

神奈川県衛生研究所研究報告

第52号（令和5年2月）

目次

総説

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

加工食品からのアレルゲンの検出～食品表示における検査から～

渡邊裕子 1

短報

感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県のインターフェロン γ 遊離試験（IGRA）における検体情報管理システムの構築

中嶋直樹，陳内理生，古川一郎 9

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

医薬品製造販売承認書に記載されないカプセル剤皮中のタール色素の分析法の検討及び実態調査

岩橋孝祐，熊坂謙一 13

化粧品中のユビデカレノンの分析法の検討

羽田千香子，甲斐茂美 18

資料

感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（令和3年度）

政岡智佳，鈴木美雪，古川一郎 22

接触者検便および陰性確認検便からの腸管出血性大腸菌検出状況（2016年度～2021年度）

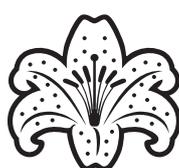
今井良美，片山丘，小松祐子，近藤木綿子，森口真理子，
岩井宏樹，宮原香代子 26

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

神奈川県内で発生したイヌサフラン誤食による食中毒事例

福光徹，萩尾真人，林孝子，桑原千雅子 29

他誌掲載論文抄録（令和3年4月～令和4年3月） 32



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所（令和4年度）

多屋馨子	石川愼一
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	宮原香代子

神奈川県衛生研究所研究報告編集員（令和4年度）

橋本正彦（編集長）	最上恵美子
木村睦未	鈴木理恵子
中嶋直樹	渡邊寿美
宮澤眞紀	吉富太一
森口真理子	岡野内俊子（事務局）

神奈川県衛生研究所研究報告第52号

令和5年2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)

総説

加工食品からのアレルゲンの検出 ～食品表示における検査から～

渡邊裕子

The detection of allergens in processed foods ~From the examination of food labeling~

Hiroko WATANABE

Key Words : 調理・加工, アレルゲン, 食品表示, ELISA, ウエスタンブロット, PCR

はじめに

加工食品の表示にアレルゲンを含む食品と遺伝子組換え食品の表示が加わり、表示制度の検査にELISAやPCRなどの生化学的手法や分子生物学的な手法が採用された。特にアレルゲンを含む食品の表示の検査では、多様な加工食品中のタンパク質を定量するという難題に対して、ELISAによる定量というひとつのものさしを示したと言える。さらに行政監視に検査法を採用しているのは日本のみである。アレルゲンを含む食品の表示制度の立ち上げでは、2001年厚生労働省食品表示研究班において、アレルギー表示検討会と特定原材料検出法検討会が組織された¹⁾。特定原材料検出法検討会は産官学の支援研究機関の協力のもとに発足し、当所もこれに参画することにより検査法に関する調査研究の機会を得ることができた。そして、検査法の設定はアレルギー表示検討会において、特定原材料等が総タンパク質として数 $\mu\text{g/g}$ または数 $\mu\text{g/mL}$ 濃度レベル以上含有する食品には表示が必要であり、表示の必要性を判断するには同一レベルまで検出可能な検査法が不可欠との判断による¹⁾。現在、省令で定められた特定原材料は7品目、通知で定められた特定原材料は21品目となったが(図1)、2002年当初の表示義務は5品目であり、卵、牛乳、小麦、そば、落花生の検査法は11月に示された。検査法に採用されたELISAは各タンパク質標準品の規格が設定され、産官学

神奈川県衛生研究所 企画情報部企画調整課
 〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

<p>義務 特定原材料 7品目 症例の多いもの 卵・牛乳・小麦+えび・かに (2008年6月) 重篤なもの そば・落花生</p>
<p>奨励 特定原材料に準ずるもの 21品目 あわび・いか・いくら・オレンジ・キウイフルーツ・牛肉・くるみ・さけ・さば・大豆・鶏肉・豚肉・まつたけ・もも・やまいも・りんご・ゼラチン+バナナ (2004年12月) +ごま、カシューナッツ (2013年9月) +アーモンド (2019年9月)</p>

図1 表示が必要となった原材料

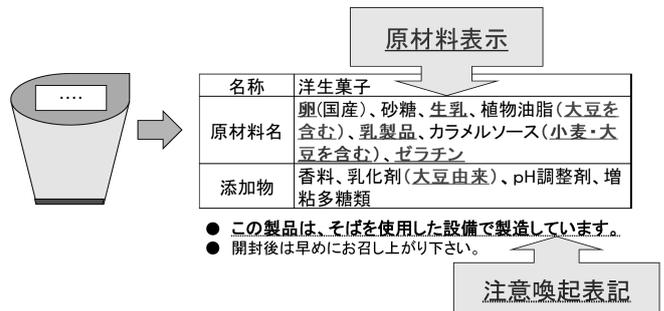


図2 特定原材料表示例

の協力研究機関によりバリデーションがなされた²⁾⁻⁶⁾。尚、各々の検査法の特徴などの詳細は各報告を参照されたい⁷⁾⁻⁹⁾。

アレルゲンを含む食品の表示では、原材料としての表示に加え、コンタミネーションがある場合の注意喚起表記が許されている(図2)^{10), 11)}。注意喚起表記は輸送や製造過程などでのコンタミネーションを表した表記例が決められている。これはこれらの過程でゼロ規制はできないための措置となる。

5品目の検査法は、スクリーニング法であるELISAで定量し、定性法は卵、牛乳はウエスタンブロット法、小麦、そば、落花生はPCR法で確認を行う。ELISAでは抗原認識の異なる抗体を用いた2種類の検出系を用い、何れかの方法で特定原材料のタンパク質量が $10\ \mu\text{g/g}$ 以上となった場合に陽性と判断する。そして原材料表示の確認とスクリーニング検査結果により、定性検査及び製造記録の確認を行う12通りの判断樹が示されており、この判断樹に従い表示が適切かどうかを判断する¹¹⁾。

ここで、食物アレルギーとその原因物質であるアレルゲンについて簡単に触れたい。食物アレルギー患者は乳幼児に多く、その主要な原因食物は卵、牛乳、小麦が占める。成長に従い、果物類、甲殻類が主となり、これらの変化は主に皮膚や腸管の発達段階や花粉症との交差反応などの要因によると考えられている。最近では種類類

表 1 特定原材料の主要アレルゲン

特定原材料	主要アレルゲン
卵	オボアルブミン, オボムコイド, オボトランスフェリン, リゾチーム
牛乳	カゼイン, β -ラクトグロブリン, α -ラクトアルブミン
小麦	グルテン, ω -5グリアジン, α -アミラーゼインヒビター
そば	legumin, Fag e 2, Fag e 5
落花生	Ara h2
えび	トロポミオシン
かに	トロポミオシン
大豆	β -コングリシニン, グリシニン, Gly m Bd 30K, Gly m 8, Gly m 4
くるみ	Jug r 1

の増加が顕著となっており、原因食物の変化は食習慣の変化を表しており、表示制度では3年ごとに品目の見直しが行われている(図1)。次に食物アレルギーの診断では、原因食物の特定に食物中のアレルゲンとなるタンパク質に対する血中IgE抗体価を測定し、最近ではそのうちのタンパク質によるのかまで特定することができるようになってきた¹²⁾。義務化7品目と義務化が検討されているくるみの主要なアレルゲンを表1に示した。このようにアレルゲンタンパク質が特定されると、たとえば、卵アレルギー患者のうちオボアルブミン(OVA)が主要なアレルゲンである場合は加熱卵が摂取可能な場合があり、オボムコイド(OM)が主要なアレルゲンである場合はアレルギー症状が誘発される臨床症状について^{13, 14)}、OVAは熱変性しやすいが、一方OMは熱変性しにくいという科学的根拠から患者が利用可能な加工食品を知ることができ、QOL(生活の質)が向上することとなる。

我々はこのような食物アレルギーの実態から、加工食品によるアレルギー発症の予防のみならず、その利用を目的とした表示制度発足の背景を踏まえ、様々な加工における食品中のタンパク質の変性について解析し、そのアレルギー症状の誘発について、さらにはアレルギー治療に繋がる知見を得ることを目的にいくつかのアプローチで検討を進めてきた。これらの研究について紹介したい。

食肉加工品、冷凍食品の加工条件による影響

神奈川県では行政検査導入前の先行調査として、2003年に県内製造業者の協力のもと、製造記録の明らかな食肉加工品、冷凍食品の加工条件における卵・牛乳の検査結果への影響や製造工程におけるコンタミネーションの状況について調査を行った¹⁵⁾。

牛乳は日本ハム(株)製FASTKITTM牛乳エライザキット(以下乳キット)、(株)森永生科学研究所製モリナガ牛乳測定 β -ラクトグロブリンキット(以下 β -LAGキット)並びにモリナガ牛乳測定カゼインキット(以下CNキット)

の3種のELISAを用いて定量し、牛乳の主要アレルゲンであるカゼインと β -ラクトグロブリン(表1)をウエスタンプロット法で確認した。0.1%の乳を含むしゅうまい以外は検査法に採用された乳キットとCNキットの組み合わせで良好な判定結果となり、乳原材料表示のない食品へのコンタミネーションはなかった。乳原材料の種類によるCNキットと β -LAGキットの検出を比較すると、カゼインナトリウム、脱脂粉乳、乳ではCNキットの値が高く、乳タンパク質では β -LAGキットが高い傾向が見られた。

卵は日本ハム(株)製FASTKITTM卵エライザキット(以下卵キット)、(株)森永生科学研究所製モリナガ卵白アルブミンキット(以下OVAキット)並びにモリナガオボムコイドキット(以下OMキット)の3種のELISAを用いて定量し、卵の主要アレルゲンであるOVAとOMをウエスタンプロット法で確認した。

OMキットは卵原材料表示のある食品のうち、レトルト加工食品以外は陽性となった一方、検査法に採用された卵キットとOVAキットの組み合わせでは卵使用の6食品が陰性となり、レトルト加工食品では定量限界以下となった。

そこで、偽陰性(原材料が使用されているが陰性と判定されること)食品が多かった卵について、抽出液に変性剤を添加しタンパク質を可溶化し測定した結果を表2に示した。偽陰性を示した6食品のうち4食品で陽性となり、尿素と2-MEを添加した抽出液では卵不使用のコンタミネーションによる陽性判定となった食品があった。一方、2食品は定量限界以下となり偽陰性のままであったことから、表示制度における判断には特定原材料の配合割合と使用方法、加工工程などの製造記録の確認が必須であることが示された。

ELISA測定における精度管理の検討

次に2003年より導入した行政検査に伴い、神奈川県内で当該検査を実施していた川崎市健康安全研究所、横浜市衛生研究所とともにELISA測定におけるデータの信

表2 尿素及びSDS添加抽出液による加工食品中の卵タンパク質量の比較

加工食品	卵白含有量 (%)	卵原材料	尿素緩衝液抽出の卵タンパク量 ($\mu\text{g/g}$)	SDS緩衝液抽出の卵タンパク量 ($\mu\text{g/g}$)	キット緩衝液抽出の卵タンパク量 ($\mu\text{g/g}$)		
食肉製品	1	ローストハム	1.6	卵白	>20	19.7	>20
	2	ベーコン	0.5	卵白	6.7	>20	>20
	3	ハムベーコン巻	0.7	卵白	3.9	12.6	>20
	4	ハンバーグステーキ	1.0	卵白, 全卵粉	<2	<2	0.8
	5	ソーセージ①	0.8	卵白	15.9	>20	2.4
	6	ソーセージ②	1.0	卵白	19.3	13.3	>20
	7	ソーセージ③	1.2	卵白	18.7	18.5	16.2
	8	ソーセージ④	0.0		<2	<2	<0.5
	9	ポークシチュー (レトルト処理)	0.9	卵白	15.2	>20	<0.5
	10	ポークシチュー (レトルト処理前)	1.0	卵白	<2	<2	0.5
冷凍食品	11	イカしゅうまい①	0.4	卵白	>20	>20	>20
	12	イカしゅうまい②	0.4	卵白	>20	>20	>20
	13	エビしゅうまい	1.0	卵白	>20	>20	2.7
	14	カニしゅうまい	0.4	卵白	>20	14.5	1.4
	15	しゅうまい①	1.3	卵白	7.6	>20	>20
	16	しゅうまい②	0.0		<2	<2	<0.5
	17	魚ボール①	2.2	卵白	<2	<2	>20
	18	魚ボール②	0.0		16.8	4.1	0.9
	19	野菜豆腐	2.8	卵白	17.2	16.1	>20
	20	春巻き	0.0		<2	<2	<0.5

データは3ウェルの平均値
本表は文献15から引用し、一部改変した。

頼性確保を目的に精度管理についての検討を試みた¹⁶⁾。

精度管理に用いる特定原材料タンパク質標準品等は提供されていなかったため、添加回収率を評価する真度試験を行うことはできないが、実サンプルに近い自家調製した加工食品を用いて、室内精度管理、室間精度管理を行うことを目的とした。先の先行調査での加工条件とその検出値への影響を参考に、簡易で均一な加熱条件となること、また10 $\mu\text{g/g}$ の基準値付近の定量値となるような卵の配合量を検討した。そして、原材料を卵黄とし、調理条件を蒸しとして、卵黄蒸ケーキを作製した。また、蒸し条件を11分、13分、15分として検討した卵キットとOVAキットの測定結果から、卵黄13分蒸ケーキの卵

キットの値が10 $\mu\text{g/g}$ 付近を示したため、これを採用した。

そこで、卵黄13分蒸ケーキを用い、3機関の測定値を比較した。その結果、2回サンプリングした3機関の平均値は1回目は20 $\mu\text{g/g}$ 以上と検量線の範囲外となったが、2回目は15 $\mu\text{g/g}$ 程度となった。次に、1回目、2回目ともに定量値の機関順位が同じ順位であったことから、3機関において抽出法で使用機器が異なったボルトックスミキサーとホモジナイザーの違いや抽出液のpH、ELISAでのスパイクテストを比較したところ、これらはほぼ同等であることが確認された。ゆえに本検討では3機関のELISAの手法や技量は同等であり、これら

の室間・室内精度は確保されていることを確認することができた。一方、実試料での室間における定量値に影響を与えたと考えられる抽出効率を一定とする試料作製の難しさを痛感した。本検査の精度管理は、現在食品衛生外部精度管理調査として実施され、またタンパク質標準品の規格も示されている。精度管理の試みから様々な影響要因を考えると、ELISAキットの安定的な提供や外部精度管理調査の実施に関わる産業界の研究所並びに関係機関の方々に敬意を表したい。

抽出法の変更におけるバリデーション

これまで検査法は2回改正され、品目の追加が1回行われている。2005年の1回目の改正では、抽出液にSDSと2-MEを添加した方法に変更された。先の我々の調査結果においても、加工によるタンパク質変性の影響を受け、使用原材料が偽陰性となる場合があったことから、変性剤を用いた抽出液への変更は表示を監視する検査法として信頼性の向上に繋がると考えられた。

この際の特定原材料キット開発者によるバリデーションに県内共同研究機関2機関とともに参加した¹⁷⁾。株式会社森永科学研究所製の落花生、そば並びに日本ハム株式製の5品目さらに卵、牛乳のウエスタンブロット法を実施した。2005年の改正ではさらに「アレルギー物質を含む食品の検査法を評価するガイドライン」が参考として示され、定量法では試験室間バリデーションは8機関以上、試料数5以上、定性法では6機関以上、試料数5以上となっている。白がゆ、おしるこ、肉団子、かまぼこ、オレンジジュース、コーヒーゼリー、みそ汁など各測定品目にあったモデルサンプルが用意された。バリデーションに参加した10~13機関において1~2機関のデータが棄却されたが、データの採用基準である室間精度25%、変動係数20%をクリアした。そして、県内3機関の室間精度、変動係数はいずれも良好であり、定性法も全て良好であった。さらに県内3機関内のデータを確認し、県内の精度が同等に確保されていることを確認した。一方、各品目におけるモデル試料のデータのばらつきを見ると、精度管理に用いる試料の選定や調製の難しさの一端が感じられた。

新、旧検査法による検出率の比較

次に2005年に改正された検査法である新法と旧法による検出率の違いについて解析を行った¹⁸⁾。神奈川県では原材料表示のない食品による、表示の欠落やコンタミネーションを原因とした誤食を防ぐことを目的に監視を行っている。すなわち表示のない原材料の混入について検査を行っているため、卵、乳表示のない加工食品の

2003~2005年までの旧検査法による卵・牛乳の検出率と2005~2007年までの検出率を比較した。但し、1 $\mu\text{g/g}$ 以上で定性法により確認されたものを検出とした。卵では2003年、2004年の旧検査法の検出率は19%、21%であった。改正のあった2005年は旧から新検査法へ移行する形で実施しており、旧法では10%であったが新法になると29%となった。その後2006年は13%、2007年は21%となった。一方、牛乳は旧検査法の2003年、2004年は27%、36%であったが、新検査法の2005~2007年では17%、14%、8%となった。これらの結果から、2005年の卵では新法への改正による検出率の上昇は抽出効率が向上したことが要因と考えられたが、牛乳では新法改正後に大きく低下した。

