

神奈川県衛生研究所研究報告

第36号 (平成18年9月)

目 次

短 報

アメーバ内増菌法を利用したレジオネラ属菌の検出 渡辺祐子, 高橋智恵子, 大屋日登美, 岡崎則男	1
VNTR法を利用した結核菌の遺伝子型別 高橋智恵子, 富岡敏昭, 綿貫祐司, 西森 敬, 岡崎則男	4
<i>Campylobacter jejuni</i> および <i>Campylobacter coli</i> 混合感染事例における遺伝子学的手法の活用 鈴木理恵子, 今井良美, 後藤喜子, 安田哲夫, 新川隆康	8
A群レンサ球菌食中毒事例由来の分離株に関する検討 鈴木理恵子, 新川隆康	12
加熱損傷リステリア菌 (<i>Listeria monocytogenes</i> IID577) の選択増菌培養法に関する基礎的検討 寺西 大, 古川 一郎, 相川勝弘, 浅井良一, 尾上洋一 新川隆康	14
高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた畜産物中の動物用医薬品の分析 甲斐茂美, 赤星 猛, 岸美智子	19
アレルギー物質を含む食品の表示制度における検査結果について 渡邊裕子, 甲斐茂美, 岸美智子	23
化粧品中のサリチル酸オクチルの高速液体クロマトグラフィーによる分析 松阪綾子, 伊藤理恵, 佐藤信夫, 土井佳代	27
木造住宅室内空気中におけるパラジクロルベンゼン濃度の推移 長谷川一夫, 仲野富美, 辻 清美, 伏脇裕一	30
相模川における水質管理目標設定項目農薬の実態調査 渡辺貞夫, 上村 仁	33
ホルムアルデヒド標準液 (メタノール溶液) のアンプル封入保存の問題点 岩淵真樹, 長谷川一夫	37
食事から摂取する人工放射性核種および微量元素濃度について 飯島育代, 高城裕之, 戸村健児	41

資 料

神奈川県におけるつつが虫病の発生状況 (平成17年度) 古屋由美子, 片山 丘	45
神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況 (平成17年度) 宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子	48
県域の感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況 (平成16年度, 17年度) 伊達佳美, 片山 丘, 古屋由美子	51
ガスクロマトグラフ質量分析計による農産物中の残留農薬一斉分析法の検討結果 佐藤久美子, 藤巻照久, 岸美智子, 伊藤伸一	53
食品汚染物質残留実態調査結果 (平成16年度, 平成17年度) 赤星 猛, 佐藤久美子, 林 孝子, 渡邊裕子 甲斐茂美, 藤巻照久, 岸美智子	56
遺伝子組換え食品の分析結果 (平成17年度) 大森清美, 土屋久世, 渡邊裕子, 関)晴子 岸 弘子, 山田利治	59
他誌掲載論文抄録 (平成17年4月～平成18年3月)	62

研究報告編集委員会（平成18年度）

委員長

今井光信（所長）

委員

増田 瑠 司（副所長）

田 村 哲（管理課）

佐藤 善 博（企画情報部）

石原 ともえ（微生物部）

古屋 由美子（微生物部）

山田 利 治（理化学部）

甲斐 茂 美（理化学部）

長谷川 幸 江（地域調査部）

事務局

長 田 幸 郎（企画情報部）



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所研究報告（略称：神奈川衛研報告）は、当所における研究業績の発表機関誌で原則として年1回発行しています。

この出版物に関するお問い合わせは、下記へお願いします。

〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
神奈川県衛生研究所 研究報告編集委員会
電 話 0467-83-4400
FAX 0467-83-4457
mail eiken.1540.kikakujoyouhou@pref.kanagawa.jp

短報

アメーバ内増菌法を利用した レジオネラ属菌の検出

渡辺祐子, 高橋智恵子, 大屋日登美, 岡崎則男

Isolation of *Legionella* spp. Using an Amoebic Coculture Procedure

Yuko WATANABE, Chieko TAKAHASHI
Hitomi OHYA and Norio OKAZAKI

はじめに

温泉や冷却塔水などの環境水からのレジオネラ属菌検出法は、通常、レジオネラ症防止指針¹⁾や上水試験方法²⁾等に基づき直接培養法で行われている。しかし、レジオネラ属菌の発育が遅いことから、初代分離培養には3日から7日を要し、このためレジオネラ属菌以外の菌やカビなどの夾雑微生物の混入が多い検体ではこれらの発育により、レジオネラ属菌の検出を困難にしてしまうことがある。また、レジオネラ属菌数が少ない検体においては増菌法の利用が考えられるが、増菌法は簡便な選択増菌培養培地がないことや結果が判明するまでに日数を要することから、一般的には増菌法は採用されていない。一方、レジオネラ属菌は細胞内増殖性を持つことから、レジオネラ属菌宿主アメーバ内で増殖し、放散されることが知られている^{3,4)}。そこで、夾雑微生物の混入が多い検体からレジオネラ属菌の検出を可能にし、検出感度を高めるため、レジオネラ属菌の宿主アメーバ（以下アメーバ）を利用した増菌法について検討を行った。なお、レジオネラ属菌のアメーバを利用した増菌培養法は、検出方法として確立されていないが、土壌からのレジオネラ属菌の検出にアメーバを利用した方法が報告されている⁵⁾。

方法

1. レジオネラ属菌のアメーバ内増殖性について

アメーバ培養液(PYGC培地)10mlを入れたボトル中でアメーバ(*Acanthamoeba* spp. TACE-1)を30℃で2日間

培養した。さらに、温泉分離株 *Legionella pneumophila* 1群を10⁶CFU/mlの濃度になるように接種して、30℃で培養した。この培養液を原則8時間ごとに、スライドガラス5枚にスポイトで1滴ずつ採取し、ギムザ染色を行い、アメーバ内の*L. pneumophila*を観察した。

2. アメーバ存在下の*L. pneumophila*菌数の経時的推移について

20ml滅菌蒸留水および50%PYGC培地をそれぞれ入れた2種類のボトル各2本に、3日培養した*L. pneumophila*を10CFU/mlと100CFU/mlになるように接種した。これらに2日培養した新鮮培養アメーバを10⁶個/mlに添加し、30℃で培養して、24時間ごとに培養液100μlを取り必要に応じて希釈を行い、BCYE培地に塗布して培養液中の*L. pneumophila*菌数を測定した。

3. アメーバ内増菌法と直接培養法の比較

直接培養法はレジオネラ症防止指針に従い河川水1,000mlを検体とし、0.45μmのメンブランフィルターでろ過濃縮後、4分間酸処理(0.2M HCl-KCl buffer pH2.2)を行った。その0.1mlをWYOα寒天培地に塗布し、36℃で培養後レジオネラ属菌の検出を行った。また、アメーバ内増菌法は河川水100mlをコルベンに入れ、それにPYGC培地で2日培養しておいたアメーバを10⁶個/mlに添加し、30℃で60日間培養した。その50mlを取り、3800rpm20分間遠心後、0.5mlを残し上清を取り除いた(100倍濃縮)。その0.2mlを50℃5分間加熱処理後、さらに室温で5分間等量の酸処理液(0.2M HCl-KCl buffer pH2.2)で処理を行い、0.1mlをWYOα寒天培地に塗布し、これらを直接培養法と同様に培養した。温泉水についても河川水と同様にアメーバ内増菌法の利用を検討した。この時のアメーバ内増菌法の培養期間は30日とした。

結果

1. レジオネラ属菌のアメーバ内増殖性

培養24時間前後からアメーバ内に*L. pneumophila*の増殖が認められ(図1)、さらに約48時間後には、増殖した*L. pneumophila*がアメーバ外へ放散される様子が観察された。このように*L. pneumophila*がアメーバ内に取り込まれた後2日~3日で菌数が増加し、アメーバを破壊して放散することが判明した。

2. アメーバ存在下の*L. pneumophila*菌数の経時的推移について

図2に示すように、*L. pneumophila*培養開始後約48時間までは培養液中の*L. pneumophila*菌数の変化は認められなかったが、これ以降、アメーバ添加ボトルでは、*L. pneumophila*の菌数が急増した。これはアメーバ内で増殖した*L. pneumophila*が外部へと放散された結果、培

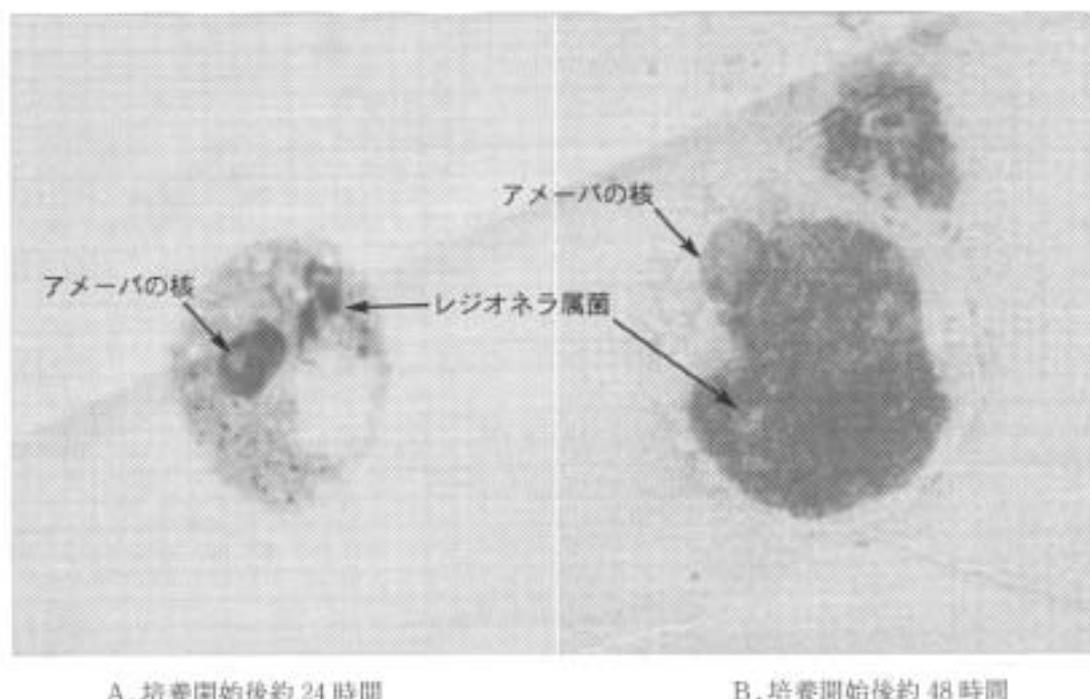


図 1 レジオネラ属菌 (*L. pneumophila* 1 群) のアモeba内での増殖

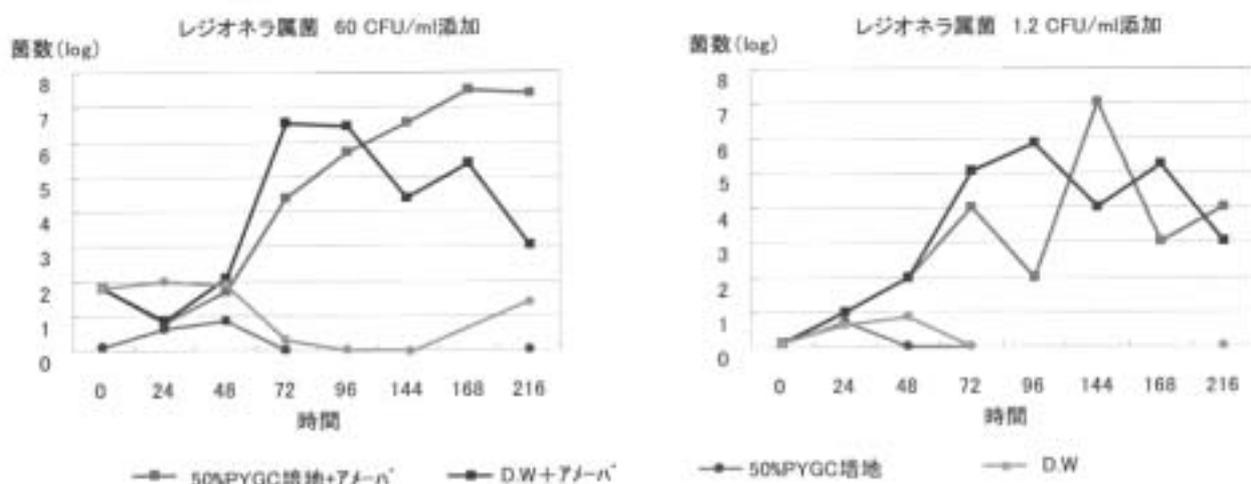


図 2 アモeba内増菌法における *L. pneumophila* 1 群の経時的菌数の推移

養液中の菌数の増加がもたらされたものと考えられた。

3. アモeba内増菌法と直接培養法の比較

10件の河川水のレジオネラ属菌検出結果を表1に示した。直接培養法では加熱処理と酸処理を併用したにもかかわらず、夾雑微生物の発育が著しくこの結果、発育が遅いレジオネラ属菌は、発育が妨げられているのか、存在しないのかの判定がつかないために判定不可となったものが8件あり、検出されたのは2件のみであった。一方、アモeba内増菌法では、判定不可となった8件のうち6件からレジオネラ属菌を検出することができた。

温泉水についての結果を表2に示した。温泉水の場合

は直接培養検査における夾雑微生物の発育は少なく、直接培養法により10件中5件から検出された。直接培養法の検出限界である <10 CFU/100mlの検体5件のうちアモeba内増菌法では2件からレジオネラ属菌を検出した。しかし直接培養検査でレジオネラ属菌を検出した5件のうちアモeba内増菌法において1件は純培養状にレジオネラ属菌が検出されたが、2件は夾雑微生物が発育し、レジオネラ属菌発育の確認ができなかった。他の2件は、培地上にレジオネラ属菌を含む集落の発育が認められなかった。

表1 河川水におけるアメーバ内増菌法を利用した
レジオネラ属菌の検出

検体名	Legionella 属菌検出状況	
	直接培養	アメーバ増菌培養
河川水 1	判定不可*	検出
河川水 2	判定不可	検出
河川水 3	判定不可	不検出
河川水 4	判定不可	検出
河川水 5	判定不可	検出
河川水 6	判定不可	検出
河川水 7	200 CFU/100ml	検出
河川水 8	判定不可	検出
河川水 9	判定不可	不検出
河川水 10	10 CFU/100ml	検出

* 判定不可：夾雑微生物発育のため

表2 温泉水におけるアメーバ内増菌法を利用した
レジオネラ属菌の検出

検体名	Legionella 属菌検出状況	
	直接培養	アメーバ増菌培養
温泉 1	<10 CFU/100ml*	不検出
温泉 2	<10 CFU/100ml	検出
温泉 3	<10 CFU/100ml	検出
温泉 4	130 CFU/100ml	判定不可**
温泉 5	40 CFU/100ml	判定不可
温泉 6	20 CFU/100ml	検出（純粹培養状）
温泉 7	50 CFU/100ml	不検出
温泉 8	<10 CFU/100ml	不検出
温泉 9	190 CFU/100ml	不検出
温泉 10	<10 CFU/100ml	不検出

* <10CFU/100ml：検出限界

** 判定不可：夾雑微生物発育のため

考 察

レジオネラ属菌の発育を妨げる夾雑微生物が多数存在する河川水のレジオネラ属菌検出にアメーバ内増菌法が有用と考えられた。また、夾雑微生物の少ない温泉水においても、直接培養法では検出できなかった温泉水からレジオネラ属菌を検出することができた。

一方、温泉水から直接培養法でレジオネラ属菌が検出された検体にもかかわらず、アメーバ内増菌法で検出されない例が認められた。これは、温泉水においては、40～50℃前後の生息環境や泉質のpHが影響して加熱や酸処理に抵抗性のある菌が生息し、WYO α 寒天培地上に優勢に発育してレジオネラ属菌の発育を妨げたことにより、検出できなかった可能性が予想された。しかし、培

地上に集落の発育の認められなかった2件については原因は不明であり、今後の検討を要する課題であると考えられた。

アメーバ増菌培養期間は土壌からレジオネラ属菌を分離する方法⁹⁾に要する培養時間から、経験的に今回30日と60日間としたが、レジオネラ属菌のアメーバ内増殖時間を考慮すれば、現在よりも短縮することが可能と考えられる。さらにPCR法と併用するなど検査時間の短縮も課題と考えられる。アメーバ内増菌法は、夾雑微生物が多く混在する検水の検査法として有用と考えられるとともに、通常の直接培養法でレジオネラ属菌が検出限界以下(<10CFU/100ml)の検体であっても、検出できる可能性が示唆された。これにより検水中に検出限界以下であってもレジオネラ属菌が生息していることが判明することにより事前に維持管理を強化するなど、予防対策をとりうると思われる。今後、これらレジオネラ属菌の検出を妨げる要因について検討を行い、より効果的な検査方法の確立を進めていきたい。

謝 辞

Acanthamoeba spp. TACE-1を分与していただくとともに、貴重なご助言をいただきました国立感染症研究所寄生動物部の八木田健司先生に深謝いたします。また、検体採取にご協力いただいた当所黒木俊郎主任研究員に深謝いたします。

(平成18年7月20日受理)

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課監修：新版レジオネラ症防止指針，財団法人ビル管理教育センター編，東京(1997)
- 2) 水質試験等調査専門委員会：上水試験方法2001年版，社団法人日本水道協会編，東京(2001)
- 3) 八木田健司，泉山信司，遠藤卓郎：レジオネラ属菌の水系汚染一宿主アメーバの果たす役割，水環境学会誌26，14-19(2003)
- 4) 古畑勝則：レジオネラ汚染対策におけるアメーバの重要性，防菌防黴，30，217-223(2002)
- 5) 古畑勝則：土壌からのレジオネラ属菌の分離状況，防菌防黴，30，555-561(2002)

短 報

VNTR法を利用した結核菌の 遺伝子型別

高橋智恵子¹, 富岡敏昭², 綿貫祐司²,
西森 敬³, 岡崎則男¹

Molecular Typing for *Mycobacterium tuberculosis* by Variable Numbers of Tandem Repeats Analysis

Chieko TAKAHASHI¹, Toshiaki TOMIOKA²,
Yuji WATANUKI²,
Kei NISHIMORI³ and Norio OKAZAKI¹

はじめに

結核の集団発生時には、感染経路・感染源を解明し、感染の拡大および再発の防止を図ることが重要である。このための分子疫学的手法として、主にRestriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法による結核菌分離株の遺伝子型別が、国際標準法として実施されてきた^{1,2)}。しかし、この方法は、制限酵素処理、電気泳動、サザンブロットイングおよびDNAハイブリダイゼーション等の複雑な工程と機器および高度の技術を必要とする。また、所要日数も1週間以上であり、結果が画像であるため、施設間のデータを比較することが困難である。これらの難点を解消する方法として最近Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法が検討されている^{3,4)}。VNTR法は、DNA上に存在する縦列反復塩基配列 (20~100bp) の反復数が、菌株により異なることを利用して型別をする方法で、PCRと電気泳動を基礎技術としているため迅速かつ簡便である。さらに、結果を数値化することにより、施設間のデータ比較が容易であり、広域データベースの構築も可能とされる。これらの利点から、結核の分子疫学的手法として現在有望視されている^{5,6)}。しかし、VNTR法は、いまだに確立されたものではなく、結核菌DNA

の抽出、DNA上の解析領域、PCR条件およびPCR産物の解析等の基礎的部分においても検討課題が残されているのが現状である。

本報では、VNTR法による結核菌の遺伝子型別を実施する際のDNA調製法、PCR反応液および電気泳動用アガロースゲルの種類と濃度等について検討したのち、臨床材料より分離された50株のVNTR解析を行った結果、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

結核予防会結核研究所より分与された結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra株 (弱毒標準株) を用いて基礎的検討を行った。さらに、1996~2004年に県内医療機関で患者より分離された結核菌50株を用いてクラスター解析を実施した。分離株中には同一患者由来株 (3名より2株ずつ: 6株)、検査室交差汚染の疑い株 (3株) および家族内由来株 (2株) が含まれていた。

2. 結核菌DNAの調製

2%小川培地 (極東製薬) に発育した結核菌集落2~3個を鈎菌し、以下に記述する5種類の方法でPCR用テンプレートDNAの調製を行った。①精製水抽出法⁷⁾ および②TE緩衝液抽出法⁸⁾ は、それぞれの液に浮遊後100℃20分加熱抽出したもの、③精製水抽出後フェノール/クロロホルム抽出したもの⁹⁾、④アイソプラント (ニッポンジーン) で抽出したもの¹⁰⁾ および⑤インスタジーンDNA精製マトリックス (以下インスタジーン、バイオラッド) で抽出したもの¹¹⁾ である。④、⑤は試薬添付の説明書に従って操作した。また、③、④、⑤の抽出液については、Ultrospec 3100 pro (アマシャムバイオサイエンス) によりDNA濃度を定量した。PCR用テンプレートDNAとして用いる際に①および②は、100倍希釈し、③、④および⑤は、DNA濃度を2μg/mlに調製した。希釈には、精製水を使用した。

3. PCR反応液・標的増幅領域・PCR条件

PCR反応液は、Premix Taq (以下Premix, タカラバイ

表1 VNTR法で使用した解析領域

TBTR 1	ETR-A	TBTR 9	MIRU-16
2	ETR-B	10	MIRU-20
3	ETR-C	11	MIRU-23
4	ETR-D	12	MIRU-24
5	ETR-E	13	MIRU-26
6	ETR-F	14	MIRU-27
7	MTRU-2	15	MIRU-39
8	MIRU-10	16	MIRU-40

1 神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
chieko.vvme@pref.kanagawa.jp

2 神奈川県立循環器呼吸器病センター

3 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

オ) およびpuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (以下Ready,アマシャムバイオサイエンス)の2種類を使用した。増幅領域およびプライマーは、西森らの報告¹¹⁾に従った。ETR領域³⁾ およびMIRU領域⁴⁾ から選択された16箇所の解析領域を表1に示したが、西森らはこれらをTBTR 1~16として記載しており、本報ではその記載に従った。なお、TBTR 10,12,13および14の4領域を増幅するためのプライマーは、西森ら¹¹⁾ が独自に設定したものである。PCR条件は、95℃5分のプレヒーティング後、94℃10秒、68℃30秒、72℃60秒の増幅サイクルを36回実施した。

4. PCR産物の解析

PCR産物の電気泳動には、アガロースH14 (タカラバイオ) およびNuSieve 3:1アガロース (タカラバイオ) を2あるいは3%の濃度で使用した。泳動終了後のアガロースゲルをエチジウムプロマイド染色し、泳動像をパソコンに取り込み、DNAサイズマーカー (100bp DNA Ladder, タカラバイオ) を目安として、目視あるいは画像解析ソフトEDAS290FF (インビトロジェン) にて、16箇所の解析領域のDNAバンドのサイズを判読した。

5. 臨床分離株のクラスター解析

臨床分離株50株について、各DNAサイズから反復塩基配列の反復数を換算表¹¹⁾より求めた。この16の反復数の並びをVNTRパターンとし、解析用ソフト秀吉 (社会情報サービス) を用いて、ユークリッド距離 (ワード法) によるクラスター解析を行った。

結果および考察

1. VNTR条件の基礎的検討結果

結核菌H37Ra株を用い、PCR用テンプレートDNAの調製法を比較検討したところ、表2に示すように①~⑤の方法の内、⑤インスタジーンによる抽出が簡便性およびDNA回収量共に最も優れていた。①精製水あるいは②TE緩衝液での加熱抽出は、簡便ではあるもののタンパク質の混入量が多くDNA定量ができないため、菌株ごとのDNA濃度を一定にすることが困難であった。また、③精製水で加熱処理後にフェノール/クロロホルム抽出

表2 テンプレート DNA 抽出法の比較

抽出法	操作	核酸濃度(μg/ml)
精製水	簡便	測定不能
TE緩衝液	簡便	測定不能
フェノール/クロロホルム	煩雑	51.8
アイソプラント	煩雑	44.4
インスタジーンマトリックス	簡便	137.8

あるいは④アイソプラントによる抽出は、DNA回収量において⑤の約3分の1量しか回収できず、さらに④は、操作が煩雑で時間を要した。これらの結果から、DNA抽出にはインスタジーンを使用することとした。

次に、PCR反応液としてPremixとReadyを比較すると、結核菌H37Ra株を用いた場合は両者においてPCR結果に優劣は認められなかった。しかし、臨床分離株では、Premixを使用した場合菌株により、16箇所の解析領域の中で増幅されない領域が認められたが、Readyの使用により増幅が確認された。VNTR法では、1菌株につき16箇所をPCRで増幅するため、まず、経費の面でより安価なPremixでPCRを実施し、良好な結果が得られなかった菌株については、Readyを用いて再試験をすることとした。

PCR産物の電気泳動に用いるアガロースH14とNuSieve 3:1アガロースを比較したところ、日常使用しているアガロースH14で十分使用可能であった。NuSieve 3:1アガロースでは、DNAバンドがよりクリアに観察されたが、この製品は高価であることから、アガロースH14による泳動においてDNAバンドが不明瞭でサイズの判読が不可能な場合にのみ使用することとした。ゲル濃度は、2および3%で泳動像に違いは認められなかったが、3%アガロースH14は硬く破損し易いため、2%での使用が有用と考えられた。以上の検討結果から、インスタジーンによるテンプレートDNAの調製後、Premixを用いてPCRを実施し、2%アガロースH14で泳動を100V 40分行うこととした。図1に、この条件で行った結核菌H37Ra株の泳動像とVNTRパターンを示した。

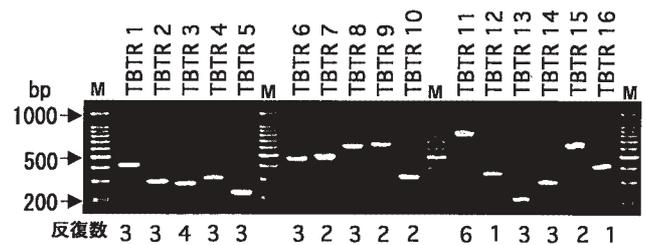


図1 Mycobacterium tuberculosis H37Ra 株のVNTR解析におけるPCR産物のアガロース電気泳動像およびVNTRパターン
M:100bp DNA ラダー

2. 臨床分離株のクラスター解析

供試した分離株50株中多くが上記の条件で解析が可能であったが、2株にDNAが増幅されない領域を認めたため、前述の通りTaqとアガロースを変更して良好な結果が得られた。こうして得られた50株のVNTRパターンは、ユークリッド距離によるクラスター解析を実施し、図2に示すようなデンドログラムを作成した。供試した

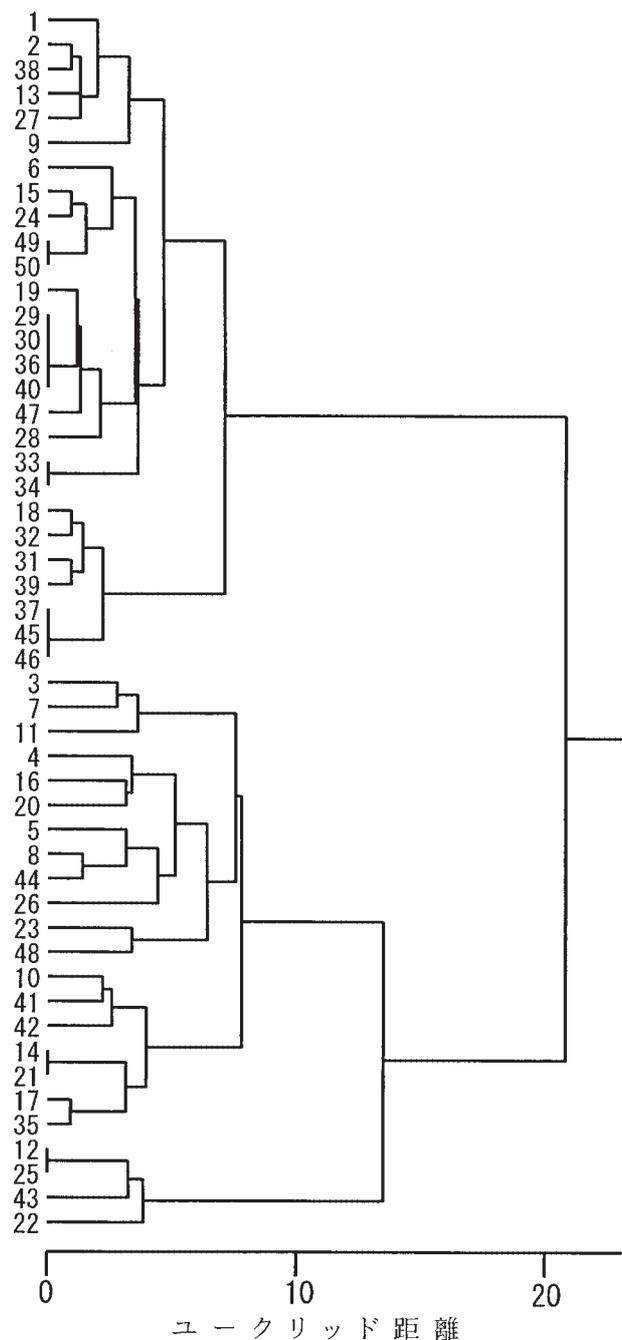


図2 結核菌分離株50株のVNTR解析によるデンドログラム

分離株50株は、41型に型別され、6組15株がクラスターを形成し、最大クラスターは4株が1組、3株が1組、2株が4組であった。クラスターを形成した菌株のVNTRパターンを表3に示した。菌株No.29, 30の2株および33, 34の2株はそれぞれ同一患者由来で、これらは初発時の菌が体内に残存し、数年後に再発した再燃例であると推定された。一方、同一患者由来の2菌株でも、VNTRパターンが一致しなかった例（菌株No.31と32）があり、これらは外来性の再感染と推察された。結核再発が内因性再燃か外因性再感染かは、治療薬剤の選択において重

表3 クラスターを形成した6組15株のVNTRパターン

菌株No.	TBTR 領域															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
29	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
30	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
36	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
40	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
37	4	2	4	2	5	3	2	1	2	2	5	1	7	3	3	3
45	4	2	4	2	5	3	2	1	2	2	5	1	7	3	3	3
46	4	2	4	2	5	3	2	1	2	2	5	1	7	3	3	3
33	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	3	7	3	3	3
34	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	3	7	3	3	3
14	3	2	4	2	4	3	2	4	3	2	6	1	5	3	1	1
21	3	2	4	2	4	3	2	4	3	2	6	1	5	3	1	1
12	4	6	4	5	3	3	2	4	3	2	6	2	2	3	3	2
25	4	6	4	5	3	3	2	4	3	2	6	2	2	3	3	2
49	4	2	4	2	4	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	2
50	4	2	4	2	4	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	2

表4 分離株(50株)のTBTR領域(16箇所)における反復数の分布

反復数	TBTR 領域															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1			1		1	1	3		8	1		43	2		9	8
2	2	45		44	1	5	50	4	7	49		5	5	1	15	13
3	14		2		13	42		26	40	1	1		2	3	48	26
4	33	1	47	2	9			11	2		3		5	1		3
5			1	3	26			1			38		8			
6	1	3									7		1			1
7											1		22			
8																4

要視され、今回の結果は、VNTR法がこれに迅速に対応できることを示すものである。また、菌株No.37, 45, 46の3株は、検査室からの情報により検査室内における交差汚染が疑われたもので、これらがクラスターを形成したことで交差汚染であることが裏付けられた。この例では、交差汚染の原因が究明された後、検査方法が改善され、交差汚染の再発防止につながったことからVNTR法が結核菌検査の精度管理にも有用であることが示された。菌株No.49, 50は同一家族内の株で、家族内での感染あるいは感染源が同じであると推定された。このように、今回の臨床分離株におけるVNTR解析結果は、ある程度の疫学的背景を反映しており、VNTR法が結核の分子疫学的解析に有用であることを示すものと考えられる。

しかし、関連性が確認されていない菌株No.36と40, 14と21, 12と25であってもクラスターを形成した。これらは隠れた関連を持つ可能性があるものの、VNTR法の解析精度を向上させることにより型別され、クラスターを形成しなくなる可能性も否定できない。そこで、今回のVNTR法の解析精度の裏付けになると考えられる16箇所の各解析領域の反復数分布を調べた。その結果、表4に示すように、TBTR 2, 3, 7, 10および14の領域においては90%以上の菌株が特定の反復数に集中していることから、これらの領域は型別に寄与する可能性が低いことが判明した。

結核菌のVNTR法による遺伝子解析領域としては、今

回使用した領域の他にQUB領域およびMtub領域等が報告されている⁶⁾。これらの領域については本邦ではいまだ活用されていないが、今後他の領域を検討することにより解析精度の向上が可能と考える。上述したように、今回、臨床分離結核菌50株を供試した範囲では、有用とは思われない解析領域が存在したが、それらの領域の有用性を今回の成績のみで判断することは早計であろう。今後、多数の株についてVNTR解析を進めながら、新たな解析領域の利用を検討し、解析精度の向上を図る必要があると考えられた。

謝 辞

最後になりましたが御指導を頂きました微生物部新川部長ならびに尾上副部長に深謝いたします。

(平成18年7月20日受理)

文 献

- 1) Takahashi, M., Y. Kazumi, Y. Fukasawa, K. Hirano, T. Mori, W. Dale et al.: Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates, *Microbiol. Immunol.*, **37**, 289-294 (1993)
- 2) 向川 純, 下島優香子, 村田似和夫, 遠藤美代子, 柳川義勢, 諸角 聖: 結核集団感染の分子疫学的解析における Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) 法の有用性, *感染症誌*, **77**, 1040-1048 (2003)
- 3) Forthingham, R., and W.A. Meeker-O'Connell: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats, *Microbiology*, **144**, 1189-1196 (1998)
- 4) Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel and C. Loht: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome, *Mol. Microbiol.*, **36**, 762-771 (2000)
- 5) Kremer, K., C. Arnold, A. Cataldi, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, S. Panaiotov et al.: Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5628-5638 (2005)
- 6) Le Fleche, P., M. Fabre, F. Denoed, J. L. Koeck, and G. Vergnaud: High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing, *BMC Microbiol.*, **2**, 1-12 (2002)
- 7) Roring, S., A. Scott, D. Brittain, I. Walker, G. Hewinson, S. Neill et al.: Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2126-2133 (2002)
- 8) Skuce, R. A., T. P. McCorry, J. F. McCarroll, S. M. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain et al.: Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets, *Microbiology*, **148**, 519-528 (2002)
- 9) Easterbrook, P. J., A. Gibson, S. Murad, D. Lamprecht, N. Ives, A. Ferguson et al.: High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study, **42**, 4536-4544 (2004)
- 10) 川合常明, 廣地 敬, 赤石尚一, 大谷倫子, 藤田晃三, 品川雅明ほか: 結核菌の制限酵素多型分類: 第一報; 方法の検討, *札幌市衛研年報*, **27**, 52-56 (2000)
- 11) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 西森知子, 今井邦俊, 柏崎佳人ほか: VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル, *動衛研研究報告*, **109**, 25-32 (2003)

短報

*Campylobacter jejuni*および *Campylobacter coli*混合 感染事例における 遺伝子学的手法の活用

鈴木理恵子^{1*}, 今井良美^{2**}, 後藤喜子²,
安田哲夫^{2**}, 新川隆康¹

Study of Genetic Technique in a Mixture Infection by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

Rieko SUZUKI, Yoshimi IMAI, Yoshiko GOTO,
Tetsuo YASUDA and Takayasu NIKKAWA

はじめに

Campylobacter jejuni/coli (以下*C. jejuni*, *C. coli*)を起因菌とするカンピロバクター腸炎は、昭和57年に食中毒起因菌として指定されて以降、厚生労働省統計表データベースシステム食中毒統計調査には毎年20件以上の発生報告がされている。平成15年以降、国内における細菌性食中毒発生検査数ではサルモネラや腸炎ビブリオの発生件数を上回りカンピロバクター腸炎が最も多く、平成16年には558件の報告例があった。

平成17年神奈川県内(横浜市・川崎市・横須賀市・相模原市を含む)の食中毒発生例のうちカンピロバクターによる事例は13件であった。しかし、食中毒として取り扱いはされなかったもののカンピロバクターによる食中毒疑い例や有症苦情例は多数発生している。

今回、食中毒疑い例より検出された *Campylobacter jejuni/coli* について、従来の生物学的手法による同定および遺伝子学的手法による同定を併用し、確実に迅速な菌種同定法について検討を行った。また、検出された *Campylobacter* 属菌についてパルスフィールドゲル電気泳動法¹⁾による疫学解析をあわせて行ったので報告する。

検査材料および方法

1. 検査材料

平成17年10月、A市内の事業所所員40名うち8名が下痢、嘔吐等の食中毒様症状を呈しているとの通報により保健福祉事務所が調査したところ、症状を呈した所員はいずれも、A市内の飲食店2施設で会食をしていることが確認され、原因施設と推定される2施設の検食16件、施設内拭き取り18件、従事者便10件および患者便11件(計55件)を検査材料として用いた。

2. 食中毒起因菌の分離

各々の検体について、定法²⁾に準じて食中毒起因菌の調査を実施した。*Campylobacter jejuni/coli*の検索は、カンピロバクター選択分離培地としてSkirrow培地(Oxoid)およびCCDA培地(Oxoid)を用い、検体を塗抹後、42℃48時間、微好気培養を行った(直接培養)。

またPreston培地(Oxoid)に検体を接種し、42℃18~24時間、微好気培養後、直接培養と同様の培地で分離培養を行った(増菌培養)。

Skirrow培地およびCCDA培地上で*Campylobacter*様の集落の発育が認められた場合、集落を複数釣菌し従来の生物学的手法および遺伝子学的手法による同定検査を併せて実施した。

3. *Campylobacter*属菌の同定

生物学の同定は、グラム染色性、好気下の発育テスト、25℃および42℃における発育テスト、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、馬尿酸加水分解試験および薬剤感受性試験(セファロシン、ナリジクス酸)を行った。

遺伝子学的手法は、JohnらのマルチプレックスPCR法³⁾により*Campylobacter*菌種特異的遺伝子の検索を行った。検索遺伝子は、ヒトからの検出率が高くカンピロバクター腸炎の原因菌である*C. jejuni*, *C. coli*および生化学性状が*C. coli*と類似する*C. lari*の菌種特異的遺伝子を対象とした。

*C. jejuni*と同定された株については、カンピロバクター免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別を行った。

4. パルスフィールドゲル電気泳動

分離株を5%ウマ溶血球加Blood Agar Base No.2培地(OXOID)で微好気培養後、精製水200 μ lに懸濁し、等量の1%Seakem Gold Agarose (Cambrex)を加え菌体包埋プラグを作製した。作製したプラグは1mg/ml Lysozyme, 0.5M EDTA (pH8.0)溶液で溶菌後、1mg/ml Proteinase K, 1%N-lauroylsarcosine添加0.5M EDTA (pH8.0)溶液で処理し、制限酵素*Sma* Iを用いDNAを切断後、パルスフィールドゲル電気泳動(以下、PFGE)を行った。また、*Sma* Iおよび*Xho* Iの2種類の制限酵素でDNAを切断し、同様にPFGEパターンの比較を行った。

1 神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
* 現 地域調査部
suzuki.s3df@pref.kanagawa.jp
2 神奈川県衛生研究所 地域調査部
** 現 藤沢市保健所

