

神奈川県衛生研究所研究報告

第51号（令和3年10月）

目次

技術報告

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

LightCycler[®]480を用いた遺伝子組換え食品検査の検討

赤星千絵, 垣田雅史, 本田裕子, 佐藤英子, 内山陽介, 大森清美, 濟田清隆,
吉田裕一, 佐藤弘樹, 関戸晴子 1

短報

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

神奈川県内に流通する国産農産物及び農産物加工品のアフラトキシン汚染実態調査

福光徹, 安田健一 7

相模川水系河川における抗微生物剤の存在実態調査

仲野富美, 佐藤学, 上村仁 12

ミネラルウォーター類中における農薬類の検出状況

佐藤学, 仲野富美, 上村仁 17

資料

感染症の監視と予防に関する調査研究

新型コロナウイルス感染症の集団感染2事例における施設の環境調査

伊達佳美, 金沢聡子, 中村廣志 21

神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（令和2年度）

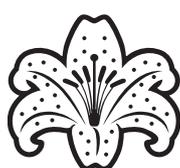
政岡智佳, 鈴木美雪, 古川一郎 26

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

神奈川県における食品中の残留農薬等一日摂取量調査（平成27～29年度）

林孝子, 福光徹, 萩尾真人, 桑原千雅子 30

他誌掲載論文抄録（令和2年4月～令和3年3月） 33



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所（令和3年度）

高崎智彦	石川慎一
中井信也	白井政美
関戸晴子	橋本正彦
大屋日登美	櫻木淳一
上村仁	相川勝弘

神奈川県衛生研究所研究報告編集員（令和3年度）

橋本正彦（編集長）	福田武二郎
木村睦未	中嶋直樹
渡邊寿美	甲斐茂美
吉富太一	森口真理子
渡邊裕子（事務局）	

神奈川県衛生研究所研究報告第51号

令和3年10月発行

編集	神奈川県衛生研究所
発行	〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1 TEL 0467-83-4400
印刷	株式会社 シーケン 〒244-0842 横浜市栄区飯島町1439 TEL 045-893-5171(代)

技術報告

LightCycler[®]480を用いた遺伝子組換え食品検査の検討

赤星 千絵¹, 垣田 雅史², 本田 裕子^{3**}, 佐藤 英子¹, 内山 陽介², 大森 清美², 濟田 清隆³,
吉田 裕一¹, 佐藤 弘樹^{3**}, 関戸 晴子^{2*}

Study on examination of genetically modified foods by LightCycler[®]480

Chie AKABOSHI, Masashi KAKITA, Yuko HONDA, Eiko SATO, Yosuke UCHIYAMA,
Kiyomi OHMORI, Kiyotaka SAITA, Yuichi YOSHIDA, Hiroki SATO and Haruko SEKIDO

Synopsis

Chie AKABOSHI, Masashi KAKITA, Yuko HONDA, Eiko SATO, Yosuke UCHIYAMA, Kiyomi OHMORI, Kiyotaka SAITA, Yuichi YOSHIDA, Hiroki SATO and Haruko SEKIDO (Kawasaki City Institute for Public Health, 3-25-13 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-0821, Japan). Study on examination of genetically modified foods by LightCyclerr[®]480

The testing methods for genetically modified (GM) foods according to national notifications in Japan mention the recommended models of the Real-time PCR machine and also define the protocol. We compared the performance of two models, LightCycler[®]480 System II (LC480, Roche Diagnostics) and ABI PRISM[®] 7900HT (7900, Applied Biosystems) in the inspection of GM foods at the three public health institutes in Kanagawa Prefecture. We compared items of sensitivity, repeatability, difference between wells, and amplification efficiency, for the results, LC480 had the same performance as 7900. In the sensitivity of GM rice, GM papaya, and GM potato, the LC480 was equal to or higher than 7900. On the other hand, in the inspections using LC480, several problems were raised in analyzing the results. The three institutes considered and unified the solutions to these problems. This study contributes to ensure the reliability of our inspection using LC480.

Key Words : Real-time PCR, genetically modified foods, validation

緒言

神奈川県内の地方衛生研究所の中で、遺伝子組換え(以下、GM)食品検査は神奈川県衛生研究所、横浜市衛生研究所、川崎市健康安全研究所の3機関が実施している。3機関とも、検出機器(リアルタイムPCR装置)

の機種変更を平成29-30年度に行い、メーカーのサポート体制が終了するApplied Biosystems製ABI PRISM[®] 7900HT(以下、7900)からRoche Diagnostics製Light Cycler[®]480 System II(以下、LC480)を使用するようになった。GM食品検査では、用いる検出機器の機種について厚生労働省通知¹⁾及び消費者庁通知²⁾(以下、両通知法)で言及されており、解析方法についても定められている。GM食品検査の定性試験においては、感度、繰り返し再現性、well間差、増幅効率等の同等性を確認すれば両通知法に記載されていない機種を使用できる旨が記されている。7900及びLC480は、ともに両通知法

1 川崎市健康安全研究所 食品担当
〒210-0821 川崎市川崎区殿町3-25-13
akaboshi-c@city.kawasaki.lg.jp

2 神奈川県衛生研究所 理化学部

* 現 企画情報部

3 横浜市衛生研究所

** 現 保土ヶ谷福祉保健センター

に記載されている機種であるが、収去検査でLC480を使用するにあたり検査結果の信頼性を確保するため、7900と比較検証した。またLC480を用いた結果において、7900を用いた結果では見られなかった現象について、3機関で検討した。

方法

安全性未審査のGMコメ (63Bt, NNBt, CpTI), GM パパイヤ (PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN) 及びGM バレイショ (F10, J3) の検知試験については厚生労働省通知¹⁾に準じ、安全性審査済みのGMダイズ (RRS, LLS, RRS2) の定量試験については消費者庁通知²⁾に準じた。リアルタイムPCR装置は、LC480及び7900を用いた。リアルタイムPCR装置の測定値 (Cq値: Quantification Cycle値) は、PCR増幅反応液の蛍光シグナルがリアルタイムPCR反応の閾値 (Threshold Line) に達した時点の増幅サイクル数である。Threshold Lineの設定を含む解析方法は両通知法に沿って行い、Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments [MIQE] guidelines³⁾に準じてLC480での測定値 (Cp値: Crossing Point値) 及び7900における測定値 (Ct値: Threshold Cycle値) をCq値として結果に表示した。LC480を用いたPCR増幅反応は、各試験において両通知法に記載のサイクル数より5サイクル増やして測定した。

1. 使用試薬

コメ (PLD, 63Bt, NNBt, CpTI), パパイヤ (Q-Chy, 35S, PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN), バレイショ (APRT, F10, J3) 及びダイズ (Le1, LLS, RRS2) の各陽性コントロールプラスミド (以下, PC) は株ニッポンジーン (以下, NG) 製を用いた。ただし方法2の試験では、copy数の明らかなPLD遺伝子のPCとしてThermo Fisher Scientific (以下, TFS) 製合成依頼品を用いた。各プライマー対及びプローブは、NG製、TFS製又は株ファスマック製を用いた。マスターミックスはTFS製のUniversal PCR Master Mix (以下, UMM) とTaqMan Gene Expression Master Mix (以下, GMM), Roche Diagnostics製のEagle Taq Master Mix (Rox) (以下, EMM) とFastStart Universal Probe Master (Rox) (以下, FM) を使用した。水は滅菌水又はQIAGEN製Nuclease Free Waterを用いた。

2. 機種同等性の確認

2-1. 検出限界の比較

PLD又はLe1のPCを2-1000 copy/wellとなるよう水で希釈し、対応する各プライマー対及びプローブ、並びにUMMを用いてPCR用反応液を調製し、2機種を用い

て10 well併行でPCR増幅させた。PCR条件は両通知法に従った。

2-2. well間差の比較及び繰り返し再現性の確認

PLD又はRRS2のPCを、500又は100 copy/wellとなるよう水で希釈し、対応する各プライマー対及びプローブ、並びにUMM (PLD) 又はEMM (RRS2) を用いてPCR用反応液を調製し、LC480 (PLD及びRRS2) 及び7900 (PLD) を用いて96 well併行でPCR増幅させた。500 copy/wellを用いた試験については3回繰り返し測定を行った。PCR条件は両通知法に従った。

2-3. 増幅効率の比較

Le1のPCを各濃度 (10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ copy/well) となるよう水で希釈した液、Le1用プライマー対及びプローブ並びにUMMを用いてPCR用反応液を調製し、2機種を用いて10 well併行でPCR増幅させ、それぞれの解析ソフトを用いて得られた検量線の傾きから増幅効率を算出した。PCR条件は消費者庁通知²⁾に従った。

3. 安全性未審査GM食品検査の妥当性確認

3-1. 各遺伝子の検知における検出限界の比較

コメ (PLD, 63Bt, NNBt, CpTI), パパイヤ (Q-Chy, 35S, PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN) 及びバレイショ (APRT, F10, J3) のPCを水で10-1000倍希釈した液、対応するプライマー対及びプローブ、並びにUMM (コメ), EMM (パパイヤ, LC480), GMM (パパイヤ, 7900) 又はFM (バレイショ) を用いてPCR用反応液を調製した。その反応液について、2機種を用いて10 well併行で測定した。試験に用いたNG製PCは、含まれるcopy数が明らかにされていないため、各試験において同ロットのPCを水で希釈した溶液を用いた。PCR条件は厚生労働省通知¹⁾に従った。

3-2. PCの測定値の比較及び繰り返し再現性の確認

コメ (PLD, 63Bt, NNBt, CpTI), パパイヤ (Q-Chy, 35S, PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN) 及びバレイショ (APRT, F10, J3) のPCについて、2機種を用いて2 well併行で3回測定 (7900を用いたパパイヤの試験のみ2回測定) した。PCR条件は厚生労働省通知¹⁾に従った。PCR用反応液の調製には、3-1の試験と同じ試薬を使用した。また、コメ (PLD, 63Bt, NNBt, CpTI) のPC (3-1で使用したPCとは異なるロットのPC) を水で10倍希釈した液について、LC480を用いて10 well併行で3回繰り返し測定を行った。同様の操作により、7900においても1回測定を行った。

4. LC480を用いた試験における課題の検証

3機関でそれぞれLC480を用いて検証した。

4-1. バレイショF10検知試験の増幅曲線

PC, ブランク試料液 (NTC: Non Template Control)

として水、及びGM食品陰性検体についてバレイショF10検知試験を、2 well併行で測定した。PCR条件及び試薬は厚生労働省通知¹⁾に従った。

4-2. ダイズLLS定量試験のNTCにおける微量増幅

NTCとして用いるNG製5ng/μL ColE1/TE溶液について、ダイズLLSの定量試験を実施した。消費者庁通知²⁾に従い、マスターミックスはUMM又はEMMを用いてPCR用反応液を調製し、PCR増幅を行った。

4-3. バレイショF10検知試験のNTCにおける微量増幅

NTCとして水を用いたバレイショF10検知試験を実施した。厚生労働省通知¹⁾に従いF10検知用プライマー対及びプローブ (NG製又はTFS製)、並びにFMを用いてPCR用反応液を調製し、PCR増幅を行った。

結果及び考察

1. 機種同等性の確認

両通知法の定性用リアルタイムPCR装置の同等性確認方法に従い、任意のプライマーを用いて実施した。方法2-1の結果を表1に示した。表1(1)から、コメPLD検知試験において、LC480を用いた試験では4 copy以上で10 well中10 well検出された。本結果は、同じ

くLC480を用いたコメPLD検知試験において10 well中10 well検出された最低濃度が4 copyであったとのメーカー技術資料⁴⁾と一致していた。一方、7900を用いた試験では、2 copy及び5 copy以上では10 well, 4 copyでは9 well検出されたことから、4copy以下では検出が不安定と考えられた。また、ダイズLe1検知試験において、2機種とも10 copy以上で10 well中10 well検出された(表1(2))。よって、LC480は7900と同等の感度であると認めた。

次に、方法2-2の結果を表1(3)に示した。well間差の比較及び繰り返し再現性については、検出限界より少し高い濃度の溶液を用いてCq最大値と最小値の差(ΔCq)が1より低いことを確認するため、表1(1)(2)のΔCqの結果及び既報⁴⁾から500 copyを用いることとした。コメPLD及びダイズRRS2検知試験において500 copyを96 well併行で3回繰り返し測定を行ったところ、LC480を用いた測定で3回ともすべてのwellで検出され、繰り返し測定の平均値の差及び96 well間のΔCqは1より低かった。既報⁴⁾のコメPLD検知試験における同様の試験では、3回のCq平均値が29.67、相対標準偏差(RSD)が0.13~0.18%、ΔCqが0.17~0.23と報告されており、本結果の方がCq平均値は少し高く、ばらつきは少し大きかったが、7900を用いた同様のコメPLD検知試験において得られた結果と同等であった。

LC480を用いたダイズRRS2検知試験において100 copyについても96 well併行で測定したところ、96 well間のΔCqは1より低く、96 well間で差がないことを確認した。

また、方法2-3を実施し、2機種から得られた検量線及び算出した増幅効率を図1に示した。LC480は7900より増幅効率が100%に近く、良好であった。

これらの結果から、LC480は、7900と同等の性能を有することを確認した。

表1 低コピー濃度溶液におけるPCR増幅結果
(1) コメPLDの測定結果 (10 well併行)

溶液中の copy数	LC480			7900		
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率
2	(38.40)	(2.03)	9/10	38.22	1.89	10/10
4	36.95	3.08	10/10	(37.40)	(2.62)	9/10
5	36.72	2.85	10/10	37.07	2.10	10/10
7	36.28	1.91	10/10	36.26	1.44	10/10
10	35.90	1.53	10/10	35.83	1.52	10/10
500	29.77	0.25	10/10	30.00	0.09	10/10

(2) ダイズLe1の測定結果 (10 well併行)

溶液中の copy数	LC480			7900		
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率
2	(39.03)	(1.55)	4/10	(38.84)	(2.67)	7/10
5	(37.10)	(0.88)	7/10	(38.37)	(2.12)	9/10
10	37.02	2.42	10/10	37.99	2.61	10/10
100	33.21	0.68	10/10	33.95	0.54	10/10
1000	29.74	0.18	10/10	30.52	0.31	10/10

(3) 繰り返し再現性及びwell間差の確認 (96 well併行)

検知した 遺伝子	溶液中の copy数	試行回数	LC480			7900		
			Cq平均値	RSD(%)	ΔCq	Cq平均値	RSD(%)	ΔCq
コメ PLD	500copy	1回目	29.73	0.20	0.29	29.96	0.20	0.30
		2回目	29.84	0.20	0.34	30.05	0.23	0.34
		3回目	29.81	0.20	0.32	30.05	0.23	0.33
ダイズ RRS2	500copy	1回目	30.22	0.26	0.40			未実施
		2回目	30.22	0.23	0.36			
		3回目	30.94	0.24	0.35			
	100copy	1回目	32.62	0.53	0.90			

ΔCq : Cqの最大値-最小値. RSD : 相対標準偏差.

