な培地が考案されてきた。二層培地は, 国内外で高く評価されているが普遍的な培養技術の確立とまでは言い難い。国内では, 1982年より厚生省感染症サーベイランス事業において, *M. pneumoniae* の培養検査による異型肺炎の調査が開始され, 各都道府県及び政令市の衛生研究所で調査が実施された。しかし, 培養技術が確立されていない状況下において, 調査を実施した機関は神奈川県衛生研究所を含めた数箇所に限られた。その後, 1999年の感染症法施行により, 感染症サーベイランス事業は感染症発生動向調査事業となり, 異型肺炎は*M. pneumoniae* に起因する疾患に限定され, 5類感染症定点把握疾患のマイコプラズマ肺炎として定点病院からの報告のみによる調査となり現在に至っている。当所では,

分離培養を基本とした病原体検出を長年継続してきた。これによりマイコプラズマ肺炎の治療に用いられるマクロライド系 (MLs) 薬剤に耐性を示すMLs耐性*M. pneumoniae*を検出し, その耐性機構や発生状況を調べることが可能になっており, これまで国内でも希少となっている菌株を多数保存している。本稿では, *M. pneumoniae* の培養検査法及び菌株保存方法について, 当所で実施してきた方法を中心に記載した。

神奈川県で臨床分離された*Mycoplasma pneumoniae* の MLVAによる遺伝子型別

大屋日登美, 古川一郎, 相川勝弘 (神奈川県衛研), 堀野敦子, 見理剛 (国立感染研), 小田洋一郎 (茅ヶ崎市立病院), 成田光生 (札幌徳洲会病院), 黒木俊郎 (神奈川県衛研) 日本マイコプラズマ学会雑誌, 42, 51-53 (2016)

神奈川県において分離された*Mycoplasma pneumoniae*については, 従来からP1蛋白遺伝子型別, 薬剤感受性試験およびマクロライド耐性遺伝子変異の分析等を実施している。*M. pneumoniae* の遺伝子型別法としては, P1蛋白遺伝子型別法があり, 1型, 2型, 2型亜種に分けることができ, 10数年周期で1型と2型が入れ替わることが報告されている。近年, MLVA (Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis) による型別が*M. pneumoniae*においても開発された。この方法は, 多くの型に分類され, P1蛋白遺伝子型別法よりも識別能が高く, 数値化によるデータの比較が可能である。このため, 様々な国々で実施され始めているが, 国内ではまだデータが少ない状況にある。そこで今回, MLVAを導入し, 疫学マーカーとして評価するため本県の臨床分離菌株178株について実施したところ, 29型に型別された。年別推移は, 2003年にK型が多く分離され, マイコプラズマ肺炎の流行があった2003, 2010～2012年に型の種類が増えるという特徴がみられた。

Increased prevalence of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2010 to 2012

(2010～2012年の日本におけるレンサ球菌性毒素ショック症候群症例でのA群溶血レンサ球菌株による有病率の増加)

池辺忠義 (国立感染研), 富永 潔 (山口環保健センター), 嶋 智子 (富山衛研), 奥野ルミ, 久保田寛顕 (東京都健康安全研究センター), 緒方喜久代 (大分衛環研センター), 千葉一樹 (福島衛研), 勝川千尋 (大阪公衛研), 大屋日登美 (神奈川衛研), 多田有希, 岡部信彦 (国立感染研情報センター), 渡辺治雄, 小川道永, 大西 真 (国立感染研), 「溶血レンサ球菌レファレンスセンター」, *Epidemiol. Infect.* 143, 864-872 (2015)

レンサ球菌性毒素ショック症候群 (STSS) は, 突然のショックの発症, 多臓器不全, および高い死亡率によって特徴付けられる重度の侵襲性感染症である. STSSは, 主に, A群溶血レンサ球菌 (GAS) によって引き起こされ, GASに誘発される STSSが著しく増加してきている. その原因を調べるために, 2010～2012年に日本でSTSS患者から分離した249 株について, GASの*emm*遺伝子型と薬剤感受性試験を実施した. 特異的な遺伝子型は, *emm*1, *emm*89, *emm*12, *emm*28, *emm*3 および*emm*90で, これらの6つの遺伝子型がSTSS分離株の90%以上を占め, 特に *emm*1, *emm*89, *emm*12および*emm*28が増加していた.