表1 菌株の生化学性状・薬剤感受性・血清型別および遺伝子検索結果

菌株No.	来由	グラム染色・形態 ¹⁾	発育	好気条件での発育	発育		オキシダーゼ試験	カタラーゼ試験	馬尿酸加水分解試験	薬剤感受性試験		C. jejuni 群別 ³⁾	菌種特異的遺伝子
					25℃	42℃				セフトロキシム(30μg) ²⁾	ナリジククス酸(30μg) ²⁾		
1	患者1	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
2		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
3		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
4		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
5		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
6		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
7	患者2	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
8		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
9		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
10		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
11		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
12		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
13	患者3	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
14		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
15		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
16		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
17		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
18		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
19	患者4	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	S	UT	C. jejuni
20		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	S	UT	C. jejuni
21		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	S	UT	C. jejuni
22		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	S	UT	C. jejuni
23		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
24		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
25	患者5	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
26		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
27	患者6	GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
28		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
29		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
30		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
31		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
32		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
33	患者7	GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
34		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
35	従業員1	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
36		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
37		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni

1) GNR: グラム陰性桿菌
 2) S: 感受性, R: 耐性
 3) NT: 試験せず, UT: 型別不能

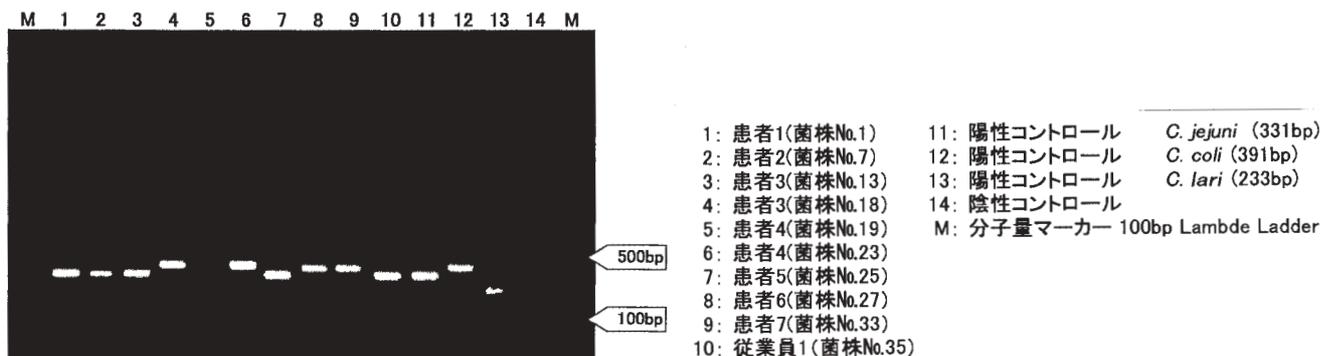


図1 マルチプレックスPCRによるCampylobacter菌種特異遺伝子の泳動図

結果

検査(16件)、ふき取り(18件)、従事者便(10件)および患者便(11件)の計55件について食中毒菌の検索を行ったところ、患者便7件、従業員便1件(計8件)より直接培養および増菌培養のいずれにも、カンピロバクター選択分離培地(Skirrow寒天平板、CCDA寒天培地)上に*Campylobacter*様の集落の発育が認められた。検査および施設内拭き取りからは食中毒原因菌は検出されなかった。

各々の検体の分離平板から*Campylobacter*属菌と推定される集落を複数釣菌し、延べ37株(8件)について従来の生物学的手法および遺伝子学的手法による同定検査を併せて実施した。

生物学的手法では、いずれの分離株もグラム陰性らせん状桿菌、微好気発育性(+), 好気発育性(-), 25℃発育(-), 42℃発育(+), オキシダーゼ試験(+), カタラーゼ試験(+)を示した。馬尿酸加水分解試験は、陽性26株(6件)、陰性11株(4件)、薬剤感受性試験は、セファロシン耐性・ナリジクス酸耐性33株(9件)、セファロシン耐性・ナリジクス酸感受性4株(1件)であった。馬

尿酸加水分解試験陰性株は、セファロシンおよびナリジクス酸耐性株であった。

従来法と併せて実施したマルチプレックスPCR法では、*C. jejuni* 遺伝子保有株は26株(6件)、*C. coli* 遺伝子保有株11株(4件)であった。

馬尿酸加水分解陽性26株は、いずれも*C. jejuni* 遺伝子保有株であり、陰性11株は、*C. coli* 遺伝子保有株であった。

生物学的手法と遺伝子学的手法の結果を併せてみると、馬尿酸加水分解陽性で*C. jejuni*遺伝子保有株を*C. jejuni*とし血清型別を実施したところ、O群22株(5件、いずれもセファロシン耐性・ナリジクス酸耐性)、型別不能4株(1件、セファロシン耐性・ナリジクス酸感受性)であった。

以上より今回の事例で検出された食中毒原因菌は、*C. jejuni* (O群) 単独検出4件(患者3件、従業員1件)、*C. coli* 単独検出2件(患者)、*C. jejuni* (O群) および*C. coli*、*C. jejuni* (型別不能) および*C. coli*の同時検出各1件(いずれも患者)と同定された(表1, 図1)。

また検出された代表株について制限酵素*Sma* Iを用い

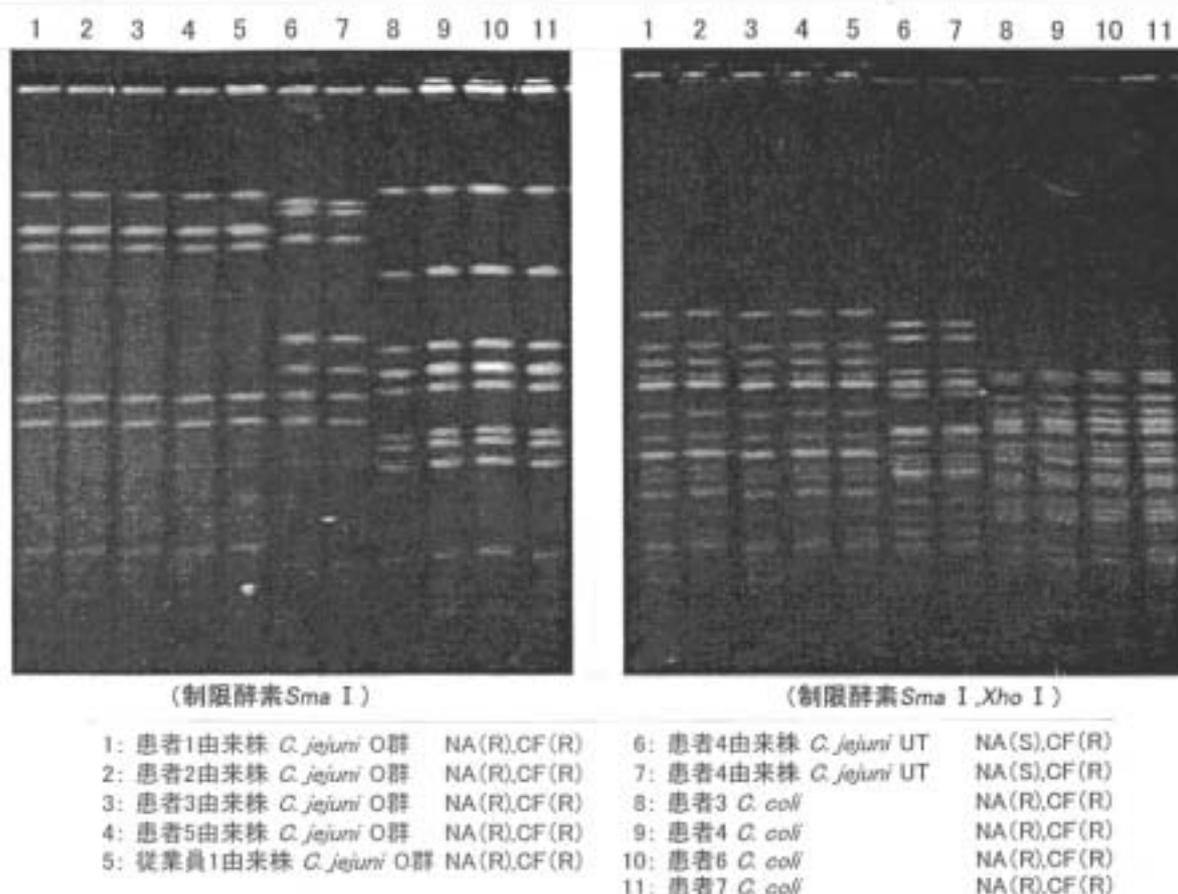


図2 *C. jejuni* および *C. coli* の PFGE 泳動図

PFGEを行ったところ、*C. jejuni* (O群) 5件、*C. coli* 4件のPFGEパターンは各々同一であった。*C. jejuni* (型別不能) 1件 (2株) とO群のPFGEパターンと異なっていた。2種類の制限酵素 (*Sma* I, *Xho* I) で処理を行ったところ、DNAの切断箇所は増えPFGEパターンは複雑となったが、菌種および血清型間の結果は*Sma* Iと同様であった (図2)。

考 察

カンピロバクター腸炎の診断については臨床症状から判断することは困難で、便等からの菌分離が確実な方法となるが、培養には微好気培養が必要なことや培養日数が他の食中毒菌に比べ長く、培養に要する時間のみで2日以上、さらに同定には数日を要す。また近年では、セファロシン、ナリジクス酸の両薬剤に対する耐性株の出現により、薬剤感受性試験を同定の指標とすることが困難になってきた⁴⁾。今回の事例においても馬尿酸加水分解試験陰性株は*C. coli*であると推察されたが、ナリジクス酸耐性株であったことから生物学的手法のみでは*C. coli*と決定することはできなかつた。このように分離された*C. jejuni*、*C. coli*に耐性株の出現が多く認められることから、従来の生化学性状および薬剤感受性試験の手法のみでは、*C. jejuni*以外の菌種同定は困難である。今回、従来の同定作業を行うとともに、遺伝子診断技術であるマルチプレックスPCR法を分離平板上に集落が形成された段階で併用することで、培養終了後数時間で確実な菌種同定が可能であった。以上のことから迅速に原因菌の確定を行うためには、PCR法等の遺伝子診断技術を導入する必要がある。

カンピロバクター食中毒は*C. jejuni*を原因とする事例が多く、*C. jejuni*では単独の血清型による事例、また複数の血清型による事例の報告がされている。

今回の事例における*C. jejuni*の血清型は、O群 (5件) と型別不能 (1件) であった。同一事例の中で血清型別不能株が血清型別された株のPFGEパターンが一致する場合があることから、これらの分離株のPFGEを実施しその異同について検討したところ、O群株と型別不能株は異なったPFGEパターンを示し、血清型別と同様の成績であった。また、同一血清型間では制限酵素の変更や複数の制限酵素により処理することでPFGEパターンが細分化される場合があるためPFGEを実施したが、い

ずれの方法でもPFGEパターンは一致しており、同一血清型間の異同は認められなかつた。

*C. coli*による食中毒報告は稀でPFGEの比較対照株を保有していなかつたことから制限酵素 (*Sma* I) に加え、複数の制限酵素による処理 (*Sma* I, *Xho* I) を試みたが、いずれの*C. coli*分離株も同一のPFGEパターンを示した。

今回の事例は、遺伝子学的同定に加え、遺伝子学的疫学解析を行い複数の血清型の*C. jejuni*と*C. coli*によりカンピロバクター腸炎が引き起こされた混合感染例であることが明らかになった。しかし、従業員から患者と同じ*C. jejuni* O群が検出されたものの、食品から菌が検出されず感染源は不明であった。

カンピロバクター食中毒の特性は、大規模事例よりも散発的な事例数が多いことが挙げられる。大規模事例では遺伝子学的疫学解析も重要となる場合もあるが、散発的な事例ではまず菌種同定を迅速に行うことが重要である。現在の検査法でカンピロバクターが原因菌と決定するまでに3日～5日以上、血清型別等を実施するためにはさらに時間を必要とする。このような同定に要する時間の長さが行政判断を行う上で大きな問題であった。菌種同定に遺伝子診断法であるPCR法を導入することにより、より迅速な行政対応が可能になると思われた。

(平成18年7月20日受理)

文 献

- 1) 伊藤喜久治:我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究. 平成10年度厚生科学研究費補助金 <新興・再興感染症研究事業>分担研究報告書, 51-56(1999)
- 2) 日本薬学会編:衛生試験法・注解2005, pp55-101, 金原出版, 東京(2005)
- 3) John D.Klena, Craig T.Parker, Krista Knibb, J.Claire Ibbitt, Phillippa M.L.Devane, Sharon T.Horn et al. : Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a Multiplex PCR Developed from the Nucleotide Sequence of the lipid A Gene *lpxA*, J.Clin. Microbiol., 42, 5549-5557(2004)
- 4) カンピロバクター腸炎1995-1999, 病原微生物検出情報, 20, 5(1999)

短 報

A群レンサ球菌食中毒事例由来の 分離株に関する検討

鈴木理恵子*, 新川隆康

A Food-borne epidemic of Group A Streptococcal Pharyngitis

Rieko SUZUKI and Takayasu NIKKAWA

はじめに

A群溶血レンサ球菌感染症は、*Streptococcus pyogenes*を原因菌とした呼吸器感染症で、*S. pyogenes*はA群レンサ球菌と呼ばれている。本菌感染症は通常、小学生頃までに感染することが多く、咽頭痛、発熱等の風邪様症状を呈し、続発症として急性糸球体腎炎やリウマチ熱等の重篤な疾患を引き起こすことがある。またA群レンサ球菌は、健康な人の咽頭、皮膚などにも存在する「常在菌」でもあり、その伝播経路は主に飛沫感染で感染源は急性期や回復期の患者の鼻腔、咽頭、または化膿性疾患部の分泌物である。A群レンサ球菌が関与する感染症には、呼吸器感染症だけではなく手足の筋膜・筋肉等の軟部組織に壊死性の炎症を伴い重篤な症状を呈す劇症型レンサ球菌感染症(TSLS)もある。

近年、食品を介して起こる感染症は大きな社会的問題となっているが、2005年7月、神奈川県内で我が国でもあまり例を見ないA群レンサ球菌による大規模な食中毒事例が発生した。著者らは今回の事例に関する食品および環境材料からの原因菌の分離、同定を実施すると共に、事例由来株について細菌学的検討、遺伝子検索およびパルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的解析を行ったので報告する。

材料および方法

県内の大学で平成17年7月30日、31日の2日間にわたり行われた催し物で、手伝いの学生および職員に配布された昼食の仕出し弁当を喫食した約489名のうち218名が咽頭痛、発熱等の症状を呈しており、患者よりA群レン

サ球菌が検出されたと病院より保健所に連絡があり、原因究明のため当所へA群レンサ球菌の検査依頼があった。

1. 検査材料

弁当提供施設の検食16検体(30日7検体, 31日9検体), 31日弁当残品(未開封)5検体(1箱を分割)および施設ふき取り5検体(計26検体)について、A群レンサ球菌の分離培養同定検査を行った。

患者および弁当製造従事者の咽頭ぬぐい液は、医療施設にてA群レンサ球菌の分離が行われ、送付された菌株11検体(患者8検体, 調理従事者3検体)について、血清型別等の同定検査を行った。

2. A群レンサ球菌の分離および血清型別

分離培養に供した検食、弁当残品および拭き取り検体は、検体量に応じて5gから10gを秤量し、等量の滅菌リン酸緩衝液で乳剤を作成した。乳剤の白金耳量を直接、5%ウマ血液加コロンビアCNA寒天培地(BD)に接種し、37℃18~24時間分離培養を行った(直接培養)。また、増菌培養として乳剤1mlをSEB培地(日水)10mlに接種し37℃18~24時間培養後、培養液の白金耳量を直接培養と同様に分離培養を行った。分離用の寒天培地上に得られたβ溶血を示す集落をA群レンサ球菌と推察し、スライデックスストレプトキットにより群別を行い、A群に凝集することを確認した。

A群レンサ球菌と同定された食品由来株および医療機関より送付されたヒト由来株について、市販のA群レンサ球菌免疫血清「生研」を用いT型別を実施した。

3. 発赤毒素遺伝子の検索

菌株の微量を精製水100μlに懸濁し、100℃10分加熱後急冷したものをDNA鋳型とし、発赤毒素speA, speB, speC遺伝子の検索¹⁾を行った。

4. パルスフィールドゲル電気泳動

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)は菌株を精製水200μlに懸濁し、等量の1%Seakem Gold Agarose(Cambrex)を加え菌体包埋プラグを作製した。作製したプラグは1mg/ml Lyzostaphin, 1mg/ml Lysozyme, 0.5M EDTA(pH8.0)溶液で溶菌後、1mg/ml Proteinase K, 1%N-lauroylsarcosine 添加0.5M EDTA(pH8.0)溶液で処理し、制限酵素Sma Iを用いDNAを切断後、パルスフィールドゲル電気泳動(以下、PFGE)を行った。また、制限酵素にSfi Iも用い、同様にPFGEパターンの比較を行った。

結 果

31日の検食3検体(炒飯, 春巻き・とうもろこし, 冷やしきしめん), 弁当残品4検体(酢豚, 炒飯, 春巻き・とうもろこし・唐揚げ, かに玉・ポテト)からA群レンサ

神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

* 現 地域調査部

suzuki.s3df@pref.kanagawa.jp

球菌が分離された。

これら分離した食品由来7株および送付されたヒト由来11株（計18株）について血清型別を行ったところ、食品由来7株はいずれもT25型であった。ヒト由来11株のうち患者由来8株および調理従事者由来2株はT25型で食品由来株と同様であったが、調理従事者由来1株はA群レンサ球菌T型別不能株であった（表1、表2）。

食品またはヒト由来株、計18株はいずれも発赤毒素*speB*遺伝子単独保有株であった。

またこれら18株について制限酵素*Sma* I および*Sfi* I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行ったところ、各々のPFGEパターンはT25型17株および型別不能1株ともに全て同一であった。

表1 食品および環境からのA群レンサ球菌分離状況

No.	検体名	結果
1	30日弁当検食(海老チリソース)	検出せず
2	30日弁当検食(そばろご飯)	検出せず
3	30日弁当検食(焼売)	検出せず
4	30日弁当検食(ゴマ団子)	検出せず
5	30日弁当検食(茄子南蛮漬)	検出せず
6	30日弁当検食(ライチ)	検出せず
7	30日弁当検食(棒々鶏サラダ)	検出せず
8	31日弁当検食(酢豚)	検出せず
9	31日弁当検食(炒飯)	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
10	31日弁当検食(春巻き・とうもろこし)	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
11	31日弁当検食(かに玉・ポテト)	検出せず
12	31日弁当材料(かに玉)	検出せず
13	31日弁当材料(ポテト)	検出せず
14	31日検食(冷やしきしめん, のり)	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
15	31日検食(かきあげ)	検出せず
16	31日検食(いなり寿司)	検出せず
17	31日弁当残品(酢豚)	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
18	31日弁当残品(炒飯)	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
19	31日弁当残品(春巻き・とうもろこし・唐揚げ)	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
20	31日弁当残品(ぶどう)	検出せず
21	31日弁当残品(かに玉・ポテト)	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
22	調理施設拭き取り①	検出せず
23	調理施設拭き取り②	検出せず
24	調理施設拭き取り③	検出せず
25	調理施設拭き取り④	検出せず
26	調理施設拭き取り⑤	検出せず

表2 患者および調理従事者由来株のA群レンサ球菌型別結果

検体名	結果
患者由来株No.1	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
患者由来株No.2	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
患者由来株No.3	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
患者由来株No.4	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
患者由来株No.5	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
患者由来株No.6	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
患者由来株No.7	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
患者由来株No.8	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
調理従事者No.1	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>
調理従事者No.2	A群レンサ球菌 T型別不能 <i>speB</i>
調理従事者No.3	A群レンサ球菌 T25 <i>speB</i>

注)PFGEパターンは全株ともに同一

考 察

今回の事例では、31日の検食および弁当残品7株、患者8株、調理従事者2株からA群レンサ球菌T25型発赤毒素*speB*遺伝子単独保有株が検出され、PFGEパターンも一致していた。疫学調査では患者は31日に配布された昼食の仕出し弁当を喫食しており、31日の仕出し弁当を原因とする大規模な集団感染事例であると判明した。調理従事者1名から検出された血清型別不能株についてもPFGEパターンの一致が確認されたが、T型別は菌体表面のタンパクについて型別を行うため、菌株の当該タンパク保有状況によっては型別が不能となる場合がある。今回、型別不能株とT25型は免疫学的手法である血清型別結果は異なったがPFGEパターンでは類縁または同一由来株であると推察された。しかし、A群レンサ球菌はPFGEパターンのバリエーションが比較的少ない菌種であるため今後ともデータを蓄積していくことが必要である。

A群レンサ球菌感染事例は、海外において多数報告されているが、我が国での集団感染例および食中毒事例は、本事例を含み2005年現在9例²⁾が報告されているにすぎない。A群レンサ球菌による集団感染事例において、食品、患者および調理従事者から血清型、発赤毒素型およびPFGEパターンの一致が確認できた事例は1998年の茨城の事例¹⁾に続き、本事例が2例目である。

食物を摂取することによって起こる食品媒介感染症はいわゆる食中毒と呼ばれ、急性胃腸炎等の消化器症状を主訴とするが、今回のような、胃腸炎以外の症状を呈する食中毒があることが再認識された。食品を介してA群レンサ球菌に感染した場合の臨床症状は、通常のA群溶血レンサ球菌感染症と何ら変わりがない咽頭痛、発熱、関節痛等である。消化器症状より呼吸器症状が顕著である本感染症は、小規模事例においては単なる風邪として見過ごされてしまう可能性も杞憂され、本感染症による集団発生報告が少ない要因であると推察される。

A群溶血レンサ球菌感染症は、飛沫感染を含め食品によっても媒介される感染症であることを認識し、集団風邪様症状の発生があった場合には、本菌食中毒も考慮し原因究明にあたる必要がある。

最後に、本事例解明のため検体搬入や情報提供いただきました相模原市保健所および衛生試験所の方々に深謝いたします。（平成18年7月20日受理）

文 献

- 1) 岸下雅通, 山崎伸二, 竹田美文: A群溶連菌の産生する発赤毒素遺伝子のPCRによる型別判定: 日本臨床, 50, 326-336(1992)
- 2) 溶血性レンサ球菌感染症2000~2004, 病原微生物検出情報, 25, 252-253(2004)

短報

加熱損傷リステリア菌 (*Listeria monocytogenes* IID577) の 選択増菌培養法に関する基礎的検討

寺西 大*, 古川一郎, 相川勝弘, 浅井良夫,
尾上洋一, 新川隆康

Study of Selective Enrichment Method of Heat-injured *Listeria monocytogenes* IID577.

Hiroshi TERANISHI, Ichiro FURUKAWA,
Katsuhiko AIKAWA, Yoshio ASAI,
Yoichi ONOUE and Takayasu NIKKAWA

はじめに

リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) は動物、植物、土壌、河川水、下水等多様な環境中に分布しており、人畜共通感染症として、ヒトが感染すると髄膜炎、敗血症等を起こし、動物が感染すると脳炎、敗血症および流産を起こすことが知られている¹⁾。リステリア菌は環境中に広く分布していることから、加工環境によっては食品を汚染することがあり、乳および肉の加工食品を中心とした死亡例を伴う食品媒介性のリステリア症が欧米において発生している。米国では食品媒介性のリステリア症は、人口100万人当たり4.8人と報告されている²⁾。わが国では食品が原因と確認されたリステリア症は1事例³⁾にすぎないが、わが国の本菌汚染率は食肉製品全体で4.1%、非加熱食肉製品のみでは22.2%と欧米同様に高率²⁾、集団発生の可能性も十分あると考えられている。

食品媒介性のリステリア症の原因食品としては、殺菌乳、ナチュラルチーズ、タンのゼリーよせ、ホットドッグ、ミートパテ等¹⁾が知られており、これらは加熱処理や凍結処理によりリステリア菌の汚染菌数は少なく、損傷状態になっている場合も少なからずあると考えられる。細菌が加熱や凍結、乾燥といったストレスを受けるとその構造や機能に障害を受け生理的に不都合な状況に陥る。

回復不能な不可逆的損傷を受け死に至る重度のものから増殖にほとんど影響を受けない軽度のものまで程度は様々であるが、その間の領域にあって条件次第で生存性を回復可能な半致死性である菌は損傷菌とよばれている。つまり、損傷菌と非損傷菌とは可逆的な変化であり、損傷を受けた後の環境条件により回復可能な状態の菌である。回復した菌については、病原遺伝子の脱落等がなければ、その病原性に著しい変化はないと考えられている⁴⁾。食品衛生学的には、通常、損傷を受けていない菌は選択培地および非選択培地に同等に発育するが、損傷菌は非選択培地には発育可能であるが障害を受けたため選択剤の感受性が増大し選択培地には発育することができない状態の菌と定義される⁵⁾。現在、食品からのリステリア菌の検出は、国際酪農連盟 (IDF) 法に準拠した公定法⁶⁾すなわち選択増菌培地 (*Listeria* Enrichment Broth) による30℃、48時間培養後、選択寒天培地 (PALCAM寒天またはOxford寒天) での30~35℃、24~48時間培養による分離で行われているが、損傷菌に対する配慮はなされていないため、本菌が存在するにもかかわらず検出できない可能性が危惧されている⁴⁾。損傷菌を含む食品検体を検査する場合、競合菌から目的とする菌を如何に選択するかという問題と同時に、目的とする菌の損傷回復を考慮し、効率よく検出する工夫が必要である。リステリア菌に限らず、森地⁴⁾は食品からのすべての食中毒菌検査、汚染指標菌検査には損傷菌対策が必要であると述べている。

そこで、IIDの3菌株を用いて加熱により本菌を損傷化させ、リステリア3菌株から熱感受性の高い菌株IID577を選択し、以降、その菌株を用いて損傷回復に有効とされているピルビン酸、カタラーゼおよびMgSO₄を単独で、或いは組み合わせて添加し損傷回復を考慮した選択培地での損傷菌の回復と増殖動態について検討した。

同時に新しい遺伝子増幅法であるLAMP法についてリステリア損傷菌検出に対する有効性についても検討したので併せて報告する。

材料および方法

1. 供試菌

供試菌として*L. monocytogenes* IID566, IID577およびIID581を使用した。

2. 加熱損傷菌の作製

リステリア菌をTrypticase Soy Broth (TSB, Becton Dickinson) で35℃、24時間培養した。培養液は生理的食塩水で約10⁶CFU/mlの菌液を調製し試験管に10mlずつ分注後、55℃の温浴中で6分間加熱し損傷化の程度を検討した。加熱処理後、直ちに氷水で冷却し、菌数測定

神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
*現 地域調査部 茅ヶ崎分室

に供した。実験は3回繰り返した。

リステリア損傷菌及び非損傷菌の菌数測定には非選択培地としてYeast Extract (Becton Dickinson)を0.6%の割合で添加したTrypticase Soy Agar(TSA, Becton Dickinson)を使用し、非損傷菌数測定には選択培地のPALCAM Listeria Selective Agar(PAL, Merck)を使用した。

加熱損傷菌の確認には、処理した菌液を生理的食塩水で適宜段階希釈し、各希釈ごとに選択・非選択培地ともに平板5枚ずつ使用した。希釈菌液は0.2mlずつ滴下し、コンラージ棒で塗抹した。35℃で24時間培養した後、菌数を測定した。加熱損傷菌数は非選択培地であるTSAに発育した菌数から選択培地のPALに発育した菌数の差である。使用した3菌株のうち損傷菌と非損傷菌の比が1:100以上となった条件を選び、その後の損傷菌の回復と増殖の検討に使用した。1:100以上の比とするのは、この損傷菌液を希釈して培養液に添加する場合に、100CFU/ml未満レベルの接種菌液0.1ml中に非損傷菌が含まれる可能性を排除するためである。

3. 加熱損傷リステリア菌の各増菌培地での回復と増殖

非選択培地であるTSB培地、公定法の選択増菌培地であるListeria Enrichment Broth(EB, Merck)培地、EB培地に損傷菌の回復に効果があるとされるピルビン酸ナトリウム(和光純薬工業、特級)を0.1%の割合で添加したEB(EB+P)培地、カタラーゼ(CALBIOCHEM)を500U/mlの割合で添加したEB(EB+C)培地、MgSO₄(和光純薬工業、特級)を0.025%の割合で添加したEB(E B+Mg)培地、これらの添加物質を組み合わせたEB(EB+P+Mg およびEB+C+Mg)培地を増菌培地として検討した。これらの培地10mlに、加熱損傷処理を施した菌液を10CFU/ml未満となるように添加し、30℃で0、24および48時間培養後、TSAとPALを用いて損傷菌作

製時と同様に菌数を測定した。対照試験として、加熱処理を実施しなかった菌液について非損傷菌の挙動測定のため同じ条件で培養後、菌数を測定した。これらの試験も3回の繰り返し実験を行った。ただし、EB培地については、6回の繰り返し実験を行った。

結果については、損傷菌を接種した各増菌培地の48時間後のPAL菌数を一元配置分散分析により検定し、有意差が認められた場合にTukeyの多重比較により、どの培地間に有意な差が認められたかを検討した。

LAMP法による遺伝子検出は以下のように行った。はじめに各培養液を核酸抽出キット「EXTRAGEN II」(東ソー)を使用して前処理を行った。ついでリステリア検出キット(栄研化学、試作品)を使用し6領域を認識する4種類のプライマーにより65℃、1時間の核酸増幅を行い、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム濃度をLoopampリアルタイム濁度測定装置(テラメックス)にて測定した。測定は検討した各培地の菌数測定時に同時に行った。EB培地については3回の繰り返し実験時について実施した。

結果および考察

1. リステリア3菌株の加熱損傷状況と加熱損傷条件の設定

L. monocytogenes IID566, IID577およびIID581の55℃における加熱損傷状況を図1に示した。グラフの菌数は3回の繰り返し実験の平均値を示している。加熱による損傷化は菌株によりかなり異なり、*L. monocytogenes* IID566では加熱による損傷は起きにくく4分後までTSAとPALの差は1オーダー以内であり、6分後まで加熱しても死滅する菌は増加するもののTSAとPALの差は2オーダーを超えることはなく、当初目標にしていた損傷菌と非損傷菌の比を1:100以上とする条件を満たせなかった。

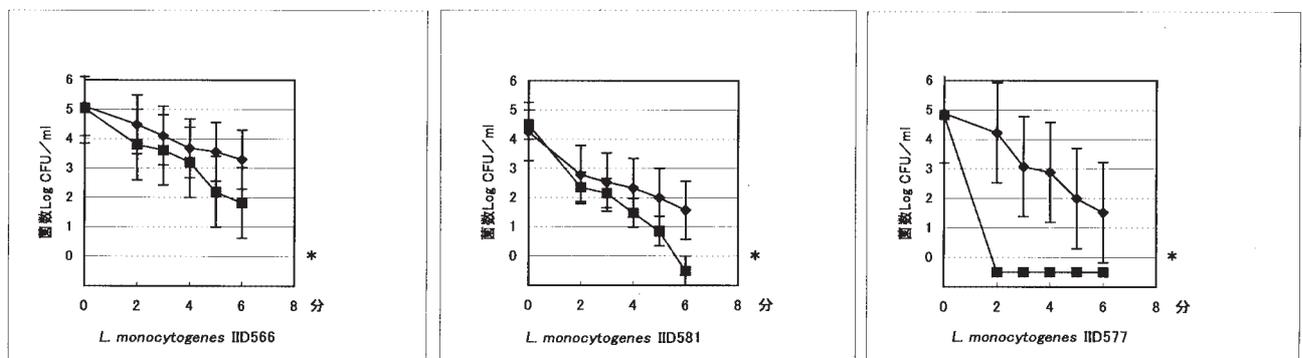


図1 *L. monocytogenes* IID 566, 581, 577 の 55℃における加熱損傷状況

◆:TSA 発育菌, ■:PAL 発育菌 エラーバーは標準偏差

* 菌数の検出限界:1CFU/mlアスタリスクの位置以下は検出限界未満を示す

L. monocytogenes IID581も*L. monocytogenes*IID566と類似した傾向を示し、加熱後5分までTSAとPALの差が1オーダー以内であり6分後でも当初目標を満たすことはできなかった。

L. monocytogenes IID577では加熱による死滅減少度は*L. monocytogenes* ID566 およびIID581に比べて大きく、かつ、速やかに損傷化が起こり、加熱後2分で選択培地のPALでは1CFU/ml未満の菌数となった。TSA上でのみ発育する損傷化した菌は加熱後2分で4.2Log CFU/ml、3分で3.1Log CFU/ml、4分で2.9Log CFU/mlとなった。加熱後2分の段階で当初目標としてきた損傷菌の割合を十分に満たすが、加熱損傷化の再現性が必ずしも良いとはいえないため、非損傷菌をより少なくするという配慮で、4分加熱後の*L. monocytogenes* IID577菌液を用いることとした。

2. 増菌培地中での*L. monocytogenes* IID577の損傷回復と増殖

図2にTSB培地での損傷菌の損傷回復と増殖および対照として非損傷菌の増殖のグラフを示した。初発菌数は接種菌液の測定値から求めたところ、55℃4分の損傷化処理では0.2~0.3CFU/mlとなり、非損傷菌数は接種菌

以上に増殖し、48時間ではその菌数は低下していた。3回の繰り返し実験で増殖は全く同じ傾向を示し、再現性は極めて良かった。

EB培地での損傷菌の損傷回復と増殖および対照として非損傷菌の増殖のグラフを図3aに示した。EB培地は選択剤が含まれているため、加熱損傷菌のEB培地での増殖は48時間後においてもばらつきが大きく菌数の平均値も5.3Log CFU/mlと低かった。損傷化したことで選択剤の感受性が増大し発育動態が不安定になっていると考えられた。EB培地では非損傷菌であっても非選択培地のTSB培地に比べて菌数の増殖は劣り、24時間後に6.2~6.8Log CFU/mlになり48時間で8.3Log CFU/ml程度となっている。これらも6回の繰り返し実験で全く同じ傾向を示した。そこで、このEB培地に前述の損傷回復に有効と考えられる物質を添加した各種培地における損傷菌の損傷回復と増殖および対照として非損傷菌の増殖のグラフを図3b~fに示した。各実験条件の損傷回復物質添加培地においては非損傷菌ではEB培地と同様の傾向を示し、差は認められなかったが、損傷菌では24時間以内に損傷状態から回復していることが認められ、48時間で平均7.3~9.0Log CFU/mlまで増殖し、各損

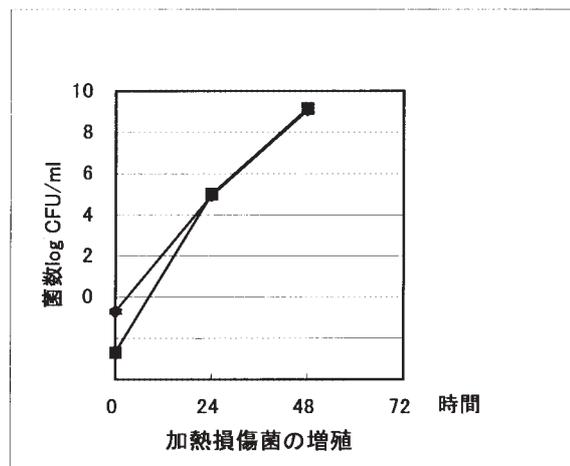
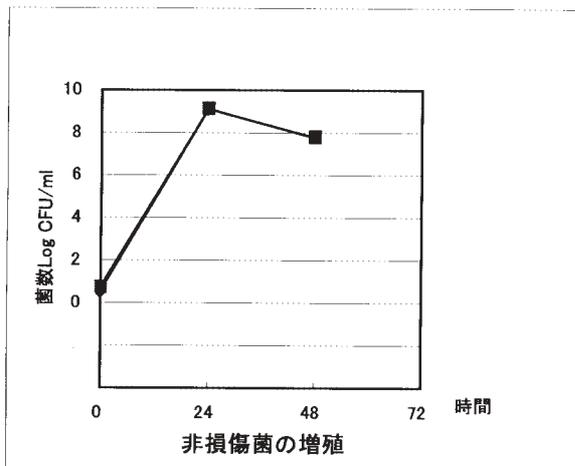


図2 TSB培地での*L. monocytogenes* IID,577非損傷菌および55℃,4分間加熱損傷菌の増殖動態
◆:TSA発育菌, ■:PAL発育菌 エラーバーは標準偏差
損傷菌の0時間のPAL発育菌数は希釈前の接種菌液の測定値より算出

数の測定値からこれの1/100以下の菌数であることが確認された。TSB培地での損傷菌の動態をみると、0時間で認められていたTSAとPALの菌数差が24時間培養の時点では認められなくなった。これは損傷菌が24時間以内に回復していることを示していると考えられた。この時点で菌数は5.0Log CFU/mlに達し、48時間後では9.0Log CFU/ml程度の菌数まで増殖することが判明した。

非損傷処理では初発菌数は3~4CFU/mlであった。非損傷菌はTSB培地において24時間で9.0Log CFU/ml

傷回復物質添加培地はEB培地に比し増殖が良くなっており、発育菌数のばらつきの程度も小さい傾向にあった。一元配置分散分析を用いて、選択分離培地であるPAL発育菌数による48時間後の各6種類の培地間の菌数増殖をみると1%の有意水準で差が認められた。Tukeyの多重比較によりEB培地とEB+C培地の発育菌数間には差が認められなかったが、EB培地とその他のすべての損傷回復物質添加培地の間に5%の有意水準で発育菌数に差が認められた。しかし、添加物質の種類あるいは組み

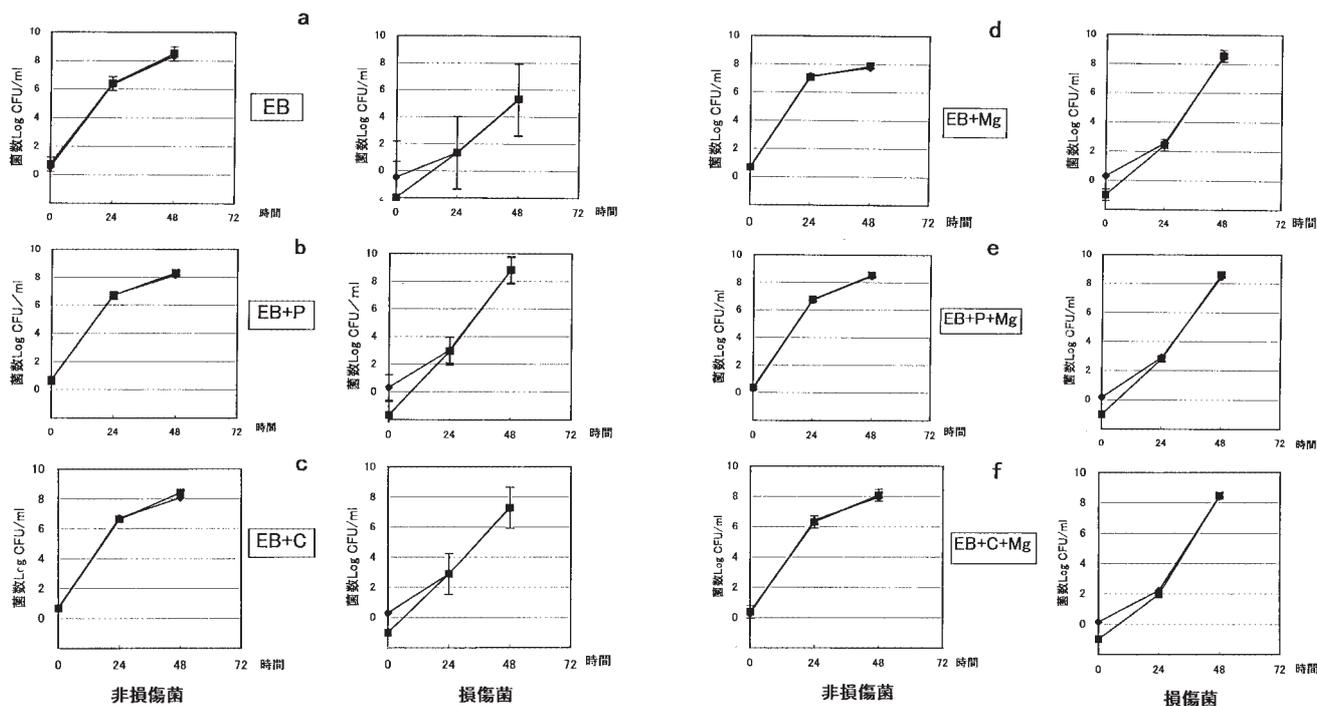


図3 EB培地および各種損傷回復物質添加EB培地での*L.monocytogenes* IID,577 非損傷菌および損傷菌の増殖
 ◆:TSA 発育菌, ■:PAL 発育菌 エラーバーは標準偏差
 損傷菌の0時間のPAL発育菌数は希釈前の接種菌液の測定値より算出
 P:ピルビン酸ナトリウム(0.1%) C:カタラーゼ(500U/ml) Mg:MgSO₄(0.025%)