()内は検出されたCqのみを使用して算出した。

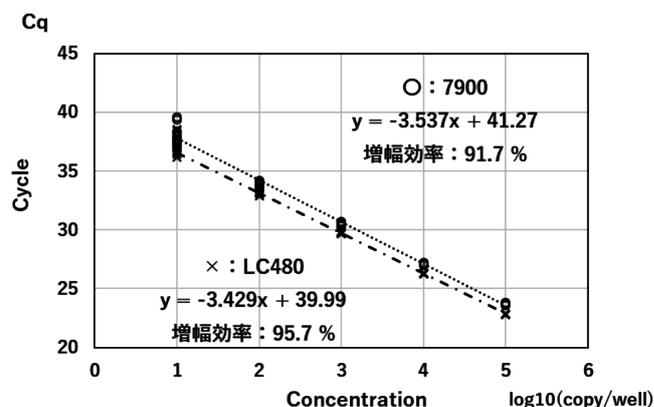


図1 ダイズLe1の検量線 (10 well併行)

表2 安全性未審査遺伝子組換え食品の検出下限の比較

(1) コメ (63Bt, NNBt, CpTI) 試験

PCの希釈率	LC480			7900			
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率	
PLD	1/100	(37.49)	(1.42)	9/10	(38.01)	(2.25)	8/10
	1/50	36.43	1.57	10/10	36.77	1.33	10/10
	1/20	35.51	1.66	10/10	35.49	0.67	10/10
	1/10	34.66	1.06	10/10	34.81	0.92	10/10
63Bt	1/100	37.49	1.73	10/10	38.40	2.85	10/10
	1/50	36.98	2.55	10/10	37.36	2.33	10/10
	1/20	35.34	1.05	10/10	36.23	1.57	10/10
	1/10	34.61	1.01	10/10	35.08	0.98	10/10
NNBt	1/100	37.52	1.57	10/10	(38.26)	(1.43)	9/10
	1/50	36.90	1.50	10/10	37.73	3.19	10/10
	1/20	35.82	1.47	10/10	36.35	2.51	10/10
	1/10	34.74	0.69	10/10	35.60	1.04	10/10
CpTI	1/100	38.11	2.85	10/10	(40.18)	(3.35)	9/10
	1/50	37.23	1.23	10/10	38.93	2.65	10/10
	1/20	36.85	1.23	10/10	38.41	1.16	10/10
	1/10	36.05	0.73	10/10	37.04	0.93	10/10

(2) パパイヤ (PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN) 試験

PCの希釈率	LC480			7900			
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率	
Q-Chy	1/1000	38.61	2.33	10/10	未実施	-	
	1/500	36.87	2.64	10/10	38.28	1.33	10/10
	1/100	34.50	0.70	10/10	37.24	0.99	10/10
	1/50	33.47	0.57	10/10	36.02	0.82	10/10
35S	1/1000	(38.70)	(2.74)	7/10	未実施	-	
	1/500	37.73	2.20	10/10	38.68	1.57	10/10
	1/100	35.62	1.15	10/10	37.24	0.81	10/10
	1/50	34.68	0.74	10/10	36.24	0.44	10/10
PRSV-YK	1/1000	(39.55)	(3.08)	8/10	未実施	-	
	1/500	37.27	1.08	10/10	-	0/10	
	1/100	35.80	0.46	10/10	39.89	1.37	10/10
	1/50	34.67	0.70	10/10	38.81	1.23	10/10
PRSV-SC	1/1000	(39.94)	(1.97)	9/10	未実施	-	
	1/500	38.28	2.12	10/10	(39.58)	(0.62)	6/10
	1/100	36.28	1.82	10/10	37.98	1.06	10/10
	1/50	35.11	0.62	10/10	37.05	0.69	10/10
PRSV-HN	1/1000	(37.93)	(2.10)	7/10	未実施	-	
	1/500	36.54	1.18	10/10	-	0/10	
	1/100	34.71	1.09	10/10	41.69	1.82	10/10
	1/50	33.73	0.73	10/10	39.67	1.84	10/10

(3) バレイショ (F10, J3) 試験

PCの希釈率	LC480			7900			
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率	
APRT	1/1000	36.91	2.43	10/10	(36.82)	(3.13)	9/10
	1/500	35.66	1.26	10/10	35.87	1.63	10/10
	1/200	34.66	1.09	10/10	34.84	1.05	10/10
	1/100	33.44	0.77	10/10	33.79	1.09	10/10
F10	1/1000	39.83	3.43	10/10	41.04	3.09	10/10
	1/500	38.68	1.41	10/10	39.73	1.99	10/10
	1/200	36.97	1.19	10/10	37.62	1.71	10/10
	1/100	36.04	1.32	10/10	36.87	1.40	10/10
J3	1/1000	(37.78)	(2.07)	9/10	38.70	2.14	10/10
	1/500	36.86	2.45	10/10	37.75	2.33	10/10
	1/200	35.54	0.87	10/10	36.67	1.05	10/10
	1/100	34.30	0.48	10/10	35.29	1.10	10/10

ΔCq : Cqの最大値-最小値.

()内は検出されたCqのみを使用して算出した.

2. 安全性未審査GM食品検査の妥当性確認

2-1. 各遺伝子検知における検出下限の比較

GMコメ, GMパパイヤ及びGMバレイショの検査で用いる各遺伝子の検知について, LC480が7900と同等以上の感度を有するかを調べるため, 方法3-1を実施した. コメ検知試験で用いるすべての遺伝子の検知において10 well中10 well検出した最大希釈率を比較したところ, 2機種とも1/50であった(表2(1)). パパイヤ検知試験でも同様に比較したところ, LC480は1/500, 7900は1/100であり, LC480の方が7900より低濃度から検出された(表2(2)). バレイショ検知試験では2機種とも1/500であった(表2(3)). よってLC480は, コメ及びバレイショの検知試験において7900と同等の感度を有し, パパイヤにおいては同等以上の感度を有していることが確認された.

2-2. PCの測定値の比較及びコメの繰り返し再現性の確認

方法3-2を実施した結果を表3に示した. PCのCq平均値は, すべての検知遺伝子で7900よりLC480が小さく, その差はパパイヤの検知遺伝子で大きかった.

コメの検知試験において, PCの1/10希釈液を用いた2機種の感度比較及びLC480における繰り返し試験を行った結果を表4に示した. 測定値の平均は, すべての検知遺伝子で7900よりLC480が小さく, RSDとΔCqを比較すると, ばらつきは概ね同等であった. LC480を用いた10 wellの平均値の3回繰り返し測定による差は1より低く, 再現性も良好であった.

コメとバレイショの内在性遺伝子(PLD及びAPRT)では, 米加工食品13検体及びばれいしょ加工食品8検体を用いた検査において, 測定値は2機種でほぼ同等であり, すべて陰性判定で一致した(データ不記載).

2-1と2-2の結果からGMコメ, GMパパイヤ及びGMバレイショの検査において, LC480を用いた検査の妥当性が確認された. 用いるプライマーによって, 機種による測定値の差が大きいものがあったため, 各遺伝子の検知試験における機種の同等性を比較する意義は大きかった.

表3 PC原液のCq平均値の比較

測定機種	コメ				パパイヤ					バレイショ		
	PLD	63Bt	NNBt	CpTI	Q-Chy	35S	PRSV-YK	PRSV-SC	PRSV-HN	APRT	F10	J3
LC480	30.92	30.69	31.36	32.74	27.84	28.70	28.67	29.25	28.11	26.63	28.17	27.39
	±0.45	±0.48	±0.41	±0.52	±0.15	±0.14	±0.05	±0.16	±0.07	±0.07	±0.18	±0.09
7900	31.22	31.43	32.44	34.16	*30.42	*30.47	*33.98	*31.45	*36.58	26.81	28.92	28.55
	±0.39	±0.53	±0.46	±0.64	±0.19	±0.28	±0.96	±0.24	±2.14	±0.18	±0.38	±0.10
平均値の差	0.30	0.74	1.08	1.42	2.58	1.77	5.31	2.20	8.47	0.18	0.75	1.16

2wellずつ3回測定のCq平均値(上段) ±標準偏差(下段). ただし, *は2wellずつ2回測定のCq平均値 ±標準偏差.

表4 PCの1/10希釈液を用いたコメ検知試験の感度比較及び繰り返し再現性 (10well併行)

検知した 遺伝子	試行回数	LC480			7900		
		Cq平均値	RSD(%)	ΔCq	Cq平均値	RSD(%)	ΔCq
PLD	1回目	33.69	0.87	0.99	33.80	0.97	0.88
	2回目	33.59	1.04	1.24	未実施		
	3回目	33.65	1.11	1.32			
63Bt	1回目	33.82	0.55	0.63		34.17	0.82
	2回目	33.68	0.55	0.68	未実施		
	3回目	33.34	0.49	0.48			
NNBt	1回目	34.06	0.42	0.48		34.98	0.92
	2回目	33.99	0.77	1.01	未実施		
	3回目	34.04	0.63	0.74			
CpTI	1回目	35.01	0.67	0.80		35.79	0.79
	2回目	35.04	0.85	0.85	未実施		
	3回目	35.07	0.90	1.03			

ΔCq : Cqの最大値-最小値. RSD : 相対標準偏差.

3. LC480を用いた試験における課題の検証結果と対応

1, 2の試験実施の際, LC480を用いた試験では以下の課題が挙げられたため, 3機関の収去検査における対応を検討した.

3-1. PCR増幅反応の設定サイクル数

LC480の2nd Derivative Max法による解析では, PCR増幅反応の設定サイクルのラスト5サイクルで増幅するCq値について, [設定サイクル数-5]で算出される. 例えば45を設定サイクルとし, 40~45のCq値となる増幅がある場合, Cq値>40と算出される仕様となっている. 両通知法の陽性基準はCq値が「設定サイクル数-2」未満であるため, 各検知試験においてその判定ができるよう, 設定サイクル数を両通知法より5サイクル増加して分析することとした.

3-2. バレイシヨF10検知試験の直線的な増幅曲線

LC480を用いたF10検知試験において, DNA試料液の代わりに水を用いたNTC及び7900を用いた測定で陰性を確認した食品からのDNA抽出液を測定したところ, 右肩上がりの直線的な増幅曲線が認められた (図2). その解析結果で, 陽性に該当するCq値が得られたwellがあった (データ不記載). この現象は, 3機関で共通

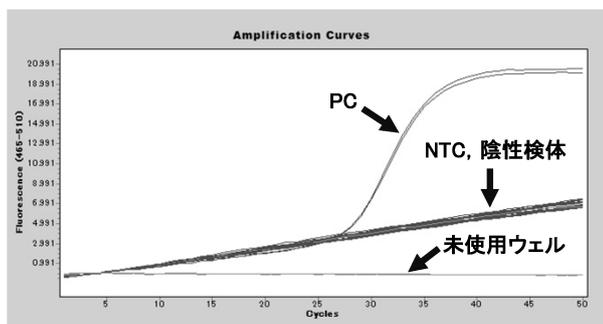


図2 LC480を用いたバレイシヨF10増幅曲線

表5 LC480を用いたダイズLLS定量試験におけるNTCの増幅検出 (well数)

マスターミックス 機関記号	EMM			UMM		
	A	B	C	A	B	C
40以上45未満	9	1	6	0	0	0
Cq値表示 45以上	4	6	8	0	0	0
Negative*	20	23	10	15	12	12
計	33	30	24	15	12	12

*Cq値のstatusに”?”が表示されている場合を含む.

EMM: Eagle Taq Master Mix, UMM: Universal PCR Master Mix

表6 LC480を用いたバレイシヨF10検知試験におけるNTCの増幅検出 (well数)

プライマー・プローブ製造元 機関記号	株ニッポンジーン			Thermo Fisher Scientific株	
	A	B	C	A	C
40以上43未満	1	0	0	0	1
Cq値表示 43以上	3	0	0	1	4
Negative*	50	36	12	15	67
計	54	36	12	16	72

*Cq値のstatusに”?”が表示されている場合を含む.

使用したNTC: 滅菌水 (機関A及びB) またはQIAGEN製Nuclease Free Water (機関C)

して認められた.

LC480では, 増幅曲線はReporter色素のFAMの蛍光強度を示す. 本検知試験では, 7900を用いた場合も同様にFAMの蛍光強度は増加していたが, Quencher色素のTAMRAも解析するため増幅曲線上では増加せず, 解析結果で陰性となっていた. LC480においてNTC及び陰性食品のCq値が陽性となった場合については, 厚生労働省通知¹⁾の陽性判定では「指数関数的な増加」を確認することとなっているため, 複数の目視で「指数関数的な増加」が認められない場合は陰性と判断することにした.

3-3. ダイズLLS定量試験のNTCにおける微量増幅

LLS定量試験において, NTCとしてColE1/TE溶液を用いて3機関で測定した結果を表5に示した. マスターミックスにEMMを用いたColE1/TE溶液の増幅結果において, サイクル数40以降に指数関数的な増幅 (微量増幅) が生じ, Cq値40以上の結果が得られた事例が, 3機関で認められた. そこで, マスターミックスをUMMに変更したところ, Cq値はすべてNegativeとなった. また, ColE1/TE溶液を水に代え, EMMを用いて3機関で計72試行繰り返したところ, Cq値はすべてNegativeであった (データ不記載). 以上のことから, ColE1/TE溶液とEMMを使用した場合にのみ発生することがある非特異的な増幅と考えられたため, 本試験ではマスターミックスにUMMを使用することにした.

3-4. バレイショF10検知試験のNTCにおける微量増幅

F10検知試験において、NTCとして水を用いて3機関で測定した結果を表6に示した。NTCでの微量増幅が2機関で確認され、「Cq値43以上」のwellは190 well中8 wellで、「Cq値43未満」のwellは190 well中2 wellであった。本試験は、使用するマスターミックスが厚生労働省通知¹⁾には1種のみ記載されており、変更するには同等性の確認が必要であるため、マスターミックスは変更せずプライマー・プローブについて製造元の異なる2種類を用いて実施し、いずれもこの微量増幅が認められた。

この微量増幅は改善には至らなかったが、出現頻度が低く、PCの希釈液で検出下限付近を測定した際に「Cq値43以上」で検出されたwellはなかった（データ不記載）ことも考慮し、非特異的増幅であると考え、適切な検査が行われていたこととした。NTCが「Cq値43未満」で検出された際は、再度PCR試験を実施することとした。上の3-1～3-4の課題について決めた対応を3機関で統一することで、神奈川県内におけるGM検査の整合性を保った。

まとめ

神奈川県内地方衛生研究所でGM検査を実施している3機関においてLC480と7900の併行設置期間を設け、コメ、パパイヤ、バレイショ及びダイズ試験について比較検討し、結果から得られた課題について検証した。各機関で検証結果を確認し、課題への対応策を統一できたことは、各機関における本検査結果への信頼性の向上にもつながった。

和文抄録

遺伝子組換え食品の検査の通知法は、用いる検出機器の機種について言及しており、解析方法についても定め

ている。神奈川県内の3地方衛生研究所において、Roche Diagnostics製LightCycler[®] 480 System IIとApplied Biosystems製ABI PRISM[®] 7900HTの2機種の遺伝子組換え食品検査における性能を比較した。本結果から、感度、繰り返し再現性、well間差、増幅効率において、LC480は7900と同等の性能を有していた。GMコメ、GMパパイヤ、GMバレイショの感度においては、LC480は7900と同等以上であった。一方、LC480を用いた試験では、結果を解析するうえでいくつかの課題が挙げられた。それらの課題についての対処方法を、3機関で考え統一した。本研究により、LC480を用いた我々の検査の信頼性の確保に貢献した。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長，安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について 別添 安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法，食安発1116第3号，平成24年11月16日。
- 2) 消費者庁次長，食品表示基準について 別添 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法，消食表第139号，平成27年3月30日。
- 3) Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. et al.: The MIQE guidelines: minimum for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clinical Chemistry*, 55, 611-622 (2009).
- 4) 日本ジェネティクス株式会社：技術資料Technical Data Sheet Vol.01 FEB 2018 厚生労働省より通知されている「遺伝子組換え食品検査方法」に則った、ロシュ社製リアルタイムPCR装置の同等性試験の結果
<<https://www.n-genetics.com/products/1295/1024/16517.pdf>> (2021/6/11アクセス)

短報

神奈川県内に流通する国産農産物及び農産物加工品のアフラトキシン汚染実態調査

福光徹¹, 安田健一²

Investigation of aflatoxin contamination in domestic agricultural products and processed agricultural products retailed in Kanagawa prefecture

Toru FUKUMITSU and Kenichi YASUDA

緒言

アフラトキシンは、主に熱帯、亜熱帯地域に生息する *Aspergillus* 属のカビのうち、特定の菌種が産生するカビ毒であり、強い発がん性を有する¹⁾。そのため、食品中のアフラトキシンについては世界各国で厳しく規制されており、日本では平成23年10月1日以降、アフラトキシンの規制がアフラトキシンB₁から総アフラトキシン(アフラトキシンB₁, B₂, G₁及びG₂の総和)に変更され、10 µg/kgを超えて検出された食品は食品衛生法違反として取り扱われることとなった²⁾。

アフラトキシン産生菌は、1970年代の調査では、南西諸島以南を除き日本国内の土壌からはほとんど検出されなかったことから³⁾、農産物へのアフラトキシン汚染もほとんど認められないと考えられていた。しかし、1990年代以降、関東、中部地方の土壌からも産生菌が分離されたとの報告がなされた^{4,6)}。また、2011年には宮崎県産の米からアフラトキシンが検出されていることから、平均気温の上昇に伴い汚染地域の拡大が懸念される。そこで、神奈川県内に流通する国産農産物及び農産物加工品におけるアフラトキシンについて分析法を検討し、汚染実態調査を実施したので報告する。

方法

1. 試料

神奈川県内で市販されている国産農産物及び農産物加工品38検体を用いた。原料原産地が都道府県名まで明確であること、加工品の場合は加工度が低く、単一原材料であることを条件とした。粉末、ペースト及び液体状の検体並びに砂糖類については未処理で、その他の形態の検体についてはフードミル又はフードプロセッサーにより粉碎又は細切均一化して使用した。

2. 分析対象

アフラトキシンB₁, B₂, G₁及びG₂の4種とした。

3. 試薬

アフラトキシン標準溶液は、Merck社(Sigma-Aldrich)製のJapanese Aflatoxin Mixture(各アフラトキシンの25 µg/mLアセトニトリル溶液)をメタノール-水(1:1)混液で希釈して調製した。メタノール(試料抽出用)及びアセトニトリルは関東化学(株)製の残留農薬試験・PCB試験用(300倍濃縮)、メタノール(標準溶液及び試験溶液調製用)は同社製のLC/MS用、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(以下、ポリソルベート20)は富士フィルム和光純薬(株)製の化学用、酢酸アンモニウムはMerck社製のLC/MS用を用いた。イムノアフィニティカラムは、Romer社製のAflaStar Rを用いた。PBSはMerck社(Sigma-Aldrich)製のタブレットを水に溶かして用いた。水は、Merck社製Milli-Q Integral 5で精製した超純水を使用した。ガラス繊維ろ紙は東洋濾紙(株)製のGA-100(直径125 mm)、ろ過用フィルターはMerck社製のマイレクス-LG(孔径0.20 µm, 直径13 mm, 親水性, PTFE)を用いた。

4. 装置及び測定条件

LC-MS/MSはWaters社製Aquity UPLC I-class PLUS(LC)及びXevo TQ-XS(MS)を用いた。ホモジナイザーは日本精機(株)製バイオミキサーBM-2、振とう機はタイテック(株)製SR-2s、遠心分離機は久保田商事(株)製S700FRを用いた。LC-MS/MS測定条件を表1及び表2に示した。