さらに卵、乳表示のある加工食品と表示のない加工食品を用いて、新旧の検査法による検出率を比較した。卵では旧法での検出率が8%であったものが、新法では42%となった。一方、牛乳では旧法で37%の検出率であったものが、新法では11%となり、新法では検出されない場合があることが示された。さらに旧検査法抽出液を使用した定性法において、新法の5 $\mu\text{g/g}$ 以下の検出ではOMとCNの分子量バンドの判定が困難となったため、阻害試験を行ったが多数のバンドが残存し判定不能となった。牛乳は加工条件等を検討した先行調査の結果、旧乳キットとCNキットの組み合わせで使用原材料を良好に検出していたものの、新法では検出率が大きく低下したことから、この要因として加熱変性した乳タンパク質の変性剤による高次構造の変化が示唆された。

えび・かにの追加

2008年6月にえび・かにが奨励から表示義務に追加され、検査法は2009年6月に設定された(図1)。えび・かには他の特定原材料とは異なり、漁獲法や食物連鎖による魚介類への混入が考えられ、これを非意図的混入とした。このような非意図的混入をコントロールすることはできないことから、魚介類原材料から加工食品へのえび・かにの混入がどの程度あるのかを把握する必要がある。そこで我々は表示制度の猶予期間である2010年6月製造までの魚介類加工食品について種類別に混入状況を調査した後、本格施行後の2010年7月製造から2012年までの魚介類加工食品におけるえび・かにの混入並びに注意喚起表記について調査を行った¹⁹⁾。尚、えび・かにの検査は甲殻類タンパク質(トロポミオシン)をELISAで定量し、PCRによりえび・かに遺伝子の確認を行う。

2010年6月製造までの20食品のうち原材料として小魚あるいは魚肉が含まれる13食品のうち11食品で甲殻

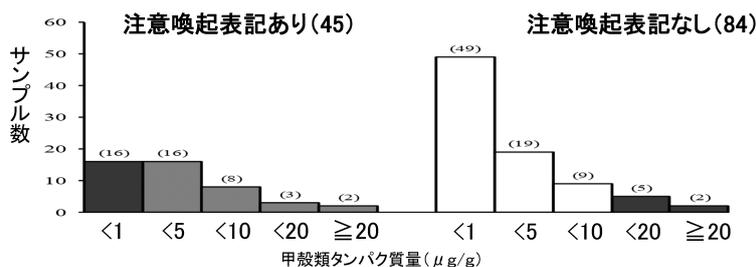


図3 魚介類加工品からの甲殻類タンパク質の検出と注意喚起表記
() 内サンプル数
本図は文献19から引用し、一部改変した。

類タンパク質が検出されたが、貝類や魚エキスおよび魚粉が含まれる7食品からは検出されなかった。そこで、施行後の調査では、魚肉生すり身30食品および魚介類を原材料とする加工食品129食品について測定した。その結果、魚肉生すり身はタラ類やホッケ、ホキなどの大型魚では甲殻類タンパク質は定量限界以下となったが、シログチやイトヨリダイ、ヒメジからはいずれも検出された。そして魚肉すり身を原材料とした魚練り製品の甲殻類タンパク質の混入率は43%、煮干や佃煮などの小魚を含む加工食品の混入率は63%と高い混入率を示した。一方、アサリ、イカなどの魚以外を原材料とする加工食品からは検出されなかった。

さらにPCRによる確認検査では、えび類に含まれるあきあみが検査法であるえびプライマーでは確認できないことから、えび・かにを原材料とする加工食品へのあきあみの混入率をPCRにより調査した。その結果、あきあみの混入率は73%となり、えびの混入率55%を大きく上回ったことから、あきあみプライマーによる確認を追加する必要があると考えられた。

次に注意喚起表記をみると(図3)、表記があり検出されたものと表記がなく検出されなかったもの、すなわち表示が妥当であったものは58%であった。注意喚起表記では2010年に事業者に対しコンタミネーション防止の徹底が推奨されたが、一方えび・かにでは「原材料中の意図しないえび、かにの混入頻度と混入量が低いものについては、患者の食品選択の幅を過度に狭める結果になることから注意喚起表記は必要ない」という判断が消費者庁より示されている¹¹⁾。

えび・かにアレルギー患者がえび、かにの加熱品や加工食品の摂取によりアレルギーを発症した経験のある割合は、それぞれ69%、49%と比較的高いことが報告されている²⁰⁾。本結果では魚介類を原材料とする加工食品のうち10 μg/g以上検出された加工食品は9.3%に上ったが、これまでえび・かにの魚介類加工品による誤食事例がみられないことから、非意図的混入に対するえび・

かにの表示は現在適切に行われていると考えられた。

調理・加工によるタンパク質の変性

アレルギーを含む食品の検査は含まれる原材料が適切に表示されているかを監視するための科学的な根拠であり、アレルギー発症を引き起こすかどうかを示すものではない。これは表示制度についてお話する際に、行政検査並びに検査法の解釈として必ず解説している。

他方これらの検査を通して、食品の加工によりタンパク質が変性し定量値が顕著に低下する可能性があること、そしてアレルギー患者によっては加工食品であれば摂取可能である場合があり^{13, 14)}、タンパク質の変性による抗体との結合能の変化がアレルギー症状誘発の可能性を評価できることが考えられる。これらの実態を踏まえて、次に調理・加工によるタンパク質変性について検討した結果を紹介したい。

3大アレルギーのうち卵アレルギーは乳幼児に患者数が多いものの成長するうちに摂取可能となる場合が多い。その要因のひとつに卵の主要なアレルギーであるOVAが加熱により変性しやすいことが示唆されている。そこで、卵調理によるタンパク質の変性について検討した²¹⁾。

卵を全卵、卵白、卵黄に分け、モデル食品としてケーキ、肉団子、パスタ、プリンを作製し、さらにこれらに相当する市販食品についてもELISAにより卵タンパク質を定量し、ウエスタンブロット法によりOVA、OMを確認した。検査法の旧ELISAキット、すなわち抽出液に変性剤を用いないOVA、OVM、卵キットを用いた。調理により食品中の卵タンパク質量は顕著に低下し、特にOVAキットの低下が顕著であった。また、小麦粉を用いた調理の場合は、小麦中のグルテンとOMとの反応により、不溶化が起こることが知られており²²⁾、OMキットではケーキの定量値が顕著に低下した。また、3キットの比較では、熱耐性のあるOVMを対象としたOVMキットが表示制度における検出に最も適していると考えられた。次に卵黄を使用した調理食品並びに市販食品中の卵

表 3 卵黄使用調理食品と市販加工食品からの卵タンパク質の検出

No.	食品	卵原材料	ELISA(μg/g)				ウエスタンブロット		
			OVA キット (旧キット)	卵キット (旧キット)	FASPEK OVA キット (新キット)	Ver.II 卵キット (新キット)	ウサギ IgG キット (OVA/OVM) (旧キット)	ヒト IgE (OVA/OVM)	ウサギ IgG FASPEK キット (OVA/OVM) (新キット)
1	ケーキ(焼)	卵黄	13.7	8.2	>20.0	>20.0	+/+	-/+	nt
2	ケーキ(揚)	卵黄	9.5	7.4	>20.0	>20.0	+/+	-/+	nt
3	ケーキ(蒸)	卵黄	10.1	>20.0	>20.0	>20.0	+/+	-/+	nt
4	肉団子(焼)	卵黄	4.6	>20.0	>20.0	>20.0	+/+	-/+	nt
5	モデル食品 肉団子(揚)	卵黄	<0.4	>20.0	>20.0	>20.0	±/+	-/+	nt
6	肉団子(蒸)	卵黄	10.3	>20.0	>20.0	>20.0	+/+	-/+	nt
7	肉団子 (レトルト処理)	卵黄	<0.4	6.1	9.2	>20.0	-/-	-/-	-/+
8	パスタ(茹)	卵黄	0.6	1.6	>20.0	>20.0	+/+	-/-	+/+
9	チョコレートラスク	卵黄	<0.4	<0.5	1.4	<1.0	-/-	-/-	-/+
10	卵ボーロ	卵黄, 卵殻カルシウム	>25.6	>20.0	>20.0	>20.0	nt	nt	nt
11	クラッカー	卵黄	<0.4	1.4	<1.0	1.1	-/+	-/-	-/-
12	ケーキ	卵黄	>25.6	>20.0	>20.0	>20.0	nt	nt	nt
13	市販食品 マヨネーズ	卵黄	>25.6	>20.0	>20.0	>20.0	nt	nt	nt
14	しゅうまい	卵黄	<0.4	<0.5	12.1	14.1	-/+	-/-	+/+
15	クリームソース (レトルト処理)	卵黄	<0.4	1.8	3.3	7.4	-/+	-/-	±/±
16	カルボナーラソース (レトルト処理)	卵黄	<0.4	>20.0	>20.0	>20.0	nt	nt	nt
17	カルボナーラソース (缶)	卵黄	<0.4	>20.0	>20.0	>20.0	nt	nt	nt

データは2回の平均値(3ウェル測定)

OVA: オボアルブミン, OVM: オボムコイド, +: 検出, -: 不検出, ±: 痕跡程度, nt: 未測定

本表は文献21から引用し, 一部改変した.

タンパク質をSDSと2-MEを添加した抽出液を用いた新キットで測定した結果(表3), レトルト処理を除き20 μg/g以上となったことから, これらの値の低下は加熱変性したタンパク質のPBS(リン酸緩衝液)への不溶化であることを確認した. また, ウエスタンブロット法による確認では, ヒトIgE抗体はいずれの食品中のOVAも検出できなかった. 本間ら²³⁾はヒトIgE抗体がOVAの高次構造を認識していると示唆しており, 調理・加工によるOVA高次構造の変化がI型アレルギー症状の誘発に大きく関与していると考えられた.

次に日本の伝統食品である大豆加工品について, 大豆の主要アレルゲンであるβ-コングリシニンとGly m Bd 30Kをターゲットとした2種のELISAキットを用いて測定を行った²⁴⁾. 大豆から炒り豆, 煮豆, 豆乳, ゆば, 豆腐, 揚げ豆腐, おからの7種類の大豆調理品を作製し, さらに大豆発酵食品や健康食品についても測定した. ELISAは検査法の2回目の改正において抽出液にSDSと2-MEを添加したものと3回目の改正において2-MEを亜硫酸ナトリウムに変更したもの(現行のELISA)を用いて測定し, 総タンパク質量をPBSとSDS, 2-MEを添加したPBSを用いて測定した. SDSポリアクリルアミド電気泳動の解析結果と合わせ, 調理による大豆タンパク質

の変性を解析し, 大豆では加工時並びに加工による水分量的変化がタンパク質変性の重要な因子であることを明らかにした. また, 大豆タンパク質のほとんどがアミノ酸やペプチドに分解されていると考えられる味噌と納豆の測定結果はターゲットアレルゲンの異なる2種のキットで大きく異なり, 興味深い結果となった. さらに本検討により日本の伝統的な大豆加工食品の製法がいかん大豆タンパク質を効率よく抽出し, 多様な食品を生み出しているのかに感心させられ, また大豆加工に関する専門的な論文を目にする良い機会となった.

加熱変性卵白によるアレルギー症状の誘発

最後にタンパク質の加熱変性による変化がアレルギー症状誘発にどのような影響を及ぼすのかを検討した研究を紹介したい. 我々はこれまで紹介した加工食品の加熱処理をヒントに, また既報²⁵⁾のOVAの加熱条件による変性状態の変化を参考とし, 卵白処理を80 °C 15分, 100 °C 5分, 121 °C 40分(レトルト処理)とした卵白食と未変性卵白食を食物アレルギーモデルマウスに摂取させ, その腸管におけるアレルギー症状等を解析した²⁶⁾.

未変性卵白食に比べ80 °C 15分処理では長期摂取で

アレルギー症状が悪化することが示された。また、100℃ 5分では軽度な腸管のアレルギー症状が観察されたものの、その症状は回復した。そして121℃ 40分ではアレルギー発症はなく、血中のOVA上昇もみられなかったことから、OVAとして吸収されなかったと考えられた。本結果から、アレルゲンの加熱変性によりアレルギー症状の誘発をコントロールすることができることを明らかとした一方、一旦アレルゲンとして感作されると誤食などによる患者の食生活へのダメージが大きいことを再認識させられた。現在、この結果を基に症状の軽減化や脱感作についての研究を進めており、随時報告していきたいと考えている。

おわりに

食品表示制度におけるアレルゲンを含む食品の検査を始めとして、調理・加工によるタンパク質の変性とそのアレルギー症状の誘発について進めてきた共同研究を通じて、食生活について昨今考えることを結語としたい。物流が様々に発達し、食の国境はないと言っていいほど日本には多くの食材が集まっている。ITによる情報により急激に流行する食材や食品が出回るなど、食生活がこれまでとは大きく変化し、アレルゲンの種類も変化している。世界で共通認識されているアレルゲン以外はその国特有の食文化や食習慣を表しているという説明は、もはや時代遅れになってしまったようだ。しかし、日本人男性で乳糖を消化できない人の割合が多いことやアルコール分解能の違い、日本の伝統食品の食材である大豆や米、海藻などの消化効率が日本人ではよいこと、また多様な発酵食品を生み出していることなどの日本の食習慣から獲得してきた体質や特性があり、食文化として培ってきたことを忘れてはならない。アレルギー予防という観点からも、故きを温ねて、子どもの成長や自分の体質を理解し体調を把握し、体に合った食品をバランスよく摂取することが自身の健康をサステナブル（持続可能）にする方法ではないかと感じている。

謝辞

食品免疫学をご指導頂きました東京大学名誉教授 上野川修一先生、前東京大学助教授 飴谷章夫先生、並びに実験等で多大なるご協力を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科 旧食品生化学研究室の皆様にご厚く感謝いたします。また現在食物アレルギーモデルマウスを用いた共同研究にご尽力頂いております東京大学大学院農学生命科学研究科 食の安全研究センター 免疫制御研究室 准教授 八村敏志先生、同特任助教 足立はるよ先生、東北大学大学院 農学研究科 教授 戸田雅子

先生に謹んで深謝いたします。

食品表示制度の特定原材料検出法検討会に参画させて頂き、多くのご助言を頂きました星薬科大学 薬学部 教授 穂山浩先生、国立医薬品食品衛生研究所 渡邊敬浩博士に深謝いたします。

食品表示制度の検査や食品中のタンパク質変性に関する共同研究に参画頂きました千葉大附属病院 アレルギーセンター客員教授 下条直樹先生、前国立成育医療センター研究所 田中和子先生、川崎市健康安全研究所 赤星千絵氏、川崎市 大澤伸彦氏、横浜市衛生研究所 濟田清隆氏、相模原市衛生研究所 伊関直美氏、同井村香織氏、同 植田壽美子氏に深謝いたします。

文献

- 1) 穂山浩, 豊田正武, 食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の概要, 食品衛生研究, 52, 6, 65-73(2002).
- 2) 穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝, 渡邊裕子他, 特定原材料 (卵) 測定の厚生労働省通知ELISA法の複数機関による評価研究, 食衛誌, 44, 5, 213-219(2003).
- 3) 穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝, 渡邊裕子他, 特定原材料 (牛乳) 測定の厚生労働省通知ELISA法の複数機関による評価研究, 食衛誌, 45, 3, 120-127 (2004).
- 4) 穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝, 渡邊裕子他, 特定原材料 (小麦) 測定の厚生労働省通知ELISA法の複数機関による評価研究, 食衛誌, 45, 3, 128-134 (2004).
- 5) 穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝, 渡邊裕子他, 特定原材料 (そば) 測定の厚生労働省通知ELISA法の複数機関による評価研究, 食衛誌, 45, 6, 313-318 (2004).
- 6) 穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝, 渡邊裕子他, 特定原材料 (落花生) 測定の厚生労働省通知ELISA法の複数機関による評価研究, 食衛誌, 45, 6, 325-331 (2004).
- 7) 高畑能久, ELISAによる特定原材料の検出について (1), 食衛誌, 43, J-275-277(2002).
- 8) 豆越慎一, ELISAによる特定原材料の検出について (2), 食衛誌, 43, J-277-279(2002).
- 9) 布藤聡, PCRによる特定原材料の検出について(2), 食衛誌, 43, J-280-282(2002).
- 10) 平成27年3月30日消食表第139号 食品表示基準 別添 アレルゲンを含む食品に関する表示.

