

総説

健康危機管理時における緊急検査対応 について — 農薬による野鳥斃死事例を中心に —

甲斐茂美

Emergency inspection correspondence during health crisis management — Focusing on the mortality cases of wild birds by pesticides —

Shigemi KAI

Key Words : health crisis management,
emergency inspection correspondence,
pesticide, LC/MS/MS,

はじめに

公衆衛生の拠点である地方衛生研究所の使命は住民の安全と健康を守ることである。

地方衛生研究所は明治時代にコレラなどの感染症対策のために設置された衛生試験所等がその起源となっている。神奈川県においては、明治35年（1902年）に横浜市に開設されたペスト検査所が当所の前身である。昭和23年（1948年）に「地方衛生研究所設置要綱」が定められ、地方の細菌検査所や衛生試験所等の衛生関係試験検査機関が統合整備され、地方衛生研究所の設置が図られた¹⁾。社会情勢の変化に伴い、平成9年（1997年）には「地方衛生研究所の機能強化について」が通知され、地方衛生研究所の設置目的である、公衆衛生の向上と増進を図るため、関係各行政部局との連携の下、調査研究、試験検査、研修指導及び公衆衛生情報の収集・解析・提供を行うことが示された²⁾。

厚生労働省の所管する健康危機管理とは、「医薬品、食中毒、感染症、飲料水その他何らかの原因により生じる国民の生命、健康の安全を脅かす事態に対して行われる健康被害の発生予防、拡大防止、治療等に関する業務」を指す³⁾。平成13年（2001年）には、地下鉄サリン事件、阪神・淡路大震災、和歌山カレー事件等、住民の安

全・安心を脅かす事例の発生を契機に「地域における健康危機管理について～地域健康危機管理ガイドライン」が定められた⁴⁾。これにより健康危機管理における地方衛生研究所の役割として、被害の拡大を防ぐための緊急時の迅速な原因物質の究明・疫学解析、日常の調査研究による被害発生時の未然防止等が求められるようになった。さらに、平成24年（2012年）には、「地域保健対策の推進に関する基本的な指針の一部改正について」が示され、地方衛生研究所は地域の衛生行政全般における科学的かつ技術的に中核となる機関として位置づけられるようになった⁵⁾。地域住民の安全・安心の確保のためには、地方衛生研究所は公衆衛生全般を網羅した機能強化が必須である。このため平常時から情報収集、分析法開発などに努め、調査研究の機能を強化するとともに、迅速な検査体制の確立と検査精度の向上を図ることは、我々研究員の責務となっている。

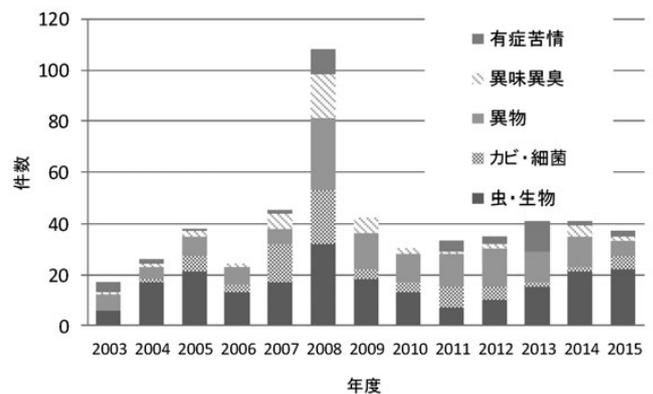


図1 食品への苦情事例の変遷（2003年度～2015年度）

県民からの衛生研究所への要望の一例として、当所の平成15年（2003年）から平成27年（2015年）における食品への苦情事例の変遷について図1に示した。例年、虫や異物の混入事例が多く寄せられる中、冷凍食品への農薬混入事件が発生した平成20年（2008年）は、他の年度に比べ食品への苦情事件事数が2倍以上寄せられた。また、苦情内容も異味異臭の原因究明に対する依頼の件数が増大した。食品の安全・安心を脅かす事例が発生したことで、県民の食品の安全性への関心が高まること、また原因究明を衛生研究所に期待していることが推測された。このような要望に対し当所では、海外で発生した炭疽菌によるバイオテロを模倣した不審物送付事件や野鳥大量斃死等、健康危機事案への拡大が懸念される事例が発生した際には、日頃の研究の中で培われた技術を駆使し、衛生研究所全体で異物の鑑定や原因の究明に尽力し、健康危機管理時における検査体制を整えてきた。

そこで、本稿では神奈川県衛生研究所の健康危機管理時における緊急検査対応について、農薬分析などの理化学検査を中心とした検査体制の概要と事例について述べる。

緊急検査体制について

健康危機管理事例として野鳥の斃死事例での当所の検査体制の一例を図2に示した。鳥インフルエンザへの対応が定められてからは、野鳥の斃死事例の発生時には環境農政局が初動で検査をすることになった。鳥インフルエンザ発生の可能性がない場合に、保健福祉事務所等の要請により、原因究明の理化学検査を実施した。野鳥の斃死の場合はまず解剖・剖検により病変の有無について検査した。剖検結果から顕著な病変が認められなかった場合、薬剤等の摂取による急性毒性での死亡が疑われることから、原因物質探索のための農薬等の分析を実施した。

1. 農薬分析

農薬のうち有機リン系農薬は、神経伝達物質のアセチルコリンを分解する酵素であるアセチルコリンエステラーゼの活性中心であるセリン水酸基をリン酸エステル化して阻害する。同様に、N-メチルカーバメート系農薬はセリンのカルバモイル化によりアセチルコリンエステラーゼを阻害する。そのため、アセチルコリンが異常に蓄積し、副交感神経興奮により鳥類や哺乳類に毒性を示す。これらの農薬は、大量投与により痙攣、麻痺、呼吸不全などの急性症状を引き起こすことが知られている⁶⁻⁸⁾。そこで、健康危機管理対応の検査対象として、当所では有機リン系農薬及びN-メチルカーバメート系農薬を分析対象とした。平成16年度までは有機リン系農薬を中心に分析しており、分析機器整備が整った平成17年度からはN-メチルカーバメート系農薬についても分析項目に加えた⁹⁾。

健康危機管理対応時の原因究明には迅速性が最も重要

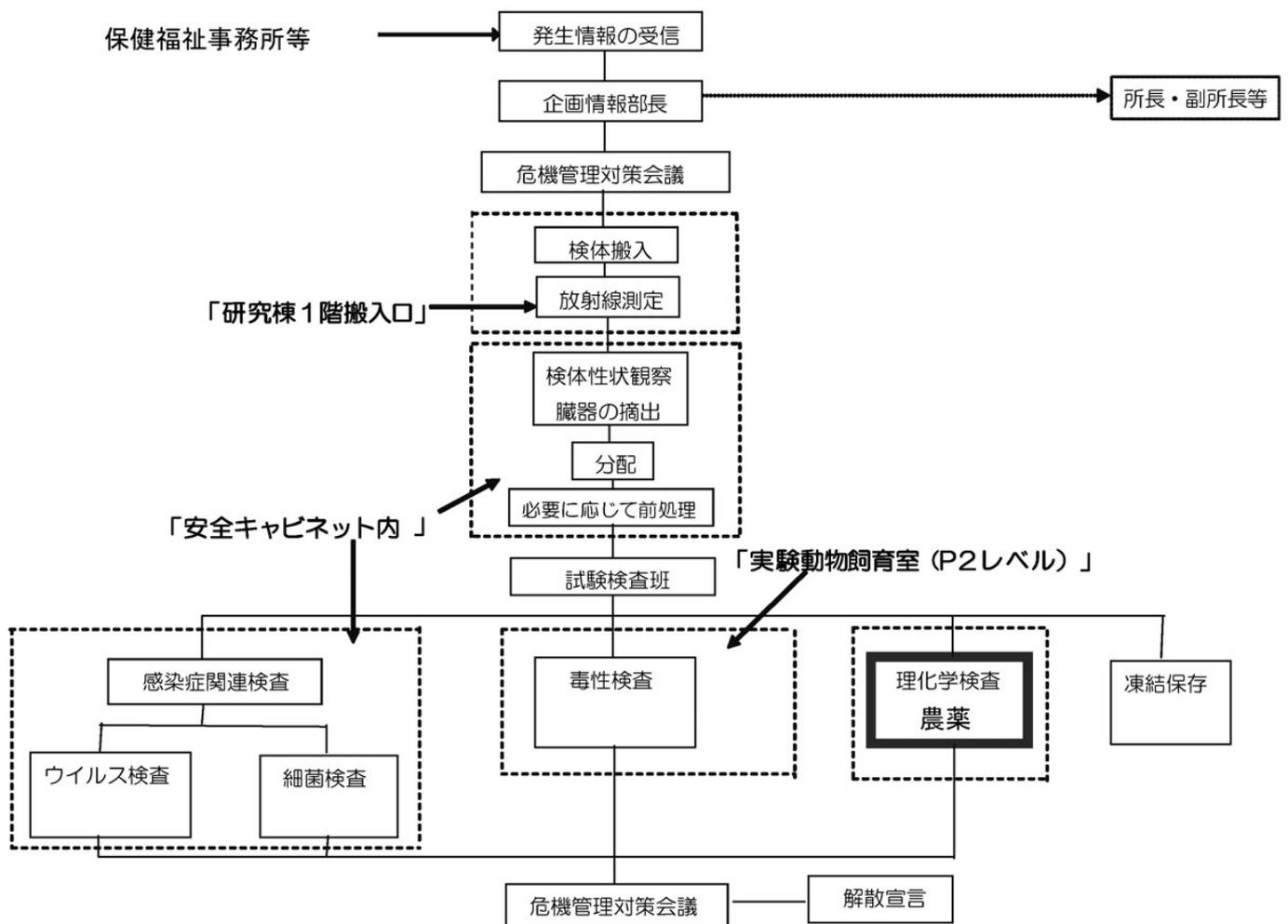


図2 健康危機管理時の検査体制の一例

となる。そこで、検査時間の短縮のため、有機リン系農薬と*N*-メチルカーバメート系農薬の同時抽出を試みた。青果物の有機リン系農薬の分析では、農薬の極性に応じて、アセトン、酢酸エチルによる抽出法が知られている^{10,11)}。一方、青果物の*N*-メチルカーバメート系農薬の分析ではジクロロメタンによる抽出法が示されている¹⁰⁻¹²⁾、近年、分析者の健康被害や環境への影響を考慮し、毒性の強いジクロロメタンに替え、酢酸エチルを用いた分析法が用いられるようになった¹³⁾。そこで我々は、有機リン系及び*N*-メチルカーバメート系農薬を同時に抽出するために、抽出溶媒には青果物中の高極性有機リン系農薬分析法に準じて酢酸エチルを選択した。有機リン系農薬測定には、酢酸エチル抽出液をそのまま供し、

N-メチルカーバメート系農薬測定用には、溶媒をメタノールに置換し分析に供した。有機リン系農薬の分析には、リン化合物に対し選択性の高い炎光光度検出器付きガスクロマトグラフィー法 (GC-FPD) で定量し、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) でスペクトルを確認した。*N*-メチルカーバメート系農薬の分析には液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) または液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いて分析した。

近年普及したLC/MS/MSはGC/MSに比べ、熱に不安定な成分の測定が可能のため、適用範囲が広く汎用性が高い。また、MS/MSは質量によるイオン選択を2度行うことができるため、高感度で選択性の高い分析能を有

表1 野鳥の大量不審死事例 (1999年~2013年)

発生年月	主な野鳥	検査結果			
		放射能	感染症	農薬	
1999(平成11)年	1月	カラス・ヒヨドリ・ツグミ	n/a	陰性	EPN
	3月	ドバト・カラス・ヒヨドリ	n/a	陰性	フェニトロチオン
2002(平成14)年	10月	ハト	陰性	陰性	DDVP
	10月	カラス	陰性	陰性	不検出
2003(平成15)年	2月	ヒヨドリ・ツグミ	陰性	陰性	シアノホス
	7月	カラス	陰性	陰性	n/a
	10月	カラス	n/a	陰性	不検出
2004(平成16)年	2月	カラス	n/a	陰性	n/a
	4月	カラス	陰性	陰性	シアノホス
	5月	カラス	陰性	陰性	パラチオン
	5月	カルガモ	陰性	陰性	ダイアジノン
	5月	カラス	n/a	陰性	n/a
	11月	カラス	n/a	陰性	n/a
2005(平成17)年	3月	カラス	陰性	陰性	シアノホス
	5月	ハシボソミズナギドリ	陰性	陰性	n/a
	6月	ハト	陰性	陰性	メソミル
	12月	トビ	陰性	陰性	フェニトロチオン
2007(平成19)年	2月	カラス・ヒヨドリ	陰性	陰性	メソミル
	2月	ヒヨドリ	陰性	陰性	メソミル
	3月	ハト	陰性	陰性	n/a
	3月	カラス	n/a	陰性	n/a
	3月	ヒヨドリ	陰性	陰性	フェニトロチオン
	12月	インコ	n/a	陰性	n/a
2009(平成21)年	4月	カラス	n/a	n/a	不検出
2012(平成24)年	6月	ハト・スズメ	n/a	n/a	不検出
2013(平成25)年	10月	スズメ	n/a	n/a	メソミル

n/a : 当該検査を実施せず

する装置である¹⁴⁾。N-メチルカーバメート系農薬の分析方法は、ポストカラム反応槽付き高速液体クロマトグラフ (HPLC) での蛍光誘導体化による方法等が知られている¹⁰⁻¹²⁾。しかし、ポストカラム-HPLC法では、特殊な機能を持つHPLCの装備が必要であり、反応液の準備やサンプルの精製等の操作が煩雑であるため、緊急検査時の迅速な対応には適していない。そこで、N-メチルカーバメート系農薬の緊急検査にLC/MS/MSの導入を試みた。その結果、N-メチルカーバメート系農薬は、蛍光誘導体化等を経ず分析することが可能となり、高感度で選択性の高い分析法を構築することが出来た。

2. 農薬の検出事例

平成10年度～平成25年度に当所に対応した、野鳥の斃死事例の検査結果を表1に示した。野鳥等の斃死事例は26件発生しており、いずれの事例とも放射能検査及びウイルス等の感染症検査では異常は認められなかった。このうち残留農薬等の理化学分析を実施した事例は18例であり、14例について農薬を検出した。検出された農薬はメソミル4例、シアノホス3例、フェニトロチオン3例、他にEPN、DDVP、ダイアジノン、パラチオンであった。代表的な検出事例について、概要を示す。

事例1 ヒヨドリの斃死事例

郊外の民家周辺でヒヨドリ約30羽の死体が発見され、このうち状態のよいヒヨドリ3羽が衛生研究所に搬入された。検体は搬入後インフルエンザの簡易検査を行い、陰性であることを確認した後に外観を観察した。外観観察の結果、全検体とも外傷や出血は認められず、下痢等による羽毛の汚れもなく、異常は認められなかったことから、さらに解剖して胸腔及び腹腔内臓器を観察した。摘出した食道から筋胃および内容物にも目視では異常がなかったため、これらを試料とし農薬検査を行った。その結果、N-メチルカーバメート系等農薬の分析では、分析対象とした8種ともすべて不検出であった。有機リン系等農薬33種を分析したところ、FPD-GCでの分析で検査に供したヒヨドリの胃及び胃内容物のすべてから、殺虫剤のフェニトロチオン0.09～0.43 mgを検出し、GC/MSのマスペクトルが標準品と一致したことから、フェニトロチオンを確認した。フェニトロチオン以外の32種の有機リン系農薬は不検出であった。

フェニトロチオン標準溶液及び胃内容物抽出液のGC-FPDのクロマトグラム及びGC/MSのマスペクトルを図3及び4に示した。

事例2 ヒヨドリ、カラスの斃死事例

県内市街地の住宅街でカラス7羽、近接地でカラスとヒヨドリの各1羽の死骸及び輪切りのミカンが発見された。警察を通して、カラス、ヒヨドリ各1羽及びミカンの検査が依頼された。

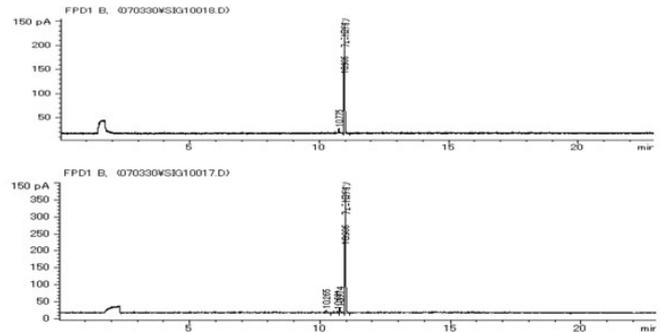


図3 FPD-GCによるクロマトグラム

上段：フェニトロチオン標準溶液 (0.5 μg/mL)
 下段：ヒヨドリの胃内容物抽出液
 装置：島津GC-2010i
 カラム：HP-5 (Agilent) 長さ30m、内径0.32mm、膜厚0.25 μm
 注入口温度：220℃
 検出器温度：280℃
 カラム温度：50℃ (2分保持) - 20℃/分 - 280℃ (10分保持)
 キャリヤーガス：ヘリウム1.33mL/min
 注入モード：スプリットレス
 注入量：2 μL

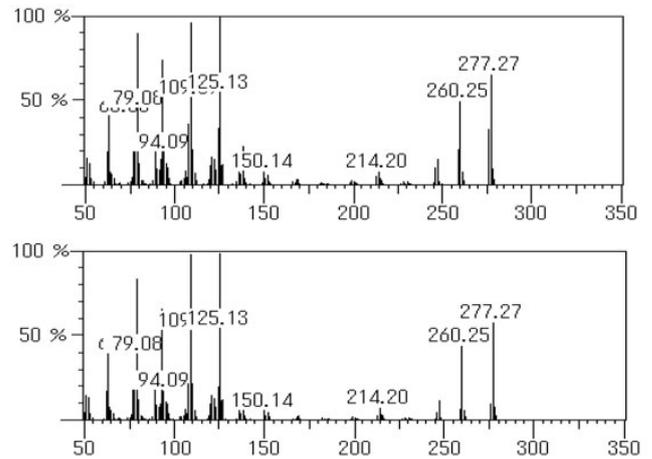


図4 GC/MSによるマスペクトル

上段：フェニトロチオン標準溶液(1.0 μg/mL)
 下段：ヒヨドリの胃内容物抽出液
 装置 MS部：日本電子Automass150
 GC部：アジレントAgilent6890
 カラム：DB-5MS(J & W) 長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25 μm
 注入口温度：220℃
 イオン源・インターフェイス温度：250℃
 カラム温度：50℃ (1分保持) - 10℃/分 - 280℃ (10分保持)
 キャリヤーガス：ヘリウム1.2mL/min
 注入モード：スプリットレス
 注入量：2 μL
 MSモード：スキャンモード

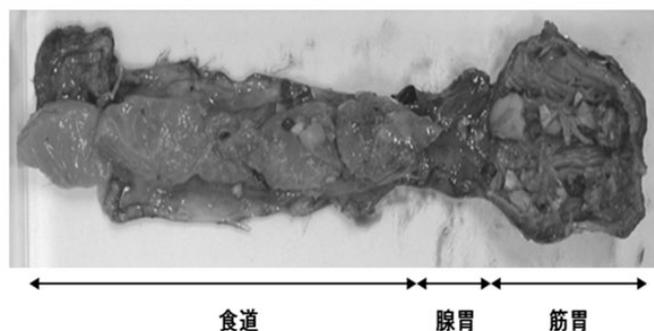


図5 カラスの食道から筋胃にかけての内容物（事例2）

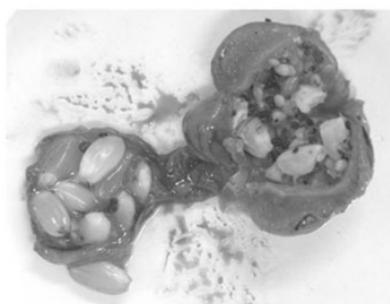


図6 スズメの胃内容物（事例3）

外観観察の結果、いずれも外傷や出血は認められず、下痢等による羽毛の汚れもなく、異常は認められなかった。いずれも栄養状態は良好であった。剖検の結果、2検体とも胸腔および腹腔内臓器に著変は認められず、死後変化も少なかった。カラスでは、咽頭直下から腺胃直前の食道全域でミカンのじょうのう（房）が充満していた（図5）。筋胃には、ミカンの果肉の他、植物の種子様物質等が確認された。消化管粘膜に出血等の変化は認められなかった。ヒヨドリでは食道から胃にかけて内容物はほとんどなかったが、筋胃内でミカンの果肉が散見された。2例とも栄養状態は良好で臓器に著変が認められなかったことから、衰弱死したものではないと考えられた。現場から採取したミカン、カラスにおいては食道または胃内容物を、ヒヨドリでは内容物を含む筋胃を試料とし農薬検査を実施した。その結果、分析したすべての検体から*N*-メチルカーバメート系農薬のメソミルを検出した。カラスにおいては、筋胃内容物からのメソミル検出量が0.04 mgであるのに対し、食道内容物からの検出量は0.55 mgと高い値を示した。また、現場から採取したミカン一房からは2.4 mgのメソミルを検出した。

事例3 スズメの斃死事例

管内のサトイモ畑で110羽程度のスズメの大量死が発見された。インフルエンザの簡易検査を行い、陰性であることを確認した後に、15羽が衛生研究所に搬入され、

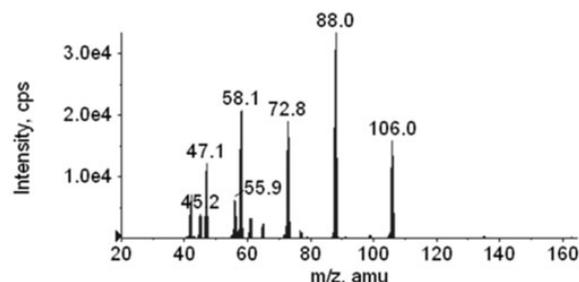
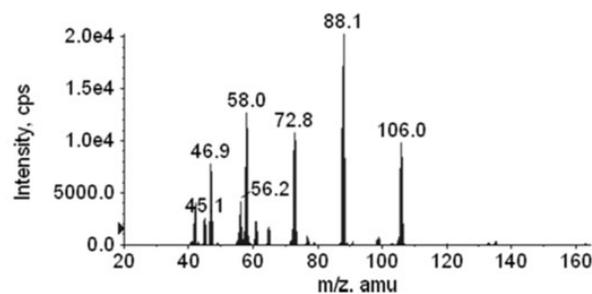


図7 LC/MS/MSによるプロダクトイオンキャンスペクトル

上段：メソミル標準溶液（1 μg/mL）

下段：スズメ胃内容物 抽出液

装置：API3000

カラム：X-Terra MS 2.1mmid.×150mm 3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A：5mM酢酸アンモニウム溶液

B：5mM酢酸アンモニウムメタノール溶液のグラジェント

流量：0.2mL/min

注入量：5 μL

イオン化法：ESI(+)

死因調査を行った。

外観観察の結果、くちばしに土の付着が15検体中4検体で観察された。全個体とも外傷や出血は認められず、下痢等による羽毛の汚れもなく、異常は認められなかった。いずれも栄養状態は良好であった。5羽を選び剖検した結果、5検体とも胸腔および腹腔内臓器に著変は認められず、死後変化も少なかったことから、衰弱死したものではないと考えられた。

全検体で筋胃内には摂取物が充満しており、その中には未消化の米粒が確認された検体もあった（図6）。また、4検体では嗉嚢にも未消化の米粒が貯留していた。全検体の食道から筋胃及びその内容物を分析試料として採材した。農薬について分析したところ、殺虫剤のメソミルが分析した各検体から3.5～18.4 μg検出された。有機リン系農薬61種及びメソミル以外の*N*-メチルカーバメート系農薬8種については不検出であった。メソミル標準溶液及び胃内容物抽出液のLC/MS/MSのプロダクトイオンキャンスペクトルを図7に示した。

事例1で検出したフェニトロチオンの鳥類に対する経口投与による半数致死量（LD50）は23.6～1,190 mg/kg

との報告がある¹⁵⁾。また事例2及び3で検出したメソミルは鳥類に対する感受性が高く、鳥類に対する経口投与によるLD50は10~50 mg/kgである¹⁶⁾。各事例とも検出された農薬の量はこれらの値に比べ低く、特に事例3では1/10以下であったが、実際に野鳥が摂取した農薬の量は致死量に達しており、一部はすでに代謝されていたものと推測された。

いずれの事例も、野鳥を撃退するために野鳥の餌に人為的に農薬を付着させたものが原因であったことが推測された。市街地や民家に隣接した農耕地等、人の往来がある場所では、農薬を付着させた餌等をベツトとして飼育されている犬や猫が誤食したり、幼児が誤って手にするなど、人の健康を害する可能性も懸念された。

平成21年(2009年)4月8日に施行された毒物及び劇物指定令の一部改正により、メソミル及びこれを含有する製剤は毒物に指定された。しかし、メソミルの含有量が45%以下の場合、農業用品目販売者が取り扱うことができる劇物に指定される。これらはインターネット販売等でも園芸用として販売されているため、健康被害の原因物質となりうる薬剤も一般の人が容易に入手できる。今回報告した野鳥の斃死事例は、野鳥による作物への被害防止のため、野鳥を駆除する目的で農薬を使用したことが原因であると推測された。住宅地が隣接している都市近郊の農耕地でのこのような行為は、近隣住民に健康被害を及ぼす可能性がある。そのため事故防止の観点から、本事例のような行為の危険性について、住民に対し啓発する必要があると考えられた。

おわりに

健康危機管理時の検査体制を整え、被害状況把握を目的とした調査を実施するためには、日頃の調査研究の中で新たな技術を習得し、これを活用する必要がある。近年、我々は新たな分析手法として、広く普及するようになったLC/MS/MSを調査研究や日常検査に取り入れた。そこで健康危機管理時の理化学検査にもLC/MS/MSを導入し、野鳥の斃死事例に対する農薬検査体制を構築した。この結果、斃死の原因物質の一つがN-メチルカーバメート系農薬のメソミルであることを突き止め、健康被害の拡大を未然に防ぐことができた。さらに、当所では本事例を契機に健康危機管理時の農薬検査を強化し、加工食品への農薬混入に対処するための分析法の整備を開始した。このことにより、その後平成26年(2014年)に発生した国産冷凍食品への農薬混入事件の際には、迅速に検査体制を整備し製品検査を実施することが可能となり、県内流通製品の安全性を確認することができた。また平成20年(2008年)に発生した中国産乳製品へのメラミ

ンの混入事例など、農薬以外の化学物質による汚染事例でも、LC/MS/MSによる分析法を整備し汚染実態調査を実施し、県内流通製品の安全性を確認することができた。このように、我々の生活を取り巻く世の中の動きを視野に入れた調査研究や、日々の技術の研鑽により得られた知見を緊急検査に導入することにより、健康危機管理体制の充実に繋げることができたと考える。

衛生研究所では、平常時にはレギュラトリーサイエンスの概念に基づき、公衆衛生の分野において科学技術を人と生活に適用させるための調整(ルールづくり)を実施し、公衆衛生行政を支えるための調査研究を進めている。一方、健康危機管理時に迅速に検査体制を整え、原因究明と危害防止に努めることは、衛生研究所の重要な責務である。平常時の調査研究で培われた技術や経験は、健康危機管理時の迅速かつ多角的な原因究明に資するため必要不可欠なものと思われる。今後も日々の調査研究の中で新たな技術の導入や分析精度の向上に努めることにより、健康危機管理時の対応に備えることが必要である。

謝辞

稿を終えるにあたり、ともに緊急検査及び調査研究に携わった、理化学部食品化学グループ並びに薬事毒性・食品機能グループの皆様に深謝します。

参考文献

- 1) 厚生省3局長, 地方衛生研究所設置要綱, 日厚生省発予第20号, 昭和23年4月7日.
- 2) 厚生事務次官, 地方衛生研究所の機能強化について, 厚生省発健政第26号, 平成9年3月14日.
- 3) 厚生省, 健康危機管理基本指針, 厚生省発厚第1号, 平成9年1月9日.
- 4) 厚生労働省, 地域における健康危機管理について~地域健康危機管理ガイドライン, 平成13年3月.
- 5) 厚生労働省健康局長通知, 地域保健対策の推進に関する基本的な指針の一部改正について, 健発0731第8号, 平成24年7月31日
- 6) 衛生試験法・注解2015: 日本薬学会編, pp466-480, 金原書店, 東京 (2015)
- 7) 植村振作, 河村宏, 辻万千子, 富田重行, 前田静夫: 農薬毒性の事典pp130, 三省堂, 東京 (1998)
- 8) 清宮幸男, 古川岳大, 佐々木幸治ほか: 野鳥のコリンエステラーゼ阻害剤中毒, 日本産業動物獣医師会会誌, 60, 191-195 (2007)
- 9) 藤巻照久, 佐藤久美子, 岸美智子: へい死野鳥の農

- 薬分析法について, 神奈川県衛生研究所報告, 33, 83-88 (2003)
- 10) 厚生労働省通知, 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について, 食安発第0227004号, 平成19年2月27日
- 11) 食品衛生検査指針 残留農薬編2003: 厚生労働省監修, pp60-75,163-173, 広川書店, 東京 (2003)
- 12) 永山敏廣, 小林麻紀, 塩田寛子, 森野雅世, 伊藤正子, 田村行弘: 農産物中のN-メチルカーバメート系農薬分析法, 食品衛生学雑誌, 35, 470-478 (1994)
- 13) 後藤智美: 食品中の残留化学物質の理化学的分析法に関する研究—カーバメート系農薬の迅速分析法について—, 薬学雑誌, 130, 999-1010 (2010)
- 14) 望月直樹: 食の安全におけるLC-MS/MS分析の問題点, 薬学雑誌, 131, 1019-1025 (2011)
- 15) EXTOXNET PIP-FENITROTHION
 <<http://extoxnet.orst.edu/pipps/fenitrot.htm>>
 (2017/6/30アクセス)
- 16) EXTOXNET PIP-METHOMYL
 <<http://extoxnet.orst.edu/pipps/methomyl.htm>>
 (2017/6/30アクセス)

Emergency inspection correspondence
 during health crisis management
 — Focusing on the mortality cases of
 wild birds by pesticides—

Shigemi KAI

This review summarized the emergency inspection correspondence in case of health crisis management in Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, focusing on chemical analysis.

We established an inspection system for acute toxic pesticides to investigate the causes of wild bird suspicious death. The organophosphorus pesticides were analyzed using gas chromatography-flame photometric detector (GC-FPD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The N-methyl carbamate pesticides were analyzed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) or liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

From 1999 to 2013, we conducted a simultaneous analysis for pesticides to investigate the causes of 18 cases of wild bird suspicious death. According to the investigation, there were cases where acute toxic pesticides such as Fenitrothion and Methomyl were detected.

It was considered that crops were contaminated intentionally by pesticides to repel wild birds.

It is an important role of the institute for hygiene research to establish an inspection system quickly when health crisis management occurs, to investigate the cause and to prevent harm.