5. 試験溶液の調製

平成23年8月16日付け厚生労働省通知⁷⁾(以下、通知)のイムノアフィニティカラムを用いた試験法に準じた方法により実施した(図1)。試料の形態や性質を考慮し、4種類(A~D)の抽出法を用いた。

6. 検量線

標準溶液をメタノール-水(1:1)混液で希釈して0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5及び1 ng/mLの検量線用混合標準溶液を調製し、絶対検量線法に

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

2 神奈川県健康医療局生活衛生部生活衛生課

表1 LC-MS/MS測定条件

LC	
カラム	AQUITY UPLC BEH C18 (Waters社) 2.1 mmI.D.×50 mm, 粒子径1.7 μm
ガードカラム	AQUITY UPLC BEH C18 VanGuard Pre-column (Waters社) 2.1 mmI.D.×5 mm, 粒子径1.7 μm
カラム温度	40℃
移動相	10 mM酢酸アンモニウム水溶液 - 10 mM酢酸アンモニウムメタノール溶液 (65 : 35) 混液
流量	0.35 mL/min
注入量	3 μL
MS/MS	
キャピラリー電圧	0.6 kV
イオン源温度	150℃
脱溶媒ガス温度	500℃
コーンガス流量	150 L/hr
脱溶媒ガス流量	1,000 L/hr
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化, ポジティブモード (ESI+)
分析モード	選択反応モニタリング (SRM)

表2 保持時間及びMS/MS条件

分析対象	保持時間 (分)	Precursor ion (m/z)	Product ion(m/z)	
			定量	確認
アフラトキシンB ₁	3.2	313.2	285.1	241.3
アフラトキシンB ₂	2.5	315.2	287.3	259.3
アフラトキシンG ₁	2.0	329.2	243.2	200.0
アフラトキシンG ₂	1.6	331.2	245.2	189.2

より定量を実施した。

7. 妥当性評価及び添加回収試験

本調査の検体の種類は多岐にわたるため、代表的な食品試料として米を選択し、通知に準じた妥当性評価を実施した。試料への添加濃度は各アフラトキシン1 μg/kgとし、1回5併行の添加回収試験により併行精度 (RSD, 目標値: 20%以下) を、異なる5日における各1併行の添加回収試験により室内精度 (RSD, 目標値: 30%以下) を評価した。合計10試行の結果をもとに、真度 (回収率, 目標値: 70~110%) を評価した。また、添加濃度に相当する標準溶液0.5ppbと比較し、選択性 (目標値: 試料の妨害ピーク面積が標準溶液のピーク面積の1/10以下) を評価した。米以外の試料については、妥当性評価と同濃度で添加回収試験を実施し、回収率のみ確認した。

8. マトリックスの影響の確認

LC-MS/MS測定におけるマトリックス (試料由来成分) によるイオン化効率の影響は、マトリックスを含まない溶媒標準溶液0.5ppbに対するマトリックス添加標準溶液

0.5ppbの面積比から算出した。

結果及び考察

1. 分析法の検討

通知では試料50.0 gを用いるが、操作の簡便化のため、本調査では10.0 g又は5.0 gとし、抽出液量も変更して抽出法Aを構築した。また、多様な形態や性質の試料に対応するため、抽出法Aを基本として抽出法B, C及びDも構築した (図1)。

抽出法Aは粉末及びペースト状の試料に適用し、抽出法Aでは抽出が不十分と考えられる試料 (細切しても粉末又はペースト状とならない野菜類等) には抽出法Bを適用した。ただし、きくいもについては、粉末状であったが、抽出液の添加により膨潤して小塊となり、抽出法Aでは試料全体に抽出液を浸透させることが困難であったことから、抽出法Bを採用した。なお、通知には「5分間ホモジナイズ又は30分間振とう」と記載されているが、抽出液の揮散が懸念されるため、抽出法Bのホモジナイズは1分間とし、その後30分間の振とうを追加した。酢以外の砂糖類には抽出法Cを適用した。これらは抽出液に溶解し、抽出液が2層に分離したことから、分取操作は困難と判断し、抽出液に溶解後、全量を8% (w/v) ポリソルベート20水溶液で希釈、定容した。液体試料 (ジュース及び酢) には抽出法Dを適用した。液体試料は抽出液による抽出の必要がないと判断し、試料に直接8% (w/v) ポリソルベート20水溶液を添加し、定容した。

2. 妥当性評価及び添加回収試験

添加回収試験及びマトリックスの影響の結果を表3に示した。米を用いた妥当性評価の結果は、真度105.2~111.4%, 併行精度3.6%以下, 室内精度7.4%以下, 選択性は目標値内であった。アフラトキシンB₁における真度のみ110%を超え、目標値外となったが、農業等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン⁹⁾における目標値上限の120%以下であった。また、本調査は食品衛生法への適合判定を目的としないことから、本分析法は適用可能と考えられた。なお、米の他にも回収率が110%を超えた試料が複数認められた。原因の1つとしてマトリックスの影響が考えられるが、最大でも+11.3%であり、影響を考慮する必要がないとされる±20%の範囲内⁹⁾であった。また、いずれも回収率120%以下であり、分析結果に影響は及ぼさないと考えられた。

えごま (粒) (白えごま種子) については抽出法Aで検討したところ、回収率が低値となったため、より抽出効率が高いと考えられる抽出法Bを用いた。抽出法Bの方が回収率の改善が認められたものの、アフラトキシン

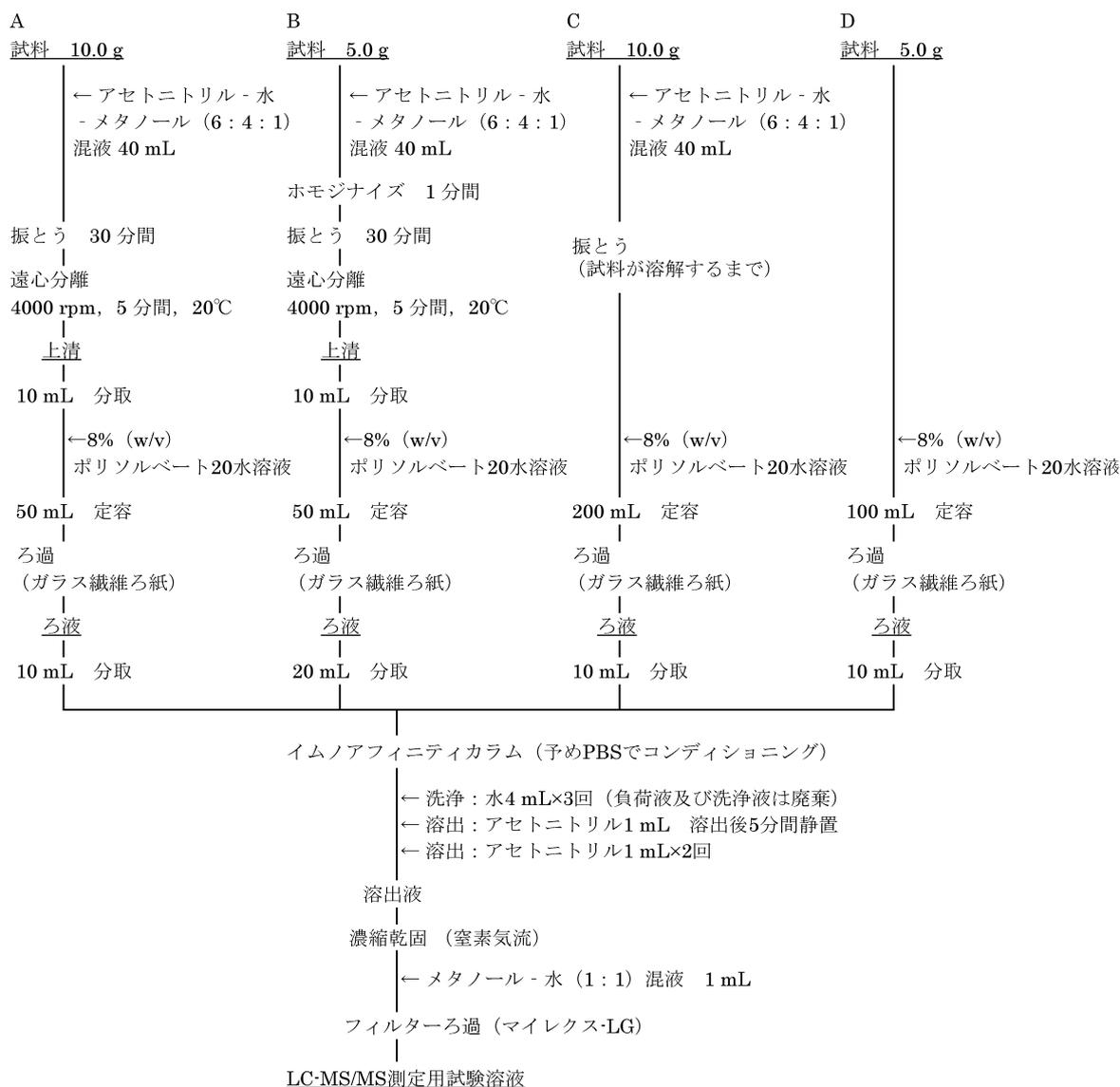


図1 試験溶液の調製方法

- A: 粉末, ペースト状の試料 (B~D以外の試料)
 B: えごま粒, 野菜類 (大根, きくいも, さつまいも, 生姜)
 C: 抽出液に溶解する試料 (酢以外の砂糖類)
 D: 液体試料 (ジュース, 酢)

G₁及びG₂は70%未満であった. 一方, えごま (粉末) は抽出法Aで回収率70%以上であった. えごま (粉末) は, 搾油後の脱脂えごまを粉末に加工した製品であり, 未処理であるえごま (粒) とは成分が異なる. そのため, 抽出時の挙動が異なり, 回収率に違いが認められたと考えられた.

検量線はいずれも $r^2 \geq 0.999$ を満たす良好な直線性を示した. なお, 汚染実態を詳細に把握するため, できる限り低濃度まで定量結果を算出することとした. 各アフラトキシンにおいて標準溶液0.01ppb (試料中濃度0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当) におけるS/N比が10以上を満たしたこと

から, 定量下限値は0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とした.

3. 汚染実態調査

汚染実態調査結果を表4に示した. 38検体中8検体からアフラトキシンが検出されたが, 総アフラトキシンとしてはいずれも規制値の1/10未満であった.

検出検体が多かったのは砂糖類であり, 7検体中4検体 (黒糖2検体, 黒糖蜜及びびざらめ糖) から検出された. このうち, 黒糖蜜は総アフラトキシンとして0.96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と比較的検出量が多かった. 本調査検体の砂糖類はいずれもサトウキビが原料であった. 鹿児島県の調査では, 黒糖から比較的高率にアフラトキシンが検出され, その

表 3 アフラトキシン添加回収試験結果

分類 ^{*1}	試料 ^{*2}	抽出法 ^{*3}	試行数 (n数)	回収率 ^{*5} (%)				マトリックスの影響 ^{*6} (%)			
				AFB ₁ ^{*4}	AFB ₂ ^{*4}	AFG ₁ ^{*4}	AFG ₂ ^{*4}	AFB ₁ ^{*4}	AFB ₂ ^{*4}	AFG ₁ ^{*4}	AFG ₂ ^{*4}
穀類	米	A	10	111.4	109.5	105.2	106.0	1.6	0.2	1.1	-0.4
	大麦	A	1	119.7	117.5	119.0	115.2	8.4	8.2	6.0	6.2
	そば	A	2	113.5	111.3	113.0	111.2	6.5	4.6	2.2	1.3
	あわ, きび	A	2	115.5	112.4	114.7	112.5	6.0	3.7	2.8	1.5
	とうもろこし	A	1	105.1	106.0	85.2	92.4	5.1	3.9	1.9	-0.6
砂糖類	砂糖, 黒糖	C	2	110.8	105.9	101.1	99.6	8.1	6.8	6.5	5.1
	さとうきび酢	D	1	107.7	104.0	105.3	105.4	9.8	6.7	7.3	3.8
種実類	ごま	A	3	94.9	94.9	79.2	83.5	2.7	1.8	0.1	-0.1
	ピーナッツ	A	2	92.7	92.4	81.2	84.1	7.6	6.6	5.8	3.2
	えごま (粉末)	A	2	76.5	74.4	78.6	80.1	1.2	-0.3	-0.2	-0.5
	えごま (粒)	A	2	71.1	76.2	32.1	44.7	7.0	4.9	4.3	2.7
		B	1	90.0	93.2	39.1	53.2	-0.9	-3.4	-1.3	-1.3
豆類	大豆	A	2	101.2	98.6	103.1	101.8	-0.4	0.1	-1.2	-3.2
	おから	A	1	99.4	98.5	70.3	72.6	6.5	3.8	0.8	0.8
野菜類	大根	B	2	113.4	108.2	107.7	104.0	2.3	-0.6	1.8	2.5
	れんこん	A	1	119.2	115.5	118.8	114.6	11.1	11.3	9.5	7.6
	きくいも	B	1	117.0	116.1	106.8	104.5	5.3	3.4	1.7	0.9
	さつまいも	B	1	109.5	109.1	99.0	97.6	7.5	7.1	4.8	4.6
	生姜	B	1	99.4	99.1	82.1	87.1	5.0	3.8	2.6	2.8
果実類	ぶどうジュース	D	1	116.4	107.5	110.1	106.6	7.7	6.0	5.6	3.9

*1 加工品を含む

*2 粉末, ペースト及び液体状以外の検体 (粒状など) は, 粉碎又は細切均一化して試料とした (砂糖類を除く)

*3 図 1 参照

*4 AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂: アフラトキシンB₁, B₂, G₁, G₂

*5 試料への添加濃度: 1 µg/kg

*6 マトリックスの影響 = ((マトリックス添加標準溶液0.5ppb面積値 - ブランク試料面積値) / 溶媒標準溶液0.5ppb面積値 - 1) × 100

表 4 国産農産物及び農産物加工品のアフラトキシン汚染実態調査結果

分類 ^{*1}	検体 ^{*2}	原産地	検体数	検出数	抽出法 ^{*3}	検出量 (µg/kg)				
						AFB ₁ ^{*4}	AFB ₂ ^{*4}	AFG ₁ ^{*4}	AFG ₂ ^{*4}	TAF ^{*5}
穀類	米 (粉末)	神奈川県/島根県	2	0	A					
	大麦 (粒/粉末)	鹿児島県	2	0	A					
	そば (粒/粉末)	長野県/宮崎県	2	1	A	0.06				0.06
	あわ, きび (粒)	岩手県/長崎県	2	0	A					
	とうもろこし (粒)	神奈川県	1	0	A					
砂糖類	砂糖, 黒糖 (粉末/蜜等)	鹿児島県/沖縄県	6	4	C	0.05				0.05
						0.06				0.06
						0.10				0.10
	さとうきび酢	鹿児島県	1	0	D		0.05			0.05
種実類	ごま (粒)	京都府/神奈川県 /宮崎県/鹿児島県	4	2	A	0.10	0.02			0.12
	ピーナッツ (粒/ペースト)	千葉県/神奈川県	3	1	A	0.11	0.03			0.14
	えごま (粒 ^{*6} /粉末)	宮城県/神奈川県	2	0	A/B					
豆類	大豆 (粒/粉末)	愛知県/京都府	3	0	A					
	おから (乾燥)	島根県	1	0	A					
野菜類	大根 (乾燥)	宮崎県	2	0	B					
	れんこん (粉末)	山口県/熊本県	2	0	A					
	きくいも (粉末)	熊本県/宮崎県	2	0	B					
	さつまいも (乾燥)	群馬県	1	0	B					
	生姜	神奈川県	1	0	B					
果実類	ぶどうジュース	福島県	1	0	D					

定量下限値: 0.02 µg/kg

空欄: 定量下限値未満

*1 加工品を含む

*2 粉末, ペースト及び液体状以外の検体 (粒状など) は, 粉碎又は細切均一化した (砂糖類を除く)

*3 図 1 参照

*4 AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂: アフラトキシンB₁, B₂, G₁, G₂

*5 TAF: 総アフラトキシン (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂の総和)

*6 回収率を考慮しても定量下限値未満

汚染は原料サトウキビに由来することが推察されると報告している^{10,11)}。本調査での検出検体についても、同様に原料サトウキビに由来する可能性が考えられた。

砂糖類以外では、長野県産のそば粉、京都府及び宮崎県産のごま、千葉県産のピーナッツペーストから、ごく微量が検出された。アフラトキシン産生菌は、九州、沖縄地方だけでなく、関東、中部地方の土壌からも分離されていることから^{4,6)}、平均気温の上昇による産生菌の分布拡大に伴い、農産物への影響も拡大している可能性が考えられる。

まとめ

国産農産物及び農産物加工品について、アフラトキシンの分析法を検討し、汚染実態調査を行った。試料の形態や性質を考慮し、4種類の抽出法により分析を実施した。検出量は最大でも規制値の1/10未満であり、微量であったが、平均気温の上昇に伴いアフラトキシンが検出される食品の生産地域の拡大が示唆された。今後も引き続き、食品の汚染実態を調査、把握していく必要があると考える。