- 11) 平成27年3月30日消食表第140号 食品表示基準Q & Aについて 別添 アレルゲンを含む食品に関する表示.
- 12) 伊藤浩明, アレルゲン検索法の実際, アレルギー, 57, 11, 1109-1116, 2008.
- 13) 八木映子, 宇理須厚雄ら, 加熱卵白経口負荷試験の意義について, 日本アレルギー学会誌, 10, 1, 24-31, 1996.
- 14) 琴寄剛, 高橋由利子ら, 食物アレルギーが疑われる小児例におけるオボアルブミン, オボムコイド, 加熱牛乳に対する特異的IgE抗体測定の有用性の検討, 日本小児アレルギー学会誌, 15, 2, 201-207, 2001.
- 15) 渡邊裕子, 甲斐茂美, 三谷智雄, 横山洋司, 岸美智子, 食肉加工品および冷凍食品からのアレルギー物質(卵・乳)の検出に関する検討, 食衛誌, 46, 139-147(2005).
- 16) 渡邊裕子, 児玉千絵, 関戸晴子, 濟田清隆, 宮沢啓貴, 渡部健二郎, 田中幸生, 山田利治, 食品中のアレルギー物質検査における精度管理の検討-I 酵素免疫測定法(ELISA)による定量, 神奈川衛研報告, 37, 53-55(2007).
- 17) 渡邊裕子, 赤星千絵, 濟田清隆, 橋口成喜, 関戸晴子, 渡部健二郎, 田中幸生, 食品中のアレルギー物質検査における精度管理の検討-II 可溶化剤を用いた抽出法による定量・定性, 神奈川衛研報告, 40, 24-28(2010).
- 18) 渡邊裕子, 赤星千絵, 濟田清隆, 関戸晴子, 橋口成喜, 渡部健二郎, 田中幸生, 特定原材料検査(卵・乳)における新・旧検査方法の比較, 食衛誌, 52, 71-77(2011).
- 19) 渡邊裕子, 濟田清隆, 赤星千絵, 大澤伸彦, 橋口成喜, 宮澤眞紀, 魚介類加工食品に含まれるアレルギー物質(えび・かに)の検出, 食衛誌, 55, 41-54(2014).
- 20) 富川盛光ら. 日本における小児から成人のエビアレルギーの臨床像に関する検討. アレルギー, 55, 1536-1542(2006).
- 21) 渡邊裕子, 赤星千絵, 関戸晴子, 田中幸生, 田中和子, 下条直樹, 調理による卵アレルギーの変性, 食衛誌, 53, 98-104(2012).
- 22) Honma, K., et al. Antigenic determinants on ovalbumin and ovomucoid; Comparison of the specificity of IgG and IgE antibodies. Arerugi, 40, 1167-1175(1991).
- 23) Kato, Y., Oozawa, E., Matsuda, T. Decrease in antigenic and allergenic potentials of ovomucoid by heating in the presence of wheat flour; Dependence on wheat variety and intermolecular disulfide bridges. J. Agric. Food Chem., 49, 3661-3665(2001).
- 24) 渡邊裕子, 秋山晴代, 大澤伸彦, 井村香織, 伊関直美, 植田壽美子, 政岡智佳, 赤星千絵, 大豆タンパク質の定量に及ぼす調理・加工の影響, 食衛誌, 62, 6, 193-202(2021).
- 25) Rumbo, M., Chirido, F. G., Fossati C. A., Anon M. C., Analysis of structural properties and immunochemical reactivity of heated-treated ovalbumin. J Agric Food Chem . 44, 3793-3798(1996).
- 26) Watanabe H, Toda M, Sekido H, Wellner A, Fujii T, Henle T, Hachimura S, Nakajima-Adachi H, Heat treatment of egg white controls allergic symptoms and induces oral tolerance to ovalbumin in a murine model of food allergy, Mol, Nutr, Food Res, 58, 394-404(2014).

The detection of allergens in processed foods ~From the examination of food labeling~

Hiroko WATANABE

Key Words : cooking and processed, allergen, food labeling system, ELISA, western blotting, polymerase chain reaction

20 years have passed since the food allergy labeling system was brought into effect in 2002, as well as our participation in the launch of the inspection method that same year. This paper will introduce the results of our research on denatured protein in foods, including the actual state of allergen detection from processed foods which began with the examination of testing methods, the examination of validation and precision control of testing methods, the examination of protein denaturation due to cooking and processing, as well as the examination of allergic symptoms induced by heat-denatured egg whites.

短報

神奈川県のインターフェロン γ 遊離試験 (IGRA) における検体情報管理システムの構築

中嶋直樹, 陳内理生, 古川一郎

Construction of sample information management system at interferon-gamma release assay (IGRA) in Kanagawa Prefecture

Naoki NAKAJIMA, Michio JINNAI
and Ichiro FURUKAWA

はじめに

結核患者の接触者の健康診断 (以下, 接触者健診) における結核感染のスクリーニング検査として, インターフェロン γ 遊離試験 (IGRA) が広く用いられている。神奈川県衛生研究所では8か所の所管域の保健福祉事務所等 (以下, 保健所) が実施する接触者健診に対応するため, IGRAの一つであるクオンティフェロンTBゴールド (QFT) による検査を2005年から実施している。近年の検査数は1,000件を超えていたが, 2020年以降は半減した (年間500~600件程度)。新型コロナウイルス感染症の拡大の影響によるものと考えられ¹⁾, これに対応する保健所においては業務量が増加し, 多忙な状況であると推察された²⁾。このような状況下で, QFT検査における検体情報の誤入力や期限切れの採血管の使用等のエラーが発生する可能性が高まることが懸念された。特に期限切れの採血管を使用した場合は, 再採血することとなり, 採血者に対して不要な負担を強いることになる。QFT検査の信頼性を確保するためには, このようなエラーを回避することが重要であり, 保健所と衛生研究所において検体情報の受け渡しを確実にし, 情報を管理するシステムの構築が必要であった。従来は, 紙媒体で検体情報を受け渡す仕組みとなっており, その情報を手作業で電子媒体に変換する手間やその際に変換ミスをする恐れ等があった。このような状況を改善するため, 検

体情報の受け渡しに紙媒体を必要とせず, 電子媒体のみを取り扱う新しいシステムを構築した。2021年1月から開始した本システムの概要を報告する。

旧システムの概要

旧システムの概要を図1に示した。旧システムでは, 保健所において接触者の情報 (氏名や採血管ロット番号等) を紙媒体の様式に手書きで記載または電子ファイルで入力したものを印刷し, その紙を採血当日に検体 (採血管) と一緒に衛生研究所に搬送していた。衛生研究所においては, 検体及び検体情報を受領後, 紙に記載された検体情報を集計ファイル (Excel) に手入力し, 各保健所の検体情報を管理していた。ELISA測定後, 検査結果を検体情報 (紙媒体) の結果記入欄に手書きで記載し, その紙をスキャンしてPDFデータとした後, これを成績書として保健所に返却していた。

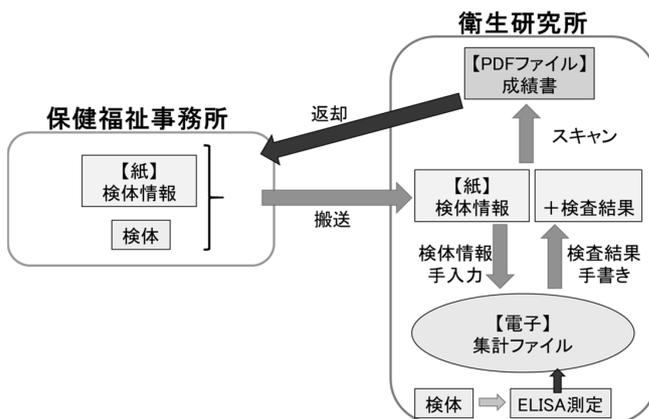


図1 旧システムの概要

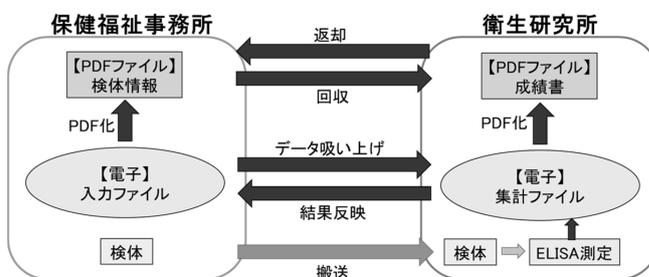


図2 新システムの概要

新システムの概要

新システムの概要を図2に示した。新システムでは、保健所においてサーバー上に設置した各保健所専用の入力ファイル（Excel）内の検体情報入力シートに接触者の情報を入力する方法で統一した。これら保健所入力ファイルと衛生研究所の集計ファイル（Excel）をリンクさせることにより、集計ファイルに自動的に検体情報が吸い上げられ、管理できるようにした。保健所入力ファイルへの情報の入力は、誤入力を抑制するために、可能な限りドロップダウンリストから選択できるようにした（図3（1））。さらに、これらドロップダウンリストの選択肢は、保健所入力ファイルとリンクしている衛生研究所の集計ファイルで管理できるようにした。例えば採血管については、期限切れの採血管の誤使用を抑制するために、ロット番号のリストを衛生研究所側で最新に保ち、期限切れの採血管ロット番号を選択できないようにした（図3（2））。図3（2）に示すように検体情報を一列ずつ入力し、保健所入力ファイルには一年分の接触者の情報が蓄積されていくため、保健所においても本システムを用いた検体情報の管理が可能となった。行政文書処理に使用する検体情報のPDFデータについては、これを作成する専用のPDF作成シートを保健所入力ファイルに設置した（図4）。このシートに採血年月日を選択するだけで検体情報入力シートに入力した情報が反映され、マクロ実行ボタンをクリックすることで簡単にPDFデータが作成される仕組みとした。PDFデータはサーバー上のフォルダに自動的に保存され、衛生研究所はこれを回収することとした。検査結果についても集計ファイルに結果を入力することで、それが各保健所入力ファイルに反映されるようにした（図3（3））。検査結果は別に、行政文書処理に使用する成績書としてPDFデータに変換し、前述のフォルダに格納することで、保健所に返却することとした。本システムにより、物体の搬送は検体のみとなり、情報の受け渡しは全てサーバー上で電子媒体によるものとなった。このサーバー上にあるフォルダやファイルには、担当となる衛生研究所および各保健所職員のみがアクセスできるように制限することで、セキュリティ対策を施した。

新システム運用開始までの工程

初めに保健所入力ファイルと衛生研究所集計ファイルの原案を作成した。保健所入力ファイルの作成時に最も注力した点は、実際に入力等をするのは保健所職員であることを考慮し、一見して操作がわかりやすいことである。そのため、前述のドロップダウンリストや簡便なPDFデータ作成方法等を導入した。次に保健所結核業務経験のある衛生研究所職員に原案の意見を求めた。いくつかの修正を施し、ファイルの体裁が整った時点で、サーバー上にテスト用のフォルダおよびファイルを作成した。これを基に、実際に各保健所の結核担当者に対して新システムの説明会を実施した。方式は新型コロナウイルス感染症の拡大の影響のため、skypeによるビデオ通話とした。保健所全8か所について個別に実施し、合計17人の担当者が参加した。説明会では、システム全体の概要を説明した後、実際にサーバー上のファイルを操作してもらった。ビデオ通話の利点を活かし、実際に使用した感想や意見、質問を丁寧に聞き取りした。説明会での意見により、記載の難しい入力項目や不必要な文面等が明らかになった。これらを参考に、業務の実状に即してファイルの修正を実施した。さらに、修正した内容に関するアンケートを実施し、説明会においてリアルタイムでは聞き取りできなかった意見や質問も記載してもらった。アンケート結果を基に保健所入力ファイルの最終版を作成し、2021年1月から新システムの運用を開始した。新システムの構想から運用開始までにはおよそ1年の期間を要した。

新システム運用後の状況

運用開始から現在まで、新システムは順調に稼働し、システム全体に影響を及ぼすエラーは発生していない。運用開始前に各保健所に対して丁寧なヒアリングを実施し、実状に即したシステムとなったことが大きな要因と考えられた。保健所では、保健所入力ファイルを利用した検体情報の管理が定着し、入力に関しては重大なミスは起きていない。特に期限切れの採血管が使用されるエラーはこれまでに発生していない。衛生研究所としては、旧システムでは手作業であった検体情報の集計や検査結果の入力がなくなり、新システムでは電子媒体の情報をそのまま利用できるため、転記ミスは起きていない。

(1) ドロップダウンリストの例示

2020年度 検体情報入力シート

検体搬入日～採血時刻までを入力してください

検査完了後に結果が表示されます。

No	欠番号	検体搬入日	氏名	年齢	性別	対象区分	感染源	採血管ロット番号	採血時刻	衛研番号	検査結果
1		2021/1/28									
2		2021/1/20									
3		2021/1/12									
4		2021/1/4									
5		-									
6		-									
7		-									
8		-									
9		-									
10		-									
11		-									
12		-									

ドロップダウンリストから選択する

(2) 情報入力後の例示

2020年度 検体情報入力シート

検体搬入日～採血時刻までを入力してください

検査完了後に結果が表示されます。

必要な情報を入力する

No	欠番号	検体搬入日	氏名	年齢	性別	対象区分	感染源	採血管ロット番号	採血時刻	衛研番号	検査結果
1		2021/1/28	神奈川 次郎	60	男	同居家族	衛研 太郎	A19046	11時11分		
2								A19046			
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											

1年間分の情報が蓄積される

期限内の採血管ロット番号のみが表示される

(3) 検査結果反映の例示

2020年度 検体情報入力シート

検体搬入日～採血時刻までを入力してください

検査完了後に結果が表示されます。

No	欠番号	検体搬入日	氏名	年齢	性別	対象区分	感染源	採血管ロット番号	採血時刻	衛研番号	検査結果
1		2021/1/28	神奈川 次郎	60	男	同居家族	衛研 太郎	A19046	11時11分	Q205555	陽性
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											

検査結果が判定後に反映される

図3 保健所入力ファイル（検体情報入力シート）

衛生研究所長 殿

令和3年1月28日

PDF作成

〇〇保健福祉事務所長

日付を入力すると必要な情報が下部に表示され、右部のマクロ実行ボタンをクリックすると簡単にPDFファイルが作成できる

結核健康診断の対象者に対するQFT検査について

以下のリストのとおり検体を送付しますので、検査をお願いします。なお、本リストに加えてQFT感染源リストも添付します。

QFT検体リスト

採血年月日	2021/1/28			〇〇保健福祉事務所			
通し番号	氏名	年齢	性別	対象区分	感染源患者名	採血管ロット番号	採血時刻
1	神奈川 次郎	60	男	同居家族	衛研 太郎	A19046	11時11分

図 4 保健所入力ファイル (PDF作成シート)

まとめ

保健所と衛生研究所の検体情報の受け渡しに電子媒体のみを取り扱う新しいシステムを構築した。システム運用開始前に保健所担当者等に協力してもらうことで、保健所の実状に即したシステムを構築することができた。本システムの導入により、検体情報を電子媒体で管理することが可能となり、検体情報の誤入力や期限切れの採血管の使用のエラーが抑制され、保健所及び衛生研究所双方の事務効率が向上した。円滑にQFT検査システムを運用することで、神奈川県における結核の対策・感染拡大防止に貢献できると考えられた。本システムはまだ完全ではなく、今後も保健所等から意見や要望を抽出し、システムを改善していくことが必要であると考えられた。

謝辞

本システムの構築にあたり、貴重なご意見を下さった衛生研究所職員、本システムの趣旨を理解し、真摯に対応して下さった保健所結核担当者の方々に感謝申し上げます。

文献

- 1) 内村和広：新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が結核患者登録に及ぼす影響について —2019年と2020年の1月から4月の月報登録数の比較—, 複十字, 393, 3-4, (2020).
- 2) 前田秀雄：新型コロナウイルス感染症対策への保健所の取り組み～機能強化に向けた課題～, 生活と環境, 65, 4-8, (2020).