総説

「未病」の改善を目指した神奈川県衛生研究所の研究, 教育, 広報活動

秋山晴代^{1*2}, 鈴木麻希^{1*}, 五十鈴川和人³,
富田基郎⁴, 甲斐茂美¹, 金成俊³, 根来孝治²,
中野泰子³, 宮澤真紀¹

Research, educational activities and public relations for "curing Mibyou" by Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

Haruyo AKIYAMA, Maki SUZUKI,
Kazuto ISUZUGAWA, Motowo TOMITA,
Shigemi KAI, SungJoon KIM, Takaharu NEGORO,
Yasuko NAKANO and Maki MIYAZAWA

Key Words : curing Mibyou, adiponectin, a public lecture on Mibyou, a questionnaire about Mibyou

緒言

神奈川県では「未病を治すかながわ宣言」(平成26年1月)に基づき, 健康寿命の延伸を図る取組みを進めてきた。超高齢社会の到来に備え, 「未病」を健康と病気の間で連続的に変化するものと捉え, 「未病を改善する」という概念の普及を目的とした教育広報活動に努めている¹⁾。平成27年10月には「未病サミット神奈川宣言」が採択され²⁾, その実現に向けて全ての世代が未病を自分のこととして考え, 行動できるよう, 新たなステージの取組みを展開している(かながわ未病改善宣言(平成29年3月29日))³⁾。

神奈川県衛生研究所においても, 未病を改善する取組みを支える仕組み作りの一環として, 平成26年度より神奈川県未病研究事業(政策局政策部総合政策課)を開

始した。遺伝子改変マウスを用いて未病の指標となるような因子の探索を実施している⁴⁾。さらに, 「未病」の認知・理解拡大に向けて平成27年度から2年間一般向けの未病出前講座を開催し, 未病出前講座の受講者に未病概念の理解や対策の実践に関するアンケート調査を実施した(神奈川県公衆衛生協会調査研究)⁵⁾。このほか, 講座内容をまとめたポスター等を所内の施設公開や平成28年度かながわ科学技術フェアで公開している。

本稿では, これら未病改善に向けた衛生研究所の取組みを, ①基礎研究, ②未病出前講座とアンケート調査, ③ポスターや体験学習を用いた広報活動の3側面からまとめたので報告する。

① 未病に関与するターゲット因子解明とその応用(基礎研究)

未病とは健康と病気の間で連続的に変化している状態であり, 生活習慣病をはじめとする病気を予防するためには, この時期の診断(未病診断)を行うためのターゲット因子探索が非常に重要となる(図1)。近年, 肥満や糖尿病, 動脈硬化性疾患に共通する病態として, 非常に低レベルの慢性炎症が注目されている。炎症状態の持続が, 動脈硬化症や糖尿病などの生活習慣病の発症の原因になることが分かってきた^{6,7)}。さらにこれら炎症性疾患に罹患すると, 身体の代謝バランスが崩れ, 本来一定に保たれているはずの血中のアミノ酸濃度のバランスが変化することも明らかになってきている⁸⁾。そこで本研究では, 未病を「生体内で小規模な炎症が起こりつつある状態」と定義し, 易炎症性を示すアディポネクチン(Adn)遺伝子改変(アンチセンストランスジェニック(AsTg))マウス⁹⁻¹¹⁾を用いて各種臓器のアミノ酸(36種)やサイトカイン/ケモカイン(31種)濃度の変化などを解析し未病の指標となるかどうかを検討した。なお, Adnは脂肪細胞から分泌される長寿ホルモンで, 抗炎症作用, 抗糖尿病作用, 抗動脈硬化作用など多くの機能を持つことが知られている。本研究ではAdn発見者のひとりに参加頂いた。使用したAdn AsTgマウスは, 野生型マウスと比べ組織に含有されるAdn量が減少しており肥満や糖尿病患者と同じ傾向を示すこと, さらに炎症が起こりやすいにもかかわらず, 形態に異常が見られない(表現型に変化がない)ことから, ヒトによって一貫性のない症状を示す「未病状態」を再現するのに適していると考えられた。研究の結果, 表1に示すように野生型と比べAdn AsTgマウスでは, 一部の血漿中アミノ酸やサイトカイン濃度に顕著な違いが認められ, 特にメスではメタボリックシンドロームで変化があると言われる分岐鎖アミノ酸のロイシン濃度が上昇していた。同

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

*前 理化学部

2 帝京平成大学 薬学部

3 横浜薬科大学

4 昭和大学

様に炎症性疾患で上昇すると報告のあるPAI-1の有意な上昇が認められた。さらにこれらの因子とアディポネクチン濃度の相関を解析したところ、野生型とAdn AsTgマウスでは全く異なる相関性を示すことが分かった(表2)。以上のことから、マウスを用いた本基礎研究により、血漿中のアディポネクチンをはじめとしたサイトカイン等とアミノ酸濃度の相関をみることで、炎症が起りやすい状態を把握出来る可能性が示唆された。

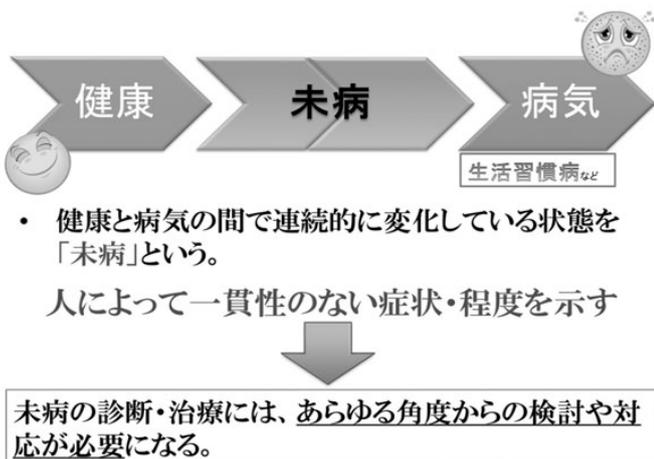


図1 未病とは何か

未病とは健康と病気の間で連続的に変化している状態であり、生活習慣病をはじめとする病気を予防するためには、この時期の診断(未病診断)を行うためのターゲット因子探索が非常に重要。

表1 Adn AsTgマウスで変化の認められたアミノ酸及びサイトカイン

野生型との比較	Adn AsTg	
	オス	メス
各種アミノ酸	トリプトファン↑	ロイシン↑、グルタミン↑
各種サイトカイン	IL-2↓、IL-1β↓	PAI-1↑

野生型と比べAdn AsTgマウスでは、一部の血漿中アミノ酸やサイトカイン濃度に顕著な違いが認められ特にメスではメタボリックシンドロームで変化があると言われる分岐鎖アミノ酸のロイシン濃度が上昇していた。同様に炎症性疾患で上昇すると報告のあるPAI-1の有意な上昇が認められた。

表2 Adn濃度と各種アミノ酸またはサイトカイン濃度の相関

Pearsonの積率相関係数	オス		メス	
	野生型	Adn AsTg	野生型	Adn AsTg
各種アミノ酸とAdn濃度の相関	総Adnと正相関するアミノ酸8種 アラニン、セリン、アスパラギン、オルニチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、フェニルアラニン	総Adnと正相関するアミノ酸5種 プロリン、バリン、イソロイシン、オルニチン、チロシン	高分子量Adnと負相関するアミノ酸3種 グリシン、オルニチン、フェニルアラニン	高分子量Adnと正相関するアミノ酸4種 スレオニン、ハイドロキシプロリン、リシン、メチオニン
各種サイトカインとアディポネクチン濃度の相関	なし	高分子量Adnと負相関するサイトカイン1種 Insulin	なし	総Adnと正相関するサイトカイン9種 IL-2、IL-4、IL-5、IL-12p70、IL-17、Eotaxin、IFN-γ、MCP-1、MIP-1β

各種アミノ酸またはサイトカインとアディポネクチン濃度の相関を解析したところ、野生型とAdn AsTgマウスでは相関を示す因子が異なっていた。

② 未病出前講座とアンケート調査

未病出前講座は、平成27年度から28年度の間計14回実施し、都市部と郡部7市1町(小田原市、座間市、茅ヶ崎市、横浜市、綾瀬市、川崎市、相模原市、葉山町)に出向いた。横浜薬科大学に協力を仰ぎ、高校での若年層向け講義にも対応した。内容としては、神奈川県を取り巻く現状について説明し、高齢者、現役世代、子供などの世代にも多くの問題があることを指摘した後、「未病」とは何か、未病を治すかながわ宣言(平成26年)について説明した。さらに、私たちが目指す参加型医療(食・運動・社会参加の3つの取組みで自分の健康状態と向き合うこと)を提案した。また、受講者の中には漢方に興味のある方もいらしたことから、西洋薬と漢方薬の互いの長所を生かし使い分けすることの大切さを説明したほか、関心の高かった漢方薬を花粉症や熱中症など季節特有の症状に対応する形で紹介した。その後、神奈川県衛生研究所の取り組み(前述の未病研究事業)をトピックスとして紹介する、という流れで進めた。なお、講座所要時間は受講団体の希望に合わせて臨機応変に対応し、

アンケートご協力をお願い

神奈川県では黒岩知事以下、未病という概念を広く県民の皆様を知って頂き、おひとりおひとりの健康維持に役立てて頂きたいと思っております。また皆様がもっと健やかに暮らして頂けるような施策を今後も打ち出していきます。そこで、本日の講義をお聞きになった皆様のご意見を是非伺いたいと思います。全部で10項目あります。ご協力の程、よろしく願い申し上げます。

- あなたの性別を教えてください。
女性 男性
- あなたの年齢(年代)を教えてください。
10代以下 20代 30代 40代 50代
60代 70代 80代以上
- あなたを含め、同居しているご家族の構成人数を教えてください。
1人 2人 3人 4人以上
- これまで健康を維持するために心がけていたことを教えてください(複数選択可)。
特に意識して心がけたことはない
食へ過ぎないようにする 低カロリー食を食べる 定期的に食事をとる
定期的に運動する 多少つらくても体を動かす
エレベーター等を使わないでなるべく歩く
サークルなどに参加する 家族や知人と積極的に会話する
睡眠時間を十分にとる その他()
- これまで「未病」についてどの程度知っていましたか?
概念まで知っていた ある程度知っていた
記事を見た、または聞いたことがある 知らなかった
- 今回の講座内容に興味を持ちましたか?
とても興味深い 興味を持った ますます いまいち
- 今回の講座内容の難易度について教えてください。
簡単 ちょうど良い 少し難しい 難しい

裏面に続きます!!

図2 未病に関するアンケート調査項目(表のみ)

A4用紙2枚(表裏)を用い、5分程度で回答可能な計10項目の質問事項を設定した。

およそ60～90分程度の講義の後、15～30分の質疑応答に充てた。受講団体にもよるが、講座後に多くの質問がなされ、自らの健康状態の維持・改善に強い関心があることが明らかになった。さらに、未病講座内容を帰宅し

表 3 受講者の年代

	10代	20代	30代	40代	50代	60代	70代	80代以上	未記入	総数
度数(人)	67	6	12	29	35	120	107	50	3	429
割合(%)	16	1	3	7	8	28	25	12	1	100

講座を受講した10代から80代以上の回答者429人の中で60代以上が全体の65%を占めていた。

表 4 男女比

	男性	女性	未記入	総数
度数(人)	121	298	10	429
割合(%)	28	70	2	100

アンケート回答者は女性が多かった。

表 5 これまで健康を維持するために心がけてきたこと*

	特に意識して心がけたことはない	食べ過ぎないようにする	低カロリー食を食べる	規則的に食事をとる	定期的に運動する	多少つらくても体を動かす	エレベーター等を使わないでなるべく歩く	サークルなどに参加する	家族や知人と積極的に会話する	睡眠時間を十分に取る	その他
度数(人)	43	224	45	245	197	116	146	162	142	233	15
割合(%)	10	52	10	57	46	27	34	38	33	54	3

*：複数回答可

これまでの生活で健康維持のために心がけていたことを複数回答して頂いたところ、食生活に注意をしている方が多く、50%を超えたのは規則的に食事を摂る、過食しないなどの項目であった。食生活以外では、睡眠時間を十分に取るのが54%、定期的に運動するのが46%と比較的多かった。

表 6 これまで未病に関してどの程度知っていたか

	概念まで知っていた	ある程度知っていた	記事を見た、または聞いたことがある	知らなかった	未記入	総数
度数(人)	42	132	135	109	11	429
割合(%)	10	31	31	25	3	100

「未病」についてこれまでどの程度知っていたかについては、概念まで知っていた方は10%程度存在し、聞いたことがあると答えた方を含めると、未病の認知度は72%だった。

表 7 現在の健康状態について

	健康	未病第一段階*1	未病第二段階*2	病気	未記入	総数
度数(人)	150	145	81	31	22	429
割合(%)	35	34	19	7	5	100

1未病第一段階：「健康」とまではいかないけれど、好きなものを食べることができるし、身体を動かすことができる方

*2未病第二段階：何らかの病気になり、手術や薬剤投与により回復傾向にあるけれど運動や食事が不自由な方

自身の健康状態に関しては、全体の53%が「未病」（第一段階34%、第二段階19%）と回答しており最も多かった。

表 8 講座内容に興味を持ったか

	とても興味深い	興味を持った	まずまず	いまいち	未記入	総数
度数(人)	112	230	63	8	16	429
割合(%)	26	54	15	2	4	100

今回の講座内容への関心度については、「とても興味深い」及び「興味を持った」と答えた方は全体の80%だった。

表9 講座を聞いて実践したい、さらに実践したいと思ったこと*

	食生活の改善	旬の食材を取り入れる	低栄養にならないようバランスのとれた食事を心がける	野菜や魚を多く摂取する	日常生活に適度な運動を取り入れる	無理をしない程度の活動を続ける	ボランティアやお稽古ごとや交流に参加する	人との出会いや交流に参加する	未病・漢方についてもっと知る	漢方について医師・薬剤師に相談してみる	今回の講座内容を誰かに教えてあげる	未病についてもっと知る	その他
度数(人)	143	109	169	219	208	162	77	137	82	23	101	13	6
割合(%)	33	25	39	51	48	38	18	32	19	5	24	3	1

*：複数回答可

講座を聞いて実践したい、さらに実践したいと思ったこと*

てから見直したいとの理由で詳しい配布資料を希望する団体が多かったことから、ME-BYO®キャラクターであるミビョーナ・ミビョーネ¹²⁾をふんだんに盛り込んだカラーのリーフレットを作成した(600部)。講座内容を補完する意味でも、非常に有効であったと示唆された。

アンケート調査は、未病出前講座を受講した延べ429人に対し実施した。図2に示すように、A4用紙2枚(表裏)を用い、5分程度で回答可能な計10項目(性別、年齢、自身の健康状態、同居人数、未病についての理解、健康を維持するために心がけていたこと、講座を聞いて実践しようと思ったこと等)の質問事項に留めた。

アンケート結果をまとめたところ、講座を受講した10代から80代以上の回答者429人の中で60代以上が全体の65%を占めており、女性が多かった(表3, 4)。これまでの生活で健康維持のために心がけていたことを複数回答して頂いたところ、表5に示すように、食生活に注意をしている方が多く、50%を超えたのは定期的に食事を摂る、過食しないなどの項目であった。食生活以外では、睡眠時間を十分に取るが54%、定期的に運動するが46%と比較的多かった。また、「未病」についてこれまでどの程度知っていたかについては、概念まで知っていた方は10%程度存在し、聞いたことがあると答えた方を含めると、未病の認知度は72%だった(表6)。

なお、平成27年6月から平成28年11月の間で講座の回数を重ねるほどこの認知度が上がったかどうかを調べたが、有意差は認められなかった。全く知らなかったと回答した25%の集団に対し、今後どのようなアプローチをしていくかが課題だと考えられた。自身の健康状態に関しては、全体の53%が「未病」(第一段階34%、第二段階19%)と回答しており最も多かった(表7)。なお、未病の第一段階は、「健康」とまではいかないけれど、好きなものを食べることができるし、身体を動かすことができる方、第二段階は何らかの病気になり、手術や薬剤投与により回復傾向にあるけれど運動や食事が不自由な方、と説明している。今回の講座内容への関心度については、「とても興味深い」及び「興味を持った」と答えた方は全体の80%だった(表8)。未病講座聴講後に実践したい、またはこれまでやっていたがさらに実践し

たいと思った項目を表9にまとめた。受講した方の半数近くから食生活の改善や日常生活に運動を取り入れたいなどの積極的な回答が得られた。また、これまでカロリーなど気にせず食事していた384人のうち32%が食生活の改善を、37%がバランスのとれた食事を、48%が野菜や魚を多く摂取するよう心掛けたいと受講後に回答した。このほか、これまで定期的な運動をしていなかった232人のうち47%は日常生活に適度な運動を、36%が無理をしない程度の運動を取り入れたいと回答した。一方、日頃何もしていなかった43人のうちほとんどは、ボランティアなどの社会活動をしようとは考えなかった。未病講座に参加した受講者は、積極的に講座を受けたいと考えているため「社会参加」の重要性に関しては講座内で多くを触れなかったが、今後は改良する必要があると考えられた。

③ ポスターや体験学習を用いた広報活動

未病出前講座のほか、未病の認知・理解拡大のために、講座内容をまとめたポスターを所内の施設公開(平成27, 28年度)やかながわ科学技術フェア(平成28年度)で公開した(図3)。所内の施設公開では、子供用の体験学習として、野菜摂取の目標量(厚生労働省健康日本21)「1日350g以上」を実際の野菜を手に取りながら秤量してもらい、クイズに答える形で理解を深めてもらった。クイズの回答者にはミビョーナ・ミビョーネをあしらったマグネットステッカーを配布した(子供136人)



図3 未病ポスターの展示



図4 未病マグネットステッカー

(図4). ポスター内容は難しかったが、野菜の測定は面白かったとの感想が得られ、年齢に合わせたアプローチの必要性が示唆され今後の課題と考えられた。

まとめ

神奈川県衛生研究所では、未病改善の取組みとして①未病の指標となる因子の探索を目的とした基礎研究、②未病の認知・理解拡大を目的とした未病出前講座とアンケート調査、③幅広い世代への認知拡大を目指したポスターや体験学習を用いた広報活動、の3側面から衛生研究所ならではのアプローチをしてきた。①の基礎研究結果は、未病出前講座で多くの質問が寄せられた内容であり、受講者の関心の高さを感じた。今後は、一般の方にもよりわかりやすく研究成果を提示することが求められてくると思われる。またアンケート調査により、未病講座を受講することで、未病を改善するための取組み(食・運動・社会参加)への積極的姿勢と、健康維持に向けた意識向上が認められたことから、未病の認知と理解拡大に本講座が有効だったことが明らかになった。

今後の課題としては、加齢に伴い社会参加など新しいことにチャレンジすることが難しい傾向があるため、若年層のうちから積極的に社会活動するなどの風土を作る必要性が示唆された。また、年代によって健康への関心度は異なることから、年齢に応じたアプローチ法を今後も模索する必要がある。

文献

- 1) 神奈川県：健康寿命の延伸への取組みについて(掲載日：2017/4/11) <<http://www.pref.kanagawa.jp/cnt/f480290/>> (2017/5/3アクセス)
- 2) ME-BYOサミット神奈川2017, <<https://www.me-byo-summit.jp/>> (2017/5/3アクセス)
- 3) 神奈川県：かながわ未病改善協力制度(掲載日：2017/6/26) <<http://www.pref.kanagawa.jp/cnt/f480290/p754591.html>> (2017/6/30アクセス)
- 4) 神奈川県衛生研究所：平成27年度指定研究の概要(掲載日：2016/2/16) <http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/005_databox/0503_shiryuu/0503_juten/shitei_27.htm> (2017/5/3アクセス)
- 5) 神奈川県衛生研究所：平成28年度助成研究の概要(掲載日：2017/3/29) <http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/005_databox/0503_shiryuu/0503_osei/jyosei_28.htm> (2017/5/3アクセス)
- 6) 江口航生, 真鍋一郎：2型糖尿病と慢性炎症, 医学のあゆみ, **236**, 263-266 (2011)
- 7) 大島正伸：消化器がん発生における慢性炎症の役割, 医学のあゆみ, **236**, 267-270 (2011)
- 8) 臨床アミノ酸研究会<<http://www.aa-pri.jp/c00/c01/>> (2017/6/30アクセス)
- 9) Negoro T, Kin M, Takuma A, Saito K, Shimizu S, Nakano Y.: Potentiated macrophage activation by acid sensing under low adiponectin levels, *Mol Immunol.*, **257**(2), 141-150 (2014)
- 10) Saito K, Arata S, Hosono T, Sano Y, Takahashi K, Choi-Miura NH. et al.: Adiponectin plays an important role in efficient energy usage under energy shortage, *Biochim Biophys Acta.*, **1761** (7), 709-716 (2006)
- 11) Nakano Y, Tajima S, Yoshimi A, Akiyama H, Tsushima M, Tanioka T. et al.: A novel enzyme-linked immunosorbent assay specific for high-molecular-weight adiponectin, *J Lipid Res.*, **47**(7), 1572-1582 (2006)
- 12) 神奈川県：ミビヨーナ・ミビヨーネ(掲載日：2016/4/1) <<http://www.pref.kanagawa.jp/cnt/f530038/p859188.html>> (2017/5/3アクセス)

Research, educational activities and public
relations for "curing Mibyou" by
Kanagawa Prefectural Institute of Public
Health

Haruyo AKIYAMA^{1*2}, Maki SUZUKI^{1*},
Kazuto ISUZUGAWA³, Motowo TOMITA⁴,
Shigemi KAI¹, SungJoon KIM³,
Takaharu NEGORO², Yasuko NAKANO³
and Maki MIYAZAWA¹

Kanagawa Prefecture is promoting concept of Mibyou ("Curing ME-BYO[®]") (by educational activities and public relations) to overcome the challenges of the super-aging society. This review summarizes contributions by The Kanagawa Prefectural Institute of Public Health (KPIPH) and collaborators focusing on fundamental research, educational activities and public relations. Research using adiponectin antisense transgenic mice revealed correlations between expression of adiponectin and levels of serum branched amino acids. Possibility of adiponectin as one of diagnostic indicators of Mibyou was suggested. KPIPH and a collaborator provided public lectures on Mibyou for citizens and high school students several times to help people recognize and understand the concept of Mibyou. Questionnaire surveys were carried out after lectures to evaluate and improve these activities. The concept of Mibyou was also presented in open days of KPIPH and some other occasions. Posters summarizing Mibyou lectures were exhibited to spread the concept of Mibyou.

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

*previous affiliation

2 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei
University

3 Yokohama University of Pharmacy

4 Showa University

短報

健康危機管理に係る食品中に含まれる 農薬の迅速試験法の検討

福光徹, 小菅教仁*, 脇ますみ, 林孝子, 岸弘子**

Examination of a fast method for detection of pesticides in foods related to health crisis management

Toru FUKUMITSU, Norihito KOSUGE,
Masumi WAKI, Takako HAYASHI
and Hiroko KISHI

緒言

平成19年度に発生した中国製冷凍餃子へのメタミドホス混入事件や平成25年度に発生した冷凍食品へのマラチオン混入事件のように、近年、大規模な農薬混入事件が発生している。当所においても、これらの事件に伴う農薬検査のほか、県民からの苦情等に関連する食品中の農薬検査を実施し、食の安全性確保に努めている。また、当所管内において、野鳥等動物のへい死事例が発生した際には、必要に応じて農薬検査を実施し、原因究明及び健康被害発生防止に努めている。しかしながら、当所において緊急時に食品及びへい死動物等の農薬検査を実施する際には、事例ごとに検査法を検討して対応してきたため、多様な検査対象品に対する一定の効率的な前処理方法や質量分析装置による定量及び定性分析法が定まっていない。そこで、平成25年3月26日付け事務連絡¹⁾（以下、事務連絡）を参考とし、多様な検査対象品に迅速かつ簡便に対応できる農薬試験法を検討し、事務連絡に従って性能評価を実施したので報告する。

方法

1. 試料

加工食品として冷凍えびドリア、冷凍餃子、冷凍あじ竜田揚げ、白菜キムチ及びレトルトカレーを用いた。ま

た、野鳥のへい死事例を想定した試料として未加工の鶏砂肝を用いた。

2. 試薬

分析対象農薬は、過去の検出事例及び急性毒性の強さを考慮し、有機リン系農薬68種類とした（表1）。これらの標準物質又は標準液は、和光純薬工業㈱、Dr.Ehrensstorfer社又はSigma-Aldrich社製の残留農薬試験用又はその同等品を用いた。ただし、ホスチアゼート及びホスファミドン標準物質は異性体混合物、エトリムホス標準液は10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ シクロヘキサン溶液、クロルフェンビンホス(E) (α -CVP) 標準液は100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ シクロヘキサン溶液を用いた。エトリムホス及びクロルフェンビンホス(E)を除く標準物質は、それぞれアセトン又はアセトニトリルに溶かして1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液とした。68種類の各液を混合し、アセトンを用いて1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の混合標準溶液を調製した。

アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、メタノール及び*n*-ヘキサンは和光純薬工業㈱製残留農薬・PCB試験用（濃縮300）、無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業㈱製残留農薬・PCB試験用を用いた。水は、メルク㈱製Milli-Q Integral 5で精製した超純水を用いた。

吸引ろ過の際のろ過助剤は和光純薬工業㈱製セライトNo.545を、ろ紙はADVANTEC製No.5A (ϕ 55 mm)を用いた。

分散固相は、ジーエルサイエンス㈱製InertSep C18, InertSep NH2及びInertSep PSAを用いた。

3. 装置及び測定条件

3. 1 装置

ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies社製7890A, 質量分析装置 (MS) : 同社製5975C。

3. 2 測定条件

分析カラム : Agilent Technologies社製DB-5MS-DG (内径0.25 mm, 長さ30 m, 膜厚0.25 μm), キャリアガス : ヘリウム (1 mL/分, 定流量モード), 注入法 : パルスドスプリットレス (30 psi, 1分), 注入量 : 2 μL , 注入口温度 : 250°C, カラム昇温条件 : 50°C (1分) —25°C/分—125°C (0分) —10°C/分—300°C (10分), トランスファーライン温度 : 300°C, イオン源温度 : 230°C, イオン化法 : 電子イオン化法 (EI), イオン化エネルギー : 70 eV, 測定モード : 選択イオンモニタリング (SIM)。各分析対象農薬の測定イオンを表1に示した。

4. 試験溶液の調製

均一化した試料10.0 gに酢酸エチル75 mL及び無水硫酸ナトリウム75 gを加え、5分間ホモジナイズした後、ろ紙上にろ過助剤約7 gを積層して吸引ろ過した。

神奈川県衛生研究所 理化学部

〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

* 現 神奈川県鎌倉保健福祉事務所三崎センター

**前 理化学部

表1 分析対象農薬, 測定条件及び性能評価結果

分析対象農薬	保持時間 (分)	測定イオン		冷凍えびドリア			冷凍餃子			冷凍あじ竜田揚げ		
		定量	確認	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	判定	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	判定	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	判定
メタミドホス	7.0	141	94	141.3	5.0	○	147.5	17.5	○	187.3	15.7	○
ジクロロホス	7.1	109	185	52.7	6.7	○	60.9	18.2	○	78.1	6.3	○
メビンホス (Z)	9.1	127	192									
メビンホス (E)	9.1	127	192	106.7	3.2	○	123.2	6.6	○	134.5	8.2	○
アセフェート	9.2	136	94	50.4	14.4	○	73.1	6.2	○	116.5	17.5	○
メタクリホス	9.9	240	208	99.7	3.3	○	106.9	11.0	○	116.0	9.3	○
オメトエート	11.1	156	110	131.8	3.4	○	165.0	3.5	○	195.5	5.0	○
エトプロホス	11.5	158	200	100.9	3.1	○	119.9	5.2	○	119.3	10.4	○
サリチオン	11.9	216	183	123.3	3.4	○	121.3	5.0	○	126.9	7.5	○
モノクロトホス	12.0	192	127	152.8	6.9	○	175.4	3.5	○	188.3	4.5	○
カズサホス	12.1	270	159	93.9	2.6	○	108.8	3.7	○	114.8	9.0	○
ホレート	12.2	260	231	55.0	29.3	○	112.6	5.9	○	116.4	10.3	○
ジメトエート	12.5	87	125	164.8	2.8	○	199.5	0.5	○	180.2	3.8	○
テルブホス	13.1	231	153	51.2	29.4	○	105.5	4.5	○	105.3	9.6	○
シアノホス	13.1	243	125	133.1	2.1	○	131.1	3.7	○	142.0	7.3	○
ダイアジノン	13.2	304	179	99.2	3.6	○	110.2	3.4	○	113.9	8.9	○
ホスファミドン (異性体1)	13.2	264	127	130.4	1.6	○	159.2	4.4	○	175.4	10.6	○
イサゾホス	13.4	313	285	109.8	3.8	○	129.2	3.4	○	136.1	9.1	○
ジスルホトン	13.4	274	186	90.1	28.9	○	161.7	6.2	○	144.7	18.4	○
エトリムホス	13.5	292	181	113.3	2.1	○	120.4	3.1	○	128.4	7.8	○
イプロベンホス	13.7	288	204	116.5	4.9	○	129.1	3.7	○	148.9	8.6	○
ホルモチオン	13.8	125	257	45.5	5.1	×	32.2	5.2	×	49.3	4.1	×
ホスファミドン (異性体2)	14.0	264	127	125.4	2.1	○	147.2	3.4	○	167.8	9.6	○
ジクロフェンチオン	14.0	279	223	98.4	2.9	○	108.7	3.2	○	115.3	8.5	○
クロルピリホスメチル	14.2	286	125	127.8	2.9	○	116.4	3.1	○	144.8	6.7	○
パラチオンメチル	14.3	263	109	135.2	2.8	○	156.2	3.5	○	196.0	9.9	○
トルクロホスメチル	14.3	265	125	114.1	2.5	○	121.1	2.8	○	129.8	7.5	○
ビリミホスメチル	14.7	290	305	98.0	2.8	○	125.8	3.0	○	135.5	8.0	○
フェニトロチオン	14.8	277	260	131.3	5.4	○	169.2	3.1	○	207.7	9.6	×
マラチオン	14.9	158	173	134.9	3.8	○	145.4	1.5	○	152.9	7.3	○
クロルピリホス	15.1	314	286	103.1	2.2	○	112.8	2.9	○	119.1	9.1	○
ジメチルビンホス (Z)	15.1	295	204	122.1	5.4	○	138.8	2.8	○	154.6	7.7	○
フェンチオン	15.2	278	169	77.8	17.5	○	135.3	3.1	○	138.4	8.9	○
パラチオン	15.2	291	235	117.7	6.6	○	139.9	3.1	○	162.2	10.2	○
プロモホス	15.5	331	125	122.6	5.7	○	135.2	2.8	○	152.2	7.2	○
ホスチアゼート (異性体1)	15.6	195	283									
ホスチアゼート (異性体2)	15.6	195	283	122.3	4.2	○	154.8	3.4	○	170.5	9.3	○
クロルフェンビンホス (E)	15.7	323	267	108.8	4.4	○	132.4	3.3	○	148.4	9.1	○
イソフェンホス	15.9	213	255	101.4	2.7	○	126.6	2.7	○	138.0	7.6	○
クロルフェンビンホス (Z)	15.9	323	267	107.8	3.4	○	130.4	3.1	○	140.8	8.7	○
メカルバム	16.0	131	159	97.0	2.0	○	114.3	3.8	○	122.5	7.9	○
フェントエート	16.0	274	246	111.2	3.4	○	141.3	2.9	○	156.4	7.1	○
キナルホス	16.1	146	157	106.5	1.2	○	127.2	2.8	○	134.6	7.6	○
プロモホスエチル	16.3	359	303	88.0	2.9	○	105.8	2.7	○	109.8	7.6	○
メチダチオン	16.3	145	85	131.6	8.2	○	159.5	2.2	○	176.6	7.4	○
プロバホス	16.4	304	220	63.2	13.5	○	140.6	3.3	○	131.0	9.4	○
テトラクロルビンホス	16.5	329	109	130.9	11.3	○	151.9	2.6	○	169.4	7.7	○
バミドチオン	16.5	145	87	55.3	17.6	○	237.1	6.8	×	237.6	8.5	×
ブタミホス	16.7	286	200	108.7	11.5	○	149.5	3.2	○	170.5	8.7	○
フェナミホス	16.7	303	154	64.2	14.7	○	170.4	3.7	○	156.1	5.7	○
プロチオホス	16.9	309	267	91.1	4.4	○	110.7	2.5	○	116.3	7.7	○
プロフェノホス	17.0	339	374	109.3	8.6	○	139.0	2.2	○	149.7	7.5	○
トリブホス	17.1	202	314	74.5	6.8	○	98.1	3.5	○	94.7	8.7	○
イソキサチオン	17.4	177	313	132.4	7.2	○	167.8	4.1	○	203.3	6.6	×
フェンスルホチオン	17.7	293	308	122.0	13.7	○	165.1	4.1	○	191.5	11.5	○
エチオン	17.8	231	153	117.5	8.7	○	138.8	3.3	○	149.0	7.5	○
トリアソホス	18.1	161	257	133.5	2.9	○	177.7	6.6	○	166.4	9.3	○
スルプロホス	18.2	322	140	64.0	16.8	○	133.5	3.3	○	119.2	6.6	○
シアノフェンホス	18.4	303	169	117.8	1.1	○	145.5	2.6	○	145.4	7.0	○
エディフェンホス	18.4	310	173	144.8	9.1	○	176.6	3.7	○	194.0	7.0	○
ピリダフェンチオン	19.3	340	199	134.8	10.9	○	163.7	3.0	○	162.3	10.2	○
EPN	19.5	157	169	110.6	7.4	○	136.0	2.3	○	134.1	10.0	○
ホスメット	19.5	160	317	119.9	22.3	○	134.3	2.6	○	166.3	5.9	○
ピペロホス	19.5	320	140	108.8	8.2	○	132.1	3.4	○	139.5	8.0	○
アニロホス	19.8	226	125	179.3	21.9	○	205.0	2.7	×	278.6	6.6	×
ホサロン	20.1	182	367	159.3	9.1	○	176.7	3.6	○	189.5	6.3	○
アジンホスメチル	20.2	132	160	163.9	22.7	○	254.8	2.2	×	352.6	7.3	×
ピラソホス	20.6	373	221	146.8	2.5	○	151.3	3.9	○	161.4	6.3	○
アジンホスエチル	20.8	160	132	142.5	3.8	○	141.6	2.7	○	149.0	8.1	○
ピラクロホス	20.9	360	194	162.5	5.8	○	173.6	3.4	○	186.1	6.6	○
適合項目数					67			64			62	