謝辞

本調査は令和2年度神奈川県健康医療局生活衛生部生活衛生課先行調査事業にて実施した。

本調査の企画調整、試料の選定等にご尽力くださいました神奈川県健康医療局生活衛生部生活衛生課の右田明日香氏、岩川未来氏及び内山勝博氏に深謝いたします。また、試料の分析等にご尽力くださいました神奈川県衛生研究所の桑原千雅子氏、林孝子氏、萩尾真人氏及び北出杏子氏に深謝いたします。

文献

1) 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男: 食品安全性セミナー5 マイコトキシン, 細貝祐太郎, 松本昌雄監修, pp.73-86, 中央法規出版, 東京 (2002)

- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて, 平成23年3月31日, 食安発0331第5号
- 3) Manabe, M. and Tsuruta, O.: Geographical distribution of aflatoxin-producing fungi inhabiting in Southeast Asia, JARQ, **12**, 224-227. (1978)
- 4) 高橋孝則: 土壌中のアフラトキシン産生菌の分布, マイコトキシン, **35**, 13-17. (1992)
- 5) 伊藤陽子, 後藤哲久: 国内茶園から分離されたアスペルギルス・フラブス菌群, マイコトキシン, **40**, 52-55 (1994)
- 6) 斉藤道彦, 岡崎博, 田中健治, 久城真代: 茨城県および千葉県内の畑土壌における *Aspergillus flavus* および *A. parasiticus* の分布調査, 食総研報, **72**, 77-81 (2008)
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 総アフラトキシンの試験法について, 平成23年8月16日, 食安発0816第1号
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について, 平成22年12月24日, 食安発1224第1号
- 9) EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides: Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed, SANTE/12682/2019
- 10) 岩屋あまね, 下堂蘭栄子, 榎元清美, 福司山郁恵, 吉村浩三: 食品中のアフラトキシン含有量調査, 鹿児島県環境保健センター所報, **13**, 91-94 (2012)
- 11) 岩屋あまね, 榎元清美, 岩下幸二, 早田理恵, 早田真也, 吉村浩三: 県内産食品のカビ毒(アフラトキシン)汚染実態調査(第I報), 鹿児島県環境保健センター所報, **14**, 41-44 (2013)

短報

相模川水系河川における抗微生物剤の
 存在実態調査

仲野 富美, 佐藤 学, 上村 仁

Monitoring of antimicrobial agents in
 water of Sagami River

Fumi NAKANO, Manabu SATO
 and Hitoshi UEMURA

はじめに

河川における医薬品類の汚染が社会的問題となっている。これらの薬剤は生理活性を有するため、環境中へ流入した場合のヒトや生態系への影響が懸念されている。医薬品類のうち、抗微生物剤（抗生物質、合成抗菌剤、抗ウイルス剤等）は医療、畜水産業など広い分野で使用され、全国の河川においても検出が報告されている¹⁻³⁾。また、薬剤耐性微生物の出現や蔓延⁴⁾も世界的な問題となっており、水源河川中の抗微生物剤濃度の監視は重要な課題である。そこで、河川における存在実態を把握するため、河川水中の抗微生物剤の一斉分析法を検討するとともに、神奈川県の主要な水道水源である相模川において実態調査を実施したので報告する。

方法

1. 試料

試料は神奈川県の県央を流れる相模川において、図1及び表1に示した18地点（本川6地点、支川12地点）で採水した。また、寒川浄水場の浄水が供給されている寒川町内公園の水道水も併せて採水した。水道水は採水時にアスコルビン酸ナトリウムを加えて残留塩素を除去した。採水は季節変動を把握するため、季節ごとに各1回（2018年3月28, 29日（春）、8月21, 22日（夏）、11月19, 20日（秋）、2019年2月20, 21日（冬））、計4回行った。

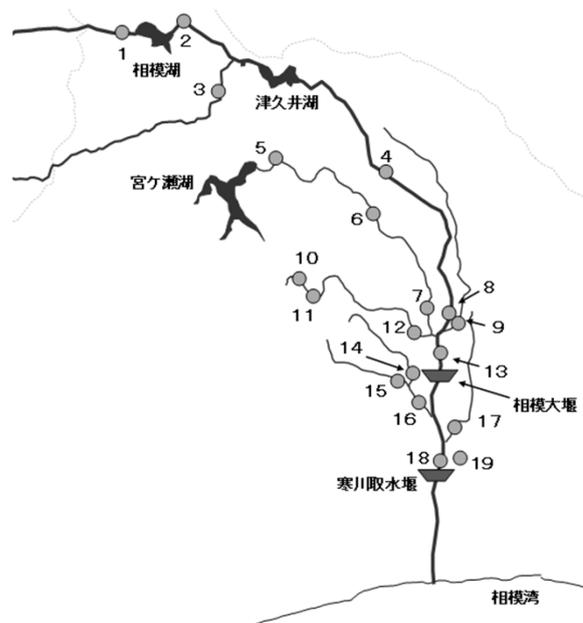


図1 採水地点

各採水地点の詳細は表1に示した。

表1 採水地点一覧

地点No.	地点名	河川名
1	藤野弁天橋	相模川本川
2	弁天橋	相模川本川
3	青山	道志川
4	高田橋	相模川本川
5	田代運動公園	中津川
6	才戸橋	中津川
7	鮎津橋	中津川
8	三川公園	相模川本川
9	さくら橋	鳩川
10	清川村役場下	小鮎川
11	片原橋	小鮎川
12	第二鮎津橋	小鮎川
13	旭町スポーツ広場	相模川本川
14	新八木間橋	恩曾川
15	八木間橋	玉川
16	酒井橋	玉川
17	平泉橋	永池川
18	寒川取水堰上	相模川本川
19*	寒川町内公園	寒川系浄水(水道水)

* 地点19は寒川浄水場から給水される地点の水道水

2. 測定対象物質

測定対象物質は、畜産や医療分野における使用実態や薬剤耐性菌の存在実態等を考慮して、表3に示した24物質（サルファ剤、マクロライド系、テトラサイクリン系、セフェム系、キノロン系抗生物質、抗インフルエンザ薬及びその代謝物等）を選定した。

表2 LC/MS/MS分析条件

LC装置	ACQUITY UPLC H-class (Waters製)
分析カラム	Inertsustain C18 PEEK 2 μ m, 2.1*100mm (GLサイエンス製)
カラム温度	30 $^{\circ}$ C
注入量	3 μ L
移動相	A : 0.1%ギ酸水溶液 B : 0.1%ギ酸添加アセトニトリル
グラジエント条件	B 15%(0-3min)- 25%(5min)-35%(9min) -100%(12-15min)- 15%(15.5-20min) (直線グラジエント)
流量	0.3mL/min
MS装置	XEVO TQ MS (Waters製)
イオン化法	ESI(+)
イオン源温度	150 $^{\circ}$ C
脱溶媒温度	500 $^{\circ}$ C
キャピラリー電圧	0.6kV
測定モード	MRMモード

3. 標準物質, 標準液, 試薬, 器材

標準物質は富士フィルム和光純薬工業(株)製の高速液体クロマトグラフィー用, 薬理研究用及び生化学用試薬, 東京化成(株)製試薬及びケムシーン製の試薬を用いた。混合標準液は24種の標準物質をメタノールに溶解して調製し, メタノールを用いて適宜希釈し使用した。メタノールは富士フィルム和光純薬(株)製残留農薬用(5000倍濃縮)試薬を, アセトニトリルは富士フィルム和光純薬(株)LC/MS用試薬を用いた。ギ酸は, 富士

フィルム和光純薬(株)特級試薬を抽出用に用い, LC/MS用試薬を測定用に使用した。アスコルビン酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬(株)特級試薬を使用した。固相カートリッジはSep-pak PS2 plusカートリッジ(充填量265mg, Waters製, 以下PS-2とする)及びOASIS HLB plusカートリッジ(充填量225mg, Waters製, 以下HLBとする)を用いた。

4. 分析法及び妥当性評価

分析法は固相抽出-液体クロマトグラフ質量分析(LC/MS/MS)法を用いた。固相カートリッジPS-2及びHLBは直列に連結し, メタノール10mL, 超純水5mLの順に通液してコンディショニングした。試料1Lにギ酸1mLを加え混和した後, PS-2, HLBの順に流速20mL/minで通水した。通水後, 固相カートリッジは窒素ガスで40分以上通気乾燥した後, 通水方向から逆方向にメタノール5mLで抽出物を溶出させた。溶出液は遠心エバポレーターを用いて1mL以下になるまで濃縮した後, メタノールを加えて1mLとしたものを試験溶液とした。試験溶液及び標準溶液は0.2%ギ酸水溶液で2倍希釈したものをを用いて, LC/MS/MS測定を行った。LC/MS/MS条件は表2及び表3に示した。

定量は原則, 溶媒検量線を用いた絶対検量線法で行った。溶媒検量線用標準溶液は, 標準溶液をメタノールで段階的に希釈して調製した。エリスロマイシンの検量線

表3 測定対象物質の保持時間及びMRM条件

分類	測定対象物質	保持時間 (min)	MRM条件			
			ブリーカー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	CV(V)	CE(eV)
サルファ剤	スルファジメトキシ	9.2	311	156	34	22
	スルファモノメトキシ	6.2	281	156	30	18
	スルファジミジン	4.1	279	186	30	16
	スルファメトキサゾール	7.3	254	92	26	26
	スルファジアジン	2.4	251	156	34	16
	スルファピリジン	2.7	250	156	28	16
マクロライド系	エリスロマイシン	9.9	734	158	26	28
	クラリスロマイシン	11.1	749	158	30	30
	タイロシン	10.6	917	174	52	36
セフェム系	セフジトレンピボキシル	11.5	621	241	32	22
テトラサイクリン系	クロルテトラサイクリン	7.2	479	444	26	22
	オキシテトラサイクリン	3.3	461	426	24	18
	ドキシサイクリン	7.9	445	428	26	18
	テトラサイクリン	4.5	445	154	26	32
キノロン系	トシル酸トスフロキサシン	7.3	405	387	56	20
	オフロキサシン	3.7	362	205	30	40
	エンロフロキサシン	5.6	360	316	32	20
	メシル酸ダノフロキサシン	5.2	358	340	32	24
	シプロフロキサシン	4.2	332	314	30	20
	ノルフロキサシン	3.7	320	276	30	18
ペニシリン系	アンピシリン	2.4	350	160	20	18
抗インフルエンザ薬・代謝物	オセルタミビルリン酸塩	3.6	313	166	18	20
	オセルタミビルカルボン酸	7.8	285	138	16	20
殺菌剤	トリクロカルバン	12.9	315	127	32	34

CV: Corn voltage, CE: Collision energy

表4 妥当性評価結果

測定対象物質	超純水添加		水道水添加		河川水添加		定量 下限値 (ng/L)
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	
スルファジメトキシシ	106	3.8	102	4.5	93	4.9	1
スルファモノメトキシシ	104	4.0	97	4.6	89	4.8	1
スルファジミジン	104	4.1	102	3.5	76	1.9	1
スルファメトキサゾール	101	3.3	70	2.8	65	3.9	1
スルファジアジン	96	4.9	79	1.5	74	4.4	1
スルファピリジン	97	6.1	88	3.5	72	2.4	1
エリスロマイシン	95	13.8	80	14.6	88	8.8	3
クラリスロマイシン	97	12.5	100	4.0	100	4.9	1
タイロシン	87	12.3	93	1.7	86	5.0	1
セフジトレンピボキシル	95	5.1	93	3.0	123	3.7	1
クロルテトラサイクリン	93	8.2	59	3.1	144	6.1	3
オキシテトラサイクリン	104	10.9	88	5.7	149	5.5	1
ドキシサイクリン	105	5.8	73	5.1	127	5.9	3
テトラサイクリン	93	6.8	95	5.7	145	5.7	3
トシル酸トスフロキサシン	102	7.0	196	5.7	213	4.5	10
オフロキサシン	95	13.0	96	2.7	97	6.6	10
エンロフロキサシン	76	15.9	88	7.0	89	4.7	10
メシル酸ダノフロキサシン	95	7.8	122	8.4	122	3.4	10
シプロフロキサシン	89	3.6	149	6.4	156	2.1	10
ノルフロキサシン	98	7.8	86	7.2	90	1.9	10
アンピシリン	86	8.6	74	2.9	89	3.2	3
オセルタミビルリン酸塩	108	3.6	102	3.3	103	4.6	1
オセルタミビルカルボン酸	72	6.9	81	3.6	83	2.5	1
トリクロカルバン	88	4.5	85	5.7	83	9.8	1

添加濃度は10ng/Lとし、5併行で添加回収試験を実施した。

用標準溶液は、超純水1Lに標準溶液を段階的に添加して試料と同様に抽出操作したものを用いた。作成した検量線を用いて定量を行った。

作成した分析法を用いて妥当性評価を行った。超純水、水道水及び河川水1Lに混合標準液を10ng/Lとなるように添加した試料を5併行で分析し、真度(%)及び併行精度(RSD%)を評価した。

結果及び考察

1. 分析法及び妥当性評価

試験溶液及び標準液はメタノール溶液のままLC/MS/MS測定するとピーク形状が悪い物質があった。0.2%ギ酸水溶液で2倍希釈してから測定したところ、ピーク形状の改善が見られたため、測定直前に希釈操作を行うこととした。

本分析法の妥当性評価の結果を表4に示した。超純水添加試料(添加濃度10ng/L, n=5)を測定した結果、エリスロマイシン以外の23物質では真度72~108%、併行精度3.3~15.9%で、全て水道水質検査の妥当性評価ガイドライン⁵⁾の農薬類の目標値(真度70~130%、併行精度 \leq 30%)を満たした。エリスロマイシンは溶媒検量

線で定量したところ、真度が22%となり、この抽出法では回収率が悪いことが明らかとなった。そこで回収率を補正するため、検量線用標準溶液についても試料と同様に抽出操作を行い、定量を試みた。その結果、添加試料の真度は95%、併行精度は13.8%で良好な結果が得られたため、エリスロマイシンについてはこの定量法を採用することとした。

実試料(水道水及び河川水)への添加試料の真度は、水道水添加試料では21物質が、河川水添加試料では18物質が目標値を満たした。併行精度は全ての物質で目標値を満たした。トシル酸トスフロキサシンの真度は河川水添加で213%と最も高く、マトリックスによる影響と推察された。内部標準法を用いることでマトリックスによる影響を濃度補正できる可能性が考えられたが、適切な内部標準物質を入手できなかったため検討は行わなかった。

本分析法は超純水添加ではすべて目標値を満たし、実試料添加でも併行精度は良好な結果が得られ、真度も概ね50~200%程度の範囲内であった。河川水中の濃度レベルの把握には十分な精度の分析法であると考えられた。

表5 季節ごとの河川水18地点中の抗微生物剤を検出した地点数及び検出濃度（検出された11物質のみ）

測定対象物質	春 2018.3		夏 2018.8		秋 2018.11		冬 2019.2		定量 下限値
	検出数*	検出濃度**	検出数*	検出濃度**	検出数*	検出濃度**	検出数*	検出濃度**	
スルファモノメトキシシン	3/18	1.0~19	2/18	3.1~5.6	2/18	11~48	2/18	11~45	1
スルファメトキサゾール	10/18	1.4~7.4	1/18	1.2	11/18	1.0~8.2	10/18	1.0~11	1
スルファピリジン	6/18	1.2~11	0/18	—	5/18	1.0~7.3	5/18	1.1~3.5	1
エリスロマイシン	0/18	—	0/18	—	1/18	5.3	1/18	3.2	3
クラリスロマイシン	10/18	1.0~16	4/18	1.4~1.6	12/18	1.0~12	12/18	1.0~16	1
タイロシン	0/18	—	0/18	—	0/18	—	2/18	1.0~9.9	1
オキシテトラサイクリン	3/18	1.7~19	2/18	1.0~6.5	6/18	1.0~300	10/18	1.0~880	1
テトラサイクリン	0/18	—	0/18	—	1/18	3.5	1/18	12	1
オセルタミビルリン酸塩	1/18	1.0	0/18	—	0/18	—	8/18	1.1~3.6	1
オセルタミビルカルボン酸	9/18	1.0~3.1	0/18	—	0/18	—	12/18	1.4~12	1
トリクロカルバン	0/18	—	0/18	—	1/18	1.1	0/18	—	1

* 18地点中の検出地点数

** 検出された濃度範囲 (ng/L)

表6 冬季（2月）の各採水地点における抗微生物剤検出濃度（検出された10物質のみ）

(濃度単位: ng/L)