短報

医薬品製造販売承認書に表記されない カプセル剤皮中のタール色素の分析法 の検討及び実態調査

岩橋孝祐, 熊坂謙一

Study of analytical methods and a survey of the undeclared coal-tar dyes in capsule shell on the Certificate for manufacturing and marketing approval of pharmaceuticals

Takahiro IWAHASHI and Kenichi KUMASAKA

緒言

医薬品製剤に配合される有効成分及び添加物は、原則として医薬品製造販売承認書にその種類、量及び規格等を記載し、GQP及びGMP省令等に従い原料の受入れ試験から最終製品試験まで厳密な製造管理及び品質管理が行われている。しかし、医薬品中のカプセルに使用される一部の添加物については製造販売承認書への記載は必須ではない¹⁾など、他の添加物等とは管理方法が異なっている。また、市場に流通している医薬品は、原則として添付文書等に全ての添加物の名称を記載する必要があるが、行政による承認審査及びGMP適合性調査等でカプセルに使用される添加物やその表示の是非を確認することは難しく、使用に制限のある添加物を検査しようとしても、適切な試験方法の規定はない。近年、製造販売承認書にない添加物あるいは規格を満たしていない添加物の添加等が原因となる自主回収も散見されるが、特に使用制限がある着色剤であるタール色素²⁾については、実態を確認した分析報告³⁾は少ない。さらに、経口薬であるカプセル製剤のカプセルに使用可能なタール色素は11種類及びそのアルミニウムレーキであるが、現在の医薬品の製造及び品質管理体制ではGMP省令による管理対象外であり、また、添加可能なタール色素の使用実態に関する報告はない。また、タール色素はアルミニウムレーキの使用も認められているが、製品中のレーキと

して使用されている金属について確認した事例はない。そこで本研究では、医薬品製剤等のカプセルの剤皮に使用される着色剤のタール色素12成分及びレーキ金属の3元素を対象とし、高速液体クロマトグラフ (HPLC)、液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MSMS) 及び誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を用いた分析条件を検討するとともに流通製品における実態調査を行ったので報告する。

方法

1. 試料

市場に製造販売されている医薬品製剤のうち、有色のカプセル製剤の内容物を除いたカプセル剤皮を対象とした。

2. 分析対象

医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令²⁾に規定された赤色2号 (以下, R2), 赤色3号 (R3), 赤色102号 (R102), 赤色104号 (R104), 赤色105号 (R105), 赤色106号 (R106), 黄色4号 (Y4), 黄色5号 (Y5), 緑色3号 (G3), 青色1号 (B1), 青色2号 (B2) 及び食品添加物の赤色40号 (R40) を加えた12種類のタール色素並びに当該省令中で色素の金属レーキとして記載のあるアルミニウムの他, 外用医薬品で一部使用が認められている金属レーキであるバリウム及びジルコニウムとした。

3. 試薬・器材

色素は東京化成工業 (株) 製のFood Color Testing Solutions A set及びレギュラトリーサイエンス財団の青色2号標準品を使用した。添加回収及びサンプルブランク用のカプセルには小林カプセル (株) 製の日本薬局方カプセルを使用した。メタノールは関東化学 (株) 製の試薬特級, 液体クロマトグラフ用又はLC/MS用, アセトニトリルは同社製の液体クロマトグラフ用又はLC/MS用, 酢酸アンモニウムはジーエルサイエンス (株) 製LCMS用を使用した。カラムはWaters社製ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm), ガードカラムは同社製ACQUITY UPLC HSS T3 VanGuard Pre-column (1.8 μm , 2.1 mm \times 5 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。金属元素の分析には, 標準液として富士フィルム和光純薬 (株) 製のアルミニウム (Al 1000) 及びバリウム (Ba 1000) JCSS標準液, 原子吸光分析用ジルコニウム標準液 (Zr 1000) を使用し, 硝酸及び過酸化水素水は同社製の有害金属測定用及び原子吸光分析用を使用した。また, 測定器具にはジーエルサイエンス (株) 製

DigiTUBEs及びDigiFILTER 0.45 μmを用いた。DigiTUBEsは予め硝酸及び過酸化水素水で洗浄してから使用した。水はMerck社製Milli-Q Integral 5で精製した超純水を使用した。

4. 装置及び測定条件

既報⁴⁾を参考に、HPLCとしてPDA検出器を接続したWaters社製ACQUITY UPLCを使用し、LC-MSMSは島津製作所製のNexera X2 UHPLCを接続した三連四重極質量分析計(LCMS-8050)を使用し、それぞれ測定条件を検討した。また、ICP-MSとして、アジレント社製Agilent 7800を用いた。各測定条件は表1から3に示した。

表1 HPLC測定条件

装置	ACQUITY UPLC (Waters)
カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters) 2.1 mmI. D. × 100 mm, 粒子径 1.8 μm
ガードカラム	ACQUITY UPLC HSS T3 VanGuard Pre-column (Waters) 2.1 mmI. D. × 5 mm, 粒子径 1.8 μm
カラム温度	40°C
移動相	A: 10 mM酢酸アンモニウム水溶液 B: アセトニトリル
グラジエント送液条件	(A : B) 95 : 5 (0 min) → 55 : 45 (9 min)
流量	0.35 mL/min
注入量	5 μL
検出器	ACQUITY UPLC eλ PDA Detector (検出波長315 nm, 測定波長200-800 nm)

表2 LC-MSMS測定条件

装置	Nexera X2 UHPLC及びLCMS-8050質量分析計(島津製作所)
カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters) 2.1 mmI. D. × 100 mm, 粒子径 1.8 μm
ガードカラム	Acquity UPLC HSS T3 VanGuard Pre-column (Waters) 2.1 mmI. D. × 5 mm, 粒子径 1.8 μm
カラム温度	40°C
移動相	A: 10 mM酢酸アンモニウム水溶液 B: アセトニトリル
グラジエント条件	(A : B) 95 : 5 (0 min) → 50 : 50 (9 min) → 95 : 5 (10 min)
流量	0.4 mL/min
注入量	1 μL
インターフェイス温度	300°C
DL温度	250°C
ネフライザーガス流量	3 L/min
ヒーティングガス流量	10 L/min
ヒートブロック温度	400°C
ドライイングガス流量	10 L/min
イオン化法	ESI法、ポジティブ又はネガティブモード
測定モード	多重反応モニタリング(MRM)

表3 ICP-MS測定条件

装置	Agilent 7800
RFパワー	1550 W
プラズマガス(Ar)流量	15 L/min
キャリアガス(Ar)流量	1.05 L/min
反応ガス(He)流量	4.3 mL/min
測定モード	Heモード
測定対象元素(測定質量数)	(積分時間(sec)/質量)
Al (27)	5
Zr (90)	1
Ba (138)	0.1

5. 実態調査

市場に流通している小児用を含む医療用及び一般用医薬品製剤のうち、有色カプセルを使用した製剤30検体を購入し、内容物を除去した後、キャップ部とボディ部をそれぞれタール色素のスクリーニング検査から実施した。流通製品の実態調査のための検査の流れを図1に示す。

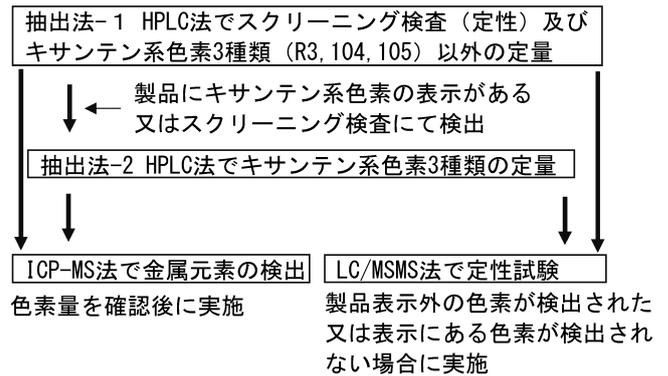


図1 色素の定性・定量と金属元素検査の流れ

6. HPLC及びLC-MSMS用試料溶液

分析対象とした12種類のタール色素のスクリーニング及びキサントン系色素の内3種類(R3,R104及びR105)を除く9種類のタール色素の定量には10%メタノールを用いた抽出法-1を、同法では回収率の悪いキサントン系色素3種類の定量には、50%アセトニトリルを使用した抽出法-2を用いた。各抽出法の詳細は図2に示した。

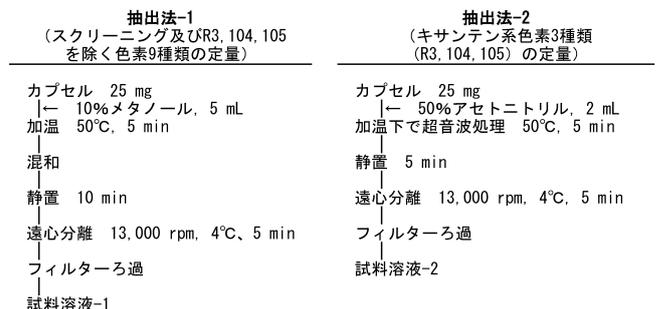


図2 HPLC及びLC-MSMS用試料溶液の調製方法

7. ICP-MS用試料溶液

約100 mgのカプセルに4 mLの60%硝酸を加え、105°Cで3時間湿式分解を行った。その後、30%過酸化水素水を1 mL加え、105°Cで1時間湿式分解を行った後、超純水で50 mLとした。0.45 μmフィルターでろ過後、試料溶液とし、検出した色素量に応じ1%硝酸で適宜希釈して分析した。

8. HPLC用検量線

1 mg/mLの標準原液を各抽出溶媒で希釈し、10%メタノール標準溶液は0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 μg/mLを50%アセトニトリル標準溶液は0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20 μg/mLの検量線用混合標準溶液を調製し、絶対検量線法により定量を実施した。

9. 分析法の評価

カプセルには「カプセル」、「ヒプロメロースカプセル」、

「プルランカプセル」があるが、代表的なゼラチン製の「カプセル」をブランク試料とし、分析法の検討及び評価を実施した。

タール色素の定量にはHPLC法を用い、特異性、直線性、真度及び精度、検出下限及び定量下限を評価した。真度・精度の評価における添加回収濃度は、製造販売承認書上の一般的な記載である「微量（0.1%以下）」の上限に相当する1 mg/gとし、1回6併行の結果により真度及び併行精度を、異なる6日間における各1回の分析結果により室内再現性を評価した。また、HPLC法における試料中の各色素の検出下限及び定量下限は標準溶液0.5 µg/mLの分析より得られた各成分ピークのシグナルノイズ比（S/N比）により評価を行い、それぞれS/N比3.3及び10となる濃度より算出した。

なお、LC-MSMSを用いたタール色素の確認は定性試験として実施し、ブランク溶液との比較による特異性及び検出下限としてピーク高さがS/N比3.3以上となる標準溶液濃度を確認した。

アルミニウム、ジルコニウム及びバリウムの各金属元素は、ICP-MSを用いた定性試験として特異性及び検出感度の確認を行った。ブランク試料からもアルミニウムが検出されることから、その特異性は添加した各金属の回収率をもって評価した。なお、ブランク試料への各金属元素量の添加量は、試料中、各色素0.1%量に結合する金属量を算出し、そのうち最も低値となった色素の金属量を踏まえ、試料中濃度としてアルミニウム20 µg/g、ジルコニウム50 µg/g、バリウム150 µg/gで添加し、特異性を確認した。また、各標準液を1%硝酸で希釈して1, 5, 10, 25, 50 ng/mLの標準溶液を調製して直線性を確認するとともに、確実に検出された最小濃度より、検出の限度値を決定した。

結果及び考察

1. 分析法の検討と評価

HPLC法における分析法の評価として、特異性はブランク溶液との比較、各色素ピーク間の分離度が1.5以上かつPDAスペクトルの形状及び極大吸収波長にて確認しており、各色素のピークの保持時間及び極大吸収波長

表4 HPLC測定における各色素のピークの保持時間及び極大吸収波長

色素	保持時間(分)	極大吸収波長(nm) [※]
R2	1.9	522
R3	6.8	529
R102	2.8	512
R104	7.9	545
R105	8.7	555
R106	7.8	562
Y4	1.5	427
Y5	3.2	483
G3	5.7	623
B1	5.9	627
B2	2.1	612
R40	3.9	510

[※]測定波長範囲(200~800 nm)の中で強度が高く特徴的と思われる極大の波長を記載した。

を表4に示した。

また、新藤らの報告⁵⁾にあるとおり、ピークの保持時間の短い色素については、移動相より抽出溶媒の極性が低くなると、HPLCでのピーク形状等に影響することから、スクリーニング検査用として10% (v/v) メタノール溶液を使用することとした。(抽出法-1)しかし、10%メタノール溶液ではR3, R104及びR105の回収率が低下したことから、これらの色素を対象とした抽出には、ピークに影響がないことを確認したうえで50% (v/v) アセトニトリル溶液を使用することとした。

直線性は各溶媒で各色素とも検量線の濃度範囲の相関係数rは0.99以上であり、良好な直線性を示すことを確認した。また、真度・精度を評価した結果を表5に示した。抽出法-1を用いた色素9種類では真度84.8~97.4%、併行精度0.1~0.9 RSD%、室内再現性1.4~10.8 RSD%、抽出法-2を採用した色素(R3, R104及びR105)では真度54.7~64.9%、併行精度3.6~4.4 RSD%、室内再現性2.6~4.3 RSD%となった。抽出法-2における低回収率の原因として色素のタンパク質への吸着⁶⁾といった報告もあったことから、回収率の向上を目指して抽出溶媒及び抽出方法を変更するなどの条件検討を行ったが、これ以上の回収率の改善を成しえることはできなかった。以上の検討結果を踏まえ、抽出法-2における真度(回収率)に改善すべき課題はあるものの、配合成分として未表示の色素検出及び金属レーキの推定に適用できると判断した。

表5 各色素の真度及び精度

抽出法	抽出法-1									抽出法-2			
	測定色素	R2	R102	R106	Y4	Y5	G3	B1	B2	R40	R3	R104	R105
真度(%)		93.7	95.0	95.9	96.4	97.4	89.9	94.2	84.8	95.7	61.8	64.9	54.7
併行精度(RSD%)		0.2	0.4	0.3	0.4	0.3	0.7	0.4	0.9	0.1	3.6	3.7	4.4
室内再現性(RSD%)		1.7	2.4	1.4	2.2	1.8	10.8	6.3	4.3	1.7	2.6	2.6	4.3

キサントニン系色素3種類(R3, R104, R105)は抽出法-2で、キサントニン系色素3種類以外は抽出法-1により評価した。

表 6 LC-MSMS測定における各色素のピークの保持時間及びMRM条件

色素	保持時間 (min)	ESI法 (+/-)	Precursor ion (m/z)	CE (V)	Product ion (m/z)	色素	保持時間 (min)	ESI法 (+/-)	Precursor ion (m/z)	CE (V)	Product ion (m/z)
R2	2.6	-	268.2	14.0	228.1	Y4	1.4	-	233.2	7.0	211.1
			537.2	31.0	317.0				467.2	21.0	198.0
			268.2	22.0	206.1				233.2	14.0	198.1
R3	7.4	+	836.5	-51.0	582.9	Y5	4.1	-	407.0	30.0	207.1
			836.5	-64.0	329.1				407.0	37.0	142.0
			836.5	-80.0	200.1				407.0	47.0	206.0
R102	3.7	-	268.2	22.0	206.1	G3	6.4	+	765.0	-56.0	300.2
			537.2	27.0	302.0				765.0	-48.0	306.2
			268.2	18.0	221.1				765.0	-64.0	288.4
R104	8.6	-	782.6	27.0	658.6	B1	6.7	+	749.0	-70.0	171.0
			782.6	21.0	702.3				749.0	-41.0	457.4
			782.6	28.0	656.8				749.0	-59.0	311.7
R105	9.2	-	970.5	35.0	672.9	B2	3.0	-	421.0	30.0	340.9
			970.5	52.0	517.7				421.0	47.0	248.1
			970.5	67.0	390.8				421.0	43.0	260.0
R106	8.3	+	559.0	-50.0	514.9	R40	4.7	-	451.1	32.0	207.2
			559.0	-67.0	471.0				451.1	55.0	206.2
			559.0	-57.0	435.0				451.1	24.0	372.2

また、定量下限は試料溶液濃度として0.25 μg/mL (抽出法-1は試料中濃度0.05 mg/g, 抽出法-2は0.02 mg/g), 検出下限は試料溶液濃度として0.1 μg/mLであった。

LC-MSMSによる定性試験では、ブランク試料溶液との比較により特異性を確認し、全ての色素において、25 ng/mLの標準溶液で各ピークのS/N比が3.3以上であったことから、検出下限濃度を一律で25 ng/mL (抽出法-1は試料中濃度5 μg/g, 抽出法-2は2 μg/g) とした。各色素のピークの保持時間とMRM条件を表6に示した。

ICP-MSによる金属元素の確認では、ブランク試料への各添加濃度にてアルミニウム109.5%, ジルコニウム104.2%, バリウム101.4%と良好な回収率が得られ、その強度はブランクと比較し、十分な強度であったことから、特異性の確認とした。各金属とも直線性の範囲の相関係数rは0.99以上であり、良好な直線性を示すことを確認した。また、そのうち1 ng/mL濃度でも各金属とも検出可能であったことから、検出の下限値は試料中濃度に換算すると0.5 μg/gとなった。なお、アルミニウムについては、ブランクカプセル (サンプルブランク) からも検出されるため、試料中の含量として2.5 μg/g未満のものは不検出とした。

2. 実態調査

調査結果を表7に示した。調査対象とした30製品では、R3, Y5及びB1の使用頻度が高く、製品あたりの色素数は1種類だけでなく最大4種類の色素が使用されている製品もあった。

今回のカプセル剤皮を対象とした分析では、目視確認で色素の抽出が十分に進まなかった検体はなかった。抽出が十分でない場合、既報³⁾や第2版食品中の食品添加

物分析法⁷⁾等に準じて水酸化ナトリウム、塩酸等による抽出、精製を検討する必要があると考えられた。

抽出法-1でスクリーニング検査を実施したところ2製品を除き、製品表示と同じ色素が検出された。検出されなかった内の1製品 (検体No.7) については、LC-MSMSによる定性試験でも検出することができなかったが、内容物の外観等から表示されたY5はカプセルではなく内容物に添加されていると推測された。残り1製品 (検体No.18) は、抽出法-2で抽出したところ、表示にあるR3が検出された。

なお、製造販売承認書上は「微量 (0.1%以下)」が一般的な記載であり、本定量法における色素の検出量は、ほとんどの医薬品で製品全体質量に換算しても0.1%以下であったが、検体No.9, 21, 22では製品全体質量の0.1%を超えていた。0.1%を超えた製品の外観の色調は濃色であることから、この結果は妥当であると考えられる。

色素が検出されたカプセルについてICP-MSにより含有金属元素を分析したところ、12製品からブランクカプセル (サンプルブランク) における強度以上のアルミニウムが検出された。アルミニウムがレーキ由来とは断定はできないが、今後、その定量法を確立することで、その金属量と色素量の相関性を確認することにより金属レーキを推定することは可能であると考えられる。また、外用医薬品で使用が認められているが、カプセルに使用不可のレーキの金属元素であるジルコニウム及びバリウムについては、ジルコニウムが検出された製品があったが、その強度はいずれも低値であったことから色素由来ではないと判断した。また、元素不純物のクラス3にも指定されているバリウムは検出されなかった。