メビンホス (Z) 及びメビンホス (E), ホスチアゼート (異性体1) 及びホスチアゼート (異性体2) は, それぞれ合算して性能評価を行った. S/N比は全て目標値を満たした. 237.1 6.8: 選択性が目標値を満たさなかったもの

表1 続き

分析対象農薬	白菜キムチ			レトルトカレー			鶏砂肝		
	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	判定	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	判定	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	判定
メタミドホス	171.0	4.6	○	184.9	3.7	○	141.3	4.5	○
ジクロロボス	45.9	14.5	×	62.9	29.4	○	80.6	7.5	○
メビンホス (Z)	107.2	6.8	○	145.0	2.6	○	128.7	2.6	○
メビンホス (E)									
アセフェート	68.2	5.4	○	94.7	2.2	○	89.5	12.3	○
メタクリホス	77.0	13.6	○	120.9	6.6	○	100.8	2.6	○
オメトエート	160.8	3.7	○	185.7	0.4	○	156.2	2.1	○
エトプロホス	107.3	5.7	○	123.3	1.9	○	119.0	1.5	○
サリチオン	102.7	7.3	○	146.5	5.8	○	116.9	5.2	○
モノクロトホス	158.8	1.3	○	198.9	3.2	○	167.5	1.4	○
カズサホス	93.5	4.5	○	113.9	0.7	○	110.7	1.1	○
ホレート	93.4	9.2	○	143.0	1.3	○	119.5	1.2	○
ジメトエート	191.0	3.4	○	197.3	1.0	○	166.4	2.4	○
テルブホス	96.7	4.3	○	155.5	1.9	○	116.7	1.5	○
シアノホス	115.8	4.2	○	140.7	1.8	○	130.8	1.3	○
ダイアジノン	97.7	4.2	○	115.0	2.3	○	103.0	0.4	○
ホスファミドン (異性体1)	147.4	3.7	○	163.4	0.7	○	133.4	2.9	○
イサソホス	114.3	5.0	○	134.7	1.2	○	121.5	0.6	○
ジスルホトン	146.1	7.5	○	351.8	8.4	×	178.1	3.2	○
エトリムホス	106.8	4.1	○	128.0	1.8	○	109.5	1.0	○
イプロベンホス	111.4	2.3	○	148.5	2.8	○	129.6	2.2	○
ホルモチオン	30.0	2.2	×	24.1	11.3	×	56.6	12.5	○
ホスファミドン (異性体2)	135.5	3.3	○	156.6	1.7	○	130.2	1.9	○
ジクロフェンチオン	97.7	5.0	○	116.0	2.0	○	102.5	1.0	○
クロルピリホスメチル	113.8	3.5	○	127.7	1.2	○	111.2	1.6	○
パラチオンメチル	135.7	4.0	○	161.3	1.3	○	124.7	4.6	○
トルクロホスメチル	108.2	4.0	○	121.3	1.6	○	107.9	1.9	○
ピリミホスメチル	108.9	4.2	○	118.0	1.9	○	106.5	1.3	○
フェントロチオン	140.0	3.2	○	173.4	1.6	○	130.8	3.9	○
マラチオン	126.9	2.7	○	151.3	1.4	○	121.0	3.7	○
クロルピリホス	102.8	3.4	○	116.3	1.6	○	103.9	1.5	○
ジメチルビンホス (Z)	119.5	3.1	○	142.8	1.9	○	127.0	2.0	○
フェンチオン	120.7	3.2	○	154.7	2.9	○	137.1	1.8	○
パラチオン	119.7	3.1	○	148.2	1.5	○	129.6	3.9	○
プロモホス	123.4	2.8	○	135.9	1.3	○	112.5	1.5	○
ホスチアゼート (異性体1)									
ホスチアゼート (異性体2)	141.3	3.8	○	170.8	2.3	○	139.3	2.2	○
クロルフェンビンホス (E)	112.8	3.1	○	146.2	2.1	○	129.5	2.0	○
イソフェンホス	110.2	3.0	○	137.3	1.9	○	128.2	3.9	○
クロルフェンビンホス (Z)	109.8	3.1	○	136.2	2.0	○	123.3	2.3	○
メカルバム	96.3	2.8	○	134.8	3.2	○	121.6	7.4	○
フェントエート	125.4	3.2	○	145.4	1.9	○	123.3	1.5	○
キナルホス	110.6	2.6	○	131.0	2.7	○	118.2	3.6	○
プロモホスエチル	95.8	3.0	○	105.2	1.5	○	94.9	2.3	○
メチダチオン	139.3	2.0	○	168.6	2.6	○	133.8	2.1	○
プロバホス	117.3	3.9	○	174.7	2.9	○	151.3	1.9	○
テトラクロルピンホス	124.6	2.2	○	158.9	1.7	○	134.0	2.8	○
バミドチオン	200.6	3.2	×	833.8	10.6	×	201.7	1.0	×
ブタミホス	121.4	2.5	○	159.7	1.8	○	143.6	5.8	○
フェナミホス	138.9	3.0	○	224.9	5.1	×	190.2	2.8	○
プロチオホス	107.9	3.2	○	116.6	2.3	○	109.6	2.9	○
プロフェノホス	117.9	1.9	○	132.5	1.0	○	132.0	2.4	○
トリブホス	84.9	2.8	○	108.1	1.5	○	96.5	4.7	○
イソキサチオン	134.0	4.3	○	161.4	3.2	○	138.0	1.0	○
フェンシルホチオン	135.6	3.4	○	171.7	2.9	○	160.4	8.1	○
エチオン	123.4	1.8	○	149.9	2.0	○	135.1	3.0	○
トリアゾホス	158.9	4.8	○	158.9	5.8	○	136.2	6.1	○
スルプロホス	122.6	3.3	○	155.5	2.9	○	150.2	3.2	○
シアノフェンホス	131.4	1.7	○	151.2	2.1	○	138.9	0.9	○
エディフェンホス	149.3	1.8	○	179.4	1.7	○	143.1	3.2	○
ビリダフェンチオン	169.2	1.4	○	171.2	3.3	○	154.4	1.9	○
EPN	129.1	0.1	○	139.2	1.7	○	136.0	4.5	○
ホスメット	125.0	1.7	○	129.3	6.1	○	144.2	5.9	○
ピペロホス	145.2	1.2	○	142.5	1.9	○	141.6	2.6	○
アニロホス	213.7	1.9	×	227.6	2.1	×	177.4	3.2	○
ホサロン	173.5	2.9	○	176.9	1.8	○	159.2	2.1	○
アジンホスメチル	224.1	0.6	×	329.2	2.8	×	202.5	4.1	×
ピラゾホス	144.0	0.2	○	169.0	2.2	○	153.9	0.7	○
アジンホスエチル	134.4	0.4	○	147.7	2.7	○	136.3	0.9	○
ビラクロホス	164.5	1.3	○	194.7	1.9	○	156.4	2.1	○
適合項目数		63		62			66		

メビンホス (Z) 及びメビンホス (E), ホスチアゼート (異性体1) 及びホスチアゼート (異性体2) は、それぞれ合算して性能評価を行った。S/N比は全て目標値を満たした。 201.7 : 選択性が目標値を満たさなかったもの

酢酸エチル20 mLでろ紙上の残留物を洗う操作を3回繰り返し、これらの洗液を先のろ液に合わせ、40℃以下で穏やかに減圧濃縮後、酢酸エチルで10 mLに定容し、この溶液を0.5 mL採った。これを窒素気流下で乾固させ、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル4 mL、アセトニトリル飽和*n*-ヘキサン2 mL及びPSA（分散固相）0.1 gを加え、10分間振とうした。毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、アセトニトリル層2 mLを採り、窒素気流下で乾固させてアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液0.5 mLに溶かし、GC-MS用試験溶液とした（図1）。

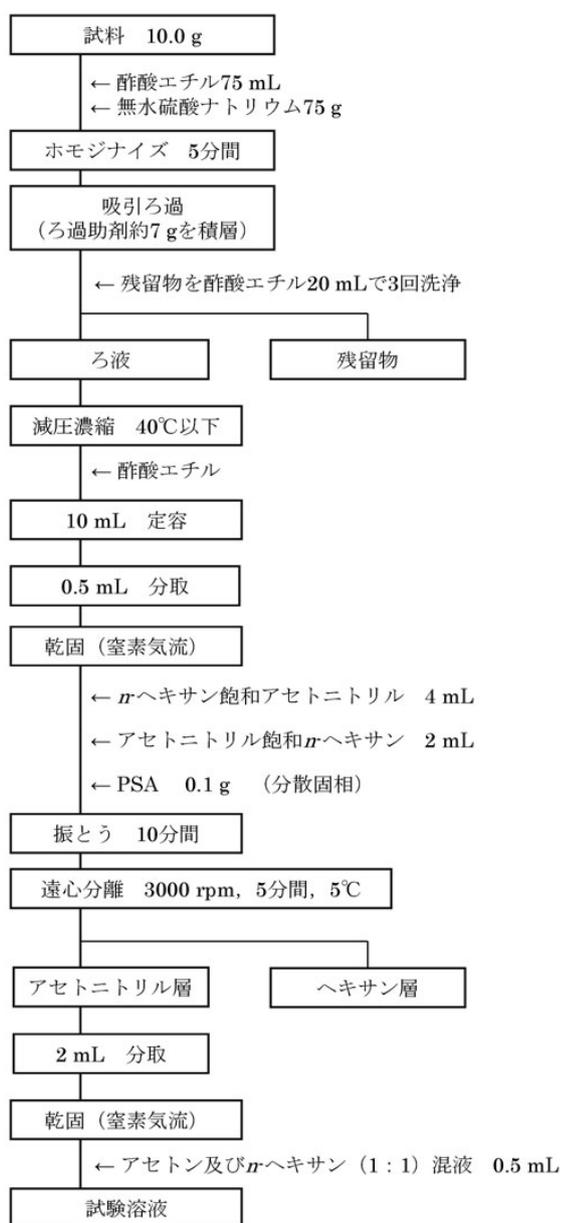


図1 試験溶液の調整方法

5. 検量線

各分析対象農薬の1 $\mu\text{g/mL}$ 混合標準溶液をアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液で希釈して0.025, 0.0375, 0.05, 0.075及び0.1 $\mu\text{g/mL}$ 溶液とし、検量線用混合標準溶液を調製した。

6. 性能評価

事務連絡に基づき、各分析対象農薬が0.1 $\mu\text{g/g}$ となるように1 $\mu\text{g/mL}$ 混合標準溶液をブランク試料10.0 gに添加して3併行で添加回収試験を実施し、次に示す4種類の性能パラメータの目標値等への適合を確認した。

6. 1 選択性

ブランク試料のピーク面積が、添加濃度（0.1 $\mu\text{g/g}$ ）に相当する検量線用混合標準溶液（0.05 $\mu\text{g/mL}$ ）のピーク面積の1/3未満であること。

6. 2 回収率

添加回収率の平均値が50%～200%であること。

6. 3 併行精度

相対標準偏差（RSD）が30%未満であること。

6. 4 評価濃度の確認

回収率の評価で得られた各ピークのS/N比が10以上であること。

結果及び考察

1. 試験溶液調製方法の検討

検討試料として冷凍えびドリアを用いた。測定機器は、ライブラリー機能を活用することにより、多くの農薬を推定可能であるGC-MSを使用した。

事務連絡には、迅速検出法-1、2及び3の3種類の試験法が示されている。まず、これら迅速検出法のうち、最も簡便な試験法である迅速検出法-1に準じて分析を行うこととした。ただし、迅速検出法-1は高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置による分析方法であることから、これをGC-MS測定に対応させるため、迅速検出法-1の試験溶液（水及びメタノール混液）を窒素気流下で乾固させ、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液に溶かし、試験溶液とした。測定の結果、比較的水溶性の高いメタミドホスやアセフェート等の回収率は50%～200%の範囲内であったが、その他の多くの農薬の回収率は50%未満となった。これは、酢酸エチル抽出液に水及びメタノール（1：9）混液及び*n*-ヘキサンを加えて振とうする操作において、水溶性の低い農薬が水及びメタノール層へ抽出されにくかったことが原因である可能性が考えられた。

そこで、当該操作について、迅速検出法-3を参考に、酢酸エチル抽出液0.5 mLを窒素気流下で乾固させ、アセトニトリル及びアセトニトリル飽和*n*-ヘキサンを加え

表2 各分散固相のマトリックスの影響

分散固相 (各 0.1 g)	マトリックスの影響 (68農薬平均値)
無添加	1.89
C18	1.89
PSA	1.32
NH2	1.39

$$\text{マトリックスの影響} = \frac{\text{マトリックス添加標準溶液のピーク面積}}{\text{溶媒標準溶液のピーク面積}} \quad (\text{各}0.05 \mu\text{g/mL})$$

表3 各分散固相の回収率 (代表的な農薬のみ)

分析対象農薬 (一部)	平均回収率 (%) (n=3)			
	無添加	C18	PSA	NH2
ジクロロボス	88.3	74.8	52.7	42.4
アセフェート	156.0	148.6	50.4	25.2
ホルモチオン	183.1	169.3	45.5	52.6
ホスメット	326.5	305.2	119.9	140.7
アニロホス	296.6	281.3	179.3	179.9
ホサロン	203.8	199.1	159.3	155.3
アジンホスメチル	360.6	324.7	163.9	156.4

分散固相無添加又はC18添加で200%を超えた農薬の一部と PSA添加又はNH2添加で50%未満となった農薬のみ示した。

て振とうする操作に変更した。振とう後遠心分離し、アセトニトリル層を採り、窒素気流下で乾固させ、アセトン及びn-ヘキサン (1 : 1) 混液に溶かし、試験溶液とした。その結果、すべての農薬の回収率が50%以上となったが、200%を超える農薬も認められ、原因として試料由来成分、すなわちマトリックスの影響が考えられた。

迅速性を保ちつつマトリックスの影響を抑制するため、アセトニトリル飽和n-ヘキサン添加時に分散固相を直接添加する方法を検討した。事務連絡の迅速検出法-2では、C18、グラファイトカーボン及びPSAミニカラムによる精製が示されている。そこで、これらのうち脂質等の除去に有効なC18及びPSAを分散固相の検討に用いることとした。また、これらに加え、PSAと同様に陰イオン交換能があり、脂肪酸の除去に有効なNH2も分散固相の検討に用いることとした。分散固相の添加量は各0.1 gとした。検討の結果、C18添加の場合は、分散固相無添加の場合と同程度のマトリックスの影響が認められ、回収率が200%を超える農薬もあったが、PSA添加及びNH2添加の場合は、分散固相無添加及びC18添加の場合に比べ、マトリックスの影響が抑制され、全ての農薬の回収率が200%以下となった (表2)。PSA添加及びNH2添加により、n-ヘキサンによる精製では除去しきれなかった脂肪酸等の夾雑成分が除去され、精製度が向上し

たと考えられた。しかしながら、NH2添加の場合はジクロロボス及びアセフェートの2農薬の回収率が50%未満、PSA添加の場合はホルモチオンのみ回収率が50%未満となり (表3)、分散固相への農薬の吸着が考えられたが、マトリックスの影響及び回収率を考慮し、PSAを分散固相として採用することとした。

なお、分散固相の混入を防ぐため、遠心分離後のアセトニトリル層は2 mLを分取することとした。そのため、添加するアセトニトリルは、アセトニトリル層の容量変動を防ぐため、n-ヘキサン飽和アセトニトリルに変更した。

2. 性能評価

各試料について、3併行で添加回収試験を実施した結果を表1に示した。併行精度及びS/N比は全て目標値を満たした。選択性は、冷凍えびドリア以外の試料のパミドチオンのみ目標値を満たさなかった。農薬68項目のうち、冷凍えびドリアは67項目、冷凍餃子は64項目、冷凍あじ竜田揚げは62項目、白菜キムチは63項目、レトルトカレーは62項目、鶏砂肝は66項目が性能評価の目標値を満たし、いずれの試料においても、90%以上の農薬が性能評価に適合した。

しかしながら、冷凍えびドリア以外の試料においては、回収率が200%を超える農薬が複数あった。特に、パミドチオン、アニロホス及びアジンホスメチルは、複数の試料において回収率が200%を超えたことから、マトリックスの影響を受けやすいと考えられた。また、ジクロロボスは、いずれの試料においても回収率が低めとなり、白菜キムチにおいては50%未満となった。これは、ジクロロボスの蒸気圧が高く、操作中に揮散しやすいことが原因であると考えられた。

3. 高濃度の農薬が含まれる加工食品の分析

平成28年度地域保健総合推進事業関東甲信静ブロック精度管理事業において、加工食品に含まれる有機リン系農薬の分析を対象とした精度管理が実施された。そこで、本試験法を用いて精度管理試料の分析を行った。

アセフェート、フェニトロチオン、マラチオン (いずれも園芸用乳化剤) のうち、いずれかが高濃度 (1,000 $\mu\text{g/g}$ 以上) に添加されたいちごジャムが精度管理試料として提供された。定性分析のため、本試験法で前処理を行い、GC-MSでSCAN分析を実施したところ、フェニトロチオンが同定された。そこで、本試験法に従い5併行で定量分析を行ったところ、フェニトロチオンの検出値は1,720 $\mu\text{g/g}$ 、RSDは4.6%であった。提供された精度管理試料にはフェニトロチオンが1,850 $\mu\text{g/g}$ 含まれていたことから、回収率は93%で、RSDも小さく、良好な結果であった。このことから、本試験法は実試料にも

適用可能であることが確認された。

まとめ

本試験法は、精製法に分散固相PSAを使用することで、迅速性を維持しながら精製度を向上させることができた。様々な食品において多くの農薬が性能評価に適合し、精度管理試料の分析結果も良好であったことから、本試験法は健康危機事例に適用可能であると考えられた。

今後、マトリックスの影響をさらに抑制するため、分析保護剤の使用及びより選択性の高いガスクロマトグラフ-タンデム質量分析装置による測定等を検討すると

もに、回収率の低い農薬やRSDの大きい農薬を安定して抽出するため、前処理方法の見直し等を検討することにより、分析方法の改良を目指す予定である。また、対象農薬を拡大し、より広範囲の健康危機事例に対応できるように検討を進める予定である。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡：加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について，平成25年3月26日

短報

コメ加工品中の組換えDNA検査におけるシリカベースタイプキットによるDNA抽出精製の検討

大森 清美, 清水 碧*, 田中 由紀子,
土屋 久世**

Study on DNA extraction and purification method of rice processed foods using the silica-base type kit for the detection of the genetically modified organism

Kiyomi OHMORI, Midori SHIMIZU,
Yukiko TANAKA and Hisayo TSUCHIYA

緒言

平成17年4月13日付けの環境保護団体グリーンピースのウェブサイト¹⁾において、未承認の遺伝子組換え米が中国湖北省で栽培および販売されていたことが報道された。また、同年9月5日付けの同ウェブサイトでは、グリーンピース等がコメ加工品（ビーフン等）を検査したところ、中国からの遺伝子組換え米がフランス、ドイツ及びイギリスの食品に含まれていたと公表された²⁾。そこで、国立医薬品食品衛生研究所は神奈川県衛生研究所などととも安全性未審査の中国産米加工品の検知法を開発し^{3,4)}、厚生労働省は検疫所でのモニタリング検査を実施した。その結果、平成19年1月26日に中国産コメ加工品（ビーフン等）において安全性未審査の遺伝子組換えコメが混入していた事例が確認され、その旨が公表された⁵⁾。その際、コメ加工品からのDNA抽出精製法として開発されたものがニッポンジーン社のGM quicker 2を用いる方法であり、安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法として通知され⁶⁾、同DNA抽出精製法は現行の通知検査方法⁷⁾においても、コ

メ（63Bt, NNBt, CpTI）の検査方法の「シリカゲル膜タイプのDNA 抽出精製キット法（NIPPON GENE GM quicker 2）」として掲載されている。しかしながら、加工品には検知目的の作物であるコメ以外にも複数の原料を含む場合があり、加熱などの加工によりPCRによる検出が可能なコメDNAが減少している可能性が考えられる。そこで、加工程度の高い試料に適用が可能とされる⁸⁾ QIAGEN社のGenomic-tipについて、現行の通知法では20/Gよりも試料の高負荷が可能な100/Gを用いて、DNA収量を上げたDNA抽出精製法が第一選択とされている⁷⁾。一般にGenomic-tip でのDNA抽出精製では最後にイソプロピルアルコールによるDNAの沈殿を行うため時間を要し、特にコメ加工品でのGenomic-tip 100/GによるDNA抽出精製では60分間の冷却工程があるため5時間以上を要する。一方、GM quicker 2を用いるDNA抽出精製は2時間程度で完了するため、Genomic-tip 100/GよりもGM quicker 2を用いる方法のほうが明らかに迅速である。そこで、各種コメ加工品のDNAの抽出精製におけるGM quicker 2法の使用の可否について検討した。

方法

試料として用いたコメ加工品は、スープなどの調味料とともに即席麺として販売されているライスヌードル8種、麺単品として販売されている調理用乾麺のライスヌードル10種、ライスペーパー2種および米粉類3種であり、いずれも神奈川県内の食料品店で購入した。試料の前処理について、ライスヌードル（即席めんおよび調理用乾麺）、ライスペーパーおよび白玉粉は、ラボミルサー（大阪ケミカル）を用いて均質に細粉碎した。その他の試料については、包装された袋内で均質になるよう混合した。DNA抽出精製法は、均質な粉状の各試料500 mgを採取し、ニッポンジーン社のGM quicker 2を用いて、通知の検査方法1.2. シリカゲル膜タイプのDNA 抽出精製キット法（NIPPON GENE GM quicker 2）（別法、コメおよび非加熱加工品に適用）に従い実施した。抽出DNAの評価は、微量分光器（NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer（NanoDrop Technologies））を用いて吸光度測定を行い、260nmにおける吸光度からDNA濃度を算出した。また、通知法の記載のとおり、260 nm/280 nmの吸光度比（A260/A280）が1.7~2.0であればDNA が十分に精製されているとされる純度の指標とした。260 nm/230 nmの吸光度比（A260/A230）は通知法については記載がないが、低波長側の不純物を確認するための参考値とした。コメ内在性遺伝子Sucrose Phosphate Synthase（SPS）のPCR

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
※ 神奈川県保健福祉局薬務課
〒231-8588 横浜市中区日本大通1
※※ 前 理化学部

およびアガロースゲル電気泳動による検知は旧通知⁹⁾に従い、遺伝子増幅装置 (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems), 電気泳動装置 (Mupid ミニゲル泳動装置, アドバンス) およびゲル撮影装置 (BIOINSTRUMENT AE-6905H Image Saver HR, ATTO) を用いて実施した。コメ内在性遺伝子 phospholipase D (PLD) のリアルタイムPCRによる検知は、現行の通知⁷⁾に従い、リアルタイムPCR装置 (7900HT, Applied Biosystems) を用いて実施した。それらのコメ内在性遺伝子として、検体No.1からNo.16はSPS遺伝子について、また検体No.6からNo.8およびNo.17からNo.23はPLD遺伝子についてPCRを行い、各

試料2抽出ずつのDNA試料液で検出の可否を検討した。

結果および考察

各種コメ加工品について、GM quicker 2を用いるDNA抽出精製法 (GM quicker 2法) によりDNAを採取し、得られたDNA試料原液の濃度、純度指標値、DNA抽出効率および内在性遺伝子のPCR結果を表1に示した。まず、コメ加工品のうち、流通製品数が多いライスヌードルについてGM quicker 2法の適用性を検討した結果、即席麺のNo.1~8では、260nm/230nm値は0~16まで様々であったが、純度指標値 (260nm/280nm値) については全て1.7以上であった。DNA試料原

表1 GM quicker 2法によるコメ加工品の抽出DNA評価

No. 検体	抽出No.	260nm /230nm	平均値	260nm /280nm	平均値	DNA試料原液濃度 (ng / μ L)		DNA抽出効率 DNA (μ g) / 試料(g)		SPS	PLD (Ct 値)
						平均値	平均値	平均値	平均値		
1 ライスヌードル(即席めん)A	1	3.46	4.39	2.03	2.03	71.0	52.8	6.9	5.1	+	NT
	2	5.31		2.03		34.5		3.4		+	NT
2 ライスヌードル(即席めん)B	1	0.00	3.50	2.00	1.98	14.0	19.3	1.4	1.9	+	NT
	2	7.00		1.96		24.5		2.4		+	NT
3 ライスヌードル(即席めん)C	1	6.50	11.00	1.95	2.01	19.5	17.5	1.9	1.7	+	NT
	2	15.50		2.07		15.5		1.5		+	NT
4 ライスヌードル(即席めん)D	1	4.47	4.02	2.00	1.99	38.0	45.8	3.7	4.5	+	NT
	2	3.57		1.98		53.5		5.3		+	NT
5 ライスヌードル(即席めん)E	1	5.57	5.05	1.95	1.99	19.5	24.5	1.9	2.4	+	NT
	2	4.54		2.03		29.5		2.9		+	NT
6 ライスヌードル(即席めん)F	1	0.00	5.75	2.00	1.96	10.0	10.8	1.0	1.1	+	NT
	2	11.50		1.92		11.5		1.1		+	NT
	3	1.53	1.58	1.79	1.82	32.8	34.6	3.3	3.5	NT	23.92
	4	1.63		1.84		36.4		3.6		NT	23.71
7 ライスヌードル(即席めん)G	1	0.00	0.00	1.91	1.86	10.5	10.3	1.0	1.0	+	NT
	2	0.00		1.82		10.0		1.0		+	NT
	3	1.78	1.73	2.03	2.02	17.1	15.8	1.7	1.6	NT	23.08
	4	1.68		2.01		14.4		1.4		NT	23.07
8 ライスヌードル(即席めん)H	1	-	-	2.00	2.00	8.0	9.0	0.8	0.9	+	NT
	2	-		2.00		10.0		1.0		+	NT
	3	1.74	1.85	1.94	2.41	24.1	15.8	2.4	1.6	NT	23.95
	4	1.95		2.87		7.5		0.8		NT	24.43
9 ライスヌードルI	1	2.77	2.69	1.95	1.95	95.5	102.0	9.5	10.1	+	NT
	2	2.61		1.95		108.5		10.7		+	NT
10 ライスヌードルJ	1	2.51	2.45	2.01	1.98	215.5	180.0	21.5	17.8	+	NT
	2	2.39		1.95		144.5		14.2		+	NT
11 ライスヌードルK	1	2.42	2.40	1.96	1.96	166.0	154.8	16.3	15.2	+	NT
	2	2.37		1.95		143.5		14.2		+	NT
12 ライスヌードルL	1	2.41	2.37	1.88	1.89	103.5	100.3	10.3	9.9	+	NT
	2	2.34		1.90		97.0		9.5		+	NT
13 ライスヌードルM	1	2.35	2.36	2.02	2.02	289.5	291.3	28.7	28.9	+	NT
	2	2.37		2.01		293.0		29.0		+	NT
14 ライスヌードルN	1	2.42	2.38	2.07	2.05	417.5	315.5	41.3	31.1	+	NT
	2	2.33		2.02		213.5		21.0		+	NT
15 ライスヌードルO	1	2.35	2.35	2.01	2.01	287.5	286.5	28.5	28.3	+	NT
	2	2.36		2.01		285.5		28.0		+	NT
16 ライスヌードルP	1	2.27	2.29	1.98	1.97	216.0	207.5	21.4	20.6	+	NT
	2	2.31		1.96		199.0		19.8		+	NT
17 ライスヌードルQ	1	1.71	1.77	1.94	1.93	44.8	53.5	4.5	5.4	NT	22.75
	2	1.82		1.92		62.2		6.2		NT	22.66
18 ライスヌードルR(コーンスターチ)	1	0.16	0.08	-0.22	6.85	-0.1	0.1	0.0	0.0	NT	29.52
	2	0.00		13.92		0.2		0.0		NT	29.31
19 ライスペーパー(タピオカ)	1	0.67	0.67	1.14	1.57	2.3	2.7	0.2	0.3	NT	32.68
	2	-		2.00		3.1		0.3		NT	33.02
20 ライスペーパー(タピオカ)	1	1.71	1.41	2.02	1.99	21.3	18.2	2.1	1.8	NT	23.72
	2	1.11		1.96		15.0		1.5		NT	24.13
21 上新粉	1	2.29	2.29	2.08	2.08	441.3	456.9	44.1	45.7	NT	24.28
	2	2.29		2.08		472.4		47.2		NT	24.56
22 白玉粉	1	2.16	2.16	1.83	1.81	111.7	92.5	11.2	9.3	NT	21.78
	2	2.16		1.79		73.3		7.3		NT	21.79
23 上新粉、白玉粉混合物	1	1.96	2.10	1.85	1.85	50.7	71.2	5.1	7.1	NT	21.88
	2	2.24		1.84		91.6		9.2		NT	21.82