表 TSB培地、EB培地および損傷回復物質添加EB培地でのリステリア非損傷菌および損傷菌のLAMP法陽性数

	培地	0時間	24時間	48時間
	非損傷菌 LAMP法 陽性数	TSB	0/3	3/3
EB		0/3	3/3	3/3
EB+P		0/3	3/3	3/3
EB+C		0/3	3/3	3/3
EB+Mg		0/3	3/3	3/3
EB+P+Mg		0/3	3/3	3/3
EB+C+Mg		0/3	3/3	3/3

	培地	0時間	24時間	48時間
	損傷菌 LAMP法 陽性数	TSB	0/3	3/3
EB		0/3	1/3	2/3
EB+P		0/3	1/3	3/3
EB+C		0/3	1/3	3/3
EB+Mg		0/3	2/3	3/3
EB+P+Mg		0/3	2/3	3/3
EB+C+Mg		0/3	1/3	3/3

EB培地への添加物質

P:ピルビン酸ナトリウム(0.1%) C:カタラーゼ(500U/ml) Mg:MgSO₄(0.025%)

合わせの種類による菌数の有意な差は認められなかった。EB+C培地では48時間後の菌数のばらつきが比較的大きく、平均の菌数も低かったためEB培地との間に有意な差が認められず、EB+C培地ではリステリア菌の加熱損傷には回復効果が弱い可能性があった。今回の実験で損傷リステリア菌に対しピルビン酸やMgSO₄の培地への添加は損傷状態からの回復を促進していると考えられた。しかし、これらの物質を組み合わせる場合には損傷回復の効果が增强することは認められなかった。ピルビン酸とカタラーゼの効果については、加熱損傷により菌体のカタラーゼとスーパーオキシドディスムターゼの活性が低下し、培養過程で蓄積される微生物にとって有害な過酸化水素やスーパーオキシラジカルをピルビン酸やカタラーゼが分解し⁵⁾、損傷状態からの回復に有効

であるためと報告されている。MgSO₄では傷害により細胞壁のテイコ酸よりMg²⁺が漏出することによる構造的変化が起こるがMg²⁺を添加することで回復を促すと報告されている⁵⁾。

食品中、特に加工食品よりリステリア菌を分離する場合には損傷菌の存在を考慮する必要があると考えられているが、本実験においてはEB培地へのピルビン酸やMgSO₄添加の有用性が示唆された。

LAMP法の結果を表に示した。非損傷菌では24時間以降すべての培地で菌が検出されたが、損傷菌では24時間では菌数が十分に増殖していない場合が多く、3例とも検出できた培地は、非選択培地のTSB培地のみであった。48時間後には損傷回復物質を添加したEB培地のすべてでLAMP法陽性となった。これらの実験からLAMP

法は概ね 10^3 CFU/ml程度の菌数があれば検出可能であることが示された。LAMP法は検出感度がPCR法と同等であり、操作がより容易である。反応時間も1時間程度で、前処理の時間を含めても3時間ほどで検出できる。このため、より詳細な検討は必要であるが、損傷回復物質添加EB培地で増菌を行い、LAMP法を併用することで損傷菌の効果的かつ迅速な検出が可能になると考えられた。(平成18年7月20日受理)

文 献

- 1) 丸山 務, 小久保彌太郎: 新訂水系感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編, pp.413-435, 中央法規(2000)
- 2) 奥谷晶子, 五十君静信: 厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業「食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究」平成15年度総括・分担研究報告, 12-17(2004)
- 3) 五十君静信, 山本茂貴, 牧野壮一, 本藤 良, 寺尾通徳, 神保勝彦ほか: 厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業「食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究」平成15年度総括・分担研究報告書, 174-183(2004)
- 4) 森地敏樹: 食品加工において生ずる損傷菌の挙動と対策, 最新食品微生物制御システムデータ集, 春田三佐夫, 宇田川俊一, 横山理雄編, pp.151-180, サイエンス フォーラム(1983)
- 5) 水落慎吾: 損傷菌とその回復における培地からの試み, 防菌防黴, 31, 197-205 (2003)
- 6) 厚生省生活衛生局: 乳及び乳製品のリステリアの汚染防止等について, 平成5年8月2日, 衛乳第169号(1993)

短報

高速液体クロマトグラフィー/タンデム 質量分析法を用いた畜産物中の 動物用医薬品の分析

甲斐茂美, 赤星猛, 岸美智子

Analysis of Veterinary Drugs in Livestock Foods Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI
and Michiko KISHI

はじめに

食の安全について国民の関心が高まる中、国は平成15年5月に、食品の安全確保について基本となる法律「食品安全基本法」を制定し、食品の監視・検査体制の見直しを行った。その中で大きく変わるのが規格基準の見直しによる農薬、動物用医薬品及び飼料添加物の残留規制の強化であり、ポジティブリスト制(基準が設定されていない農薬及び動物薬等が一定量以上含まれる食品の流通を原則禁止する制度)が、平成18年5月29日から施行された。これに伴い、規制対象となる動物用医薬品等は従来の約30から230前後に増加した。

このため、新たに設定される基準値に対応し、多くの動物用医薬品等を迅速に検査できる一斉分析法の開発が急務となっている。厚生労働省では、現在、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた動物用医薬品の一斉分析法を一部公表しているが、食品由来の夾雑成分から多数の目的物質を精度よく検出するためには、HPLCに比べ、高感度で選択性のある高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置(LC/MS/MS)の活用が有効である。

著者らは、イオントラップ機能を有するLC/MS/MSが、高感度プロダクトイオンスキャン(EPI)やマルチブルリアクションモニタリング(MRM)等の機能により、高感度測定と構造解析能を合わせ持ち、高い選択性を有

することに着目し、検査の確認に活用してきた。この度のポジティブリスト制施行に際しても、検査項目の拡大と、より高感度で精度の高い分析を行なうために、LC/MS/MSによる定量・確認法を確立し、日常検査へ適用することとした。まずは、厚生労働省が示している「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅱ(畜産物)」¹⁾の分析対象薬剤について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

試料は神奈川県内で市販されていた牛肉、豚肉、鶏肉を分析対象とした。試料はフードプロセッサーで粉碎混合したものを用いた。

2. 試薬

分析対象薬剤は表1に示した。標準品は和光純薬(株)、関東化学(株)及び林純薬(株)の残留物質試験用を用いた。標準原液はアセトニトリルまたはメタノールを用いて100 μ g/mlになるように調製した。混合標準溶液は35%メタノール水溶液で段階的に希釈し調製した。

アセトニトリル、メタノール及びn-ヘキサンは和光純薬(株)の残留農薬試験用またはLC-MS用を用いた。その他の試薬は和光純薬(株)の特級を用いた。

0.2mol/lリン酸緩衝液(pH5.0)は、リン酸一カリウム27.2gに水を加えて1000mlとしたものに、リン酸二カリウム3.48gに水を加えて100mlとしたものを加えて混和し、リン酸でpHを5.0に調整した。

0.02mol/lリン酸緩衝液(pH5.0)は0.2mol/lリン酸緩衝液を10倍に希釈して用いた。

Waters社製OasisHLB(60mg)カートリッジは、あらかじめメタノール10ml、水10ml、次いで0.2mol/lリン酸緩衝液(pH5.0)2mlでコンディショニングした後使用した。

フロリジルカラムは内径15mm、長さ300mmのクロマトグラフ管に、和光純薬(株)の残留農薬分析用フロリジルPRを130 $^{\circ}$ Cで12時間活性化したもの8gを、アセトニトリルに懸濁して充填し、アセトニトリル100mlで洗浄し調製した。

3. 装置

HPLCはAgilent社製1100シリーズを、MS/MSはApplied Biosystems社製Qtrap LC/MS/MSを用いた。

4. 測定条件

HPLCのカラムはImtakt社製CadenzaCD-C18 (2.1mmi.d.×150mm, 3 μ m)を用い、カラム温度45 $^{\circ}$ C、流速0.2ml/min、注入量10 μ l、移動相はアセトニトリル-0.1%ギ酸を用いた以下のグラジェント条件で分析した。0-25min ; (5:95) から (99:1) までの直線グラジェント、

表1 動物用医薬品のLC/MS/MSにおける測定条件および添加回収試験結果

対象薬剤	RT (min)	MRM Trace (m/z)	DP (V)	CE (V)	回収率%(相対標準偏差%)		
					牛肉	豚肉	鶏肉
ポジティブイオン化							
サルファ剤							
スルファジアジン (SDZ)	8.8	251→156 251→ 92	31	19	74.8(10.5)	83.1(3.5)	86.0(10.1)
スルファチアゾール (STZ)	9.7	257→156 257→ 92	31	37	76.7(11.1)	83.9(4.6)	86.8(11.3)
スルファピリジン (SPY)	10.1	250→156 250→ 92	36	21	75.5(8.5)	85.8(2.9)	87.5(11.7)
スルファメラジン (SMR)	10.6	265→156 265→ 92	51	21	79.4(8.7)	85.4(3.3)	87.8(10.0)
スルファジミジン (SDD)	11.6	279→156 279→ 92	36	23	77.9(9.3)	85.7(3.5)	88.5(12.1)
スルファメキシピリダジン (SMPD)	11.7	281→156 281→ 92	41	25	73.8(10.5)	85.0(3.9)	84.2(12.0)
スルファモノメトキシ (SMMX)	12.4	281→156 281→ 92	36	41	77.8(7.9)	86.3(3.6)	85.8(10.4)
スルファクロピリダジン (SCPD)	12.7	285→156 285→ 92	31	19	75.4(9.7)	87.0(3.5)	81.5(12.3)
スルファドキシ (SDX)	13.2	311→156 311→ 92	36	29	79.1(6.7)	88.7(3.9)	88.5(11.4)
スルファメキサゾール (SMZ)	13.2	254→156 254→ 92	31	47	79.0(6.8)	88.0(3.3)	86.8(11.5)
スルファベンズアミド (SBA)	14.3	277→156 277→ 92	21	19	79.6(7.2)	88.9(2.1)	86.4(10.5)
スルファジメトキシ (SDMX)	14.5	311→156 311→ 92	36	41	79.4(7.4)	89.1(2.6)	86.4(11.6)
スルファキノキサリン (SQ)	14.5	277→ 92	41	17	75.8(9.1)	84.2(3.4)	85.3(11.9)
スルファニトラン (SNT)	15.9	311→156 311→ 92	36	30	76.9(6.0)	87.3(2.7)	86.7(11.6)
スルファキノキサリン (SQ)	14.5	301→156 301→ 92	36	47	78.2(7.7)	87.4(4.3)	87.8(10.8)
スルファニトラン (SNT)	15.9	301→ 92	36	19	70.2(8.8)	83.7(2.2)	80.6(14.1)
スルファニトラン (SNT)	15.9	336→156 336→ 92	36	36	70.3(8.3)	83.1(1.9)	80.1(14.0)
スルファニトラン (SNT)	15.9	336→156 336→ 92	36	17	87.9(7.1)	91.3(8.1)	91.7(7.7)
スルファニトラン (SNT)	15.9	336→ 92	36	43	89.7(8.4)	85.4(6.4)	91.3(11.6)
その他の薬剤							
オラキンドックス (OQ)	6.3	264→143 264→ 75	36	43	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)
5-ヒドロキシチアベンダゾール (TBZ-M)	9.1	218→191 218→147	31	85	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)
クロピドール (CLP)	9.1	192→ 87 192→101	51	35	60.2(4.9)	82.3(4.4)	67.2(9.6)
レバミゾール (LEV)	9.7	205→ 91 205→178	46	43	60.1(5.5)	82.7(3.4)	68.4(10.1)
5-プロピルスルホニル-1H-ベンズ イミダゾール-2-アミン (ABZ-M)	9.8	240→133 240→198	51	41	69.5(5.9)	96.5(4.0)	93.6(7.2)
チアベンダゾール (TBZ)	10.0	202→175 202→131	26	33	69.7(6.5)	93.0(3.5)	92.2(7.2)
トリメトプリム (TMP)	10.6	291→123 291→230	51	51	37.0(24.3)	47.9(12.8)	50.7(8.7)
オルメトプリム (OMP)	11.0	275→123 275→ 81	51	27	35.4(23.2)	47.7(13.4)	51.5(8.3)
オキシベンダゾール (OXBZ)	13.5	250→176 250→218	131	39	59.9(6.2)	87.5(4.7)	87.5(4.7)
アルベンダゾール (ABZ)	15.4	266→234 266→191	106	21	59.9(6.3)	87.3(4.7)	87.3(4.7)
フルベンダゾール (FBZ)	15.7	314→123 314→282	126	35	67.9(405)	81.8(6.9)	55.0(17.7)
β -トレンボロン (β -TB)	16.6	271→165 271→107	56	43	67.3(5.0)	81.1(7.6)	54.6(17.6)
α -トレンボロン (α -TB)	16.9	271→165 271→115	51	39	48.2(9.6)	72.4(6.3)	70.9(7.2)
ネガティブイオン化				23	48.9(9.6)	72.5(5.7)	71.1(8.5)
チアンフェニコール (TPC)	3.0	353→184 353→ 79	-36	37	41.1(14.1)	60.5(7.4)	60.7(9.6)
エトパベート (ETB)	14.0	236→192 236→132	-41	55	41.4(14.8)	60.1(6.2)	59.9(8.8)
ゼラノール (ZER)	17.2	321→277 321→ 63	-61	39	44.5(10.0)	64.8(9.7)	60.6(14.4)
ナイカルバジン (NCZ)	18.8	301→137 301→106	-21	21	46.5(14.0)	74.0(12.1)	55.4(11.6)
ジクラズリル (DCZ)	20.0	405→334 405→299	-66	45	33.4(11.4)	41.3(7.4)	41.3(7.4)
ノボピオシン (NB)	20.4	611→205 611→150	-51	49	35.2(13.8)	40.2(10.6)	40.2(10.6)
クロサンテール (CLS)	25.4	660→127 660→344	-96	25	47.0(10.6)	70.9(11.5)	60.6(12.8)
				69	48.0(9.1)	67.7(9.9)	60.3(14.8)
				85	59.6(5.5)	81.7(2.0)	78.6(10.3)
				63	59.3(7.7)	84.5(3.3)	76.5(9.8)
				87	62.6(7.4)	91.0(2.1)	91.0(2.1)
					63.0(6.1)	90.0(2.1)	90.0(2.8)
					91.7(12.9)	79.3(2.6)	102.4(11.1)
					100.3(13.8)	80.9(4.0)	101.1(8.9)
					89.0(6.7)	95.4(1.8)	97.4(7.3)
					90.1(4.9)	96.0(1.2)	97.5(7.5)
					81.1(5.4)	86.8(2.8)	89.3(7.8)
					79.2(6.7)	86.2(2.3)	90.8(8.8)
					145.7(6.4)	90.0(4.0)	229.4(15.2)
					146.3(6.4)	87.8(4.3)	233.0(14.3)
					337.2(8.1)	107.6(7.2)	383.0(27.2)
					322.7(6.5)	110.6(7.6)	424.6(29.7)
					107.4(11.4)	101.4(19.1)	191.6(41.6)
					107.3(13.3)	101.9(17.8)	194.4(42.2)
					0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)
					0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)

RT.: 保持時間

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

CE.: コリジョン エネルギー (Collision Energy)

MRM Trace: マルチプルリアクションモニタリング測定時の選択イオン プレカーサイオン→プロダクトイオン 上段: 定量イオン 下段: 確認イオン

添加量 0.1 μ g/g 試行回数 n=5

25-35min ; (99:1)で保持. MS/MSのイオンソースはESIを使用し, イオン化モードがポジティブの時はイオンスプレー電圧5.5kV, イオン化モードがネガティブの時はイオンスプレー電圧-4.2kV, イオン源温度480℃, ネブライザーガス圧は70psiで測定した. 薬剤ごとのその他の分析条件は表1に示した.

5. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は通知法¹⁾に準じて行った. 粉碎均一化した試料の5.00gを共栓遠沈管に量り採り, 95%アセトニトリル水溶液30mlを加え1分間ホモジナイズした後, 毎分2,500回転で5分間遠心分離し, アセトニトリル層を採った. 残留物に95%アセトニトリル水溶液30mlを加えて激しく振り混ぜた後, 上記と同様に遠心分離し, 得られたアセトニトリル層を合わせた.

フロリジルカラムにこの溶液及びアセトニトリル30mlを順次注入し, 溶出液を採った. これにn-ヘキサン100mlを加え, 振とう機を用いて3分間激しく振り混ぜた後, 静置し, アセトニトリル層を採り, 40℃以下で濃縮し溶媒を除去した. 残留物に0.2mol/lリン酸緩衝液 (pH5.0) 4mlを加えて溶かし, 水6mlを加えた.

この溶液をOasisHLB(60mg)に注入した後, 0.02mol/lリン酸緩衝液(pH5.0)5mlを注入し流出液を捨てた. このカラムに70%アセトニトリル水溶液を注入し, 溶出液を採り, 40℃以下で濃縮し溶媒を除去した. 残留物に35%メタノール水溶液2.0mlを加えて溶かし, 毎分15,000回転で5分間遠心分離した後, 上澄を試験溶液とした.

結果及び考察

1. LC/MS/MS測定条件の検討

1) HPLC条件の検討

通知法には, 分離用カラムにオクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)カラムを用い, 移動相にリン酸緩衝液(pH3.0)とアセトニトリルのグラジエントによるHPLCの分析条件が示されているが, 確認法のLC/MS(/MS)の分析条件は示されていない. そこで, 通常LC/MS/MSには好ましくない不揮発性のリン酸緩衝液の代わりに, 同等のpHを示す0.1%ギ酸を用いグラジエント分析を行なったところ, 対象薬剤を一斉分析することが可能であった. 分離カラムは高純度シリカゲルを基材としたエンドキャッピング済みのODS系カラムを中心に検討したところ, カラムによっては一部の薬剤で強いテーリングを示すものがあった. 検討した中ではCadenzaCD-C18で各薬剤ともピーク形状が最も良好であった. 各薬剤の保持時間は表1に示すとおりである.

2) MRM分析条件の検討

対象薬剤のイオン化はイオンソースをESIとし, 各標

準溶液を直接MSに導入するインフュージョンによるイオンソースの最適化を行ない最大感度が得られる条件を求めた. 結果は表1に示した. 各薬剤とも, $[M+H]^+$ または $[M-H]^-$ をプレカーサーイオンとし, 相対的に最も感度が強く得られたプロダクトイオンを定量イオン, 次に高感度だったプロダクトイオンを確認イオンとした.

合成抗菌剤のナイカルバジンは2成分の混合物であるが, 4,4'-Dinitrocarbanilideの $[M-H]^-$ である m/z 301の強度がより強く得られたためこれをプレカーサーイオンとした. 各物質とも2種のプロダクトイオンを同時にモニターすることで, より確実に目的物質を捕捉することができ, マトリックスに由来する夾雑物質の影響を軽減することが可能になった. サルファ剤はプロダクトイオンとして共通構造部分であるanilineに由来する m/z 92及びaniline+SO₂に帰属する m/z 156が各薬剤から感度よく観測されたため, 各薬剤とも同じプロダクトイオンを選択することとなったが, プレカーサーイオンが異なることから, 測定対象薬剤間での干渉は見られず一斉分析が可能であった. 分析対象とした薬剤のうちサルファ剤のスルファジメトキシシンとスルファドキシシン, スルファメトキシピリダジンとスルファモノメトキシシンは分子量が同じ構造異性体であり, また合成ホルモン剤のトレンボロンには α と β の異性体が存在するため, プレカーサーイオン, プロダクトイオンとも m/z が同じになった. しかしこれらの薬剤は検討したHPLCでの分析条件で分離が可能であったため, 同時分析が可能であった.

MRMによる分析による検量線は, 対象薬剤を表1に示したサルファ剤, その他のポジティブイオン化薬剤, ネガティブイオン化薬剤の3グループに分け混合標準溶液を調製し, 0.01, 0.05, 0.5, 1.0, 5.0ngを注入しピーク面積による絶対検量線法で作成した. オラキンドックスは確認イオンの感度が不十分で測定が出来なかった. また, クロサンテール, ナイカルバジンは検量線の直線性が得られなかった. これらを除く各薬剤では0.01~5ngの範囲で良好な直線性を示し, 定量イオンで作成した検量線の相関係数(r^2)は0.996~1.000であった. 注入量を0.01ngとしたときの相対標準偏差($n=5$)は10~20%となったが, その他の注入量での相対標準偏差($n=5$)はいずれも10%以内であった.

3) EPI分析条件

検討に用いたQTrapLC/MS/MSはQ3部分にリニアイオントラップの機能を併せ持つ装置であり, EPI分析はQ3でトラップを行なうプロダクトイオンスキャンであるため, 従来のLC/MS/MSによるプロダクトイオンスキャンに比べ高感度にプロダクトイオンを検出することが可能で, 測定物質の構造情報を反映するスキャンスペ

クトルを得ることができる。そこで、各標準溶液について $[M+H]^+$ または $[M-H]^-$ をプレカーサーイオンとし、プロダクトイオンのスキンスペクトルが得られる条件を求めた。分析例として図1にスルファドキシシ及びスルファジメトキシシの構造式及び1ng注入時のEPI測定によるスペクトルを示した。これらの薬剤は $-OCH_3$ の結合位置のみが異なる構造異性体であるため、MRM分析ではプレカーサーイオン、プロダクトイオンとも同一のものとなった。しかし、EPI分析によるスペクトルを比較したところ、 m/z 140のフラグメントがSDXにはみられるがSDMXにはみられなかった。各々のスペクトル

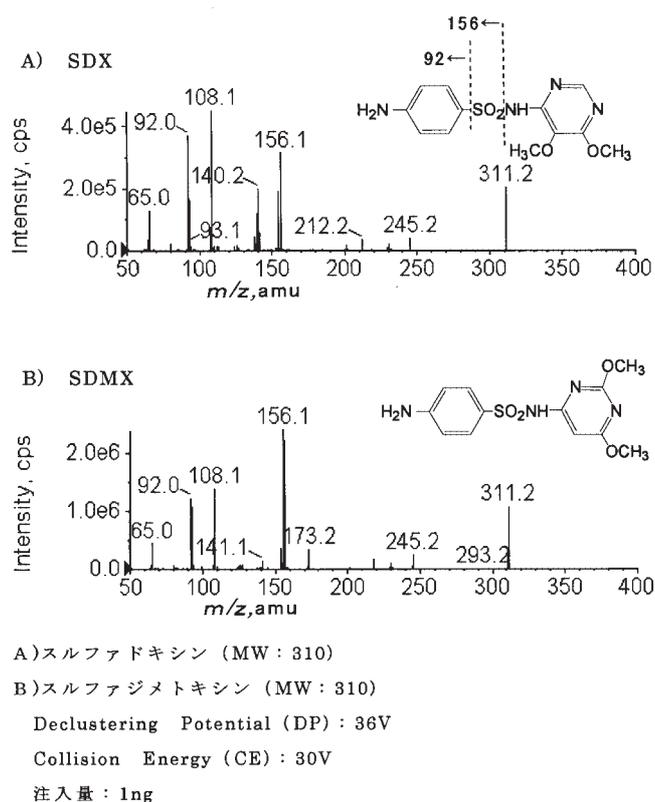


図1 EPI測定によるスペクトル

ルの特徴は、注入量を0.025ngまで減少させても一致していたことから、EPI分析によるスペクトルは2つの薬剤の判別の指標になると考えられた。また、EPI分析により得られたスペクトルを比較することで、食品成分等の夾雑物との判別が可能であり、EPI分析による得られる構造情報が定性分析に有効であると考えられた。

2. 試験溶液調製法の検討

抽出操作を効率よく行なうためカートリッジカラムによる精製について検討した。通知法ではHPLCで分析するため、カートリッジカラムからの溶出時に40%メタノール水溶液と70%アセトニトリル水溶液に分画して溶出しているが、LC/MS/MSでの分析ではHPLCでの分離が

不完全でも別々に定量、確認することができる。そこで溶出操作の簡略化を検討し、溶出力の強い70%アセトニトリル水溶液のみで溶出することとした。またカートリッジカラムは適用範囲が広く、乾燥に強いなどの操作性に優れているOasisHLB[®]の適用について検討したところ、多くの薬剤で良好な結果が得られた。

3. 添加回収試験

本法を用い牛肉、豚肉、鶏肉に各薬剤を0.1 μ g/gになるように添加して、添加回収試験を行なった。回収率はマトリックスによるイオン化抑制の影響を避けるため、サンプル抽出液に標準物質を添加して作成したマトリックス検量線を用いて求めた。結果は表1に示した。オラキンドックス、クロサンテールは回収が得られず、ナイカルバジン、ジクラズリルは牛肉及び鶏肉で、ノボピオシンは牛肉で夾雑物の影響を受けた。ベンズイミダゾール系駆虫剤では回収率が50%に満たないものがあり、抽出操作等に検討が必要であると考えられた。他の薬剤では回収率が概ね70~120%、相対標準偏差は15%以内であり、日常検査に適用可能であることが確認された。

まとめ

畜産物中の動物用医薬品の分析について、イオントラップLC/MS/MSの活用を検討した。サルファ剤等の合成抗菌剤を対象に検討を実施したところ、MRM分析により高感度な分析が可能となり、またEPI分析により同定の指標として有効な化合物の構造情報が得られた。

ポジティブリスト制施行に向けて、多成分一斉分析をより確実に実施するために、高感度で構造情報を得ることができるイオントラップLC/MS/MSのMRM、EPIによる分析は有用な手段であることがわかった。

(平成18年7月20日受理)

文 献

- 「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」：厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安発第1129002号，(平成17年11月29日)
- 野口昭一郎，寺田久屋，田村征男：LC/MS/MSを用いた畜水産食品中の動物用医薬品の一斉分析法，第90回日本食品衛生学会学術講演会抄録，101(2005)

短 報

アレルギー物質を含む食品の表示制度 における検査結果について

渡邊裕子, 甲斐茂美, 岸 美智子

Examination of Foods Containing Allergic Substances under the Labelling System

Hiroko WATANABE,
Shigemi KAI and Michiko KISHI

緒 言

平成11年FAO/WHO合同食品規格委員会総会において、アレルギー物質を含む食品の表示を行うことで合意した後、日本では平成13年4月1日より食品衛生法に基づき、アレルギー物質を含む食品に関する表示が制度化された¹⁾。表示が義務化された目的は、表示によって食物アレルギー患者が「アレルギー症状を誘発する食品を回避し、その結果として摂取可能な食品を選ぶことができるようになること」である。卵・乳・小麦・そば・落花生の5品目は表示が義務化され、その他19品目は表示の推奨となった(平成16年にバナナが追加され、表示推奨が20品目となった)。

厚生労働科学研究食品表示研究班において、アレルギーを誘発するタンパク量が一般的に数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ レベル以上という指針が示されたことから、表示の妥当性を確認するために、平成14年11月に検査法が定められた(平成14年11月「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食発第1106001号)²⁾。検査法は、5品目ともに複合抗原標識抗体と精製抗原標識抗体により検出する2種類のELISA法キットにより定量を行い、確認検査として卵・乳ではウエスタンブロット法、小麦・そば・落花生ではPCR法を用いる。これに基づき、神奈川県では平成15年度に県内事業所の協力により、加工食品からの特定原材料の検出について調査を行い、平成16年度より検査を行っている。そこで、平成15年度に行った加工食品からの卵

の検出に関する調査結果および平成16年度の乳の検査結果について報告する。

方 法

1. 試料および試薬

試料は、卵原材料調査では市販食肉加工品および冷凍加工品を用い、乳原材料検査は市販菓子類および総菜・冷凍食品を用いた。

卵タンパク量の測定には、森永生科学研究所製モリナガ卵白アルブミンキット(以下卵白アルブミンキット)および日本ハム製FASTKITTM卵エライザキット(以下卵キット)を用いた。乳タンパク量の測定には、モリナガ牛乳測定カゼインキット(以下カゼインキット)および日本ハム製FASTKITTM牛乳エライザキット(以下牛乳キット)を用いた。ウエスタンブロットには、(株)森永生科学研究所製モリナガ卵ウエスタンブロットキット(卵白アルブミンおよびオボムコイド)、牛乳ウエスタンブロットキット(カゼインおよび β -ラクトグロブリン)を用いた。その他の試薬は、すべて試薬特級を用いた。水は超純水を用いた。

2. 機器および測定条件

サンプルの均一化には、フードカッター ナショナル製 MK-K58を用いた。抽出操作には、キネマティカポリトロン製ホモジナイザーPT3100、高速冷却遠心機 トミー製GRX-220を用いた。ELISA測定には、マイクロプレートウオッシャー ナルジェヌンク製Nuncイムノウオッシュ470175、マイクロプレートリーダー バイオラッド製を用いた。ウエスタンブロットには、電気泳動装置 テフコ製セイフティーセルミニ、パワーサプライ インビトロジェン製MP250、転写装置 バイオラッド製トランスブロットSDセルを用いた。

卵および乳タンパクの定量として用いたELISA法および定性として用いたウエスタンブロットは既報^{3)~6)}に従った。表示がなく、ELISA法で検出された食品についてはウエスタンブロット法で確認を行った。ELISA測定用の検量線は、各キットのマニュアルに従い、3ウエル併行で測定を行い、マイクロプレートマネージャー5.2 PCデータ解析ソフトウエアを用いて、4係数logistic解析により作成した。定量限界については、日本薬局方の基準を準用した⁴⁾。

3. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は検査方法に従い³⁾、均質化されたサンプルを約2g取り、キット付属の抽出用緩衝液を38mL加え抽出溶液を調製した。

表1 特定原材料(卵)の調査結果

No.	食肉製品	卵配合割合(%)	原材料	加工条件	卵(μg/g)	卵白アルブミン(μg/g)	判定*	ウエストンプロット** (OM/OVA)
1	ロースハム	1.55	卵白粉末	乾燥、スモーク、蒸(70~80℃、20~120分)	20.0<	25.6<	+/+	
2	ベーコン	0.50	卵白粉末	乾燥、スモーク、蒸(70~80℃、20~150分)	20.0<	25.6<	+/+	
3	豚角煮	0.87	卵白粉末	蒸(90℃、140分)、レトルト処理(124℃、40分)	0.3	<0.4	-/-	+/+
4	ハムベーコン巻き	0.67	卵白粉末	乾燥、スモーク、蒸(70~80℃、20~360分)	20.0<	25.6<	+/+	
5	ソーセージ① (粗挽き)	0.83	卵白粉末	乾燥、スモーク、蒸(70~80℃、7~35分)	2.4	3.9	-/-	+/+
6	ソーセージ②	1.03	卵白粉末	乾燥、スモーク、蒸(70~80℃、7~35分)	20.0<	25.6<	+/+	
7	ソーセージ③	1.23	卵白粉末	煮(80℃、70分)	16.3	25.6<	+/+	
8	ハンバーグ	0.96	卵白粉末、卵粉末	スモーク(150℃、70分)、レトルト処理(124℃、40分)	0.8	<0.4	-/-	+/+
9	豚角煮(中間品)	1.00	卵白粉末	煮(90℃、140分)	0.5	1.2	-/-	+/+
10	ソーセージ④	0.00	-	乾燥、スモーク、蒸(70~80℃、7~35分)	<0.2	<0.4	-/-	-/-
No.	総菜・冷凍食品	卵配合割合(%)	原材料	加工条件	卵(μg/g)	卵白アルブミン(μg/g)	判定*	ウエストンプロット** (OM/OVA)
11	イカしゅうまい1	0.36	卵白	蒸(100℃数分)	20.0<	25.6<	+/+	
12	エビしゅうまい	0.96	卵白	蒸(100℃数分)	2.7	4.6	-/-	+/+
13	しゅうまい1	1.30	卵白	蒸(100℃数分)	20.0<	25.6<	+/+	
14	カニしゅうまい	0.37	卵白	蒸(100℃数分)	1.4	1.9	-/-	+/+
15	さつまあげ	2.20	卵白	蒸(100℃数分)	20.0<	25.6<	+/+	
16	イカしゅうまい2	0.37	卵白	蒸(100℃数分)	20.0<	25.6<	+/+	
17	やさ豆腐	2.80	卵白	蒸(100℃数分)	20.0<	25.6<	+/+	
18	春巻	0.00	-	蒸(100℃数分)	<0.2	<0.4	-/-	-/-
19	サカナあげ	0.00	-	蒸(100℃数分)	0.9	1.4	-/-	+/+
20	しゅうまい2	0.00	-	蒸(100℃数分)	<0.2	<0.4	-/-	-/-

*:10μg/g未満, 10μg/g以上+

**:不検出-, 検出+

OM:オボムコイド, OVA:オボアルブミン

結果および考察

1.卵特定原材料の検出に関する調査結果

食肉製品10検体および総菜・冷凍食品10検体について加工条件および卵の添加量の調査を行った。

表1に調査結果を示した。検査法では、ELISA法におけるタンパク検出値10μg/g以上を陽性、10μg/g未満を陰性と判定する。食肉製品の原材料は、No.1~4, 6, 7, 9は卵白、No.5のソーセージは結着剤料(でんぷん、卵白)、No.8のハンバーグは、つなぎ(パン粉、卵白)であった。また、いずれも同じ卵白粉末添加物を使用していた。No.10は、卵不使用であり、検出値も定量範囲以下であった。

卵を使用した9製品の配合割合は、0.5%~1.55%であった。このうち、定量値が10μg/g以上とならない製品(No.3, 5, 8, 9)は、豚角煮と卵を結着剤等に使用している製品であった。この場合、判定にあたり検査法別添「偽陽性または偽陰性を示す食品リスト」により、確認を行う。このリストには偽陰性を示す食品として、いずれのキットにおいても、容器包装詰加圧加熱殺菌食品と食肉製品、レトルトパウチ製品が挙げられている。食肉製品では、高畑ら⁷⁾が行った市販加工品の測定においても、ソーセージと豚角煮で偽陰性の例があり、その要因としてタンパク変性などによる抽出効率の変動が考えら

れた。その点を考慮し、豚角煮は、レトルト加工を行っているもの(No.3)と行っていないもの(No.9)について、調査を行った。豚角煮は、卵を原材料として使用しており、調理加工のみでも検出値は数μg/gとなり、さらにレトルト加工することにより検出値が低下した。No.8のハンバーグについては、加工による歩留が低いこと(0.63)と150℃焙焼およびレトルト加工により、偽陰性となったことが推測された。

しかし、No.5(陰性)およびNo.6(陽性)のソーセージについては、加工工程に大きな違いは見られなかった。加工工程では乾燥温度はNo.5 75℃、No.6 70℃であり、加工歩留はNo.5 0.92、No.6 0.86であった。一方、この2製品は製品名が表すとおり、No.5は肉質が粗挽きの状態であるが、No.6は均一の状態であった。加工品の卵タンパクの検出に製品の均一化がどの程度影響するのかについては、今後の課題であるが、製品の加工法の違いにも注意する必要があると考えられた。

卵を使用した総菜・冷凍食品(No.11~17)の配合割合は、0.36~2.80%であった。また、いずれも卵白を使用していた。No.11, 13, 15, 16, 17については10μg/g以上となり、配合割合を裏付ける検出結果となった。

しかし、No.12エビしゅうまいとNo.14カニしゅうまいについては、数μg/gとなり陰性の判定となった。

No.14は配合割合が0.37%と少ないが、同じ配合割合であるNo.11およびNo.16は陽性となった。加工工程では蒸機温度はいずれも100℃であるが、蒸機時間がNo.14が5分51秒、No.11 3分25秒、No.16 3分59秒とNo.14が約2分長かった。

一方、No.12（陰性）と配合割合に近いNo.13（陽性）を比べると、蒸機時間がNo.12 約6分、No.13 約9.5分でむしろNo.13が長い。製品全ての原材料等の情報が得られなかったため、これらの製品が陰性となった要因を特定することはできなかった。

No.18からNo.20は卵配合なしの製品で、不検出となった。No.19については、2キットいずれも数 $\mu\text{g/g}$ の検出値であるが、10 $\mu\text{g/g}$ 以下であるため陰性の判定となるが、ウエスタンプロットにおいて卵の混入が確認された。ラインコンタミネーションの可能性があるので、事業者に問い合わせた。その結果、製造記録から、No.15さつまあげの製品製造後に当該製品を製造したことによるラインコンタミネーションの可能性が示唆されたとの報告があった。また、当事業所では製造ラインの洗浄を行い、ラインコンタミネーションへの対応をすでに行っ

ているとの説明があった。このことから、練り製品は通常のライン洗浄では、数 $\mu\text{g/g}$ 程度のコンタミネーションの可能性が残ることが明らかとなった。このようなラインコンタミネーションが起こるケースについては情報が無いことから、有益なデータとなった。

また、本製品の場合、原材料として使用していないため行政措置は不要であるが、混入の可能性のある場合、その量によりアレルギー発症のリスクが考えられる。表示制度ではコンタミネーションの場合、原材料表示することは認めておらず、欄外に注意喚起表示（例；卵製品を製造する施設と同じ施設で製造しています）を行うことが認められている。また、表示検討会では、コンタミネーションの定義については検討中であるが³⁰⁾、コンタミネーションの可能性のある場合、製品の表示方法の判断根拠となる特定原材料の検出値をモニターするなどの対応を行う必要があると考えられる。

以上のことから、食肉製品、総菜・冷凍食品における卵タンパクの検出とアレルギー表示との妥当性を判断する材料として、その配合割合と使用方法および加工工程などの製造記録の情報の重要性が確認された。さらに、

表2 特定原材料（乳）の検査結果

No.	菓子類	表示	乳($\mu\text{g/g}$)	カゼイン($\mu\text{g/g}$)	判定*	ウエスタンプロット** (CN/ β LAG)
1	ウエハース	なし	<0.5	<0.4	-/-	
2	ポーロ	なし	<0.5	<0.4	-/-	
3	クッキー	注意喚起	20.0<	25.6<	+/+	+/+
4	ビスケット	なし	<0.5	<0.4	-/-	
5	駄菓子	なし	<0.5	0.8	-/-	-/-
6	ヘビーフード (スパゲッティ瓶詰め)	なし	<0.5	<0.4	-/-	
7	パイ	注意喚起	<0.5	<0.4	-/-	
8	カップケーキ	なし	0.8	2.3	-/-	+/-
9	マシュマロ	注意喚起	<0.5	<0.4	-/-	
10	ラスク	なし	<0.5	<0.4	-/-	
No.	総菜・冷凍食品	表示	乳($\mu\text{g/g}$)	カゼイン($\mu\text{g/g}$)	判定*	ウエスタンプロット** (CN/ β LAG)
11	ロースハム	なし	0.8	<0.4	-/-	-/-
12	にら焼餅	脱脂粉乳	5.2	25.6<	-/+	
13	ヘビーフード (ハンバーグレトルト)	なし	<0.5	<0.4	-/-	
14	カレー(レトルト)	なし	2.0	1.1	-/-	+/+
15	パンミックス(粉)	注意喚起	20.0<	25.6<	+/+	+/+
16	ソーセージ1	乳糖	<0.5	<0.4	-/-	
17	ウインナー1	なし	<0.5	<0.4	-/-	
18	ウインナー2	なし	<0.5	1.8	-/-	+/-
19	ソーセージ2	不使用	<0.5	<0.4	-/-	
20	ミートボール	なし	<0.5	<0.4	-/-	

*: 10 $\mu\text{g/g}$ 未満-, 10 $\mu\text{g/g}$ 以上+

** : 不検出-, 検出+

CN:カゼイン, β LAG: β -ラクトグロブリン

多様な加工製品における加熱加工処理だけではない製造レシピ（均一性、歩留など）についての情報も把握できれば検出値の参考となることが明らかとなり、有益な調査結果が得られた。今後もこのようなデータの蓄積をすすめ、管内製造業者への情報提供および指導が必要と考えられた。

2. 乳特定原材料の検査結果

乳原材料の検査として、菓子類10検体および総菜・冷凍食品10検体の検査を行った。

表2に検査結果を示した。乳の原材料表示のない菓子10検体、総菜、食肉製品等9検体及び乳表示のある総菜1検体（No.12）の検査を行った。No.12に焼餅は、判定結果が-/+であるが、脱脂粉乳の原材料表示が記載されていたことから、通知に示された判断樹により、製造記録の確認は省略することができる。

No.3クッキーおよびNo.15パンミックスは乳、カゼイン検査いずれも陽性となった。この場合表示を見る限り、乳及びカゼイン検査で挙げられている羊乳、山羊乳、牛肉、いくら、すじこの偽陽性を示す原材料が含まれていないため、偽陽性には該当しない。また、ウエスタンブロット法により乳の混入が確認された。これらは注意喚起表示「本品製造工場では、乳、卵を含む製品を生産しています。」の記載はあるが、 $10\mu\text{g/g}$ 以上の検査結果はアレルギー発症のリスクが高いことが考えられるため、製造行程および原材料の再確認を行い、適切な表示が必要と考えられた。この2当該業者の回答は、1事業者はそのまま注意喚起表示とし、他の1事業者は原材料として使用し、原材料表示に変更を行うものであった。

No.5駄菓子、No.8カップケーキ、No.11ロースハム、No.14カレー及びNo.18ウインナー2については、いずれも陰性であるが、乳あるいはカゼインが検出された。原材料表示を見る限り、偽陽性には該当せず、No.8、14及び18については、ウエスタンブロット法で乳が確認された。表示制度においては、注意喚起表示が許されていることから、キャリーオーバーや製造ラインの点検を行い、消費者への適切な情報提供が必要と考えられた。

No.7パイ、No.9マシュマロについては、注意喚起表示が記載されているが、検査結果は定量限界値以下であった。焼き菓子等については、検査方法の別添4において未確認であるが偽陰性の可能性が考えられるため、検査値のみでは判断できない。尚、注意喚起表示を行った場合においても、製造記録等で表示の根拠が必要となる。

判断樹における基本的注意事項において、判断樹枝①の表示があり検査結果が陽性である場合以外は、製造記録の確認が必須となる。従って、乳の表示がなく、検査で陰性の場合においても、製造記録により表示の根拠を確認する必要がある。これは、ELISA法の検査では、偽陰性の場合が考えられるため、製造記録の確認が必須であるとされている。

また、No.16ソーセージ1は、乳の原材料表示である乳糖の表示があるが、定量限界以下であった。乳糖は、乳タンパクのキャリーオーバーがほとんどない場合は、検査において偽陰性となる場合があり、製造記録において根拠が確認できれば行政措置は不要となる。尚、ELISA測定時の添加回収では、カゼイン検査98%、乳検査109%の回収率が得られている。

これまでの検討結果により、食品のアレルギー表示制度における検査では、検査値とその裏付けとなる製造記録などの情報が行政判断に重要であることが明らかとなった。今後も検査担当と監視担当との連携を密にし、食の安心・安全のための有益な行政監視に繋げていきたい。

（平成18年7月20日受理）

文 献

- 1) 神奈川芳行, 今村知明: アレルギー物質を含む食品の表示制度について, 食衛誌, **43**, J269-J271 (2002).
- 2) 穂山浩, 豊田正武: 食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の概要, 食品衛生研究, **52**, 65-73(2002).
- 3) 穂山浩: アレルギー物質を含む食品の検査方法について, 食衛誌, **44**, J168-J177(2003).
- 4) 穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝, 渡邊裕子, 飯島賢, 山川宏人他: 特定原材料(卵)測定の厚生労働省通知ELISA法の複数機関による評価研究, 食衛誌, **44**, 213-219(2003).
- 5) 高畑能久: ELISAによる特定原材料の検出について (1), 食衛誌, **44**, J275-277(2002).
- 6) 豆越真一: ELISAによる特定原材料の検出について (2), 食衛誌, **43**, J277-J279(2002).
- 7) 高畑能久, 森松文毅: 特定原材料検査キット「FASTKITエライザ」の開発と応用, FFI ジャーナル, **206**, 23-32(2002).

