

神奈川県衛生研究所研究報告

第38号 (平成20年9月)

目 次

短報

感染症の監視と予防に関する調査研究

河口周辺における糞便汚染指標菌の解析 黒木俊郎, 伊東久美子, 石原ともえ, 尾上洋一	1
散発性下痢症患者便から検出されたカンピロバクター分離菌株の解析 伊東久美子, 石原ともえ, 黒木俊郎	4
神奈川県域で検出されたノロウイルスの解析 片山 丘, 宮原香代子, 古屋由美子	8
呼吸器感染症からのヒトメタニューモウイルスの検出 渡邊寿美, 齋藤隆行	12
新しい遺伝子型別法であるVariable Number of Tandem Repeat (VNTR) を利用した レジオネラ ニューモフィラの型別について 渡辺祐子, 高橋智恵子, 大屋日登美, 岡崎則男	15

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

切り身魚からのヒスタミン生成菌の検出 伊達佳美, 古川一郎, 相川勝弘, 浅井良夫, 尾上洋一	19
チョコレート製品及びチューインガム中のカフェイン及びテオブロミン含有量の測定 岸 弘子	23
食品中の乳化剤, ポリソルベートの分析 岸 弘子	26
組換えDNA検査における食品の特性と結果の動向 —平成19年度 パパイヤ, コメ, トウモロコシおよび大豆の組換えDNA検査結果より— 大森清美, 服部愛希, 渡邊裕子, 関戸晴子, 岸 弘子	30
高速液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた食品中の合成着色料の分析 関戸晴子, 岸 弘子	35
高速液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析計による農産物中の残留農薬一斉試験法の検討 林 孝子, 藤巻照久, 伊藤伸一	39
誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)によるミネラルウォーター中の金属の分析方法の検討 岩淵真樹, 長谷川一夫	44

くらしの安全・安心に関する調査研究

温泉源周辺土壌からのレジオネラ属菌の分離について 石野珠紀, 安藤利恵, 山本陽子, 沖津忠行	47
高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の紫外線吸収剤 2,2'-メチレンビス(6-(2Hベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール)の分析 仲野富美, 河合伸亮, 佐藤信夫, 小島 尚	51

健康増進と疾病予防に関する調査研究

高等学校における薬物乱用防止講話の効果について —統計手法を用いた考察— 佐藤善博, 折原直美, 小島 尚	55
薬物乱用防止講話における高校生の意識について —統計手法を用いた考察— 折原直美, 佐藤善博, 小島 尚	59

資料

感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県域の定点調査における百日咳菌の検出状況（平成19年度）
高橋智恵子，大屋日登美，渡辺祐子，岡崎則男 63

神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（平成19年度）
石原ともえ，伊東久美子，黒木俊郎 66

神奈川県におけるウイルス性胃腸炎の集団発生状況（平成19年度）
宮原香代子，片山 丘，原田美樹，古屋由美子 69

感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況（平成19年度）
片山 丘，原田美樹，宮原香代子，古屋由美子 72

神奈川県におけるつつが虫病の発生状況（平成19年度）
原田美樹，片山 丘，宮原香代子，古屋由美子 75

食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

食品汚染物質残留実態調査結果（平成19年度）－動物用医薬品，カビ毒，農薬，ベンゼン等－
佐藤久美子，赤星 猛，林 孝子，甲斐茂美，中村廣志，藤巻照久 78

ミネラルウォーター中の全有機炭素（TOC）調査結果
長谷川一夫，岩淵真樹 82

他誌掲載論文抄録（平成19年4月～平成20年3月） 85



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所研究報告編集委員（平成20年度）

今 井 光 信（委員長）	増 田 友 克
木 内 久美子	折 原 直 美
齋 藤 隆 行	高 橋 智恵子
関 戸 晴 子	熊 坂 謙 一
佐 藤 利 明	丹 羽 加代子（事務局）

神奈川県衛生研究所研究報告第38号

平成20年9月発行

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

短報

河口周辺における 糞便汚染指標菌の解析

黒木俊郎, 伊東久美子, 石原ともえ, 尾上洋一

Analysis of fecal indicator bacteria in estuary area.