- : 吸光度実測値が0以下のため評価不能

NT: PCRを実施せず

液の濃度は、No.1~5は十分な濃度が得られたが、No.6~8は定性PCRに用いられるDNA試料液の濃度である10 ng/ μ lとほぼ一致もしくはそれに満たないものもあった。ライスヌードルのうち、コメ粉100%の調理用乾麺 (No.9~17) では、いずれにおいてもDNA試料原液の260nm/280nm値および260nm/230nm値はすべて1.7以上であった。一方、調理用乾麺であってもコーンスターチを含むNo.18は、260nm/280nm値、260nm/230nm値およびDNA試料原液の濃度のいずれの値も通知法の目安には満たない値であった。コーンスターチからはトウモロコシのDNAがほとんど抽出されないことが報告されていることから¹⁰⁾、細粉碎した試料中のコメDNA量がコメ粉100%のライスヌードルよりも少ないことがDNA試料原液の濃度が低い原因の一つと考えられた。また、No.18のDNA試料原液の濃度は0.1ng/ μ lとコメ粉100%の調理用ライスヌードルに比べて極端に低い値であることから、No.18の含有成分がDNAの抽出を妨害している可能性も考えられた。次に、タピオカ入りのライスペーパー2種 (No.19, 20) について検討を行った。その結果、No.20は260nm/280nm値は適切な値でありDNA試料原液の濃度も10ng/ μ l以上であったが、No.19ではDNA試料原液の濃度は2.7ng/ μ lと低値であり、260nm/280nm値もばらつきが大きかった。260nm/230nm値はNo.19およびNo.20ともにばらつきが大きく再現性が低かった。これらの試料についてもタピオカの混合による粉碎試料中のコメDNA量の減少および含有成分によるコメDNAの抽出妨害がDNA試料原液の低濃度の要因として推察された。コメ粉類は非加熱加工品であるため、現行通知法⁷⁾でもGM quicker 2法が適用されている。表1でのコメ粉類 (No.21~23) の結果においても260nm/280nm値および260nm/230nm値は1.7以上であり、DNA試料原液の濃度は50ng/ μ l以上であった。以上、23種のコメ加工品からGM quicker 2法により得られたDNA試料原液の濃度および260nm/280nm値の大方は十分かつ適切であったが、加工度の高い即席麺やコメ以外のでんぷんを添加した製品のDNA試料原液の濃度および260nm/280nm値は、目安とされる値に満たないものがあった。しかしながら、内在性遺伝子のPCR結果においては、SPSのPCRを実施した試料については全て+ (検出) であった。またPLDのリアルタイムPCR結果でも実施した試料のCt値は全て34未満であり検出基準となるCt値の48未満であることから全て+ (検出) であった。このことから、コーンスターチを含むライスヌードル (No.18) およびタピオカ入りのライスペーパー2種 (No.19, 20) から抽出精製されたコメDNAは、少量ながらもPCR増幅が可能なDNAの質を保

持していることが示唆された。以上によりGM quicker 2法は、各種コメ加工品のDNAの抽出精製法として使用可能であると考えられた。

結論

GM quicker 2法では、コメ粉100%の調理用ライスヌードルおよび米粉類については、40ng/ μ l以上のDNA試料原液が得られ、純度指標である260nm/280nm値も全て1.7以上であり適用可能であった。一方、即席麺など加工度の高い製品やコーンスターチ、タピオカなどのコメ以外のでんぷんが添加された製品ではDNA試料原液の濃度が10ng/ μ lに満たないものや260nm/280nm値が目安の範囲に入らないものもあったが、内在性遺伝子のPCR結果は、いずれも検出が可能であった。したがって、GM quicker 2法はコメおよび非加熱加工品以外のコメ加工品について行政処分などを伴う検査のDNA抽出精製法としては使用できないが、迅速性を優先するスクリーニング試験などには使用可能であることが示唆された。

文献

- 1) 国際環境保護NGOグリーンピースホームページ：Scandal, Greenpeace discovers illegal GE rice in China<<http://www.greenpeace.org/international/news/scandal-greenpeace-exposes-i>> (2016/06/12アクセス)
- 2) 国際環境保護NGOグリーンピースホームページ：Releases, <http://www.greenpeace.org/international/press/releases/illegal-genetically-engineered>
- 3) 厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課長, 安全性未審査の中国産米及び米加工品の検知法について, 食安監発第0126005号通知, 平成19年1月26日.
- 4) Akiyama H et al., Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products., J Agric Food Chem., **55**, 5942-5947 (2007).
- 5) 厚生労働省ホームページ, 報道発表資料, 安全性未審査の中国産遺伝子組換え米の混入事例について, <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2007/01/h0126-3.html> (2016/06/12アクセス)
- 6) 医薬食品局食品安全部監視安全課長, 安全性未審査の中国産米及び米加工品の検知法について, 食安監発第0126006号平成19年1月26日.
- 7) 厚生労働省医薬 生活衛生局 生活衛生・食品安全

- 部長，安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法の一部改正について，生食発0824 第2号，平成28年8月24日。
- 8) 消費者庁次長，アレルギー物質を含む食品の検査方法について，消食表第36号，平成26年3月26日。
- 9) 厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課
- 長，安全性未審査の中国産米及び米加工品の検知法について，食安監発第0220001号，平成19年2月20日。
- 10) 大森清美ほか：トウモロコシ加工品からのイオン交換樹脂タイプキットを用いたDNA抽出精製法の検討，食品衛生学雑誌，49，45-50（2008）

短報

イオン交換レジンタイプキットを用いたトウモロコシ加工品のDNA抽出精製における簡易化の検討

大森 清美, 土屋 久世*

Study on simplification of DNA extraction and purification method of corn processed foods using the ion-exchange resin type kit for the detection of the genetically modified organism

Kiyomi OHMORI and Hisayo TSUCHIYA*

緒言

イオン交換タイプのDNA抽出精製キット法(QIAGEN Genomic-tip) (Gtip法)は、厚生労働省通知の「安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法」¹⁾ (厚労GM通知法) およびJAS 分析試験ハンドブックの「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」²⁾ (JASハンドブック法) に採用されている他、消費者庁通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法」³⁾ (消食AL通知法) でもDNA抽出精製法として採用されている。特に、消食AL通知法のGtip法は、食品の加工度が高く、DNA収量の少ない食品からのDNA抽出精製に適している³⁾とされているが、それら3種のGtip法は、試料調製法およびDNA抽出精製に用いる試薬量等が異なるため、時間や経費等にも違いがある。

厚労GM通知法のトウモロコシ (CBH351) の検査方法では、タコス、トルティーヤ、コーンチップおよびコーンフレークについては、「2.1.1. タコス、トルティーヤ、コーンチップおよびコーンフレーク (加熱加工されているものに限る)」と記載されたDNA抽出精製 (MHLW-Gtip法) を行い、それ以外のトウモロコシ加工品は、JASハンドブック法に従い、加水およびホモジネート (湿式法) により調製した試料2 gからGtip法を用いて

DNAの抽出精製 (JAS-Gtip法) を行うこととされている。しかし、DNA収量の少ないジャンボコーン (トウモロコシを原料としたボン菓子) 等については、湿式法を用いたJAS-Gtip法では、定性PCRで用いられる10ng/ μ l以上のDNAが得られず、PCR後のトウモロコシ内在性遺伝子 (Zein遺伝子) の検出も困難であったことから、筆者らは以前に加水せず粉砕 (乾式法) を行うKNG-Gtip法を提案した⁴⁾。他のコーンスナック菓子類 (ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナックおよびコーンパフ類) については、湿式法で調製した試料2 gからJAS-Gtip法を用いてDNAの抽出精製を行うこととされているが、加水およびホモジネート処理を行う湿式法による試料調製は煩雑であり、さらには使用する試薬類は多くがMHLW-Gtip法の2倍量であることから経費が嵩む。また、消食AL通知法に記載されたGtip法 (ALG-Gtip法) では、アミラーゼ処理により澱粉質を分解する工程があるため、抽出時間および経費ともに3種のGtip法の中で最大である。

そこで、最も簡便で安価なMHLW-Gtip法について、厚労GM通知法では適用外の各種コーンスナック類およびその他のトウモロコシ加工品でのDNA抽出精製法として適用の可否を検証するために、抽出DNAの量、質およびPCRによるZein遺伝子増幅について3種のGtip法での比較を行った。

方法

試料として用いたトウモロコシ加工品は、コーンスナック菓子 (ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナック、コーンパフ、トウモロコシ缶詰 (ホールタイプ、クリームタイプ)、コーンスープ (乾燥粉末、液体)、冷凍トウモロコシ) であり、いずれも神奈川県内の食料品店で購入した。

試料の前処理について、MHLW-Gtip法の乾式法は、試料を袋の中で可能な限り細かくした後、ラボミルサー (大阪ケミカル) で粉砕した。湿式法は、JASハンドブック法²⁾ 「個別品目編 (定性試験)」に従い、試料に規定量の滅菌水を加え、ホモジナイザー (佐久間精機) を用いてホモジナイズした。MHLW-Gtip法の適用性を検討した冷凍トウモロコシおよびトウモロコシ缶詰 (ホールタイプ) は、湿式法に従い、トウモロコシ缶詰 (クリームタイプ) およびコーンスープ (液体) については、ホモジネートを行うのに十分な水分を含むことから、加水せずにホモジネート処理のみを行った。コーンスープ (乾燥粉末) は、乾式法により試料調製を行った。

DNA抽出精製法において検討を行った3種のDNA抽出精製法は、MHLW-Gtip法として、厚労GM通知法¹⁾、

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

ALG-Gtip法は、消食AL通知法³⁾、JAS-Gtip法は、JASハンドブック法²⁾に従った。なお、いずれのDNA抽出精製法についても、1試料につき3回(n=3)の抽出を行った。

抽出DNAの評価は、吸光度測定法として、分光光度計(Gene Quant Pro, アマシャムファルマシア)を用いて230 nm, 260 nm, 280 nmの測定を行い、260 nmにおける吸光度からDNA濃度を算出し、260 nm/230 nmの吸光度比(A260/A230)および260 nm/280 nmの吸光度比(A260/A280)は純度の指標とした。また、電気泳動法での評価は、100 ng/ μ lに希釈したDNA溶液7.5 lについて0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。0.8%アガロースゲルは、アガロース(LO3[TAKARA], タカラバイオ)およびTAE緩衝液を用いて調製した。 λ DNA HindIII(タカラバイオ)を分子量マーカーとして、100Vで電気泳動を行い、電気泳動後のアガロースゲルは、エチジウムブロミド(和光純薬工業)のTAE緩衝液溶液(0.1 mg/l)で15分間染色後、TAE緩衝液で15分間脱色した。紫外線312 nmを照射し、画像撮影装置(AE-6905H Image Saver HR, アトー)を用いてDNAの電気泳動像を撮影した。

PCR増幅によるDNA抽出精製法の適用性評価は、CBH351系統組換えトウモロコシの加工品は入手不可能であることから、トウモロコシ内在性遺伝子 ZeinのPCR増幅を指標として、厚労GM通知法¹⁾に従った。

結果および考察

3種のGtip法(MHLW-Gtip法, ALG-Gtip法およびJAS-Gtip法)を用いて、各種コーンスナック類(ジャイアントコーン(試料No.1), ポップコーン(試料No.2), タコススナック(試料No.3)およびコーンパフ類(試料No.4-1, 4-2および4-3))からDNAの抽出精製を行い、抽出DNAの質および量の比較を行った。その結果、いずれのGtip法を用いた場合にも、抽出DNAの濃度は10 ng/ μ lを超えており、試料1gあたりの抽出DNA量として算出したDNA抽出効率、タコススナック以外の5品目において、MHLW-Gtip法がALG-Gtip法およびJAS-Gtip法と比べて高値を示した(Table 1)。一方、ALG-Gtip法はアミラーゼ処理が行われているにも関わらず、DNA抽出効率は他の2法よりも低値であった。また、A260/A280の吸光度比を指標とした抽出DNAの純度については、MHLW-Gtip法により得られたDNA試料原液は、いずれも良好な純度の指標とされる1.7以上であったが、ALG-Gtip法およびJAS-Gtip法を用いた場合には、ジャイアントコーン、ポップコーン、およびタコススナックのDNA試料原液で1.7に満たないことがあっ

た。A260/A230の吸光度比はすべて2.1以上で良好な値であった。それらの抽出DNAについて、Zein遺伝子を増幅し電気泳動を行った結果、試料No.1~4のコーンスナック菓子のいずれにおいても、MHLW-Gtip法、JAS-Gtip法およびALG-Gtip法により抽出されたDNA試料液で、3回抽出のすべてにおいてZein遺伝子のバンドが検出された(Table 1)。次に、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った結果、ジャイアントコーンについては、MHLW-Gtip法を用いて抽出したDNA試料液が他の2法により抽出したDNA試料液よりも高分子量のDNAを含有していた(Fig.1. No.1)。一方、タコススナックについては、MHLW-Gtip法を用いて抽出されたDNA試料液よりも他の2法を用いて抽出されたDNA試料液の方が高分子量のDNAを含んでいた(Fig.1. No.3)。試料No.4-3のコーンパフについては、MHLW-Gtip法およびALG-Gtip法よりもJAS-Gtip法を用いて抽出されたDNA試料液の方が高分子量のDNAが多い傾向であった。その他のコーンスナック菓子については、3種のGtip法を用いて抽出精製されたDNA試料液の分子量分布に明確な差は認められなかった。以上により、ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナック、コーンパフ類については、3種のGtip法により得られたDNAの分子量分布において、MHLW-Gtip法は他の2法と比較して必ずしも高分子量のDNAが採取できていないが、いずれのDNA試料液についてもZein遺伝子の増幅および検出には影響がないことから、Fig.1でみられたDNAの分子量分布の差は、トウモロコシ遺伝子の検出に影響のないレベルであることが確認され、MHLW-Gtip法により得られた抽出DNAの量および純度は他の2法よりも高値であることが明らかになった。これらの結果に加えて、MHLW-Gtip法は、煩雑なJAS-Gtip法の加水およびホモジネート処理やALG-Gtip法のアミラーゼ処理を必要とせず、抽出用試薬量もJAS-Gtip法およびALG-Gtip法の1/2量であり低コストであることから、ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナックおよびコーンパフ類のDNA抽出精製法として、3種のGtip法の中では最も有用であると考えられた。

さらに、その他のトウモロコシ加工品(Table 1, 試料No.5, 6-1, 6-2, 7-1, 7-2)について、MHLW-Gtip法の適用性を検討した結果、DNA試料原液濃度は、いずれも100 ng/ μ lを超え、A260/A230は2.2~2.4、A260/A280は1.7以上であることから、DNAの抽出精製は良好であると判断された(Table 1)。Zein遺伝子増幅後の電気泳動像は、いずれのDNA試料液についても3回抽出のすべてにおいてバンドが検出され(Table 1)、それらのバンドはいずれも明瞭であった。また、

Table 1 Quality and yield of DNA extracted from corn processed foods and maize

Sample No.	Maize processed foods	Gtip method	No. of extraction	Weight of water for homogenization of sample ¹⁾ (g)	Sampling weight after pre-treatment (g)	Ratio of absorbance (260nm/230nm)		Ratio of absorbance (260nm/280nm)		Concentration of DNA measured by O.D.260nm (ng/μL)		Amount of DNA extracted from 1g sample(μg)		Detection frequency of <i>Zein</i> gene (per 3 times)
						ave.	±S.D.	ave.	±S.D.	ave.	± S.D.	ave.	± S.D.	
1	Giant corn	MHLW-Gtip	1,2,3	-	1	2.25 ± 0.02	1.75 ± 0.02	503.7 ± 42.3	503.7 ± 42.3	3				
		ALG-Gtip	4,5,6	-	2	2.30 ± 0.01	1.58 ± 0.01	435.3 ± 29.1	217.7 ± 14.6	3				
		JAS-Gtip	7,8,9	x3	2	2.28 ± 0.05	1.69 ± 0.05	119.7 ± 15.0	239.3 ± 29.9	3				
2	Popcorn	MHLW-Gtip	1,2,3	-	1	2.23 ± 0.01	1.70 ± 0.02	1182.8 ± 17.1	1182.8 ± 17.1	3				
		ALG-Gtip	4,5,6	-	2	2.24 ± 0.01	1.64 ± 0.01	1112.7 ± 17.1	556.3 ± 8.5	3				
		JAS-Gtip	7,8,9	x3	2	2.33 ± 0.02	1.71 ± 0.01	523.3 ± 16.1	1046.7 ± 32.1	3				
3	Tacos snack	MHLW-Gtip	1,2,3	-	1	2.28 ± 0.04	1.69 ± 0.05	431.2 ± 3.6	431.2 ± 3.6	3				
		ALG-Gtip	4,5,6	-	2	2.19 ± 0.02	1.64 ± 0.02	833.0 ± 7.1	416.5 ± 3.5	3				
		JAS-Gtip	7,8,9	x2	2	2.33 ± 0.01	1.63 ± 0.11	425.7 ± 4.3	638.5 ± 6.4	3				
4-1	Corn puff (salt taste)	MHLW-Gtip	1,2,3	-	1	2.22 ± 0.01	1.75 ± 0.04	469.5 ± 44.7	469.5 ± 44.7	3				
		ALG-Gtip	4,5,6	-	2	2.24 ± 0.04	1.76 ± 0.02	673.8 ± 4.3	336.9 ± 2.2	3				
		JAS-Gtip	7,8,9	x2	2	2.21 ± 0.03	1.78 ± 0.01	262.8 ± 20.0	394.3 ± 30.0	3				
4-2	Corn puff (with onion)	MHLW-Gtip	1,2,3	-	1	2.32 ± 0.02	1.74 ± 0.04	577.5 ± 19.7	577.5 ± 19.7	3				
		ALG-Gtip	4,5,6	-	2	2.33 ± 0.03	1.78 ± 0.03	522.0 ± 16.1	261.0 ± 8.1	3				
		JAS-Gtip	7,8,9	x2	2	2.34 ± 0.02	1.73 ± 0.01	340.0 ± 15.7	510.0 ± 23.6	3				
4-3	Corn puff (with chili)	MHLW-Gtip	1,2,3	-	1	2.41 ± 0.07	1.69 ± 0.03	553.2 ± 18.3	553.2 ± 18.3	3				
		ALG-Gtip	4,5,6	-	2	2.36 ± 0.03	1.77 ± 0.03	570.7 ± 15.3	285.3 ± 7.7	3				
		JAS-Gtip	7,8,9	x2	2	2.36 ± 0.03	1.74 ± 0.04	282.2 ± 21.8	423.3 ± 32.6	3				
5	Frozen corn	MHLW-Gtip	1,2,3	x1	1	2.24 ± 0.08	1.68 ± 0.09	224.0 ± 41.7	448.0 ± 1.9	3				
6-1	Whole corn (canned)	MHLW-Gtip	1,2,3	x1	1	2.40 ± 0.02	1.66 ± 0.01	270.7 ± 4.9	541.3 ± 9.9	3				
6-2	Cream corn (canned)	MHLW-Gtip	1,2,3	-	1	2.31 ± 0.00	1.65 ± 0.01	394.7 ± 8.1	394.7 ± 8.1	3				
7-1	Corn soup (dry powder)	MHLW-Gtip	1,2,3	-	1	2.34 ± 0.01	1.76 ± 0.01	947.0 ± 15.8	947.0 ± 15.8	3				
7-2	Corn soup (liquid)	MHLW-Gtip	1,2,3	-	1	2.42 ± 0.02	1.65 ± 0.03	130.8 ± 5.1	130.8 ± 5.1	3				

1) ×1: The weight of water is equal to the weight of sample.
 ×2: The weight of water is twice the weight of sample.
 ×3: The weight of water is 3 times the weight of sample.

0.8%アガロースゲルによる電気泳動では、冷凍トウモロコシでは23 Kbp付近の高分子DNAを多く含むインタクトなDNAが観察された (Fig.2, No.5). 一方、トウモロコシ缶詰 (ホールタイプ)、トウモロコシ缶詰 (クリームタイプ) およびコーンスープ (乾燥粉末) では560 bp以下の低分子化したDNAが明瞭に観察され、コーンスープ (液体) のDNA試料液には2 Kbp付近から低分子量側にのびるスメアも観察された (Fig.2, No.6-1, No.6-2 No.7-1, 2No.7-2). 以上の結果により、MHLW-Gtip法を用いた場合のDNA試料液の分子量分布は加工品により異なっていたが、それらの抽出DNAは定性PCRに用いるDNA試料原液として量および質ともに良好であることが確認された。

結論

Gtipを用いた3種のDNA抽出精製法のうち、作業効率および経済性の観点からJAS-Gtip法およびALG-Gtip

法よりも優れているMHLW-Gtip法は、本研究で検討した11種のトウモロコシ加工品において、定性PCRに用いるDNA試料原液として量および質ともに良好なDNAが得られることが確認された。よって、トウモロコシ (CBH351) の検査方法におけるコーンスナック菓子 (ジャイアントコーン, ポップコーン, タコススナック, コーンパフ, トウモロコシ缶詰 (ホールタイプ, クリームタイプ), コーンスープ (乾燥粉末, 液体), 冷凍トウモロコシのDNA抽出精製法については、試料採取量1gのMHLW-Gtip法への統一が可能であると考えられる。

文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局 生活衛生・食品安全部長, 安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法の一部改正について, 生食発0824第2号, 平成28年8月24日.
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター, JAS

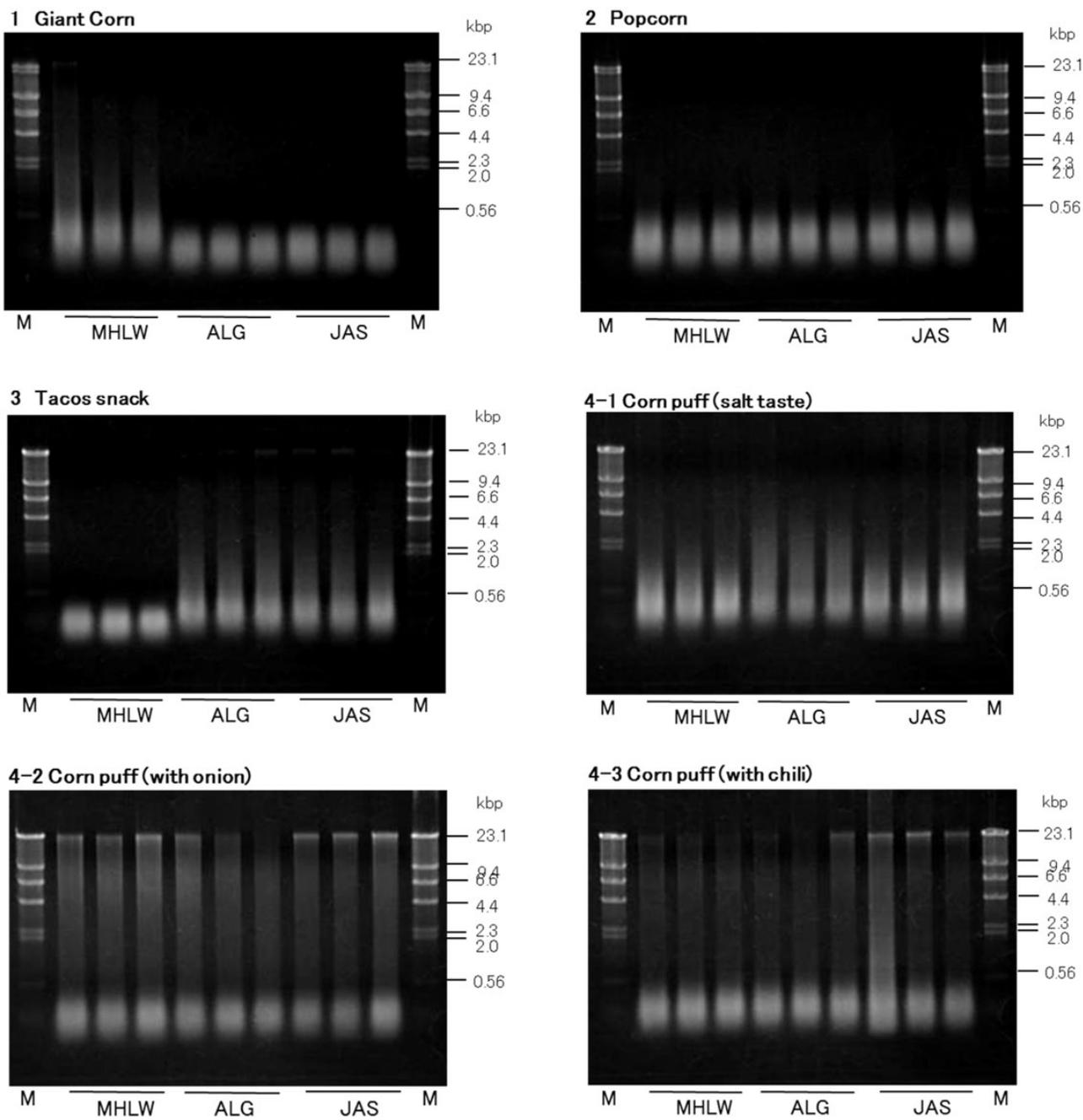


Fig.1 各種Gtip法によるDNA試料原液の分子量分布の比較

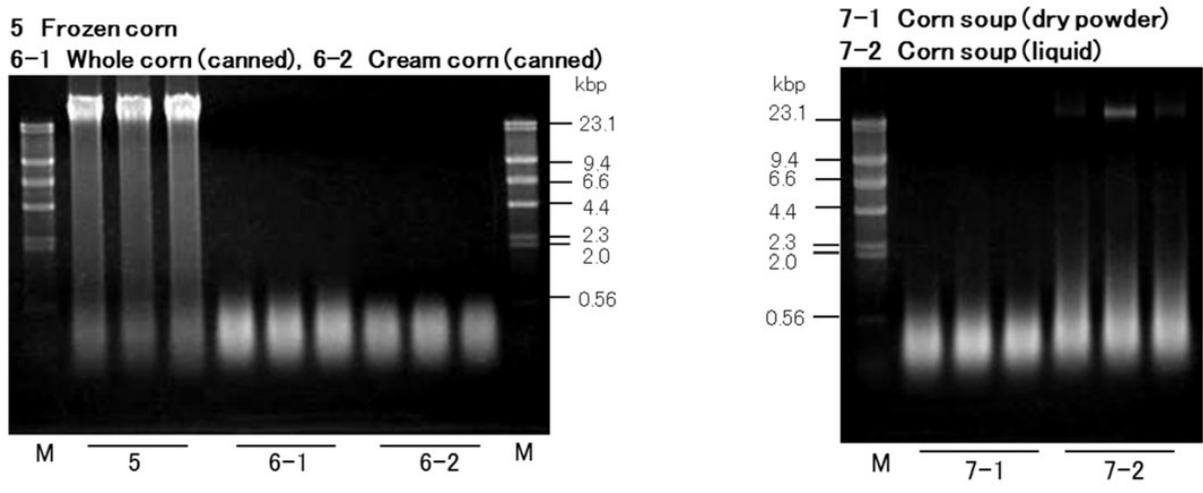


Fig.2 MHLW-Gtip法によるDNA試料原液の分子量分布

分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 第3版, 平成24年9月24日.

3) 消費者庁次長, アレルギー物質を含む食品の検査方法について, 消食表第36号, 平成26年3月26日.

4) 大森清美ほか: トウモロコシ加工品からのイオン交換樹脂タイプキットを用いたDNA抽出精製法の検討, 食品衛生学雑誌, 49, 45-50 (2008)

短報

冷蔵保存における開封後のpH標準液の安定性

外館史祥, 熊坂謙一, 羽田千香子, 甲斐茂美

Stability of pH standard solutions after unsealing their packages under refrigerated storage.