短 報

化粧品中のサリチル酸オクチルの高速液体クロマトグラフィーによる分析

松阪綾子¹, 伊藤理恵², 佐藤信夫², 土井佳代¹

The Analytical Method for Octyl Salicylate Determination in Cosmetics with High Performance Liquid Chromatography

Ayako MATSUZAKA, Rie ITO,
Nobuo SATO and Kayo DOI

はじめに

サリチル酸オクチル (Octyl Salicylate, OS) は紫外線吸収剤として広く用いられており, その配合量は薬事法上, 全ての化粧品100g中の最大配合量が1.0g以下とされてきた。しかし平成13年3月30日より化粧品基準が改定¹⁾され, 紫外線吸収剤として用いられる最大配合量が緩和された。このことからOSがより多くの化粧品に配合される可能性が考えられた。OSの分析法としては高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による化粧品中の紫外線吸収剤の一斉分析法²⁾がある。この分析法は定性に関する検討が主であり, 定量性についての検討が不十分であると思われた。そこで, 今回HPLCを用いて化粧水及びクリーム中のOSの定量方法について検討を行ったところ, 良好な結果が得られたので報告する。

方 法

(1) 試薬及び器材

標準品として用いたOSはシグマ・アルドリッチ, サリチル酸メチルは東京化成工業, 移動相に用いるアセトニトリルは和光純薬のHPLC用を用い, その他の試薬は全て和光純薬の特級品を用いた。また, 標準品として用いたOSの純度はHPLCを用いて99%以上であることを確認した。シリンジフィルターはDISMIC-13HP (孔径0.45

μm , アドバンテック) 及びGHPアクロディスク (孔径0.45 μm , ゲルマン) を用いた。

(2) 試料溶液及び標準溶液の調製

0.1%及び1.0%OS配合の化粧水及びクリームを試料として用いた。試料約0.1g及び1.0gを精密に量り, アセトニトリル10mlを加え, クリームについては超音波浴を用いて分散させた後, アセトニトリルで全量20mlとした。これらの溶液を各々シリンジフィルターでろ過し, 試料溶液とした。標準溶液はOS約0.01gを精密に量り, アセトニトリルを加えて溶かし正確に100mlとする。この溶液をアセトニトリルで正確に希釈し, 0.1~750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のOS標準溶液を調製した。

(3) HPLC装置

HPLCはアジレント社製1100シリーズを用いた。カラムにTSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm (5 μm , 東ソー製) を用い, 測定波長190~400nm (検出波長306nm), カラム温度40℃, 流量1.0ml/min, 注入量10 μl とした。

(4) HPLCによる定量範囲の直線性及び再現性

0.1~750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したOS標準溶液10 μl をHPLCに注入し, ピーク面積を求め, そのピーク面積より定量範囲の直線性を確認した。また5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準溶液を各々6回繰り返し注入し, その再現性を求めた。定量試験では1~110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準溶液を調製し, 検量線は得られたピーク面積値より絶対検量線法により作成した。

結果及び考察

(1) HPLCによる検討

移動相としてアセトニトリル/水混液(8:2)を用いたところ, OS標準溶液では保持時間12.1分付近にピークを認め, その紫外部吸収スペクトルは図1に示したとおり, 205nm, 237nm及び306nmに極大吸収が認められた。また, 試料溶液についても図2に示したとおり, 約12.1分にピークが認められた。Dinunzio²⁾らの方法は測定に30~40分を要するが, 本法は測定時間が半分以下に短縮され, ピークの分離も良好であった。本条件の検出限界はS/N比3で約0.7ng, 定量限界はS/N比10で約2.3ng, 理論段数は13000以上, シンメトリー係数は1.16であった。

(2) 抽出溶媒の検討

メタノール, エタノール, アセトニトリル及びアセトン溶媒として, OS標準溶液の紫外部吸収スペクトルを測定した。図1に示したとおり, アセトンでは紫外部吸収スペクトルが測定できなかった。また, サリチル酸化合物であるサリチル酸フェニルは, アルコール類とエステル交換反応し, 副生成物のサリチル酸エステル類を生ずることが知られている³⁾。このためOSについても同様

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 (株) コーセイ研究本部

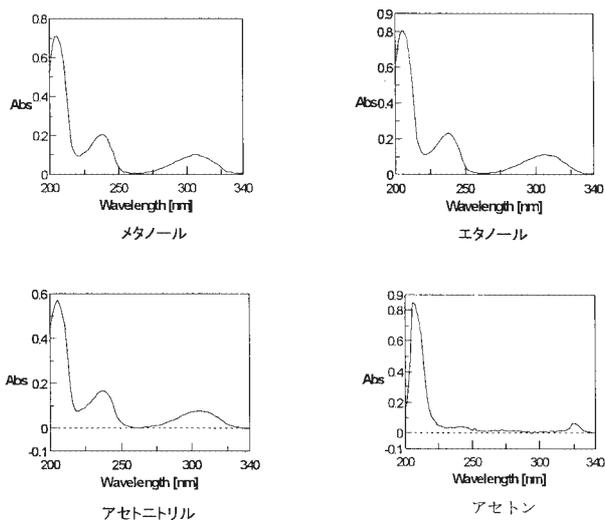


図1 各溶媒に溶解したOS標準溶液の紫外外部吸収スペクトル

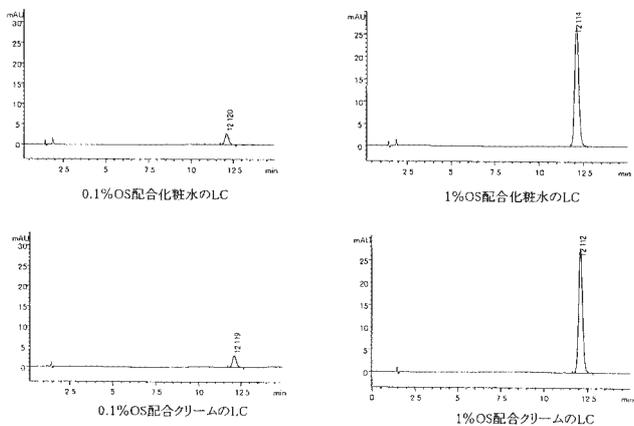


図2 OS配合化粧水及びクリームのHPLCクロマトグラフ

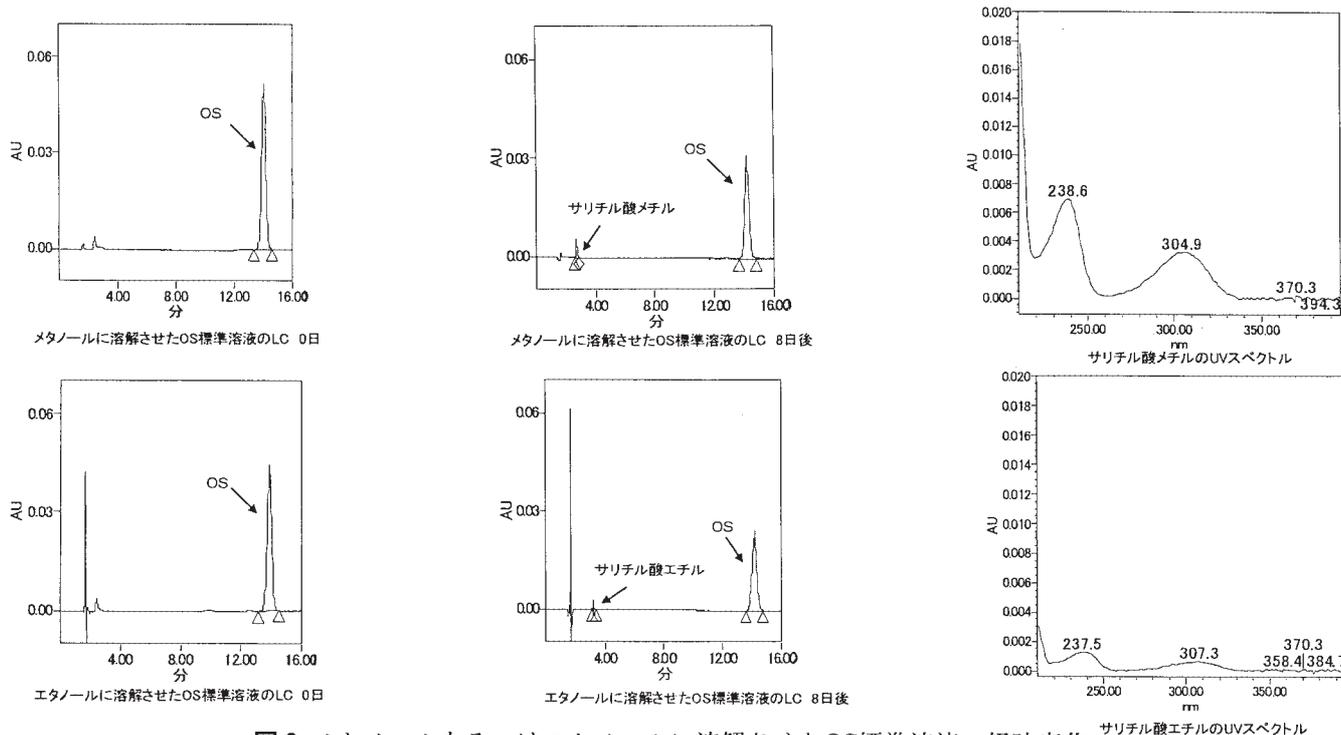


図3 メタノールあるいはエタノールに溶解させたOS標準溶液の経時変化

に副生成物を生ずることが予測された。そこでメタノール、エタノール及びアセトニトリルを用い、各溶媒にOSを溶解させ、40℃の恒温水槽に放置し、0,1,5及び8日後のOS標準溶液中に生成されるサリチル酸エステル類の生成量を調べた。表1及び図3に示したとおり、メタノール及びエタノールを溶媒とした場合、サリチル酸エステル類であるサリチル酸メチル及びサリチル酸エチルの生成が認められた。以上の結果から、メタノール、エタノール及びアセトンは抽出溶媒に適さないと考えられた。従って、抽出溶媒としてアセトニトリルを選択した。次に試料約1.0gを精密に量り、アセトニトリル及び移動相を抽出溶媒として試料溶液を調製した。表2に示したとおり、化粧水はいずれの抽出溶媒を用いても、100%の回収率が得られ、変動係数は0.3%以下であった。一方、クリームはアセトニトリルを抽出溶媒とした場合は98%以上の回収率が得られ、変動係数は0.4%以下であった。しかし、移動相を抽出溶媒とした場合は96~98%程度の回収率であり、変動係数は0.5%以下であった。以上の結果から、化粧水はいずれの抽出溶媒によっても差を生じないが、クリームではアセトニトリル抽出が適していると考えられた。ただし試料採取量が1.0gの場合、化粧水はやや透明度を欠き、クリームは浮遊物を生じ白濁した。そこで、試料採取量を0.1gとし、アセトニトリルで抽出したところ、化粧水は澄明に溶解し、クリームは浮遊物を生じず白濁して分散した。また、いずれの試料溶液においても回収率は向上し、変動係数も0.5%以下と良好であった。これらのことから、定量は試料0.1gを採取し、アセトニト

リルを抽出溶媒として用いることとした。

表1 各溶媒によるOSからのサリチル酸エステルの生成

溶解溶媒	生成成分	生成量(%)		
		1日	5日	8日
メタノール	サリチル酸メチル	0.4	2.0	3.0
エタノール	サリチル酸エチル	0.0	0.6	1.0
アセトニトリル	不検出	-	-	-

(3) 添加回収試験の検討

添加回収試験の結果,表3に示したとおり,いずれの試料溶液においても100%の回収率が得られ,変動係数も0.6%以下であった。従って,化粧水及びクリームに対する本抽出条件は適切であり,抽出時のクリーム試料溶液の白濁は,OSの回収率にはほとんど影響をしないことがわかった。

(4) HPLCによる定量範囲の直線性,再現性及び試料の分析結果

OSの定量限界をS/N比10で求めた結果,2.3ngであったため,注入量として4.0ng~7.5?gの範囲で検量線を作成したところ,良好な直線性を示し,相関係数は0.999以上であった。3回検量線を作成した結果,傾き 8.36 ± 0.06 ,Y切片 0.72 ± 3.2 と良好な結果を得た。また標準溶液の繰り返し注入時における相対標準偏差も0.4%以下と良好であった。各試料におけるOSの含有量についてHPLCにより3回測定した結果,表2に示すとおり良好な結果を得た。

まとめ

HPLCによる化粧品中のOSの分析法を検討した。OSの抽出溶媒はアセトニトリルを用いることにより良好な結果を得た。HPLCは試料0.1gを採取し,移動相としてアセトニトリル/水混液(8:2)を用いることにより良好な結果を得た。本法は(Dinunzioらの方法2)と比較し,分析時間は半分以下に短縮できた。添加回収試験では,HPLCによる6回測定の結果,100%の回収率が得られ,変動係数は0.6%以下と良好であった。また,定量範囲は注入量として4.0ng~7.5?gの範囲で検量線を作成したところ,良好な直線性を示し,相関係数は0.999以上であった。

(平成18年7月20日受理)

文献

- 1) 化粧品基準の一部改正について,厚生労働省医薬局長医薬発第306号,平成13年3月30日
- 2) J.E.Dinunzio and R.R.GADDE : Determination of sunscreen compounds in topical sunscreen products, J. Chromatogr., **519**, 117-124(1990)
- 3) 森謙一郎,寺島潔,中村義昭,大貫奈緒美,横山敏郎,伊藤弘一:化粧品中のサリチル酸フェニルの分析法,東京衛研年報,**53**,65-67(2002)

表2 OS配合化粧水及びクリームの定量試験結果

試料	化粧水							
	アセトニトリル抽出				移動相抽出			
	0.1%OS配合		1.0%OS配合		0.1%OS配合		1.0%OS配合	
採取量(g)	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0
平均値(%)	0.0993	0.0983	1.0190	1.0070	0.0991	0.0983	1.0187	1.0106
S.D	0.0028	0.1330	0.0188	0.0785	0.0010	0.1053	0.0299	0.2975
RSD(%)	0.2828	0.1360	0.1846	0.0779	0.1052	0.1070	0.2938	0.2943

n=3

試料	クリーム							
	アセトニトリル抽出				移動相抽出			
	0.1%OS配合		1.0%OS配合		0.1%OS配合		1.0%OS配合	
採取量(g)	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0
平均値(%)	0.1023	0.0999	1.0052	0.9829	0.0971	0.0963	0.9843	0.9764
S.D	0.0050	0.3587	0.0311	0.2146	0.0033	0.3317	0.0464	0.4664
RSD(%)	0.4935	0.3589	0.3097	0.2180	0.3447	0.3443	0.4715	0.4776

n=3

表3 添加回収試験結果

試料	化粧水		クリーム	
	アセトニトリル抽出		アセトニトリル抽出	
	0.1%OS標準溶液添加	1.0%OS標準溶液添加	0.1%OS標準溶液添加	1.0%OS標準溶液添加
平均値(%)	100.33	100.36	100.51	100.76
S.D	0.51	0.32	0.61	0.26
RSD(%)	0.50	0.32	0.61	0.26

n=6

短 報

木造住宅室内空気中における パラジクロロベンゼン濃度の推移

長谷川一夫, 仲野富美, 辻 清美, 伏脇裕一

Time Course of p-Dichlorobenzene Concentration in Wooden House Indoor Air

Kazuo HASEGAWA, Fumi NAKANO,
Kiyomi TSUJI and Yuichi FUSHIWAKI

はじめに

化学物質による室内空気汚染が大きな問題となっていることから、厚生労働省は現在までに13物質の室内濃度指針値を定めている¹⁾。その中の一つであるパラジクロロベンゼンは衣料用防虫剤として広く使用されている。県内保健福祉事務所からの依頼で行っている室内汚染化学物質調査では、毎年パラジクロロベンゼンの指針値を超える事例が報告されている²⁾。しかし、パラジクロロベンゼンの室内濃度推移報告例はほとんどみられない。そこで、アクティブサンプリング法を用いた揮発性有機化合物(以下、VOC)43項目の調査でパラジクロロベンゼンが室内濃度指針値を大きくこえていた住宅において、設置場所確保が容易なVOCパッシブサンプラーを用いてパラジクロロベンゼン濃度の推移を調査したので報告する。

方 法

1 試料採取場所

県内の戸建て木造住宅1件(築約50年)について、室内及び衣類容器内の空気を採取した。

2 空気試料の採取方法

居住状態の室内空気を、2002年4月は100ml/minの流量で24時間、スベルコ社製VOC用捕集管ORBO-91Lにサンプリングポンプで採取した(アクティブサンプリング法)。2002年11月以後はパラジクロロベンゼンについてアクティブサンプリング法との測定値の一致が確認さ

れた³⁾。パッシブサンプラーであるスベルコ社製VOC用捕集管VOC-SDを用いて24時間室内空気を採取した。室内空気の採取位置は部屋の中央あるいは居住者の日常生活に支障をきたさない場所で、高さ1.0~1.5mとした。居住者が行った低減化対策の作業時には居住者の胸元にVOC用パッシブサンプラーを装着し試料の採取を行った。衣類収納容器内空気は衣類に直接VOC用パッシブサンプラーが接触しないようにして試料の採取を行った。衣類収納容器内等の採取は採取時間を変更した。気中濃度計算に必要な試料捕集時の温度はVOC捕集管のそばに温湿度計を設置して測定を行った。

3 試薬

二硫化炭素は和光純薬工業の作業環境測定用を用いた。標準試薬は関東化学の室内環境測定用VOCs混合標準原液(パラジクロロベンゼンを含む45種混合、各1000mg/l二硫化炭素溶液)、内標準物質はアイソテック社の重水素標識トルエン(以下、トルエン-d₈)を用いた。

4 標準溶液

VOCs混合標準原液を二硫化炭素で希釈し、各100mg/lの標準溶液を調製した。トルエン-d₈を二硫化炭素で希釈し500mg/lの、内標準溶液を調製した。

5 装置

サンプリングポンプ: ガステック社製GSP-250FT
ガスクロマトグラフ質量分析装置(以下、GC/MS): Agilent社製6890(GC), 5973(MS)
温湿度計: 佐藤計量器製作所製SK-L200TH

6 分析方法

(1) 測定用試料の調製

ORBO-91Lに捕集されたパラジクロロベンゼン等を捕集管から抽出するために、キャップ付きバイアル瓶に捕集剤を取り出し、二硫化炭素5mlを加えた。さらに、内標準溶液5 μ lを添加し、2時間放置したものをGC/MS測定用試料とした。VOC-SDについては二硫化炭素2ml、内標準溶液2 μ lを用いて同様に操作を行い、GC/MS測定用試料を調製した。

(2) 定量

GC/MS測定用試料の1 μ lをGC/MSに注入し、選択イオン検出法(SIM法)で測定後、内標準法によりあらかじめ作成した検量線を用いて室内空気中濃度を算出した。検量線の濃度範囲は抽出した二硫化炭素溶液中で0.1~8 mg/lとした。キシレンは異性体の合計量で濃度を求めた。

(3) GC/MS測定条件

カラム: DB-1 (60m \times 0.25mm, 膜厚1.0 μ m)
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C(5分保持)-10 $^{\circ}$ C/分-300 $^{\circ}$ C(3分保持)
注入口温度: 250 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：He(0.9ml/min)

注入量：1μl (スプリット比1:10)

モニターイオン (下線は定量用, 他は定性用) : トルエン-d₈(*m/z* 98,100), パラジクロロベンゼン(*m/z*146,148), トルエン(*m/z*91,92), キシレン(*m/z*91,106), 1,2,4-トリメチルベンゼン(*m/z*105,120), オクタン(*m/z*85,57), ノナン(*m/z*43,57), デカン(*m/z*43,57), ウンデカン(*m/z*43,57), ドデカン(*m/z*1,85), リモネン(*m/z*68,67)

結果及び考察

表1に2002年4月に測定した一階寝室空气中的VOC濃度を示した。43項目中パラジクロロベンゼン, トルエン, リモネン等10項目が検出され, 5項目は脂肪族炭化水素類であった。パラジクロロベンゼンは指針値の約16倍の3800μg/m³検出され, 10項目のVOC合計濃度の98%をパラジクロロベンゼンが占めており, 室内空気がパラジクロロベンゼンに高濃度に汚染されていた。

表1 一階寝室 VOC 測定結果* (2002年4月)

項目	空气中濃度	室内濃度指針値 (μg/m ³)
パラジクロロベンゼン	3,800	240
トルエン	17	260
キシレン	7	870
1,2,4-トリメチルベンゼン	6	—
オクタン	5	—
ノナン	9	—
デカン	11	—
ウンデカン	9	—
ドデカン	5	—
リモネン	16	—

* :33項目は4μg/m³未満

室内空气中的パラジクロロベンゼンの発生源は一般に衣料用防虫剤又はトイレ用消臭剤であることが指摘されている⁴⁾⁵⁾。この住宅では衣料用防虫剤にパラジクロロベンゼンを使用していたが, 発生源の場所を推定するため2002年11月に, 部屋別の濃度測定を行った。その結果を図1に示す。7カ所の測定場所の中で居間等の5部屋は120~190μg/m³に対して, 一階寝室690μg/m³及び一階北部屋670μg/m³で, それぞれ指針値の3倍近い濃度を示した。この結果から, これらの部屋に発生源があると推定され, 押入れ及び洋服ダンス等に使用されていた衣料用防虫剤が発生源であることが確認された。

表2に居住者が行ったパラジクロロベンゼン濃度の低減化対策とその実施時期を示した。2002年5月からは新たに使用する防虫剤がピレスロイド系に変更になり, その後約1年間は残存しているパラジクロロベンゼンと新

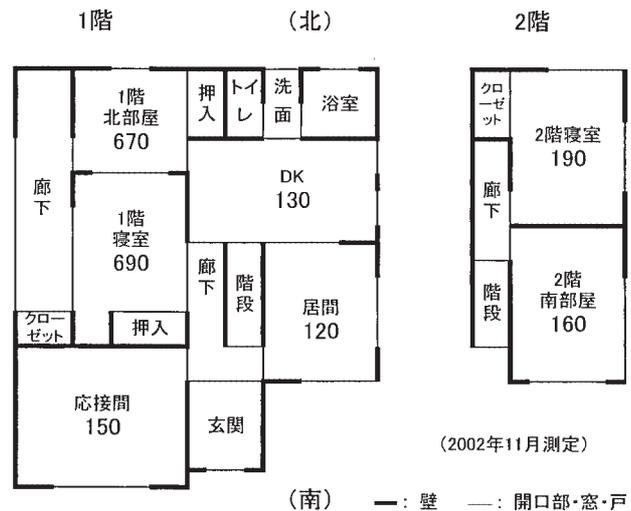


図1 パラジクロロベンゼンの部屋別濃度 (μg/m³)

たに使用したピレスロイド系防虫剤の両方が存在する状況が続いた。2002年12月から残存しているパラジクロロベンゼンの除去が始まり, 2003年5月以後パラジクロロベンゼン防虫剤は完全に除去され, 使用している防虫剤はピレスロイド系だけになった。また, 衣類収納容器も茶箱からプラスチック製容器への交換が行われた。

表2 パラジクロロベンゼンの濃度

時期	低減化対策
2002年5月以後	パラジクロロベンゼン防虫剤からピレスロイド系防虫剤への変更開始
2002年12月及び2003年3月	残存しているパラジクロロベンゼン防虫剤の除去及び防虫剤変更
2003年4月~5月	残存しているパラジクロロベンゼン防虫剤の除去及び衣類収納容器の交換

注)パラジクロロベンゼン防虫剤は2003年5月以後は完全に除去されていた

一階寝室で2002年秋以後, 2006年冬まで春夏秋冬の年4回室内空气中的パラジクロロベンゼン及び室温を測定した結果を図2に示した。防虫剤の変更開始後パラジクロロベンゼン濃度は季節による変動が見られるが徐々に減少し, 2004年冬(1月)に指針値以下, 2006年冬(1月)に指針値の約1/15に減少した。しかし, 防虫剤のパラジクロロベンゼンを完全に取り除いて2年以上経過後もパラジクロロベンゼンを使用していない一般住宅で報告⁵⁾されている室内濃度レベルまでは減少しなかった。2003年春(5月)は1600μg/m³に濃度が上昇したが, 表2に示したパラジクロロベンゼン防虫剤除去作業の影響が考えられた。一階寝室の換気状態は春, 秋, 冬は北側の開口部だけが昼間に開放になっていた。しかし夏は東側, 北側, 西側の開口部が一日中開放になっていた。また, 夏は夜も西側窓の一部を開放して換気が行われていた。したがって

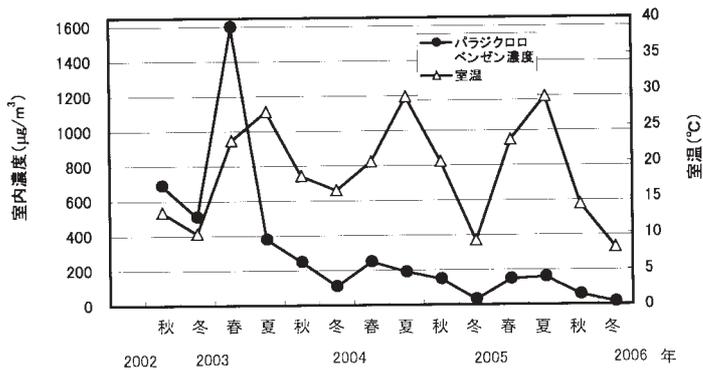


図2 一階寝室空気中パラジクロロベンゼン濃度及び室温の推移

気温が上昇する夏でも濃度の上昇はあまり見られなかった。表3に居住者が行った低減化対策の作業時の一階寝室空気濃度及び居住者の胸元での測定濃度から推定した暴露濃度を示した。室内濃度は図2に示した2003年冬(2月)の510 μg/m³及び2003年夏(8月)の380 μg/m³よりも高い1200から1900 μg/m³で、作業中のパラジクロロベンゼンの空気中への放散による影響が認められた。居住者の胸元での測定濃度から推定した暴露濃度は室内空気濃度よりも高く、作業中の居住者は高濃度のパラジクロロベンゼンに暴露されていた。作業中の個人暴露量を低減するために窓の開放、換気扇の使用など十分な換気と、風向きに注意する等の対策を行うことが必要と思われた。

表3 低減化対策作業時の室内及び居住者の暴露濃度 (μg/m³)

年月	一階寝室濃度*	居住者の暴露濃度**
2002年12月	1,500	9,800
2003年3月	1,200	6,400
2003年4月	1,900	-

* : 採取時間は24時間

** : 採取時間は2.5時間、胸元での測定濃度から推定

パラジクロロベンゼン防虫剤を取り除いた後も、パラジクロロベンゼンが検出される原因を調べるために、室内、押入れ及び衣類収納容器内空気中の濃度を測定した結果を表4に示した。1月と8月とともに室内よりも押し入れ内空気濃度が高く、さらに衣類収納容器内の空気中濃度は押し入れ内空気より約18~510倍も高い結果でNo.④では244,000 μg/m³であった。したがって、防虫剤のパラジクロロベンゼンを完全に取り除いた後も室内空気中のパラジクロロベンゼンが検出される原因は、衣類

へ吸着したパラジクロロベンゼンが空気中へ放散するためと推定された。このためのパラジクロロベンゼン低減化対策としては望月ら⁶⁾が報告している衣類の日陰干しが有効と考えられた。

表4 押入れ、衣類、収納容器内空気中のパラジクロロベンゼン濃度

年月	平均室温	寝室	寝室内の押入れ	押入れ内の衣類収納容器 (μg/m³)			
				No.①	No.②	No.③	No.④
2005年1月	9°C	32	67	1,200	34,000	-	-
2005年8月	29°C	160	810	-	-	17,000	#####

まとめ

室内空気中のパラジクロロベンゼンが高濃度 (3800 μg/m³) で検出された木造住宅において2002年11月から2006年1月まで室内空気中のパラジクロロベンゼン濃度推移を調査した。

パラジクロロベンゼンの低減化対策 (使用の中止及び除去) 後に徐々に減少し、2004年冬(1月)に指針値以下、2006年冬(1月)に指針値の約1/15に減少した。

パラジクロロベンゼン防虫剤交換作業時等の室内濃度及び居住者暴露濃度は高く、作業中の個人暴露量を低減するための対策が必要と思われた。

パラジクロロベンゼン防虫剤を取り除いた後も室内空気中のパラジクロロベンゼンが検出される原因は衣類への吸着と推定された。(平成18年7月20日受理)

文献

- 1) 室内空気中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について、医薬発第020700号、平成14年2月7日
- 2) 住まいと健康サポート推進事業16(1)室内汚染化学物質調査、神奈川県衛研年報、54, 53-54(2004)
- 3) 辻清美, 長谷川一夫, 伏脇裕一: 室内空気中のVOC測定用パッシブサンプラーのフィールド試験による評価、神奈川衛研報告、35, 23-26(2005)
- 4) 花井義道, 加藤龍夫, 神馬高彦, 野村かおる: p-ジクロロベンゼンの大気中動態、横浜国大環境研紀要、12, 31-39 (1985)
- 5) 酒井潔, 三谷一憲: 名古屋市内の住宅におけるパラジクロロベンゼン(p-DCB)防虫剤の使用実態と室内空気中p-DCB濃度、名古屋市衛研報、49, 7-12(2003)
- 6) 望月大介, 菅野尚子, 鈴木由利子, 浮島美之, 房家正博: 家具の中に含まれる化学物質過敏症等に関連した化学物質-p-Dichlorobenzeneを主成分とする防虫剤及び衣類用収納容器-, 静岡県環境衛生科学研究報告、47, 57-61(2004)

短 報

相模川における水質管理目標設定項目 農薬の実態調査

渡辺貞夫, 上村 仁

Monitoring of Pesticides Evaluating Water Quality in Sagami River

Sadao WATANABE and Hitoshi UEMURA

はじめに

水道水質基準に関する農薬類は、平成4年の水質基準改訂等により基準項目(4農薬)、監視項目(15農薬)、ゴルフ場農薬(26農薬)に分類されて、それぞれに基準値が設定されていた。平成16年に水質基準が改訂され、農薬は新たに水質管理上留意すべき項目として水質管理目標設定項目と位置づけられ、対象は101農薬に広げられた。また総農薬方式が採用され、検出された農薬については、検出値/各農薬に設定された目標値の比の総和を求め、その値が1以下であることとなった¹⁾。測定すべき農薬については、散布される地域や時期など、その地域の状況に応じて101農薬から適切に選択することが求められている。

この改訂により、対象農薬が大幅に広がり、これに対処するためガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)及び液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)による多項目一斉の分析法が採用され、101農薬の中で90農薬前後がこの一斉分析法で測定可能と考えられる。そこで、実際の試料に適用出来るのか検討をかねて、神奈川県内の主要水道水源の1つである相模川での農薬実態調査を行った。

方 法

1. 試料

相模川の河口から上流6.5kmの寒川取水堰地点で、神奈川県、横浜市及び横須賀市が水道事業の水道原水として河川の左岸から取水している。今回、この地点からさらに上流約1kmの左岸で、平成16年5月中旬から8月中旬まで週1回の割合で計12回採水した。また調査期間

中、寒川浄水場からの給水を受けている神奈川県衛生研究所内(茅ヶ崎市下町屋)の給水栓から6月22日と7月13日に採水した。

2. 試薬

農薬混合標準液A:和光純薬工業(株)の57種農薬混合標準液(各10mg/l, アセトン溶液)を用いた。なお、以下の農薬混合標準液B, C及びDについても混合されている農薬は表1にまとめて示した。

表1 使用した農薬混合標準液に含まれている農薬

農薬混合標準液A:

ジクロロボス, エトリジアゾール, クロロネブ, ペンシクロン, シマジン, ピロキロン, クロロタロニル, エチルチオメトン, テルブカルブ, トルクロホスメチル, シメトリン, ジチオピル, エスプロカルブ, クロルピリホス, フェンチオン, ベンディメタリン, ジメタメトリン, イソフェンホス, フェントエート, プロシミドン, メチダチオン, ナプロパミド, イソプロチオラン, プレチラクロール, プロフェジン, CNP, エディフェンホス, ピリプチカルブ, イプロジオン, ビベロホス, ビフェノックス, ピリプロキシフェン, エトフェンブロックス, ジクロベニル, トリクロロホン, フェノブカルブ, ベンフルラリン, ジメトエート, プロピザミド, ダイアジノン, イプロベンホス, プロモプチド, メタラキシル, フェニトロチオン, マラチオン, チオベンカルブ, フサライド, メチルダイムロン, キャプタン, ジメビペレート, プタミホス, フルトラニル, イソキサチオン, メプロニル, テニクロール, ピリダフェンチオン及びEPNの57種

農薬混合標準液B:

モリネート, トリフルラリン, α -エンドスルファン, β -エンドスルファン, イソプロカルブ, アトラジン, アラクロール, プロピコナゾール, メフェナセット及びカフェンストロールの10種

LC用農薬混合標準液C:

メソミル, トリシクラゾール, カルボフラン, ジウロン, シデュロン, イプロジオン, アシュラム, チオジカルブ, プロベナゾール, ベンスルフロンメチル, アズキシストロピン及びベンスリドの12種

LC用農薬混合標準液D:

ベンタゾン, トリクロピル, ハロスルフロンメチル, チウラム, ダイムロン, 2,4-D, メコプロップ, チオファネートメチル, フラザスルフロン及びカルプロパミドの10種

農薬混合標準液B:和光純薬工業(株)の10種農薬混合標準液(各10mg/l, アセトン溶液)を用いた。

農薬混合標準液C:和光純薬工業(株)のLC用12種農薬混合標準液(各20mg/l, アセトニトリル溶液)を用いた。

農薬混合標準液D:和光純薬工業(株)のLC用10種農薬混合標準液(各20mg/l, アセトニトリル溶液)を用いた。

カルバリル及びカルベンダジム(ベノミル):それぞれ

の標準品(含量98%以上)をアセトニトリルに10mg/lの濃度で溶解した混合標準液を調製した。

アニロホス, CNPアミノ体:それぞれの標準品(含量98%以上)をアセトンに10mg/lの濃度で溶解し,標準液を調製した。

フェナントレン- d_{10} , アトラジン- d_{10} 及び9-プロモアントラセン:それぞれの標準品(含量98%以上)をジクロロメタンに溶かし,1mg/lの濃度の3種混合液を調製し,GC-MS用内部標準液とした。