Toshiro KUROKI, Kumiko ITO,
Tomoe ISHIHARA and Yoichi ONOUE

はじめに

河川水中には生息の場として増殖する微生物も存在するが、糞便由来細菌のように周囲の環境から混入する微生物もあり、その中には病原性を有する微生物も含まれる。こうした種々の微生物は河川水とともに海に流入する。海浜環境は食品である魚介類の生産あるいは海水浴等のレジャーといった人の生活あるいは産業と密接に係わる場として欠かせない。しかし、海を汚染する病原体による海水浴での感染や海産物の汚染が懸念されている^{1,2)}。そこで、本調査では河川から海浜への糞便由来細菌の流入を想定し、糞便汚染指標である大腸菌群と大腸菌を、また糞便由来の病原菌として *Salmonella* を取り上げ、それらの分布状況を調査して海浜における汚染の実態を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 採水方法

採水は2005年7月19日、8月15日、8月29日、9月27日、10月3日、11月28日、12月19日、6月12日、7月25日、8月30日、9月26日、10月17日に計12回行った。採水地点は神奈川県内の中央部を流れる二級河川の金目川の河口から上流へ約1.3kmの地点と、河口から東西両側へ100m、300mおよび500m離れた砂浜の3地点ずつ、合わせて7地点とした。河川においては川の中央付近の河川水を採取した。砂浜においては、波打ち際で採水した。各地点の試料の搬送には滅菌した2lのポリ容器1本あるいは2本を用いた。

2. 大腸菌群数および大腸菌数の測定

試料水中の大腸菌群数の測定はLB法を用いて最確数(MPN)法(3本法)により行った。2倍濃度LB培地(日水)10mlに試料原液10mlあるいは10倍段階希釈した試料10mlを加え、36℃、48時間培養した。培養後に黄変およびガス産生が見られた試験管を陽性とした。LB法陽性試験管から1白金耳をEMB培地(Oxoid)に接種後、36℃、24時間培養し、金属光沢のある中心が黒色の集落が得られた試験管を大腸菌陽性とした。各希釈段階における陽性試験管の本数から最確数表により大腸菌群数あるいは大腸菌数を求めた。測定は2005年9月27日、11月28日、12月19日、2006年6月12日、8月30日、9月26日、10月17日に合わせて7回行った。

3. *Salmonella* 菌数の測定

金目川の河口から1.3km上流地点の河川水の *Salmonella* の菌数測定は、最確数法(3本法)により行った。試料水1,000mlは孔径0.45 μ mの滅菌メンブランフィルター(Millipore)でろ過し、細菌を捕捉したメンブランフィルターを滅菌Buffered Peptone Water (BPW) (Oxoid) 30mlで36℃、20~22時間、前培養した。試料水100mlおよび10mlは同量の2倍濃度滅菌BPWに、試料水1mlは滅菌BPW10mlに加え、36℃、20~22時間、前培養した。各培養液の1mlをハーナ・テトラチオン酸塩培地(栄研化学)10mlに接種後、42℃、18~20時間、選択増菌培養した。培養液の1白金耳をSS寒天培地(栄研化学)およびESサルモネラ培地II(栄研化学)に接種後、36℃、20~22時間培養した。培養後、*Salmonella* 様集落を生化学的性状により同定し、さらに市販の型別用血清(デンカ生研)を用いてO型別およびH型別を行った。*Salmonella* の菌数は、段階ごとの陽性数から最確数表より求めた。*Salmonella* の測定は採水を行った12回すべてで実施した。

4. 流量の測定

金目川の河口から約1.3km上流の地点において、直読式電磁流速計AEM1-D(アレック電子)を用い、川岸から2m間隔で流速と水深を測定し、流量を算定した。測定地点の川幅は通常約30mであった。

結果および考察

金目川と河口周辺の海水中的大腸菌群数および大腸菌数の測定は2005年9月から2006年10月までに7回行った。採水地点の大腸菌群数および大腸菌数の結果は図1に示した。河川の定点における大腸菌群数および大腸菌数はそれぞれ幾何平均 $1 \times 10^4 / 100 \text{ml}$ ($1.3 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^4 / 100 \text{ml}$) および $1.6 \times 10^3 / 100 \text{ml}$ ($45 \sim 1.1 \times 10^4 / 100 \text{ml}$) であった。海水では河口から100mの地点は東側は $4.0 \times$