Fumiaki SOTODATE, Kenichi KUMASAKA,
Chikako HADA, Shigemi KAI

諸言

試薬・試液や標準品等の品質は、医薬品検査を始め理化学的な試験検査の品質保証において重要な管理事項の一つである。その中でもpH標準液はガラス電極計を用いたpH計の校正に必要不可欠なものであり、試料の測定のみならず、緩衝液や移動相のpH調製にも必要となる。

pH標準液は、JIS Z8802「pH測定方法」¹⁾や日本薬局方一般試験法pH測定法²⁾に内容は一部異なるものの、それぞれ6種類の規定がされている。これらのpH標準液はトレーサビリティのとれたJCSSのpH標準液を試薬メーカーより購入して使用するのが一般的と思われる。その使用期限については、未開封時の保証期限として容器及び証明書に記載されているが、開封後の使用期限については保証されていない。文献によっては、一度開封したpH標準液をJCSS第2種の精度(±0.015pH)に維持できる期間として、酸性側pH標準液で1ヶ月、アルカリ性側pH標準液で1週間程度とすると記載されている³⁾。また、アルカリ性側のpH標準液は保存条件によっては速やかに低下するとの報告もある⁴⁾。しかしながら、開封後のpH標準液の安定性については文献的にはほとんど知見がなく、使用状況及び保存状況によって異なるものと想定される。

そのため、本研究では、pH標準液のうちフタル酸塩pH標準液、中性りん酸塩pH標準液及びほう酸塩pH標準液の開封後のpHの安定性について、使用状況を反映したモデルケースを設定して検証した。

さらに、二酸化炭素の影響によりpHが変化しやすい

とされるほう酸塩pH標準液については、その保存条件として、容器内空気の窒素置換の有無及び小分け保存によるpHの安定性への影響について検討を行ったので、その結果について報告する。

方法

1. 試薬及び装置

pH標準液は和光純薬工業株式会社製のフタル酸塩pH標準液(pH4.01)、中性りん酸塩pH標準液(pH6.86)及びほう酸塩pH標準液(pH9.18)(いずれもJCSS第2種、500 mL、pHは25°Cの値)を使用した。なお、pH標準液は種類ごとに同一ロットの製品を使用し、1~5°Cで冷蔵保存した。

pHメーターは株式会社堀場製作所製LAQUA F-74SP、pH電極には同社製の複合電極9615-10Dを使用した。なお、pHメーターは、事前に日本薬局方一般試験法pH測定法の規定に準じて、中性りん酸塩pH標準液を用いた5回繰り返し測定による繰り返し性、温度指示値の精度及び校正に使用したpH標準液の規定値と実測値の誤差について適合することを確認した。また、恒温水槽はタイテック株式会社製Personal-10/SX-10Rを使用した。

2. pH測定方法

pHメーターの校正には、測定毎に保証期間内の上記未開封pH標準液3種類を用いた。また、pH測定時は、採取した試験液を水浴中で保温し、25.0±0.1°Cの温度範囲にて測定した。

3. 試験方法

フタル酸塩pH標準液、中性りん酸塩pH標準液及びほう酸塩pH標準液について、冷蔵保存している各同一容器より週1回使用することを想定し、1週間毎に25 mLずつ16週間繰り返して採取するモデルケースを設定した。そのうち、開封時(0週目)、4週目、8週目、12週目及び16週目に採取した各pH標準液のpHを測定した。また、ほう酸塩pH標準液は、メーカーの保存条件に従い採取後に容器内の空気を窒素で置換を行った。

また、ほう酸塩pH標準液については、容器内空気に対する窒素置換の影響を比較検討するため、窒素置換未実施のものを準備し、上記と同様の方法でpHを測定した。なお、窒素置換はパストールピペットを用い液面を泡立てない程度に静かに窒素を吹き入れて行った。

更に、ほう酸塩pH標準液の小分け保存時の安定性検証のため、高密度ポリエチレン製30 mL容器に摺り切り一杯充填し、冷蔵保存した。その小分け保存品について充填時(0週目)4週目、8週目、12週目及び16週目にpHの測定を行った。なお、測定に使用した小分けほう酸塩pH標準液は使い切りとした。

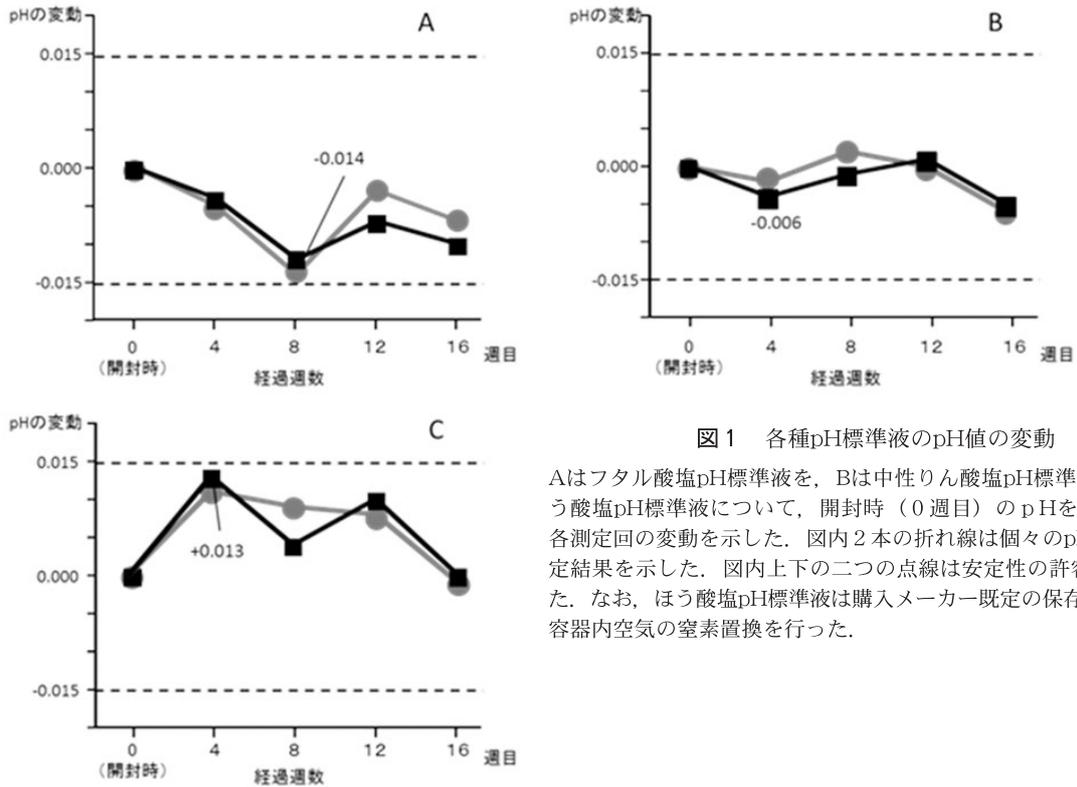


図1 各種pH標準液のpH値の変動

Aはフタル酸塩pH標準液を、Bは中性りん酸塩pH標準液を、Cはほう酸塩pH標準液について、開封時（0週目）のpHを0とした時の各測定回の変動を示した。図内2本の折れ線は個々のpH標準液の測定結果を示した。図内上下の二つの点線は安定性の許容範囲を示した。なお、ほう酸塩pH標準液は購入メーカー既定の保存条件に従い、容器内空気の窒素置換を行った。

本検討における測定数は、いずれも $n = 2$ とし、安定性の許容範囲は初回測定時のpH値に対してJCSS第2種の精度である ± 0.015 pH とした。

結果及び考察

本モデルケースにおいては、実施期間を長く設定する兼ね合いから週当たりの想定使用頻度を少なく設定しており、採取は週1回25 mLと設定した。

各種pH標準液の開封後のpHの安定性を測定した開封時（0週目）のpHと比較した時の各測定回の最大変動幅は、フタル酸塩pH標準液で-0.014pH、中性りん酸塩pH標準液で-0.006pH、ほう酸塩pH標準液で+0.013pHであり、16週目まで安定であった（図1）。また、各種pH標準液とも許容範囲内における変動は上昇・低下とも特定の傾向は認められなかった。

一般にpH標準液を繰り返し使用する場合は、容器から一定量取り出して使用するため、容器内の空気は増大し、空気も入れ替わる。JIS Z8802「pH測定方法」¹⁾によれば、ほう酸塩調製pH標準液及び炭酸塩調製pH標準液は、二酸化炭素などを吸収してpH値が低下すること、日本薬局方一般試験法pH測定法²⁾では、アルカリ性側pH標準液の保存として二酸化炭素吸収管を付けての保存が有効との記載があるように、容器内空間の二酸化炭素は、アルカリ性側pH標準液のpHの安定性に影響を及ぼすものと考えられる。そこで、ほう酸塩pH標準液を

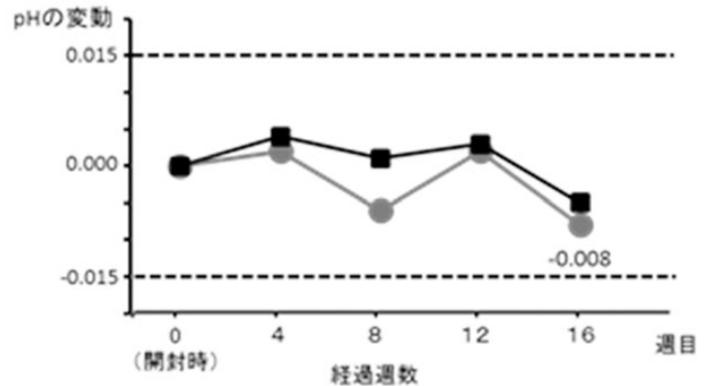


図2 窒素置換未実施におけるほう酸塩pH標準液のpH値の変動

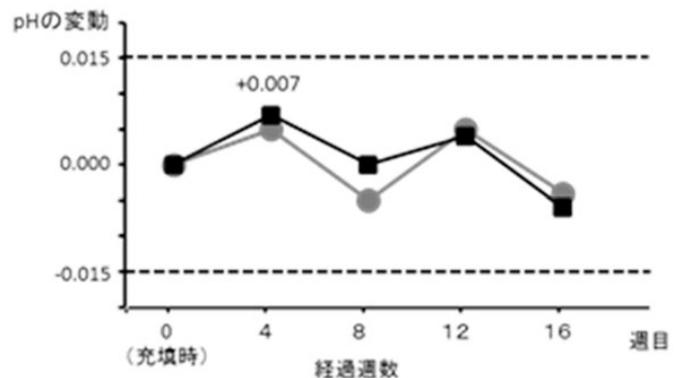


図3 小分け保存したほう酸塩pH標準液のpH値の変動

用いて、二酸化炭素を含む容器内の空気のパHの安定性への影響を以下の2つの方法で検討した。

初めに、容器内空気の窒素置換の有無の影響については、窒素置換を行わない場合であっても、開封時(0週目)のpHと比較した時の各測定回の最大変動幅は-0.008 pHであり、窒素置換を行ったものと同様に16週目まで安定であった(図2)。次に使い切りを想定し、pH標準液を摺り切り一杯で空気の入らないように充填率100%として小分け保存した場合の安定性については、小分け直後(0週目)のpHと比較した時の各測定回の最大変動幅は+0.007pHであり、16週目まで安定であった(図3)。

本検討においてほう酸塩pH標準液のpH値が長期間安定であった要因として、その保存条件の寄与が考えられる。四角目らの報告⁵⁾によれば、容器の材質、保存温度及び充填百分率の影響が大きいとされており、容器材質は高密度ポリエチレン製、保存温度は5℃及び充填百分率は100%が最適な保存条件とされている。本検討でもほぼ同一の保存条件下で安定性を検討していたことから、そのpHの安定性に大きく寄与したものと考えられる。なお、高密度ポリエチレン容器は低密度ポリエチレン容器と比較し二酸化炭素、窒素及び酸素ガスの透過率が低いことが知られており⁶⁾、小分け保存時の容器の選択に留意する必要があると考えられた。

また、中村らの報告⁴⁾によると、ほう酸塩標準液は、容器内に空間のある状態にて実験室内に保存するとpH値は徐々に低下し、1か月の保存では精密分析用標準液として使用できなくなる。本検討では窒素置換未実施のほう酸塩pH標準液でも容器内の空間があったにもかかわらずpHへの影響は見られない。しかし、このことは直ちに二酸化炭素がほう酸塩pH標準液のpHの安定性に影響しないということではなく、モデルケースにおける週1回の使用頻度では、容器内空気の外気との交換頻度が少なく、pHの変動を引き起こすほどの影響は無かった可能性もある。そのため、使用頻度の増加により、容器内空気と外気との交換頻度が増えれば、pHの安定性に影響する可能性も否定できない。

また、保存温度については、各pH標準溶液とも容器に25℃以下で保存する旨の注意書きがある。今回は実質的に1~5℃で保存していたことから、四角目らの示した至適温度条件に近く、pHの安定性に寄与した可能性も考えられた。

なお、今回購入した製品には、フタル酸塩pH標準液にはチモール0.04%、中性りん酸塩pH標準液にはアジ化ナトリウム0.1%が防腐剤として使用されている。チモールのようなフェノール系化合物の抗菌作用は細胞膜に機

能的・構造的に障害を与え⁷⁾、アジ化ナトリウムは細菌内のシトクロムオキシダーゼやカタラーゼに含まれるヘム鉄と結合し静菌作用を引き起こす⁸⁾ことが報告されている。そのため、防腐剤の使用は微生物の増殖を抑え二酸化炭素の産生を防いでいることでpHの安定性に寄与している可能性がある。なお、他のメーカーのJCSSのpH標準液には防腐剤不含の製品や、保存条件の異なる製品もあるため、その影響については検討が必要である。

まとめ

3種類のpH標準液を用いて開封後のpH標準液の安定性についてモデルケースを設定して検討したところ、いずれも16週目まで安定であった。また、ほう酸塩pH標準液は二酸化炭素による影響を検討するため容器内空気の窒素置換の有無及び小分け保存について検討したところ、いずれも16週目まで安定であった。今回の研究結果では開封後のpH標準液も安定であることが示されたが、保存条件及び防腐剤の有無等により安定性が異なる可能性もある。そのため、開封後のpH標準液の使用期限を決める際には、実態に合った使用頻度及び保存条件、その他、購入メーカー又は自家調製による相違点等により、各々に検証する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 一般財団法人日本規格協会：JIS Z8802: pH測定方法, pp1-8, 一般財団法人日本規格協会(2011)
- 2) 厚生労働省告示第64号: 第十七改正日本薬局方(平成28年3月7日), 一般試験法2.54 pH測定法
- 3) 田中龍彦: JIS使い方シリーズ 化学分析の基礎と実際, 第1版, 田中龍彦編, pp.109-120, 一般財団法人日本規格協会(2008)
- 4) 中村進, 札川紀子, 川瀬晃: pH標準液の安定性, 分析化学, **28**, 39-42(1979)
- 5) 四角目和広, 栗原力, 中村進, 久保田正明: pH標準液の保存条件の検討, 分析化学, **37**, 17-21(1988)
- 6) 葛良忠彦: 包装材料としての高分子フィルム, 繊維と工業, 41,348-354(1985)
- 7) Makhil S., Kumar S., Giri A.: Effectiveness of thymol in extending keeping quality of cottage cheese, J Food Sci Technol, **51**, pp.2022-2029(2014)
- 8) Winter C., Kerros ME., Weinbauer MG.: Effect of sodium azide on the abundance of prokaryotes and viruses in marine samples, PLoS One, **7**, pp.1-4(2012)

短報

炭酸入りミネラルウォーターの
 成分規格試験法の検討
 —揮発性有機化合物—

上村 仁, 仲野 富美, 佐藤 学, 西 以和貴,
 辻 清美

Studies on analytical method of
 compositional standard items in
 carbonated mineral waters.
 —Volatile Organic Compounds—

Hitoshi UEMURA, Fumi NAKANO, Manabu SATO,
 Iwaki NISHI and Kiyomi TSUJI

はじめに

平成26年(2014年)12月に施行されたミネラルウォーター類の規格基準改正¹⁾によりミネラルウォーター類に係る規制項目が大幅に増加した。多くの項目はすでに水道水の規制項目となっており、水道水や清涼飲料水の分析法(通知法)^{2,3)}を用いて精度よく分析することが可能である。しかし、炭酸入りミネラルウォーター類については、その特異性から既存の分析法がそのまま適用できない項目が多く存在する。試料の発泡のみが分析の障害となるため試料を十分に脱気することにより解決することが可能な項目もあるが、項目によっては脱気が不可能な場合もあり、揮発性有機化合物(VOC)はその代表的な例である。

そこで、ヘッドスペースGC/MS法を用いたVOC分析法について、炭酸入りミネラルウォーター類への適用の可否について検証した。

方法

1. 試薬

メタノールは和光純薬工業製の残留農薬・PCB試験用(5,000倍濃縮)を、各内部標準原液及び各標準原液は和光純薬工業製の水質試験用試薬を使用した。

添加用ブランク水には十分に冷却した市販のミネラル

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

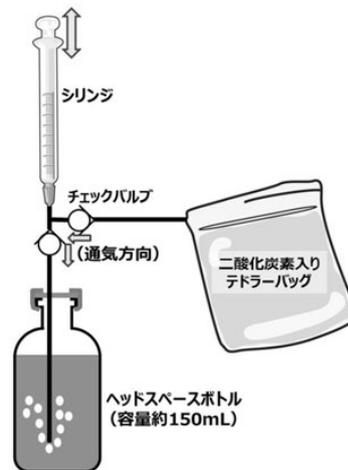


図1 自作の器具による炭酸水の製造方法

ウォーター(ボルヴィック:キリンビバレッジ製)に自作の器具(図1)を用いて二酸化炭素を注入し、よく振とう混合したものを用いた。

2. 装置及び測定方法

装置及び測定条件を表1、表2に示した。測定対象はミネラルウォーター類としての規格基準のある14化合物と、農薬としてミネラルウォーター類への残留基準が定められている1,2-ジクロロプロパン、1,3-ジクロロプロパン(シス体及びトランス体)の合計17化合物とした。

表1 装置及び測定条件

ヘッドスペースサンプラー	アジレント GC Sampler 80
GC/MS	アジレント 7890B GC + 5977A MSD
カラム	アジレント DB-624 (0.25mm i.d. ×30m, 膜厚1.4µm)
カラム温度	40°C(6分)-(8°C/分)-120°C(3分) -(15°C/分)-230°C(5分)
キャリアガス	ヘリウム(1mL/分、定流量モード)
注入口温度	230°C
注入モード	スプリット(スプリット比 10:1)
測定モード	SIM
測定質量数	表2に記載
バイアル加熱温度	60°C
バイアル加熱時間	40分

結果及び考察

1. 試料採取方法の比較

当所においては、炭酸を含まない水の分析の場合、ヘッドスペースバイアルへの試料の採取(12mL)にはデジタルピペットを使用している(6mLを2回採取)。しかし、炭酸水では気泡を嚙んでしまい正確な液量の採取が困難であると考えられた。そこで、デジタルピペット(6mL×2回)、ホールピペット(6mL×2回)、メスピペット(20mLメスピペットで12mL)、メスシリンダー(20mLメスシリンダーで12mL)で炭酸水(精製水に二

酸化炭素を注入したもの)を採取し、その重量を測定してどの程度正確に試料が採取できるのかを比較した(10回繰り返し測定)。炭酸を含まない精製水で実施した結果と併せて、結果を表3に示した。炭酸水においては、ホールピペットでは気泡のために液面を標線に合わせることが不可能であったため、その他の3つの方法につい

て比較した。その結果、最も回収率が良好だったのがメスピペット(99.2%)で、次いでメスシリンダー(97.6%)、デジタルピペット(91.9%)であった。再現性はメスピペットが最も良好(変動係数0.158%)で、次いでデジタルピペット(0.541%)、メスシリンダー(0.606%)であった。総合すると、試料採取にはメスピペットが最適であると考えられた。そこで、以降の検討において、炭酸水試料採取の際にはメスピペットを使用することとした。

表2 測定質量数

化合物名	定量イオン(m/z)	確認イオン(m/z)	化合物名	定量イオン(m/z)	確認イオン(m/z)
四塩化炭素	117	119	プロモジクロロメタン	83	85
1,4-ジオキサン	88	58	プロモホルム	173	171
シス-1,2-ジクロロエチレン	96	61	1,2-ジクロロエタン	62	64
トランス-1,2-ジクロロエチレン	96	61	トルエン	91	92
ジクロロメタン	84	86	1,2-ジクロロプロパン	63	62
テトラクロロエチレン	166	129	シス-1,3-ジクロロプロペン	110	75
トリクロロエチレン	130	132	トランス-1,3-ジクロロプロペン	110	75
ベンゼン	78	77	フルオロベンゼン(内部標準)	96	70
クロロホルム	83	85	1,4-ジオキサン-d8(内部標準)	96	64
ジブロモクロロメタン	129	127			

2. 試料の調製方法の比較

ヘッドスペース分析の際には塩析用に塩化ナトリウムを試料に添加するが、炭酸水に塩化ナトリウムを添加すると激しく発泡し、その際のVOCの逸失が懸念される。また、水道水やミネラルウォーター類の通知法に定められた方法(あらかじめ塩化ナトリウムを入れたバイアルに検体を注ぎ、その後、内部標準溶液を添加する方法)では、塩化ナトリウムを添加してVOCが揮散しやすくなった状態で密栓までの時間が長くなり、この間におけるVOCの逸失も懸念される。これらの問題を確認する

表3 検体採取方法の比較 (n=10)

	無炭酸				炭酸入り		
	デジタルピペット(6mL×2)	ホールピペット(6mL×2)	メスピペット	メスシリンダー	デジタルピペット(6mL×2)	メスピペット	メスシリンダー
平均重量(g)	11.867	12.002	12.008	11.873	11.029	11.907	11.710
変動係数(%)	0.179	0.090	0.177	0.913	0.541	0.158	0.606
平均回収率(%)	98.9	100.0	100.1	98.9	91.9	99.2	97.6

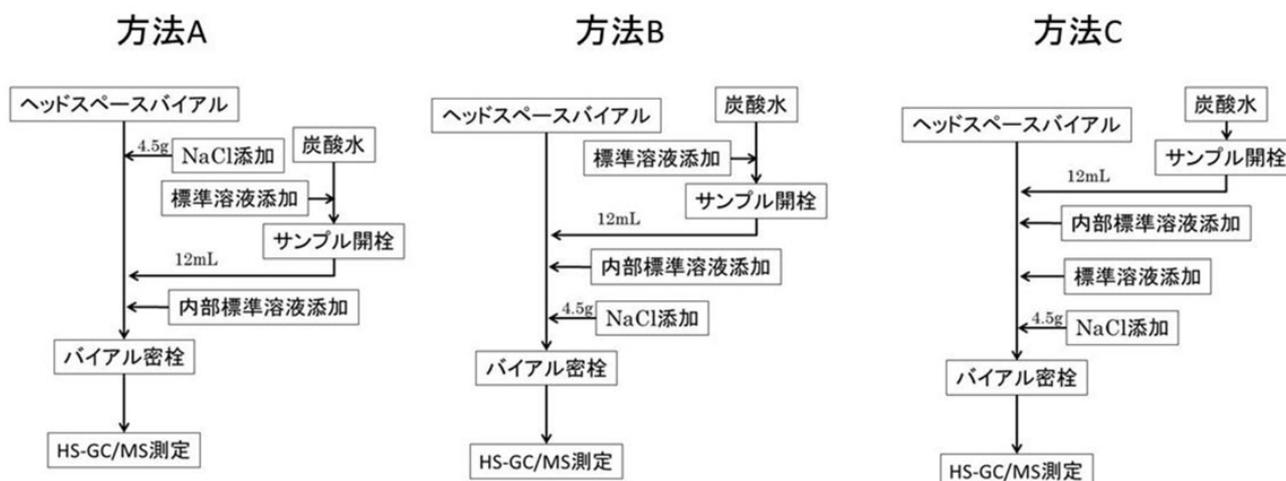


図2 検討した前処理方法

ため、ブランク水の採取、塩化ナトリウムの添加、標準溶液の添加の順序を変えて調製した各試料（図2 方法A及び方法B）の測定を行った。

あらかじめヘッドスペースバイアルに塩化ナトリウムを入れておき、そこに標準溶液を添加した炭酸水と内部標準溶液を添加して密封する方法（方法A：通知法準拠）と、ヘッドスペースバイアルに標準溶液を添加した炭酸水を入れた後に内部標準溶液を添加し、最後に塩化ナトリウムを添加して密封する方法（方法B）で測定を行った。いずれの方法でも、自作の器具（図1）により製造した炭酸水に対して、開栓することなくキャップ部のセプトラムを通して所要量の標準溶液を注射針で注入することにより、開栓前の状態でVOC濃度既知の炭酸水を調製した。これらの分析結果の比較により塩化ナトリウム添加のタイミングの違いによるVOC逸失の状況を確認した（各成分の濃度は5 μ g/Lとなるように開栓前に標準溶液を添加、5回繰り返し測定）。

結果を表4に示した。揮発性の低い1,4-ジオキサンはどちらの方法でも良好な回収率が得られた。その他の化合物の回収率は方法Aでは41.4%~89.5%（平均69.9%）、方法Bでは60.4%~120%（平均96.6%）であった。方法Bの方が良好な結果であり、塩化ナトリウム添加後、密栓までの時間が長くなることにより、VOCの逸失が起きていることが示唆された。

3. 開栓時、分注時のVOCの揮散

炭酸飲料は開栓時や測定容器への移し替え時に発泡し、この際のVOC逸失も懸念されるところである。開栓前に標準溶液を添加する方法Bと対象化合物を含まない炭酸水をヘッドスペースバイアルへ分注後に標準溶液を添加する方法（方法C）の分析結果の比較をした（各成分の濃度は5 μ g/Lとなるように標準溶液を添加、5回繰り返し測定）。方法Cにおいては対象化合物は開栓時及びバイアルへの分注時の影響を受けない。従って、方法Cの測定値と方法Bの測定値の差が開栓時及びバイアルへの分注時に逸失するVOCの量に相当すると考えられた。

結果を表4に示した。1,4-ジオキサンはどちらの方法でも良好な回収率が得られたので、ここではそれ以外の化合物について論じる。方法Cにおいて、各化合物の回収率は71.2%~129%（平均106%）であった。方法Bにおいては各化合物の回収率は60.4%~120%（平均96.6%）であった。方法Bと方法Cの回収率を比較すると、各化合物の平均で方法Bは方法Cの90.8%の回収率（80.6%~101%）となっていた。物質により程度は異なるが、開栓からバイアル分注までの間にVOCは最大20%近くが逸失していることが明らかになった。

4. 妥当性確認

開栓前の炭酸水中のVOC濃度を正確に求めることは、測定までの間のVOCの揮散の程度が化合物の種類や製品の状態（炭酸含有量等）により異なるために困難であると考えられた。一方、消費者が実際に飲用・摂取する

表4 各前処理方法による測定結果 (n=5)

検査対象物質	方法A			方法B			方法C		
	測定値 (μ g/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	測定値 (μ g/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	測定値 (μ g/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
ジクロロメタン	3.74	74.8	4.21	5.17	103	7.65	5.64	113	5.70
トランス-1,2-ジクロロエチレン	2.80	55.9	7.27	4.01	80.3	3.02	4.68	93.6	3.67
シス-1,2-ジクロロエチレン	3.51	70.2	4.56	4.92	98.5	5.23	5.57	111	3.67
クロロホルム	3.55	71.0	4.41	4.87	97.5	6.01	5.36	107	3.71
四塩化炭素	2.07	41.4	12.3	3.02	60.4	3.21	3.56	71.2	9.23
ベンゼン	3.27	65.4	5.50	4.58	91.6	4.28	4.97	99.4	3.34
1,2-ジクロロエタン	4.48	89.5	4.68	5.98	120	7.87	6.43	129	7.40
トリクロロエチレン	2.85	56.9	7.43	4.08	81.7	2.63	5.06	101	4.07
1,2-ジクロロプロパン	3.80	75.9	3.65	5.19	104	6.43	5.49	110	4.35
1,4-ジオキサン	5.48	110	14.0	5.15	103	5.49	5.20	104	6.92
プロモジクロロメタン	3.92	78.4	3.80	5.29	106	7.17	5.50	110	5.15
トルエン	3.22	64.3	6.00	4.54	90.7	2.93	5.49	110	3.61
シス-1,3-ジクロロプロペン	3.71	74.3	3.19	5.12	102	7.80	5.87	117	6.00
トランス-1,3-ジクロロプロペン	3.74	74.8	3.03	5.26	105	6.31	5.99	120	4.24
テトラクロロエチレン	2.57	51.4	9.71	3.71	74.1	2.49	3.90	78.1	6.72
ジブロモクロロメタン	4.21	84.3	4.18	5.65	113	8.23	5.78	116	5.91
プロモホルム	4.47	89.4	4.74	5.93	119	8.98	5.86	117	6.20
平均(全体)	3.61	72.2	6.04	4.85	97.0	5.63	5.31	106	5.29
最少(全体)	2.07	41.4	3.03	3.02	60.4	2.49	3.56	71.2	3.34
最大(全体)	5.48	110	14.01	5.98	120	8.98	6.43	129	9.23
平均(1,4-ジオキサンを除く)	3.49	69.9	5.54	4.83	96.6	5.64	5.32	106	5.19
最少(1,4-ジオキサンを除く)	2.07	41.4	3.03	3.02	60.4	2.49	3.56	71.2	3.34
最大(1,4-ジオキサンを除く)	4.48	89.5	12.3	5.98	120	8.98	6.43	129	9.23

表5 妥当性確認結果（2 併行 5 回測定）

検査対象物質	添加濃度 (mg/L)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
ジクロロメタン	0.002	99.0	4.89	9.01
トランス-1,2-ジクロロエチレン	0.002	87.6	2.89	7.39
シス-1,2-ジクロロエチレン	0.002	100	3.97	6.52
クロロホルム	0.002	97.3	3.87	6.46
四塩化炭素	0.002	70.6	4.80	15.8
ベンゼン	0.002	95.2	3.15	5.74
1,2-ジクロロエタン	0.002	112	4.24	9.18
トリクロロエチレン	0.002	89.0	2.71	7.75
1,2-ジクロロプロパン	0.002	101	4.39	6.46
1,4-ジオキサン	0.01	101	3.92	5.65
プロモジクロロメタン	0.002	102	4.77	6.67
トルエン	0.01	102	6.68	9.74
シス-1,3-ジクロロプロペン	0.002	101	9.11	10.6
トランス-1,3-ジクロロプロペン	0.002	103	7.46	11.8
テトラクロロエチレン	0.002	84.0	2.87	10.6
ジブロモクロロメタン	0.002	108	4.86	7.76
ブロモホルム	0.002	111	4.72	8.80
目標値		70~120	20	20

VOC濃度は、炭酸水を開栓しコップ等に移して飲むことを想定すると、開栓・分注の間に揮散するVOC濃度を除外した濃度、すなわち、方法Cで測定した濃度が相当するものと考えられた。そこで、方法Cについて妥当性の確認を行った。添加濃度は1,4-ジオキサンとトルエンは0.01mg/L、その他の化合物は0.002mg/Lとした。各回2 併行、5 回の測定結果を用いて評価した。真度及び精度の目標値は妥当性評価ガイドライン⁴⁾に従った。結果を表5に示した。真度は四塩化炭素が70.6%と、辛うじて目標値を満足したが、その他の化合物は概ね良好な結果となった。併行精度、室内精度も目標値を満足していた。炭酸を含まないミネラルウォーターを用いた妥当性確認結果は真度93.9%~105%（平均102%）、併行精度4.11%~5.58%（平均4.93%）、室内精度4.67%~8.73%（平均5.77%）であり、これに比較すると劣るも

の、本法が妥当であることが確認できた。

まとめ

炭酸入りミネラルウォーターをヘッドスペースバイアルに分注する際に用いる器具をデジタルピペット、ホールピペット、メスピペット、メスシリンダーと比較したところ、メスピペットが最も正確に量り取れることがわかった。試料の開栓時やヘッドスペースバイアルへの分注時にVOC濃度は最大20%近く減少していた。揮発性の低い1,4-ジオキサンは分析操作途中で揮散せず、正確な分析が可能であった。試料への塩析用の塩化ナトリウムの添加は密封直前に行うとVOCの逸失が比較的抑えられた。この方法について妥当性確認を行ったところ、妥当であり、炭酸入りミネラルウォーターにも適用可能であることが確認できた。

参考文献

- 1) 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について、食安発1222第1号、平成26年12月22日。
- 2) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法、厚生労働省告示第261号、平成15年7月22日。
- 3) 清涼飲料水等の規格基準の一部改正に係る試験法について、食安発1222第4号、平成26年12月22日。
- 4) 食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドラインについて、食安発1222第8号、平成26年12月22日。

短報

炭酸入りミネラルウォーターの 成分規格試験法の検討 —陰イオン性化合物・臭素酸—

仲野 富美, 佐藤 学, 西 以和貴, 辻 清美,
上村 仁

Studies on analytical method of compositional standard items in carbonated mineral waters. —Anions and bromate—

Fumi NAKANO, Manabu SATO, Iwaki
NISHI, Kiyomi TSUJI and Hitoshi UEMURA

はじめに

ミネラルウォーター類 (MW) の成分規格が平成26年12月に改正され, 現在, MWの化学物質等についての成分規格基準は, 殺菌・除菌有の製品で39項目, 殺菌・除菌無の製品で14項目が定められている¹⁾.

MWは種類が非常に多く, 一部, 炭酸入りミネラルウォーター (以下, 炭酸MW) が流通している. これらの製品は炭酸ガスが発泡するため, 検査時にピペット等の計量器具でサンプリングする際や測定装置のオートサンプラーで試料注入を行う際に, 気泡を嚙んで採取量または注入量が不正確となることが懸念される. またイオンクロマトグラフ法では炭酸ガスによるクロマトグラムへの影響も報告されていることから^{2,3)}, 前処理として試料から炭酸ガスを除去することが必要と考えられる.

MWの試験法は厚生労働省からの通知⁴⁾で分析法 (以下, 通知法) が示されているが, 炭酸MWの分析については言及されていない.

そこで今回, 成分規格基準項目のうち, イオンクロマトグラフを用いて測定する項目である陰イオン性化合物 (以下, 陰イオン類) 及び臭素酸 (以下, BrO_3) について炭酸ガスを除去するための前処理法を中心に試験法の

検討を行った. また, 炭酸を含有する水を保存した場合の陰イオン類の安定性について若干の検討を行ったので, 併せて報告する.

方法

1. 装置

イオンクロマトグラフはサーモフィッシャーサイエンティフィック製ICS-1600, ポストカラム装置はPPU-520を用いた. 超音波洗浄機はシャープ製UT-105HSを用いた.

2. 標準液, 試薬, 器材

陰イオン混合標準液は陰イオン類7成分 (フッ化物イオン (以下, F) 及び塩化物イオン (以下, Cl) 各20mg/L, 亜硝酸イオン (以下, NO_2), 臭化物イオン (以下, Br), 硝酸イオン (以下, NO_3) 及び硫酸イオン (以下, SO_4) 各100mg/L, リン酸イオン (以下, PO_4) 200mg/L) を含む和光純薬工業製JCSS試薬を用いた. 塩素酸イオン (以下, ClO_3) 標準液 (1000mg/L), 亜塩素酸イオン (以下, ClO_2) 標準液 (1000mg/L) 及び BrO_3 標準液 (2000mg/L) は関東化学製のJCSSまたはイオンクロマトグラフィー用試薬を用いた. 亜硝酸性窒素標準液 (Nとして100mg/L) は和光純薬工業製JCSS試薬を用い, NO_2 としての濃度に換算して実験に用いた. 標準液は適宜, 超純水で希釈した. 炭酸ナトリウム, 炭酸水素ナトリウム, 亜硝酸ナトリウム及び臭化カリウムは和光純薬工業製特級試薬を, 硫酸は和光純薬工業製有害金属分析用試薬を用いた. フィルターはGLサイエンス製イオンクロマトグラフ用孔径 $0.2\mu\text{m}$ を用いた.