アセトン,ジクロロメタン,メチルアルコール及びアセトニトリルは和光純薬工業(株)の残留農薬試験用を用いた。その他試薬は,残農用あるいは試薬特級を用いた。

PS-2カートリッジ及びHLB PlusカートリッジはWaters社製を用いた。

3. 装置及び測定条件

(1) GC-MS

装置:5973/6890(ヒューレット・パッカー社製)

カラム:DB-5MS(内径0.25mm,長さ30m,膜厚0.25 μ m, J & W Scientific社製)

カラム温度:50 $^{\circ}$ C(2分間保持)–(10 $^{\circ}$ C/分昇温)–170 $^{\circ}$ C–(2.5 $^{\circ}$ C/分昇温)–220 $^{\circ}$ C–(10 $^{\circ}$ C/分昇温)–300 $^{\circ}$ C(5分間保持)

注入口温度:250 $^{\circ}$ C

キャリアーガス:1.5ml/分(ヘリウム)

注入量:2 μ l(スプリットレス)

(2) LC-MS

MS条件:

装置:Quattro Ultima Pt(Micromass社製)

イオン化法:エレクトロスプレー

イオン源温度:130 $^{\circ}$ C

キャピラリー電圧:3kV

HPLC条件:

装置:2695(Waters社製)

カラム:Symmetry RP-18(2.1mm ϕ ×150mm, 5 μ m, Waters社製)

カラム温度:40 $^{\circ}$ C

移動相:水/アセトニトリル(9:1)→(20分)→水/アセトニトリル(2:8)のリニアグラジエント

流速:0.2ml/分

注入量:10 μ l

4. 試料の調製

(1) GC-MS試料液

検水500mlを採り,濁っている時はガラス繊維ろ紙でろ過をした。あらかじめジクロロメタン,メチルアルコール,精製水各5mlで洗浄し,活性化したPS-2カートリッ

ジに毎分10~20mlで通水した。通水後,カートリッジを30分以上真空ポンプで吸引乾燥後,ジクロロメタン3mlで溶出した。溶出液に,窒素ガスを吹きつけ0.5ml以下にした。これに内部標準液0.5mlを加え,ジクロロメタンで1mlに調製し,GC-MS試料液とした。

(2) LC-MS試料液

検水500mlを採り,濁っている時はガラス繊維ろ紙でろ過をした。その後,検水を1N塩酸でpH3.5程度に調整し,あらかじめアセトニトリル,メチルアルコール,蒸留水各10mlで洗浄,活性化したHLB Plusカートリッジに毎分10~20mlで通水した。カートリッジを約30分窒素通気乾燥し,通液側とは反対側からアセトニトリル5mlで溶出後,減圧遠心分離器で0.2ml程度まで濃縮した。その後,蒸留水で1mlに調製した。これをLC-MS試料液とした。

結果及び考察

1. GC-MSによる68農薬の添加回収

GC-MSの分析対象は表1に示した混合標準液Aの57農薬, Bの10農薬及びアニロホスとCNPアミノ体で合計69農薬になるが, Bに含まれる α -エンドスルファン及び β -エンドスルファンは異性体で両者を1つと数え68農薬を対象とした。各農薬の測定は,告示に示された質量数(m/z)に準じSIMモードで測定した。1農薬につき,定量用及び確認用の2つの質量数を設定したため,1回の測定で68農薬を分析するには無理があり,なるべく保持時間が重ならないように表2及び表3の2系統(A及びB)にわけて,さらにA系統はIからXIのグループに分割した。表2に示したように測定開始5分後から, Iグループの属する5農薬の主 m/z 及び副 m/z を順次20~50ミリ秒ずつ測定し,15.2分まで繰り返した。次のIIグループは,15.2分から3農薬を同様な方法で18.2分まで測定した。このように, IからXIグループに属するすべての農薬を測定する1つのSIMメソッドを作成した。B系統についても同様のSIMメソッドを作成し,添加回収実験を行った。

精製水500mlに農薬混合標準液A, B, アニロホス及びCNPアミノ体の各1mg/lアセトン溶液をそれぞれ0.1ml添加し,最終濃度で0.2 μ g/lに調製した。3回の繰り返しの結果,エトファンブロックスの回収率が50%程度と低かったが,それ以外は70~120%と良好な回収率が得られ,計68農薬の分析が可能であることが明らかとなった。

(2) LC-MSによる24農薬の添加回収

精製水500mlに農薬混合標準液C,D及びカルバリル,カルベンダジムの計24農薬について,各1mg/lのアセトニトリル溶液をそれぞれ0.2ml添加し,最終濃度で0.4 μ g/lに調製したものについて分析した。分析は,タンデ

表2 GC-MSによる農薬一斉分析のための
グループ化と測定イオン (A 系統)

No	農薬名	保持時間 (分)	主m/z	副m/z	測定m/z 切り換え時間 (分)	グループ
5						
1	ジクロロボス	10.57	109	79		I
2	エトリジアソール	13.39	211	183		
3	トリクロロホン	13.5	109	79		
4	クロロネブ	14.11	191	193		
5	モリネート	14.6	126	98		
15.2						
6	トリフルラリン	16.43	306	264		II
7	ペンシクロン	16.81	125	180		
8	シマジン	17.76	201	186		
18.2						
9	ピロキロン	18.59	173	130		III
10	クロロタロニル	18.78	266	264		
11	エチルチオメトン	19.14	89	97		
20						
12	テルブカルブ	20.59	205	220		IV
13	トルクロホスメチル	20.99	265	125		
14	シメトリン	21.22	213	170		
15	ジチオビル	21.79	354	306		
16	エスプロカルブ	22.62	91	222		
22.8						
17	クロルピリホス	23	197	199		V
18	フェンチオン	23.23	278	153		
19	ペンディメタリン	24.73	252	191		
25						
20	ジメタメトリン	25.22	212	255		VI
21	イソフェンホス	25.36	213	121		
22	フェントエート	25.67	274	125		
23	プロシミドン	25.79	283	96		
26.1						
24	メテダチオン	26.34	145	85		VII
25-1	α-エンドスルファン	26.98	195	241		
26	ナプロバミド	27.69	72	128		
28						
27	イソプロチオラン	28.31	118	189		VIII
28	プレチラクロール	28.33	162	238		
29	プロプロフェジン	29.17	105	175		
29.8						
25-2	β-エンドスルファン	30.46	195	241		IX
30	CNP	32.6	317	319		
31	エディフェンホス	32.9	109	310		
34						
32	ビリブチカルブ	35.68	165	108		X
33	イプロジオン	35.97	314	316		
34	ピペロホス	36.38	320	140		
35	ピフェノックス	36.93	341	310		
37.4						
36	ビリブキシフェン	37.91	136	226		X I
37	エトフェンプロックス	41.09	163	183		

表4 LC-MS測定条件

No	農薬名	保持時間 (分)	モード	コーン 電圧(V)	コリジョン エネルギー (eV)	MS1 (プレカサ イオン)	MS2 (フラグメント イオン)
1	アシュラム	3.36	-	70	15	229.0	196.9
2	メソミル	7.17	+	35	5	162.9	87.9
3	ベンタゾン	7.59	-	75	20	239.1	131.9
4	2,4-D	9.55	-	50	10	219.0	160.8
5	トリクロロビル	9.88	-	35	10	254.0	195.8
6	メコプロップ(MCPP)	10.36	-	45	12	213.0	140.8
7	カルベンダジム(ベノミル)	10.76	+	70	15	192.0	160.0
8	トリシラゾール	11.4	+	80	20	189.8	162.9
9	ハロスルフロメチル	11.76	-	60	20	433.2	252.0
10	フラザスルフロン	12.98	-	60	13	406.3	250.9
11	チオファネートメチル	13.95	+	50	15	343.0	150.7
12	チオジカルブ	14.13	+	45	7	355.1	163.0
13	カルボフラン	14.48	+	70	10	222.1	165.1
14	テウラム	15.25	+	35	5	241.1	195.9
15	カルバリル	15.33	+	55	10	201.9	144.9
16	シデクロン	18.13	-	60	15	231.0	91.9
17	アゾキシストロビン	17.56	+	65	13	404.2	371.7
18	ジウロン(DCMU)	17.67	-	70	17	230.9	185.8
19	ベンスルフロメチル	17.67	-	60	10	409.3	253.9
20	ダイムロン	18.42	-	50	10	267.2	105.9
21	イプロジオン	18.53	+	75	15	329.9	244.9
22	ベンスリド(SAP)	19.85	+	65	10	398.1	313.9
23	カルプロバミド	20.04	-	35	2	333.9	333.8

△型のMS-MS検出器により定量した。エレクトロスプレー法によりイオン化させ、表4に示した質量MS1 (プレカサ-イオン)のみを選択的に通し、次のコリジョンセルで表4に示す条件で衝突開裂により生成したフラグメントイオン (MS2)により定量した。添加した24

表3 GC-MSによる農薬一斉分析のための
グループ化と測定イオン (B 系統)

No	農薬名	保持時間 (分)	主m/z	副m/z	測定m/z 切り換え時間 (分)	グループ
5						
1	ジクロベニル	11.92	171	100		I
2	イソプロカルブ	14.5	121	136		
15						
3	フェノプロカルブ	15.48	121	150		II
4	ペンフルラリン	16.51	292	264		
5	ジメトエート	17.46	87	125		
17.7						
6	アトラジン	17.94	200	215		III
7	プロピザミド	18.58	173	145		
8	ダイアジノン	18.79	179	137		
19.4						
9	イプロベンホス	19.78	204	91		IV
10	プロモプチド	20.65	119	232		
11	アラクロール	21.03	160	188		
12	メタラキシル	21.4	160	206		
21.8						
13	フェントロチオン	22.18	277	260		V
14	マラチオン	22.79	173	125		
15	チオベンカルブ	23.05	100	72		
16	フサライド	23.6	243	241		
24.5						
17	メチルダイムロン	25.33	107	119		VI
18	キャプタン	25.54	79	149		
19	ジメビベレート	25.8	119	145		
26.2						
20	ブタミホス	27.52	286	258		VII
21	フルトラニル	28.1	173	145		
28.5						
22	CNP-アミノ体	28.98	287	289		VIII
23	イソキサチオン	29.94	105	177		
24	メプロニル	32.28	119	269		
32.8						
25	プロピコナゾール	33.2 33.57	259	173		IX
26	テニコロール	34.05	127	288		
35						
27	ピリダフェンチオン	35.85	340	199		X
28	EPN	36.17	157	169		
29	アニロホス	36.85	226	125		
30	メフェナセット	37.84	192	120		
31	カフェンストロール	40.04	100	188		

No 25は2つの異性体である

農薬の中で、ベンフラカルブはほとんど回収されず、イプロジオンはGC-MSで分析したため、この2農薬を除いた22農薬の5回の繰り返しの結果、ジウロン、ベンスルフロメチル及びシデクロンの回収率が50%前後と低かったが、その他の農薬の回収率は70~120%と良好であった。さらに、アセフェートは直接LC-MSで分析可能であるため、計23農薬の分析が可能であった。

2. 相模川の農薬実態調査

調査地点での農薬実態調査において、一度でも検出された農薬を含めると図1に示したように17農薬が検出された。メフェナセット、プロモプチド、チオベンカルブの濃度が高く、検出された濃度を加算すると一番高い値を示した時期は6月中旬であり、県内の水稲栽培の時期と重なっていた。

今回の改訂により、検出された農薬個々の値ではなく、「検出値/個々の農薬に設定された目標値」の比の総和として1以下が基準となっている。そこで、検出された農薬の検出値と目標値の比の総和を計算してみると、図2に示すように6月中旬に約0.3となり最も高い値を示した。

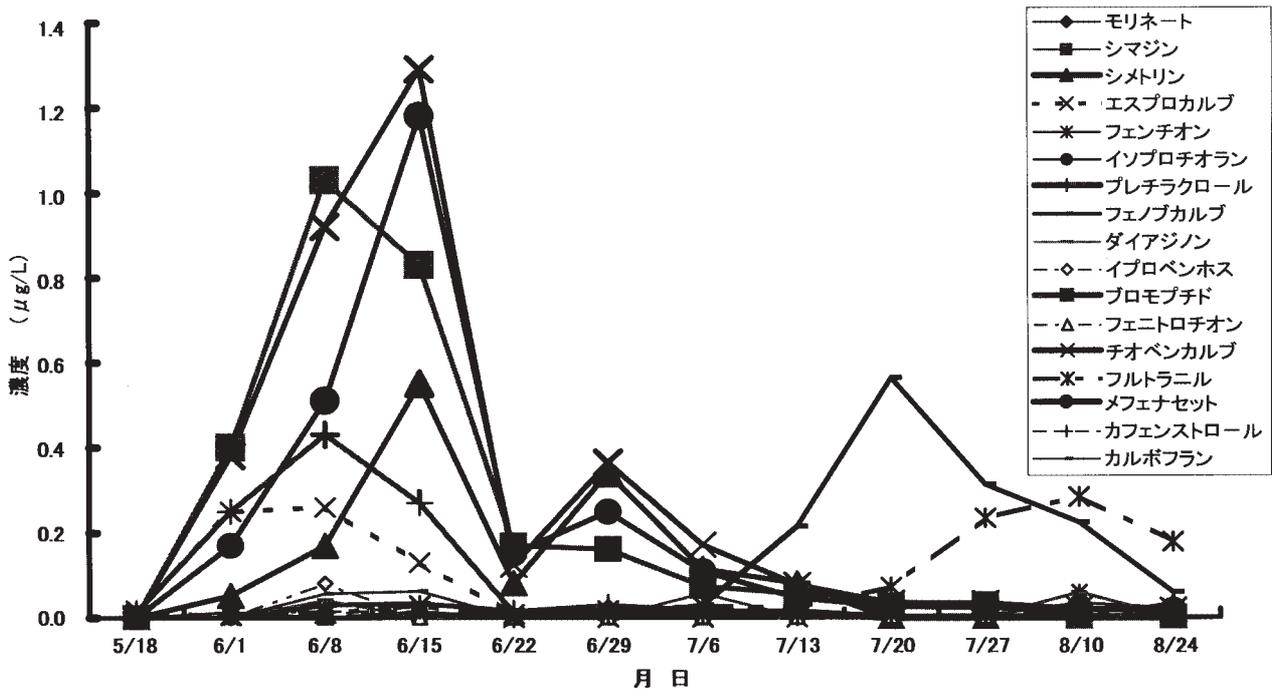


図1 相模川河川水の農薬調査

この値に大きく寄与したのはメフェナセットであった。1ヶ月以上の長期に渡って連続的に検出されたのは、シメトリン、プレチラクロール、フェノブカルブ、プロモプチド、チオベンカルブ、フルトラニル、メフェナセット及びカルボフランの8農薬であった。

これら検出された農薬は、いままでの報告例^{2,5)}にあるものが多く、今回の改訂により監視対象農薬が大幅に多くなったが、この調査からは検出濃度が異常に高いという新たな農薬汚染は認められなかった。

調査期間中、寒川浄水場からの給水を受けている当衛生研究所内（茅ヶ崎市下町屋、浄水場から直線距離で5km）の給水栓から6月22日及び7月13日採水し、検出指標値を算出したところ、6月22日は0.030、7月13日は0.015であった。今後は、データ数を増やすことにより河川水に存在した農薬がどの程度当所の水道水から検出されるのかなど検討を加える予定である。

まとめ

農薬の分析法では、101農薬のうちGC-MSで68種類、LC-MSで23種類の合計91農薬を分析する手法を検討し、実際に水道水源である相模川の実態調査を行ったところ、妨害もなく良好に測定が可能であることが明らかとなった。

相模川のモニタリングで1度でも検出された農薬は17農薬であり、そのうち除草剤が9農薬、殺虫剤が5農薬、殺菌剤が3農薬であり、水稻栽培に使われる農薬が主であった。

(平成18年7月20日受理)

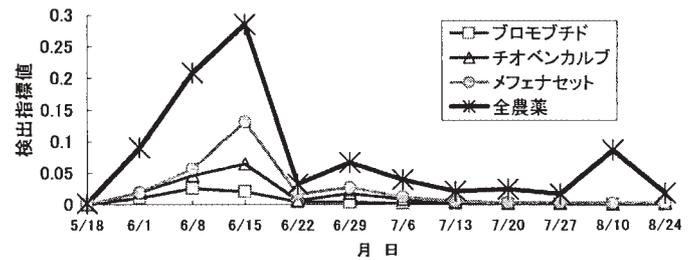


図2 相模川から検出された主な農薬と指標値
検出指標値; Σ (個々の農薬の検出値/目標値)

文献

- 1) 相澤貴子, 嶋田俊夫, 鎌田素之, 西村哲治: 水道における新たな農薬監視体制, 用水と廃水, 46, 582-590 (2004)
- 2) 嶋津治希, 杉田育生, 橋渡健児, 米倉祐司, 高尾健一郎, 広田忠彦: 太田川流域の浄水場における農薬類検出実態と原水中濃度の予想, 水道協会雑誌, 74, 19-27 (2004)
- 3) 水戸部英子, 茨木 剛, 田辺顕子, 川田邦明, 坂井正昭, 貴船育英: 水田地域を流域とする河川水中における農薬濃度の変動, 環境化学, 9, 311-320 (1999)
- 4) 近藤秀治, 福山龍次, 劉 愛民: 石狩川水系における農薬の多成分同時分析とその季節的変動, 環境化学, 11, 253-266 (2001)
- 5) 神奈川県企業庁水道局浄水課編: “平成14年度県営水道の水質”, 寒川浄水場原水および浄水中の農薬調査(平成14年), 424-429 (2002)

短報

ホルムアルデヒド標準液 (メタノール溶液)のアンフル封入 保存の問題点

岩淵真樹, 長谷川一夫

Problems of the Preservation of Glass Ampoule for Formaldehyde Standard Solution (Methanol Solution)

Masaki IWABUCHI and Kazuo HASEGAWA

はじめに

現在, 水道水の水質検査用の標準原液の多くはアンフルの形態で市販されている。我々は分析方法の迅速化, 使用溶媒の低減化及び内部精度管理の向上等のために, いくつかの測定項目について希釈標準液をアンフルで保存して使用する方法を採用している。今回飲料水中のホルムアルデヒドを分析するために, 市販ホルムアルデヒド標準液(1,000mg/lメタノール溶液)をメタノールで希釈してから, アンフルに小分け, 封入して保存した標準液(10及び1mg/lメタノール溶液)を開封して検量線を作成したところ, 適正な値が得られないことを経験した。そこで, この原因等について検討したので報告する。

方法

1. 試薬, 標準原液及び標準液

メタノールとアセトンは和光純薬工業株式会社残留農薬測定用を, アセトニトリルは同社高速液体クロマトグラフ用を, n-プロピルアルコールとエタノールは同社試薬特級を, イソプロピルアルコールは同社精密分析用を, ヘキサンは同社残留農薬・PCB試験用をそれぞれ用いた。o-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシアミン(PFBOA)塩酸塩は和光純薬工業株式会社水質試験用を, ホルマリン及びアセチルアセトン同社試薬特級をそれぞれ用いた。ブランク水はエビアン(カルピス伊藤忠ミネラルウォーター株式会社)を使用した。精製水は逆浸透, イオン交換及び活性炭による処理により得られた水を用いた。

内部標準液として, 1-クロロデカン(1,000mg/lヘキサン溶液)(関東化学株式会社水質試験用)をヘキサンで希釈して1mg/lヘキサン溶液にして使用した。

ホルムアルデヒド標準液は, 以下の3種のものを使用した。PFBOA-ホルムアルデヒド標準液はPFBOA-ホルムアルデヒド標準原液(100ppmヘキサン溶液)(林純薬工業株式会社)をヘキサンで希釈してホルムアルデヒド濃度として1mg/lとした。ホルムアルデヒド標準液(10mg/l及び1,000mg/lアセトニトリル溶液)は生活用品試験法のホルムアルデヒド試験¹⁾に準じてホルマリンを水のかわりにアセトニトリルで希釈して調製した。ホルムアルデヒド標準液(100mg/l水溶液)はホルムアルデヒド標準原液(1,000mg/lメタノール溶液)(和光純薬工業株式会社水質試験用)を精製水で希釈して調製した。

2. 保存容器

アンフル管は, アズワン株式会社製の容量1ml褐色のものを, 標準試薬保存容器は, 有限会社桐山製作所製の容量100ml二重栓付き透明ガラスのものを使用した。

3. 装置

ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)はAgilent社製ガスクロマトグラフ(HP6890)に同社製質量分析装置(HP5973)を装備したものをを用いた。分光光度計は島津製作所製紫外可視分光光度計UVmini-1240を用いた。

4. 分析操作

4. 1 GC/MSによるホルムアルデヒド濃度の測定

4. 1. 1 試験溶液の調製

以下の(1)から(4)のとおり各溶媒をアンフルに封入し, その後開封して, 溶媒を(1), (2)は200 μ l, (3), (4)は500 μ l, 共栓試験管に採取したブランク水50mlに添加し, 水道水中のホルムアルデヒドの測定法²⁾に従ってヘキサンで抽出してGC/MS用試験溶液を調製した。

(1)メタノールを室温で10本のアンフルに調製者A, Bが各5本ずつそれぞれ約1ml採取して, バーナーで封入した。

(2)アンフルにメタノール約1ml採取して, 水中5分間冷却後バーナーを用いて封入した。

(3)あらかじめ常圧下及び減圧下でアンフル内の空気をアルゴン置換させてから, メタノールをそれぞれアンフルに約1ml採取してバーナーで封入した。

(4)メタノールにかえて, アセトニトリル, n-プロピルアルコール, イソプロピルアルコール, エタノール及びアセトンを, 室温でアンフルに約1mlずつ採取してバーナーで封入した。

4. 1. 2 GC/MSによる定量方法

GC/MS用試験溶液1 μ lをGC/MSに注入し, 内部標準法により定量した²⁾。検量線作成には, PFBOA-

表1 メタノールのアンプル封入によるホルムアルデヒド生成量

調製者	生成濃度 (mg/l)						変動係数 (%)	全体の平均 (mg/l)	全体の変動係数 (%)
	1本目	2本目	3本目	4本目	5本目	平均			
A	1.88	1.71	3.11	1.60	3.80	2.42	40.6	3.49	60.6
B	2.88	6.33	2.53	8.10	3.01	4.57	54.8		

※アンプル封入り前メタノール中のホルムアルデヒド濃度は0.3mg/l未満であった

ホルムアルデヒド標準液をヘキサンで希釈してホルムアルデヒド濃度として各0.01, 0.02, 0.1, 0.4mg/lにして使用した。GC/MS測定は以下の条件で行った。

カラム：DB-1(30m×0.25mm, 膜厚0.25 μ m, J&W社製)

カラム温度：50℃(1min)—5℃/min—130℃

キャリアガス：ヘリウム(1.0ml/min)

注入口温度：250℃

注入方法：スプリットレス注入

モニターイオン(M/Z):1-クロロデカン (91, 105),
ホルムアルデヒド(181, 195)

4. 2 吸光度法によるホルムアルデヒド濃度の測定

4. 2. 1 試験溶液の調製

ホルムアルデヒド標準液(10mg/lアセトニトリル溶液)を標準試薬保存容器に入れたものとアンプル封入したものを、それぞれ冷蔵および冷凍の条件で保存し、吸光度測定用試験溶液①とした。

また、ホルムアルデヒド標準液(1,000mg/lアセトニトリル溶液)をアンプル封入操作したアセトニトリルと試薬ビン中のアセトニトリルを使ってそれぞれ100倍希釈したものを吸光度測定用試験溶液②とした。

4. 2. 2 吸光度の測定方法

吸光度測定用試験溶液①及び②を精製水で2.5倍希釈した後、アセチルアセトン法¹⁾によりそれぞれの吸光度を吸収波長413nmで測定した。なお、吸光度の信頼性を確保するためにホルムアルデヒド標準液(100mg/l水溶液)を2ml採取しアセトニトリルを20ml添加した後、精製水で50mlにしたものの吸光度を吸収波長413nmで測定した。

結果及び考察

1. 室温でのメタノールのアンプル封入

アンプル封入前のメタノール中のホルムアルデヒド濃

度は、0.3mg/l未満であったが、室温でアンプル封入したメタノールからは、表1のとおりホルムアルデヒドがAの調製者で平均2.42mg/l、Bの調製者で平均4.57mg/l、最高8.10mg/lで調製者間の差が大きかった。また、変動係数はそれぞれ40.6、54.8%で共に大きかった。ホルムアルデヒドはメタノールと空気中の酸素の反応で生成することが知られている³⁾。今回の実験でのメタノールからのホルムアルデヒドの生成率は約0.00016~0.00081 w/v%であるが、生成濃度では我々が使用しているホルムアルデヒド標準液濃度10mg/l及び1mg/lと同程度であった。したがって、アンプル保存したホルムアルデヒドのメタノール標準液から適正な検量線が得られなかったのは、アンプル封入によりメタノールからホルムアルデヒドが生成されたことが原因と思われる。

2. 種々の条件下でのメタノールのアンプル封入

メタノールからのホルムアルデヒドの生成を低減させるために、アンプルを冷却してメタノールを封入した時と、常圧下及び減圧下で空気をアルゴン置換してメタノールを封入した時のそれぞれのホルムアルデヒド濃度は、表2のとおりであった。室温封入と比較して生成量及びばらつきはともに小さくなったが、平均値は0.97~

表2 メタノールを種々の条件でアンプル封入した時のホルムアルデヒド生成量

条件	最大値 (mg/l)	最小値 (mg/l)	平均値 (mg/l)	変動係数 (%)
冷却 (n=10)	1.51	0.80	1.09	20.6
常圧下アルゴン置換 (n=14)	1.64	0.46	0.97	28.7
減圧下アルゴン置換 (n=3)	1.98	1.59	1.84	11.8

1.84mg/lであり、冷却及び空気をアルゴン置換してもアンプル封入保存する標準液（10及び1mg/l）の調製には適さないことがわかった。

3. 他の溶媒のアンプル封入

表3にメタノールを他の溶媒にかえた場合の、封入前と封入後アンプルを開封した時の各溶媒中のホルムアルデヒド濃度を示した。アセトン及びアセトニトリル以外

表3 メタノール以外の溶媒のアンプル封入によるホルムアルデヒド生成量

溶媒	ホルムアルデヒド(mg/l)	
	封入前 (n=1)	封入後 (n=3)
アセトニトリル	<0.1	<0.1
n-プロピルアルコール	0.2	0.3
イソプロピルアルコール	<0.1	0.2
エタノール	<0.1	0.4
アセトン	<0.1	<0.1

は、アンプルに封入することでホルムアルデヒドが0.2～0.4mg/l検出された。アセトンはPFBOAとの反応生成物である非常に大きなピークがクロマト上に認められ、質量分析装置に悪影響を及ぼす。さらに、PFBOAがアセトンとすべて反応して、ホルムアルデヒドを誘導体化できなくなるので、希釈溶媒には適さない。したがって、今回の結果からはホルムアルデヒドの希釈溶媒としてアセトニトリルが使用できる可能性が考えられた。

4. ホルムアルデヒド標準液（アセトニトリル溶液）の保存

ホルムアルデヒド標準液（10mg/lアセトニトリル溶液）を標準試薬保存容器とアンプルに移し、アンプルは封入後それぞれ冷蔵保存と冷凍保存した場合の経時変化を吸光度で測定した。調製直前の吸光度を相対濃度100

%とした経時変化を図1に示した。冷蔵、冷凍とも標準試薬保存容器で保存すると2ヶ月にわたって相対濃度の変化がみられなかったがアンプル封入保存では、調製直後に約10%相対濃度が低下した。したがって、アセトニトリルもアンプル封入には適さないと思われる。

5. ホルムアルデヒド標準液（アセトニトリル溶液）のアンプル封入による吸光度減少の検討

ホルムアルデヒド標準液（アセトニトリル溶液）のアンプル封入によりホルムアルデヒドの吸光度が減少する原因が、加熱によってホルムアルデヒドが直接分解するのか、ホルムアルデヒドもしくはアセトニトリルの加熱生成物がホルムアルデヒドの分解に関与しているのかを調べるため以下の試験を行った。ホルムアルデヒド標準液（1,000mg/lアセトニトリル）を希釈して10mg/lにする際に、アンプル封入操作をしたアセトニトリルと試薬ビン中のアセトニトリルを使ってできた標準液の吸光度を比較した結果を表4に示した。アンプル封入操作を行ったアセトニトリルで希釈した場合は試薬ビン中のアセトニトリルより約2%低いという結果であった。更にt検定してみると両者の平均値に5%水準で有意差が認められた。上村らは、アンプル中で保管されたチウラムのアセトニトリル溶液の濃度がアセトニトリルから生じた加熱生成物とチウラムの反応により急激に低下すると報告している⁴⁾。今回の実験においてもアンプル封入時の加熱によって、アセトニトリルから生じた加熱生成物がホルムアルデヒドと反応し、ホルムアルデヒドの吸光度が減少した可能性が推定される。

メタノールはアンプル封入すると加熱生成物であるホルムアルデヒドが生成し、ホルムアルデヒド濃度が増加した。アセトニトリルはアンプル封入するとホルムアルデヒド濃度が減少した。他の溶媒についてもアンプル封

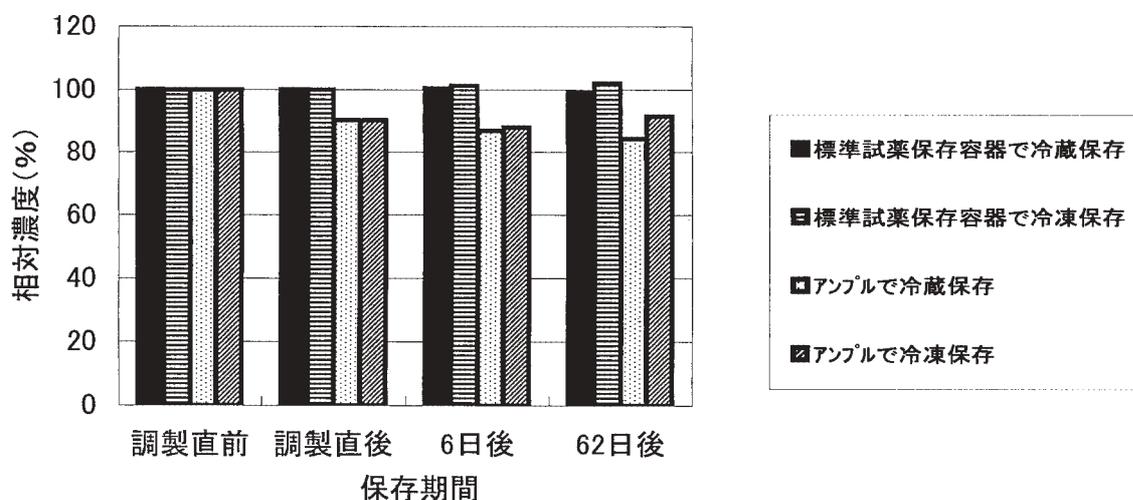


図1 保存形態別相対濃度の経時変化

表 4 アンブル封入及び試薬ビン中のアセトニトリルにより調製したホルムアルデヒド標準液の吸光度の比較

試料No	アンブル封入したアセトニトリルで調製	試薬ビン中のアセトニトリルで調製
1	0.520	0.524
2	0.521	0.523
3	0.524	0.525
4	0.517	0.525
5	0.503	0.525
6	0.515	0.529
7	0.507	0.527
平均値	0.515	0.526
SD	0.0075	0.0019

入により目的とする物質の濃度を変化させる可能性が考えられる。したがって、アンブル封入を行う場合はこれらのことを十分に考慮することが必要と思われる。

まとめ

ホルムアルデヒドのメタノール標準液を希釈するための溶媒としてメタノールをアンブル封入すると、封入時にメタノールが酸化されてホルムアルデヒドが生成された。

アンブルを氷冷もしくはアルゴン置換しても、室温封入に比べて低濃度であるが、ホルムアルデヒドが生成さ

れたことから、メタノールは標準液濃度（10及び1mg/l）の調製には適さないことが明らかになった。

メタノール以外について、ホルムアルデヒドの希釈溶媒を検討したところ、アセトン及びアセトニトリルはホルムアルデヒドを生成しなかった。しかし、アセトンはPFOAと反応し、消費してしまうので希釈溶媒には適さない。

ホルムアルデヒド標準液（10mg/lアセトニトリル溶液）は、アンブル封入時にホルムアルデヒドの吸光度が低下したのでアセトニトリルもアンブル封入保存するための希釈溶媒には適さないことが明らかになった。

（平成18年7月20日受理）

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2000, pp.611, 金原出版, 東京(2000)
- 2) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法について, 厚生労働省告示第261号, 平成15年7月22日
- 3) 長倉三郎ほか:理化学辞典, 第5版, pp.1325-1326, 岩波書店, 東京(1998)
- 4) 上村 仁, 伊藤伸一:チウラム標準液保存時の濃度減少について, 水道協会雑誌, 72(4), 34-37(2003)

短 報

食事から摂取する人工放射性核種 および微量元素濃度について

飯島育代¹, 高城裕之², 戸村健児³

Concentration of Artificial Radionuclides and Trace Elements in Daily Intakes

Ikuyo IJIMA¹, Hiroyuki TAKAGI²
and Kenji TOMURA³

はじめに

我々は全国的に実施されている環境放射能水準調査の一環として、陰膳方式による、成人の日常食（1日に摂取する食事・間食・飲み物等）中の人工放射性核種濃度の調査を継続して実施している。また、環境中の放射性核種の挙動を推定する上で、自然界の大部分を占める非放射性の安定元素の挙動は大きなファクターと考えられ、関心が高く、環境中の安定元素の挙動を把握するための試みがいくなされてきている^{1),2)}。そこで、神奈川県内の日常食中の放射性核種分析結果および、一部試料について実施した安定元素分析結果から、県内在住成人が食事からどの程度放射性核種および安定元素を摂取しているか、また、放射性核種、安定元素と献立に使用された食材との関連性、および放射性核種と安定元素との濃度の関連性等について検討したので報告する。

実 験

1 試料

神奈川県平塚保健所管内（平塚市、中郡大磯町、同二宮町、以下平塚地区と称する）在住の成人5名および横浜市港南区（以下、横浜地区と称する）在住の成人5名の1日食事分を夏季、冬季の年2回、陰膳方式により、簡単な一日の献立表とともに採取した。試料は文部科学省

監修の放射能測定シリーズ16「環境試料採取法」に準じ、磁製皿に分取し、105℃で1昼夜乾燥後、電気炉で24時間で灰化した。5人分の灰化物をよく混ぜ合わせ、1試料とした。

2 核種分析

灰化物試料をスチロール樹脂製容器（U-8容器）に詰め、 γ 線スペクトロメトリーにより、放射性核種の定量を行った。

3 安定元素の分析

核種分析を行った灰化物試料の内、1990年～1994年までの5年間の平塚地区、横浜地区の計20試料について、それぞれ約100mgを分取して精秤し、ポリエチレン袋に密封して中性子放射化用試料とした。比較標準試料として、和光純薬製原子吸光測定用標準試料を東洋アドヴァンテックNo.7ろ紙に吸着させたもの、及び精度管理のため標準試料として、国立環境研究所頒布のCRM, No.1 PEPPERBUSH, および米国NIST製のSRM1571, ORCHARD LEAVESを約300mg精秤し、それぞれポリエチレン袋に密封した。

4 安定元素の中性子照射条件

立教大学原子力研究所のTRIGA II型原子炉で、短半減期核種は1試料ごとにf孔で1分中性子照射した。中・長半減期核種はポリエチレン袋に封入した灰化物、比較標準試料、精度管理用試料を一緒に収納した、ポリエチレン製のカプセルを回転試料棚に入れ、6時間中性子照射した。

5 装置

人工放射性核種および中性子放射化により生成した中・長半減期核種は、OXFORD社製Ge半導体検出器をOXFORD社製MCA（マルチポート）に接続して計測し、同社製解析プログラム（ガンマトラックまたはAssayer）を用いて定量した。中性子放射化により生成した短半減期核種は、ORTEC社製Ge半導体検出器をセイコーM7800型マルチチャンネルアナライザー（MCA）に接続し、同社の解析プログラムを用いて定量を行った。

6 計測時間

人工放射性核種は80000～100000秒計測した。中性子放射化後に生成した短半減期核種は5分間、中半減期核種は照射後、約1週間程度放置後10000～50000秒、長半減期核種は中半減期核種の減衰のため、約1ヶ月放置後、80000秒計測した。

結果と考察

1 食事から摂取した放射性核種濃度の推移

神奈川県の日常食試料から検出された放射性核種は、人工放射性核種のセシウム-137(Cs-137)、セシウム-134(Cs-134)、ストロンチウム-90 (Sr-90)、天然放射性核

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 神奈川県衛生研究所地域調査部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
3 立教大学原子力研究所
〒240-0101 横須賀市長坂2-5-1

種のカリウム-40 (K-40) 等である³⁾。我々は1984年からガンマ線スペクトロメトリーによる日常食の核種分析を開始した。2005年までの日常食中のCs-137の濃度推移を図1に示した。Cs-137は1986年に旧ソビエト連邦キエフ市郊外にあるチェルノブイリ原子力発電所4号炉で原子炉事故が発生したため、日常食中の濃度が上昇したことがわかる。その後は濃度の小幅な上昇下降が認められる

図1に示すように、近年の神奈川県の日常食のCs-137摂取量は杉山⁵⁾が実施した国内におけるマーケットバスケット方式によるトータルダイエツト試料のCs-137摂取量(0.012<0.077Bq/日)とほぼ同じレベルである。なお、横浜地区の日常食調査は2003年度以降は国の環境放射能水準調査委託実施計画からはずれたため実施していない。

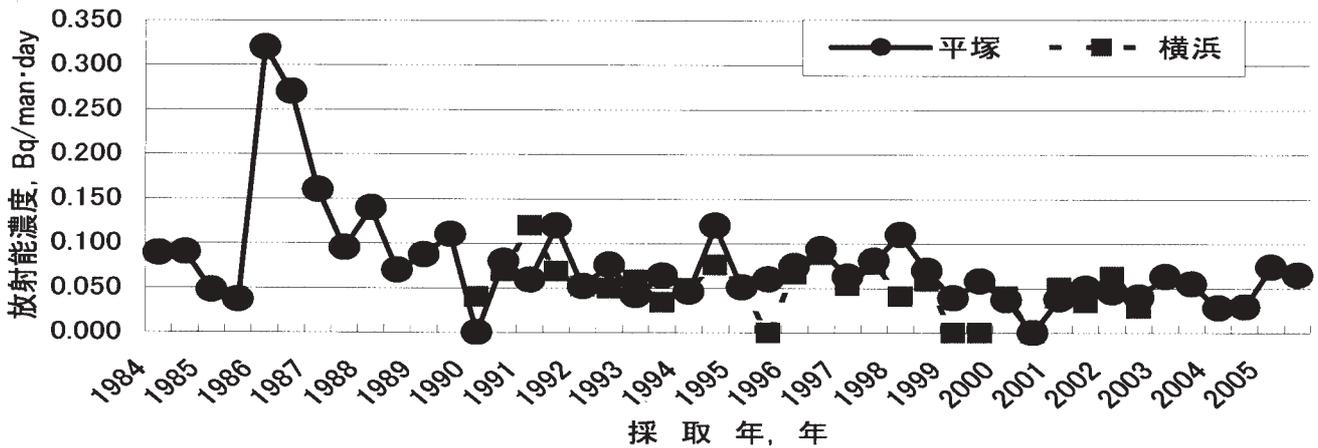


図1 日常食からのCs-137摂取量

が、徐々に減少していった。大気中核実験時に成層圏にまで上昇し滞留している放射性物質の降下が現在もあり、ここ数年のCs-137濃度の減衰傾向は停滞している。日本の人工放射性核種の多くは、中華人民共和国が実施した大気中核実験が供給源となっている核分裂生成物である⁴⁾。Cs-134は核分裂ではなく、稼働中の原子炉内で中性子によって放射化されて生成し、炉内に蓄積している放射性核種である。チェルノブイリ原子力発電所事故時に原子炉の火災爆発により、環境中に放出された。半減期が約2年と短いため、我々の調査では、事故直後は様々な食品や環境試料から検出されたが、日常食試料からは、1986年7月実施分より0.12Bq/人日検出されたのみで、同年冬の日常食調査では検出されなかった。Sr-90の分析は各自治体が採取した試料について財団法人日本分析センターが実施し、報告している³⁾。