10²/100ml (22~4.6 x 10³/100ml) および25/100ml (検出限界以下~1.5 x 10³/100ml), 西側は2.5 x 10²/100ml (9.1~1.1 x 10⁴/100ml) および16/100ml (検出限界以下~2.1 x 10²/100ml), 300mの地点は東側は2.0 x 10²/100ml (4.5~2.4 x 10³/100ml) および16/100ml (検出限界以下~9.3 x 10²/100ml), 西側は1.3 x 10²/100ml (7.3~2.4 x 10³/100ml) および16/100ml (検出限界以下~2.4 x 10²/100ml), 500mの地点は東側は13/100ml (4.0~49/100ml) および1/100ml (検出限界以下~2.0/100ml), 西側は63/100ml (17~4.9 x 10²/100ml) および6/100ml (2.0~46/100ml) であった。したがって、河川水が海に流入すると、大腸菌群数は河口から100m離れた地点では1.5log (10^{-1.5}), 300m離れた地点では1.8log (10^{-1.8}), 500m離れた地点では2.2~2.9log (10^{-2.2~2.9}) 減少した。しかし、測定日ごとの菌数は河口の東側と西側で異なり、また東側と西側のどちらの菌数が多いかは測定日により異なっていた。これは河口から海に注ぎ出た河川水が均等に海水に混ざって広がるのではなく、河川から海への流入方向や相模湾の循環流、風向の影響を受けて、相模湾に流入した河川水が東側あるいは西側に向かって浜に沿って流れることによると推測された。日向けの報告によれば、相模湾の表層の循環流は湾北部では反時計回り(沿岸部では東から西の流れ)の場合と時計回り(沿岸部では西から東の流れ)の場合があり、短周期で方向が変わるとされた³⁾。この報告は、今回の調査の結果を裏付けている。

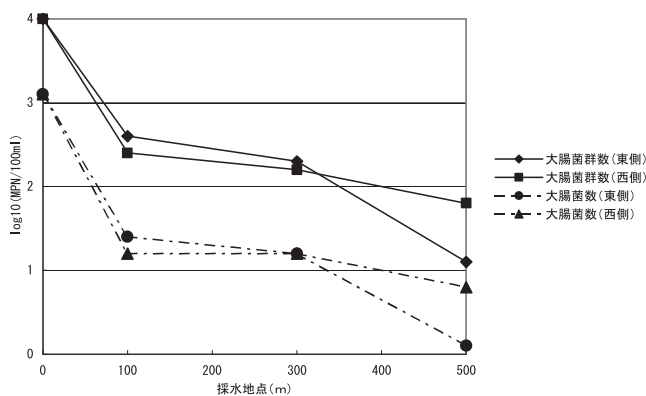


図1 採水地点における大腸菌群数および大腸菌数

そこで、河口からの方向に関係なく、測定日ごとに菌数の多い側 (I) と少ない側 (II) の2グループに分け、それぞれのグループにおける各地点の大腸菌群菌数と大腸菌数の幾何平均を図2に示した。7回測定したうち、流入水が東側へ流れたと推測されたのは3回、西側は4回であった。I では大腸菌群数は河口から100m離れる

ごとに0.4log程度ずつ減少するのに対して、IIでは河口から100m離れると急激に2.1log減少し、それから先の減少は緩やかであった。いずれの採水地点でも大腸菌数は大腸菌群数の1/10程度であったが、減少の状況は大腸菌群数とほぼ同様であった。