表7 実態調査結果

検体 No.	表示色素	検出したタール色素 (検出量mg/g) ^{※1}											検出した金属			
		R2	R3	R102	R104	R105	R106	Y4	Y5	G3	B1	B2	R40	Al ^{※2}	Zr	Ba
1	B1										0.08			検出	検出	
2	Y5								4.26							
3	Y5								4.09							
4	Y5								4.12							
5	Y5								4.93							
6	Y5								3.59							
7	R3, Y5, B1		0.03								0.13					
8	B1										0.13			検出	検出	
9	B1, R3		46.15								0.11			検出		
10	R3, Y5, B1		0.53							2.32	0.19			検出		
11	三酸化鉄, 黄色三二 酸化鉄, 黒酸化鉄															
12	R102, Y5, B1			0.73					1.24		0.12			検出		
13	B1										1.04			検出		
14	B2											0.53				
15	B2											1.54				
16	なし															
17	Y5, R102			0.17						0.33				検出		
18	Y4, R3		検出					2.96								
19	R3, Y5		1.19						7.34							
20	なし															
21	Y5								6.77							
22	Y5, B1, R3		42.85						0.06		0.14			検出		
23	B2											0.38				
24	Y5, B1								0.33		0.48					
25	Y5, B1								0.24		0.68			検出	検出	
26	Y5, B1								0.35		0.61					
27	B1, Y4							0.15			0.21			検出		
28	B1, Y4, Y5, R3		8.33					0.15	0.74		0.05			検出		
29	R2, Y5	4.36							5.60							
30	B1										0.17			検出		

検出量は有色のキャップ部又はカプセル剤皮全体の値とし、空欄は未検出を示す。

^{※1} 定量限界未満は検出とした。

^{※2} 試料中の含量として2.5 µg/g未満のものは不検出とした。

まとめ

医薬品に使用されるカプセル中のタール色素の分析法を検討し、市場流通製品の実態調査を行った。色素毎の回収率に応じて、2種類の抽出法、HPLC及びLC-MSMSを用いて検査を実施したが、配合成分表示外の色素は検出されなかった。一部の製品からは、一般的なタール色素の配合量である微量を超える色素が検出された。カプセルへの色素の使用について、製造販売承認書に記載する必要はないとはいえ、視認性に有用な最低量での使用を検討することが望ましいと考える。また、色素が検出された製品について、ICP-MSを用いて金属元素の確認を行ったところ複数のカプセルよりアルミニウムが検出されたものの、色素由来と推定される強度のジルコニウム及びバリウムは検出されなかった。このことから、今回確認したカプセルに使用された色素は、製造販売承認書に記載がなくとも、他の添加物と同様に適正に製造管理されていると推測した。

文献

- 1) 「承認基準の定められた一般用医薬品の申請書の記載及び添付資料の取扱い等について」の一部改正について、薬生薬審発 0616 第7号, 令和3年6月16日, 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知
- 2) 医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令, 昭和四十一年厚生省令第三十号,

- 3) 赤田良信, 河野貞子, 棚瀬弥一郎: 高速液体クロマトグラフ法によるカプセル中の色素の定量, 薬学雑誌, **98**, 1300-1304(1978)
- 4) 関戸晴子, 岸弘子: 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた食品中の合成着色料の分析, 神奈川県衛研報告, **38**, 35-38(2008)
- 5) 新藤哲也, 大石充男, 石川ふさ子, 堀江正男, 安井明子, 伊藤弘一: 食用黄色4号のHPLCにおける保持時間の変動, 東京健安研七年報, **57**, 205-209 (2006)
- 6) Ishikawa, F., Shigeoka, S., Nagashima, M., Takahashi, M., Kamimura, H., Onishi, K., et al.: Analytical method of 21 coal-tar dyes in protein-rich foods by solid-phase extraction and HPLC. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.), **41**, 194-199 (2000)
- 7) 厚生省生活衛生局食品化学課通知: 第2版食品中の食品添加物分析法, 衛化第15号, 平成12年3月30日

短報

化粧品中のユビデカレノンの分析法の検討

羽田千香子, 甲斐茂美

Analytical method of Ubidecarenone in cosmetics

Chikako HADA, Shigemi KAI

緒言

ユビデカレノン (CoQ10) はユビキノーン-10又はコエンザイムQ10とも言われ、動植物の体内で生合成される成分であり、ミトコンドリアに最も多く存在し電子伝達系における補酵素としてエネルギー産生に関与することが知られている^{1,2)}。また、医薬品では「基礎治療施行中の軽度及び中等度のうっ血性心不全症状」の効能効果³⁾で承認され、医薬部外品、化粧品では保湿効果等、健康食品では疲労感軽減等を謳った製品として幅広く利用されている。化粧品への配合については、医薬品成分に該当していることから化粧品基準⁴⁾により禁止されていたが、平成16年10月1日付け化粧品基準の一部改正により配合できる成分の範囲が拡大され、「粘膜に使用されない化粧品」については、化粧品100 g中の最大配合量として0.03 gまで配合できることとなった⁵⁾。

ユビデカレノンの分析法としては、日本薬局方各条ユビデカレノン定量法⁶⁾ (以下、日局とする)のほか、HPLC-ECD法⁷⁾、HPLC-UV法⁸⁾等が報告されている。しかし、これらは移動相に用いる有機溶媒を100%近い割合で使用しているため、多種多様な成分を有する化粧品においては、極性成分のいずれかがカラムに残ってしまい分析に支障をきたす恐れがある。そこで、化粧品中の極性成分による妨害を除去することを目的とし、カラム、移動相、抽出法の検討を行った。

方法

1. 試薬

標準品として、富士フィルム和光純薬株式会社のユビ

キノーン-10 (和光特級, 規格含量98.0%以上) を用いた。アセトニトリル, メタノールはHPLC用を, エタノールはエタノール (99.5), JIS特級を用いた。

2. 試料

ユビデカレノンの使用頻度が多いことから乳液及びクリームを, また「粘膜に使用されることがある化粧品」に該当することからユビデカレノンは配合禁止である口腔洗浄液及び口紅⁹⁾を対象とした。

3. 装置及び器具

本分析には、HPLCシステムとして、島津製作所製Nexera-i LC-2040シリーズを用いた。なお、PDA検出器の測定範囲は210~400 nm, 検出波長は275 nmとした。メンブランフィルターはメルクミリポア製マイレクスLG (孔径0.20 μ m, 直径13 mm) を用いた。

4. HPLC分析条件

分析カラムはKinetex 2.6 μ m Biphenyl 100Å (2.6 μ m, 3.0 mm ϕ ×150 mm, phenomenex社製) を用い、カラム温度は40°C, 移動相は水とアセトニトリルを用いたグラジエント送液とした。流量は0.5 ml/minで水/アセトニトリル混合比率50:50を初期条件として3分間でアセトニトリル100%まで直線的に変化させた後、10分間保持する条件とした。注入量は2 μ lとした。

5. 標準溶液調製

標準品約15 mgを精密に量り、エタノールを用いて溶解し、150 μ g/mlの標準原液とした。標準原液を段階的に希釈し、3.75, 7.5, 15, 30, 60, 120及び150 μ g/mlの標準溶液を調製した。

6. 試料溶液調製

試料約1 gを精密に量り、エタノールを3 ml加え、10分間超音波処理したのち、遠心分離(2800 rpm, 5min)し上澄液を採取した。残渣について、エタノールを3 ml加え10分間超音波処理したのち、同様に遠心分離し、上澄液を先の上澄液と合わせた。本操作を2回行った後、エタノールを用いて10 mlに定容して転倒混和した後、メンブランフィルターでろ過し試料溶液とした。

7. 添加回収試験

ユビデカレノンが不含であることをあらかじめ確認した乳液, クリーム, 口腔洗浄液及び口紅を用い、標準原液を添加し、その回収率を求めた。添加量は化粧品中の配合量として0.03 g/100 gになるよう添加し、繰り返し回数は6回とした。

8. 市販化粧品への適用

ユビデカレノンの表示のある乳液1製品及びクリーム2製品について、上記の条件を用いて定量した。

結果及び考察

1. HPLC条件の検討

HPLC条件は日局[®]を参考にした。ただし、化粧品におけるユビデカレノンの配合量は医薬品原料に比べて極少量のため、低濃度での分析及び化粧品に含有される多種多様な成分との分離も考慮する必要がある。また、分析対象の化粧品がユビデカレノンより極性が大きく異なる成分を含む場合、対象成分の分析に焦点を当てたアイソクラティックモードではそれらがカラムに残ってしまい分析に支障をきたす恐れがある。これらのことから、感度や理論段数の向上に考慮しつつ、水の割合をできるだけ高い状態とする有機溶媒とのグラジエント条件を検討することとした。

移動相に用いる有機溶媒の選定のため、ユビデカレノン標準品の30 $\mu\text{g/ml}$ アセトニトリル溶液5 μl について、移動相としてメタノール、エタノール及びアセトニトリル各100%として、流量を1.6 ml/min（日局[®]の移動相条件メタノール/エタノール（13:7）で約10分に当該ピークが検出される流量）、ODSカラムであるUnison US-C18（5 μm 、4.6 mm ϕ ×150 mm、インタクト製）を用いて測定したところ、メタノールでは約30分、エタノールでは約2分にピークを検出したが、アセトニトリルでは30分以内にピークは検出されなかった。水とメタノール、水とアセトニトリルのグラジエント法とした場合保持時間はさらに遅くなり、また、水とエタノールのグラジエント法ではカラム圧が耐圧上限近くまで上昇したことから、カラムの修飾基を変更することとした。

カラム修飾基の選定にあたり、目的成分はイソブレン基を多く有し π 電子を多く含むことから、フェニルカラムであるInertsil Ph-3（3 μm 、3.0 mm ϕ ×150 mm、ジエールサイエンス製）、ビフェニルカラムであるKinetex 2.6 μm Biphenyl 100Åを用いることとした。2本のカラム各々について移動相としてメタノール、エタノール及びアセトニトリル各100%を用いて流速0.4 ml/minで分析したところ、ビフェニルカラムで移動相にメタノールを用いた場合では約13分にピークを検出したが、それ以外の条件では各カラムとも5分以内に検出した。いずれの有機溶媒でも適切な保持時間で検出したことからカラム圧をなるべく低くするためアセトニトリルを選択し、水、アセトニトリルを用いたグラジエント条件を検討した。流量は0.5 ml/min、注入量2 μl 、ビフェニルカラムを用い、アセトニトリルの割合を初期条件50%から3分間で100%まで上げる条件で目的成分のピーク形状及び感度が良好であった（図1）。

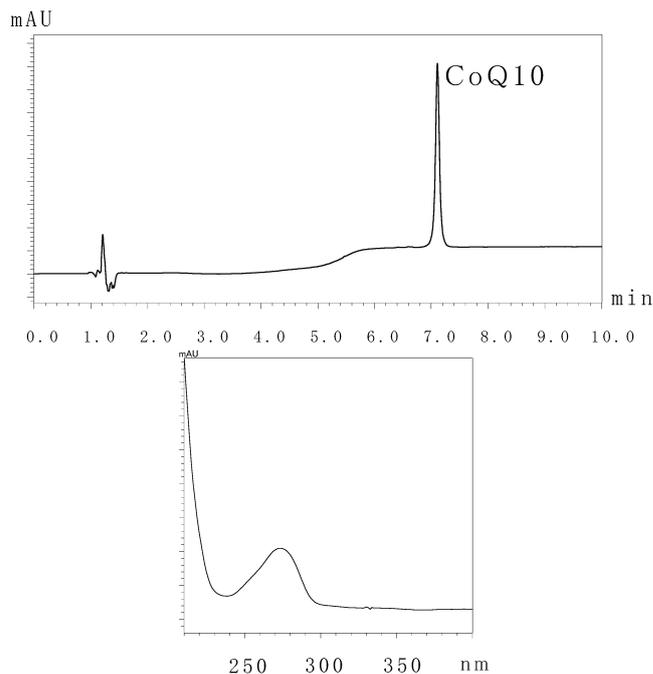


図1 ユビデカレノン標準溶液のクロマトグラム（上）及びPDAスペクトル（下）

2. 直線性及び検出限界

標準溶液について各濃度を3回繰り返し注入し、ユビデカレノンの濃度とピーク面積値との回帰直線の相関係数から直線性の範囲を確認した。その結果、標準溶液濃度3.75~150 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で相関係数は0.999以上となり、良好な直線性が得られた。また、検出限界はPDAスペクトルが確認できる濃度とし、2 $\mu\text{g/ml}$ であった。

3. 抽出方法の検討

試料1 gを10 mlメスフラスコに採取したのち、移動相に合わせて抽出溶媒はアセトニトリルを加えた。超音波処理後定容し、フィルターろ過して試料溶液とした。方法4.を用いて分析したところ、全体的に回収率が著しく低かった（10%~60%）。これは、化粧品に配合される脂溶性成分とユビデカレノンの親和性が高く、アセトニトリルへの移行が十分ではなかったためと思われる。そこでユビデカレノンの溶解性がアセトニトリルより高いエタノールを抽出溶媒に用いるほか、抽出方法と回数を変更して行うことを検討した。試料1 gを50 ml遠沈管に採取したのち、エタノールを加えて超音波処理して分散させた後、遠心分離して上澄液を10 mlメスフラスコにとり、残渣についてエタノールを加える操作から1回または2回同様に行った後10 mlに定容し、フィルターろ過した液を試料溶液とした。前の方法と回収率を比較したところ口紅のみ2回抽出で不十分であったが、3回抽出することで良好な回収率を得ることができた。このことから全ての試料で3回抽出を行うこととした。

4. ユビデカレノンと化粧品成分との分離

ブランク試料を本法に従って分析したところ、ユビデカレノンの保持時間にピークが検出されないことを確認した(図2, a-1, b-1, c-1, d-1). 各試料にユビデカレノン0.03 g/100 gを添加し、同様に分析したところ、いずれの試料においてもユビデカレノンのピークが化粧品由来成分と良好に分離されること(図2, a-2, b-2, c-2, d-2), 連続分析でも妨害成分が検出されなかったことから、本条件を採用することにした。

5. 添加回収試験

回収率は86.5~97.2%となり口紅でやや低い結果となったが、全体として概ね良好な回収率が得られた(表1)。

表1 ユビデカレノンの添加回収試験

試料	回収率	
	平均(%) ± 標準偏差	RSD(%)
乳液	94.6 ± 0.3	0.3
クリーム	97.2 ± 0.7	0.7
口腔洗浄液	96.3 ± 0.5	0.5
口紅	86.5 ± 2.0	2.3

n=6

6. 市販化粧品への適用

市販されている乳液1製品及びクリーム2製品を対象に分析を実施した。定量値を表2に、乳液及びクリーム1のクロマトグラムを図3に示した。クリーム2で定量値にバラツキが見られた。なお、いずれの試料も化粧品基準を満たしていた。

表2 市販化粧品の定量値

試料	定量値(mg/100 g)
乳液	9.53 ± 0.18
クリーム1	9.37 ± 0.44
クリーム2	14.41 ± 1.38

平均 ± 標準偏差, n=3

結論

化粧品中のユビデカレノンの分析法について抽出方法及びHPLC条件の検討を行ったところ、抽出溶媒にエタノールを用い、カラムはビフェニルカラム、水とアセトニトリルによるグラジエント送液によりユビデカレノンと化粧品成分を分離することができ、良好なピークを得た。また、直線性、検出限界を確認し、添加回収試験の結果も概ね良好であった。さらに、市販化粧品への適用を行い定量値を確認したところ、いずれの試料も化粧品基準を満たしており、本分析法適用の可能性を確認できた。今後は口紅における回収率の改善や化粧品の種類や製品数を増やす等、更なる検討に努めていきたい。

参考文献

- 1) 第十八改正日本薬局方解説書—条文・注・解説—, C-5903-5904, 廣川書店, 東京(2021)
- 2) 内閣府, 第29回新開発食品専門調査会資料5, 平成17年11月7日
- 3) 医薬品インタビューフォーム, 代謝性強心剤イノキノン, 2021年11月改訂(改訂第11版)
- 4) 化粧品基準, 厚生省告示第331号, 平成12年9月29日
- 5) 化粧品基準の一部を改正する件について, 厚生労働省告示第370号, 平成16年10月1日
- 6) 第十八改正日本薬局方, 厚生労働省告示第220号, 令和3年6月7日, 1749-1750
- 7) A.Hirayama, H.Kubo, M.Mita, O.Shirota and Y. Yamamoto: High-Sensitivity Simultaneous Analysis of Ubiquinol-10 and Ubiquinone-10 in Human Plasma, Journal of Chromatographic Science, **46**, 717-712 (2008)
- 8) 服部暁史, 青木由典, 阿部皓一, 芦澤一英, 岡本正志, 塚本靖和: 栄養ドリンク中の酸化型および還元型コエンザイムQ10の定量と保存中のコエンザイムQ10の温度安定性, ビタミン, **90**, 334-340 (2016)
- 9) 化粧品の全成分表示の表示方法等について, 医薬審発第163号, 医薬監麻発第220号, 平成13年3月6日