Evaluation of streptococcal toxic shock-like syndrome caused by group B streptococcus in adults in Japan between 2009 and 2013

(2009年～2013年の日本の成人におけるB群溶血レンサ球菌によって誘発されるレンサ球菌性毒素ショック症候群の評価)

池辺忠義 (国立感染研), 千葉一樹 (福島衛研), 嶋 智子, 増田千恵子 (富山衛研), 奥野ルミ (東京都健康安全センター), 大屋日登美 (神奈川衛研), 緒方喜久代 (大分衛環研センター), 勝川千尋, 河原隆二 (大阪公衛研), 富永 潔, 矢端順子 (山口環保健センター), 多田有希, 岡部信彦 (国立感染研情報センター), 渡辺治雄, 常 彬, 小川道永, 大西 真 (国立感染研), 「溶血レンサ球菌レファレンスセンター」, *J. Infect. Chemother* 21, 207-211(2015)

*Streptococcus agalactiae*による感染は, 長い間乳児において認識されてきた. 近年では, *S.agalactiae*が成人の罹患率と死亡率の重要な因子としてレンサ球菌性毒素ショック症候群 (STSS) に似たB群溶血レンサ球菌 (GBS) 感染症や劇症型の症例が報告されている. 2009～2013年の間に日本の成人患者を対象としたSTSS様症例から*S.agalactiae* 19株が分離されたので報告する. 患

者の平均年齢は66.3歳で, 少なくとも一つの基礎疾患を持つ患者が47.4% (9 /19) であった. これらの株の中で最も多かった血清型は, Ibであった. 血清型Ibの株は, すべてシプロフロキサシン耐性であった. これとは対照的に, すべての株がペニシリンG, アンピシリン, セファゾリン, セフォタキシム, イミペネム, パニペネムおよびリネゾリドに感受性であった.

肺炎マイコプラズマ分離用培地の改良および薬剤感受性試験法の検討

奥野ルミ, 久保田寛顕, 内谷友美 (東京都健康安全研究センター), 大屋日登美 (神奈川衛研), 平井昭彦, 甲斐明美, 貞升健志 (東京都健康安全研究センター), 臨床微生物: 26 (2), 90-96, (2016)

近年, マクロライド系薬剤耐性 *Mycoplasma pneumoniae*が増加しており, その動向を把握することがより重要となっている. 本報では, 従来の分離培地及び薬剤感受性試験法を改善する検討を行ったので報告する. *M. pneumoniae*の分離培養の際に, 雑菌増殖等により目的菌の分離が困難な場合が多かったため, 従来からの分離培地であるPPLO液体培地の改良を行った. 改良培地を用いてマイコプラズマ感染症疑い患者108名の咽頭ぬぐい液から, *M. pneumoniae*の分離を実施した結果, PCR法陽性31検体のうち22検体 (67.7%) から菌を分離することができた. 次に, 従来から行われている微量液体希釈法は, 薬剤の入手から濃度調整, 分注等を行うなど煩雑であり手間が掛かるため, 簡便なドライプレートを用いた方法を検討した. その結果, 標準株ではMIC値で1管差であり, 従来法とほぼ同等の値が得られた. 本法を用いて臨床分離株18株について薬剤感受性試験を実施したところ, 15株 (83%) がerythromycin耐性となった. 今回検討した方法を用いることで, *M. pneumoniae*の分離率が向上するとともに薬剤感受性試験が容易になることから, さらに多くの実態調査や解析が可能となると考えられる.

Novel HIV-1 Recombinant Identified in a Foreign Heterosexual Resident in Japan: Relatedness to Recently Reported CRF69_01B, Detected Primarily among Japanese Men Who Have Sex with Men

(日本で報告された異性間性行為による外国人HIV-1感染者から得られた組み換えHIV-1の構造解析)

草川 茂, 横田裕子, 俣野哲朗 (国立感染研), 根岸昌功 (根岸クリニック), 近藤真規子 (神奈川衛研), 加藤真吾 (慶應義塾大学医学部), 武部 豊 (国立感染研) *Genome Announcemnts*, 28, e00196-15

(2015)

異性間性行為によるHIV-1感染者（日本在住のミャンマー男性）から、サブタイプBとCRF01_AEの組み換えウイルス、05JP.MY.CS113SP420を検出した。この組み換え体は2005年に分離され、*gag-pol*領域及び*vpr-tat*領域に計8つのブレークポイントが存在していた。最近、同性間感染による日本男性において、サブタイプBとCRF01_AEの組み換え体であるCRF69_01Bが複数株報告されたが、05JP.MY.CS113SP420株とCRF69_01Bは同一のキメラ構造であった。

Characteristics of Transmitted Drug-Resistant HIV-1 in Recently Infected Treatment-Naïve Patients in Japan