3. 炭酸入り超純水 (以下, 炭酸超純水), 炭酸MW

炭酸超純水は次のように調製した. まず, 予め冷却した超純水を容量約150mLのヘッドスペースボトルに入れて密栓した. 炭酸ガスを入れたテドラーバッグに注射シリンジを接続し, 注射針をボトルキャップのセプタム部分に差し込んだ. 注射シリンジを用いてボトル内に炭酸ガスを繰り返し吹き込みながら混和し, 超純水中に十

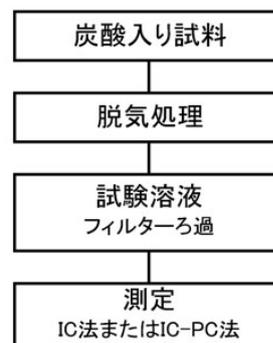


図1 分析フロー

分に溶解させた⁵⁾。

炭酸MWは国産2検体（製品A：硬度19~50mg/L及びB：硬度10~35mg/L）、外国産1検体（製品C：ドイツ産、硬度1310mg/L）（硬度は成分表示記載に基づく数値）を用いた。

4. 分析法

通知法⁴⁾及び水道法告示法⁶⁾に準じ、陰イオン類はイオンクロマトグラフー斉分析法（以下、IC法）を、 BrO_3 はイオンクロマトグラフ-ポストカラム吸光光度法（以下、IC-PC法）を用いた。分析フローは図1に示した。分析条件は以下に示した。

(1) 陰イオン類

カラム：Ion Pac AS9-HC、内径4mm、長さ250mm（サーモフィッシャーサイエンティフィック製）

溶離液：9mM 炭酸ナトリウム水溶液、1mL/分

カラム温度：35℃

検出器：電気伝導度検出器

注入量：100 μL

(2) BrO_3

カラム、溶離液、カラム温度：(1)と同じ

反応液A：1.2mmol/L亜硝酸ナトリウム溶液、200 μL /分

反応液B：臭化カリウム-硫酸溶液、400 μL /分

反応コイル温度：40℃

検出器：UV 検出器 測定波長268nm

注入量：250 μL

5. 添加試料

陰イオン類の添加試料は炭酸超純水に陰イオン混合標準液0.5mL、100mg/L ClO_2 標準液0.3mL及び100mg/L ClO_3 標準液0.3mLを添加したのち全量50mLとした。 BrO_3 は炭酸MWに1mg/L BrO_3 標準液を0.5mL添加したのち全量50mLとした。対照として超純水に同様に添加した試料についても調製した。

6. 添加回収試験

添加試料を1日2併行で、5日間分析を行い、真度及び精度を推定し、厚生労働省の妥当性確認ガイドライン⁷⁾に示された目標値と比較した。

7. 炭酸入り試料中での陰イオン類の安定性

陰イオン類を炭酸超純水に添加した試料を容量約20mLのヘッドスペースバイアルに分注して密栓したものを4℃で保存した。この試料を一定期間毎に測定し、炭酸入り試料中での各成分の安定性について確認した。添加濃度は添加回収試験と同一濃度とした。陰イオン類9成分（F、 NO_2 、 NO_3 、 ClO_2 、 ClO_3 、Cl、Br、 PO_4 及び SO_4 ）を全て混合して添加した場合、 NO_2 、 ClO_2 及び ClO_3 を単一で添加した場合、3成分を組合せて添加した場合

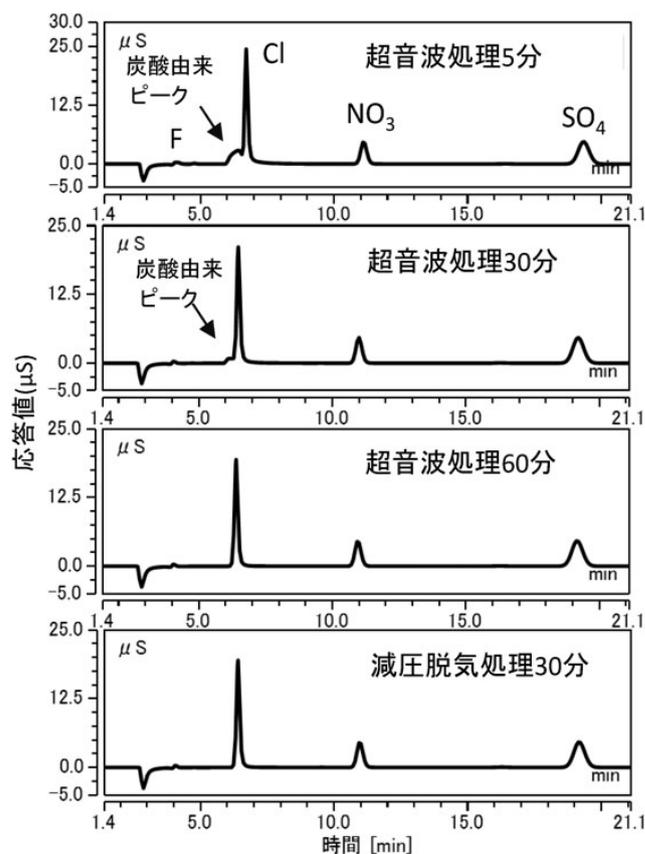


図2 陰イオン類分析の脱気処理の検討
製品Aのイオンクロマトグラム

(NO_2+ClO_2 、 NO_2+ClO_3 及び $\text{ClO}_2+\text{ClO}_3$) について検討を行った。対照として超純水に添加した試料についても測定を行った。

結果および考察

1. 脱気条件の検討

(1) 陰イオン類

測定対象物質は基準項目5項目（F、 NO_2 、 NO_3 、 ClO_2 及び ClO_3 ）及び基準外4項目（Cl、Br、 PO_4 及び SO_4 ）

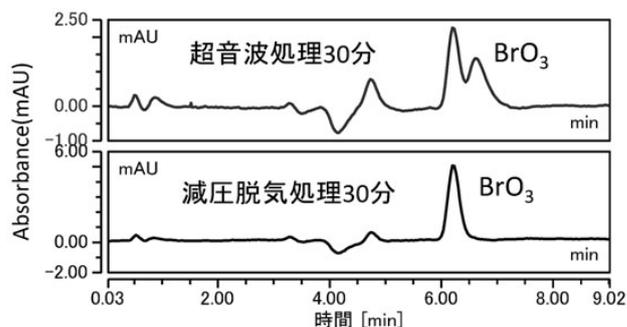


図3 BrO_3 分析の脱気処理の検討
製品Aの添加試料のイオンクロマトグラム

表1 添加回収試験の結果（1日2併行、5日間）

物質名	規格基準	殺菌・除菌 ¹⁾		添加濃度 (mg/L)	添加用 ブランク試料	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
		有	無					
F	2mg/L以下	○	○	0.2	炭酸 超純水	100.2	3.2	3.2
NO ₂	10mg/L以下 ²⁾	○	○	1		95.8	1.2	2.1
NO ₃				1		98.3	1.3	3.6
ClO ₂	0.6mg/L以下	○	—	0.6		94.7	0.6	1.5
ClO ₃	0.6mg/L以下	○	—	0.6		99.1	0.6	1.7
Cl	—	—	—	0.2		105.4	5.4	5.4
Br	—	—	—	1		97.9	1.0	1.0
PO ₄	—	—	—	1		97.3	0.9	0.9
SO ₄	—	—	—	1		98.7	1.8	1.8
BrO ₃	0.01mg/L以下	○	—	0.01		製品A	102.3	1.2
妥当性確認ガイドラインの目標値				陰イオン類 BrO ₃		90-110	室内精度の 目標値以下	10> 5>

1) MW成分規格における試料の区分
 2) 硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の合算値としての基準値
 ○：規制対象、—：規制対象外

とした。
 試料中の炭酸ガスを脱気するため、超音波処理を試みた。炭酸MW（製品A）約20mLを50mL比色管に入れ、5分から60分間超音波処理を行い、IC法により測定を行った。イオンクロマトグラムを図2に示した。超音波処理5分から30分では炭酸由来と思われるピークが保持時間約6.4分に検出され、Clのピークと重なった。炭酸由来のピークは処理時間が長くなるにつれてピーク高が減少し、処理時間60分では検出されなかった。また炭酸由来のピークが検出された場合には、各イオンの保持時間が遅れる傾向があり、特にClで顕著であった。

次に吸引ポンプによる減圧脱気処理を検討した。製品Aを50mL三角フラスコに約30mL採り、攪拌子（長さ2cm）を入れ、吸引ろ過鐘内に置いた。スターラーで攪拌しながら、密栓したろ過鐘内の空気を30分間吸引ポンプで吸引し、減圧脱気したものをIC法により測定した。その結果、図2のように炭酸由来ピークは認められなかった。減圧脱気の方が超音波処理に比べて短時間で炭酸ガスが効果的に除去できることがわかった。

(2) BrO₃
 製品AにBrO₃標準液を添加した試料に対し、超音波処理または減圧脱気を行い、IC-PC法により測定を行った。その結果、図3のように超音波処理30分ではBrO₃のピークは2つに分かれたが、減圧脱気処理30分ではピーク形状は良好であった。超音波処理60分についても測定を行っ

たところ、BrO₃のピークは2つに分かれたものの、処理30分に比べるとピーク形状は若干改善した。BrO₃分析では陰イオン類分析に比べて注入量が多いため、超音波処理60分でもピークに影響が生じたと思われた。また、BrO₃分析の場合、炭酸由来のピークは測定波長に吸収がないため、クロマトグラム上には検出されなかったが、BrO₃のピーク保持時間（約6.2分）の近傍に溶出されていると思われた。そのため炭酸ガスの除去が不十分であるとピーク形状に影響を及ぼしたと考えられた。

以上のことから、試料中から炭酸を除去し、検査を迅速に行うため、試料の前処理として30分間減圧脱気を行うこととし、検討を進めた。なお、超純水に添加した標準液ではこの減圧脱気処理を行っても各成分の濃度が変化しないことを確認した。

3. 添加回収試験

陰イオン類は炭酸超純水に、BrO₃は炭酸MW（製品A）に添加した試料を用い、30分間減圧脱気を行った後、IC法またはIC-PC法で測定を行った。1日2併行で、5日間分析を行った結果を表1に示した。測定を行った陰イオン類9成分及びBrO₃は真度、精度ともガイドラインの目標値を満たし、良好な結果となった。今回の添加回収試験では基準項目のうちF、NO₂及びNO₃の添加用標準液は便宜上、陰イオン混合標準溶液を用いたため、基準値より低い添加濃度で実施した。実際の検査に適用する際には、基準値濃度についても確認すべきと思われる。

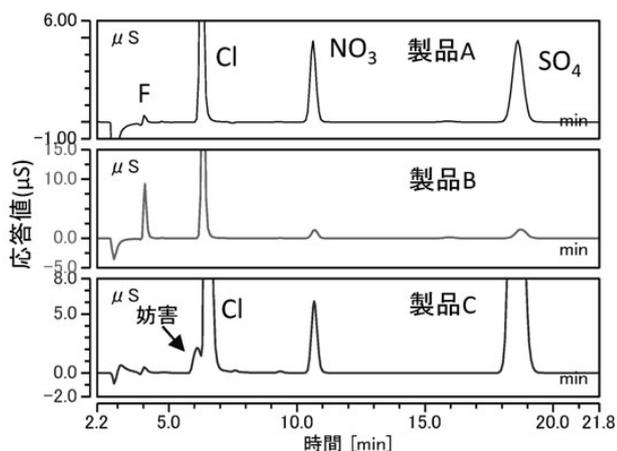


図4 炭酸MWの陰イオンクロマトグラム

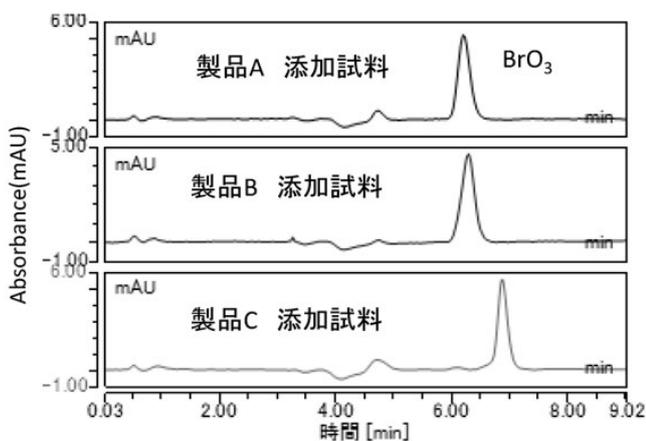


図5 炭酸MW添加試料のBrO₃イオンクロマトグラム

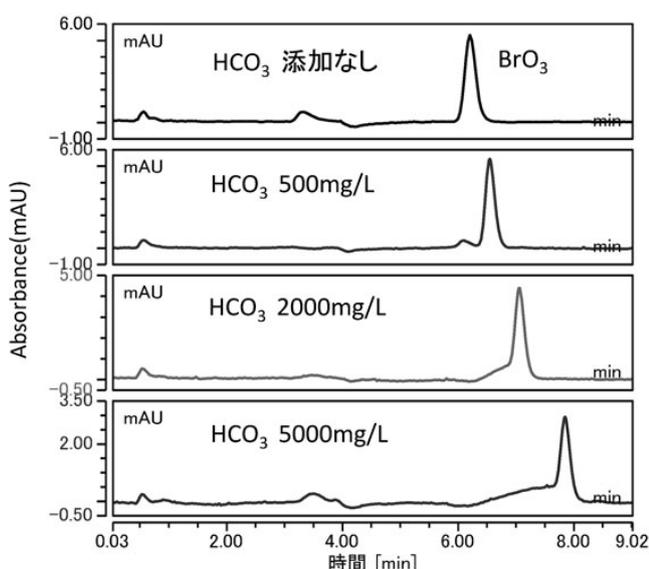


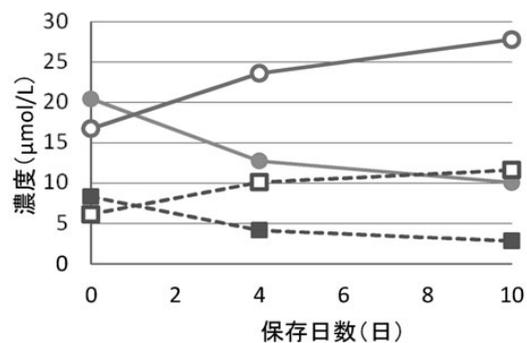
図6 炭酸水素イオンの量によるBrO₃ピークへの影響
BrO₃標準液 (10 μg/L) のクロマトグラム

3. 炭酸MWの分析

(1) 陰イオン類 (基準項目F, NO₂, NO₃, ClO₂及びClO₃)

実試料の成分規格検査に適用可能か確認するため、炭酸MW (製品A, B及びC) を用いて測定を行った。クロマトグラムを図4に示した。製品A及びBについては妨害ピークもなく、試験溶液で検出されたF及びNO₃のピークは標準溶液の保持時間と一致した。製品Cでも検出されたピークは標準溶液と保持時間がほぼ一致したが、Cl (基準外) のピークに妨害ピークが重なった。製品Cの成分表示を確認したところ、重炭酸 (炭酸水素) イオン (以下、HCO₃) の含有量が1770mg/Lと多いものであった。そこで炭酸水素ナトリウム溶液を希釈して測定したところ、同じ保持時間にピークが検出された。また、製品Cは減圧脱気後の試験溶液に白い沈殿を生じた。この製品は成分表示に記載された硬度が1310mg/Lで、硬度の高いものであった。そこで脱気後、生じた沈殿を定量ろ紙5Cでろ過して除去したものを水道法告示法に準じて滴定法で硬度を測定した。その結果、硬度は元の水より減少していた。このことから沈殿は試料中の炭酸塩硬度⁸⁾が原因と考えられ、減圧により炭酸ガスが除去された

A: 9成分混合



B: NO₂+ClO₂混合

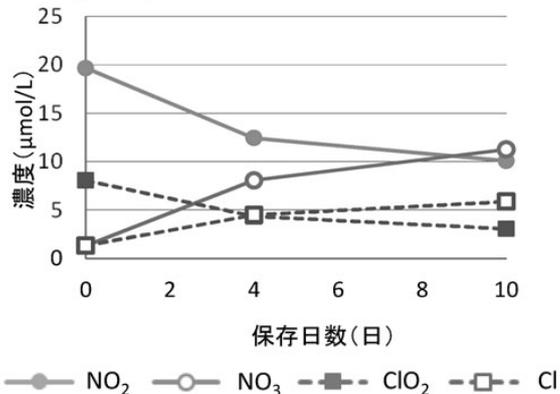


図7 炭酸超純水添加試料中での陰イオン類の濃度変化
A: 炭酸超純水に陰イオン類9成分を混合して添加
B: 炭酸超純水にNO₂及びClO₂を混合して添加

ため、水中に含まれる水溶性の炭酸水素カルシウムや炭酸水素マグネシウムが不溶性の塩（炭酸カルシウム、水酸化マグネシウム）となり析出したと推察された。この沈殿はイオンクロマトグラフ用の孔径 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターで目詰まりせずに除去できた。

(2) BrO_3

BrO_3 については製品A、B及びCは BrO_3 を含有しないため、添加試料を調製して測定を行った。クロマトグラムを図5に示した。製品A及びBの添加試料は標準液と試験溶液の保持時間が一致したが、製品Cでは標準液に比べ、保持時間が遅くなった。この現象についても HCO_3 が原因と考えられたため、 BrO_3 標準液に HCO_3 濃度として0~5000mg/Lとなるように炭酸水素ナトリウム溶液を段階的に加えて測定したところ、図6のように HCO_3 の濃度が高くなるにつれて BrO_3 の保持時間が遅くなった。

HCO_3 が非常に高濃度の試料では脱気処理により気体で存在する炭酸ガスは十分に除去できたが、除去できなかった HCO_3 の影響が溶出時間が近傍となるCl及び BrO_3 のピークに顕著に生じた。なお、製品Cは殺菌・除菌無の製品であるため、MWの成分規格では BrO_3 は基準外の項目であった。殺菌・除菌有で、 HCO_3 が非常に高濃度に含有するMWを検査する場合には前処理法、カラムの種類を変更するなどより良い分析条件が必要と考えられる。

4. 炭酸入り試料中での陰イオン類の安定性

炭酸超純水に添加した試料を10日間保存した場合の陰イオン類の濃度変化をモル濃度に換算して図7に示した。陰イオン類9成分を炭酸超純水に添加した場合、図7-Aに示したように、保存期間が長くなるにつれて NO_2 及び ClO_2 の濃度は減少し、 NO_3 及びClの濃度が明らかに増加した。その他の5成分については顕著な濃度変化はみられなかった。無炭酸の超純水に添加した場合にはすべての成分で保存期間中に顕著な濃度変化はなかった。

炭酸超純水に NO_2 、 ClO_2 または ClO_3 を単一成分で添加した場合には保存期間中の濃度変化は生じなかった。3成分の標準液を組合せて添加した場合（ NO_2+ClO_2 、 NO_2+ClO_3 及び $\text{ClO}_2+\text{ClO}_3$ ）は NO_2 及び ClO_2 が共存した場合（ NO_2+ClO_2 ）に9成分を混合して添加した場合と同様に、保存期間が長くなるにつれて NO_2 及び ClO_2 の濃度は減少し、 NO_3 及びClの濃度が増加した。 NO_2+ClO_2 の結果を図7-Bに示した。この濃度変化は NO_2 の減少量が NO_3 の増加量と、 ClO_2 の減少量がClの増加量とほぼ一致し、炭酸存在下では NO_2 が NO_3 に、 ClO_2 がClに変化したと推察された。

MWは水道水とは異なり、製品として容器詰めされたのち、販売まである程度長期間保存される。炭酸MW中では含有する成分によっては保存期間中に濃度変化が生

じる場合があることが明らかとなった。また、今回の添加回収試験の結果では NO_2 及び ClO_2 の添加回収率（真度）は他の項目に比べ低い傾向がみられた（表1）。この2成分について妥当性確認を実施するときは、混合せずに別々に添加するとより良好な結果が得られると考えられた。

まとめ

(1) 炭酸MWの陰イオン類及び BrO_3 の分析において、前処理として減圧脱気処理を30分間行うことで、試料中の炭酸ガスを除去することができた。

(2) 上記の方法を用いて陰イオン類9成分及び BrO_3 について添加回収試験を行ったところ、すべての項目で真度、精度とも妥当性確認ガイドラインの目標値を満たし、良好な結果となった。

(3) 実試料の成分規格検査に適用可能か確認するため、3種類の炭酸MWを用いて分析を行った。陰イオン類の基準項目F、 NO_2 、 NO_3 、 ClO_2 及び ClO_3 についてはいずれも適用可能であった。 BrO_3 については製品A及びBでは適用可能であったが、 HCO_3 を高濃度に含有する製品Cでは BrO_3 の保持時間が標準溶液に比べ遅くなった。

(4) 炭酸超純水に NO_2 及び ClO_2 を同時に添加した場合には、保存中にこの2成分の濃度は減少し、 NO_3 及びClが増加した。妥当性確認を実施するときは注意を要する。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について、食安発1222第1号、平成26年12月22日
- 2) インライン脱気デバイスCRDを用いたミネラル炭酸水中の陰イオン分析、Application Note IC14004、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社（2014）
- 3) 福田優作、片岡洋平、佐野勇氣、滝澤和宏、渡邊敬浩、手島玲子：ミネラルウォーター類中のシアンおよび臭素酸を対象とした分析法の開発と適用性の検証、食衛誌、56(6)、256-262（2015）
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：清涼飲料水等の規格基準の一部改正に係る試験法について、食安発1222第4号、平成26年12月22日
- 5) 上村仁、仲野富美、佐藤学、西以和貴、辻清美：炭酸入りミネラルウォーターの成分規格試験法の検討－揮発性有機化合物－、神奈川衛研報告、47、32-35（2017）
- 6) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法、厚生労働省告示第261号、平成15年

7月22日

- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドラインについて，食安発1222第8号，平成26年12月22

日

- 8) 上水試験法2011年版 II 理化学編，pp.113，日本水道協会，東京（2011）

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28年度）

古川一郎, 政岡智佳, 中嶋直樹, 黒木俊郎

Occurrence of enterohemorrhagic
Escherichia coli in Kanagawa Prefecture
 (April,2016-March,2017)

Ichiro FURUKAWA, Tomoka Masaoka,
 Naoki NAKAJIMA 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直ち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遺伝子解析を実施し, 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. 感染研では, 2014年度から遺伝子解析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, 神奈川県域(横浜市, 川崎市, 横須賀市および相模原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)を併せて実施している. 本報では, 平成28年度に収集したヒトおよび集団食中毒事例の原因食品から分離されたEHEC 120株の遺伝子解析および薬剤感受性試験の結果について報告する.

EHEC 120株のうち, ヒト由来株はO157(VT2)の集団食中毒事例で分離された61株を含む116株であり, この他集団食中毒事例の原因食品から4株が分離された. 116株のうち89株は, 県域の医療機関等で分離され, 27株は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

表1 EHEC 116株の血清型およびVero毒素型(平成28年度)

施設	菌株数	O157		O26	O111		O121	O103	O91	OUT
		VT1&2	VT2	VT1	VT1&2	VT1	VT2	VT1	VT1&2	VT2
平塚保健福祉事務所	38	6	30		1	1				
同上 秦野センター	15	1	11	3						
茅ヶ崎保健福祉事務所	10	4	3	3						
厚木保健福祉事務所	7	1	2	4						
同上 大和センター	1						1			
小田原保健福祉事務所	11	1	5					4		1
鎌倉保健福祉事務所	4	1	3							
同上 三崎センター	3						3			
藤沢市保健所	27	7	15	4					1	
計(割合)	116	21 (18.1%)	69 (59.5%)	14 (12.1%)	1 (0.9%)	1 (0.9%)	4 (3.4%)	4 (3.4%)	1 (0.9%)	1 (0.9%)

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	4	8	12
6-10	8	5	13
11-20	15	13	28
21-30	7	6	13
31-40	2	9	11
41-50	6	9	15
51-60	4	3	7
61-70	4	5	9
>70	3	5	8
計	53	63	116

分離された。表1には管轄施設別の搬入菌株数、EHECの血清型、毒素型および分離株数を示した。ヒト由来の116株の血清型およびVT型は、O157(VT1&2) 21株、O157(VT2) 69株、O26(VT1) 14株、O111(VT1&2) 1株、O111(VT1) 1株、O121(VT2) 4株、O103(VT1) 4株、O91(VT1&2) 1株、O型別不能(以下、UTと略す)(VT2) 1株であった。

EHECが分離された患者および保菌者の性別と年齢構成は、男性が53名、年齢範囲1～79歳で平均29.1歳、女性が63名、年齢範囲1～84歳で平均32.0歳であった(表2)。

PFGEは、制限酵素Xba Iを使用し、6V/cm、パルスタイム2.2～54.2秒、12℃の条件下で19時間行われた。泳動パターンについてBioNumerics (Applied Maths社)を用いてクラスター解析し、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、PFGEパターンが一致した場合あるいは家族内感染等の疫学的関連が認められた場合は1つの事例として図中に示した(図1、図2、図3)。また、IS法の結果をパターンごとに記号で表記した。

O157(VT1&2)の遺伝子解析の結果、感染事例1～4において、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。事例2および3は、PFGEの遺伝子パターンは異なるものの類似度は95%以上と高く、IS法のパターンも一致しており疫学的な関連が疑われたが、事例2は家族内感染であり、共通食品の喫食等、事

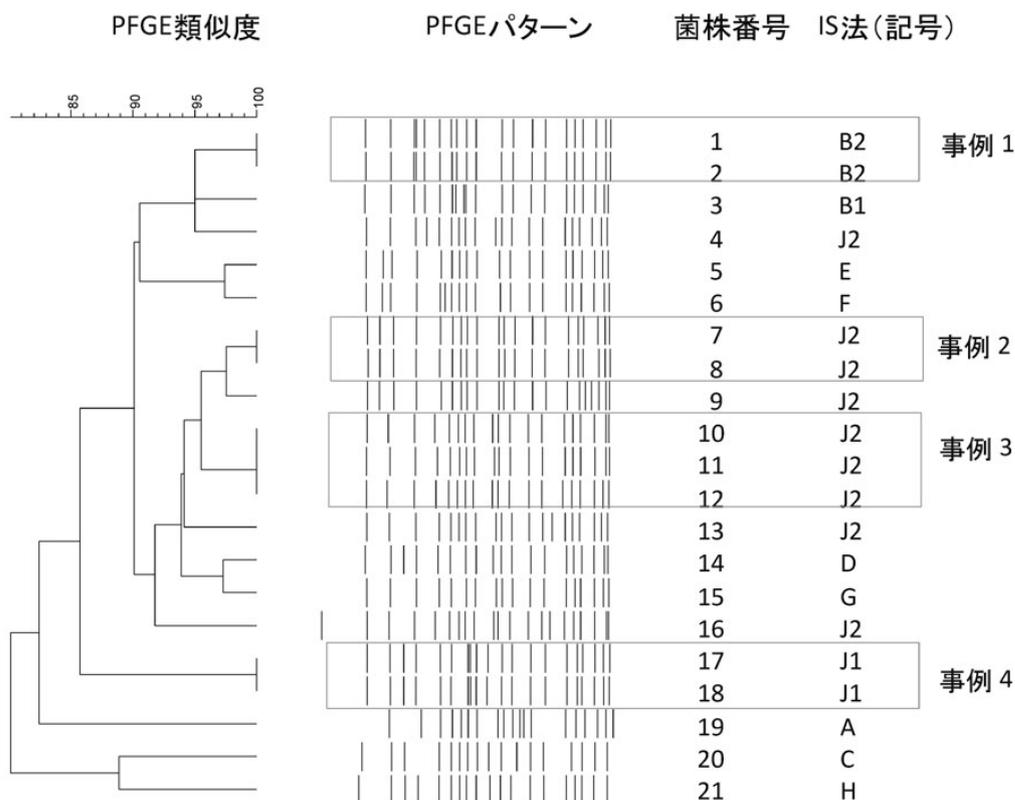


図1 EHEC O157 (VT1&2) の遺伝子解析結果

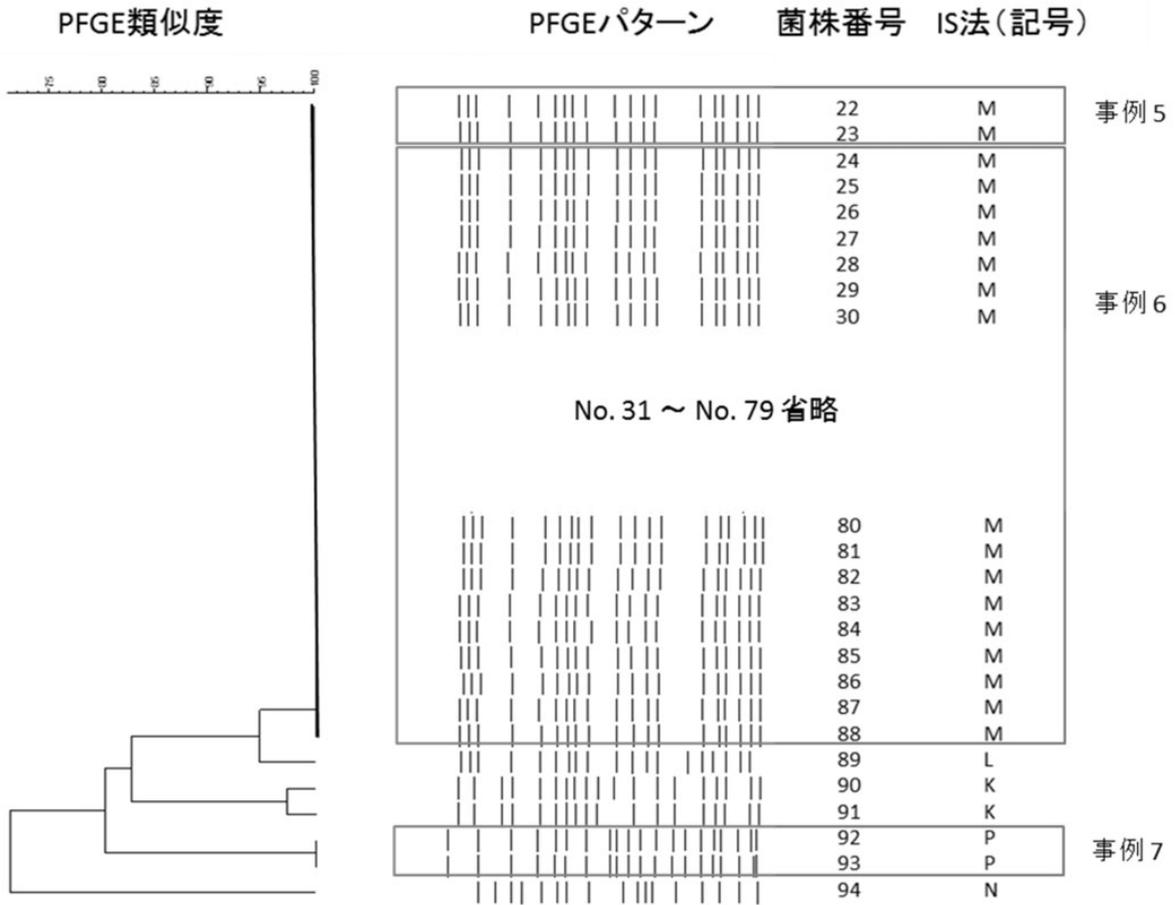


図2 EHEC O157 (VT2) の遺伝子解析結果

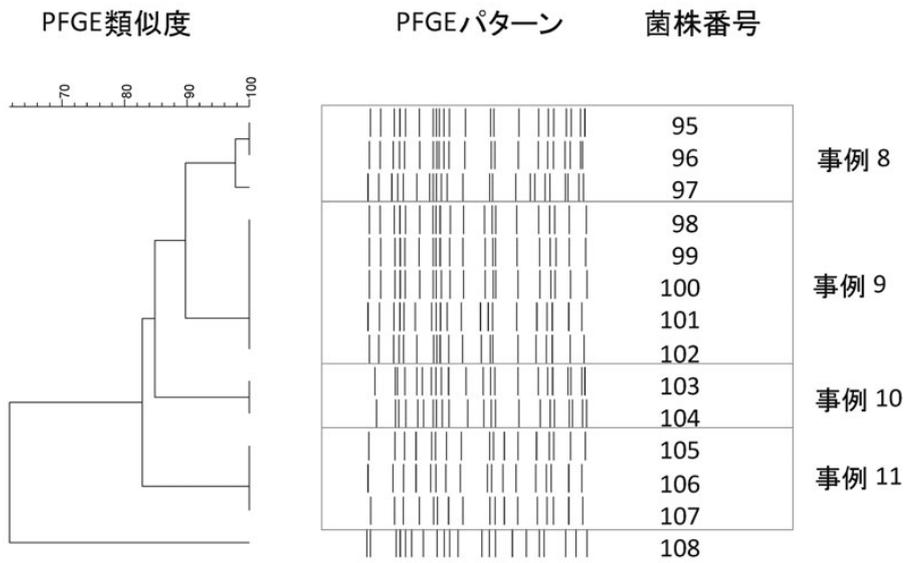


図3 EHEC O26 (VT1) の遺伝子解析結果

例3との直接的な関連は認められなかった。さらに散发事例の菌株No.4, 8, 12, 13およびNo.16のPFGEパターンは、90%以上の類似性が認められたもののバンド数1～3本分が異なっていたが、IS法の遺伝子パターンは一致していた(図1)。IS法は、1日以内に結果が得られるなど迅速性に優れており、スクリーニング法として有効であるが、より識別能力に優れたPFGEあるいはMLVAによる解析の必要性が改めて示された。MLVAについては年度内の導入に向けて検討中である。