地点 No.	サルファ剤			マクロライド系			テトラサイクリン系		抗インフルエンザ薬、代謝物	
	スルファモノ メトキシシン	スルファ メトキサゾール	スルファ ピリジン	エリスロ マイシン	クラリスロ マイシン	タイロシ ン	オキシテトラ サイクリン	テトラ サイクリン	オセルタミビル リン酸塩	オセルタミビル カルボン酸
1	ND	3.7	2.5	ND	6.7	ND	1.0	ND	1.6	5.1
2	ND	4.0	1.8	ND	6.9	ND	1.1	ND	3.0	12
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.4	ND	ND	ND
4	ND	2.1	ND	ND	2.0	ND	1.0	ND	ND	4.3
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.4	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	1.7	ND	ND	3.1	ND	ND	ND	ND	4.4
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.4
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.5	ND	ND	ND
11	45	ND	ND	ND	1.6	9.9	880	12	ND	ND
12	11	2.5	ND	ND	3.5	ND	59	ND	1.4	6.1
13	ND	ND	ND	ND	1.0	ND	1.9	ND	ND	2.0
14	ND	1.0	ND	ND	16	ND	ND	ND	1.3	3.4
15	ND	2.7	ND	3.2	9.4	ND	1.2	ND	2.4	6.4
16	ND	3.6	1.6	ND	11	1.0	ND	ND	1.8	2.1
17	ND	11	3.5	ND	11	ND	ND	ND	3.6	2.1
18	ND	2.6	1.1	ND	3.2	ND	ND	ND	1.1	4.0
19*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
定量 下限値	1	1	1	3	1	1	1	3	1	1

ND: 定量下限値未満

*: 地点19は水道水試料

2. 存在実態調査

河川水試料（18地点×4回）の季節ごとの検出結果を表5に示した。河川水では11物質が検出された。18地点中半数以上の地点で検出され、検出率が高かった物質は、クラリスロマイシン（春、秋、冬）、スルファメトキサゾール（春、秋、冬）、オキシテトラサイクリン（冬）、オセルタミビルカルボン酸（春、冬）であった。季節ごとの結果を比較すると、夏は春、秋、冬に比べて検出数が少なかった。夏季は水温が高く雨量が多いため、水中微生物等による生分解や増水による希釈等の要因により水中濃度が低くなるのが推察された。冬季は一般

的に風邪など呼吸器系感染症が多く発生することも季節差に影響したと考えられた。オセルタミビルリン酸塩及びその代謝物であるオセルタミビルカルボン酸は冬または春に多く検出され、抗インフルエンザ薬の一般的な服用時期と一致した。検出濃度が比較的高かった物質はオキシテトラサイクリンで最大値880ng/L（冬）、スルファモノメトキシシンで最大値48ng/L（秋）であった。水道水からはいずれの物質も検出されなかった。水道原水中に残存した物質は浄水場における浄水処理の過程において分解・除去されたと考えられた。

冬季（2月）の採水地点別の検出濃度結果を表6に示

した。小鮎川の採水地点（10、11及び12）において、地点11及び12ではオキシテトラサイクリン及びスルファモノメトキシンの2物質の検出濃度が高かった。地点11の検出濃度は、その上流に位置する地点10に比べて高いことから、地点10と地点11の間で汚染が生じたことが示唆された。テトラサイクリン系抗生物質やサルファ剤は畜産動物でも多く使用される薬剤である⁴⁾。小鮎川では、採水地点11の付近からその下流に畜産施設が存在するため、動物に投与された薬剤が河川へ流出した可能性が推察された。当所で過去に行った相模川水系河川における医薬品類の調査³⁾においても、同地点ではオキシテトラサイクリンが比較的高濃度で検出された（2007年1月調査）。前回の調査から12年経過したが、この地点においては、河川への抗微生物剤の流出が継続している実態が明らかとなった。

冬季の調査では、オセルタミビルリン酸塩は河川の調査地点18地点中8地点で、オセルタミビルカルボン酸は12地点で検出された。相模川本川では全地点で、支川では比較的下流域に位置する鳩川、小鮎川の地点12、恩曾川、玉川及び永池川の地点において、これら2物質の両方またはいずれか一方が検出された。検出された地点でのオセルタミビルリン酸塩の検出濃度は1.1～3.6ng/L、オセルタミビルカルボン酸の検出濃度は1.4～12ng/Lで、同一地点での検出濃度はオセルタミビルカルボン酸の方がリン酸塩に比べ高濃度に検出された地点が多かった。今回調査を行った相模川水系河川では、オセルタミビル原体に加え、服用した薬剤が生体内で代謝物と

なり、河川へ流出している実態が明らかとなった。また、今回の調査ではオセルタミビル以外の薬剤の代謝物は測定対象ではなかったが、他の薬剤においても河川水中で原体が検出されない場合であっても、その代謝物や分解物が水中に残存する可能性が推察された。医薬品類の代謝物や分解物については、その毒性や生理活性等に未解明な点が多く、ヒトや生態系への悪影響が懸念される。今後は代謝・分解物も含めてモニタリングが可能な分析法の確立や河川水を汚染する化学物質の毒性評価等も重要な課題と考える。

文献

- 1) 上村仁：相模川水系河川水中の医薬品類の分布，神奈川衛研報告，37，60-64（2007）
- 2) 鈴木俊也：水環境中のヒト用医薬品の存在実態及び環境中濃度の予測，東京健安研七年報，63,69-81（2012）
- 3) 井原賢，張晗，花本征也，田中宏明：下水，河川水からの医薬品生理活性の検出，薬学会雑誌，138,281-287（2018）
- 4) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会：薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書（2020），令和3年1月8日
- 5) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について，健水発0906第1～4号，平成24年9月6日〔最終改正平成29年10月18日薬生水発1018第1～4号〕

短報

ミネラルウォーター類中における 農薬類の検出状況

佐藤 学, 仲野 富美, 上村 仁

Survey of pesticides in bottled water

Manabu SATO, Fumi NAKANO
and Hitoshi UEMURA

はじめに

飲料水の安全性について関心が集まる中で、ミネラルウォーター類の需要は年々高まっている。現在ではミネラルウォーター類は飲用や調理等に広く用いられており、この傾向は今後も続くことが予想される。

ミネラルウォーター類は食品の清涼飲料水に区分され、食品衛生法に基づく食品、添加物等の規格基準において成分規格が定められている。平成26年にミネラルウォーター類の個別規格が改正され、検査法や基準値を水道法に基づく水道水質基準¹⁾に近づける形での変更が行われた。一方で、ミネラルウォーター類中の残留農薬については食品中の残留農薬等のポジティブリストに基づき、32種類の農薬類について個別基準が定められ、その他の農薬類については一律基準として0.01 ppm (0.01 mg/L) と定められている²⁾。これらの個別基準、一律基準は水道水質基準に基づく農薬類の目標値とは必ずしも一致していない。

水道水における農薬類は近年の利用状況や生産動向、最新の知見に基づいて目標値の見直しや検査法の改正が毎年のように行われているが、ミネラルウォーター類中の残留農薬の規格基準にはそれらが反映されておらず、基準値も水道水の目標値と大きく異なるものが存在している。飲料水の安全性の観点から、将来的にはミネラルウォーター類中の農薬類についても水道水質基準に準じたものとして測定、検査を行う必要があると考えられる。

ミネラルウォーター類中の農薬類の検出状況については、これまであまり詳細な検討がなされてこなかった。しかし、土壌中における残留農薬の拡散や浅層の地下水脈への農薬類の混入事例³⁾が報告されていることから、

これらの地下水を原水とするミネラルウォーター類における農薬類の実態把握は急務である。

そこで、水道水質基準の対象となる農薬類171項目について、ミネラルウォーター類119検体を対象とした実態調査を行った。これにより複数のミネラルウォーター類から農薬類が検出される等、若干の知見を得たので報告する。

方法

1. 試料

市販のペットボトル入りミネラルウォーター類119種類を店頭や通信販売で購入し検体とした。一部の検体は同一の商品名であったが、ロット番号や製造時期が異なるため別の検体として扱った。119検体のうち国内産の製品は107検体、国外産の製品は12検体であった。

2. 試薬及び試液等

農薬類の混合標準液はいずれも富士フイルム和光純薬工業(株)の66種農薬混合標準液 水質-1-2 (各20 μ g/mLアセトン溶液)、15種農薬混合標準液 水質-2 (各20 μ g/mLアセトン溶液)、28種農薬混合標準液 水質-3 (各20 μ g/mLアセトニトリル溶液)、63種農薬混合標準液 水質-4 (各20 μ g/mLアセトニトリル溶液)、29種農薬混合標準液 水質-9 (各20 μ g/mLアセトニトリル溶液)、農薬混合標準液 水質-6 (各20 μ g/mLメタノール溶液)を使用した。また農薬類の標準品としてC NP-アミノ標準物質、2-ベンズイミダゾールカルバミン酸メチル標準品、チオファネートメチル標準品、ベンフラカルブ標準品、DPAナトリウム標準品、アミトラズ標準品、メソトリオン標準品、フルボキサム標準品、クロラントラニプロール標準品、BPPS標準品は富士フイルム和光純薬工業(株)残留農薬試験用を使用した。

表1 LC/MS/MS測定条件

HPLC system	Waters ACQUITY H CLASS UPLC
カラム	ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 mm \times 100 mm
移動相	A: 5 mM酢酸アンモニウム水溶液 B: 5 mM酢酸アンモニウムメタノール溶液
グラジエント条件	B: 1%(0 min) \rightarrow B: 40%(2 min) \rightarrow B: 75%(10 min) \rightarrow B: 99%(30-32 min) \rightarrow B: 1%(32-36 min) (直線グラジエント)
カラム流量	0.20 mL/min (B: 1%(32-36 min)のみ0.35 mL/min)
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
サンプル温度	10 $^{\circ}$ C
注入量	50 μ L
MS/MS system	Waters Xevo TQ-S micro
プローブ電圧	0.5 kV (ESI+), -0.5 kV (ESI-)
イオンソース温度	150 $^{\circ}$ C
脱溶媒ガス	N ₂ (500 $^{\circ}$ C) 1000 L/hr
コーンガス流量	50 L/hr
コリジョンガス	Ar 0.15 mL/min

表 2 本試験の概要

区分*	総数	測定対象 農薬類数
対象農薬リスト掲載農薬類 (オキシソニド等)	114	81
要検討農薬類	20	13
その他の農薬類	16	11
除外農薬類	86	47
リスト等未掲載の農薬類	18	13
合計	-	6
	254	171

* 水道水質基準における農薬類の分類

テフリルトリオン代謝物B (CMTBA), スルホキサフロルは林純薬工業 (株) の標準品を用いた。メタノール, アセトンは富士フィルム和光純薬工業 (株) 残留農薬試験用を用いた。アセトニトリルは富士フィルム和光純薬工業 (株) LC/MS用を用いた。酢酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬工業 (株) 試薬特級を用いた。精製水は, 富士フィルム和光純薬工業 (株) 超純水LC/MS用及び, 超純水製造装置 (Milli-Q Integral MT 5 ; Merck社製) で作成した超純水を用いた。

3. 装置及び測定条件

農薬類の分析は, 水道水及び河川水の農薬類を対象とした直接注入-LC/MS/MS一斉分析法⁴⁾を一部変更して使用した。検体には残留塩素等は含まれていないことから残留塩素除去のための薬剤は用いず, ろ過等も行わずに直接LC/MS/MSに導入し, 測定した。測定条件を表1に示す。測定対象とした農薬類は水道法における管理目標設定項目の対象農薬リスト掲載農薬類, 要検討農薬類, その他農薬類のうち直接注入-LC/MS/MS一斉分析法で十分な精度の測定が可能なもの, さらに管理目標設定項目の見直しでリストから除外された農薬類のうち13種, リスト未掲載農薬類であるテフリルトリオン代謝物B (CMTBA), メソトリオン, クロラントラニリプロール, フルボキサム, スルホキサフロル, アミトラズ代謝物6種を加えた171項目である。概要を表2に示す。定量下限値は一律0.010 μg/Lとした。

結果及び考察

本実態調査にて分析を行った119検体中, 23検体から1種類以上の農薬類が検出された。1種類以上の農薬類が検出された検体の測定結果と各検体の情報を表3に示す。なお, 表3における硬度の値は検体のラベルに記載されているものである。

農薬類の検出された検体はすべて国内産のミネラルウォーター類であった。国外産のミネラルウォーター類はCO DEXのナチュラルミネラルウォーター規格 (CXS 108-

1981)⁵⁾に基づき農薬類の基準が定められ, 採水地にも厳格な管理が求められていることから, 検出がみられなかったものと考えられる。また, 測定対象とした171農薬類のうち, 検出された農薬類は12種類であった。検出濃度は水道水質基準における農薬類の目標値および食品における農薬の残留基準のいずれと比較しても低い値であった。

検出された農薬類のうち, プロモプチド, ベンタゾン, ジノテフラン, E-ピリミノバックメチルは水道水からも検出される⁴⁾。これらの農薬類は塩素処理では分解されず, 活性炭処理等でも比較的除去されにくいことが報告されている^{6,7)}。一方, 今回の実態調査ではイソプロチオラン, メトミノストロビン, イミダクロプリド, プロマシルといった水道水からは検出されない農薬類も検出された。これらの農薬類は塩素処理によって分解されることが確認されており^{6,7)}, 水道水においては浄水処理の過程で分解除去されている農薬類である。しかし, 今回調査対象としたミネラルウォーター類は, その製造過程において塩素処理や活性炭処理等を行わずにボトルに封入される。これにより原水中に存在している農薬類が製造過程で除去されずにミネラルウォーター類中に残存していることが考えられる。

実態調査においては販売会社や商品名が異なっているが, 同一の採水地点から原水を採水し, 同じ製造会社で製造されているミネラルウォーター類が複数確認できた。このような検体から農薬類が検出された場合, 検体G~Iや検体P~S等のように類似した検出状況であった (表3)。このことから農薬類の混入はミネラルウォーター類の原水となっている地下水の採水地点で起きていることが推察された。

河川水中の農薬類は, 農作物への使用時期や降雨等によって濃度の季節変動を起すことが知られている。一般的には春から夏にかけては農薬類の使用が増え, 降雨等によって河川への流入が増えることで濃度が高くなり, 冬季には低くなる傾向がある⁴⁾。しかし, 今回調査を行ったミネラルウォーター類においては, 製造時期が異なっても濃度の大きな変動は確認できなかった (表3)。表流水である河川に比べ, 地下水であることから季節変動の影響を受けにくいことが考えられる。

表3 農薬類の検出状況及び検体の情報

													(定量下限値:0.010 µg/L)			
検体	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M			
採水地	新潟県A地点		新潟県B地点	山梨県A地点		山梨県B地点	長野県A地点			長野県B地点						
製造年月	2018/7	2020/9	2020/4	2019/10	2019/12	2020/2	2018/11	2019/8	2020/8	2019/12	2020/8	2020/9	2020/12			
分類 ¹⁾	硬度(mg/L)															
対015	イソプロチオラン(IPT)	0.022	0.021	nd	nd	nd	nd	0.021	nd	nd	0.025	0.026	0.022	0.029		
対094	プロモブチド	0.119	0.036	nd	nd	nd	0.015	0.077	0.033	0.031	nd	nd	nd	0.011		
対099	ベンタゾン	0.051	0.110	nd	nd	nd	nd	0.109	0.125	0.132	0.017	0.023	0.019	0.021		
対110	メミノストロピン	nd ²⁾	nd	nd	nd	nd	nd	0.011	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
対111	メトリブジン	nd	nd	0.011	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
要002	イミダクロプリド	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.012	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
要005	エチプロール	nd	0.017	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
要012	プロマシル	nd	nd	nd	0.051	0.041	nd	0.042	0.064	0.069	nd	nd	nd	nd		
他031	ジノテフラン	0.024	0.032	nd	nd	nd	nd	0.049	0.217	0.221	nd	nd	nd	nd		
他063	E-ピリミノバックメチル	nd	0.012	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
除017	カルプロパミド	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.024	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
未003	クロラントラニリプロール	nd	0.016	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		

検体	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W				
採水地	長野県C地点		岐阜県A地点				静岡県A地点		宮崎県A地点	鹿児島県A地点	水道水における目標値(µg/L)	検出数(119検体中)	最大値(µg/L)	
製造年月	2019/9	2020/3	2020/9	2020/9	2020/12	2020/12	2020/8	2020/10	2020/1	2020/2				
分類 ¹⁾	硬度(mg/L)													
対015	イソプロチオラン(IPT)	nd	nd	nd	0.013	0.012	nd	nd	nd	nd	300	9	0.029	
対094	プロモブチド	0.011	0.011	0.016	0.023	nd	nd	nd	nd	nd	100	11	0.119	
対099	ベンタゾン	0.036	0.035	0.137	0.147	0.134	0.121	0.016	0.018	0.036	0.036	200	19	0.147
対110	メミノストロピン	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	40	1	0.011
対111	メトリブジン	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	30	1	0.011
要002	イミダクロプリド	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	100	1	0.012
要005	エチプロール	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10	1	0.017
要012	プロマシル	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.012	0.016	nd	nd	50	7	0.069
他031	ジノテフラン	nd	nd	0.082	0.087	0.085	0.077	nd	nd	nd	nd	600	9	0.221
他063	E-ピリミノバックメチル	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	50	1	0.012
除017	カルプロパミド	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	40	1	0.024
未003	クロラントラニリプロール	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	未設定	1	0.016

1) 水道水質基準における管理目標設定項目の農薬類の区分。対：対象農薬リスト掲載農薬類、要：要検討農薬類、他：その他の農薬類、除：除外農薬類、未：リスト等未掲載の農薬類