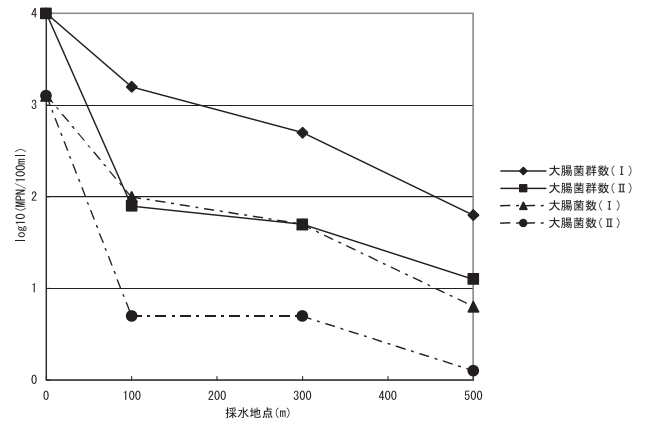


図2 相模湾に流入した河川水の流れる方向による菌数の変化 I、II: 本文参照

Salmonellaの菌数測定は2005年7月から2006年10月までに合わせて12回実施し、このうちSalmonellaは9回(75%) 検出された(表1)。検出された血清型はS. Agona, S. Infantis, S. Mbandaka, S. Newport, S. Saintpaul, S. SchwarzengrundおよびO4:i:-であった。河川の流量は12回のうち9回測定した。流量は2.9~9.0m³/sで平均5.1m³/sであった。9回の測定のうち、Salmonellaは6回検出され、このときのSalmonella菌数は0.36~1.5/100ml(平均0.62/100ml)であった。流量と100ml当たりの菌数から、測定時に1秒間に1.2~5.5 x 10⁴(平均2.92 x 10⁴)のSalmonellaが河川水とともに流れていると推定された。

Salmonellaは下痢症や食中毒の原因として主要な細菌であるとともに、広く環境中に存在していることが知られており、下水や畜産排水とともにSalmonellaが河川に流入し、河川を汚染する。わが国の他の河川でもSalmonellaは頻りに検出されている^{4,5)}。海に流入したSalmonellaは海水を汚染し、海水浴やサーフィンといったマリレジャーでの感染や、魚介類への2次的汚染を起こす原因となることが推定される^{1,2)}。今回の調査で得られたデータから、河口から100m離れると菌濃度は1/10程度であり、500m離れると1/100程度に減少することが観察された。今回の調査の範囲では河川水中のSalmonellaの菌数は低レベルであったが、12回の測定のうち43/100ml検出されたことがあり、高濃度の汚染の場合は河口周辺の海浜では十分に希釈されず、感染リ

表1 金目川の流量と *Salmonella* 菌数

測定日	水温(°C)	流量(m ³ /s)	<i>Salmonella</i>		血清型
			菌数(MPN/100ml)	菌数(MPN/s)*	
1 2005年7月19日	27.0	5.6	0.36	2.0 x 10 ⁴	Newport, O4:i:-
2 2005年8月15日	28.0	6.1	<0.36	—	
3 2005年8月29日	26.5	9.0	0.36	3.2 x 10 ⁴	Agona, Saintpaul, O4:i:-
4 2005年9月27日	21.0	5.0	<0.36	—	
5 2005年10月3日	—	—	0.73	—	O4:i:-
6 2005年11月28日	12.5	3.4	0.36	1.2 x 10 ⁴	Infantis, O4:i:-
7 2005年12月19日	6.8	2.3	<0.36	—	
8 2006年6月12日	19.5	8.0	0.43	3.4 x 10 ⁴	Mbandaka
9 2006年7月25日	22.0	—	0.036	—	Infantis
10 2006年8月30日	25.0	—	43	—	Agona
11 2006年9月26日	18.5	3.7	1.5	5.5 x 10 ⁴	Schwarzengrund, O4:i:-
12 2006年10月17日	20.0	2.9	0.75	2.2 x 10 ⁴	O4:i:-

*:河川流水における1秒あたりの菌数

スクがあることが懸念された。*Salmonella*の感染菌量は血清型や株あるいは宿主の状態など種々の要因により異なるとされているが、50個以下といった少数の摂取でも感染が成立することがあるとされている^{6,7)}。河口周辺においてサーフィンあるいは水浴により比較的大量の海水を摂取した場合に感染が成立する可能性があると推定される。

謝 辞

直読式電磁流速計の使用を快諾いただき、また流量データの解析にご協力をいただきました、神奈川県環境科学センター環境保全部 大塚知泰氏に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) Prieto, M.D., Lopez, B., Juanes, J.A., Revilla, J.A., Llorca, J. and Delgado-Rodriguez, M.: Recreation in coastal waters: health risks associated with bathing in sea water, *J.Epidemiol. Community Health*, **55**, 442-447 (2001)
- 2) Minette, H.P.: Salmonellosis in the marine

environment. A review and commentary, *Int. J. Zoonoses*, **13**, 71-75 (1986)