2 安定元素摂取量

1990年から1994年までの5年間の平塚地区、横浜地区の日常食各10試料について中性子放射化分析法により安定元素濃度を定量した。1試料につき5名の協力者で、年2回、県内2カ所採取のため、延べ100人の協力者が対象となった。5年間の年齢構成は図2に示すとおり、横浜地区の方が全般的に若年である。平均年齢は横浜地区が42.1才±5.3才、平塚地区が52.4才±5.8才であった。また、

今回我々が元素分析を実施した1990年～1994年までの5年間についての神奈川県の日常食のCs-137摂取量は平均0.040Bq/人日で、同時期の全国の平均値0.061Bq/人日³⁾より十分低い。同じく5年間の日常食のCs-137摂取量の中央値も0.030Bq/人日と、全国の中央値0.050Bq/人日³⁾を下回った。この5年間の全国の最大値は日本海側の高緯度地域で、0.34Bq/人日であった³⁾。この地域は気象学的に中国の大気中核実験由来の放射性降下物が多い事が知られており、日常食にも影響が現れている。

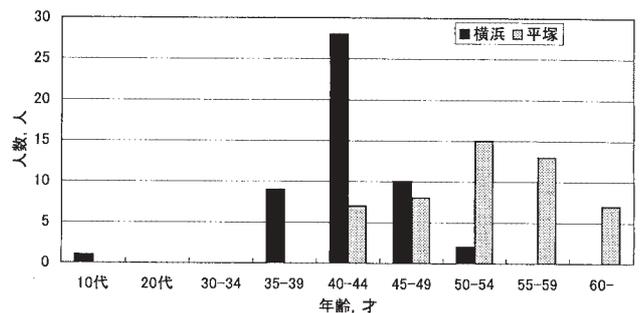


図2 提供者の年齢構成

1日食事摂取量は表1の通り、水を含め、平塚地区が平均2.05kg、横浜地区が1.81kgと、平均年齢が高い平塚地区の方が多かった。これは、横浜地区の協力者がサラリーマン家庭であるのに対し、平塚地区の協力者に肉体労働に従事している農家の主婦が含まれていることに起因すると考えられる。「日本人の食事摂取基準(2005年版)」

表1 試料提供者の1日食事摂取量

	単位: kg	
	平塚地区	横浜地区
提供者数	50人	50人
最小	1.174	1.264
最大	3.089	2.683
平均	2.053	1.808
SD	0.405	0.345
変動係数, %	19.75	19.08

として厚生労働省が数種のミネラル・微量元素について、平成17年から平成21年までの5年間に用いる1人当たりの1日摂取基準値を定めている。我々はその元素類について、食事からの1人当たりの1日摂取量を求め、前述の基準値と共に地区別に表2に示した。元素の分類は前述の基準に準じた。マグネシウム(Mg)、カルシウム(Ca)は基準値より若干低めであった。ナトリウム(Na)および食塩としての記載がある塩素(Cl)は、両地区とも日標量を下回っており、食塩を控えていることが伺える。なお、Clは食塩摂取基準値から換算して求めた。カリウ

表3 五訂食品成分表における主な食品分類

食品群番号	分類名	主な食品名
1	穀類	こむぎ、パン類、めん類、こめなど
2	いも及び でんぷん類	さつまいも、さといも、じゃがいも、こんにやく、でんぷん類、はるさめなど
3	砂糖及び 甘味類	砂糖類、はちみつ、メープルシロップなど
4	豆類	いんげん豆、大豆、豆腐類、納豆類、豆乳、湯葉など
5	糧食類	アーモンド、ぎんなん、くり、ごま、らっかせい、ピーナッツバターなど
6	野菜類	きゅうり、だいごん、たまねぎ、なす、にんじん、ピーマン、ほうれんそうなど
7	果実類	うめ、梅干し、みかん、かき、りんご、なし、もも、ぶどうなど
8	きのこ類	えのきたけ、さくらげ、しいたけ、しめじ類、ひらたけ類、まつたけなど
9	藻類	あおのり、あまのり、こんぶ類、ひじき、わかめなど
10	魚介類	魚類、貝類、えび・かに類、いか・たこ類、水産練り製品など
11	肉類	うし、ぶた、ハム類、ベーコン類、ソーセージ類、にわとり、かえる、はちなど
12	卵類	うずら卵、鶏卵類、卵豆腐、たまご焼きなど
13	乳類	生乳、加工乳、粉乳類、植物性脂肪、チーズ類、アイスクリームなど
14	油脂類	ごま油、大豆油、顔合油、牛脂、バター類、マーガリン類など
15	菓子類	和菓子類、菓子パン類、ケーキ、デザート菓子、チョコレートなど
16	嗜好飲料類	アルコール飲料、茶類、コーヒー・ココア類、昆布茶、炭酸飲料類など
17	調味料及び 香辛料類	食塩類、食酢類、だし類、マヨネーズ、醤油、みそ類、コショウなど
18	調理加工 食品類	レトルトカレー、冷凍きゅうぎ、冷凍ハンバーグ、冷凍ピラフなど

ム(K)はほぼ目安量に達している。亜鉛(Zn)は試料間のばらつきが小さく、両地区とも摂取基準を満たしていた。鉄(Fe)もほぼ基準値に近かった。いずれも上限量を超えておらず、極端な不足といえる元素もなかった。また、クロム(Cr)を除くとすべて平塚地区の住民の摂取量が高いことがわかった。

3 食材との関連性

5年間の全献立表100枚より、使用された食材を表3の五訂食品成分表に基づいて食品群別に分類した。食品群

表2 日常食中の元素1日摂取量と摂取基準

単位: mg/日

分類	元素名	平塚地区				横浜地区				推定平均必要量	推奨量 ¹	推奨量 ²	目安量 ¹	目安量 ²	目標量 ¹	目標量 ²	上限量 ¹	上限量 ²	高血圧 予防に 望ましい 摂取量	
		平均値	SD	CV%	n	平均値	SD	CV%	n											
ミネラル	Mg	180	81	46.35	7	130	64	48.98	7	240	280	290	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ca	410	110	26.29	10	310	74	23.82	10	-	-	-	600	700	-	600	-	-	2300	-
微量元素	Cr	0.045	0.025	55.51	10	0.060	0.062	103.41	10	0.025	0.030	0.030	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mn	2.1	0.4	17.96	10	1.9	0.77	41.18	10	-	-	-	3.5	3.5	-	-	-	11	11	-
	Fe	8.2	2.8	33.57	10	5.8	1.6	26.80	10	9	10.5	10.5	-	-	-	-	-	40	45	-
	Zn	6.7	0.88	13.12	10	6.1	2.0	32.86	10	6	7	7	-	-	-	-	-	30	30	-
電解質	Na	3000	440	14.79	10	2500	440	17.22	10	600	-	-	-	-	<3100	<3100	-	-	-	-
	Cl ³	4200	610	14.48	10	3500	500	14.19	10	910	-	-	-	-	<4900	<4900	-	-	-	-
	K	1700	320	18.41	10	1400	410	28.82	10	-	-	-	1600	1600	2800	3100	-	-	-	3500

注)1: 30~49才女性の各基準値、2: 50~69才女性の各基準値
3: 食塩相当量から換算した。

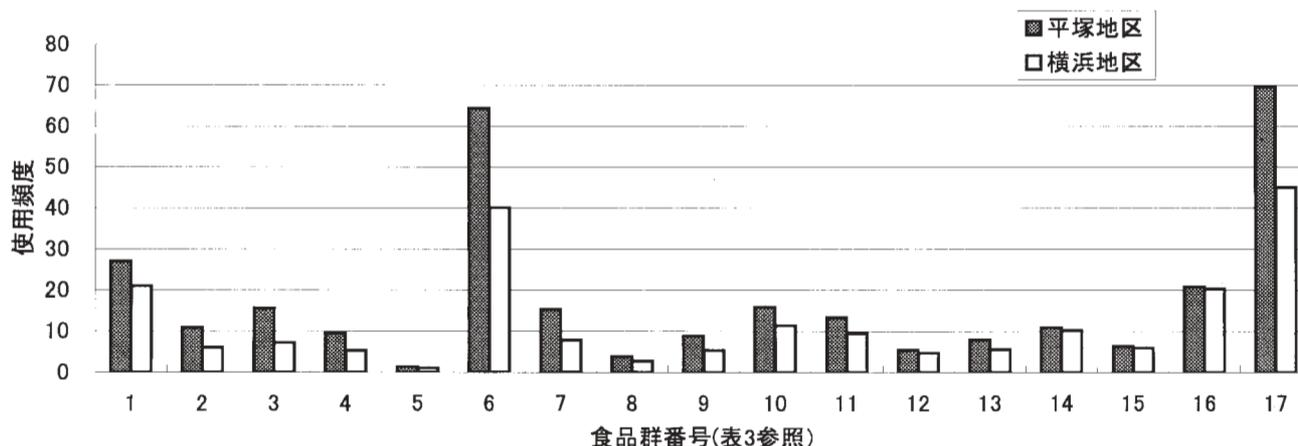


図3 食品群別食材使用頻度

によっては使用頻度が小さいものもあるため、1試料(5人分)あたりの平均食品群別食材数として、地区別に図3に示した。なお18群については、献立表からは判断ができないため除いた。17群には調味料が含まれ、これらはほとんどの献立に出てくるため、横浜、平塚地区とも使用頻度が高かった。次いで、6群の野菜類が両地区とも突出して多いことがわかる。前述の杉山の報告⁵⁾によれば、本研究と食品群の分類方法に違いがあるものの、その他野菜きのこ・海藻類からのCs-137の寄与が高いという結果が出ているが、安定元素摂取量についても、献立中に多用されている6群からの寄与が高いと考えられる。全ての食品群について、横浜地区に比べ、平塚地区は献立中の使用食材数が多い事がわかった。これは同地区の協力者を保健所が主催する食生活改善の会員から選定しているため、日頃の学習成果が献立に反映され、いわゆる「1日30品目」という知識が実際の献立に反映していることが伺える。結果としてミネラル等が基準値に近く、適切に摂取しているものと推測できる。なお、前述の平均一日食事摂取重量は、当時の国民栄養調査結果から求めた重量より少なめであったことが基準値より低めの元素が認められた一因と考えられる。横浜地区では年間を通し、同じ対象者に依頼した。また、調査期間中の対象者の入れ替わりが少なく、延べ50名であるが実数は9名であった。また延べ50名のうち1名は15才の少年が入っている。この1名を除いても横浜地区の協力者は平均年齢が10才近く若いことから、ダイエット効果を望んだ献立を組んだ可能性がある。Crは両地区とも、試料間の変動が非常に大きかったが、何に起因するかは不明である。

4 放射性核種と安定元素との関連

1990年から1994年までの5年間の平塚地区、横浜地区の各10試料についてCs-137と安定元素セシウム(Cs)濃度の関係を調べ、図4に示した。我々のこれまで食品素材別の調査では、脱脂粉乳や魚類などはCs-137との間に正の相関が認められた^{6) 7)}が日常食試料においては両者間の相関は認められなかった。これは、両者の相関が認

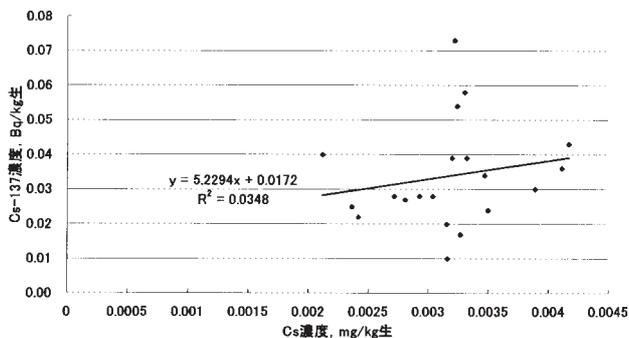


図4 日常食のCsとCs-137の濃度

められているミルクや魚類の日常食に占める割合が低く、他の食材の多くはCs-137と安定Csが平衡に達していない事を示している。

食品中の放射性核種や無機元素については様々なデータがすでにまとめられているが、食事からの摂取量は調理での損失分の見積もり方などで数値が大きく変動する。このため、調理後の日常食の調査は直接的な摂取量を求める上で有用であり、今後も検討を続ける必要がある。

まとめ

神奈川県内の日常食中の放射性核種濃度調査をガンマ線スペクトロメトリーにより実施した。Cs-137は1986年のチェルノブイリ事故時に濃度が増加したが、その後、漸減傾向が見られた。しかし近年では漸減傾向が停滞していることがわかった。1990年～1994年までの5年間の日常食試料について機器放射化分析法により安定元素を定量し、神奈川県内在住の40～60代の女性の無機元素摂取量を求めた。本調査では平塚地区の女性の方が横浜地区に比べ、若干摂取量が大きかった。平塚地区では横浜地区に比べ、野菜類を初め、全ての食品群で食材を多用した献立を組み立てていること、また1日食事摂取量が大きかったためと見られる。日本人の食事摂取基準(2005)と比較すると、ほぼ基準を満たしているかやや少ない傾向が見られた。食塩は両地区とも日標量以下に抑えられていた。上限量を超えているものはなかった。安定CsとCs-137の1日摂取量には相関関係が認められず、多くの食品で、CsとCs-137とは平衡に達していない事が確認された。(平成18年7月20日受理)

文献

- 1) 塚田祥文, 渡部輝久: 保健物理, **31**, (2), 177-183 (1996)
- 2) Tsukada, H. shibata, H. et all.: J. Environ. Radioac., **39**, 149-160 (1998)
- 3) (財) 日本分析センター: 環境放射線データベース <http://search.kankyo-hoshano.go.jp/> より
- 4) 高城裕之, 飯島育代, 小山包博: 神奈川県衛生報告, **22**, 22-28 (1992)
- 5) 杉山英男: 食品の安全性高度化推進事業平成16年度総括・分担研究報告書, 67-96 (2005)
- 6) 飯島育代, 高城裕之, 戸村健児: 第38回理工工における同位元素・放射線研究発表会要旨集, p.4 (2001)
- 7) 飯島育代, 高城裕之, 戸村健児: 第39回理工工学における同位元素・放射線研究発表会要旨集, p.20 (2002)

資料

神奈川県におけるつつが虫病の 発生状況 (平成17年度)

古屋由美子, 片山 丘

Occurrence of Tsutsugamushi Disease in Kanagawa Prefecture (2005)

Yumiko FURUYA and Takashi KATAYAMA

つつが虫病は秋田県, 山形県および新潟県の特定河川流域で夏期にアカツツガムシが媒介する古典的と, 日本各地で春期や秋期に非アカツツガムシが媒介する新型が知られているが, 1951年をピークに1960年代後半には発生数が一桁になりほぼ制圧されたと思われていた。しかし1980年代になり各地で新型つつが虫病患者が再び急増し, 1984年には約1,000名の患者発生に至った。その後患者数は徐々に減少する傾向であったが, 2000年には一時増加がみられた。しかし2003年に全国での患者数は402名と減少し, 2004年は302名, 2005年は325名となり, 減少傾向が続いている。神奈川県でも1990年に112名の患者が報告されたが, その後減少傾向を示し, 1996年, 1997年には9名にまで減少した。しかし1998年より増加傾向に転じ, 1999年35名, 2000年42名の患者が報告されたが, 再び2001年7名, 2002年4名, 2003年5名と減少した。その後2004年には18名に増加し, 2005年も19名であった(図1)。

神奈川県では, 1990年から1992年の3年間に神奈川県希少感染症対策事業として, 県保健予防課, 足柄上保健福祉事務所, 足柄上医師会, 衛生研究所が協力してつつが虫病の検査体制の整備, 地域の医療機関および住民への啓発を行った。このことにより, 従来行っていた immunofluorescence assay (IF) による抗体検査に加え, 1994年より polymerase chain reaction (PCR) によるつつが虫の遺伝子検査および感染株の型別を行い,

医療機関へ迅速に検査結果の報告が行われ, 医療現場への検査・研究の情報還元も行われるようになった。

2005年4月から2006年3月(平成17年度)につつが虫病を疑われた患者は, 足柄上保健福祉事務所管内20例, 秦野保健福祉事務所管内3例, 小田原保健福祉事務所管内2例で合計25例であった。これらの検体について検査結果を表1にまとめた。IFによる急性期・回復期の血清抗体価の上昇(4倍以上の差)および急性期の抗体検出(IgM抗体価が80倍以上)により18例がつつが虫病患者と診断された。また急性期の血液のみの搬入で, 抗体が検出されず, 判定保留となった7例はPCRでもDNAが検出されず, つつが虫病患者ではないと判定された。

IFで陽性であった18例のうち, PCRによる急性期の血液を用いた *Orientia tsutsugamushi* DNAの検出では13例からDNAが検出され, 迅速な診断が可能であった。しかしIFで陽性であった5例でDNAが検出されなかった。急性期ですでに血清抗体価が高い場合は, 血液中のリケッチアが消失しているため, PCRで検出されないこともある。しかし今回, 遺伝子が検出されなかった5例中2例は抗体がなかった。今後このような例に対してもPCRにより遺伝子が検出されるように検討する必要があると思われる。

PCRにより *O. tsutsugamushi* DNAの検出された13例について, 型別用のプライマーを用いたPCRを行い, 神奈川県内で発生しているつつが虫の感染株について検索を行った(表1)。この結果, 今回県内で感染が見られた株は, Karp, Kawasaki および Kuroki の3株であり, それぞれ1例(7.7%), 10例(76.9%) および2例(15.4%)であり, その大部分がKawasaki株による感染であることが判明した。検体番号2005-20のようにIFでの血清抗体価からKuroki株の感染と推察されたが, PCRではKarp株に型別される検体が認められた。IFでは株特異抗体が検出され, 感染株が推察されるものがほとんどであるが, このように回復期血清がなかった場合にはPCRによる型別が有効であると考えられた。しかしIFとPCRによる結果が一致しなかった例では, 従来の感染株とは異なる株の可能性も考えられ, 今後詳細な遺伝子解析を行う必要があると思われる。

これらのつつが虫病と確定診断された患者より聞き取り調査で得られた感染推定場所は, 足柄上郡山北町に集中しており過去の発生状況と同じであった。

つつが虫病患者の発生時期は10月から12月がほとんどで, 11月がおおよそ80%を占めていた。また感染時の行動は, 山地の畑での農作業が多く, 次に山菜取りなどの山作業や平地での畑, 田圃などでの農作業となっており, 日常生活での感染の機会が多かった。

つつが虫病は適切な薬剤投与により完治する病気であるが、適切な治療が行われないと死亡する例もあり、早期に確定診断することが重要である。今後も迅速に診断可能なPCRとIFによる抗体検出を併用し、つつが虫病の診断をより確実にする必要があると思われた。

最後になりましたが、患者情報の収集に御協力いただきました各医療機関の先生方に深謝いたします。さらに衛生研究所への迅速な検体輸送に御尽力いただきました各保健福祉事務所、県健康増進課の方々に深謝いたします。
(平成18年7月20日受理)

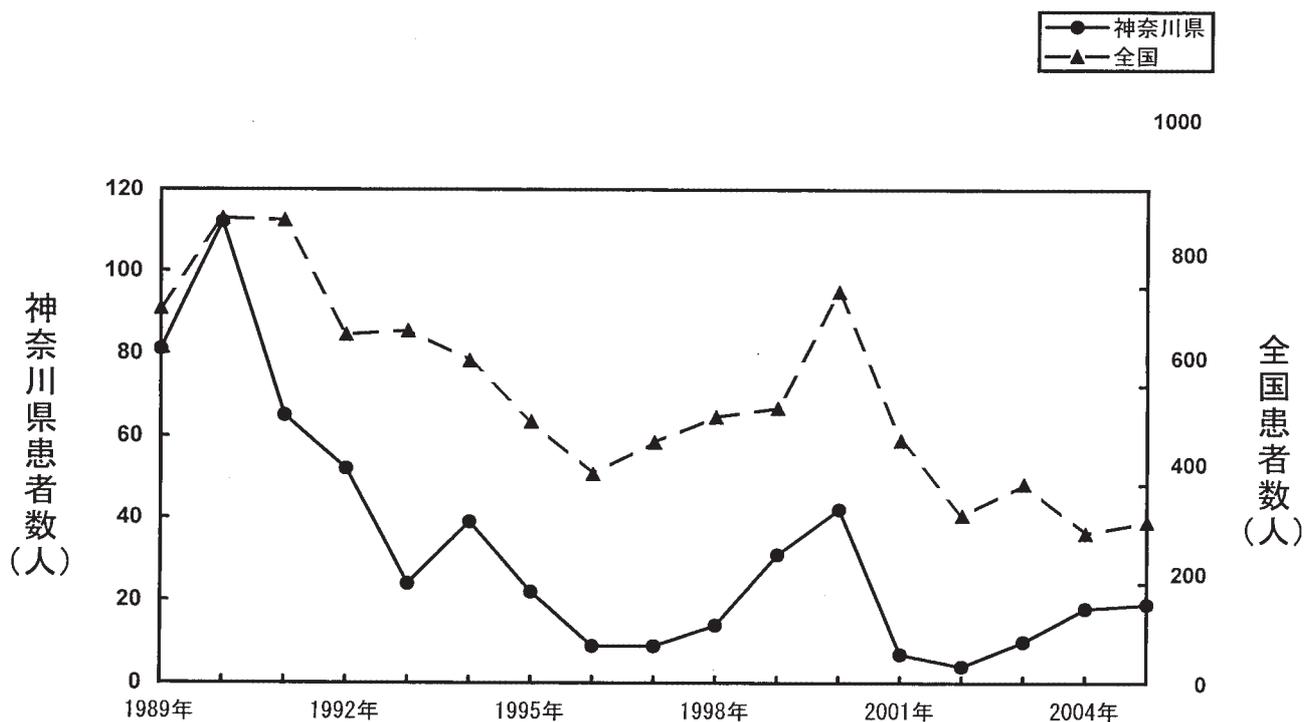


図1 つつが虫病患者発生状況

表1 つつが虫病を疑われた患者のIFとPCRによる検査結果

検体番号	性別	年齢	採血日	Gilliam		Karp		Kato		Kawasaki		Kuroki		IF判定	PCR結果	総合判定
				IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG			
2005-1	男	24	2005.5.10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2005-2	男		2005.5.19	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2005-3	男	53	2005.9.21	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2005-4	男	59	2005.10.31	20	40	20	<10	20	20	<10	<10	40	40	陽性	陽性(Kr)	陽性
			2005.11.7	1280	1280	1280	1280	1280	1280	640	80	5120	1280			
2005-5	女	50	2005.11.2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.11.16	320	160	10	160	20	160	2560	640	10	160			
2005-6	男	71	2005.11.7	20	<10	10	<10	10	<10	20	<10	10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.12.5	1280	320	40	80	80	160	2560	640	80	160			
2005-7	男	46	2005.11.5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.11.19	640	160	640	<10	320	<10	2560	320	640	<10			
2005-8	男	72	2005.11.7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kr)	陽性
			2005.11.21	40	160	40	320	40	320	40	20	320	320			
2005-9	男	65	2005.11.9	80	<10	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.11.15	2560	320	80	80	80	80	5120	320	80	20			
2005-10	男	70	2005.11.9	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.11.22	320	320	80	80	160	160	2560	640	160	40			
2005-11	男	64	2005.11.10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.11.23	320	80	20	40	40	40	320	320	40	40			
2005-12	女	65	2005.11.15	640	640	640	320	640	320	1280	2560	640	160	陽性(Kw)	陰性	陽性
			2005.11.30	640	320	640	320	640	320	1280	1280	640	320			
2005-13	女	72	2005.11.16	80	<10	10	<10	160	<10	320	<10	160	<10	陽性(Kw)	陰性	陽性
			2005.11.30	5120	320	160	320	640	320	10240	2560	320	320			
2005-14	女	80	2005.11.17	640	<10	<10	<10	20	<10	1280	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.11.30	320	320	320	320	320	320	1280	640	320	320			
2005-15	男	72	2005.11.21	<10	40	<10	20	160	40	<10	<10	1280	320	陽性(Kr)	陰性	陽性
			2005.12.4	640	640	80	80	640	320	160	40	2560	1280			
2005-16	女	47	2005.11.19	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
			2005.11.22	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性
2005-18	男	54	2005.11.24	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.12.6	640	160	40	80	320	320	5120	640	40	160			
2005-19	女	75	2005.11.25	5120	80	<10	<10	10	80	10240	80	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.12.9	2560	640	320	320	320	320	10240	2560	160	320			
2005-20	女	64	2005.11.25	80	20	80	20	40	40	<10	10	160	160	陽性	陽性(Kp)	陽性
2005-21	男	55	2005.11.28	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性(Kr)	陰性	陽性
			2005.12.6	320	40	160	40	320	40	40	20	1280	80			
2005-22	男	67	2005.11.28	640	160	80	80	160	160	1280	160	80	160	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2005.12.12	5120	640	640	640	640	640	10240	5120	1280	320			
2005-23	男	62	2005.11.28	10	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	<10	陽性(Kw)	陰性	陽性
			2005.12.12	1280	320	1280	320	1280	160	2560	640	1280	320			
2005-24	男	41	2005.12.26	<10	20	<10	20	<10	20	<10	20	<10	20	保留	陰性	陰性
2005-25	女	26	2006.3.17	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性

Kr: Kuroki株, Kw: Kawasaki株, Kp: Karp株

資料

神奈川県における ウイルス性集団胃腸炎の発生状況 (平成17年度)

宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子

Occurrence of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (2005)

Kayoko MIYAHARA, Takashi KATAYAMA
and Yumiko FURUYA

ウイルスによる集団胃腸炎は、主に食品を介する食中毒やヒトからヒトへ伝播する感染性胃腸炎として発生している。その原因ウイルスには、ノロウイルスをはじめサポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスなどがある。特にノロウイルスは、平成16年の全国食中毒発生状況をみると、病因物質別食中毒事件数が277件でカンピロバクターの558件に次いで第2位でありながら、患者数は12,537名で第2位のサルモネラ属菌3,788名に比べ3倍以上で第1位となっている。さらに平成16年度冬季には高齢者施設における集団感染の急増など、大規模な集団発生が問題となっている。我々は集団発生時の感染拡大を防止するために、原因ウイルスや感染源の早期解明を目的とした検査および調査を実施している。そこで平成17年4月から平成18年3月にかけて、神奈川県域で発生した集団胃腸炎事例の原因ウイルス検出状況について報告する。

平成17年度にウイルス検査を行った集団胃腸炎事例は72事例で、検体数は便606検体、吐物4検体、食品15検体の625検体であった。検査方法について、ノロウイルスは定量PCR、サポウイルスとC群ロタウイルスは逆転写PCR、A群ロタウイルスは酵素抗体法を用いた。電子顕微鏡観察は、原因ウイルスを広く迅速に検索するため有症者の検体を中心に行った。72事例のうち45事例の便257検体および吐物1検体からウイルスが検出され、食品からは検出されなかった。そのうち食中毒と判定されたものが8事例(表1)、感染性胃腸炎と判定されたものが

17事例(表2)であった。その他の20事例は、有症苦情が10事例、他の自治体からの関連調査が10事例であり、検出されたウイルスは有症苦情の1事例がA群ロタウイルスで、それ以外は全てノロウイルスであった。

食中毒事例で検出された原因ウイルスは全てノロウイルスであり、電子顕微鏡観察においても、これらの事例の患者便26検体および調理従事者便3検体から小型球形ウイルス粒子を検出することができた(表1, 図1)。

食中毒8事例から原因として検出されたノロウイルスのgenogroupはGⅡが5事例(62.5%)で半数以上を占め、次いでGⅠが2事例(25.0%)、GⅠとGⅡの両方が検出された事例は1事例(12.5%)であった。事例番号7では患者便からGⅡのみが検出されGⅡによる食中毒と推定されたが、調理従事者便からはGⅠのみ、GⅠとGⅡの重複、GⅡのみが検出された。聞き取り調査の結果、調理従事者は1週間ほど前に生カキを摂食していたためにGⅠとGⅡが混在して検出され、患者便と調理従事者便のgenogroupに不一致が生じたと考えられた。また、事例番号8では患者便からGⅠのみ、GⅠとGⅡの重複、GⅡのみが検出され、疫学調査より原因食品が生カキと推定された。このように事例番号7, 8では、生カキを摂食した調理従事者や患者より複数のgenogroupが検出されたことから、摂食した生カキが数種類のノロウイルスに汚染されていたと推測された。

食中毒の原因食品については、生カキと推定されたこの1事例以外不明であった。しかし、原因食品が不明であった7事例全てにおいて、調理従事者便よりノロウイルスが検出されたことから、調理従事者による二次汚染が原因で食中毒が発生した可能性も考えられた。これら調理従事者の大部分は聞き取り調査で「症状がない」と回答しており、不顕性感染の可能性も含め、自己の健康管理および手洗いの励行や調理用手袋着用など食中毒予防に対するさらなる注意が必要である。また、事例番号7にみられるように、調理従事者は生カキの摂食を控える等の対策も重要であると考えられた。

感染性胃腸炎17事例で検出された原因ウイルスは、ノロウイルスが12事例、サポウイルスが2事例、A群ロタウイルスが2事例、C群ロタウイルスが1事例であった(表2, 図2, 3)。事例番号1はサポウイルスが原因であったが、調理従事者便1検体からノロウイルスGⅠが検出された。また、事例番号16ではノロウイルスGⅡが原因であったが、症状のある施設職員便1検体からA群ロタウイルスが検出された。この2事例からそれぞれ検出されたノロウイルス、A群ロタウイルスは疫学調査の結果、今回発生した集団胃腸炎とは関連がないものと考えられた。ノロウイルスが検出された12事例のgenogroupは

GIIが11事例で大部分を占め、GIは事例番号5の小学校で発生した1事例のみであった。
 感染性胃腸炎の発生施設は、小学校が5事例、高齢者

施設が5事例、福祉施設と病院がそれぞれ2事例、高校、児童養護施設および宿泊施設がそれぞれ1事例であった。
 特に小学校で発生した5事例は、サポウイルスが2事例

表1 平成17年度食中毒事例

事例番号	発生年月	管轄保健福祉事務所	原因施設	原因食品	検体	ノロウイルス定量PCR			電子顕微鏡観察	
						検体数	陽性数	genogroup	検体数	陽性数
1	H 17. 5	秦野	飲食店	不明	患者便	14	6	GI	7	4
					調理従事者便	15	2	GI	2	2
2	H 17.11	小田原	旅館	不明	患者便	6	6	GII	4	4
					調理従事者便	13	2	GII	N.T.	
3	H 17.11	大和	飲食店	不明	患者便	8	6	GI	5	2
					調理従事者便	3	1	GI	3	0
4	H 17.12	小田原	飲食店	不明	患者便	2	2	GII	2	2
					調理従事者便	2	1	GII	1	1
5	H 17.12	平塚	飲食店	不明	患者便	10	8	GII	1	1
					調理従事者便	4	2	GII	N.T.	
6	H 18. 1	藤沢	飲食店	不明	患者便	18	17	GII	12	6
					調理従事者便	7	1	GII	N.T.	
7	H 18. 1	小田原	飲食店	不明	患者便・吐物	43	33	GII	3	3
					調理従事者便	31	3	GI,GI&II,GII	N.T.	
8	H 18. 2	厚木	飲食店	生カキ*	患者便	5	5	GI,GI&II,GII	4	4
					調理従事者便	4	0		N.T.	

N.T. : 検査せず * : 疫学調査より推定

表2 平成17年度感染性胃腸炎事例

事例番号	発生年月	管轄保健福祉事務所	発生施設	検体	検体数	陽性数	検出ウイルス	電子顕微鏡観察		
								検体数	陽性数	
1	H 17. 5	小田原	小学校	発症者便	児童	40	36	サポウイルス	40	21
					職員	1	1		1	1
				非発症者便	職員	2	2		2	2
				調理従事者	15*	0		15	0	
2	H 17. 5	鎌倉	高齢者施設	発症者便	8	5	A群ロタウイルス	8	5	
3	H 17. 5	平塚	小学校	発症者便	12	11	サポウイルス	9	7	
4	H 17. 5	茅ヶ崎	小学校	発症者便	11	11	C群ロタウイルス	11	8	
5	H 17. 5	厚木	小学校	発症者便・吐物	5	5	ノロウイルス(GI)	4	4	
6	H 17. 6	秦野	高校	発症者便	9	6	ノロウイルス(GII)	6	4	
				非発症者便	5	1		1	1	
7	H 17.11	平塚	高齢者施設	発症者便	入所者	4	2	ノロウイルス(GII)	1	1
					職員	2	2		2	2
				非発症者便	調理従事者	5	0		N.T.	
8	H 17.12	津久井	福祉施設	発症者便	入所者	3	3	ノロウイルス(GII)	3	2
					職員	2	2		2	1
				非発症者便	調理従事者	5	0		N.T.	
9	H 17.12	平塚	病院	発症者便	3	2	ノロウイルス(GII)	N.T.		
10	H 17.12	足柄上	福祉施設	発症者便	7	3	ノロウイルス(GII)	7	1	
11	H 18. 1	小田原	宿泊施設	発症者便	3	3	ノロウイルス(GII)	N.T.		
				非発症者便	調理従事者	7		0	N.T.	
12	H 18. 1	藤沢	病院	発症者便	患者	4	2	ノロウイルス(GII)	3	2
					職員	2	1		1	0
13	H 18. 1	鎌倉	小学校	発症者便	2	2	ノロウイルス(GII)	2	1	
14	H 18. 1	藤沢	高齢者施設	発症者便	入所者	4	4	ノロウイルス(GII)	3	2
					職員	1	1		N.T.	
				非発症者便	職員	4	1	N.T.		
15	H 18. 2	茅ヶ崎	高齢者施設	発症者便・吐物	3	1	ノロウイルス(GII)	2	1	
16	H 18. 3	鎌倉	児童養護施設	発症者便	入所者	3	3	ノロウイルス(GII)	2	2
					職員	1**	0		1	1**
				非発症者便	調理従事者	11	1		N.T.	
				食品	12	0	N.T.			
17	H 18. 3	足柄上	高齢者施設	発症者便	11	9	A群ロタウイルス	5	4	
				非発症者便	調理従事者	13		2	N.T.	