2) nd：定量下限値未満。農薬類の検出濃度の単位はµg/Lである

食品中の残留農薬ポジティブリストにおける基準値は一律10µg/Lである（個別基準のある32農薬を除く）

まとめ

ミネラルウォーター類119検体を対象に農薬類の実態調査を行ったところ、119検体中23検体から1種類以上の農薬類が検出された。農薬類の検出された検体はすべて国内産のミネラルウォーター類であった。水道水からは検出されない農薬類が検出されており、原水中に存在している農薬類が製造過程で除去されずにミネラルウォーター類中に残存していることが原因と考えられる。今後は比較的高い濃度で農薬類の検出がみられた検体について、継続的に検体を入手して濃度の推移を把握するとともに、採水地点の降水量、降水の地下への浸透速度、地下水水中での農薬の挙動等をより詳細に調査を行う。また、一般的なミネラルウォーター類の処理方法である中空糸膜ろ過等において農薬類の除去が行われるかの模擬実験等を行うことを予定している。

文献

- 厚生労働省：水質基準項目と基準値（51項目）
〈<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi.html>〉（2021/6/4アクセス）
- 厚生労働省：食品中の残留農薬等
〈https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/zanryuu/index.html〉（2021/6/4アクセス）
- 藤縄克之、飯塚宏栄：潜在的地下水汚染源としての農薬、地下水学会、32(3)、139-146(1990)
- 佐藤学、仲野富美、上村仁：LC/MS/MS一斉分析法を用いた神奈川県相模川流域における農薬類の実態調査、第52回日本水環境学会年会講演集、21(2018)
- Codex Alimentarius Commission：STANDARD FOR NATURAL MINERAL WATERS CXS 108-

1981

<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B108-1981%252FCXS_108e.pdf> (2021/6/4 アクセス)

- 6) 簗内宣博, 吉村誠司, 平林達也, 北本靖子: 対象農薬リスト掲載農薬類の浄水処理性, 水道協会雑誌, **87(6)**, 2-15, (2018)
- 7) 簗内宣博, 外山義隆, 吉村誠司, 平林達也ほか: 要検討及びその他農薬類の淀川水系における存在実態とその浄水処理性, 水道協会雑誌, **88(3)**, 2-15, (2019)

資料

新型コロナウイルス感染症の集団感染 2 事例における施設の環境調査

伊達佳美* 金沢聡子 中村廣志

Environmental investigation in 2 cases of COVID-19 clusters

Yoshimi DATE, Satoko KANAZAWA
and Hiroshi NAKAMURA

2020年、相模原市内の医療機関と福祉施設で新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）による感染症が発生し、管轄の保健所が接触者のPCR検査と疫学調査を実施したところ、共に集団感染事例であることが判明した。当時は流行初期であり、国内で SARS-CoV-2の感染者が利用した施設における環境調査の報告はなかった。そこで、集団感染が判明した医療機関と福祉施設において、環境中のSARS-CoV-2の汚染状況を調査したので報告する。なお、本調査におけるSARS-CoV-2の遺伝子の検出は、相模原市衛生研究所で実施し、一部、国立感染症研究所にご協力いただいた。

検体は、ふき取りにより採取した。採取の方法は、予めリン酸緩衝生理食塩水10mlのうち8mlを除去したふき取り用のスワブ（ふきふきチェックII・栄研化学）で採取場所の表面をぬぐい、残ったリン酸緩衝生理食塩水2mlに懸濁させた。SARS-CoV-2の検出方法は、国立感染症研究所のSARS-CoV-2遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル¹⁾に従い、QIAmp Viral RNA Miniキット（QIAGEN）でRNAを抽出した後、TaqManプローブ（N2セット）によるリアルタイムone-Step RT-PCR法（以下PCR検査）により、ふき取り検体から遺伝子の検出を行った。

事例1 医療機関における環境調査

はじめに、SARS-CoV-2感染者の探知から環境調査に至るまでの経緯と状況を記す。当該機関に勤務する医療

従事者が最初に発症し、PCR検査でSARS-CoV-2の陽性が判明した。接触者調査のため、保健所が入院患者の一斉PCR検査を実施したところ、患者A、Bが陽性であった。患者A、Bは初発の医療従事者の発症前から入院しており、PCR検査の前に発熱や咳などの症状があった。

環境調査は、患者A、BのPCR検査陽性判明後に実施され、初発の医療従事者の発症日から6日以上経過していた。環境調査実施時、患者Aは調査対象となる病室で入院を継続、患者Bは調査対象となる病室から移動しており、初発の医療従事者は発症後勤務していなかった。

調査対象は、患者A、Bの病室内と廊下に設置された物品とした。採取場所は、病床やその付近、病室のドアノブ、患者に使用する医療器具、病室内に設置された洗面所・トイレ内、各病室の吸気口、初発の医療従事者が使用した物品など、感染者の飛沫や物理的な接触により汚染されたと予想される場所として、患者Aの病室内33か所、患者Bの病室内17か所および廊下に設置されたパソコンや医療器具等3か所の計53か所をふき取り、検体とした。なお、調査対象の患者Bの病室は、検体採取時に患者Bが病床ごと移動しており、調査対象の病室内に病床がなかったことから、移動前の病室を想定して採材した。

図1に、検体採取場所の見取り図と検出結果を示した。SARS-CoV-2の遺伝子は、53か所のうち21か所から検出された。

患者Aの病室内では、19か所から検出された。そのうち、患者Aの病床付近では、患者が直接接触する取手やボタン類のほか、飛沫による汚染が考えられる家具類表面、床付近のセンサーマット、およびスリッパの外側の13か所から検出された。さらに、洗面所では、蛇口ハンドル、電気スイッチ、および洗面器内部の3か所から、トイレでは、ドアノブ、電気スイッチ、および水洗レバーの3か所から検出されており、これらは、病床から離れているが、接触頻度が高いものと考えられた。このことから、感染者の飛沫により周辺が汚染され、さらに、物理的な接触と感染者の移動に伴い汚染が広がった可能性が考えられた。

患者Bの病室内では、病床付近の冷蔵庫の取手、トイレの水洗レバーの2か所から検出され、それ以外の場所から検出されなかった。また、初発の医療従事者が使用した物品、医療器具、および各病室の吸気口からは検出されなかった。

患者Bの病室2か所以外から検出されなかった理由として、患者Bは調査対象の病室から移動しており、感染者の移動後に消毒・清掃された可能性が考えられた。さらに、オーバーテーブルや医療器具から検出されなかつ

相模原市衛生研究所
〒252-5277 相模原市中央区中央2-11-15
*現 神奈川県衛生研究所 微生物部

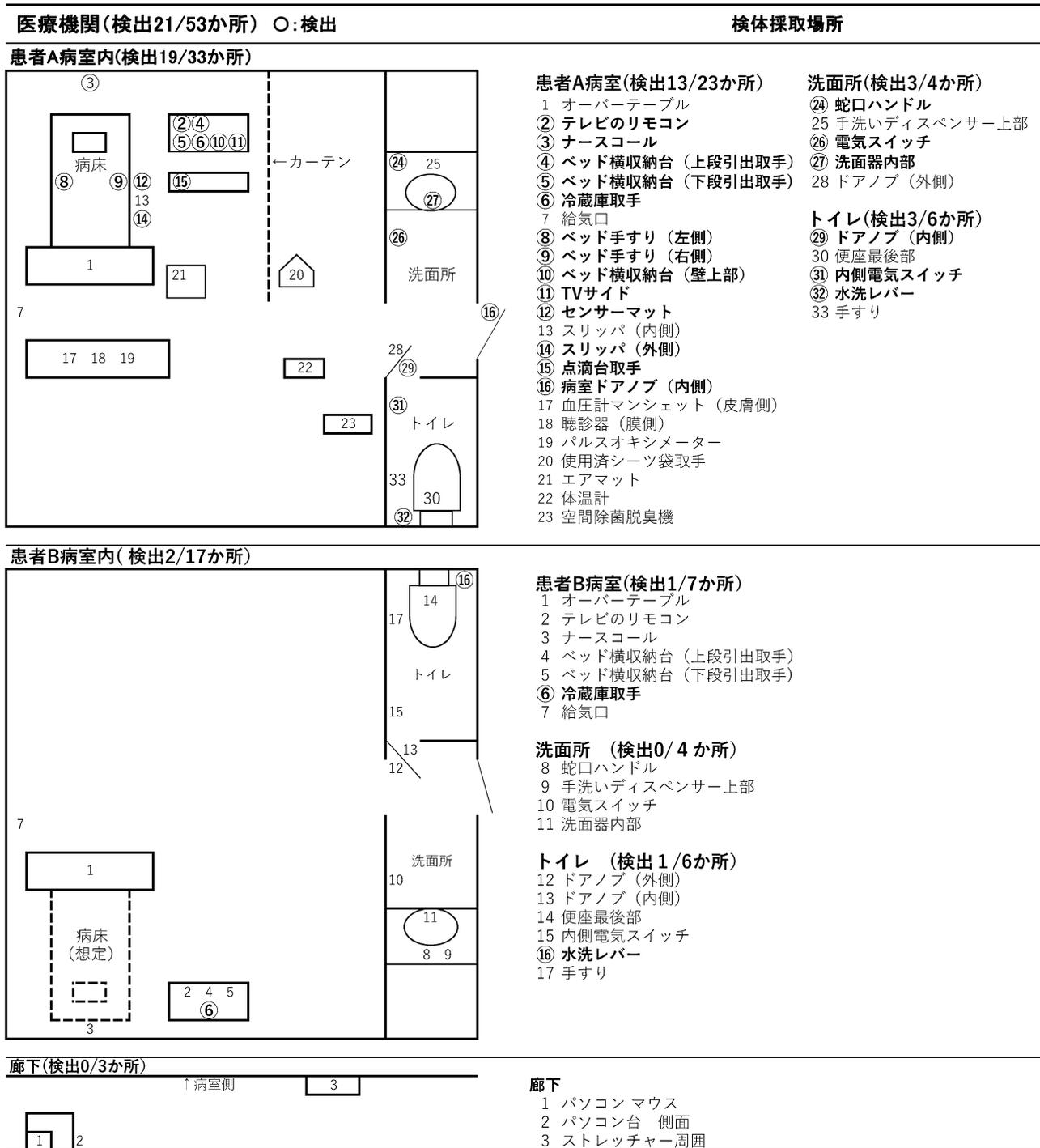


図1 検体採取場所の見取り図と検出結果(医療機関)

たのは、日常的な消毒・清掃によるものと考えられた。

事例2 福祉施設における環境調査

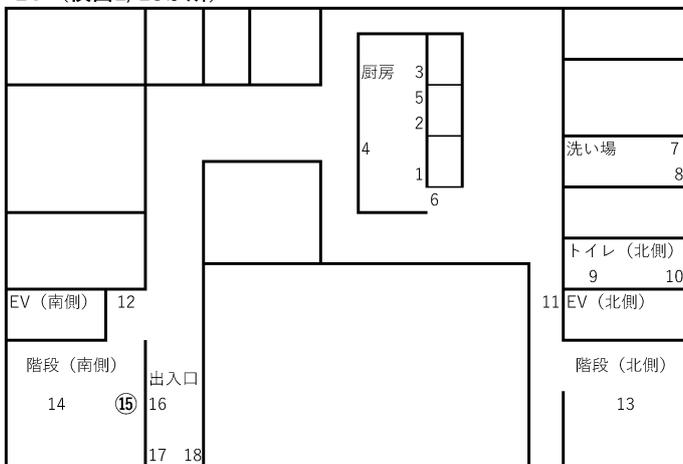
調査の対象は通所型の福祉施設で、最初に職員Aが発症し、翌日PCR検査を行ったところ、SARS-CoV-2の陽性が判明した。職員Aの陽性判明により、保健所が職員や利用者のPCR検査を実施したところ、職員2名と利用者3名計5名が陽性であった。このため、施設の管

理者は施設の利用を停止し、その後、施設内の消毒を行った。施設的环境調査は、施設内の消毒後に実施され、施設の利用停止から6日後であった。

調査対象は3階建ての施設で、初発の職員や感染した利用者が使用し、かつ汚染が考えられる場所として、共用部分のうち、1階の出入口付近や厨房、2階の作業室、3階の作業室や倉庫、階段付近、エレベータ、およびトイレを、個人専用部分のうち、職員や利用者のロッカー

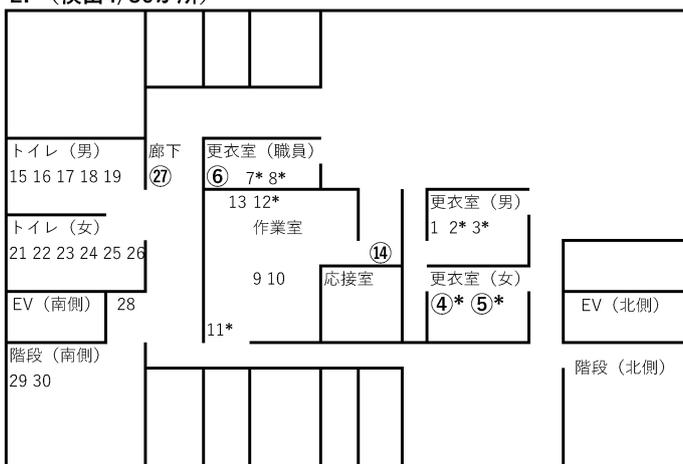
福祉施設 (検出10/60か所) ○：検出 検体採取場所 *は未消毒の採取場所

1F (検出1/18か所)



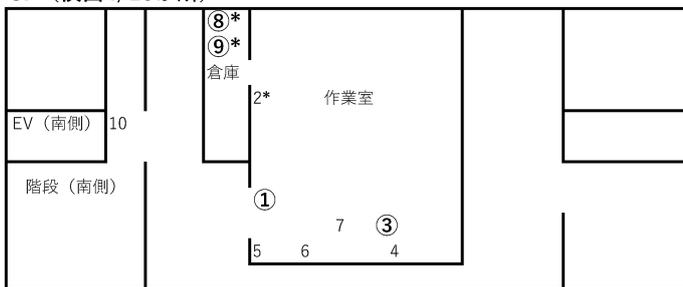
- 1 手洗器 蛇口ハンドル
- 2 冷蔵庫 取手
- 3 戸棚 取手
- 4 シンク 蛇口ハンドル
- 5 ウォークイン冷蔵庫 取手
- 6 ドアノブ 上壁 (廊下側)
- 7 シンク 蛇口ハンドル
- 8 シンク 内側
- 9 電気スイッチ
- 10 便器水洗レバー
- 11 電気スイッチ
- 12 電気スイッチ
- 13 手すり
- 14 手すり
- ⑮ 階段脇壁
- 16 扉取手 (内側)
- 17 手すり
- 18 マット

2F (検出4/30か所)



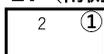
- 1 利用者Aロッカー 取手
- 2 利用者Aロッカー 上履き*
- 3 利用者Aロッカー内ハンガー*
- ④ 利用者Bロッカー内上履き*
- ⑤ 利用者Cロッカー内上履き袋*
- ⑥ 職員ロッカー 取手
- 7 職員ロッカー内スプレー*
- 8 職員ロッカー内サンダル*
- 9 セロテープ
- 10 イス
- 11 入口マット*
- 12 水槽 取手*
- 13 掃除機 取手・コード
- ⑭ エアコンスイッチ
- 15 手洗いディスペンサー
- 16 手洗器 内側
- 17 個室ドア 取手 (外側)
- 18 便器 水洗レバー
- 19 便座最後部
- 20 掃除用モップ
- 21 手洗いディスペンサー
- 22 手洗器 内側
- 23 個室ドア 取手 (外側)
- 24 便器 水洗レバー
- 25 便座最後部
- 26 ほうき
- 27 トイレ電気スイッチ
- 28 スイッチ
- 29 手すり
- 30 床部

3F (検出4/10か所)



- ① 階段側入口前 床部
- 2 洗濯干し*
- ③ セロハンテープ
- 4 エアコン スイッチ
- 5 ショーケース 取手
- 6 ショーケース内 容器
- 7 イス
- ⑧ 体重計*
- ⑨ マイク*
- 10 スイッチ

EV (南側) 内部 (検出1/2か所)



- ① スイッチ
- 2 手すり

図2 検体採取場所の見取り図と検出結果 (福祉施設)

表 1 物品別検出結果と物品ごとの消毒の有無（福祉施設）

物品	設置 場所	消毒後		未消毒	
		検体採取場所の番号*	検出数/検査数	検体採取場所の番号*	検出数/検査数
取手類（蛇口ハンドル・取手・ 手すり・ドアノブ・レバー）	1F	1 2 3 4 5 6 7 10 13 14 16 17	1/22	12	0/1
	2F	1 ⑥ 13 17 18 23 24 29			
	3F	5			
	EV内	2			
ボタン類（ボタン・リモコン・ スイッチ）	1F	9 11 12	2/9		0/0
	2F	⑭ 27 28			
	3F	4 10			
	EV内	①			
壁（階段脇）	1F	⑮	1/1		0/0
床付近（マット・床部）	1F	18	1/3	11	0/1
	2F	30			
	3F	①			
その他（シンク等内側・セロハンテープ・ イス・手洗いディスペンサー・便座・ ほうき・モップ・容器・洗濯干し・体重計・ マイク・上履き等）	1F	8	1/14	2 3 ④ ⑤ 7 8	4/9
	2F	9 10 15 16 19 20 21 22 25 26			
	3F	③ 6 7			
計			6/49		4/11