O157(VT2)の遺伝子解析の結果、集団食中毒事例である事例6について、患者およびその家族等から分離された61株、原因食品と同一ロットの食品から分離された3株、原因食品と同じ施設で製造された別製品から分離された1株、計65株のPFGEおよびIS法のパターンはすべて一致していた。事例5の菌株No.22と23は、事例6で分離された菌株と同一のPFGEおよびIS法パターンを示したが、国立感染症研究所においてMLVAにより解析した結果、これら2つの事例の分離菌株は互いに異なる遺伝子パターンであることが確認された。事例7の菌株No.92と93のPFGEおよびIS法の遺伝子パターンは一致していたが、共通食品の喫食等、疫学的な関連は認められなかった(図2)。

O26(VT1)の事例8、事例9および事例11はいずれも家族内事例であったが、事例9には2つの家族が含まれているものの、共通食品の喫食等、家族間の疫学的な関連は認められなかった。事例10の菌株No.103と104は、他の自治体における集団事例の患者および接触者から分離された(図3)。

次に、EHEC 116株について、アミノベンジルペニシリン(ABPC)、セフォタキシム(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、試験の結果は薬剤ごとの阻止円の基準に従い、耐性、中間、感受性に分けて判定した(表3)。その結果、集団食中毒事

例の分離株を含む105株は、供試した11薬剤すべてに感受性であった。その他の11株はいずれかの薬剤に耐性を示したが、すべて散发事例由来であった。O111(VT1&2)の1株は、ABPC, CP, GM, KM, NA, SM, ST, TCの8剤に耐性を示し、O26(VT1)の1株は4剤耐性、O157(VT2)の2株は3剤耐性、O157(VT1&2)の1株およびO121(VT2)の1株が2剤耐性であった。OUT(VT2)の1株およびO157(VT1&2)の1株は単剤耐性、3株はそれぞれ単剤で中間を示した。

平成28年度に解析したEHECの菌株数は、O157(VT2)による集団食中毒事例が発生したことにより、平成27年度の57株から大幅に増加した。今回の集団食中毒事例では、早期に原因食品が特定されたことにより、マスコミを通じた県民への情報提供や食品の回収等感染拡大の防止が図られた。本事例では遺伝子解析の結果が一致した時点で県生活衛生課に情報を集約し、その結果は迅速に各保健福祉事務所に連絡された。さらに、患者が県域以外の周辺地域にも見られたため、周辺の自治体とも情報を共有し、迅速に原因菌の分布状況が把握できた。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(食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究)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、生活衛生課、健康危機管理課ならびに藤沢市保健所の方々に深謝いたします。

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

感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス
 検出状況 (平成28年度)

鈴木理恵子, 高橋淳子, 近藤真規子, 黒木俊郎

Surveillance of viral gastroenteritis
 in Kanagawa Prefecture
 (April, 2016 – March, 2017)

Rieko SUZUKI, Junko TAKAHASI,
 Makiko KONDO, 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、横須賀市、相模原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および学校、施設等で発生した集団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28年4月から平成29年3月に感染性胃腸炎と診断された患者便80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、サポウイルス、アストロウイルスはRT-PCRを用い、アデノウイルス、A群ロタウイルスおよびC群ロタウイルスはこれらを同時に検出するマルチプレックスRT-PCR¹⁾により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、ダイレクトシーケンシング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。80検体中39検体から43株の原因ウイルスが検出され、その内訳は、ノロウイルス30株(69.8%)、A群ロタウイルス7株(16.3%)、アデノウイルス5株(11.6%)、サポウイルス1株(2.3%)で、アストロウイルスおよびC群ロタウイルスは検出されなかった。ノロウイルスは13歳～22歳を除くすべての年齢層、A群ロタウイルスは6歳以下と7歳～12歳から、サポウイルスとアデノウイルスは6歳以下から検出された。また、複数ウイルスが検出された

表1 年齢別ウイルス検出状況 (平成28年4月～平成29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
			G I ¹⁾	G II ²⁾						
6歳以下	50	26 ³⁻⁵⁾	1	18	1	0	5	5	0	30
7歳～12歳	10	8	3	3	0	0	0	2	0	8
13歳～22歳	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23歳～64歳	13	3	0	3	0	0	0	0	0	3
65歳以上	3	2	2	0	0	0	0	0	0	2
合計	80	39	30 (69.8)		1 (2.3)	0	5 (11.6)	7 (16.3)	0	43 (100)

1 : genogroup I
 2 : genogroup II
 3 : 複数ウイルス検出 1例 (ノロウイルスG I, ノロウイルスG II)
 4 : 複数ウイルス検出 1例 (ノロウイルスG II, アデノウイルス)
 5 : 複数ウイルス検出 2例 (ノロウイルスG II, A群ロタウイルス)

表2 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	
	G I ¹⁾	G II ²⁾						
平成28年 4月	0	1	0	0	0	2	0	3
5月	0	0	0	0	0	0	0	0
6月	5	2	1	0	1	0	0	9
7月	0	0	0	0	0	0	0	0
8月	0	0	0	0	0	0	0	0
9月	0	2	0	0	0	0	0	2
10月	0	1	0	0	1	0	0	2
11月	0	8 ³⁾	0	0	1	1 ³⁾	0	10
12月	1 ³⁾	6 ³⁾	0	0	2 ³⁾	1	0	10
平成29年 1月	0	2	0	0	0	0	0	2
2月	0	0	0	0	0	1	0	1
3月	0	2 ³⁾	0	0	0	2 ³⁾	0	4
小計	6	24						
合計	30		1	0	5	7	0	43

1 : genogroup I

2 : genogroup II

3 : 複数ウイルス検出例を含む

表3 ノロウイルス遺伝子型別状況

年 月	型別実施数	遺伝子型				
		GI.4	GII.2	GII.4	GII.5	GII.6
平成28年 4月	1			1		
5月						
6月	7	5			1	1
7月						
8月						
9月	2		2			
10月	1			1		
11月	8		7		1	
12月	7	1	6			
平成29年 1月	2		2			
2月						
3月	2		2			
合計	30	6	19	2	2	1

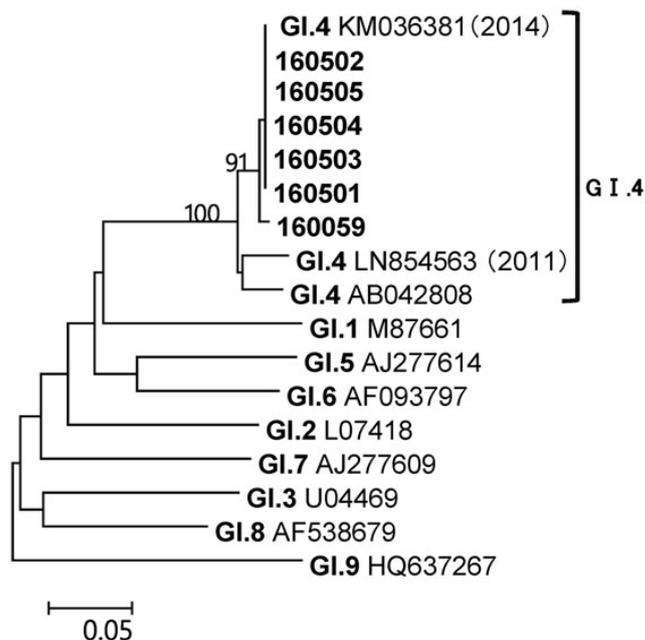


図1 ノロウイルスG I capsid領域の系統樹 (294bp)

4 検体はいずれも6歳以下からの検体で、検出ウイルスはノロウイルスgenogroup (以下、G) IとG II、ノロウイルスG IIとアデノウイルスが1例ずつと、ノロウイルスG IIとA群ロタウイルスが2例であった。G IとG IIの同時検出は、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ことが知られているが、今回の患者は8か月の乳児であり、ノロウイルスに汚染された貝

類等に起因する感染とは想定しにくく、人または環境から複数のウイルスに感染したと思われる。

月別のウイルス検出状況を表2に示した。43株のウイルスの多くは秋期から冬期にかけて検出され、5月、7月、8月には検出されなかった。平成28年度に検出されたノロウイルス30株のgenogroupはG I 6株、G II 24株であり、これらのcapsid領域の遺伝子型を系統樹解

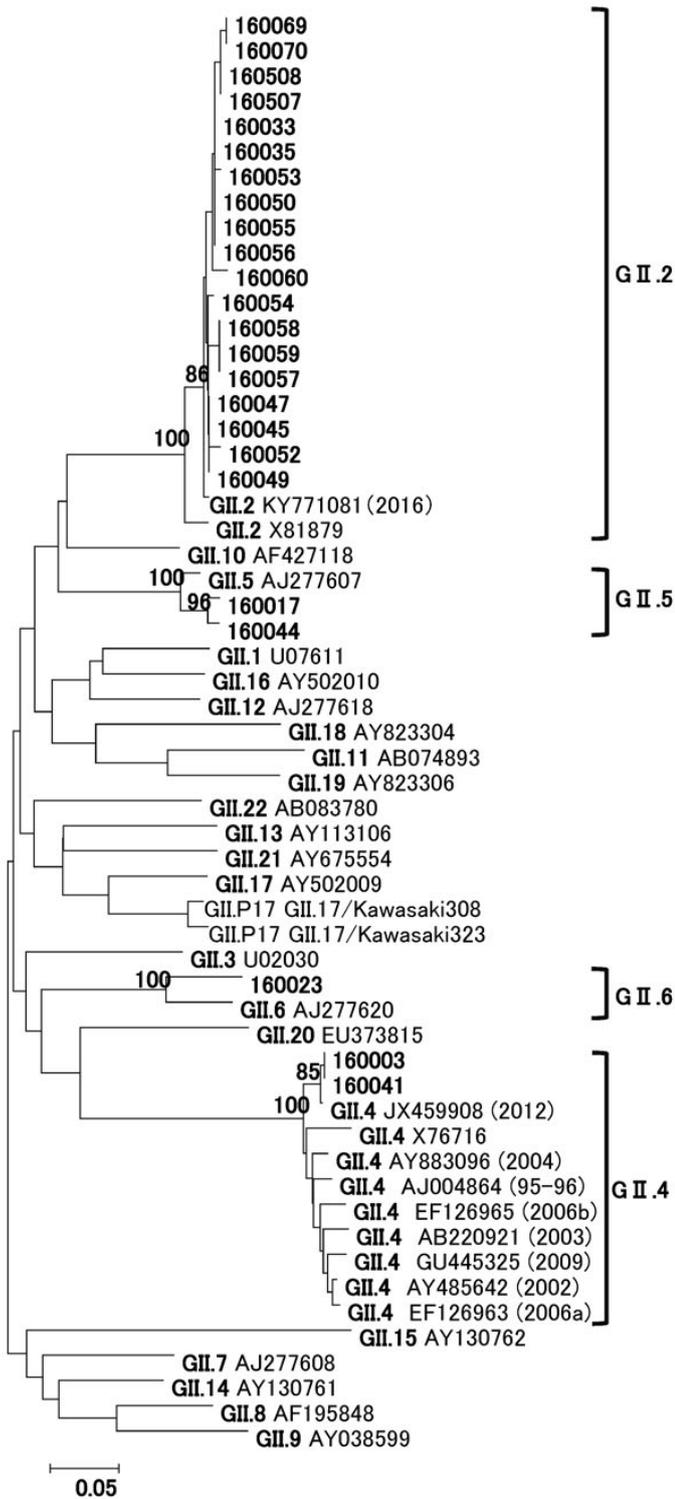


図2 ノロウイルスGII capsid領域の系統樹 (275bp)

析により決定した(図1, 2, 表3). ノロウイルスG Iの遺伝子型はG I.1からG I.9の9種類, G IIの遺伝子型はG II.1からG II.22の22種類に分類される. 遺伝子型別の結果, G Iの6株すべてがG I.4, G IIの24株の内19株がG II.2, G II.4が2株, G II.5が2株, G II.6が1株であった.

G I.4の6株は, G I.4標準株(AB042808)や2011年に報告された株(LN854563)とは系統が異なり, 2014年に報告された株(KM036381)と同じクラスターを形成していた. 近年のG Iの検出頻度は低く, 大きな流行がみられていないが, 6月にG I.4が5株検出されたことから神奈川県では小規模な流行があったと思われる.

G II.2の19株は, G II.2標準株(X81879)とは系統が異なり, 2016年に報告された株(KY771081)と同じクラスターを形成していた. G II.2は, 平成28年9月, 11月, 12月, 平成29年1月, 3月と秋期から冬期に検出され, 平成28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, 平成27年度はG II.17変異型, 平成28年度はG II.2変異型に入れ替わっている. G II.17変異型は, 平成26年度の流行期終盤にすでに確認²⁾されており, 平成27年度の本格的流行が始まる前に, 予防対策の重要性が周知されたことで大流行には至らなかった. しかし, G II.2変異型の出現は, ノロウイルス流行期に入ってから検出されたため, 予防対策等の周知が遅れ, 平成24年度のG II.4変異型の大流行時と同様の規模となったと考えられる(図3). 変異型の出現は, ノロウイルスによる感染性胃腸炎大流行の可能性が高まることから, 流行初期の遺伝子型については迅速に解析し, その情報を周知することが重要である.

アデノウイルスは, 平成28年6月, 10月, 11月に1株ずつ, 12月に2株計5株が検出され, 遺伝子型は全て41型であった.

A群ロタウイルスは, 平成28年4月, 平成29年3月に2株ずつ, 平成28年11月, 12月, 平成29年2月に1株ずつ計7株が検出され, 遺伝子型はG2P[4]型, G3P[8]型が3株ずつ, G12P[8]型が1株であった.

今回, アデノウイルス, A群ロタウイルスおよびC群ロタウイルスを同時に検出できるマルチプレックスRT-PCRを用い検出を行った. 昨年まで実施していたウイルスごとのRT-PCRとの感度を比較したところ両方法とも同等の結果が得られた. 今後も, 効率的でコストの削減が可能なマルチプレックスRT-PCRによるウイルス検索を行っていきたい.

我々は, 平成23年度以降, 検出数の多かったウイルスについて系統樹解析(NJ法)による型別を実施し, 流行

報告数

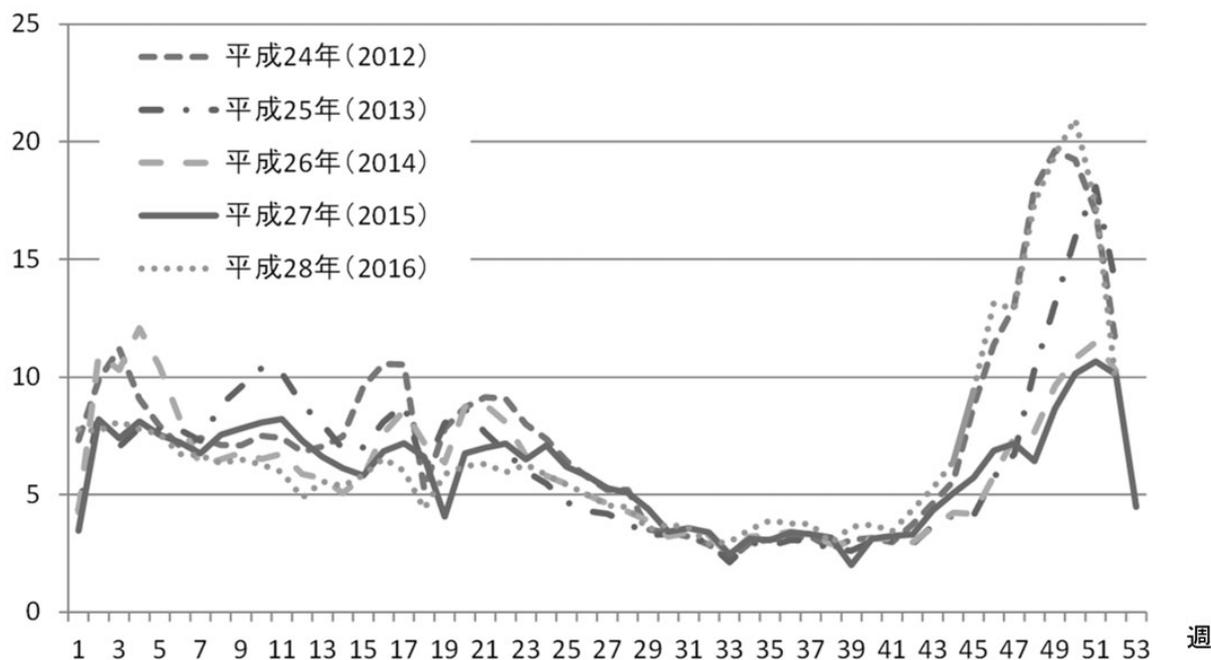


図3 感染性胃腸炎患者定点あたりの報告数（全国）

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り、解析により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ずることが可能となる。感染症の流行を未然に防ぐために、今後も継続して遺伝子解析を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。

文献

- 1) Development of RT-multiplex PCR Assay for Detection of Adenovirus and Group A and C Rotaviruses in Diarrheal fecal Specimens from Children in China, 感染症学雑誌 78(8),699-709 (2004)
- 2) 松島勇紀, 石川真理子, 清水知美, 駒根綾子, 清水英明, 松尾千秋ほか: 新規遺伝子型ノロウイルスG II.P17-G II.17の流行, 病原体検出情報(IASR), 36, 175-178 (2015)

資料

神奈川県域におけるインフルエンザの 流行状況 (2016/2017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(2016/2017 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。2016/2017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46週(11/14~20)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, 緩やかに増加していき, 2017年2週(1/9~15)に注意報レベルの10.0人を, 3週(1/16~22)に警報レベルの30.0人を超え, 4週(1/23~29)にピーク(50.71人)を迎えた。その後患者報告数は減少に転じ, 10週(3/6~12)には8.98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。本シーズンは, 2016年46週に流行期に入っており, AH1pdm09によるパンデミックの2009/2010シーズンを除くと, 2007/2008シーズン以来の早い流行期入りとなった。また, 2017年13週(3/27~4/2)の患者報告数は5.82人で流行は継続状態であり, 終息時

期は例年と同様に4月末(17週)以降になると考えられる。したがって, 本シーズンの流行期間は昨シーズンの17週間(2016年1~17週)よりも長くなった(図1)。

ウイルス調査は, 2016年36週(9/5~11)~2017年13週の間(9/5~11)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(県域保健所管内の初発事例)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469例, 入院サーベイランスの検体は4例, 集団かぜの検体は10集団40例, 計513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ビクトリア系統, B山形系統の型別を行った。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。2016年37週(9/12~18)に定点医療機関の検体からAH3が検出され, 翌38週(9/19~25)には県域初発の集団かぜ検体からもAH3が検出された。その後も毎週AH3の検出が続き, 本シーズンはAH3を中心とした流行になった。また, 2月以降になるとB型の検出割合が増加した。検出されたインフルエンザウイルスは470例で, その内訳は, AH3が410例(87%)で最も多く, Bビクトリア系統が41例(9%), B山形系統が14例(3%), AH1pdm09が5例(1%)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340例で, AH3が285株, Bビクトリア系統が39株, B山形系統が11株, AH1pdm09が5株であった。

集団かぜ調査においては, 9月から12月の間に県域10保健所管内のうち9か所で初発の発生報告があり, 1月に発生した1集団も含めて9集団からAH3が検出された(1集団は不検出であった)。なお, 本シーズン中に鳥インフルエンザ感染疑い症例の検査依頼は無かった。

インフルエンザウイルス検出者(470例)の年齢構成は, 5~9歳と10~14歳が最も多く24%ずつ, 次いで0~4歳が10%となっており, 14歳以下が58%を占めた。他の年齢群は3~9%であった(図3)。

入院症例4例の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, 3例からAH3が検出され, 1例は不検出であった。それぞれの検体採取時期は, 1~3例目が流行のピーク時期と一致する2017年2~

3週、4例目が13週であった。入院患者の年齢構成は、1～3例目が成人（65～90歳）、4例目が小児（2歳）であった。（表1）

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所職員の皆様に深謝いたします。

最後になりましたが、検体採取および患者情報の収集

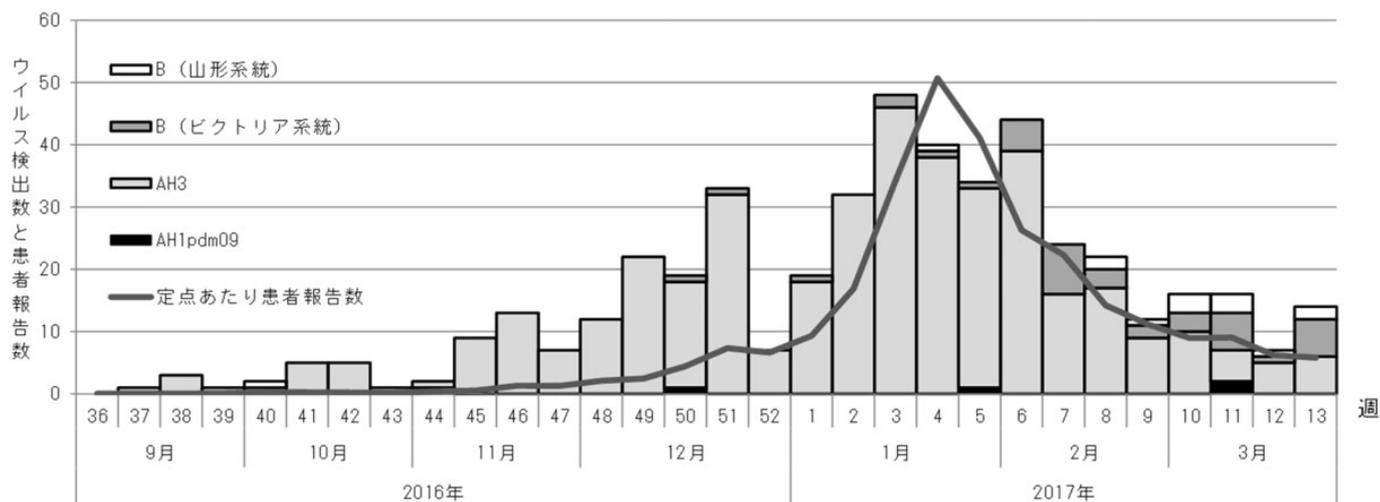


図1 インフルエンザウイルス検出数と患者報告数の推移

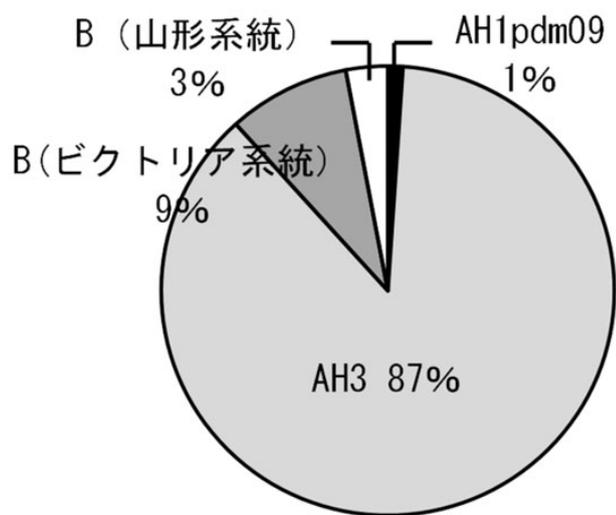


図2 インフルエンザウイルス検出割合

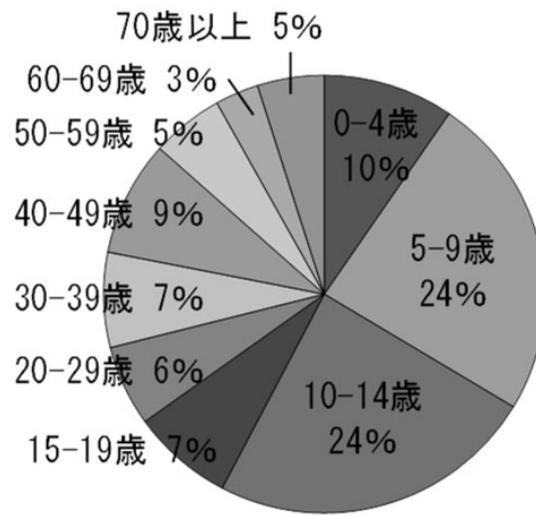


図3 インフルエンザウイルス検出者の年齢構成

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	2017年2週	80歳	発熱（37.7℃）、上気道炎、下気道炎（肺炎）、意識障害、腎機能障害、横紋筋融解症	AH3
2	2週	90歳	発熱（38.6℃）	AH3
3	3週	65歳	発熱（39.3℃）、関節痛、筋肉痛、横紋筋融解症	AH3
4	13週	2歳	発熱（39.8℃）、上気道炎	不検出

資料

NaI(Tl)シンチレーションカウンタ による食品中の放射性セシウム測定

桑原千雅子, 飯島育代

Determination of Radiocesium in foods using a NaI(Tl) scintillation counter

Chikako KUWAHARA, Ikuyo IJIMA

東京電力(株)福島第一原子力発電所(以下、福島原発)事故直後、神奈川県衛生研究所(以下、当所)では、多くの試料の放射能測定が依頼されたが、当時の人員や2台のゲルマニウム半導体検出器付きガンマ線スペクトロメータ(以下、Ge検出器)では、全ての依頼に対応することは不可能であった。

神奈川県内には2つの原子力関連施設と原子力艦船が300日近く寄港する米海軍基地がある。これらの施設等で不測な事故等が発生した際には、福島原発事故を上回る数の試料を測定する必要性が予想される。そこで、当所ではRI(Radio Isotope:放射性同位元素)実験室に、高濃度のガンマ線放射性核種を測定するために整備されていたオートサンプラー付きNaI(Tl)シンチレーションカウンタ(以下、NaI(Tl)検出器)の更新機器として、厚生労働省「食品中の放射性セシウムスクリーニング法の一部改正について」¹⁾に準拠し、食品の一次スクリーニング法に利用可能なオートサンプラー付きNaI(Tl)検出器を2016年に整備した。このNaI(Tl)検出器は、NaI(Tl)の結晶が従来の1.3インチから3インチに大きくなり、試料測定用容器の容量も7mlミニバイアルのみから20mlバイアルまで対応可能となり、検出感度を高めたものである。また、多数試料の自動測定が可能であるとともに、得られたデータを測定器メーカーから提供された専用ソフトウェアに適用するだけで¹³⁴Cs、¹³⁷Csおよび放射性セシウムの濃度を求めることができる。

今回、このNaI(Tl)検出器とGe検出器で食品の放射性セシウムを測定し、比較検討したので報告する。

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
chika_kuwahara.u79v@pref.kanagawa.jp

試料は、2011年に当所で¹³⁴Csおよび¹³⁷Csを検出した牛肉2試料、玄米、玄米粉末各1試料とした。表1に試料搬入時におけるGe検出器の定量結果を示した。牛肉は、2011年に脂肪および筋等を除去し、可食部のみとした後、フードプロセッサで細切した。その一部を検査に使用し、残った大部分の試料を冷凍保管した。今回、その保管試料を流水中で解凍し、プラスチック容器(以下、U-8容器)には80g程度、専用の20mlバイアル(テフロンコーティングポリエチレン製)には20mlの容量の線まで、均一になるよう充填した。玄米、玄米粉末は、そのままU-8容器と専用20mlバイアルに同様に充填した。

表1 試料搬入時に測定したGe半導体検出器による¹³⁴Csおよび¹³⁷Cs濃度

試料名	基準日 ^{*1}	Bq/kg ^{*2}			
		¹³⁴ Cs		¹³⁷ Cs	
牛肉(肩ロース)	2011/7/26	120	± 4.1	150	± 3.9
牛肉(牛友スネ)	2011/8/29	66	± 3.0	84	± 2.8
玄米	2015/1/1	17.9	± 0.517	58.6	± 0.805
玄米粉末	2016/4/1	21.0	± 0.672	102	± 1.12

*1 基準日:放射能濃度を算出するための一定の日

*2 基準日に補正した濃度

NaI(Tl)検出器(PerkinElmer社製2480WIZARD2ガンマカウンター)では、20分または60分測定した。PerkinElmer社製のZantei7換算表ソフトウェアを用い、Food screening改良(540-830keV)換算式により放射性セシウム濃度を、zantei7c換算式により¹³⁴Cs、¹³⁷Csおよび放射性セシウム濃度を求めた。Ge検出器(OXFORD社製CNVDS30-35195、CANBERRA社製GC3520)では、10,000秒あるいは80,000秒測定し、 γ 線核種分析を行った。

牛肉と玄米粉末は、NaI(Tl)検出器の測定日とほぼ同じ日にGe検出器で測定した。それぞれの定量値とその計数誤差を表2に示し、玄米は、試料搬入時に検出された濃度をNaI(Tl)検出器の測定日(2017/5/1)に補正した。牛肉は、2011年の検査時(表1)より5.4年経過したため、半減期が2.062年の¹³⁴Csは16%程度、半減期が30.174年の¹³⁷Csは88%程度に減少していた。これらは、理論値どおりに減衰しており、牛肉試料は冷凍保管中の変質や放射性物質の損失が無いことが分かった。NaI(Tl)検出器で20分測定した結果を表3aに、60分測定した結果を表3bに示した。試料は、3回あるいは4回繰り返し測定し、その平均値と標準偏差を表記した。濃度20Bq/kg以上では、zantei7cで求めた¹³⁴Cs、¹³⁷Csおよび放射性セシウム