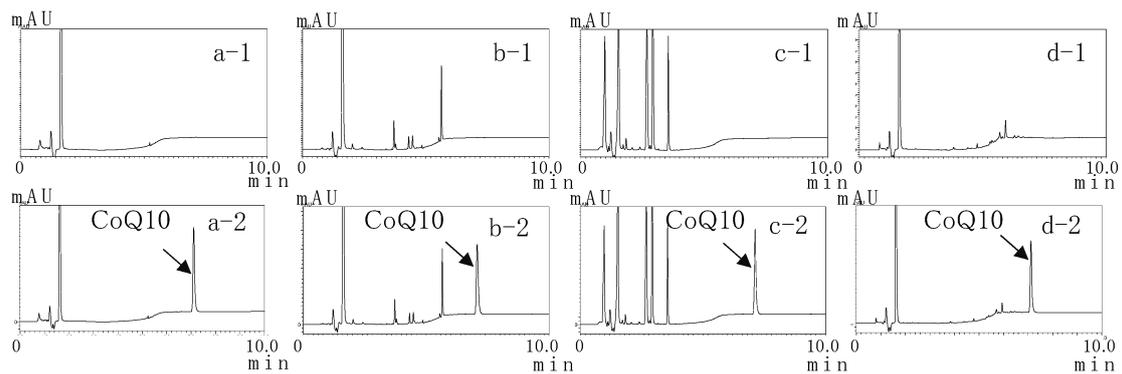


図2 ユビデカレノン未添加及び添加時の化粧品のクロマトグラム
 a: 乳液, b: クリーム, c: 口腔洗浄液, d: 口紅
 1: ユビデカレノン未添加 (ブランク試料), 2: ユビデカレノン0.03 g/100 g添加

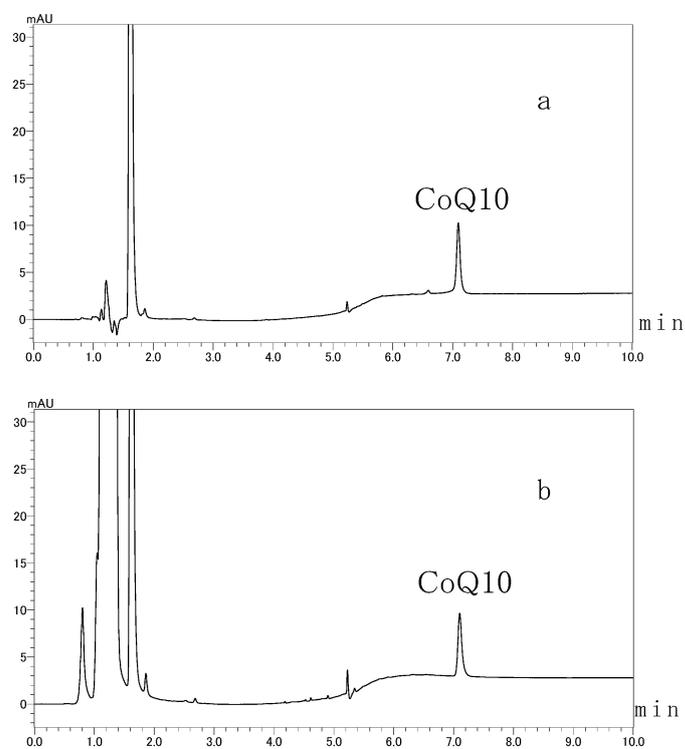


図3 市販化粧品のクロマトグラム
 a: 乳液 b: クリーム1

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3年度）

政岡智佳, 鈴木美雪, 古川一郎

Occurrence of enterohemorrhagic
Escherichia coli in Kanagawa Prefecture
 (April, 2021-March, 2022)

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。EHECの遺伝子型別検査は、これまでパルスフィールド・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（以下、MLVAと略す）が実施されていた。その後、「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、広域的な事案の探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、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3年度に収集したヒト及び牛枝肉から分離されたEHEC24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。

EHEC24株のうち14株は県域の医療機関等で分離され、8株は当所地域調査部において患者家族から分離され、2株は県食肉衛生検査所で同一の牛枝肉から分離された。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。24株の血清型および毒素型は、O157 (VT1&2) 3株、O157 (VT2) 10株、O26

表1 菌株の血清型および毒素

管轄保健所等	合計 (株)	血清型				
		O157		O26	O111	O128
		VT1&2	VT2	VT1	VT1	VT1&2
平塚保健福祉事務所	5	3	1	1		
小田原保健福祉事務所	5			2	3	
厚木保健福祉事務所	9		4	4		1
同上大和センター	3		3			
食肉衛生検査所	2		2			
合計 (割合)	24	3 (12.5%)	10 (41.7%)	7 (29.2%)	3 (12.5%)	1 (4.2%)

表2 患者・保菌者の年齢構成および

年齢層	男性	女性	計
0-5		1	1
6-10	3	2	5
11-20	3	1	4
21-30	2		2
31-40	1	3	4
41-50		4	4
51-60	1		1
61-70			0
>70		1	1
計	10	12	22

(VT1) 7株, O111 (VT1) 3株およびO128 (VT1&2) 1株であった。牛枝肉由来の2株を除く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10名、年齢範囲9～60歳で平均21.5歳及び中央値20歳、女性が12名、年齢範囲3～95歳で平均33.8歳及び中央値35.5歳であった(表2)。搬入時期は、6月が8株と最も多く、次いで10月の6株及び9月の3株と続いた。

PFGEは全24株について、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。MLVAは血清型O128の1株を除いた23株について、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(2018年11月編)」(<https://www.chieiken.gr.jp/manual01/MLVA/MLVA-handbook2018.pdf>) 記載の方法に従い実施した。MLVAの結果に基づいてPFGEと同じソフトを用いてMinimum spanning tree (以下、MSTと略す)を作成

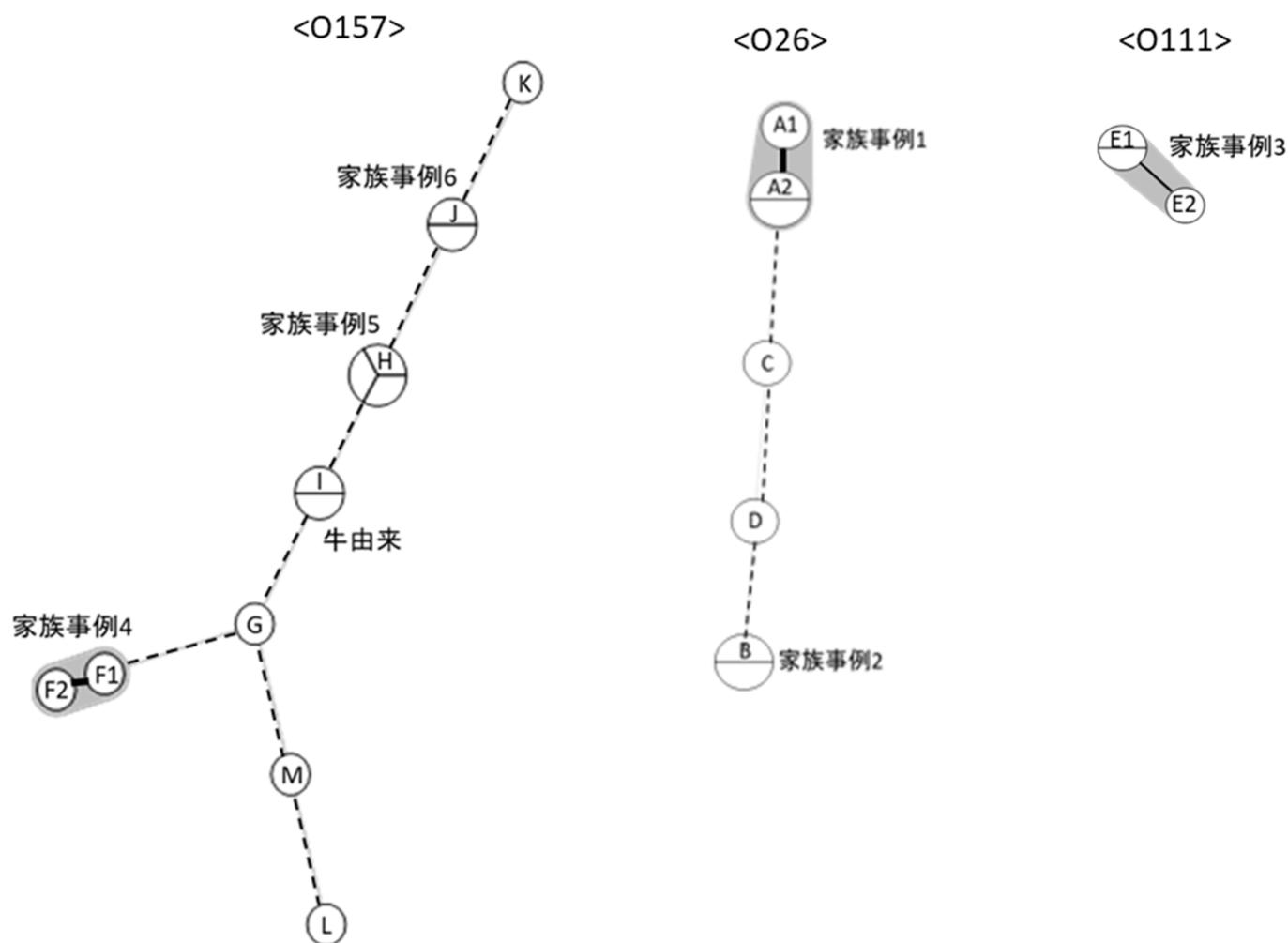


図1 MLVA解析結果に基づくMST
アルファベットおよび数字はMLVAパターンを示す

した。各円でMLVAパターンを示し、同一のMLVAパターンの菌株が存在した場合は、円を分割することで菌株数を示した。1遺伝子座が異なるsingle locus variant (以下、SLVと略す)の場合は円同士を太い実線(A1-A2間およびF1-F2間)で繋ぎ、2遺伝子座が異なるdouble locus variant (以下、DLVと略す)の場合は細い実線(E1-E2間)で繋いだ。さらにSLVおよびDLVの場合は、円同士をグレーで囲んだ。3遺伝子座以上異なる場合は、円は点線で繋がれており、点線の距離が長いほど異なる遺伝子座が多いことを示している。

血清型O128を除く23株のMLVAの結果から得られた血清型ごとのMSTを図1に示した。家族内感染事例では、MLVAパターンは一致もしくは、SLVまたはDLV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³⁾、今回SLVであった家族内感染事例1 (A1およびA2) および事例4 (F1およびF2) も疫学的背景



図2 血清型O26の遺伝子解析結果

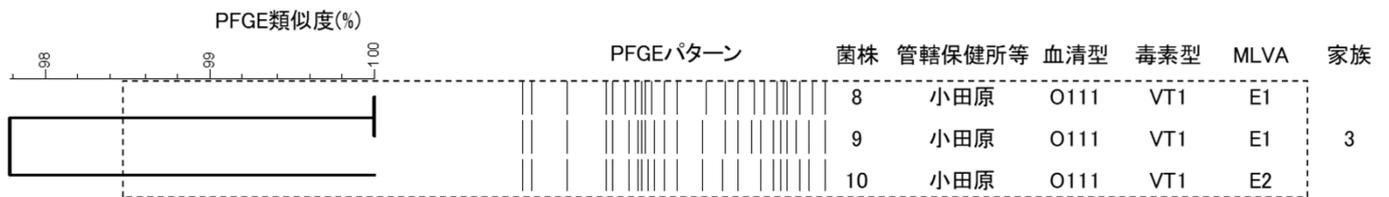


図3 血清型O111の遺伝子解析結果

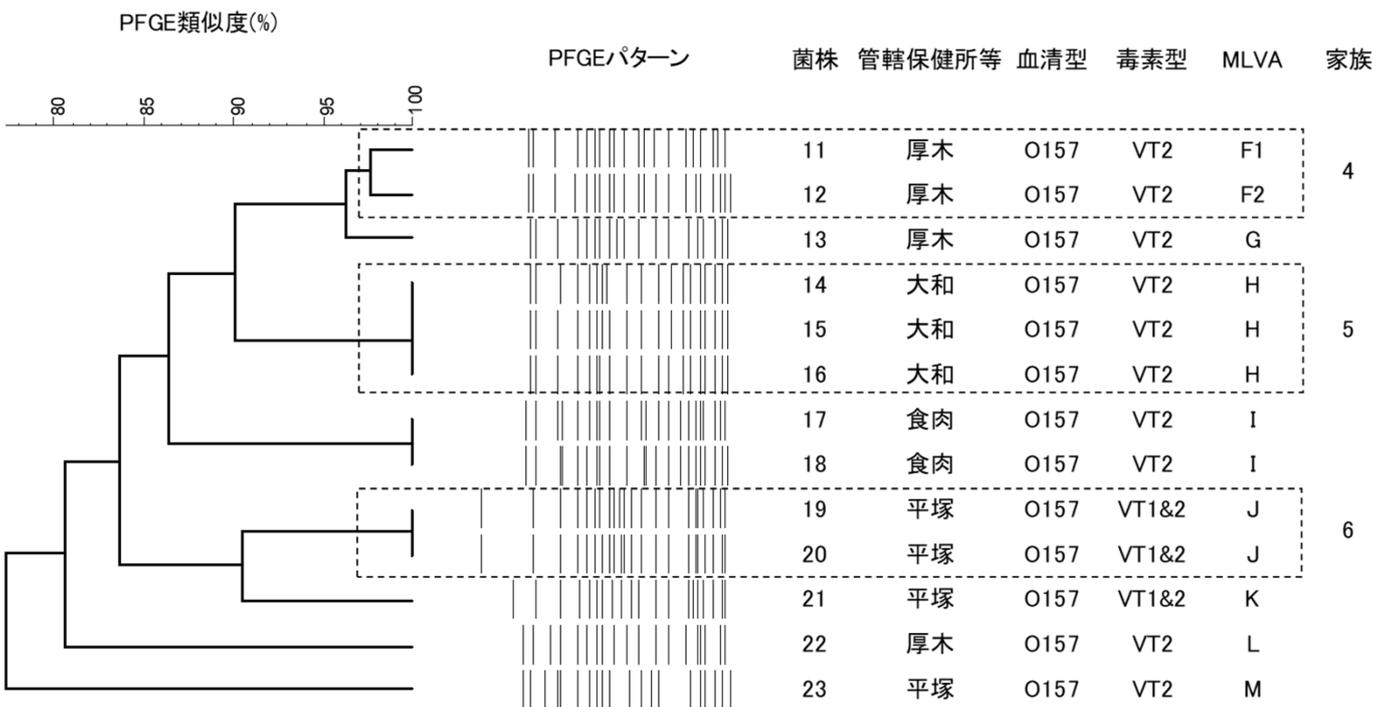


図4 血清型O157の遺伝子解析結果

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	3剤	ABPC,SM,TC	I	O111 VT1	2
		CP,KM,SM	II	O157 VT2	1
	単剤	TC	III	O111 VT1	1
		FOM	IV	O26 VT1	1
中間	単剤	FOM	V	O26 VT1	3
感受性		VI		16	
計				24	

も考慮し、同一事例であると考えられた。また、DLVであった家族内感染事例3（E1およびE2）で異なっていた2遺伝子座は、プラスミド上に存在することが知られており⁴⁾、プラスミドの脱落によりMLVAパターンに差が生じたと考えられた。これらのことから、MLVAでは疫学調査により関連が認められる場合は、2遺伝子座までの違いであれば、同一事例と判断できると考えられた。さらに、PFGEパターンを基に血清型ごとに作成したデンドログラムに、MLVA等の結果もあわせて表記した（図2～4）。家族内感染事例で分離された菌株は、全事例でPFGEパターンが一致または類似度95%以上を示した。一方で、家族内感染事例4のNo.11およびNo.12の菌株とNo.13の菌株ではPFGE解析では類似度が96.2%と高い値を示したが（図4）、MLVAによるMSTでは点線で繋がれており（図1、F1-G間）、疫学情報でも関連が見られず異なる事例であると考えられた。今回の調査では、遺伝子型別においてはPFGEよりもMLVAの方がより解像度が高い結果となった。しかし、MLVAでは全ての血清型を型別することができないため、汎用性の面ではPFGEが優れていると考えられた。

次に、全24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、5株がいずれかの薬剤に耐性を示し、このうち3株が多剤耐性であった。さらに、2株が1薬剤に対して耐性を示し、3株が1薬剤に対し中間を示した。残りの16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6パターンに分けら

れた（表3）。

本調査期間中に当所に搬入された菌株は牛由来の2株を含め24株であった。このうちヒト由来の22株中15株（68.2%）は家族内感染事例由来で、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は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、疫学情報から同居家族であるなど同一の感染源が疑われた菌株同士の関連を裏付ける結果となり、EHECの検査においてMLVA等の遺伝子解析を実施することは、集団感染事例の迅速な探知に繋がると考えられた。

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、食肉衛生検査所ならびに医療危機対策本部室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) 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)
- 4) 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)
- 5) Clinical and laboratory standards institute; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, CLSI document M100-S25, (2015)

資料

接触者検便および陰性確認検便からの 腸管出血性大腸菌検出状況 (2016年度～2021年度)

今井良美, 片山丘, 小松祐子, 近藤木綿子,
森口真理子, 岩井宏樹*, 宮原香代子

Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in contact and negative confirmation stool specimen (April, 2016 - March, 2022)

Yoshimi IMAI, Takashi KATAYAMA,
Yuko KOMATSU, Yuko KONDO,
Mariko MORIGUCHI, Koki IWAI,
and Kayoko MIYAHARA