N.T. : 検査せず * : 1検体よりノロウイルスGIを検出 ** : A群ロタウイルスを検出

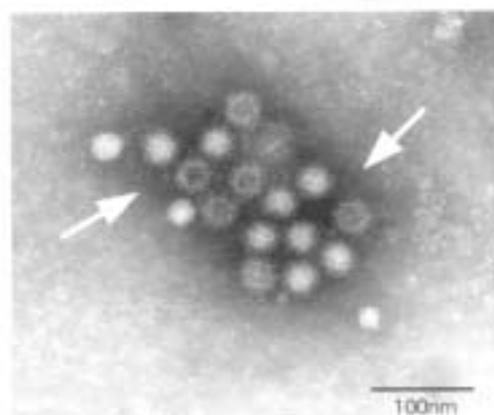


図1 食中毒事例で検出されたノロウイルスの電子顕微鏡像(16万倍)

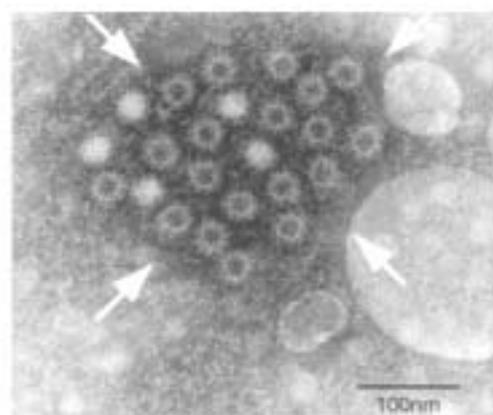


図2 感染性胃腸炎事例で検出されたサボウイルスの電子顕微鏡像(16万倍)

(事例番号1, 3), C群ロタウイルス(事例番号4), ノロウイルスG I (事例番号5), およびノロウイルスG II (事例番号13) がそれぞれ1事例と原因ウイルスが多岐にわたっていたが, 発生時期はノロウイルスG II の事例以外は全て5月に集中していた。サボウイルスおよびC群ロタウイルスによる事例は, 神奈川県域で初めて確認された集団発生であり, 事例番号1では当該小学校と同じ給食が供給された他2校に集団胃腸炎の発生がなかったこと, 事例番号3および4では発症者が一学年に限られていたことなどの疫学調査から, 食中毒ではなく感染性胃腸炎と判定された。この3事例では定量PCRでノロウイルスは検出されず, 同時に進めていた電子顕微鏡観察により小型球形ウイルス粒子, ロタウイルス粒子を検出することができたため, それぞれのウイルスの確認検査を早期に進めることが可能であった。このようにノロウイルスが検出されない場合には, 多種類のウイルスが同時に検索できる電子顕微鏡観察が有用であった。

聞き取り調査から感染性胃腸炎の多くの事例では, 施設の利用者とともに職員にも発症がみられた。特に高齢者・福祉施設などで便や吐物の処理を行う介護職員は, 感染の危険性が高いと考えられた。また今回, 症状のない施設職員からもウイルスが検出された事例があり, 不顕性感染の可能性も考えられた。施設内が汚染されると利用者の中で感染が広がるだけでなく, 利用者や職員および職員と職員の間でも感染が拡大すると推測された。このことから感染拡大を防止するためには, 施設職員における日常的な衛生意識の再確認をすることが重要であると考えられた。

このようにひとたび施設内でウイルスによる胃腸炎が起ると, 容易に感染が拡大し大規模な集団発生となる。その集団発生の原因ウイルスはほとんどがノロウイルスであったが, 今回のようにサボウイルスやロタウイルスが原因となる集団発生も確認されたことから, 今後はノ

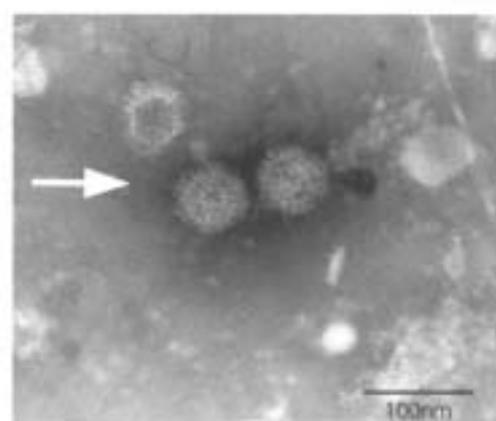


図3 感染性胃腸炎事例で検出されたC群ロタウイルスの電子顕微鏡像(16万倍)

ロウイルス同様これらのウイルスの動向についても監視する必要があると考えられた。

平成17年度の結果を当所で実施した前年度の結果と比較すると食中毒による集団発生事例はやや減少し, 発生時期は冬季に集中していた。一方, 感染性胃腸炎による集団発生事例は前年度に引き続き増加傾向にあり, 発生時期は冬季に加え春季にもピークがみられたことから, 冬季に限らず施設内における対策が必要であると考えられた。施設内で集団発生が疑われた場合は, 調理従事者や職員を含めた施設全体の発症者を把握し原因ウイルスの検出を速やかに行うことで, 感染源および感染経路の推測ができ, 集団発生を早期に終息させる事が可能になると考えられた。

最後に, 衛生研究所への検体搬入や情報提供にご尽力いただいた各保健福祉事務所, 県生活衛生課および健康増進課の方々に深謝いたします。

(平成18年7月20日受理)

資料

県域の感染性胃腸炎患者からの 原因ウイルス検出状況 (平成16年度, 17年度)

伊達佳美, 片山 丘, 古屋由美子

Surveillance of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (2004, 2005)

Yoshimi DATE, Takashi KATAYAMA
and Yumiko FURUYA

感染症予測監視事業の一環として、感染性胃腸炎の原因ウイルスの動向を把握する目的で、県域の医療機関から得られた感染性胃腸炎患者の検体から原因ウイルスの検索を行っている。ウイルスを原因とする感染性胃腸炎は主に冬季(12月から3月)にみられ、原因究明のため小児科定点を受診した乳幼児や小児の患者検体のウイルス検索を実施している。しかし、冬季以外にも成人を含む施設などで感染性胃腸炎の集団発生がみられる。そこで、患者の年齢に関わらず年間を通じて県域における感染性胃腸炎の原因ウイルスの動向を探るため、小児科定点を受診し感染性胃腸炎と診断された成人を含む患者を対象に原因ウイルスの検索を行った。

平成16年4月から平成18年3月に感染性胃腸炎と診断された患者の便および吐物125検体を検査に用いた。ウイルスの検出は感染性胃腸炎の主な原因となるA群ロタウイルス、アデノウイルス40/41型およびノロウイルスを対象とした。A群ロタウイルス、アデノウイルス40/41型には抗原検出用キットであるロタクロン、アデノクロン(TFB社製)を使用し、ノロウイルスには定量PCRを用いた。

検査の結果、125検体中54検体から感染性胃腸炎の原因ウイルスが検出された(表1)。検出されたウイルスは、54検体中A群ロタウイルスが14検体(25.9%)、アデノウイルス40/41型が3検体(5.6%)、ノロウイルスが37検体(68.5%)であった。検出されたノロウイルスのgen

ogroupをみると、37検体のうち34検体(91.9%)がGⅡ、2検体(5.4%)がGⅠであった。また、GⅠおよびGⅡが同時に検出されたものが1検体あった。過去に県域で食中毒以外の感染性胃腸炎患者からgenogroupの異なるノロウイルスが同時に検出された例はないため、今後検体を増やすことにより、ウイルスの感染状況や流行の把握が可能になると思われた。

患者の年齢を乳幼児(6歳未満)、小児(6歳から14歳)、青年期と壮年期(15歳から64歳)および高齢者(65歳以上)に分け、ウイルスの検出状況を年齢別にみると、A群ロタウイルスは6歳未満の乳幼児からの検出数が最も多く、次に65歳以上の高齢者からであった。A群ロタウイルスによる感染性胃腸炎は、主に乳幼児を中心に流行することが知られているが、高齢者からも検出されており、乳幼児以外でも感染性胃腸炎の原因としてA群ロタウイルスを考える必要があると思われた。アデノウイルスは6歳未満の3検体から検出された。ノロウイルスは全ての年齢で検出された。

月別の検出状況をみると(図1)、A群ロタウイルスは平成17年2月と4月、平成18年1月と3月に検出されている。全国的な傾向として、A群ロタウイルスが検出される時期はノロウイルスの検出がピークを迎えた後であるが、その傾向と一致していた。また平成18年3月には11検体から検出され、この11検体のうち10検体は小田原市内の定点医療機関から提供されたものであったことから、この時期に小田原地区でA群ロタウイルスの流行があったと推察された。アデノウイルスは平成16年6月と平成17年11月に検出された。ノロウイルスは、平成17年5月に検出された2検体を除き11月から3月に検出された。平成17年5月に検出された2検体はともにGⅠであり、患者2名は母親(30代)と子供(9歳)であった。発症日を確認したところ、子供が発症してから2日後に母親が発症しており、家族内での感染が推測された。

今回の調査では、平成16年度の6月から12月まで検体が得られず、その間のウイルスの検出状況はわからなかった。平成17年度の6月から10月については感染性胃腸炎の原因ウイルスは検出されなかった。非流行期のウイルスの動向を把握するには、単年度の調査では不十分であり多年度にわたる調査が必要である。今後引き続き調査を行うためには定点医療機関のさらなる協力が重要である。我々も検査結果の迅速な還元など情報の提供に努めていきたい。

最後に、本調査を実施するにあたりご協力いただきました小児科定点医療機関および県健康増進課に深謝いたします。

(平成18年7月20日受理)

表1 年齢別ウイルス検出状況

	検査数	検出数	ウイルス別検出数				
			AHRV	Ad	NV		
					GI	GII	GI/GII
6歳未満	53	27	9	3		15	
6歳～14歳	23	6	1	0	1	4	
15歳～64歳	44	17	1	0	1	14	1
65歳以上	5	4	3	0		1	
計	125	54	14	3	2	34	1

AHRV : A群ロタウイルス Ad : アデノウイルス 40/41型 NV : ノロウイルス

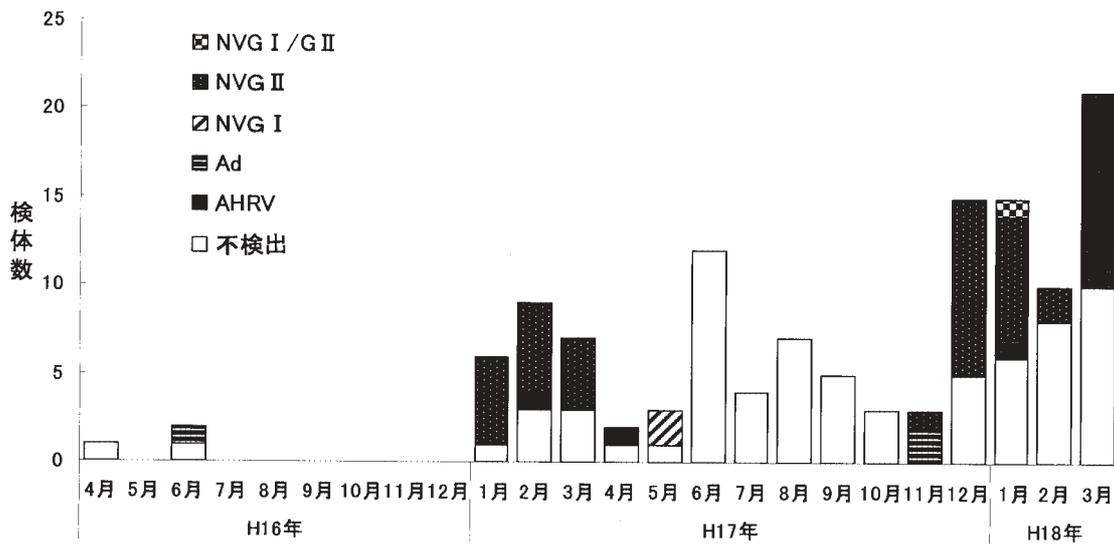


図1 月別ウイルス検出状況

資料

ガスクロマトグラフ質量分析計による 農産物中の残留農薬一斉分析法の 検討結果

佐藤久美子, 藤巻照久, 岸 美智子, 伊藤伸一

Simultaneous Determination of Pesticide Residues in Agriculture Products Using Gas Chromatograph Mass Spectrometer

Kumiko SATO, Teruhisa FUJIMAKI,
Michiko KISHI and Shin-ichi ITOH

食品中の残留農薬等の試験については、平成18年5月29日よりポジティブリスト制が施行されることにともない、多成分を効率よく分析することが求められている。ガスクロマトグラフ質量分析計等を用いた農薬等の一斉分析法については、平成15年度より国立医薬品食品衛生研究所を中心に、当所を含めた十数カ所の地方衛生研究所等が参加し検討を進めているところである。平成15年度は約120農薬、平成16年度は約130農薬について検討が行われ¹⁾、適用可能とされた農薬とともに、分析法が通知されている²⁾。しかし、検討を行った農産物は玄米、大豆、馬鈴薯、ほうれんそう、キャベツ、リンゴ、オレンジの7農産物のみであり、他の農産物に対しても適用試験を行う必要があると考えられた。また、添加濃度は0.1ppmの一点のみであり、一律基準値として0.01ppmが設定される³⁾ことから、一律基準値付近の濃度における検討も行う必要があると考えられた。

そこで我々は、6農産物（いちご、キャベツ、きゅうり、だいこん、トマト、ピーマン）を用い、平成15年度に適用可能とされた約90農薬を対象として検討を行った。試験方法は通知の方法²⁾に従った。添加回収試験は添加濃度0.1ppm、0.01ppmを各々n=3で行った。濃縮率は、通知の方法の4倍濃縮の他に2倍濃縮でも検討を行い、結果を比較した。同時に、溶媒標準溶液に対する農産物中

の夾雑物の影響をみるために、それぞれの試料について抽出、精製後に試料に対して0.1ppmおよび0.01ppmになるように標準溶液を添加して調製したマトリックス標準溶液を調製し、マトリックス標準溶液と溶媒標準溶液の比較を行った。それらの結果を報告する。

プロパニル、プロマシル、キノクラミン、イソキサチオンオキシソンの4農薬で2倍濃縮、4倍濃縮いずれも、一律基準値付近の濃度での感度が得られず、定量することが困難であった。今回は2倍から4倍に濃縮率を上げることで感度が著しく改善された農薬はなかった。

無添加試料では、いちごでXMC、モノクロトホス、きゅうりでオキサジキシル、だいこんでイプロベンホス、トマトでオキサジキシル、ブプロフェジン、ピーマンでナプロバミドの保持時間付近にピークが見られた。トマトのオキサジキシル（試料中濃度0.04ppm）、ブプロフェジン（試料中濃度0.01ppm）はSCANモードでマススペクトルが得られ、検出を確認した。オキサジキシル、ブプロフェジンは平成18年5月29日以降、暫定基準が適用され、トマトの基準値はオキサジキシルが5ppm、ブプロフェジンが1ppmとなる。今回の検出値は基準値の100分の1以下の濃度であった。

2倍濃縮時の0.1ppmおよび0.01ppm添加回収結果を表1に示し、回収率が70%未満または120%を超えたものを灰色で示した。0.1ppm添加では概ね70~120%の良好な回収率であった。なお、0.1ppm添加のときに4倍濃縮より2倍濃縮のほうが120%を超える農薬が少なく良好な結果が得られた。0.01ppm添加ではいずれの濃縮率でも大部分の農薬が120%を超えた。キャピラリーカラムを用いるGCもしくはGC/MS分析では、夾雑物の存在下、ピーク強度が増大し、回収率が100%を超える現象が見られることがあり、低濃度になるほど、農薬成分に対する夾雑物の影響が大きく、回収率が見かけ上高くなったものと考えられた。

次に、2倍濃縮時のマトリックス標準溶液と溶媒標準溶液の比較結果を表2に示した。マトリックス標準溶液／溶媒標準溶液の比が0.7未満または1.2を超えたものを灰色で示した。0.1ppmマトリックス標準溶液では2倍濃縮のほうが4倍濃縮より1.2を超えるものが少なく、良好な結果を得ることができた。0.01ppmマトリックス標準溶液では、いずれの濃縮率でも1.2を超えるものがほとんどであった。

以上の検討結果より、0.1ppm添加では2倍濃縮のほうが、4倍濃縮よりも正確な定量値を出すことが可能と考えられた。一律基準値付近の低濃度領域では回収率が120%を超えるものがほとんどであり、一律基準値が適用される項目では真値が基準値以下の濃度であっても、

見かけ上基準値を超えてしまう可能性が考えられた。検出値を真値に近づけるための検討が必要であり、特異性の高い精製方法の検討、マトリックスを加えた標準溶液

の検量線による定量の検討、GC/MSより特異性が高い機器(GC/MS/MS等)を用いた検討が必要と考えられた。

(平成18年7月20日受理)

表1 検討農薬の添加回収結果(0.1ppm,0.01ppm添加,2倍濃縮)

農薬名	平均回収率(%) (n=3)											
	いちご		キャベツ		きゅうり		だいこん		トマト		ピーマン	
	0.1ppm	0.01ppm	0.1ppm	0.01ppm	0.1ppm	0.01ppm	0.1ppm	0.01ppm	0.1ppm	0.01ppm	0.1ppm	0.01ppm
DMC	100.0	602.4	101.7	221.3	104.0	239.9	129.2	161.0	97.9	159.1	100.9	248.4
アゼコナゾール	99.9	127.1	91.7	131.7	92.2	111.0	93.0	129.3	93.9	140.9	99.9	128.6
アゼトキロール	91.7	136.1	92.2	152.7	90.7	134.2	94.9	117.6	99.4	130.6	91.6	109.4
アトラジン	94.2	151.9	106.3	153.2	94.0	123.7	97.1	158.9	97.9	159.1	91.9	123.9
アメトリン	96.0	138.2	103.1	141.1	89.0	93.9	101.9	134.0	101.1	150.9	91.9	127.2
アレキシン ¹⁾	104.2	136.7	102.1	123.1	97.2	99.3	121.6	180.3	100.9	279.1	97.7	140.2
アレキシン ²⁾	106.4	246.9	116.0	226.3	106.2	237.7	114.2	203.5	110.9	309.3	101.7	245.2
イソキサチオンオキシロン	100.0	x ³⁾	95.4	x	92.3	x	102.7	x ⁴⁾	103.0	x ⁴⁾	99.9	x ⁴⁾
イソプロピル	99.9	136.1	107.3	136.3	92.4	121.3	96.4	139.5	94.7	133.3	99.6	112.7
イソプロチオラン	99.2	126.9	96.7	121.3	92.3	115.9	93.3	129.4	94.3	132.9	97.5	117.1
イソプロピル	99.9	136.7	106.0	136.6	98.1	127.1	106.7	146.0	99.9	142.8	91.4	118.1
イソプロピル	107.9	171.9	70.7	95.2	95.7	133.9	111.9	163.2	103.1	129.9	97.5	112.5
メチル	99.9	136.3	98.1	134.0	92.7	122.3	100.7	157.2	96.4	149.1	90.9	131.8
メトフェネート	91.2	126.6	99.2	137.7	92.3	114.9	97.4	120.0	95.4	126.4	99.4	116.4
メンドフルファン[α]	91.7	106.9	90.6	114.9	94.6	102.2	94.9	106.7	93.9	112.7	94.3	99.9
メンドフルファン[β]	93.9	107.4	90.9	114.1	99.9	95.4	91.4	126.0	99.0	125.2	99.4	104.0
オキサジメチル	99.4	115.7	93.5	121.9	99.9	104.2	96.5	118.4	91.0	113.3	94.5	110.2
オキサジメチル	90.1	121.7	102.6	120.9	93.4	147.0	95.9	121.4	97.9	403.0	94.4	127.4
オキサフルオルフェン	93.9	122.4	99.0	129.9	99.0	122.9	110.7	166.9	93.2	133.6	95.6	141.4
カルフェントリン	99.1	143.4	95.7	112.9	93.9	109.9	99.7	141.8	100.9	149.0	92.6	121.2
カルボフラン	97.9	141.7	111.4	137.5	91.9	139.4	111.9	158.6	97.1	187.0	99.9	122.2
カルボキサリル	91.1	139.1	99.3	134.6	92.4	134.1	99.9	131.1	97.9	119.7	93.2	120.6
カルトリン	115.4	x	129.8	x	99.9	x	90.9	x	104.2	x	99.9	x
クロロピリ	79.4	126.9	100.7	136.9	79.9	106.3	93.9	129.1	94.7	103.7	99.7	104.9
クロロピリ	94.0	129.6	106.1	134.9	92.5	104.2	99.4	121.9	99.9	112.1	99.7	119.1
クロロピリ	97.2	115.0	90.4	125.1	99.3	87.4	99.9	111.3	99.1	116.0	97.4	102.0
クロロピリ	99.9	106.2	93.9	115.9	99.2	99.9	97.6	114.3	93.9	129.9	99.4	103.9
クロロピリ	99.9	107.4	94.7	119.6	96.2	101.9	99.2	124.3	95.0	120.2	96.2	106.4
クロロピリ	99.6	120.9	96.9	129.2	96.7	114.9	93.4	123.0	92.6	125.3	98.0	116.9
シメタリン	99.1	122.2	114.9	134.1	98.2	122.2	100.2	127.1	94.0	147.3	94.3	124.9
ジメチル	99.2	146.0	97.9	120.6	96.0	114.0	96.6	122.4	94.2	126.4	93.0	122.2
ジメチル	115.1	142.1	121.6	162.3	97.2	122.2	122.7	162.6	96.0	123.8	96.9	127.5
ジメチル	99.7	120.4	97.3	120.9	93.1	112.3	99.2	126.2	99.1	126.4	90.4	119.9
ジメチル	102.2	160.2	117.3	184.2	102.5	167.2	108.9	162.1	97.2	126.8	98.3	124.9
ジメチル	94.6	127.9	99.9	123.9	93.4	104.9	101.7	124.9	96.9	129.9	90.4	112.9
ジメチル	92.0	129.8	103.0	121.0	90.0	94.9	100.2	128.8	96.9	122.7	90.1	120.2
チナリン	74.0	103.9	73.7	94.5	99.9	77.1	90.2	99.6	74.3	92.5	99.9	90.0
チナリン	96.7	167.2	99.9	149.6	93.7	129.4	91.3	149.8	94.9	166.1	94.7	127.0
チナリン	99.4	124.4	97.0	126.2	91.0	103.9	92.6	120.9	99.0	121.0	91.7	112.9
チナリン	90.2	127.1	96.4	126.4	92.3	106.4	99.9	129.2	99.4	121.2	90.3	109.9
チナリン	96.0	111.7	99.3	119.9	96.0	97.9	93.0	111.1	93.9	101.6	97.3	102.4
チナリン	99.9	129.3	94.9	144.3	94.9	117.4	100.0	109.2	92.3	107.3	94.0	148.1
チナリン	99.4	126.9	96.3	126.9	93.6	119.1	99.4	149.0	94.4	129.1	99.9	127.7
チナリン	129.9	171.9	104.9	120.4	107.9	120.0	107.3	161.1	92.7	129.0	104.1	120.9
チナリン	99.9	126.2	95.1	126.2	97.7	114.9	94.4	125.9	90.1	123.8	99.2	142.1
チナリン	79.7	99.3	94.0	119.4	97.3	116.1	107.3	141.7	91.4	118.4	95.9	106.6
チナリン	105.4	161.4	109.9	162.9	100.7	95.4	105.5	160.7	91.4	111.8	101.0	123.8
チナリン	92.3	126.9	99.4	129.1	92.2	119.4	101.2	147.7	99.3	140.3	91.9	125.6
チナリン	94.7	141.3	102.4	133.6	96.5	129.4	106.3	169.0	99.9	163.3	92.7	126.4
チナリン	106.1	162.9	109.1	152.7	104.5	126.6	112.3	183.2	97.9	154.1	105.0	126.1
チナリン	99.9	160.0	113.0	144.3	102.0	141.3	111.4	192.9	101.9	192.8	102.0	162.2
チナリン	99.4	129.4	98.2	135.9	91.1	116.2	94.7	129.1	95.0	129.5	99.7	115.6
チナリン	113.3	162.5	97.7	114.6	105.5	122.5	116.6	181.1	103.6	129.8	99.6	166.1
チナリン	112.2	199.9	129.5	180.9	112.9	144.7	115.4	174.4	111.4	192.9	101.9	162.9
チナリン	107.2	143.8	114.9	169.2	94.2	99.9	100.3	142.3	104.4	143.0	100.9	127.9
チナリン	96.5	149.9	106.6	142.2	96.2	99.4	106.9	164.1	109.5	149.0	94.4	124.1
チナリン	121.2	294.4	118.4	161.7	104.0	115.3	117.7	149.1	109.5	129.1	101.4	186.2
チナリン	92.2	116.9	99.3	126.2	92.4	97.4	95.3	124.3	99.9	129.9	99.4	103.1
チナリン	94.3	121.4	104.1	120.5	94.0	104.4	93.3	120.7	92.9	119.4	92.9	112.7
チナリン	99.1	124.9	71.9	103.7	90.1	102.9	97.9	122.3	97.2	129.9	99.4	114.0
チナリン	97.2	117.1	97.3	116.4	99.2	105.9	90.6	115.3	94.9	129.9	91.1	111.4
チナリン	97.2	124.9	91.7	124.7	92.9	107.9	99.7	109.7	99.9	127.2	99.4	112.4
チナリン	93.0	129.2	96.0	129.2	93.3	106.9	99.3	147.8	99.9	147.2	99.4	129.9
チナリン	99.9	142.7	104.9	129.0	99.7	116.0	100.5	129.1	99.9	129.5	94.9	124.8
チナリン	114.9	125.2	114.9	149.0	109.9	112.3	122.9	198.2	115.2	129.1	104.9	129.9
チナリン	118.4	121.2	99.9	114.7	106.9	112.4	106.9	129.9	104.1	162.9	119.0	147.1
チナリン	99.9	119.9	106.4	129.6	99.1	109.1	71.9	77.4	97.9	129.1	93.0	104.2
チナリン	129.7	x	183.3	x	123.6	x	129.4	x	127.4	x	115.4	x
チナリン	94.4	129.1	113.5	189.6	109.4	119.1	113.4	192.4	92.3	183.9	99.5	127.0
チナリン	92.7	127.6	109.0	126.0	92.3	117.0	105.0	129.0	94.2	144.4	92.2	124.9
チナリン	93.3	143.6	99.1	132.0	99.3	122.0	97.0	148.3	94.3	147.7	99.7	129.9
チナリン	99.0	142.4	122.2	176.9	93.4	122.7	106.1	127.2	99.0	119.1	94.3	107.0
チナリン	111.0	x	114.9	x	107.2	x	110.7	x	99.3	x	97.2	x
チナリン	99.9	124.0	91.9	121.6	91.0	149.0	92.0	127.4	97.0	129.2	99.4	107.2
チナリン	97.6	126.1	95.1	127.1	94.4	114.4	93.9	127.5	91.3	123.1	94.9	115.3
チナリン	91.0	121.7	96.9	119.5	93.1	106.0	96.4	129.5	99.4	129.3	91.2	117.6
チナリン	99.9	124.7	95.9	127.8	90.9	121.4	93.6	129.2	94.0	149.9	99.3	117.3
チナリン	99.9	148.1	104.7	127.9	99.9	99.1	102.9	129.9	97.2	109.9	99.4	116.1
チナリン	99.2	119.9	93.4	123.4	93.1	99.1	92.2	121.9	99.2	122.1	99.4	109.6
チナリン	99.0	122.9	102.2	144.0	91.4	112.9	96.4	129.7	99.2	129.8	95.7	117.7
チナリン	77.1	101.3	79.4	105.0	73.5	99.9	99.3	112.3	81.7	96.4	79.4	91.4
チナリン	93.1	104.9	94.1	129.6	94.4	102.1	99.1	119.9	94.5	113.3	92.2	96.6
チナリン	93.4	103.9	92.9	110.4	92.3	99.9	92.9	91.4	79.5	97.6	93.1	91.9
チナリン	93.0	92.4	94.2	129.7	93.9	99.3	101.9	117.2	94.2	99.2	97.1	94.0
チナリン	109.0	142.1	102.9	149.9	99.4	149.3	104.2	142.9	90.5	124.9	99.7	129.9
チナリン	104.4	129.7	100.7	149.2	96.4	124.4	99.7	143.0	92.8	143.3	99.9	129.1
チナリン	109.9	129.3	109.1	172.7	111.4	112.4	77.9	199.9	100.9	224.4	106.3	191.6
チナリン	99.9	119.7	95.9	121.2	92.7	123.0	94.9	123.0	91.4	129.4	90.3	106.2
チナリン	102.1	129.9	112.2	194.7	109.9	149.6	102.3	180.7	99.6	179.2	102.7	182.4
チナリン	97.5	119.9	99.4	112.9	98.1	92.9	96.0	126.1	99.9	121.1	99.7	109.2
チナリン	91.4	144.9	100.7	129.7	94.4	122.7	93.4	154.1	91.1	142.8	93.2	122.0
チナリン	92.9	142.3	94.4	125.1	92.0	129.1	91.3	164.3	99.1	127.0		

資料

食品汚染物質残留実態調査結果
 (平成16年度, 17年度結果)

赤星猛, 佐藤久美子, 林孝子, 渡邊裕子,
 甲斐茂美, 藤巻照久, 岸美智子

On the Residual Levels of Food
 Chemical Contamination in
 Kanagawa Prefecture (2004, 2005)

Takeshi AKABOSHI, Kumiko SATO,
 Takako HAYASHI, Hiroko WATANABE,
 Shigemi KAI, Teruhisa FUJIMAKI and Michiko KISHI

我々は、食品中の残留汚染物質を監視し、その安全性を確保することを目的として農薬、動物用医薬品、カビ毒および環境汚染物質の食品への残留調査を実施している。本報では平成16年度及び17年度の調査結果を報告する。

1. 残留農薬調査

食品衛生法では平成18年5月28日現在、穀類、豆類、果実、野菜、茶等130以上の農産物について、一日許容摂取量(ADI)を基にして、残留農薬の基準が定められている。

我々は平成2年度より、残留基準が未設定である農薬の農産物に対する、残留調査と残留基準の設定対象となっ

ていなかった加工食品に対する残留調査を行ってきた。平成16年度は濃縮果汁中の有機リン系農薬、カーバメート系農薬および含窒素系農薬、平成17年度は小麦加工品とその原料小麦の有機リン系農薬、大豆加工品中のグリホサート、グルホシネートおよびウナギ加工品中の有機塩素系農薬について残留実態調査を行った。結果を表1~3に示す。

小麦加工品4検体からクロルピリホスメチル(0.013, 0.033ppm)、ピリミホスメチル(0.03, 0.03ppm)が検出された。これら農薬は加工過程では消失せず、残留するものと考えられる。しかし、クロルピリホスメチルのADIは0.005mg/体重kg/日、ピリミホスメチルのADIは0.025mg/体重kg/日であり、体重50kgの人が今回検出された一番高い濃度の小麦を食品群別1日摂取量である98.0g¹摂取した場合であっても、クロルピリホスメチルの摂取量はADIの1.3%、ピリミホスメチルの摂取量はADIの0.24%であり、人の健康を損なうおそれのない濃度であると考えられる。また平成18年5月29日に施行されたポジティブリスト制(平成17年11月29日付け、厚生労働省告示第499号)による新たな基準は、小麦のクロルピリホスメチルで10ppm、ピリミホスメチルで1ppmであり、基準を超える量は検出されていない。

ウナギ加工品10検体中8検体からDDT代謝物のpp'-DDEが検出された(表3)。DDT本体は検出されずまた検出濃度も低いことから、農薬として最近使用されたものではなく、ウナギの生育環境の水質、土壌等に残留していた過去に使用されたものが取り込まれたものと考えられた。ウナギ加工品には残留基準は設定されていない。しかし、輸入食肉の脂肪中の暫定基準値は総DDTとして3ppmであり、今回検出された濃度はその1000分の1程度と低く、また体重50kgの人が今回検出された一番高

表1 加工食品等の残留農薬事態調査結果①

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)		
		有機リン系農薬*1	カーバメート系農薬*2	含窒素系農薬*3
オレンジ果汁	5	0/5	0/5	0/5
トマトジュース	5	0/5	0/5	0/5
リンゴ果汁	4	0/4	0/4	0/4
グレープ果汁	3	0/3	0/3	0/3
グレープフルーツ果汁	3	0/3	0/3	0/3
ミカン果汁	2	0/2	0/2	0/2
パイナップル果汁	1	0/1	0/1	0/1
小麦加工品及び原料	10	4/10*4	-	-

- 未測定

定量限界: EPN:0.02ppm, エトプロホス, クロルピリホスメチル, カーバメート系農薬:0.005ppm, その他の有機リン系農薬および含窒素系農薬:0.01ppm

*1 有機リン系農薬: EPN, エチオン, エトプロホス, エトリムホス, クロルピリホス, クロルピリホスメチル, シアノホス, ジクロルボス, ダイアジノン, チオメトン, パラチオン, パラチオンメチル, ピリミホスメチル, フェニトロチオン, フェンチオン, プロチオホス, ホサロン, マラチオン, メチダチオン, トルクロホスメチル

*2 カーバメート系農薬: エチオフェンカルブ, オキサミル, カルバリル, フェノカルブ, ベンダイオカルブ

*3 含窒素系農薬: クロルプロファム, ジフェノコナゾール, シプロコナゾール, テブコナゾール, トリアジメノール, トリアジメホス, トリフルミゾール, ビテルタノール, フルシラゾール, プロピコナゾール, ヘキサコナゾール, ペンコナゾール, プロシミドン

*4 検出値 クロルピリホスメチル: 0.013, 0.033ppm ピリミホスメチル: 0.03, 0.03ppm

表2 加工食品等の残留農薬事態調査結果②

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)	
		グリホサート	グルホシネート
大豆及び加工品	7	0/7	0/7

定量限界: グリホサート 0.01ppm
グルホシネート 0.05ppm

表3 加工食品等の残留農薬事態調査結果③

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)	
		有機塩素系農薬*	検出農薬/検出値(ppm)
国産ウナギ加工品	3	3/3	pp'-DDE/0.004, 0.005, 0.008
輸入ウナギ加工品	7	5/7	pp'-DDE/0.003, 0.003, 0.004, 0.004, 0.007

*1 有機塩素系農薬: 総BHC(α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC), DDT (PP'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD op'-DDT, pp'-DDT) デILDリン, ヘプタクロル(ヘプタクロルエポキシドを含む)
定量限界: pp'-DDE 0.003ppm
 β -BHC, op'-DDD, pp'-DDD, pp'-DDT 0.008ppm
上記以外 0.002ppm

表4 食肉中の動物用医薬品検査結果

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)						
		スピラマイシン*1	チルミコシン	シロマジン	ニューキノロン*2	アルベンダゾール*3	チアベンダゾール*4	トリクラベンダゾール
国産牛肉	7	0/7	0/7	0/2	0/2	-	-	0/5
輸入牛肉	6	0/6	0/6	0/2	0/2	0/4	0/4	0/4
国産豚肉	9	-	0/9	0/3	0/3	-	-	-
輸入豚肉	7	-	0/7	0/3	0/3	0/3	0/3	-
国産鶏肉	7	0/7	0/3	0/3	0/3	-	-	-
輸入鶏肉	6	0/6	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-
輸入羊肉	2	0/1	0/2	0/1	-	0/1	0/1	0/1

- 未測定
定量限界: スピラマイシン, ネオスピラマイシン, チルミコシン 0.05ppm
トリクラベンダゾール, アルベンダゾール代謝物, チアベンダゾール代謝物 0.01ppm
ダノフロキサシン 0.001ppm
上記以外 0.005ppm
*1 ネオスピラマイシンを含む
*2 ニューキノロン: エンロフロキサシン, シプロフロキサシン, ダノフロキサシン, サラフロキサシン, オフロキサシン
*3 アルベンダゾール代謝物である5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミンを測定
*4 チアベンダゾールの代謝物である5-ヒドロキシチアベンダゾールを含む

表5 魚介類中の動物用医薬品検査結果

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)	
		オキシテトラサイクリン	エンロフロキサシン
鮮魚(サケ)	9	0/9	-
鮮魚(ブリ)	7	0/7	-
鮮魚(マダイ)	3	0/3	-
鮮魚(カンパチ)	2	0/2	-
エビ	8	0/8	-
ウナギ加工品	8	0/4	0/8

定量限界: オキシテトラサイクリン 0.02ppm
エンロフロキサシン 0.05ppm

い濃度のうなぎを食品群別1日摂取量(魚介類)である88.2g¹摂取した場合であっても, pp'-DDEのADIは0.005mg/体重kg/日であり摂取量はADIの0.28%である。このことから, 人の健康を損なうおそれのない濃度であると考えられる。

濃縮果汁及び大豆加工品についてみると, 平成13年度調査では輸入りんごからクロルピリホスが, 平成14年度調査では輸入大豆からグリホサートが検出された。今回調査した濃縮果汁23検体および大豆加工品10検体から農

薬は検出されなかった。

2. 食肉, 魚介類中の動物用医薬品・抗生物質残留調査
我々は平成8年度より動物用医薬品・抗生物質について継続して調査を行っている。平成16年度, 17年度合わせて, 食肉44検体, 魚介類37検体について調査を行なったところ, すべて不検出であった。検査項目および結果を表4, 5に示す。

3. 輸入食品のカビ毒調査

我々は平成15年度より, 県内流通の輸入香辛料, 豆類および穀類について, アフラトキシンB₁, アフラトキシンB₂, アフラトキシンG₁およびアフラトキシンG₂について調査を実施している。平成16年度, 17年度は計59検体について調査を行なったところ, すべて不検出(10ppb以下)であった。結果を表6に示す。

近年アフラトキシン以外のカビ毒に対しても衛生上の

注意が向けられていることから, 平成17年度は新たに, 小麦, 大麦についてデオキシニバレノール, 輸入りんご果汁についてパツリンの検査を実施した(表6)ところ, りんご果汁2検体からパツリンが0.03および0.01ppm検出された。パツリンの暫定耐容一日摂取量(PTDI)は, 0.4 μ g/体重kg/日であり, 体重50kgの人が今回検出された一番高い濃度のりんご果汁を食品群別1日摂取量(果実類)である124.3g¹摂取した場合であっても, パツリン摂取量はPTDIの18.6%である。また基準が0.50ppm未満であることから, 人の健康を損なうおそれのない濃度と考えられる。

4. 海産魚介類の有機スズ化合物の汚染実態調査

神奈川県では, 漁網や船底塗料中に使用され, 魚介類への汚染が食品衛生上問題とされてきた昭和60年代からピストリブチルスズオキシド(TBTO)およびトリフェニルスズ(TPT)の汚染実態調査を行っている。平成6年度以降は代謝産物であるジブチルスズ(DBT)を調査項目に加えた。平成16年度, 17年度は計30検体について調査

を行ない、9検体（16年度：6/15検体、17年度：3/15検体）からTBTOが検出された。結果を表7に示す。最大濃度は平成16年度で0.025ppm、17年度で0.017ppmであった。また平成16年度はTBTOが検出されたサバからDBTも検出された。検出頻度、濃度ともに減少傾向が続いているが依然として汚染がみられる。有機スズ化合物は、内分泌攪乱物質としての疑いをもたれており微量でも次世代へまたがる影響が懸念されることから、今後とも継続してモニタリングする必要があると考える。

表6 輸入食品のカビ毒調査結果

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)		
		アフラトキシン ^{*1}	デオキシニパレノール	パツリン
香辛料				
ブラックペッパー	4	0/4	-	-
ホワイトペッパー	6	0/6	-	-
トウガラシ	4	0/4	-	-
ナツメグ	5	0/5	-	-
ジンジャー	1	0/1	-	-
カルダモン	1	0/1	-	-
混合品	2	0/2	-	-
乾燥果実				
イチジク	4	0/4	-	-
豆類				
ピーナッツ	14	0/14	-	-
ビスタチオ	14	0/14	-	-
穀類				
ポップコーン	4	0/4	-	-
大麦 ^{*2}	3	-	0/3	-
小麦 ^{*2}	2	-	0/2	-
果物				
リンゴ果汁	5	-	-	2/5

定量限界：アフラトキシンおよびパツリン 0.01ppm、デオキシニパレノール 0.1ppm
^{*1}アフラトキシン：アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁、アフラトキシンG₂を含む

^{*2}大麦は国産2検体、小麦は国産1検体を含む
 リンゴ果汁中パツリンの検出値：0.01、0.03ppm

表7 海産魚介類中のTBTO,TPTおよびDBT調査結果

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)			検出濃度(ppm)
		TBTO	TPT [*]	DBT [*]	
アジ	10	0/10	0/10	0/10	TBTO:0.011, 0.019 DBT:0.020 0.011 0.011 0.017 0.012, 0.023 0.025 0.017
サバ	3	2/3	0/3	1/3	
イワシ	2	1/2	0/2	0/2	
カマス	1	1/1	0/1	0/1	
ゴマサバ	3	1/3	0/3	0/3	
サゴシ	2	2/2	0/2	0/2	
タチウオ	1	1/1	0/1	0/1	
マイワシ	1	1/1	0/1	0/1	
イナダ	2	0/2	0/2	0/2	
トビウオ	1	0/1	0/1	0/1	
ホウボウ	1	0/1	0/1	0/1	
タイ	1	0/1	0/1	0/1	
メダイ	1	0/1	0/1	0/1	
ワラサ	1	0/1	0/1	0/1	

定量限界：TBTO 0.010ppm、TPTおよびDBT 0.020ppm
^{*}TPTおよびDBTは、それぞれTPTC(塩化トリフェニルスズ)、DBTC(塩化ジフェニルスズ)として算出

5. 魚介類加工品の総水銀調査

厚生労働省は平成15年6月に「水銀を含有する魚介類等の摂食に関する注意事項」を発表した。この中で海棲哺乳動物、大型回遊魚および深海魚は、水銀濃度が高い傾向にあり、サメ、カジキ、キンメダイおよびクジラ類について、妊婦を対象に摂食注意を呼びかけている。一

表8 魚介類加工品の総水銀調査結果

原料魚種	検出値(ppm)	検体数			
		0.1~0.4	0.4~0.7	0.7~1.0	1.0以上
マグロ	81	58	15	4	4
カツオ	21	19	1	1	
キンメダイ	9	7		1	1
タイ	2	1	1		
アカウオ	6	6			
アンコウ	1	1			
クジラ	11	11			
ウナギ	10	10			
グチ・タラ	15	15			
タラ	7	7			
グチ	16	16			
サケ	7	7			
イカ	3	3			
イワシ	3	3			
エイ	1	1			
タチウオ	1	1			
アジ・タラ	1	1			
タラ・ホッケ	1	1			
タラ・オキアミ・マグロ	1	1			
タラ・ホッケ・マグロ	1	1			
タラ・イトヨリ	1	1			
イルカ	1				1

定量限界：0.0005ppm(脂肪分の多い検体は0.001ppm)

方、魚介類摂取量のおよそ36%は加工品によるものであるが、その水銀濃度の分析報告は少ない。そこで我々は平成16年度から魚介類加工品を中心に総水銀量調査を実施した。結果を表8に示す。加工食品について基準は設定されていないが、魚介類の暫定的規制値(総水銀として0.4ppm：昭和48年7月23日環乳第99号厚生省環境衛生局長通知)を超えるものが200検体中29検体(14.5%)あった。マグロ、カツオ、キンメダイで濃度が高く、加工食品も使用魚種の影響が大きいという結果であった。また、加工による水銀量の減少傾向はあまり見られなかった。今後も魚介類加工食品による水銀摂取量について考える必要があると考える。

(平成18年7月20日受理)

文献

- 1) 健康・栄養情報研究会編 国民栄養の現状(平成14年厚生労働省国民栄養調査結果), p92~97, 第一出版

資料

遺伝子組換え食品の分析結果
 (平成17年度)