*検体採取場所の番号は図 2 と同様（検体採取場所は図 2 を参照）

が設置されている 2 階の更衣室など、60か所をふき取り、検体とした。

図 2 に、検体採取場所の見取り図と検出結果を示した。SARS-CoV-2 の遺伝子は、60か所のうち 10か所から検出された。検出された場所は、共用部分では 1 階の階段脇壁 1ヶ所、2 階のエアコンのスイッチ 1ヶ所、3 階では作業室内の床、セロハンテープ、倉庫内の体重計、マイクの 4か所、およびエレベータ内部のスイッチ 1ヶ所で、個人専用部分では個人ロッカーの取手やロッカー内部など 3か所で、各階から広範囲に検出された。

表 1 に、物品別検出結果と物品ごとの消毒の有無を示した。個人専用部分の一部や、3 階の倉庫付近を除く共用部分はほとんどが消毒後であった。消毒後の 49か所のうち、取手類 22か所中 1か所、ボタン類 9か所中 2か所、壁 1か所、床付近 1ヶ所、その他 14か所中 1か所、計 6か所から検出された。一方、未消毒の物品 11か所のうち、4か所から検出された。

本調査の対象施設は、感染者が 5 名判明しており、感染者が増えたことにより、SARS-CoV-2 に汚染された場所が拡大し、広範囲になったと考えられた。

接触頻度が高いと思われる取手類からの検出は、22か所中 1ヶ所のみであった。これは、環境調査前に実施された消毒の効果によるものと考えられた。しかし、未消毒の場所があったことも確認され、そこから SARS-CoV-2 の遺伝子が検出された。さらに、消毒済みの場所からも検出されており、施設全体としては広範囲に検出された。加えて、施設の利用停止から 6 日後に SARS-CoV-2 の遺伝子が検出されたことから、SARS-CoV-2 は一定期間、環境中に存在することが確認された。

これらの結果から、SARS-CoV-2 を環境中から除去するために、消毒・清掃は有効であるが、効果的な消毒・清掃方法について検討するとともに、手順書を作成するなど、対策を講ずる必要があると考えられた。さらに、他の自治体では、実際に消毒や清掃の際に接触感染が疑われる事例²⁾が報告されていることから、環境を介した感染の可能性を考慮し、消毒・清掃は慎重に行う必要がある。

SARS-CoV-2 は、咳やくしゃみに伴って排出される飛沫による感染に加えて、接触を介した感染により広がるとされている³⁾。このため、WHO は、汚染場所のモニタリングが SARS-CoV-2 の感染リスクを低減するために必要⁴⁾であるとしている。今回の調査では、飛沫で汚染される可能性のある場所や物理的な接触として、主に手で接触する場所から検体を採取したが、床付近から履物を介して汚染が広がる可能性があることから、検体採取場所の選定、さらに、測定に定量性をもたせるための検体採取や検出方法など、調査を行うにあたり、さらなる検討が必要であると考えられた。

最後に、この調査にご協力をいただきました国立感染症研究所 感染症危機管理研究センターの藤本嗣人先生、花岡希先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 「感染研・地衛研専用」 SARS-CoV-2遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル Ver1.1
〈<https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/10032-sars-cov-ref2.html>〉
(2020/6/1 アクセス)
- 2) 国立感染症研究所IASR:廃棄物を扱う際に接触感染が疑われた清掃員や医療従事者のSARS-CoV-2感染,
〈<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/2488-idsc/iasr-news/10327-496po2.html>〉 (2021/5/5 アクセス)
- 3) 篠原直秀:新型コロナウイルスの感染対策に有用な室内環境に関連する研究事例の紹介, 室内環境学会誌, 23, 2, 99-106 (2020)
- 4) World Health Organization; Cleaning and disinfection of environmental surfaces in the context of COVID-19,
〈<https://www.who.int/publications-detail/cleaning-and-disinfection-of-environmental-surfaces-in-the-context-of-covid-19>〉
(2020/12/10アクセス)

資料

神奈川県における腸管出血性大腸菌の
 検出状況 (令和2年度)

政岡智佳, 鈴木美雪, 古川一郎

Occurrence of enterohemorrhagic
Escherichia coli in Kanagawa Prefecture
 (April,2020-March,2021)

Tomoka MASAOKA, Miyuki SUZUKI,
 Ichiro FURUKAWA

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: 以下, EHECと略す) 感染症は, 「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(平成10年10月2日法律第114号) で三類感染症に分類され, EHEC感染症の患者を診断した医師は, 保健所を経由して都道府県知事に直ちにその者の氏名, 年齢, 性別その他厚生労働省令で定める事項を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採知することにより感染の拡大防止に努めている. 「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」(平成30年6月29日付, 事務連絡) において, これまで実施されていた遺伝子型別検査であるパルスフィールド・ゲル電気泳動 (以下, PFGEと略す), IS-Printing Systemおよび反復配列多型解析法 (Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, 以下MLVAと略す) の中から, 広域的な事案の採知の迅速化のために, 異なる検査機関で実施した検査の結果が比較可能なMLVAによる遺伝子解析を実施することで統一された. 感染研ではMLVA解析について2014年から血清型O157, O26およびO111について解析が実施されており, さらに2017年からは血清型O103, O121, O145, O165およびO91についても解析が実施され, その結果が各自自治体に報告されている²⁾. また, 溶血性尿毒症症候群 (以下, HUSと略す) 発症者については, 便からのペロ毒素 (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) から搬入されたEHECについて血清型別, 毒素型別, 薬剤感受性試験, PFGEおよびMLVA (血清型O157, O26およびO103のみ) を実施している. 本報では, 令和2年度に収集したヒトから分離されたEHEC27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.

EHEC27株のうち24株は県域の医療機関等で分離さ

表1 菌株の血清型および毒素型

施設	合計 (株)	血清型						
		O157		O26	O130		O145	OUT
		VT1&2	VT2	VT1	VT1	VT2	VT2	VT1&2
平塚保健福祉事務所	4	2	1					1
同上 秦野センター	6	3	2	1				
鎌倉保健福祉事務所	3		1				2	
同上 三崎センター	1		1					
小田原保健福祉事務所	1	1						
同上 足柄上センター	2	2						
厚木保健福祉事務所	3	1			2			
同上 大和センター	3	1	2					
藤沢市保健所	4	1	2			1		
合計 (割合)	27	11 (40.7%)	9 (33.3%)	1 (3.7%)	2 (7.4%)	1 (3.7%)	2 (7.4%)	1 (3.7%)

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			0
6-10	2		2
11-20	1	2	3
21-30	2	5	7
31-40	1	3	4
41-50			0
51-60	1	1	2
61-70	1	3	4
>70	3	2	5
計	11	16	27

れ、3株は当所地域調査部において患者家族から分離された。表1には管轄施設別の搬入菌株数、EHECの血清型および毒素型別を示した。27株の血清型および毒素型は、O157(VT1&2) 11株、O157(VT2) 9株、O26(VT1) 1株、O103(VT1) 2株、O130(VT2) 1株、O145(VT2) 2株およびO型別不能(VT1&2) 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11名、年齢範囲6～85歳で平均45.2歳、女性が16名、年齢範囲14～92歳で平均42.5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°Cの条件下で19時間実施した。泳動パターンについてBioNumerics Ver.6.6(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。MLVAは地研協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループで作成した「腸管出血性大腸菌 MLVAハンドブック(O157, O26, O111編) Ver.1.2」³⁾記載の方法に従い実施した。O157(VT1&2)、O157(VT2)およびO157以外の血清型について、PFGEパターンを基に作成したデンドログラムに、O157の菌株についてはMLVAの結果もあわせてパターンごとに記号で表記した(図1, 図2, 図3)。

図1に示したO157(VT1&2)の遺伝子解析の結果、家族内事例1では、PFGEパターンおよびMLVAパターンの両方が一致した。No.1からNo.3の菌株では、PFGEパターンは一致していたが、No.3のMLVAの結果が1遺伝子座のみ異なるsingle locus variant(以下、SLVと略す)であった。同一事例から分離された菌株でもSLVは確認されており⁴⁾、この3株について同一の感染源が疑われたが疫学的関連は認められなかった。図2に示したO157(VT2)の遺伝子解析の結果、2つの家族内事例においてPFGEパターンが一致していた。家族内事例2ではMLVAの結果はSLVではあったが家族間での感染と考えられた。菌株No.14は家族内事例3の菌株No.15およびNo.16とPFGEパターンが一致していたが、MLVAでは3遺伝子座違いであり、さらに疫学的関連も認められなかったことから異なる事例であると考えられた。図3で示したO157以外の血清型における遺伝子解析の結果、家族内事例であったO145の2株はPFGEパターンが一致していた。さらに、O103の2株についてもPFGEパターンが一致しており、さらに居住地も同一自治体であったが感染源を特定することはできなかった。

次に、EHEC 27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)、ノルフロキサシン(NFLX)、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12薬剤についてCLSI(米国臨床検査標準化協会)法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⁵⁾。その結果、7株がいずれかの薬剤に耐性を示し、このうち4株が多剤耐性であった。さらに、2株が1薬剤に対して中程度の耐性を示し、残りの18株は供試した薬剤全てに感受性となり、薬剤耐性パターンは8パターンに分けられた(表3)。最も多くの薬剤に耐性を示し



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

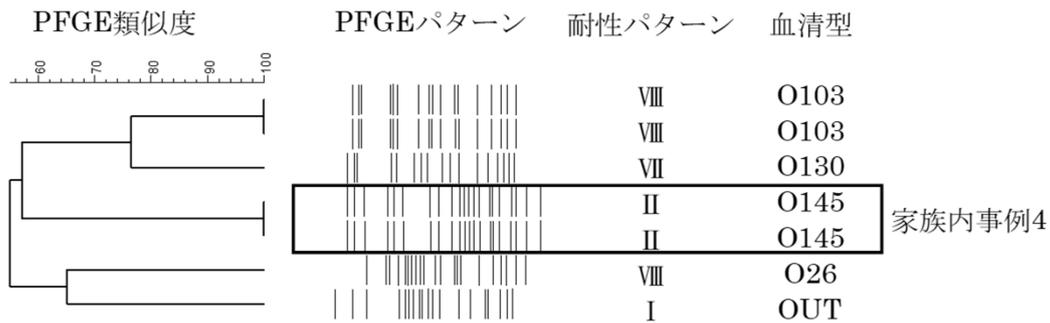


図3 EHEC O157以外の遺伝子解析結果

表3 薬剤感受性試験の結果

		耐性薬剤	パターン	血清型	菌株数
耐性	7剤	ABPC, CP, KM, NA, SM, ST, TC	I	OUT VT1&2	1
	4剤	ABPC, SM, ST, TC	II	O145 VT2	2
		ABPC, CP, SM, TC	III	O157 VT1&2	1
	単剤	SM	IV	O157 VT1&2	2
		CP	V	O157 VT2	1
中間値	単剤	SM	VI	O157 VT2	1
		ABPC	VII	O130VT2	1
感受性			VIII		18
計					27

たのはO型別不能(VT1&2)株で、耐性を示した薬剤の数は7剤であった。今回調査した菌株の中に家族内事例が4つあったが、事例ごとに薬剤耐性パターンは一致していた(図1, 図2, 図3)。

本調査期間中に当所に搬入された菌株は27株であった。このうち9株は家族内事例で全体の3分の1を占めており、EHECの感染対策として家庭内での二次感染を予防することが重要であると考えられた。今回実施した2つの遺伝子解析では、PFGEでパターンが一致したがMLVAでは3遺伝子座が異なっており、異なる感染源であると判断できた事例があった。MLVAの分解能はPFGEと同程度以上である⁶⁾とともに、検査にかかる時間がPFGEと比較し短時間であることから、迅速な対応が求められる集団発生事例等でMLVAによる菌株の解析を実

施することは有用であると考えられた。

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

最後に、ご協力を頂きました各医療機関、医療検査機関、衛生研究所地域調査部および菌株搬入にご尽力いただきました各保健福祉事務所、生活衛生課、医療危機対策本部室ならびに藤沢市保健所の方々に深謝いたします。

参考文献

- 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) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課食中毒

- 被害情報管理室：腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について, IASR, 40, 83-85(2019)
- 3) 地研協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編, 腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック(O157, O26, O111編)Ver.1.2, (2018)
- 4) 松本裕子, 小泉充正, 小川敦子, 後藤千恵子, 吉野友章, 田中伸子: MLVA解析を活用した迅速な行政対応が可能であった腸管出血性大腸菌O157食中毒事例-横浜市, IASR, 40, 76-77(2019)
- 5) Clinical and laboratory standards institute; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, CLSI document M100-S25, (2015)
- 6) Izumiya *et al.*: New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111, Microbiol Immunol, 54, 569-577(2010)

資料

神奈川県における食品中の残留農薬等
 一日摂取量調査 (平成27~29年度)

林 孝子, 福光 徹, 萩尾真人, 桑原千雅子

Analytical study on daily intake of
 pesticide residues in
 Kanagawa Prefecture
 (April, 2015-March, 2018)

Takako HAYASHI, Toru FUKUMITSU,

Masahito HAGIO and Chikako KUWAHARA

日常の食事を介して、食品中に残留する農薬をどの程度摂取しているかを把握するため、厚生労働省ではマーケットバスケット方式による食品中の残留農薬等一日摂取量調査を全国規模で実施している。当所では平成17年度より本事業に参加し、神奈川県域における食品中に残留する農薬の一日摂取量実態調査を行ってきた。今回、平成27~29年度に実施した結果について報告する。

神奈川県内の小売店で各年11月に購入した食品及び当所研究棟実験室で採水した水道水を試料とした。平成27年度は平成20~22年の国民健康・栄養調査¹⁾より、平成28、29年度は平成23~25年の国民健康・栄養調査より集計・平均して得られた関東I地域の食品群別摂取量に基づき食品を分類、秤量、調理し、食品群ごとに均一に混合したものを試料とした(表1)。調査対象農薬は、自治体・検疫所等のモニタリング検査において、比較的検出頻度の高い農薬20種類を選定した(表2)。

測定には、LC-MS/MS装置としてWaters社製のLC(ACQUITY UPLC H-class)とMS(Xevo-TQ MS)を用いた。分析カラムはACQUITY UPLC BEH C18(2.1x50 mm, 1.7 μm, Waters社製)を用い、カラム温度は40℃、移動相はA液(5 mM 酢酸アンモニウム水溶液)とB液(5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液)を用いたグラジエント送液とした。送液条件は、流速0.353 mL/minにてB液%を15(0 min) — 40

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

表1 調査対象試料 (平成27~29年度)

群	食品分類	平成27年度		平成28, 29年度	
		食品 摂取量* (g)	混合 食品数	食品 摂取量* (g)	混合 食品数
I	米・米加工品	281.8	4	303.2	4
II	その他穀類・いも類・種実類	160.7	29	176.8	29
III	砂糖類・菓子類	31.5	14	35.0	14
IV	油脂類	9.9	6	11.6	6
V	豆類	47.5	11	54.6	11
VI	果実類	105.5	23	110.1	23
VII	緑黄色野菜	95.1	19	104.7	20
VIII	淡色野菜・きのこ・海藻類	184.5	22	199.6	22
IX	嗜好飲料	557.7	14	601.4	14
X	魚介類	66.0	34	67.0	34
XI	肉類・卵類	107.5	18	124.3	19
XII	乳・乳製品	111.8	9	132.6	9
XIII	調味料	87.7	11	93.6	11
XIV	飲料水	600	1	600	1

* : 関東I地域の一日摂取量

表2 調査対象農薬

農薬名	分類
アセタミプリド	ネオニコチノイド系殺虫剤
アゾキシストロビン	ストロビルリン系殺菌剤
イマザリル	イミダゾール系防かび剤殺菌剤
イミダクロプリド	ネオニコチノイド系殺虫剤
クロチアニジン	ネオニコチノイド系殺虫剤
シアゾファמיד	シアノイミダゾール系殺菌剤
ジノテフラン	ネオニコチノイド系殺虫剤
シプロジニル	アニリノピリジン系殺菌剤
チアクロプリド	ネオニコチノイド系殺虫剤
チアメトキサム	ネオニコチノイド系殺虫剤
ピラクロストロビン	ストロビルリン系殺菌剤
フェンプロパトリン	ピレスロイド系殺虫剤
フルフェノクスロン	ベンゾフェニル尿素系殺菌剤
ボスカリド	アニリド系化合物殺菌剤
メソミル	カーバメート系殺虫剤
ルフェスロン	ベンゾイルフェニルウレア系殺虫剤
アセフェート	有機リン系殺虫剤
クロルピリホス	有機リン系殺虫剤
ペルメトリン	ピレスロイド系殺虫剤
シベルメトリン	ピレスロイド系殺虫剤
シメコナゾール	トリアゾール系殺菌剤

(0.19 min) — 40 (0.66 min) — 50 (1.13 min) — 55 (1.51 min) — 95 (3.31 min) — 95 (5.67 min) と直線勾配で変化させ、注入量は2 μLとした。MS条件においては、イオン化法はESI(ポジティブモード)、脱溶媒温度は500℃、キャピラリ電圧は0.5 kV、測定モードはSRM(選択反応モニタリング)で測定を行った。

分析方法は、I-XIII群は厚生労働省通知²⁾別添試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」に準じ実施した。I-V, X-XIII群は試料10 g(IV群は5 g)を採取し、穀類、豆類及び種実類の場合の抽出を行った。