当所では三類感染症（コレラ、細菌性赤痢、腸チフス、パラチフス、腸管出血性大腸菌感染症）の蔓延防止対策として、保健福祉事務所の依頼により、接触者の病原体保有状況確認や患者の陰性確認（治療等により病原体を保有していないことの確認）の検査を実施している。2016年度から2021年度までの6年間に実施した三類感染症の病原体検査実施検体数は1348検体で、腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: 以下、EHECと略す）が1290検体、赤痢菌が45検体、コレラ菌が4検体、チフス菌が6検体、パラチフス菌が3検体であった。三類感染症の中ではEHECが最も多く、全国的に同様の傾向がみられた^{1,2)}。

当所では対象とするO群により異なる培地及び増菌培養法を採用している^{3,4)}。そこで今回2016年度から2021年度までの6年間に実施したEHECの検査について、O群別分離状況、直接分離培養法と増菌培養法による分離状況、使用した選択分離培地およびベロ毒素（以下、VTと略す）遺伝子スクリーニング検査結果についてまと

めたので報告する。

EHECは1290検体中149検体より分離され、そのO群の内訳はO157が58検体、O26が78検体、O111が5検体、O121が4検体、O103が3検体、O145が1検体であった（表1）。

表1 EHECの分離状況

陽性検体数		149
O群内訳	O157	58
	O26	78
	O111	5
	O121	4
	O103	3
	O145	1
陰性検体数		1141
計		1290

検査は便を滅菌生理食塩水で約10%乳剤にした後、スポイトで数滴滴下し選択分離培地に塗抹する直接分離培養法と、便の乳剤を数滴滴下し増菌培地で培養後、一白金耳量を選択分離培地に塗抹する増菌培養法を併用した。増菌培養法はノボジオシン加mEC培地（以下、n+mEC培地と略す、栄研化学）を用いて42℃にて20時間から24時間培養し、O157以外のO群についてはmEC培地（日水製薬）を用いた37℃培養を併用した。検査を行っている中で、直接分離培養法でEHECが分離されない場合は、増菌培養法でも菌が分離されない検体が多いと思われた。そこでEHECが分離された149検体について、検出法の内訳をまとめた（表2）。

EHECが分離された149検体中141検体は直接分離培養法で分離され、8検体は直接分離培養法では分離されず、増菌培養法のみで分離された。

増菌培養法のみで分離された8検体の内訳は、O157が5検体、O26、O111およびO121が各1検体であった。O157はn+mEC培地を用いた42℃培養を採用しているが、O157以外のO群はn+mEC培地を用いた42℃培養とmEC培地を用いた37℃培養を併用し、そのうちmEC培地を用いた37℃培養で分離された。O157が分離された5検体のうち3検体は治療後の排菌を確認するための検査（陰性確認）であった。

EHECの分離培養は糖の分解性を利用し鑑別する培地と酵素基質を利用し色調から鑑別する培地（以下、酵素基質培地と略す）を併用している³⁾。またセフィキシム0.05 mg/Lおよび亜テルル酸カリウム2.5 mg/L（以下、CTと略す）を添加することでその他の腸内細菌の発育を抑制しEHECの分離率を高めている。分離検体数が多

神奈川県衛生研究所 地域調査部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
*現 神奈川県衛生研究所 地域調査部 小田原分室
〒250-0042 小田原市荻窪350-1 小田原合同庁舎内4階

表2 EHECの検出法の内訳

O群	検出数	培養方法	
		直接	増菌培養法のみで検出
0157	58	53	5
026	78	77	1
0111	5	4	1
0121	4	3	1
0103	3	3	
0145	2	1	
計	149	141	8

いO157, O26について直接分離培養法で使用した分離培地をまとめたところ表3に示した組合せであった。

CT - ソルビトールマッコンキー培地 (以下, CT - SMAC培地と略す, 栄研化学) およびCT - ラムノースマッコンキー培地 (以下, CT - RMAC培地と略す, ベクトン・デイッキンソン) は糖の分解を利用している選択分離培地である^{3,4)}。クロモアガーO157培地 (クロモアガー社), クロモアガーO157TAM培地 (クロモアガー社), クロモアガーSTEC培地 (以下, STEC培地と略す, クロモアガー社) およびViRx O26培地 (栄研化学) は酵素基質培地である。通常STECは添付の選択剤混合物を添加して使用するが, 菌分離を考慮して選択性の弱い培地も作製して検査を実施している。表3では選択剤混合物を添加したSTECを選択剤混合物 - STEC培地, 添加していないSTECをSTEC培地とした。

分離平板培地には糖の分解性を利用した培地を必ず使用した。酵素基質培地は当初1つのO群を鑑別するクロモアガーO157培地やViRx O26培地を使用していたが, その後, 様々なO群のEHECを単色で一括鑑別できるSTEC培地を使用するようになったため, 様々な組合せとなっている。

直接分離培養法でO157が分離された53検体のうち, CT - SMAC培地とクロモアガーO157培地の組合せが7検体, CT - SMAC培地とクロモアガーO157TAM培地の組合せが3検体, CT - SMAC培地とクロモアガーO157培地およびクロモアガーO157TAM培地の組合せが2検体, CT - SMAC培地とクロモアガーO157培地および選択剤混合物 - STEC培地の組合せが28検体, CT - SMAC培地とクロモアガーO157TAM培地および選択剤混合物 - STEC培地の組合せが13検体であった。表には示していないが, クロモアガーO157培地およびクロモアガーO157TAM培地のみでO157が分離された検体はなかった。

直接分離培養法でO26が分離された77検体のうち, CT - RMAC培地とViRx O26培地の組合せが2検体, CT - RMAC培地と選択剤混合物 - STEC培地の組合せが12検体, CT - RMAC培地とViRx O26培地および選択剤混合物 - STEC培地の組合せが56検体, CT - RMAC培地とViRx O26培地, 選択剤混合物 - STEC培地およびSTEC培地の組合せが7検体であった。表には示していないが, ViRx O26培地, STEC培地のみでO26が分離された検体はなかった。

表3 選択分離培地の組合せ

0157		菌が分離された検体数	
使用培地			
CT-SMAC	クロモアガーO157		7
CT-SMAC	クロモアガーO157TAM		3
CT-SMAC	クロモアガーO157	クロモアガーO157TAM	2
CT-SMAC	クロモアガーO157	選択剤混合物 - STEC	28
CT-SMAC	クロモアガーO157TAM	選択剤混合物 - STEC	13
計			53
026		菌が分離された検体数	
使用培地			
CT-RMAC	ViRx O26		2
CT-RMAC	選択剤混合物 - STEC		12
CT-RMAC	ViRx O26	選択剤混合物 - STEC	56
CT-RMAC	ViRx O26	選択剤混合物 - STEC STEC	7
計			77

O157, O26および O111以外のEHECは、糖分解で鑑別する培地がなくSTECの色調もO群によっては明記されていないため、VT遺伝子のスクリーニング検査を追加した。VT遺伝子のスクリーニング検査は選択分離培地から単独集落の複数をまとめたもの、もしくは濃厚発育部からかきとり得た菌体（以下、コロニースイープと略す）または増菌培養液を検体として実施した。VT遺伝子の検出方法はPCR法（タカラバイオ）またはLamp法（栄研化学）を使用した^{3,4)}。この結果を表4に示した。VT遺伝子スクリーニング検査実施数は、43検体であった。そのうちスクリーニング結果が陽性で分離培養が陽性であった検体は6検体、スクリーニング結果が陰性で分離培養が陽性であった検体は0検体、スクリーニング結果が陽性で分離培養が陰性であった検体は2検体、スクリーニング結果が陰性で分離培養も陰性であった検体は35検体であった。VT遺伝子スクリーニング検査実施数43検体のうち41検体はスクリーニング結果と分離培養の結果が一致した。しかし2検体はVTスクリーニング検査が陽性であったが、EHECの菌分離には至らなかった。その2検体はO103であり、そのうち1検体は、DHL培地（栄研化学）からのコロニースイープや増菌培養液を検体としたものはスクリーニング検査が陽性であったが、選択剤混合物 - STEC培地にEHECの色調を示すコロニーが見られなかった。その検体についてDHL培地からコロニーの釣菌および増菌培養液はビーズ法も実施したが、O103は分離できずVTスクリーニング検査の結果と分離培養の結果は必ずしも一致しないことを経験した。使用したDHL培地は一般的な大腸菌分離培地であり、糖分解で鑑別する培地がない場合に採用している^{3,4)}。

VTスクリーニング検査が陽性であり、かつEHECが分離された6検体はO121, O103, O145であった。

過去6年間に検査を実施したEHECの検体について分離状況等についてまとめた結果、9割以上が直接分離培養法で分離されていることから、検査の選択肢を増やしEHECを効率よく分離するために、選択分離培地の種類、STEC培地に添加する選択剤混合物の変更、CT濃度を検討していく必要がある。増菌培養法のみでEHECが分離された検体数は少ないが、O157以外のO群は37°CmEC培地で検出された。また陰性確認のような菌量が少ないと予想される検体について増菌培養法は有効であった。現在は直接分離培養法でEHECが分離された場合は増菌培養法での同定は行っていないが、今後は増菌培養法での同定も行い、増菌培地の種類や温度条件のデータを蓄積していくことも重要である。

最後に衛生研究所への迅速な検体搬送、情報提供にご尽力いただきました各保健福祉事務所およびセンター保健予防課の方々、ご指導をいただきました衛生研究所微生物部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。43, 1 (103) -4 (106)
- 2) 国立感染症研究所：感染症発生動向調査、感染症発生動向調査年別一覧表 - 2020 - , 三類感染症 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10066-report-ja2020-10.html> (2022/6/10アクセス)
- 3) 腸管出血性大腸菌O26, O103, O111, O121, O145及びO157の検査法について 平成26年11月20日 食安監発1120第1号
- 4) 国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル 2022年4月改訂3-6 (2022)

表4 VT遺伝子スクリーニング及びEHEC分離培養結果

		分離培養		計
		陽性	陰性	
VT遺伝子スクリーニング	陽性	6	2	8
	陰性	0	35	35
		6	37	43

資料

神奈川県内で発生したイヌサフラン 誤食による食中毒事例

福光徹, 萩尾真人, 林孝子, 桑原千雅子

Accidental poisoning with *Colchicum autumnale* in Kanagawa prefecture

Toru FUKUMITSU, Masahito HAGIO,
Takako HAYASHI and Chikako KUWAHARA

有毒植物を原因とする食中毒は、食中毒全体に占める割合は低いですが、致死率が高いことから、食品衛生上重要な問題である。特に、近年イヌサフランやスイセン等の観賞用植物による食中毒が増加傾向にある¹⁾。イヌサフランは、葉をギョウジャニンニクやオオバギボウシと、球根をニンニク、タマネギやジャガイモと誤認する事例が多い。イヌサフランの主要な有毒成分はコルヒチンであり、全草に含まれる。中毒症状は嘔吐、下痢、皮膚の知覚減退、呼吸困難等で、重症の場合は死亡することもある²⁾。2017年～2021年の5年間の有毒植物（キノコを除く）による食中毒において、国内では合計7件の死亡事例が発生しているが、うち6件の原因植物がイヌサフランであった¹⁾。

神奈川県所管域においても、2021年5月にイヌサフランの誤食による食中毒が発生した。患者自身が自宅敷地内で球根3個をタマネギと認識して掘り起こし、うち1個を炒めて全量を喫食したところ、嘔吐の症状を呈し、その後病院に搬送された。患者は1名であった。医師は、患者が喫食した植物はイヌサフランである可能性が高いと判断した。本事例において、喫食残品はなかったが、患者が採取し保管していた球根（以下、検体1）（図1）及び保健福祉事務所が同じ場所で採取した同種と考えられる植物3株（以下、検体2～4）（図2）について、保健福祉事務所からイヌサフランの有毒成分の検査依頼があった。これを受けて、当所においてLC-MS/MSによる検査を実施したので報告する。

検査対象は、イヌサフランの有毒成分として知られて

いるコルヒチン及びデメコルシンの2成分とした。検体1（図1）はそのまま全量を細切均一化し、検査試料とした。検体2～4は、付着した泥を流水で落とし、余分な水分を除去した後、葉、球根及び球根の下部から生えるひげ根（図3）の3部位に分け（図2）、それぞれ細切均一化し、検査試料とした。検体1から葉及びひげ根が除去されていたことを踏まえ、部位別に検査を実施することとした。検査方法については、試験溶液の調製方法を図4に、LC-MS/MS測定条件を表1及び表2に示した。



図1 患者が採取した球根（検体1）
上が葉側、下がひげ根側

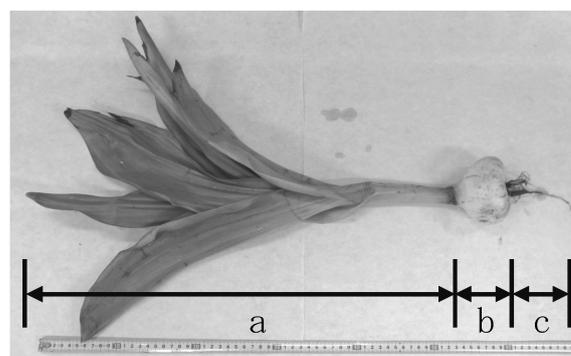


図2 保健福祉事務所が採取した植物
代表例として検体2を示した。葉 (a)、球根 (b) 及び
ひげ根 (c) の3部位に分けた。



図3 球根及びひげ根

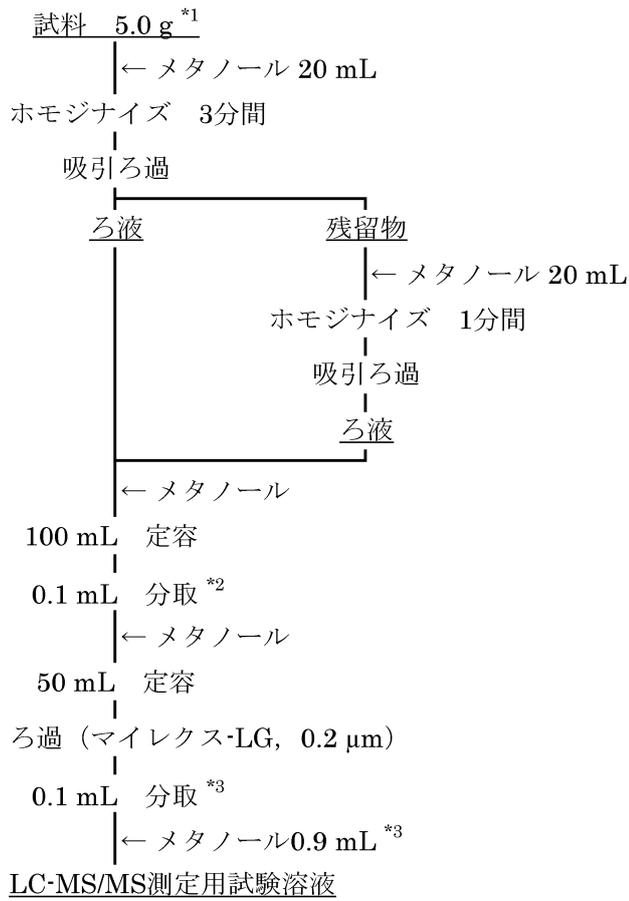


図4 試験溶液の調製方法
 *1 ひげ根は0.20 g又は0.30 g
 *2 添加回収試料は1 mL分取
 *3 ひげ根及び添加回収試料は実施せず

本検査法の性能確認のため、ジャガイモを用いて添加回収試験を実施した (n=1)。試料への添加濃度は各成分0.001 mg/gとした。回収率はコルヒチンが103.5%、デメコルシンが105.4%であり、良好な結果が得られた。

検体の検査結果を表3に示した。すべての検体、部位からコルヒチン及びデメコルシンが検出された。部位別に検査した検体2、3及び4は、いずれもコルヒチン、デメコルシンともに球根中の含有濃度が最も高かった。また、コルヒチンは葉に比べひげ根の含有濃度が若干高かったが、デメコルシンは葉に比べひげ根の含有濃度が低かった。なお、各検体の球根中のコルヒチン含有濃度は、デメコルシンに比べばらつきが大きく、検体の重量とも相関がなかった。検体1のコルヒチン含有濃度は0.20 mg/gであったが、これはコルヒチン27 mgを含む計算になる。コルヒチンの最小致死量は、ヒト経口摂取で0.086 mg/kg体重とされており、体重50 kgの場合は4.3 mgに相当する^{2,3)}。患者が喫食した球根と検体1のコルヒチン含有量が同程度であったと仮定すると、患

表1 装置及び測定条件

LC	
装置	ACQUITY UPLC I-Class PLUS (Waters社)
カラム	CAPCELL CORE ADME (株大阪ソーダ) 2.1 mm I.D.×100 mm, 粒子径2.7 μm
カラム温度	40℃
移動相	A液: 5 mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液 B液: 5 mmol/Lギ酸アンモニウムメタノール溶液
グラジエント	B液%: 0分 (60%) - 3分 (60%) - 5分 (95%) - 7分 (95%) - 7.1分 (5%) (直線グラジエント)
流量	0.3 mL/min
注入量	3 μL
MS/MS	
装置	Xevo TQ-XS (Waters社)
キャピラリー電圧	3 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
コルヒチン	2.0	400.3	358.2	152.1
デメコルシン	2.1	372.3	310.3	152.3