表2 再測定等したGe半導体検出器による¹³⁴Cs、¹³⁷Csおよび放射性セシウムの濃度

試料名	基準日*1	Bq/kg*2					
		¹³⁴ Cs		¹³⁷ Cs		放射性セシウム	
牛肉（肩ロース）	2017/1/5	20.6	± 1.39	130	± 3.49	150	
牛肉（牛友スネ）	2017/1/12	11.3	± 0.400	72.4	± 0.842	84	
玄米*3	2017/5/1	8.21	± 0.236	55.6	± 0.763	64	
玄米粉末*3	2016/12/27	16.4	± 0.524	101	± 1.10	120	

*1 基準日:放射能濃度を算出するための一定の日

*2 基準日に補正した濃度

*3 再測定せず、試料搬入時に測定した定量値を基準日における放射能濃度に補正した

表3 NaI(Tl)検出器による¹³⁴Cs、¹³⁷Csおよび放射性セシウムの濃度

a. 20min測定

試料名	測定回数 n	供試料量 g	Bq/kg						
			¹³⁴ Cs *1		¹³⁷ Cs *1		放射性セシウム*1	Food screening改良放射性セシウム*2	
			mean	SD	mean	SD	mean	mean	SD
牛肉（肩ロース）	3	19.32	23	± 4.9	130	± 3.7	160	180	± 7.4
牛肉（牛友スネ）	4	21.05	2.4	± 4.5 (ND)*3	71	± 3.7	74	100	± 13
玄米	4	18.64	0.12	± 0.25 (ND)	60	± 5.6	60	85	± 6.9
玄米粉末	3	13.14	7.2	± 7.3 (ND)	110	± 8.1	110	150	± 5.9

b. 60min測定

試料名	測定回数 n	供試料量 g	Bq/kg						
			¹³⁴ Cs *1		¹³⁷ Cs *1		放射性セシウム*1	Food screening改良放射性セシウム*2	
			mean	SD	mean	SD	mean	mean	SD
牛肉（肩ロース）	3	19.32	22	± 3.5	130	± 8.6	160	180	± 6.7
牛肉（牛友スネ）	4	21.05	4.7	± 4.5 (ND)*3	67	± 2.4	72	100	± 1.8
玄米	4	18.64	1.1	± 2.2 (ND)	58	± 4.0	60	87	± 6.4
玄米粉末	3	13.14	15	± 11 (ND)	110	± 3.9	120	150	± 12

*1 zantei7cにより算出した¹³⁴Cs、¹³⁷Csおよび放射性セシウムの濃度

*2 Food screening改良により算出した放射性セシウム濃度

*3 ND: Not Detectable

濃度はGe検出器での定量値と非常に良く一致し、20分測定で十分な精度の定量値が得られることが確認できた。また、¹³⁴Csは、Ge検出器で16Bq/kg未満の試料（表2）では、検出限界値を下げるために測定時間を20分から60分に長くしても検出されることは無かった（表3 a, b）。このことから、緊急時におけるNaI(Tl)検出器による測

定時間は、20分が適当と考えた。放射性セシウム濃度が100Bq/kg以下では、NaI(Tl)検出器でzantei7cによる定量値は、Ge検出器よりいずれの試料も小さくなる傾向が認められた。zantei7cにより算出される定量値は、Ge検出器の定量値と非常に良く一致しているが、今回の調査では、100Bq/kg以下の食品で過小評価になる可能性が

示唆された。一方、Food screening改良により算出された放射性セシウム濃度は、どの試料においても、Ge検出器の定量値より高くなった。食品のスクリーニング調査としては、安全側に配慮し、こちらの方法を採用した方が良いと考えられた。

今回調査した食品は、種類、試料数および濃度範囲などで限定的ではあるが、Ge検出器とNaI(Tl)検出器による定量値は非常に良く一致していた。今回使用したNaI(Tl)検出器は、試料の自動交換が可能で、測定時間も短く、1日に多数の試料測定ができることから、緊急時調査には非常に有用であることが分かった。しかし、原子力関

連施設等の事故時の測定対象は、ウラン、トリウム系列の天然放射性核種等を多く含む土壌や重量の小さい大気浮遊じんといった環境試料が想定される。現在、Zantei7換算表はあくまでも食品試料にのみ適用とされているため、環境試料への適用の可否については、今後、さらに検討していく必要がある。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課：食品中の放射性セシウムスクリーニング法の一部改正について事務連絡（平成23年11月10日）

他誌掲載論文抄録

(平成28年4月～平成29年3月)

A case of consecutive infection with Zika virus and Chikungunya virus in Bora Bora, French Polynesia.

Kutsuna S, Kato Y, Nakayama E, Taniguchi S, Takasaki T, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N. *J Infect Chemother.* 23(2), 114-116 (2017) pii: S1341-321X(16)30142-8.

フランス領ポリネシアからのチクングニア熱輸入症例の患者は現地に居住していて帰国し、2015年1月に関節痛、発熱、筋肉痛をきたしチクングニア熱と診断された。詳しく聴取するとフランス領ポリネシアでジカウイルス病が流行していた1年前の1月にも比較的軽症のよく似た症状があったとのことで、血清学的に診断したところ、ジカウイルス特異的IgM抗体が判定保留（陰性領域）、ジカウイルス中和抗体陽性であり、ジカウイルスに感染していたことが確認された症例に関して報告した。

Utility of Japanese encephalitis virus subgenomic replicon-based single-round infectious particles as antigen tests for Zika virus and three other flaviviruses.

Atsushi Yamanaka, Meng Ling Moi, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Mami Matsuda, Ryosuke Suzuki, Eiji Konishi. *J Virol Methods.* 243, 164-171 (2017)

日本脳炎ウイルス遺伝子をもとに作製した、1回感染性レプリコンウイルスの構造遺伝子部分をジカウイルスのものに置き換えることで、抗ジカウイルス中和抗体試験が可能となり、生のジカウイルスを用いた中和抗体試験結果と一致することを報告した。1回感染性レプリコンウイルスは持続的に増殖することのないウイルスであり、より安全に中和抗体価を測定することが可能である。

Japanese encephalitis vaccine-facilitated dengue virus infection-enhancement antibody in adults.

Saito Y, Moi ML, Takeshita N, Lim CK, Shiba H, Hosono K, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. *BMC Infect Dis.* Oct 18, 16(1) 578 (2016)

日本脳炎ワクチン接種を受けた成人77人に関して、デングウイルスに対する交差抗体、交差防御能、感染増強

活性を評価した。その結果、デングウイルス交差反応性抗体は、Fcγレセプター発現BHK細胞を用いて評価したところ、40人は感染増強活性が接種前も接種後も認められなかった。37人に関して、デングウイルス1型に対しては18%（接種前6%）、2型に対しては21%（接種前3%）、3型に対しては31%（接種前14%）、4型に対しては34%（接種前13%）が、デングウイルス感染増強活性を示した。

Neutralizing and Enhancing Antibody Responses to Five Genotypes of Dengue virus type 1 (DENV-1) in DENV-1 Patients.

Yamanaka A, Moi ML, Takasaki T, Kurane I, Konishi E. *J Gen Virol.* 98(2) 166-172 (2017)

デングウイルスは1～4型の血清型に分類されるが、それぞれの血清型はさらに4から6の遺伝子型に分類される。デングワクチン開発において、遺伝子型が異なると防御効果が異なるのではないかという指摘が存在する。そこで我々はデングウイルス1型遺伝子I～IV型に感染した患者血清を用いて、デングウイルス1型I～V型ウイルスに対する中和抗体価を検討したところ遺伝子型が違っても中和活性に差はないことを確認した。

Development of a novel dengue virus serotype - specific multiplex real-time reverse transcription - polymerase chain reaction assay for blood screening.

Tezuka K, Kuramitsu M, Okuma K, Nojima K, Araki K, Shinohara N, Matsumoto C, Satake M, Takasaki T, Saijo M, Kurane I, Hamaguchi I. *Transfusion.* 56(12) 3094-3100 (2016)

デング熱が輸入症例に限られていれば、海外からの帰国後4週間の献血禁止などの対策で輸血・血液製剤へのデングウイルス紛れ込みリスクを下げるができるが、2014年のデング熱国内流行といった事態が発生すると献血血液、血液製剤のウイルススクリーニング検査が必要となる。ヒトの細胞成分を多く含んだ検査検体に対応し、高感度で検査効率のよいデングウイルス1～4型遺伝子を検出できるマルチプレックスリアルタイム逆転写PCR系を開発した。

Autochthonous chikungunya fever in traveler returning to Japan from Cuba.

Tsuboi M, Kutsuna S, Kato Y, Nakayama E, Shibasaki K-i, Tajima S, Takasaki T, Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N. *Emerg Infect Dis.* 22(9) 1683-1685 (2016)

チクングニアウイルス感染症は、2013年にカリブ海の島嶼国で流行が発生し、中南米や米国に拡大した。2016年2月にキューバを旅行し発熱、関節痛、発疹、結膜充血をきたし、国立国際医療研究センター病院を受診した患者が、チクングニア熱であると血清からウイルス遺伝子を検出し確定した。キューバでのチクングニア熱流行の情報はなかったが、本症例を通してキューバでもチクングニア熱が流行していることが明らかとなった。検出したウイルスを遺伝子解析するとコロンビア、プエルトリコ、ドミニカ共和国、ホンディラスの流行株と近似であった。

Knowledge Obtained from an Elderly Case of Japanese Encephalitis.

Itoh K, Iwamoto K, Satoh Y, Fujita T, Takahashi K, Katano H, Hasegawa H, Takasaki T, Tando S, Fushiki S. *Intern Med.* 55(17) 2487-90 (2016)

日本脳炎はワクチン接種プログラムにより年間の患者発生数は数例であり、高齢者の病気となっている。髄液からのウイルス検出は、発病初期のものでないと困難である。2013年8月に発症した72歳男性の症例については、脳生検組織からの日本脳炎ウイルス抗原および遺伝子検出により日本脳炎が確定した詳細を報告した。しかし、本症例の髄液、血清から抗日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体が陽性であったことから、日本脳炎の診断におけるIgM抗体検査の有用性が確認された。

Dengue Virus Isolation in Mosquito *Aedes albopictus* Captured During an Outbreak in Tokyo, 2014, by a Method Relying on Antibody-Dependent Enhancement Mechanism Using Fc γ R-Expressing BHK Cells.

Moi ML, Kobayashi D, Isawa H, Sasaki T, Saijo M, Kurane I, Sawabe K, Takasaki T. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 16(12): 810-812 (2016)

2014年の東京を中心としたデング熱流行時に、代々木公園などで採集した蚊からのデングウイルス分離を実施した。その際Fc γ レセプター発現BHK細胞（ベビーハムスター腎臓由来細胞）を用いて、デングウイルス感染増強活性を有する単クローン抗体を添加して分離を試みたところ、従来のヒトスジシマカ由来細胞やVero細胞を用

いて分離するよりもウイルス分離率が高かったことを報告した。

Bivalent vaccine platform based on Japanese encephalitis virus (JEV) elicits neutralizing antibodies against JEV and hepatitis C virus.

Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Tajima S, Takasaki T, Konishi E, Kato T, Kohara M, Takeyama H, Wakita T, Suzuki R. *Sci Rep.* 2016 Jun 27;6:28688.

doi: 10.1038/srep28688.

C型肝炎ウイルス（HCV）は、フラビウイルス科のウイルスでありワクチンの存在する日本脳炎ウイルスと構造上も類似である。日本脳炎ウイルスはRNA遺伝子を含まないサブウイルス粒子（SVP）を作ることができる。この技術を応用してC型肝炎の中和エピトープ3ヶ所を挿入し日本脳炎ウイルスSVPに発現させることに成功した。この技術を応用して日本脳炎とC型肝炎ウイルスに有効な単一のワクチン開発につながる可能性がある。

DGV: Dengue Genographic Viewer.

Yamashita A, Sakamoto T, Sekizuka T, Kato K, Takasaki T, Kuroda M. *Front Microbiol.* 2016 Jun 7;7:875. doi: 10.3389/fmicb.2016.00875. eCollection 2016.

国立感染症研究所で配列が決定されたデングウイルス遺伝子情報およびGenBankに登録された遺伝子情報を国立感染症研究所のデータベースに組み込んで、新しいデングウイルス遺伝子配列情報を入力することでそのウイルスの起源と過去から現在までどのように拡散・拡大してきたのかをビジュアル化できるソフトウェアを開発した。

Dengue Sentinel Traveler Surveillance: Monthly and Yearly Notification Trends among Japanese Travelers, 2006-2014.

Fukusumi M, Arashiro T, Arima Y, Matsui T, Shimada T, Kinoshita H, Arashiro A, Takasaki T, Sunagawa T, Oishi K. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Aug 19;10(8):e0004924.

日本における海外渡航でデング熱に感染した輸入症例の、渡航先、時期、渡航期間などを解析して、年単位あるいは月単位の、感染推定国・地域の情報をまとめた。このような解析は海外渡航者に渡航地別のデングウイルス感染リスクを提供でき、輸出元の国や地域に情報提供

することで、流行地にとっても重要な情報源となる。

Two different dengue virus strains in the Japanese epidemics of 2014.

Eri Nakayama, Akira Kotaki, Shigeru Tajima, Miki Kawada, Kuniharu Miura, Aki Gemma, Takuya Adach, Tsuyoshi Sekizuka, Kengo Kato, Akifumi Yamashita, Meng Ling Moi, Makiko Ikeda, Kazumi Yagasaki, Takumi Tomikawa, Kenichi Shibasaki, Yuka Saito, Masayuki Saijo, Makoto Kuroda, Tomohiko Takasaki. *Virus Genes*. 52, 722-726 (2016)

2014年の東京での Dengue 熱流行で患者から検出された Dengue ウイルスは 1 型であり、その遺伝子配列は構造遺伝子領域ではほぼ一致するもので、インドネシアあるいはシンガポールの流行株と近いウイルスであった。唯一、静岡県患者から分離されたウイルスが Dengue ウイルス 1 型ではあったが異なるウイルス株であった。当該患者に海外渡航歴はなく代々木公園はじめ東京の流行地域も訪れておらず、ウイルス遺伝子解析上は台湾あるいはタイの 2009 年の流行株に近かったことから静岡周辺で別の Dengue 熱小流行があったことが示唆された。

Novel antiviral activity of bromocriptine against dengue virus replication.

Kato F, Ishida Y, Oishi S, Fujii N, Watanabe S, Vasudevan SG, Tajima S, Takasaki T, Suzuki Y, Ichiyama K, Yamamoto N, Yoshii K, Takashima I, Kobayashi T, Miura T, Igarashi T, Hishiki T. *Antiviral Res*. 131: 141-7 (2016)

抗 Dengue ウイルス活性物質をスクリーニングする目的で作製したレプリコンシステムを用いて 1280 の薬剤化合物ライブラリーについて、抗 Dengue ウイルス活性を測定した。その結果ドパミン受容体刺激薬であるプロモクリプチンが、Dengue ウイルス複製の翻訳段階および RNA 複製段階を阻害する活性があることを見出した。

Possible Case of Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis in Traveler Returning to Japan from India.

Takajo I, Sekizuka T, Fujita H, Kawano A, Kawaguchi T, Matsuda M, Kubo K, Miyauchi S, Umekita K, Nagatomo Y, Kuroda M, Takasaki T, Okayama A, Ando S. *Emerg Infect Dis*. 2016 Jun;22(6): 1079-82.

インドからの帰国した紅斑熱と診断された 60 歳の女性

の症例を報告し、分離されたリケッチアの全遺伝子配列を決定し報告した。

話題の感染症と検査 (3) Dengue 熱.

モイ メンリン, 高崎智彦. *臨床病理*64(9) 1033-1043 (2016)

Dengue ウイルスのウイルス学的特徴, Dengue 熱の病態および重症化の機序, 臨床経過と検査所見, 実験室診断法について概説した。

ワクチンが有効な感染症 黄熱.

高崎智彦. *臨床と研究*. 93(12) 45-48 (1589-1592) 2016.

黄熱の疫学, 媒介蚊, 臨床症状, ワクチンとその副反応, 黄熱予防接種証明書および 2016 年のアンゴラ, コンゴ民主共和国の流行について概説した。

Dengue ウイルスはワクチンで防ぐことができるのか?

高崎智彦. *臨床とウイルス*. 44(5) 252-256 (2017)

Dengue ウイルスは、フラビウイルス属のウイルスである。Dengue ウイルスは 1943 年に長崎で初めて分離された。Dengue ワクチンの開発、実用化が遅れているのは Dengue ウイルスには 4 つの血清型が存在することによる。Dengue ウイルスそれぞれの型に対しては終生免疫であるが、異なる血清型には再感染する。そして再感染時に重症化することが多い。したがってワクチン接種により 4 つの血清型すべてに防御免疫を誘導する必要がある。また、Dengue 熱の流行地は発展途上国が多く、価格面から Dengue ウイルス 1 ~ 4 型それぞれの弱毒生ワクチンが開発されてきたが、弱毒化が十分でなかったり、すべての型に均等な防御免疫が誘導できなかった。従来法による生ワクチン開発が進まない中で登場したのが、遺伝子組み換え技術を用いたキメラワクチンの開発である。黄熱ワクチン 17D 株と Dengue ウイルスの構造遺伝子部分の組み替えにより作られたキメラワクチンは、第 3 相臨床試験を終了しメキシコなど数ヶ国でライセンスを得ている状況であるが、それでもなお Dengue 熱流行を制御しきれない問題点を概説した。

周産期のウイルス感染症：今話題の蚊媒介性ウイルス感染症—ジカウイルス, Dengue ウイルス, チクングニアウイルス.

高崎智彦. *周産期医学* 47(2) 303-305. 2017.

ネッタイシマカやヒトスジシマカなどのヤブカ属の蚊が媒介するジカウイルス, Dengue ウイルス, チクングニアウイルス感染症について概説した。ジカウイルス病は、ア

フリカの風土病的な感染症であり、東南アジアでも散発的に流行が発生していたが、2007年にはミクロネシア連邦のヤップ島での流行、2013年にはフランス領ポリネシアで流行が報告され、2015年に入ってブラジルなど中南米で大流行になり、妊婦がジカウイルスに感染すると小頭症など先天性障害をきたすことが明らかとなった。妊娠初期、中期にジカウイルスに感染すると胎児に先天性障害をきたしやすいが、妊娠後期での感染の胎児への影響は、まだ今後のフォローアップが必要性を強調した。

An outbreak of Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1 and 13 strains with closely related genetic profiles (遺伝学的性状が類似した*Legionella pneumophila*血清群1及び13による在郷軍人病の集団発生)

黒木俊郎 (神奈川衛研), 前川純子 (国立感染症研究所), 大屋日登美, 古川一郎, 鈴木美雪, 政岡智佳, 相川勝弘, 日比和美 (神奈川衛研), 森田昌知, 李謙一, 大西真, 倉文明 (国立感染症研究所) *Emerging Infectious Diseases*, 23, 349-351 (2017)

2015年6月に神奈川県内の入浴施設を原因とし、7人の患者を含むレジオネラ肺炎の集団感染が発生した。4人の患者と入浴施設から分離された*Legionella pneumophila* SG1及びSG13が原因であると推測された。1人の患者からは*L. pneumophila* SG1及びSG13の両方の株が分離された。*L. pneumophila* SG13は*L. pneumophila*の血清群の中ではまれな血清群であり、さらに*L. pneumophila* SG1及びSG13が共感染するという非常に珍しい事例であった。これらの分離株を遺伝学的手法により解析したところ、血清群別がSG1, SG13と異なっているにもかかわらず、パルスフィールドゲル電気泳動法によるパターンが一致している、及びシークエンスタップとcgMLSTタイプが類似しているというように、両株は遺伝学的に非常に類似していることが明らかとなった。

薬剤耐性肺炎マイコプラズマの検出状況と遺伝子型別

大屋日登美, 古川一郎, 相川勝弘 (神奈川衛研), 堀野敦子 (国立感染症研), 小田洋一郎 (茅ヶ崎市立病院), 見理剛 (国立感染症研), 成田光生 (札幌徳洲会病院), 黒木俊郎 (神奈川衛研) *日本マイコプラズマ学会雑誌*, 43, 42-45 (2017)

当所では、肺炎マイコプラズマの分離培養による病原体検出を1976年から実施し、2003年以降、マクロライド (MLs) 耐性肺炎マイコプラズマを検出し、その動向を調査するとともに耐性に関与する遺伝子変異等を解析している。1976年から2015年までに検査した咽頭ぬぐい

液2,837件中、肺炎マイコプラズマ検出数は790件 (27.8%) であった。年次別では、1980年代はオリンピック年の4年ごとに検出数の増加がみられたが、1990年代に入りその周期性は崩れている。2000年以降は、2011年と2012年、2015年に大きく増加した。本県分離株524株 (1986-2015年) を調べたところ、1999年までは296株中MLs耐性株は検出されていないが、2003年に初めて検出され、流行期の2011年は74%、2012年には88%と高率に認められるようになった。なお、2013年は60%、2014年は56%となり、流行期の2015年も54%と低下していた。耐性遺伝子変異は、A2063Gが最も多く、A2063C, A2063Tの変異株が流行期であった2011年に出現していた。2015年はA2063Gのみが出現していた。また、266株について新しい遺伝子型別法であるMLVAを実施した。MLVAは、5領域のうちMP1の領域に変異が起こりやすくMP1を除く4領域での解析が推奨されており、これにより解析すると、5領域での解析では、35型に分類されたが、4領域では13型に分類された。

Qualitative Real-Time PCR Assay for HIV-1 and HIV-2 RNA (リアルタイムRT-PCR法によるHIV-1及びHIV-2遺伝子同時検出法の開発)

山崎さやか (慶應義塾大学医学部), 近藤真規子 (神奈川衛研), 須藤弘二, 植田知幸, 藤原宏, 長谷川直樹, 加藤真吾 (慶應義塾大学医学部) *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69, 367-372 (2016)

HIV抗体確認検査としてウエスタンブロッティング法 (WB) が用いられているが、HIV-1抗体とHIV-2抗体には交差反応性があるため、HIV-1とHIV-2感染の鑑別、又は重複感染をWBで判定することが難しい場合がある。そのため、定量リアルタイムPCR法によるHIV-1とHIV-2の同時検出法を開発した。国際スタンダードを用いた本法の感度は、95% hit rateがHIV-1で54IU/ml, HIV-2で5IU/mlであった (プロビット回帰分析)。感染者血漿を用いた検討ではHIV-1感染者52例中51例、HIV-2感染者10例中7例で検出可能であった。非HIV感染者血漿100例を用いた検討では、100例すべてHIV-1, HIV-2ともに検出されなかった。本法は高い感度と高い特異性を持ち、HIV-1とHIV-2の診断及び鑑別に有用であると考えられる。

ポリスチレン製器具・容器包装における揮発性物質試験の試験室間共同実験

菌部博則 (日文安試), 六鹿元雄 (国衛研), 阿部孝 (日文安試), 阿部智之 (日冷検), 阿部裕 (国衛研), 大坂郁恵 (埼玉衛研), 大野春香 (愛知衛研), 大野浩之 (名古屋市衛研), 大野雄一郎 (千葉県薬検査セ),

大畑昌輝（産技総研），尾崎麻子（大阪市環境研），柿原芳輝（日穀検），小林尚（食分開セ），柴田博（顕微鏡院），関戸晴子（神奈川衛研），高坂典子（食葉安セ），竹中佑（日文安試），但馬吉保（食環検），田中葵（日海検），外岡大幸（さいたま市衛研），中西徹（日食分セ），野村千枝（大阪府公衛研），羽石菜穂子（東京健安研セ），早川雅人（化研評機），疋田晃典（長野県環境研），松山重倫（産技総研），三浦俊彦（日冷食研協），山口未来（国衛研），渡辺一成（化研評機），佐藤恭子（国衛研），穂山浩（国衛研）食品衛生学雑誌，57，169-178（2016）

ポリスチレン（PS）を主成分とする合成樹脂の器具・容器包装では，揮発性物質（スチレン，トルエン，エチルベンゼン，イソプロピルベンゼン及びプロピルベンゼン）の残存量が規制されている．その試験法は，規格試験としての真度や精度などの性能評価は行われていない．そこで，本試験法について試験室間共同試験を行い，食品衛生法の規格試験法の性能を評価するとともに，GC/MSやヘッドスペース-GC（HS-GC）を用いた代替法の妥当性を検証した．

ナイロン製器具・容器包装におけるカプロラクタム試験の試験室間共同試験

渡辺一成（化研評機），六鹿元雄（国衛研），阿部孝（日文安試），阿部智之（日冷検），阿部裕（国衛研），大坂郁恵（埼玉衛研），大野春香（愛知衛研），大野浩之（名古屋市衛研），大野雄一郎（千葉県薬検査セ），尾崎麻子（大阪市環境研），柿原芳輝（日穀検），小林尚（食分開セ），近藤貴英（さいたま市衛研），柴田博（顕微鏡院），城野克弘（食葉安セ），関戸晴子（神奈川衛研），菌部博則（日文安試），高坂典子（食葉安セ），但馬吉保（食環検），田中葵（日海検），田中秀幸（東京健安研セ）中西徹（日食分セ），野村千枝（大阪府公衛研），羽石菜穂子（東京健安研セ），早川雅人（化研評機），疋田晃典（長野県環境研），三浦俊彦（日冷食研協），山口未来（国衛研），佐藤恭子（国衛研），穂山浩（国衛研）食品衛生学雑誌，57，222-229（2016）

ナイロンを主成分とする合成樹脂の器具・容器包装に対して，ナイロン6のモノマーであるカプロラクタムの溶出量が規制されている．その試験法は，規格試験としての真度や精度などの性能評価は行われていない．そこで，本試験法について試験室間共同試験を行い，公定法の性能を評価するとともに，公定法変法及びGC/MSについて公定法の代替法の妥当性を確認した．

LC-MS/MSによる豚肉および豚肉加工食品中のクレブテロール残留分析法

林 孝子（神奈川衛研），小菅教仁（食肉衛生検査所），福光 徹，脇ますみ，岸 弘子，宮澤真紀，藤巻照久（神奈川衛研），斉藤貢一（星薬科大学）

日本食品化学学会誌，23(1) 20-26（2016）

LC-MS/MSによる，豚肉および豚肉加工食品中クレブテロールの残留分析法について検討し，妥当性評価ガイドラインに従って妥当性を確認した．豚肉試料に抽出溶媒としてアセトニトリルを用い，無水硫酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムを加えてホモジナイズ抽出し，精製はC18による分散固相抽出およびPSAカートリッジカラムによる固相抽出を行った．PSAによる精製は，抽出液に残留する脂肪酸等のマトリックスの除去に効果があった．測定には，LC-MS/MSを用いた．豚肉および豚肉加工食品を用いて，添加濃度0.05 ng/gでの妥当性評価を実施した結果，マトリックス検量線法と内部標準法のいずれも，ガイドラインの示した目標値を満たす結果が得られた．本検討法は，現行の残留規制値に十分に対応できる分析法であることが示されたが，豚肉加工食品のようにマトリックスの異なる様々な加工食品の検査に対応するには，内部標準法による定量が実用的で望ましいと考える．

Analysis of Fusarium toxins in processed grain products using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry（高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた穀類加工品中のフザリウム属カビ毒の分析）

甲斐茂美，小菅教仁*，脇ますみ，宮澤真紀（神奈川衛研），金澤秀子（慶應義塾大学），*現 神奈川県食肉衛生検査所，Chromatography，37，79-85（2016）

フザリウム属カビ毒5種（ニバレノール，デオキシニバレノール，T-2トキシン，HT-2トキシン及びゼアラレノン）の穀類加工食品からの同時分析法を検討した．試料中のカビ毒はアセトニトリル-水（85：15）を用いて抽出し，多機能カートリッジカラムMultiSep#226 AflaZon+で精製し，LC-MS/MSで定量した．小麦粉を用いた妥当性確認試験では，直線性 $r>0.999$ ，真度は85～97%，併行精度1.9～13.3%，室内精度10.2～19.6%であった．市販食品汚染調査における定量限界は，NIV及びDONは15 μ g/kg，T-2，HT-2及びZENは5 μ g/kgであった．本法を用いて，様々な麦類やトウモロコシ製品を含む加工食品55検体について汚染調査を実施した．DONは36検体から検出され，最大検出値はコーングリッツの238 μ g/kgであった．また，HT-2は6検体，T-2は2検体が麦を原料

とする製品から検出されたが、検出値はいずれも $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。本研究により、穀類を原材料とする輸入加工品へのカビ毒汚染実態については、経年的にスクリーニング調査を継続し、リスク管理する必要があることが示唆された。

水道水中のグルホシネート・グリホサート・AMPAのLC/MS/MS一斉分析法の妥当性評価

小林憲弘，久保田領志，五十嵐良明（国立衛研），木下輝昭，鈴木俊也（東京都健康安全研究センター），高木総吉，吉田仁（大阪府立公衆衛生研究所），望月映希，小林浩（山梨県衛生環境研究所），辻清美，上村仁（神奈川県衛研），植田紘行（千葉県水道局水質センター），齋藤信裕（仙台市水道局），岩間紀知（岐阜県公衆衛生検査センター），粕谷智浩（千葉県薬剤師会検査センター），古川浩司（三重県環境保全事業団），塚本多矩，市川千種（島津製作所），環境科学会誌，29(3) 147-158（2016）

水道水中グルホシネート，グリホサート，AMPAの誘導体化-固相抽出-LC/MS/MS一斉分析法の妥当性を評価するため，9機関において水道水を用いた添加回収試験を行った。その結果，各評価項目は水道ガイドラインの目標を満たしていた。固相抽出なしで検体を直接LC/MS/MSに注入した機関でも良好な結果が得られた。本分析法は水道水中のグルホシネート，グリホサート，AMPAの一斉分析法として非常に有用であると考えられた。

Monitoring the concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-inhibiting activities in the surface waters of the Tone Canal and Edo River Basin（利根運河及び江戸川流域における表流水中の非ステロイド性抗炎症薬及びシクロオキシゲナーゼ阻害活性のモニタリング調査）

西 以和貴（神奈川県衛研），河上 強志（国立衛研），小野寺 祐夫（東京理科大学）J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng., 50, 1108-1115（2015）

昨今，医薬品による水環境汚染は世界的に懸念されているところであるが，日本におけるその汚染実態に関する情報は未だ少ない。そこでよく使用される医薬品である非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）について，水環境への影響を明らかにするため，利根運河流域の河川水及び家庭排水中の濃度及びシクロオキシゲナーゼ（COX）阻害活性を測定した。NSAIDsは家庭排水において河川水より高濃度で検出されたことから，調査対象とした流域では家庭排水が主なNSAIDsの汚染源と考えられた。また，COX阻害活性とNSAIDs濃度を比較したところ，良好な相関関係が認められた。しかし，家庭排水試料のCOX阻害活性について，測定したNSAIDsによる寄与率を確認したところ，約60%であることが分かった。残りの40%については，濃度を測定した機器の感度等の問題から測定できなかったNSAIDs等による影響が考えられた。このことから，NSAIDs等による水環境への影響を正確に評価するためには，COX阻害活性を持つ化合物について，さらなる研究が必要と考えられた。