大森清美, 土屋久世, 渡邊裕子, 関戸晴子,
 岸 弘子, 山田利治

Investigation on the Qualitative and
 Quantitative Analysis of Genetically
 Modified Foods in Kanagawa
 Prefecture (2005)

Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA,
 Hiroko WATANABE, Haruko SEKIDO,
 Hiroko KISHI and Toshiharu YAMADA

平成13年4月から食品衛生法により遺伝子組換え (GM) 食品の安全性審査と表示が義務化されたことに伴い、神奈川県ではGM食品の検査を実施している。平成17年度は、5月から11月及び平成18年1月に、神奈川県下7カ所の保健所によりスーパー及び小売り店舗から収去された70検体について検査を実施した。

試験方法は、厚生労働省通知(平成16年6月28日食安発第0628001号)に従い、安全性未承認の組換え遺伝子については定性試験を、安全性承認済み組換え遺伝子に

ついては定量試験を実施した。表1に検査項目及び品目ごとの試験方法を示した。通知では、トウモロコシ半製品であるコーンミール及びコーンパウダー、大豆加工品である冷凍枝豆、大豆水煮及び豆腐については、定量試験法は適用されていない。しかし、加工食品へのGM作物の混入に対する消費者の不安が大きいことから、穀粒の定量試験法を参考に調査的観点から定量試験を実施した。使用機器類は、遺伝子増幅装置にTaKaRa PCR Thermal Cycler SP, 電気泳動装置にMupid ミニゲル泳動装置, ゲル撮影装置にATTO BIOINSTRUMENT A E-6905H Image Saver HR, 遺伝子定量装置にABI PRISM 7700を用いた。

食品80検体についての、組換え遺伝子の定性及び定量試験結果を表2及び表3に示した。定性試験については、35検体すべてにおいて組換え遺伝子は不検出であった(表2)。定量試験結果については、トウモロコシについて、No.41のトウモロコシ穀粒で定量下限値(0.5%)未満の35S(0.1%)が検出された(表3)。No.42及び43のトウモロコシ穀粒, No.44のコーンミール及びNo.45のコーンフラワーは、定量下限値未満の35S(0.04~0.3%)及び定量下限値(0.1%)未満のGA21(0.002~0.03%)が検出された。しかしいずれの検体についても、35S及びGA21の含有%の和は、0.3%以下であった。大豆については、大豆穀粒3検体(No.56, 59及び60)及び豆腐1検体(No.77)から定量下限値(0.5%)未満のRRS(0.02~0.04)が検出された。そのほかの不検出と記載された36検体については、組換え遺伝子のコピー数は全く計測されなかった。

平成14年度から平成16年度に実施した組換え遺伝子の試験結果^{1) 2) 3)}において、平成14年度のコーングリッツ

表1 平成17年度 組換え遺伝子検査項目および試験方法

原料	品目	検体数	項目	試験方法	抽出法	組換え遺伝子	内在性遺伝子
パパイヤ	パパイヤ	5	定性	PCR法	DNeasy Plant Mini	55-1	Papain
	トウモロコシ青果	5					
	トウモロコシ穀粒	3					
	コーンミール	1					
	コーンフラワー	1					
トウモロコシ	コーンスナック菓子	10	定性	PCR法	Genomic-tip	CBH351	Zein
	コーンフレーク	2					
	コーンスープ	1					
	トウモロコシ缶詰	5					
	冷凍トウモロコシ	2					
大豆	トウモロコシ青果	5					
	トウモロコシ穀粒	3	定量	PCR法	DNeasy Plant Mini	35S・GA21	SS II b
	コーンミール	1					
	コーンパウダー	1					
	枝豆青果	5					
大豆	大豆穀粒	10			CTAB		
	冷凍枝豆	6	定量	PCR法		RRS	Le1
	大豆水煮	4			Genomic-tip		
	豆腐	10					
合計		35	定性				
		45	定量				

表 2 平成 17 年度 組換え遺伝子定性試験結果

No.	品目	産地/原産国	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
1	パパイヤ	アメリカ(ハワイ)	55-1	不検出	記載なし
2	パパイヤ	フィリピン	55-1	不検出	記載なし
3	パパイヤ	アメリカ(ハワイ)	55-1	不検出	記載なし
4	パパイヤ	フィリピン	55-1	不検出	記載なし
5	パパイヤ	フィリピン	55-1	不検出	記載なし
6	トウモロコシ 青果	千葉県	CBH351	不検出	記載なし
7	トウモロコシ 青果	千葉県	CBH351	不検出	記載なし
8	トウモロコシ 青果	千葉県	CBH351	不検出	記載なし
9	トウモロコシ 青果	横浜	CBH351	不検出	記載なし
10	トウモロコシ 青果	栃木県	CBH351	不検出	記載なし
11	トウモロコシ 穀粒	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
12	トウモロコシ 穀粒	不明	CBH351	不検出	記載なし
13	トウモロコシ 穀粒	不明	CBH351	不検出	記載なし
14	コーンミール	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
15	コーンフラワー	イタリア	CBH351	不検出	記載なし
16	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
17	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
18	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
19	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
20	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
21	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
22	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
23	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
24	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
25	コーンスナック 菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
26	コーンフレーク	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
27	コーンフレーク	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
28	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	記載なし
29	トウモロコシ 缶詰	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
30	トウモロコシ 缶詰	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
31	トウモロコシ 缶詰	カナダ	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
32	トウモロコシ 缶詰	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
33	トウモロコシ 缶詰	不明	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
34	冷凍トウモロコシ	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない
35	冷凍トウモロコシ	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組み換えでない

表 3 平成 17 年度 組換え遺伝子定量試験結果

No.	品目	産地/原産国	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
36	トウモロコシ 青果	千葉県	35S-GA21	不検出	記載なし
37	トウモロコシ 青果	千葉県	35S-GA21	不検出	記載なし
38	トウモロコシ 青果	千葉県	35S-GA21	不検出	記載なし
39	トウモロコシ 青果	横浜	35S-GA21	不検出	記載なし
40	トウモロコシ 青果	栃木県	35S-GA21	不検出	記載なし
41	トウモロコシ 穀粒	アメリカ	35S-GA21	定量下限値未満検出(0.1%)	遺伝子組み換えでない
42	トウモロコシ 穀粒	不明	35S-GA21	定量下限値未満検出(0.04%)	記載なし
43	トウモロコシ 穀粒	不明	35S-GA21	定量下限値未満検出(0.1%)	記載なし
44	コーンミール	不明	35S-GA21	定量下限値未満検出(0.3%)	遺伝子組み換えでない
45	コーンフラワー	イタリア	35S-GA21	定量下限値未満検出(0.1%)	記載なし
46	枝豆 青果	埼玉県	RRS	不検出	記載なし
47	枝豆 青果	群馬県	RRS	不検出	記載なし
48	枝豆 青果	山形県	RRS	不検出	記載なし
49	枝豆 青果	千葉県	RRS	不検出	記載なし
50	枝豆 青果	群馬県	RRS	不検出	記載なし
51	大豆 穀粒	アメリカ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
52	大豆 穀粒	カナダ	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
53	大豆 穀粒	アメリカ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
54	大豆 穀粒	アメリカ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
55	大豆 穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
56	大豆 穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.04%)	IPハンドリングあり
57	大豆 穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
58	大豆 穀粒	カナダ	RRS	不検出	IPハンドリングあり
59	大豆 穀粒	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	IPハンドリングあり
60	大豆 穀粒	カナダ	RRS	定量下限値未満検出(0.03%)	IPハンドリングあり
61	冷凍枝豆	中国	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
62	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
63	冷凍枝豆	中国	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
64	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
65	冷凍枝豆	中国	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
66	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
67	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	記載なし
68	大豆 水煮	不明	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
69	大豆 水煮	不明	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
70	大豆 水煮	不明	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
71	豆腐	不明	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
72	豆腐	不明	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
73	豆腐	アメリカ	RRS	不検出	記載なし
74	豆腐	アメリカ	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
75	豆腐	カナダ	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
76	豆腐	不明	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
77	豆腐	日本	RRS	定量下限値未満検出(0.04%)	遺伝子組み換えでない
78	豆腐	カナダ	RRS	不検出	遺伝子組み換えでない
79	豆腐	不明	RRS	不検出	記載なし
80	豆腐	不明	RRS	不検出	記載なし

及びコーンミールで0.1～0.3%の組換え遺伝子が検出されている。平成17年度の試験結果についても、No.41～45のトウモロコシ穀粒、コーンミール及びコーンフラワーから定量下限値未満の組換え遺伝子を検出し、No.41のトウモロコシ穀粒及びNo.44のコーンミールについては、遺伝子組換えでないことが表示されていた。また、大豆穀粒についても、平成14年度から平成16年度の試験結果では、毎年2～3検体で定量下限値未満のRRSが計測されており、平成15年度にはIPハンドリングを有するアメリカ産の大豆穀粒で、定量下限値を大幅に超える2.6%のRRSを検出した。平成17年度の試験結果においても、2検体の大豆穀粒で定量下限値未満のRRS（0.02～0.04%）を計測し、これらの平成14年度から17年度までにRRSが計測された大豆穀粒は、すべてアメリカ産もしくはカナダ産の大豆穀粒であった。豆腐については、平成14年度に豆腐9検体で定量下限値未満ではあるが0.02～0.1%のRRSを計測し、17年度においても、国産大豆100%及び「遺伝子組み換えでない」と表示したNo.77の豆腐について、定量下限値未満（0.04%）のRRSが計測された。これらの結果により、トウモロコシ及び大豆の流通過程において、IPハンドリングを取り交わされた作物であっても、意図せぬ組換え体の混入が起こる可能性があるものと考えられた。

平成17年5月に実施された厚生労働省の食品安全モニター約500名による遺伝子組換え食品の安全性に関するアンケート⁹⁾では、77%が「非常に不安である」もしくは

「ある程度不安である」と回答している。また同年に実施された農林水産省の安全・安心モニター約1300人によるアンケート⁵⁾においても、「食品を購入する際、遺伝子組換え食品が原材料として使用されているかどうかは気になりますか」という質問に対して、「非常に気になる」もしくは「気になる」の回答は79%であった。このように多くの消費者は現在もGM作物の安全性に対して不安感をもつことから、消費者の「食品を選択する権利」をまもるために、今後もGM食品の表示に対する監視を継続することが必要であると考えられた。なお、本検査は神奈川県保健福祉部生活衛生課の食品科学調査事業により実施された。（平成18年7月20日受理）

参考文献

- 1) 大森清美ほか：遺伝子組換え食品の分析結果(平成14年度)，神奈川県研報告，**33**，111-113（2003）
- 2) 大森清美，土屋久世，岸弘子，山田利治，平山クニ，佐藤修二：遺伝子組換え食品の分析結果(平成15年度)，神奈川県研報告，**34**，56-58（2004）
- 3) 大森清美，土屋久世，岸弘子，山田利治，平山クニ：遺伝子組換え食品の分析結果（平成16年度），神奈川県研報告，**35**，33-35（2005）
- 4) 厚生労働省，食品安全モニター課題報告書「食の安全性の意識等についての結果」，平成17年5月実施
- 5) 農林水産省，安全・安心モニター第4回調査結果，平成17年8月26日プレスリリース

他誌掲載論文抄録 (平成17年4月～平成18年3月)

Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*

(マクロライド耐性肺炎マイコプラズマの臨床的検討)

鈴木里和 (国立感染症研), 山崎勉 (埼玉医科大学), 成田光生 (札幌鉄道病院), 岡崎則男 (神奈川衛研), 鈴木五三男, 安藤智暁 (茅ヶ崎市立病院), 松岡真由美, 見理 剛, 佐々木裕子, 荒川宜親, 佐々木次雄 (国立感染症研), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 709-712(2006)

日本では2000年以降, マクロライド薬剤耐性肺炎マイコプラズマが分離されるようになった。本報では, 耐性肺炎マイコプラズマ感染者におけるマクロライド薬剤の治療効果について検証した。耐性菌感染者11名と26名の感受性菌感染者について, マクロライド薬剤治療を実施した際の臨床経過について比較した。その結果, 治療中における発熱期間は耐性菌感染者においてより長かった。更に, 耐性菌感染者においては, 最初に使用したマクロライド薬剤を途中で他の薬剤に換える例がより多かった。これは, 担当の小児科医がマクロライド薬剤の治療効果が低いと判断し, 他の薬剤に換えたことによる。また, 耐性菌感染者ではマクロライド薬剤を投与しても発熱期間が延長したものの, 他の薬剤に換えなくても解熱した。これらの結果は, マクロライド薬剤が耐性菌感染者の治療においてある程度の効果があることを示すものである。

HIV感染症に対する迅速診断法の進歩と課題

—HIV抗体迅速検査とそれを用いた

HIV即日検査について—

今井光信, 嶋 貴子, 須藤弘二, 近藤真規子 (神奈川衛研), *臨床とウイルス*, **33**, 3, 131-136(2005)

1983年にHIVがAIDSの原因ウイルスであることが明らかにされて以来, HIV検査法は目覚ましい進歩を遂げてきた。その一方で, HIV感染は感染から発症までの時間が長く, 感染の自覚症状があまりないこと, 血中や体液にはかなりの量のウイルスが存在すること等の特徴も原因となり, 血液や血液製剤を介しての感染や性行為を介しての感染により, 2004年末には世界の感染者は4000万人を超えるまでにその感染が拡大している。感染者本人にとっても, また感染予防の意味においても, HIV検査の持つ意味は極めて重要である。そのため, HIV検査はより鋭敏にまたより簡便にと多大の努力が重ねられ, 急速に進歩を遂げてきた。本報では, これらHIV検査技術の進歩と迅速検査を用いた即日検査の試みを紹介する

とともに, HIV検査の現状と今後の課題について報告した。

Current state and need for improvement of system for antibody testing and counseling for HIV infection at public health centers in Japan

(日本の保健所におけるHIV抗体検査・相談体制の現状と改善の必要性)

宮崎千佳, 河原和夫 (東京医科歯科大学大学院), 桜井賢樹 (エイズ予防財団), 中瀬克己 (岡山市保健所), 潮見重毅 (栃木県南健康福祉センター), 今井光信 (神奈川衛研), *Journal of Medical and Dental Sciences*, **52**, 4, 177-182(2005)

日本全国にある保健所は, 日本におけるHIV感染予防対策の役割を担っているが, HIV感染者数およびAIDS患者数は年々増加している。保健所におけるHIV抗体検査の実施状況を調査するために, HIV抗体検査に関する調査票を1997年1月から2001年12月の間に594保健所に配布し調査を行った。回答率は73.9%であった。保健所におけるHIV検査システムの解析には, 統計手法としてピアソンの相関係数, 一元配置分散分析, 重回帰分析を使用した。解析の結果, 地域によってHIV抗体検査の需要に差がみられた。5年間にわたる10万人あたりのHIV抗体検査数は大都市で高くなっており, これは2つの要因, 人口密度と昼夜間人口比率が影響していると思われた。また, 検査結果を受け取りに來なかつた受検者割合については, 保健所の立地条件・地域により影響を受けていた。これらのことから, 保健所は地域の特性および検査希望者のニーズを取り入れたHIV検査システムを確立していく必要があると考える。

海外における献血血液へのHIV混入の防止対策:教育・面接等を中心としたスクリーニング方法

杉本和隆, 高西優子, 木村和子 (金沢大学大学院) 今井光信 (神奈川衛研), *日本エイズ学会誌*, **7**, 1, 23-30 (2005)

日本は他の先進諸国に比べ推定国民HIV感染率が低いにも関わらず, 献血のHIV陽性検体出現率が著しく高い。さらに献血のHIV陽性検体出現率は増加の一途である。これはHIV感染者の増加のみならず, HIV検査を目的とした献血希望者の存在が原因といわれている。そこで, 諸外国の献血者選定方法, 特にHIV感染リスクを有する者の献血を防止する手法について調査した。ベルギー,

スイス、英国、スウェーデン及びカナダの血液サービスを対象に、文献、調査書送付及び訪問面接により調査を行ったところ、調査対象国では、献血者登録手続きとして証明書等による本人確認を行っており、献血者情報を全国的に管理していた。また、献血前に献血希望者に対してHIV/AIDS教育と理解の確認が徹底されており、面接官には面接訓練や見逃し責任を課していた。さらに、一般医療機関におけるHIV検査が利用しやすいことが、感染リスク保持者の献血の減少に寄与しているものと思われた。

Identification of attenuated variants of HIV-1 Circulating Recombinant Form 01_AE that are associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the *nef*/Long Terminal Repeat sequences.

(病態の進行に関与するHIV-1の*nef*/LTR遺伝子領域に大きな欠損が存在したCRF01_AE弱毒株)

近藤真規子、嶋貴子、今井光信(神奈川県衛研)、須藤弘二(エイズ予防財団)、西澤雅子、武部豊(国立感染症研究所)、岩室紳也、岡部武史(厚木市立病院)、
J. Infect. dis. 192, 56-61 (2005).

HIV感染後長期にわたり抗体価が低レベルで推移し、HIV遺伝子も長期間検出できなかった症例について5年以上経過観察した結果、初回採血から1年半後にHIV-1プロウイルスが検出され、4年以上経過後血中HIV-1RNAが陽性となった。プロウイルス中のHIV-1遺伝子には当初*nef*/LTR領域に84baseの欠損がみられたが、その後欠損は時間の経過とともに大きくなり4年3ヶ月後には391baseの欠損クローンが優勢となった。このクローンの欠損部分はシドニー血液銀行コホート研究で報告された長期未発症者から得られた*nef*欠損株(サブタイプB)と非常によく似ていた。この症例は6年以上経過した現在も未発症であり、サブタイプはCRF01_AEである。本症例はnonサブタイプBにおいても*nef*/LTR領域の大きな欠損が病気の進行を遅らせていると考えられる初めての報告である。

保健所におけるHIV即日検査導入の試みとその効果

嶋 貴子、近藤真規子、今井光信(神奈川県衛研)、一色ミユキ、塚田三夫、潮見重毅(栃木県県南健康福祉センター)、日本公衆衛生雑誌, 53, 3, 167-177 (2006)

HIV検査をより受けやすくするための試みの一つとして、検査を受けたその日にHIVスクリーニング検査結果を通知する「HIV即日検査」を保健所のHIV検査に導入し、その効果と実施に伴う問題点等を検討した。栃木県

県南健康福祉センターにおいてHIV検査に通常検査と同時に即日検査を試験的に導入した結果、HIV検査数は即日検査導入前の2002年は130件であったのに対し、即日検査導入後の2003年は453件と3.5倍に増加し、また、そのうちの94%が即日検査を希望した。即日検査を希望した404名中5名がスクリーニング検査陽性となり、確認検査の結果、1例がHIV陽性、4例が偽陽性(偽陽性率1%)と判定された。同時期に即日検査を導入していない栃木県内の他保健所のHIV検査数の増加率は0.9~1.0倍、全国保健所HIV検査件数の増加率は1.2倍であった。これらのことから、即日検査は受検者にとって需要の高い検査であり、保健所HIV検査への即日検査導入はHIV受検者数の増加に繋がる可能性が高いことが分かったが、HIV迅速検査キットの偽陽性率が1%と高いことから、検査前・後の説明やスクリーニング検査陽性者へのサポート体制が重要となることも分かった。

Norovirus gastroenteritis in kanagawa prefecture in december 2004

(2004年12月神奈川県域で発生したノロウイルスによる集団胃腸炎事例)

古屋由美子、片山 丘、高橋孝則、新川隆康(神奈川県衛研), Jpn. J. Infect. Dis., 58, 391-392(2005)

12月に神奈川県域(横浜、川崎、横須賀、相模原市を除く)でノロウイルスを原因とする集団胃腸炎が9事例発生した。そのうち食中毒と決定されたものが4事例、施設内での感染性胃腸炎として取り扱われたものが5事例であった。食中毒すべての事例で調理従事者からもノロウイルスが検出されたことから、カキを喫食した事例を除いて、調理従事者が食品や調理器具を汚染した可能性も考えられた。感染性胃腸炎が集団発生した施設は介護老人保健施設や病院で、検出されたノロウイルスはすべてGIIであった。すべての事例で入所者や入院患者とともに職員の発症が見られている。介護老人保健施設や病院では、入所者や入院患者の便の処理などを行う職員に感染の危険性が高く、施設内で感染が起こると入所者間で感染が広がるとともに、職員の間でも感染が広がると考えられているが、職員などが外部からウイルスを持ち込むことがあるので、施設内に入出入りする人達も注意が必要である。

腸管出血性大腸菌O157を含む生活排水二次処理水の塩素による消毒効果の基礎実験

竹田 茂(神奈川県衛研)、北原節子(大妻女子大)
用水と廃水, 47, 11, 69-75 (2005)

生活排水処理施設に腸管出血性大腸菌O157が混入し

た場合を想定して塩素処理実験を行った。実験は、初期菌濃度を 1.2×10^3 および 4.0×10^4 CFU/mLになるように調製した生活排水二次処理水(生物処理水)に塩素を段階的に添加し、大腸菌O157および大腸菌群数の経時変化を求めた。その結果、 10^4 CFU/mLレベルの高菌濃度で混入したとしても、下水道施設設計指針や浄化槽の構造基準で規定されている塩素注入量10mg/L、接触時間15分の条件で十分な消毒効果を得ることができた。また、消毒工程の維持管理に際し、消毒効果の良否を的確に判断するためには残留塩素で行うよりも遊離残留塩素で行う方がより適していることがわかった。

塩素、オゾン、紫外線消毒した生活排水の変異原性試験による安全性の評価

竹田 茂, 稲田貴嗣, 伏脇裕一, 森 康明(神奈川衛研), 水環境学会誌, 29, 1, 45-48(2006)

生活排水二次処理水を対象にオゾン、紫外線、塩素消毒実験を行い、それぞれの処理水について高感度エームス法による変異原性試験を行い、安全性を比較検討した。その結果、塩素処理水ではほとんどの菌株条件で変異原強度が高かった。特にTA100(-)の条件で高く、注入量50mg/Lの時、平均7,120net rev/Lであった。オゾン処理水ではオゾン注入量10~40mg/Lの範囲においてTA98(-)条件でわずかに変異原性が認められたが、注入量20mg/Lの時の強度は平均176net rev/Lと低かった。紫外線処理水では紫外線照射量が $40\text{mW}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ までは変異原性は認められず、 $80\text{mW}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ でわずかに発現し、 $160\text{mW}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ の時に平均233net rev/Lであった。最適処理条件下(塩素処理:10mg/L, オゾン処理:10mg/L, 紫外線処理: $40\text{mW}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$)における強度は、塩素処理水では2,816 net rev/Lと高かったが、オゾン処理水および紫外線処理水では変異原性はないか極めて弱かった。

高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による畜産物中のベンズイミダゾール系寄生虫駆虫剤の分析

甲斐茂美, 赤星猛, 岸美智子(神奈川衛研), 金澤秀子, 小林静子(共立薬科大学), 分析化学, 54, 775-782(2005)

家畜用寄生虫駆除剤のベンズイミダゾール系薬剤について、高感度測定と構造解析能を合わせ持つイオントラップ-高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(Ion trap LC/MS/MS)に、固定相にペンタフルオロフェニルプロピル基が導入されたHPLCカラムを用いた分析法を検討した。移動相をアセトニトリル:0.2%ギ酸(50:50)(v/v)とし、ポジティブモードのエレクトロスプレーイオン化(ESI)でMultiple Reaction Monitoring

(MRM)及びEnhanced Product Ion Scan(EPI)により測定を行った。オクタデシルシリカ(ODS)カラムとは選択性の異なる分析カラムを用いることにより、アイソクラテックな移動相での9種のベンズイミダゾール系薬剤の一斉分析が可能となった。またイオントラップLC/MS/MSのEPI分析では定性分析の指標として有効な化合物の構造情報が、MRM分析では高感度測定が得られ、LC/MS/MS法の活用は残留動物用医薬品分析の有効な手段となることが明らかとなった。

An inter-laboratory collaborative study by the nongenotoxic carcinogen study group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells (日本における非変異・がん原性物質への対策研究会によるBhas42細胞を用いた発がんプロモーター検出のための細胞形質転換試験に関する研究室間再現性の評価研究)

大森清美(神奈川衛研), 梅田誠, 田中憲穂((財)食品薬品安全センター), 高木弘毅(アベンティスファーマ(株)), 吉村功(東京理科大学), 佐々木澄志, 浅田晋((財)食品薬品安全センター), 酒井綾子(国立医薬品食品衛生研究所), 浅倉眞澄(日本バイオアッセイセンター), 馬場博(三菱ウェルファーマ(株)), 伏脇裕一(神奈川衛研), 浜田修一((株)三菱化学安全科学研究所), 鬼頭暢子(富山化学工業(株)), 中村哲(キヤノン(株)), 中村好志(椋山女子学園大学), 大石英俊(大日本製薬(株)), 佐々木聡(高砂香料工業(株)), 嶋田佐和子((財)食品農医薬品安全性評価センター), 土屋敏行(萬有製薬(株)), 宇野芳文(三菱ウェルファーマ(株)), 鷲塚昌隆(ゼリア新薬工業(株)), 矢島聡(高砂香料工業(株)), 山本康人(ライオン(株)), 山村英二(三菱ウェルファーマ(株)), 八城友子(キヤノン(株)), Alternatives to Laboratory Animals, 33, 619-639(2005)

Bhasプロモーション試験法は、反応性、簡便性、コストの面で優れた試験法であることから、発がんプロモーション試験法としての実用化をめざし、産学公14機関の参加による研究室間再現性確認のためのバリデーショナルスタディーを実施した。12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)とlithocholic acid(LCA)について、いずれの研究機関でも陽性結果になることを確認した後、他の12化合物についてブラインド方式により1化合物あたり4研究機関で試験を実施した。8化合物については、4研究機関で同一の判定結果が得られた。他の4化合物のうち2化合物は、1研究機関のみで他の3機関と異なる判定となった。全体として判定結果の一致性は高かった。研究の過程でいくつかの問題点が浮かび上がった。それ

らの問題点は、注意深く前培養を行うことの重要性及び細胞毒性の強い化学物質についての濃度設定であった。問題点はその都度解析し、プロトコルの見直しを行った。本研究によりプロモーション活性が陽性と判定された化合物を3つのタイプに分けた。T-タイプは形質転換フォーカスが形成する濃度で顕著な増殖を示すTPA、メゼレイン、PDDとインスリンである。LCAとオカダ酸は形質転換フォーカスが形成される濃度で細胞毒性を示す化合物で、これらはL-typeに属する。プロゲステロン、カテコール、サッカリンはほとんど細胞毒性のない濃度でフォーカスを形成するためM-typeとした。このようにBhas promotion assayにおける形質転換フォーカス形成に異なるタイプが存在することは、発がんプロモーションのメカニズムを解明するための手がかりとなると考えられた。

粒径別に分級採取した空気浮遊粒子の発がんプロモーション活性

大森清美(神奈川衛研), 中島大介, 江副優香(国立環境研究所), 森 康明, 伏脇裕一(神奈川衛研), 遠藤 治(国立保健医療科学院), 武田 健(東京理科大学), 後藤純雄(国立環境研究所), 環境化学, 16, (1), 119-123 (2006)

空気浮遊粒子の発がんプロモーション活性評価として、13段階の粒径別に分級採取した空気浮遊粒子について、Bhas42細胞を用いた形質転換試験を実施した。その結果、粒径 $2.5\mu\text{m}$ 未満の粒子は単位粒子量当たりのフォーカス数が多く、 $0.06\mu\text{m}$ 未満の微細粒子が最も高い値を示した。また、単位空気量当たりのフォーカス数は、粒径 $0.76\mu\text{m}$ 付近の3フラクションが高値を示し、 $0.06\mu\text{m}$ 未満の微細粒子は4番目に高い値であった。以上により、粒径 $1\mu\text{m}$ 未満の微小粒子には空気浮遊粒子中の発がんプロモーターの70%以上が含まれ、肺内沈着率の高い微細粒子になるほど発がんへの影響も大きくなることが示唆された。

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

渡邊裕子, 甲斐茂美(神奈川衛研), 三谷智雄(藤沢保健所食品衛生課), 横山洋司(厚木保健所食品衛生課), 岸美智子(神奈川衛研), 食衛誌, 46(4), 139-147(2005)

卵・乳原材料の使用量および加工工程の明らかな食肉加工品および冷凍食品を用い、アレルギー物質の検出について検討を行った。卵原材料の検出では、ELISA法で偽陰性を示す食品が16食品のうち6食品であったが、抽出溶液の改良または、オボムコイドキットの利用により改善

することができた。冷凍食品で卵原材料の製造ラインにおけるコンタミネーションの例が確認された。乳原材料では、検査法に示された2種のキットを用いたELISA法で良好な判定結果が得られた。ウエスタンブロット法では、卵・乳使用食品のアレルギー物質はいずれの食品においても確認することができた。

Screening and quantitative analysis for sulfonylurea-type oral antidiabetic agents in adulterated health food using thin layer chromatography and highperformance liquid chromatography

(健康食品に添加されるスルホニルウレア系糖尿病治療薬のスクリーニングおよび定量法)

熊坂謙一, 小島尚(神奈川衛研), 本多秀雄(東京薬科大学), 土井佳代(神奈川衛研), J. Health Sci., 51 (4) 453-460 (2005)

健康食品に医薬品成分が添加される事例が相次ぎ、服用により健康被害が発生する事例もある。しかし、このような製品を対象とした医薬品成分の分析法はほとんど整備されておらず、分析が困難である場合が多い。そこで、健康食品に添加された糖尿病治療薬6種のスクリーニングおよび定量法について、TLC(薄層クロマトグラフィ)法およびHPLC(高速液体クロマトグラフィ)法により検討した。まず、スクリーニング法を検討した結果、TLC法では展開溶媒に酢酸n-ブチル/ぎ酸混液を使用することにより良好な分離が得られ、スポットの検出はドラージェンドルフ試液、30%硫酸等の発色試薬による呈色確認が有効であった。HPLC法ではODSカラムを用いた逆相分析条件により良好な分離が得られた。また、定量法の検討はHPLC法により行い、アセトン抽出により適切な添加回収率が得られた。以上の結果、今回確立した分析法は、健康食品中の糖尿病治療薬の分析において有効であることが確認された。

大学新築校舎における室内環境汚染化学物質の濃度推移の特性と類型化

伏脇裕一, 森 康明(神奈川衛研), 粕谷奈穂, 村上和雄(東京家政大学), 岡 敬一(神奈川環境科学センター), 環境化学, 15, 2, 321-333 (2005)

大学新築校舎における室内環境汚染化学物質の濃度推移とそれらの類型化を試みた。その結果、ホルムアルデヒドのような化学物質は温度の影響を受けて夏期に高濃度を示したが、年間を通してみると濃度は減衰していた。

一方、トルエンや酢酸エチルのような化学物質は竣工直後から相対的に低濃度であり、温度の影響を受けずに時間の経過と共に濃度の増加と減少を繰り返していた。

測定したデータをクラスター分析で類型化することができた。クラスター分析の結果より、経月変化、暖房時、冷房時とでは多少類型化が異なっていた。このことは、室内の温度等の影響や化学物質の持つ沸点、蒸気圧、水溶解度等の物性値等の特性によって化学物質がそれぞれ異なる挙動を示したためと考えられる。

室内環境中のホルムアルデヒド簡易測定法の信頼性評価

伏脇裕一, 辻 清美, 仲野富美, 長谷川一夫, 森康明 (神奈川衛研), 鈴木孝治 (慶應義塾大学理工学部), 環境化学, 15, 4, 871-877 (2005)

室内環境中のホルムアルデヒドの簡易測定法の信頼性を評価する目的で、現在用いられている簡易測定法と厚生労働省が指定した標準法との比較を行った。その結果、簡易測定法である検知管法、吸光光度法、試験紙光電光度法と標準法とは、それぞれ良好な相関が得られ、測定値も一致したことから実用性が認められた。但し、検知管の場合については、アセトン類等の共存物質の影響に注意を払う必要がある。また、簡易測定法である検知紙法は定性的かつ簡易な方法であり、スクリーニング方法の一つとしての実用性が認められた。

Simultaneous analysis of termiticides in indoor air by using gas chromatography mass spectrometry

(GC/MSによる室内環境中の防蟻剤の一斉分析)

辻 清美, 伏脇裕一, 森 康明 (神奈川衛研), 嵐谷 奎一 (産業医科大学), 中島大介, 藤巻秀和, 後藤純雄 (国立環境研究所), J. UOEH (産業医大雑誌), 27, 151-160 (2005)

ポンプで吸引した空気試料から、防蟻剤を捕集するためのフィルター (Empore C18など3種類) や抽出溶媒, 抽出方法 (超音波等), GC/MSを用いた13種類の同時, かつ高感度に分析できる測定方法を詳細に検討した。その結果、ポンプで吸引した室内空気試料のフィルター (Empore C18, 石英フィルター) による捕集, 捕集した防蟻剤成分のアセトンによる溶出とGC/MSによる測定から室内空気中の防蟻剤の13成分の一斉分析法を確立した。各物質の定量下限値は空気 2 m³採取したとき, 0.02 μg/m³, 回収率は66-100%, 相対標準偏差3.7-14.2%であった。

Bacterial degradation of microcystins and nodularin

(マイクロシスチンとノジュラリンの微生物分解)

今西 進, 加藤 創, 水野雅義, 原田健一 (名城大学), 辻 清美 (神奈川衛研), Chemical Research in Toxicology, 18, 591-598(2005)

湖水から分離したB-9株によるラン藻類が産生する肝臓毒、環状ペプチドの分解をLC/ITMSを用いて解析した。B-9株抽出液とタンパク分解酵素阻害剤を用い、マイクロシスチン-LRの分解挙動を観察した結果、環状ペプチドを構成するArg-Adda, Ala-leuから Adda-Gluのペプチド結合の加水分解を経て無毒な2個の分解中間体が生成し、最終的にはAddaを生成することが判明した。さらに、B-9株による他のマイクロシスチン類とノジュラリンの分解挙動を検討結果、LRと同様にArg-Addaペプチド結合を有するマイクロシスチンとノジュラリンは完全にAddaに分解した。それに対して、Arg-Addaペプチド結合の代わりにphe-Addaを有するマイクロシスチンLFの分解は遅いことから、最初に切断されるペプチド結合の構成アミノ酸の違いが分解速度に影響すると推察された。

Accumulation of radiocesium in wild mushrooms collected from a Japanese forest and cesium uptake by microorganisms isolated from the mushroom-growing soils

(日本の森林から採取した野生キノコにおける放射性セシウムの蓄積とキノコが生息していた土壌から分離した微生物によるセシウム取込み)

桑原千雅子 (神奈川衛研), 福本敦, 大曾根彩子, 古家信敬 (東邦大学), 柴田尚 (山梨森林総研), 杉山英男 (国立保健医療科学院), 加藤文男 (東邦大学), Science of the Total Environment 345, 165-173 (2005)

富士山の亜高山帯の森林よりキノコと土壌を採取し、¹³⁷Csと安定Csを定量した。キノコ中の¹³⁷Csは291-7950 Bq kg⁻¹乾, 安定Csは4.69-58.1 mg kg⁻¹乾であった。キノコ中の¹³⁷Csと安定Cs濃度は、ともに一般の農作物に比べると高かった。土壌中の¹³⁷Csは3.18-149 Bq kg⁻¹乾, 安定Csは0.618-2.18 mg kg⁻¹乾であった。土壌から出現する放線菌ならびに細菌の頻度は、培地へ添加する安定Cs濃度の増加とともに減少した。また、土壌から出現する放線菌と細菌の頻度は、土壌中の安定Cs濃度と関係は認められなかった。放線菌は25mM Cs存在下では、いずれの土壌からも生育できなかった。しかし、細菌は50mM Cs存在下において、全ての土壌から生育でき、さらに100mM Cs存在下においても土壌試料の約70%から生育できた。in vitro実験では、5mM Cs存在下における放線菌ならびに細菌のCs取込みは高く、キノコと同様にCsを蓄積していた。これらの結果より、放線菌は細菌に比べるとCsに対して感受性が高く、さらに放線菌のうち数株は、5mM Cs存在下において、高いCs蓄積性を示すことが分かった。

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.36 (September, 2006)

CONTENTS

Short reports

Isolation of <i>Legionella</i> spp. Using an Amoebic Coculture Procedure Yuko WATANABE, Chieko TAKAHASHI, Hitomi OHYA and Norio OKAZAKI	1
Molecular Typing for <i>Mycobacterium tuberculosis</i> by Variable Numbers of Tandem Repeats Analysis Chieko TAKAHASHI, Toshiaki TOMIOKA, Yuji WATANUKI Kei NISHIMORI and Norio OKAZAKI	4
Study of Genetic Technique in a Mixture Infection by <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Campylobacter coli</i> Rieko SUZUKI, Yoshimi IMAI, Yoshiko GOTO, Tetsuo YASUDA and Takayasu NIKKAWA	8
A Food-borne epidemic of Group A Streptococcal Pharyngitis Rieko SUZUKI and Takayasu NIKKAWA	12
Study of Selective Enrichment Method of Heat-injured <i>Listeria monocytogenes</i> IID577. Hiroshi TERANISHI, Ichiro FURUKAWA, Katsuhiro AIKAWA Yoshio ASAI, Yoichi ONOUE and Takayasu NIKKAWA	14
Analysis of Veterinary Drugs in Livestock Foods Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI and Michiko KISHI	19
Examination of Foods Containing Allergic Substances under the Labelling System Hiroko WATANABE, Shigemi KAI and Michiko KISHI	23
The Analytical Method for Octyl Salicylate Determination in Cosmetics with High Performance Liquid Chromatography Ayako MATSUZAKA, Rie ITOH, Nobuo SATO and Kayo DOI	27
Time Course of p-Dichlorobenzene Concentration in Wooden House Indoor Air Kazuo HASEGAWA, Fumi NAKANO, Kiyomi TSUJI and Yuichi FUSHIWAKI	30
Monitoring of Pesticides Evaluating Water Quality in Sagami River Sadao WATANABE and Hitoshi UEMURA	33
Problems of the Preservation of Glass Ampoule for Formaldehyde Standard Solution (Methanol Solution) Masaki IWABUCHI and Kazuo HASEGAWA	37
Concentration of Artificial Radionuclides and Trace Elements in Daily Intakes Ikuyo IJIMA, Hiroyuki TAKAGI and Kenji TOMURA	41
Data	
Occurrence of Tsutsugamushi Disease in Kanagawa Prefecture (2005) Yumiko FURUYA and Takashi KATAYAMA	45
Occurrence of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (2005) Kayoko MIYAHARA, Takashi KATAYAMA and Yumiko FURUYA	48
Surveillance of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (2004, 2005) Yoshimi DATE, Takashi KATAYAMA and Yumiko FURUYA	51
Simultaneous Determination of Pesticide Residues in Agriculture Products Using Gas Chromatograph Mass Spectrometer Kumiko SATO, Teruhisa FUJIMAKI, Michiko KISHI and Shin-ichi ITOH	53
On the Residual Levels of Food Chemical Contamination in Kanagawa Prefecture (2004,2005) Takeshi AKABOSHI, Kumiko SATO, Takako HAYASHI, Hiroko WATANABE Shigemi KAI, Teruhisa FUJIMAKI and Michiko KISHI	56
Investigation on the Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified Foods in Kanagawa Prefecture (2005) Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA, Hiroko WATANABE Haruko SEKIDO, Hiroko KISHI and Toshiharu YAMADA	59
Abstracts of original papers by research staffs (April, 2005 - March, 2006)	62