（新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性変異の動向と性状解析）

服部純子（名古屋医療センター）、椎野貞一郎（国立感染症研）、潟永博之（国立国際医療センター）、森 治代（大阪公衛研）、南 留美（九州医療センター）、内田和代（埼玉県衛生研究所）、貞升健志（東京都健康安全センター）、近藤真規子（神奈川衛研）、杉浦 互（名古屋医療センター）、the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network, JAIDS, 71, 367-373, (2016)

日本国内の薬剤耐性HIVの発生・伝播動向を把握するため2007～2012年の6年間に登録された3904例のHIV-1感染者について、薬剤耐性変異の出現頻度や流行株の解析を行い、2700例についてBED法による感染時期の推定を行った。2008年の耐性変異の検出頻度は9.1%であったが、2012年は12.5%に増加した。BED法では468例（33.4%）が感染後6か月以内（RS）と推定され、リスク別によるRS割合は日本男性及び男性同性間（MSM）感染で有意に高かったが、これら2つのグループ間に差は認められなかった。両グループに見られた薬剤耐性変異で最も多い変異はM46I/LとT215リバタントであり、その他K103N、D30N/N88Dの高度耐性変異も検出された。系統樹解析の結果、変異ごとにクラスターを形成する傾向にあった。日本におけるHIVの流行の中心は、依然としてMSMを主とした日本男性であり、2000年以前に使用されていた薬剤に対する耐性関連変異M46I/LやT215リバタントを含むバリエーションが存在し、感染していると考えられた。

HIV郵送検査の現状と展望

須藤弘二（慶應義塾大学医学部）、佐野貴子、近藤真規子（神奈川衛研）、今井光信（田園調布学園大学）、

加藤真吾（慶應義塾大学医学部）日本エイズ学会誌, Vol.17, 138-142 (2015)

HIV検査として、保健所等における無料匿名の公的検査、病院の診療に関わる検査等が行われているが、近年検査数が伸びている方法としてHIV郵送検査がある。2010年以降の検査数は、保健所等公的検査の約半数にまで達している。我々はHIV郵送検査の実態を把握するため、過去10年間、アンケート調査や精度管理等を実施してきた。これらの結果をもとに、HIV郵送検査の現状を総括し、課題等の解決に向けた考察、提言を行った。

HIV無料・匿名検査相談の役割—保健所等HIV無料・匿名検査相談施設におけるHIV検査の現状と課題—

佐野貴子（神奈川衛研）、加藤真吾（慶應義塾大学医学部）、今井光信（田園調布学園大学）、日本エイズ学会誌, 17, 125-132 (2015)

保健所等HIV無料・匿名検査相談施設におけるHIV検査相談の実施状況を把握し、その充実を図る目的で、全国の保健所・支所・保健センターおよび特設検査施設（以下、保健所等検査施設）を対象にアンケート調査を実施した。その結果、保健所等検査施設でのHIV検査の陽性数は、エイズ動向委員会で報告されるHIV感染者数の約45%に相当していることが分かった。このことから、公的施設で実施されているHIV検査・相談事業は、我が国のHIV/エイズ対策において一定の効果を上げており、検査希望者にとっては重要な検査機会となっていると考えた。また、保健所等検査施設における保健所と特設検査施設での比較では、検査数は保健所での実施数が8割を占めていたのに対し、陽性率では特設検査施設が保健所に比べて2倍以上も高くなっていた。特設検査施設の設置は、より感染リスクの高い検査希望者への受検機会提供の場として有効であることが示唆された。

Cyanobacterial blue color formation during lysis under natural conditions

（自然界における青色化を伴うラン藻の溶藻現象）

有井鈴江（名城大学）、辻 清美（神奈川衛研）、富田浩嗣（愛知衛研）、Beata Bober、長谷川真照、原田健一（名城大学）、Appl. Environ. Microbiol., 81, 2667-2675 (2015)

ラン藻は様々な揮発性有機物（VOC）を産生し、そのVOCはラン藻自身に対し、溶藻活性を持つことが知られている。2008年と2010年には津久井湖において青色化を伴った溶藻現象が起きた。ラン藻とVOCを含む湖水を採取し、VOCの分析、細胞数、形態変化、pH変化を観察した。β-シクロシトラールとその酸化生成物

とフィコシアニンが検出され、pH低下もみられた。ラン藻に由来する β -シクロシトラールは、ラン藻自体に対して溶解活性を有するが、他の藻類に対してより強い阻害活性を示した。VOCが湖沼生態系において重要な役割を果たしていることが示唆された。

Microbial degradation of linear peptides by strain B-9 of *Sphingosinicella* and its application in peptide quantification using liquid chromatography-mass spectrometry