表3 一日摂取量調査結果（平成27～29年度）

農薬名	ADI ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	平成27年度			平成28年度			平成29年度		
		検出された 食品群	EDI ³⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	対ADI比 (%)	検出された 食品群	EDI ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	対ADI比 (%)	検出された 食品群	EDI ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	対ADI比 (%)
アセタミプリド	71	VI	0.0062	0.0087	VI, VIII	0.0087	0.012	VI, VII, IX	0.0064	0.0091
アゾキシストロビン	180	— ⁴⁾	0	0	VI, VII, X	0.0087	0.0048	VI, VII, VIII, IX	0.032	0.018
イマザリル	25	VI	0.018	0.070	VI	0.22	0.87	VI	0.013	0.053
イミダクロプリド	57	—	0	0	VII, VIII, IX	0.0092	0.016	VI, VII	0.072	0.13
クロチアニジン	97	VII	0.011	0.011	VI, VII	0.015	0.016	I, VII	0.0020	0.0021
シアゾファミド	170	—	0	0	VII	0.038	0.022	—	0	0
ジノテフラン	220	VII	0.042	0.019	VI, VIII	0.083	0.038	I, VII, VIII	0.065	0.029
シプロジニル	27	—	0	0	VI	0.0046	0.017	VI	0.0015	0.0055
チアクロプリド	12	—	0	0	VI	0.00045	0.0037	VI	0.0014	0.012
チアメトキサム	18	VII	0.029	0.16	—	0	0	VII, VIII	0.0056	0.031
ピラクロストロビン	34	—	0	0	VI, VII, VIII	0.0081	0.024	VI	0.00057	0.0017
フェンプロパトリン	27	—	0	0	—	0	0	—	0	0
フルフェノクスロン	37	VI, VII	0.0033	0.0088	VII	0.11	0.31	IV	0.00015	0.00041
ボスカリド	44	VII	0.0034	0.0078	VI, VII	0.031	0.071	VI, VII, IX	0.059	0.13
メソミル ¹⁾	20	—	0	0	VIII	0.0013	0.0065	—	0	0
ルフェスロン	14	—	0	0	VII	0.024	0.17	—	0	0
アセフェート	2.4	—	0	0	*	*	*	*	*	*
クロルピリホス	1.0	—	0	0	*	*	*	*	*	*
ベルメトリン	50	* ⁵⁾	*	*	—	0	0	—	0	0
シベルメトリン	50	*	*	*	IV	0.00089	0.0018	—	0	0
シメコナゾール	8.5	*	*	*	*	*	*	—	0	0

1) 対象成分はメソミルとチオジカルブ 2) 一日摂取許容量 3) 推定一日摂取量, 体重50.0 kgで算出 4) 不検出 5) 調査未実施

このうちI-III及びV群は採取試料に水を20 mL加えたのち抽出を開始した。VI-IX群は試料20 g (IX群は5 g)を採取し、果実及び野菜の場合の抽出を行った。いずれもENVI-Carb/NH₂カートリッジによる精製の前に、無水硫酸ナトリウムによる脱水操作を追加した。

XIV群については、水道水試料500 mLに脱塩素操作としてアスコルビン酸ナトリウムを0.01 g添加したのち、硝酸(1+10)でpH値を3.5に調整した。Oasis HLB Plus カートリッジに全量を負荷後、アセトニトリル5 mLでバックフラッシュ溶出を行い、濃縮乾固後メタノールに溶解し試験溶液とした。

各年度の調査結果を表3に示す。平成27年度は対象農薬の検出された食品群数が2群、検出された農薬数が7種類であったが、平成28年度は検出食品群数が6群、検出農薬数が15種類、平成29年度は検出食品群数が6群、検出農薬数が12種類となり、平成28、29年度に検出された食品群数、農薬数はいずれも平成27年度の約2倍となった。この傾向は、厚生労働省の一日摂取量調査結果(全国)^{3,5)}においても同様であった。調査期間中に農薬が検出され食品群のうち、検出件数が多い食品群はVI群(果実類, H27: 3種類, H28: 9種類, H29: 8種類, 延べ20件)、VII群(緑黄色野菜H27: 5種類, H28: 8種類, H29: 7種類, 延べ20件)であった。調査対象農薬は、実際に使用頻度が高く自治体・検疫所等

のモニタリング検査で比較的検出頻度も高い農薬を選択しているため、調査結果でVI群、VII群に農薬検出が集中したと考えられた。

調査期間中に農薬が検出されなかった食品群はII群(その他穀類・いも類・種実類)、III群(砂糖類・菓子類)、V群(豆類)、XI群(肉類・卵類)、XII群(乳・乳製品)、XIII群(調味料)、XIV群(飲料水)の7群であった。また、調査期間中に検出されなかった農薬はフェンプロパトリン、アセフェート、クロルピリホス、ベルメトリン、シメコナゾールの5種類であった。一方、3年間にわたり同じ食品群から検出された農薬は、アセタミプリド(VI群)、イマザリル(VI群)、クロチアニジン(VII群)、ボスカリド(VII群)の4農薬であった。

検出された農薬については、健康への影響を確認するため、いずれも推定一日摂取量(EDI)を算出し、各農薬の一日摂取許容量(ADI)から対ADI比を算出した(表3)。平成27～29年度の調査期間中検出された農薬の対ADI比は、いずれも1%未満となった。なお、最大の対ADI比は、平成28年度に実施したVI群(果実類)のイマザリル(柑橘類等の防かび剤、ポストハーベストとして使用)の0.87%であった。

まとめ

平成27～29年度に当所で実施した食品中の残留農薬

等一日摂取量調査において、神奈川県内に流通している食品から検出した農薬の推定一日摂取量（EDI）はいずれも一日摂取許容量（ADI）より十分に小さく、健康に影響を及ぼすおそれはないものと考えられる。

文献

- 1) 厚生労働省：国民健康・栄養調査ホームページ
〈https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kenkou_eiyou_chousa.html〉（2022/4/23アクセス）
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について，食安発第0124001号，平成17年1月24日。
- 3) 厚生労働省：平成27年度 食品中の残留農薬等の一日摂取量調査結果
〈<https://www.mhlw.go.jp/content/000333558.pdf>〉（2022/4/23アクセス）
- 4) 厚生労働省：平成28年度 食品中の残留農薬等の一日摂取量調査結果
〈<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzentu/0000201935.pdf>〉（2022/4/23アクセス）
- 5) 厚生労働省：平成29年度 食品中の残留農薬等の一日摂取量調査結果
〈<https://www.mhlw.go.jp/content/000500686.pdf>〉（2022/4/23アクセス）

他誌掲載論文抄録

(令和2年4月～令和3年3月)

Periodic Genotype Shifts in Clinically Prevalent *Mycoplasma pneumoniae* Strains in Japan

Tsuyoshi Kenri, Masato Suzuki, Tsuyoshi Sekizuka (国立感染研), Hitomi Ohya (神奈川県), Yoichiro Oda (茅ヶ崎市立病院), Tsutomu Yamazaki (若葉こどもクリニック), Hiroyuki Fujii, Toru Hashimoto (倉敷中央病院), Hiroshi Nakajima (岡山県環境保健センター), Chihiro Katsukawa (大阪健康安全基盤研究所, 大阪府立大学), Makoto Kuroda and Keigo Shibayama (国立感染研) *Frontiers Cellular and Infection Microbiology*, 2020: 10: 385.

日本の4地域(神奈川, 岡山, 大阪, 埼玉)で, 2006年から2019年の間に分離された *Mycoplasma pneumoniae* 分離株554株について遺伝子型別分析を行った。日本では2011, 2012, 2015, 2016年に全国的なマイコプラズマ肺炎の流行が見られている。2011年と2012年の分離菌の80%以上は1型系統の菌が占めていたが, 2015, 2016年の流行期には2型系統の菌が増えており, 2017年以降は2型系統の菌が優位になっていた。2010年以降に分離された1型系統の菌の大半は23S rRNA 遺伝子にマクロライド耐性変異を有していたが, 2型系統の菌はほとんどが変異を持っていなかった。この調査の過程で新しい1型の亜型のp1 遺伝子をもつ株も見つかり1b型と命名した。また本研究では, *M. pneumoniae* の遺伝子型別法MLVA, MLSTおよびSNP-8の解釈について, より詳しい理解を得るため, 日本の分離株81株のゲノムを解読するとともに, データベースに登録されている156株の *M. pneumoniae* ゲノムとの比較を行った。これらの情報は, 今後の *M. pneumoniae* 感染症の分子疫学, 進化学的な研究に役立つ。

Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogen

Miriam N Jacobs, Annamaria Colacci, Raffaella Corvi, Monica Vaccari, M Cecilia Aguila, Marco

Corvaro, Nathalie Delrue, Daniel Desaulniers, Norman Ertych, Abigail Jacobs, Mirjam Luijten, Federica Madia, Akiyoshi Nishikawa, Kumiko Ogawa, Kiyomi Ohmori, Martin Paparella, Anoop Kumar Sharma, Paule Vasseur, *Archives of Toxicology*, **94**, 2899-2923 (2020)

経済協力開発機構(OECD)は, 2016年に非遺伝毒性発がん性(NGTxC)のテストと評価(IATA)への統合アプローチを開発するための専門家グループを設立した。NGTxC・IATAでは有害転帰経路(AOP)の概念を使用して, 様々ながんモデルが開発され, 包括的なメカニズムと作用機序が特定された。がんの一般的な特徴に関してさらに改良と構造化を行い, NGTxCが多様な特定のメカニズムを通じて作用し, NGTxC・IATAには, 複数の生物学的特性を含む一連のテストが必要であることが明らかになった。ここでは, NGTxCの定義, 包括的なNGTxC・IATAの開発およびアッセイを評価するためのランク付けパラメータの開発について報告する。最終的な目的は, NGTxC・IATAに統合するための最良の評価アッセイを選択し, 発がん性物質をより適切に特定することにより, 公衆衛生上の発がんリスクを削減することである。

Determination of clenbuterol in various edible parts of livestock products by LC-MS/MS and LC-MS/MS/MS methods

林 孝子(神奈川県), 浜瀬健司(九州大学), *Chromatography*, **42**, 43-48,

DOI: 10.15583/jpchrom.2020.021 (2021)

畜産物の様々な食用部分におけるクレンプテロール残留について, LC-MS/MS及びLC-MS/MS/MS分析による調査を行った。対象食品は, 豚と牛の内臓可食部とした。試料はアセトニトリル抽出後, C18分散固相抽出および陰イオン交換固相カートリッジによる精製を行い, 試験溶液とした。分析は全長10 cmのC18カラムを固定相とし, 5%から99%アセトニトリルまでの10分間のグラジエント溶離を行い, クレンプテロールのピークは4.8分に溶出した。LC-MS/MS測定の結果, 肝臓, 腎臓でクレンプテロールの保持時間前後に夾雑物ピークが検出さ

れたが、LC-MS/MS/MS測定により、殆どの夾雑成分が除去された。MS/MS/MS測定が特異性の高い分析法であるとともに、今回調査した神奈川県内に流通している畜産可食部試料にクレンプテロールが残留していないことを確認した。

Residual analysis of aflatoxins in spice by HPLC coupled with solid-phase dispersive extraction and solid-phase fluorescence derivatization method

Koichi Saito, Junki Ishii, Misaki Naniwa, Rie Ishii, Mihoko Kato, Takahide Kondo, Hikaru Sakurai, Masaru Taniguchi, Shigeki Hashiguchi, Takako Hayashi, Rie Ito, J. AOAC Int., **103**, 1521-1527, DOI: 10.1093/jaoacint/qsaa077 (2020)

発がん性マイコトキシンであるアフラトキシンの食品、特に香辛料中からの微量分析には簡便かつ正確な分析法が必要とされている。今回、固相分散抽出 (SPDE) とイムノアフィニティ (IA) ゲルを組み合わせた固相蛍光誘導体化による前処理と蛍光検出HPLC測定による簡便、迅速、高感度な分析法を開発した。白胡椒と黒胡椒による本分析法の検出限界は0.15–0.29 ng/gであった。また、併行精度は<10%、室内精度は<15%、真度は61.7–87.8%であった。ラボ間での室間精度は<29%、回収率は61.5–76.7%となった。Zスコアは1つのラボで $2 < |z| < 3$ となったものの、他7つのラボでは $|z| \leq 1$ の良好なスコアが得られ、開発した分析法の有用性が確認された。

繊維製品中のディルドリン及びDTTB 分析法の開発

西以和貴, 佐藤学, 仲野富美, 辻清美, 上村仁, 河上強志 (国立衛研) YAKUGAKU ZASSHI, **140**, 809-818 (2020)

わが国の法律 (「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」) で規制されている繊維製品中のディルドリン及び4,6-ジクロロ-7- (2,4,5-トリクロロフェノキシ) -2-トリフルオロメチルベンズイミダゾール (DTTB) の検出には、30年以上前に制定された分析法が用いられてきた。本研究では、安全な試薬を使用し、ディルドリンとDTTBの分析物を同時に検出できる、GC-MSをベースとした改良分析法を開発した。従来の分析法では、DTTBの誘導体化に発がん性物質である硫酸ジメチルを使用していた。今回開発した分析法では、代替試薬である水酸化フェニルトリメチルアンモニウムを用いてDTTBを誘導体化し、良好な結果を得た。ディルドリンと誘導体化したDTTBをGC-MSで分析すると、直線性の高い検量線が得られた。また、塩酸メタノール

で還流抽出することで、分析対象物質が繊維製品から十分に抽出できることを確認した。さらに、Bond Elut PRSカラムを用いた精製法を確立し、羊毛製品に含まれる妨害物質を効果的に除去することができた。最後に、これらの技術を組み合わせて改良分析法を開発したところ、両分析対象物質の回収率は94~104%、相対標準偏差は7%以下を達成した。また、定量限界 (ディルドリン: 1.3 $\mu\text{g/g}$, DTTB: 0.72 $\mu\text{g/g}$) は、日本の規制値である30 $\mu\text{g/g}$ よりも十分に低かった。

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律 (有害物質含有家庭用品規制法) におけるメタノール, トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレン試験法改定に係る検討

河上強志 (国立衛研), 菅谷なえ子 (横浜市衛研), 田原麻衣子 (国立衛研), 大嶋智子 (大安研), 西以和貴, 上村仁, 塩田寛子 (東京都健安研), 鈴木郁雄 (東京都健安研), 田畑佳世 (堺市衛研), 五十嵐良明 (国立衛研) YAKUGAKU ZASSHI, **140**, 1485-1494 (2020)

わが国では「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づき、家庭用エアゾール製品へのメタノール, トリクロロエチレン, テトラクロロエチレンの使用が禁止されている。これらの物質の公定分析法は35年以上も改正されていないため、いくつかの問題が指摘されてきた。そこで先行研究では、公定法を改正するための新たな試験法を開発した。本研究では、メタノール, トリクロロエチレン, テトラクロロエチレンを含む2つのエアゾール製品サンプル (AおよびB) を用いて、新試験法の妥当性評価を行った。サンプルAはこれらの化合物の濃度が規制値に、サンプルBは規制値の10分の1になるように調製した。また、妨害物質となる数種類の揮発性化合物も含有させた。その後、ヘッドスペース/ガスクロマトグラフ質量分析計で分析したところ、クロマトグラム上で対象となる3物質が他の化学物質と分離していることが確認された。

続いて、用意したサンプルを用いて、7機関で新試験法の妥当性評価を行った。その結果、サンプルBのトリクロロエチレンとテトラクロロエチレンの回収率が120%をわずかに超えた機関があったが、他の機関では70~120%であった。各機関の併行精度は10%以下であった。さらに、室間精度は15%以下であった。以上より、今回検証した試験法は、家庭用エアゾール製品に含まれるメタノール, トリクロロエチレン, トリクロロエチレンの改正試験法として有効であると考えられた。

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health No.51 (October, 2021)

CONTENTS

Technical paper

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Study on examination of genetically modified foods by LightCycler[®]480
Chie AKABOSHI, Masashi KAKITA, Yuko HONDA, Eiko SATO, Yosuke UCHIYAMA,
Kiyomi OHMORI, Kiyotaka SAITA, Yuichi YOSHIDA, Hiroki SATO
and Haruko SEKIDO 1

Short reports

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Investigation of aflatoxin contamination in domestic agricultural products and processed
agricultural products retailed in Kanagawa prefecture
Toru FUKUMITSU and Kenichi YASUDA 7
- Monitoring of antimicrobial agents in water of Sagami River
Fumi NAKANO, Manabu SATO and Hitoshi UEMURA 12
- Survey of pesticides in bottled water
Manabu SATO, Fumi NAKANO and Hitoshi UEMURA 17

Data

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- Environmental investigation in 2 cases of COVID-19 clusters
Yoshimi DATE, Satoko KANAZAWA and Hiroshi NAKAMURA 21
- Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April,2020-March,2021)
Tomoka MASAOKA, Miyuki SUZUKI and Ichiro FURUKAWA 26

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Analytical study on daily intake of pesticide residues in Kanagawa Prefecture
(April, 2015-March, 2018)
Takako HAYASHI, Toru FUKUMITSU, Masahito HAGIO and Chikako KUWAHARA 30

-
- Abstracts of original papers by research staffs (April, 2020 - March, 2021) 33
-