者は最小致死量を超えるコルヒチンを摂取した可能性が考えられた。一方、デメコルシンはコルヒチンに比べて毒性が弱く、最小毒性量がヒト経口摂取で0.2 mg/kg体重とされており、体重50 kgの場合は10 mgに相当する³⁾。検体1のデメコルシン含有濃度は0.40 mg/gであったことから、検体1はデメコルシンを54 mg含む計算となり、患者はデメコルシン単体でも毒性が発現するほどの量の球根を喫食した可能性が考えられた。

患者は2週間程度の入院を経て回復した。植物に含まれる有毒成分の個体差及び調理による有毒成分の損失等の要因により⁴⁾、実際の有毒成分の摂取量は想定より低かった可能性も考えられる。一方、1 mg/kg体重のコルヒチンを経口摂取したものの治療により回復した症例もあることから^{3,5)}、定量値に近い有毒成分を実際に摂取

表3 イヌサフラン有毒成分の定量結果

検体	重量 (g)	葉の 長さ (cm)	有毒成分濃度 (mg/g)				
			コルヒチン		デメコルシン		
			部位別	全草*	部位別	全草*	
検体1	球根 (患者採取)	135.4	0.20		0.40		
	葉	97.8	0.12		0.15		
検体2	球根	225.8	0.25	0.21	0.62	0.48	
	ひげ根	1.4	0.18		0.022		
	葉	71.5	0.097		0.13		
検体3	球根	128.3	1.1	0.74	0.61	0.43	
	ひげ根	3.9	0.14		0.061		
	葉	44.7	0.19		0.12		
検体4	球根	66.9	0.78	0.54	0.54	0.37	
	ひげ根	1.4	0.23		0.038		

*葉、球根及びひげ根を含めた濃度

しつつも、治療が奏功し、患者が快方に向かった可能性も考えられた。

本事例では、形態観察による鑑定の結果、同じ場所で採取された植物がイヌサフランであると確認されたこと、患者の症状がイヌサフランの中毒症状と一致していること、患者を診察した医師から食中毒の届出があったことからイヌサフランを原因とする食中毒と断定された。本検査結果は食中毒と断定された後に確定したが、イヌサフランの有毒成分が食中毒の原因であることを補完する情報を提示することができたと考える。本事例と異なり、調理残品しか入手できないなど、形態観察が困難な事例の発生時には、原因究明のため、有毒成分の分析結果がより重要になると考えられる。今後、さらに検査体制を強化し、様々な有毒成分の摂取による健康被害事例に迅速に対応できるように努めていきたい。

最後に、本検査の実施にご協力くださいました神奈川県厚木保健福祉事務所生活衛生部食品衛生課の皆様へ深謝いたします。

文献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計資料
〈https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html〉 (2022/4/22アクセス)
- 2) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル，高等植物，イヌサフラン
〈<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000058791.html>〉 (2022/4/22アクセス)
- 3) National Library of Medicine: ChemIDplus
〈<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>〉 (2022/4/22アクセス)
- 4) 佐藤正幸，姉帯正樹：有毒植物イヌサフラン調理品中のコルヒチン残留量，北海道立衛生研究所報，60, 45-48 (2010)
- 5) Folpini, A., and Furfori, P.: Colchicine toxicity-clinical features and treatment. Massive overdose case report, J. Toxicol. Clin. Toxicol., 33, 71-77. (1995)

他誌掲載論文抄録

(令和3年4月～令和4年3月)

合成樹脂製の器具・容器包装における溶出試験の精度の検証

尾崎麻子(大阪健安基研), 六鹿元雄(国衛研), 岸映里(大阪健安基研), 阿部智之(日食衛協), 阿部裕(国衛研), 安藤景子(長野県環境研), 石原絹代(日食分セ), 牛山温子(川崎市健安研), 内田晋作(日穀検), 大坂郁恵(埼玉衛研), 大野浩之(名古屋市衛研), 風間貴充(日食分セ), 加藤千佳(愛知衛研), 小林尚(食分開セ), 佐藤環(福岡保環研), 柴田博(顕微鏡院), 関戸晴子(神奈川県衛研), 高島秀夫(化研評機), 田中葵(日海検), 外岡大幸(さいたま市衛研), 花澤耕太郎(食環検協), 山口未来(国衛研), 山田悟志(日食検), 吉川光英(東京都健安研), 渡辺一成(化研評機), 佐藤恭子(国衛研)

食品衛生学雑誌, 63, 51-61 (2022)

溶出試験は器具・容器包装の規格適合性や安全性を確認するうえで重要な試験法であるが, 溶出操作から定量までを含めた溶出試験全体の試験室間共同試験はほとんど実施されていない。そこで, 22機関が参加し, 広範なオクタノール/水分分配係数を有する10物質を添加した8種類の合成樹脂製モデル試料を用いて試験室間共同試験を行い溶出試験全体の精度を検証した。その結果, HorRat(r)は大部分が基準を満たしたが, HorRat(R)は基準を超過したものが多かった。そのため, 単一試験室で行うには精度は概ね確保されるが, 試験室間の精度には問題があった。この主な原因としては, 試験機関間における溶出操作時の温度や時間管理等の試験溶液の調製操作の差異によるものと考えられた。

大豆タンパク質の定量に及ぼす調理・加工の影響

渡邊裕子, 秋山晴代(帝京平成大学), 大澤伸彦(前川崎市健康研), 井村香織(相模原市衛研), 伊関直美(相模原市衛研), 植田壽美子(相模原市衛研), 政岡智佳, 赤星千絵(川崎市健安研)

食品衛生学雑誌62(6),193-202(2021)

大豆の調理・加工によるタンパク質定量への影響を検討した。リン酸緩衝食塩水抽出画分はピシンコニン酸法で測定し, ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)と2-メルカプトエタノール(ME)含有緩衝液抽出画分は2-D

Quant Kitで測定し, 各画分のSDSポリアクリルアミド電気泳動分析を行い, さらに各種ELISAで測定を行った。豆腐調理過程では浸漬大豆と生呉でタンパク質濃度が変動し, 試料均一化時の水分量によるタンパク質溶解性の変動が要因と考えられた。豆乳作製時の生呉の加熱でのタンパク質濃度の低下は熱変性を表すと考えられた。豆腐ではSDS, ME抽出による測定系への影響が考えられた。加熱調理では炒り豆を除き50kDa付近以上と20kDa付近のタンパク質が変性し, 2度揚げ豆腐で40kDa付近のタンパク質が変性したが, 煮豆を除いたタンパク質濃度は低下しなかった。さらに炒り豆, ゆば, 炒りおから, 揚げ豆腐では調理時間に伴いタンパク質濃度が増加したことから, 水分の低下に伴いタンパク質の変性温度が高温にシフトしたと考えられた。食品表示法に準拠した2種のELISAは大豆調理加工品や納豆を除いた発酵食品, 健康食品中のタンパク質とペプチドを検出し, 大豆タンパク質の検出に有用であった。

Gene Expression Over Time During Cell Transformation Due to Non-Genotoxic Carcinogen Treatment of Bhas 42 Cells

Kiyomi Ohmori^{1,2*}, Asuka Kamei³, Yuki Watanabe⁴ and Keiko Abe^{3,5}

¹ Chemical Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

² Research Initiatives and Promotion Organization, Yokohama National University

³ Group for Food Functionality Assessment, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology

⁴ Health and Anti-Aging Project, Kanagawa Academy of Science and Technology

⁵ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

* Corresponding author

International Journal of Molecular Sciences, 23, 3216, 2022

Bhas 42細胞形質転換試験 (Bhas 42 CTA) は、遺伝子毒性発がん物質 (NGTxC) を含む腫瘍促進化合物による細胞形質転換を遺伝子毒性発がん物質とは区別して検出するための特定のツールとして、経済協力開発機構 (OECD) で認定された唯一の試験法である。この試験法は、腫瘍性形質転換の表現型検出を可能にするという大きな利点を提供する。非遺伝毒性発がん物質を含む腫瘍促進化合物の細胞形質転換メカニズムの研究に Bhas42CTA を使用することの主な利点は、Bhas 42細胞は、*v-Ha-ras* 遺伝子がマウス線維芽細胞にトランスフェクトされた細胞株であるため、腫瘍開始化合物による処理を要することなく、被験物質の細胞形質転換活性を直接検出できることである。完全繰り返し実験 3 回の Bhas 42CTA において、腫瘍促進化合物であり NGTxC でもある 12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート (TPA) で処理した Bhas 42細胞について、各回での経時的な 4 点の RNA 試料を調製し、DNA マイクロアレイを使用して遺伝子発現変動を解析した。本報告は、NGTxC 単独による細胞形質転換過程での経時的な遺伝子発現を網羅的に解析した最初の論文である。TPA で処理された Bhas42細胞の細胞形質転換過程において活性化または不活性化された経路は、RAS 遺伝子だけでなく、がんの特徴であるさまざまなパスウェイにも直接関連していた。

Deep neural network for the determination of transformed foci in Bhas 42 cell transformation assay

Minami Masumoto¹, Ittetsu Fukuda², Suguru Furihata², Takahiro Arai², Tetsuo Kageyama^{1,3}, Kiyomi Ohmori^{1,4*}, Shinichi Shirakawa², Junichi Fukuda^{1,3*}

¹ Faculty of Engineering, Yokohama National University

² Graduate School of Environment and Information Sciences

³ Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology

⁴ Kanagawa Prefectural Institute of Public Health
* Corresponding author

Scientific Reports, 11 : 23344, 2021

Bhas 42細胞形質転換試験は、Bhas 42細胞に発がん物質をばく露し、コンフルエントな単層上に形質転換巣と呼ばれるフォーカスを形成することにより、化学物質の発がん性を予測する目的で使用されている。形質転換フォーカスは、形態学的基準により訓練を受けた専門家によって分類および定量化される。この試験法は国際的

な検証研究によって認定され、OECDによってガイダンス文書として発行されているが、個々の形質転換フォーカスの分類には人手や時間を要し、精度の高い判定には教育訓練を要する。そこで我々は、ディープニューラルネットワークを使用して、フォーカスをより迅速かつ客観的に分類することを提案する。データセットを取得するために、Bhas42CTAは強力な腫瘍プロモーターである12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテートを処理して実施し、フォーカス画像は専門家が分類した(合計1405枚の画像)。判定のラベル付けを行ったフォーカス画像は、ランダム画像処理で拡張され、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) のトレーニングに供した。トレーニングされたCNNは、TPAのテストデータセットで0.95の曲線スコアの下領域を示し、フォーカス分類の初心者による従来法による成果を大幅に上回った。TPA以外の2種の腫瘍プロモーターをテストデータとしたCNNの性能は、AUCが0.87であった。CNNは、フォーカス判定の基本的なツールとして細胞形質転換試験をサポートする可能性がある。

Detectability of papaya, tomato, apple and banana DNA in dried fruit products processed with food additive sulfites

Kiyomi Ohmori¹, Chie Akaboshi², Eiko Sato², Jumpei Narushima³, Shinya Kimata³, Keisuke Soga⁴, Kazunari Kondo⁴, Hiroshi Akiyama⁴, Kousuke Nakamura^{4*}

¹ Chemistry Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

² Kawasaki City Institute for Public Health

³ Food Research Institute

⁴ National Institute of Health Sciences

* Corresponding author

日本食品化学学会誌 28 (3), 107-116, 2021

本研究では、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (リアルタイムPCR) によるドライフルーツに含有するフルーツ由来のデオキシリボ核酸 (DNA) の検出可能性について調査した。ゲノムDNA中に低コピー数存在するパパイヤ内在性遺伝子 (Chymopapain)、トマト内在性遺伝子 (LAT52)、ならびにリンゴ内在性遺伝子 (Apo 5) を標的に、漂白、防腐剤または抗酸化目的に食品添加物亜硫酸塩で処理されたドライフルーツ製品について調査した結果、14製品中13製品のパパイヤドライフルーツ、8製品中8製品のトマトドライフルーツ、3製品中3製品のリンゴドライフルーツから、検出の閾値として設定したCq値40以下で、DNAは検出されなかった。一方で、

ゲノム中に高コピー数存在する内因性遺伝子(18SrDNA)については、同程度の内在性遺伝子の増幅断片長が再現性良く検出された。また、亜硫酸塩の添加の有無にかかわらず、調査したすべてのバナナドライフルーツ製品については、単一コピー数のバナナ内因性遺伝子(BAN)が50 ng DNAを鋳型にCq値22.33~35.80で検出された。以上の結果は、ドライフルーツ製品では、原材料のフルーツと亜硫酸塩が用いられた加工工程の組み合わせによってはDNA収量が不十分で、低コピー数の遺伝子を標的とした場合、リアルタイムPCRを用いたドライフルーツ中の遺伝子組換え食品やアレルゲンを含む食品等の再現性ある検出は困難になる可能性が示唆された。

畜水産物中のキノロン系およびテトラサイクリン系薬剤の一斉分析法

福光 徹, 脇ますみ, 萩尾真人, 林 孝子, 桑原千雅子 (神奈川衛研)

食品衛生学雑誌, 62, 168-174 (2021)

畜水産物中のキノロン系およびテトラサイクリン系薬剤18成分を対象としたLC-MS/MSによる高精度な一斉分析法を確立した。n-ヘキサン存在下、EDTA含有クエン酸緩衝液-メタノール-アセトニトリル(3:1:1, v/v/v)混液で試料から対象薬剤を抽出し、Oasis PRiME HLBミニカラムで精製した。本分析法は、n-ヘキサンをを用いることで、脂肪を含む固体試料中の対象薬剤も抽出可能であることが示唆された。また、ミニカラムからの溶出液に0.1 vol%ギ酸含有・メタノール-アセトニトリル(3:7, v/v)混液を用いることで、回収率の低下を最小限にしつつ精製効果を向上させることができた。6種類の食品試料を用いて妥当性評価を実施した結果、選択性および添加濃度におけるS/N比は良好であり、真度70.6~113.8%, 併行精度9.0%以下, 室内精度15.5%以下とガイドラインの目標値を満たした。

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)における繊維製品中防虫加工剤試験法改定に係る検討

西以和貴, 上村仁, 大嶋智子 (大安研), 菅谷なえ子 (横浜市衛研), 印南佳織 (千葉県衛研), 田畑佳世 (堺市衛研), 河上強志 (国立衛研),

YAKUGAKU ZASSHI, 141(8), 1031-1040 (2021)

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より、繊維製品中の防虫加工剤(ディルドリンおよび4,6-dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole; DTTB)の使用が規制されている。これらの薬剤の現公定試験法は約40年前に定められたものであるため、我々は以前の研究で改良した分析法を開発した。本研究では、この改良試験法の妥当性を確認した。3 μg/g(規制値の1/10)と30 μg/g(規制値)に調製したサンプルを6つの検査機関で分析したところ、ほぼ全てのサンプルにおいて高い真度及び精度(真度:70~120%, 併行精度:<10%, 室内精度:<15%)を示し、本法の有効性が確認された。また、規制導入前に実際に市場に流通していた3つのサンプルについても検証を行った。これらのサンプルの分析結果は、検査機関間のばらつきが少なく、本法が実際のサンプルにも適用可能であることが確認された。一方、ある検査機関では定量値が他の検査機関より明らかに低くなっていた。これは、GC-MS分析において、試料マトリックスの内標準物質への影響(マトリックス効果)が大きくなっていることが主な原因と考えられた。そこで、疑似マトリックスとしてポリエチレングリコール300(PEG)を用いた分析方法を検討した。PEGは標準溶液とマトリックス含有溶液のGC-MS応答差を最小化することから、PEGを用いたGC-MS分析は本法におけるマトリックス効果対策に有用であると考えられた。

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

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

Bulletin
of
Kanagawa Prefectural Institute of Public Health
No.52 (February, 2023)

CONTENTS

Review

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- The detection of allergens in processed foods ~From the examination of food labeling~
Hiroko WATANABE 1

Short reports

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- Construction of sample information management system at interferon-gamma release assay (IGRA)
in Kanagawa Prefecture
Naoki NAKAJIMA, Michio JINNAI and Ichiro FURUKAWA 9

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Study of analytical methods and a survey of the undeclared coal-tar dyes in capsule shell on the
Certificate for manufacturing and marketing approval of pharmaceuticals
Takahiro IWAHASHI and Kenichi KUMASAKA 13
- Analytical method of Ubidecarenone in cosmetics
Chikako HADA and Shigemi KAI 18

Data

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

- Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April,2021-March,2022)
Tomoka MASAOKA, Miyuki SUZUKI and Ichiro FURUKAWA 22
- Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in contact and negative confirmation stool
specimen (April,2016 - March,2022)
Yoshimi IMAI, Takashi KATAYAMA, Yuko KOMATSU, Yuko KONDO,
Mariko MORIGUCHI, Koki IWAI and Kayoko MIYAHARA 26

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

- Accidental poisoning with *Colchicum autumnale* in Kanagawa prefecture
Toru FUKUMITSU, Masahito HAGIO, Takako HAYASHI and Chikako KUWAHARA 29

-
- Abstracts of original papers by research staffs (April, 2021 - March, 2022) 32
-