(*Sphingosinicella* B-9株による直鎖状ペプチドの分解とLC/MSを用いたペプチド定量への応用)

宮地 淳 (三和化学研究所, 名城大学), 近藤文雄 (愛知医大), 辻 清美 (神奈川衛研), 栗田実希, 原田健一 (名城大学), J. Biosci. Bioeng., 6. 724-728

(2015)

高感度なペプチド定量法確立のため、サロゲートペプチドを用いたLC/MS定量法を検討した。良好なサロゲートペプチドを得るため、新規プロテアーゼとして3つのプロテアーゼを持つmicrocystin分解性細菌B-9株を用いて、生理活性ペプチドに対する分解特性を検討した。阻害剤で制御しない場合、基質特異性を明らかにすることはできなかったが、EDTAで阻害した場合、直鎖状のペプチドに対して、エンドペプチターゼ様の切断が確認され、サロゲートペプチドの新規取得法として利用できることが明らかとなった。本研究により、B-9株プロテアーゼが、市販のプロテアーゼでは見られない広範囲な分解特異性を持つことから、LC/MSによるたんぱく質とペプチド定量への適用の可能性が示唆された。

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health No.46 (September, 2016)

CONTENTS

Review

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

The necessity of molecular epidemiological analysis on tuberculosis outbreaks Chieko TAKAHASHI	1
---	---

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

Examination of food additives Hiroko KISHI	7
---	---

Short reports

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

Detection of drug-resistant bacteria from stools of patients with infectious gastroenteritis Miyuki SUZUKI, Ichiro FURUKAWA, Tomoka MASAOKA, Tomoe ISHIHARA, Katsuhiro AIKAWA and Toshiro KUROKI	14
Detection of Norovirus in environmental swab samples Rieko SUZUKI, Junko TAKAHASHI, Keiko KINJO, Makiko KONDO and Toshiro KUROKI	18
Sentinel surveillance and virus detection trends of hand, foot and mouth disease and herpangina cases in Kanagawa Prefecture Takako SANO, Satoko SHINOZAKI, Sho KADEKARU, Yoshimi DATE, Sumi WATANABE, Makiko KONDO and Toshiro KUROKI	22

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

Determination of ethylene diamine tetra-acetic acid and its salts in foods Haruko SEKIDO, Yukiko TANAKA, Hiroko KISHI	27
Studies on analytical conditions for sildenafil analogs and other undisclosed active ingredients found in tainted products using thin-layer chromatography Kenichi KUMASAKA, Chikako HADA, Fumiaki SOTODATE and Shigemi KAI	32

Data

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

Occurrence of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> in Kanagawa Prefecture (April, 2015-March, 2016) Ichiro FURUKAWA, Tomoka MASAOKA, Tomoe ISHIHARA, Katsuhiro AIKAWA and Toshiro KUROKI	37
Epidemic of influenza in Kanagawa Prefecture (2015 / 2016 season) Sumi WATANABE, Sho KADEKARU, Takako SANO, Makiko KONDO and Toshiro KUROKI	41
Surveillance of viral gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2015 – March, 2016) Rieko SUZUKI, Keiko KINJO, Junko TAKAHASHI, Makiko KONDO and Toshiro KUROKI	43

Data

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

Summary of inspection of allergen-containing foods in Kanagawa prefecture
accumulated in past 10 years (fiscal year 2006-2015)

Haruyo AKIYAMA, Hiroko WATANABE, Shigemi KAI and Maki MIYAZAWA ----- 46

Survey report of pesticide residues in agricultural products (April, 2007-February, 2016)

Masashi KAKITA, Kazumi HIBI, Takako HAYASHI, Kaori YOKOMIZO,
Ayako MATSUZAKA, Kumiko SATO, Fumi NAKANO, Makiko TONOHARA,
Mikio NAKAGUCHI, Mayumi OZAWA, Noriaki MARUYAMA, Ryoko OKI,
Kyoko KITADE and Naomi YAMAZAKI ----- 53

Surveillance study on the safety of living

Radioactive survey in Kanagawa Prefecture after the fourth North Korean nuclear test

Chihiro YAMAGUCHI, Kouji KATSUBE, Ikuyo IJIMA, Kiyomi TSUJI,
Fumi NAKANO, Chikako KUWAHARA and Hitoshi UEMURA ----- 49

Abstracts of original papers by research staffs (April, 2016 - March, 2017) ----- 57

-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----■-----

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health (Bull. Kanagawa
Ins. of P. H.) is an official periodical on reseach works at Kanagawa
Prefectural Institute of Public Health and is publishued, 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