- 3) 日向博文, 宮野仁, 柳哲雄, 石丸隆, 粕谷智之, 川村宏: 大島西水道からの黒潮系暖水流入時における相模湾表層循環流の短周期変動特性, *海の研究*, **12**, 167-184 (2003)
- 4) 熊正昭: *Salmonella*に関する調査研究(第2報)河川水の汚染状況, *長崎県衛生公害研究所報*, 昭和48年度88-91 (1973)
- 5) 磯野利昭, 大久保忠敬, 小田隆弘, 田中恭生: 福岡市内河川の*Salmonella*汚染調査, *福岡市衛生試験所報*, **2**, 28-31 (1976)
- 6) Vought, K.J. and Tatini, S.R.: *Salmonella* Enteritidis contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak, *J. Food Prot.*, **61**, 5-10 (1998)
- 7) Koch, J., Schrauder, A., Alpers, K., Werber, D., Frank, C., Prager, R. et al.: *Salmonella* Agona outbreak from contaminated aniseed, Germany, *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1124-1127 (2005)

短報

散発性下痢症患者便から検出された カンピロバクター分離菌株の解析

伊東久美子, 石原ともえ, 黒木俊郎

Epidemiological study of *Campylobacter* isolated from patients with sporadic diarrhea in Kanagawa Prefecture

Kumiko ITOH, Tomoe ISHIHARA
and Toshiro KUROKI

はじめに

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) はニワトリ, ウシ, ブタ, 水鳥などの腸管に分布し, 直接的あるいは間接的に食品や水を介して人に感染する. 細菌性食中毒の原因菌としても検出頻度の高い菌の一種であり, 特に乳幼児や学童の下痢症として重要である. カンピロバクターが原因の食中毒事件数は, 1997~1999年まではサルモネラと腸炎ビブリオに次いで多く, 2001年以降は首位を占めている¹⁾. また, 1999~2005年にヒトから分離されたカンピロバクターの菌種のうち, *C. jejuni*は97%を占め *C. coli*は3%にも満たない¹⁾.

当所では感染症の予防とまん延防止を目的として, 県域の協力小児科医療機関で感染性胃腸炎と診断された散発性下痢症患者便の腸管系病原菌検査を実施している. 著者らは散発性下痢症患者便から検出されたカンピロバクターの分離菌株について, 細菌学的および分子疫学的解析をしていくことは, 今後のカンピロバクター感染症の発生要因や感染経路を追求していく上で重要であると考える. 今回, 散発性下痢症患者便から検出された *C. jejuni* と *C. coli* の分離菌株について疫学データの基礎となる血清型別, 薬剤感受性試験およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子解析を実施したので報告する.

検査対象および方法

1. 検査対象

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

平成19年4月から平成20年3月にかけて当所に搬送された散発性下痢症患者便168検体を検査対象とした.

2. 方法

1) 検出方法

カンピロバクターの検出には, 直接培養の分離培地として, プレストン寒天培地 (Oxoid) およびCCDA培地 (Oxoid) を用い, これらに検体を塗抹し, 42°C, 40~48時間微好気培養した. 増菌培養はプレストン液体培地 (Oxoid) に検体を接種し, 42°C, 18~24時間微好気培養後, 直接培養と同様に行った. 分離平板上の疑わしい集落を1検体あたり5~10集落釣菌し, 伊藤の記述した方法²⁾ に準じて菌の同定を行い, Lintonら³⁾ の報告したPCRにより菌種を確認した.

2) 血清型別試験

*C. jejuni*と同定した菌株について, 市販のカンピロバクター免疫血清 (デンカ生研) を用いてPennerの血清型別を行った.

3) 薬剤感受性試験

供試薬剤はストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), アミノベンジルペニシリン (ABPC), クロラムフェニコール (CP), スルファメトキサゾール/トリメトプリム (ST), テトラサイクリン (TC), ノルフロキサシン (NFLX), シプロフロキサシン (CPFX), オフロキサシン (OFLX), ナリジクス酸 (NA), エリスロマイシン (EM), ホスホマイシン (FOM) の12薬剤とし, Sensi-Disk (BBL) を用いてCLSI法 (米国臨床検査標準化協会) に準拠した一濃度ディスク法で実施した. すなわち, 検出された *C. jejuni* と *C. coli* の菌株について, 5%ウマ脱線維素血液加ミューラーヒントン培地 II (BBL) と上記ディスクを使用し, 42°C, 24時間微好気培養後, 感受性を判定した.

4) PFGEによる解析

分離菌株を5%ウマ脱線維素血液加Blood Agar Base No.2培地 (Oxoid) で42°C, 24時間微好気培養後, 平板上の集落を精製水でMacFarland No.3程度に懸濁し, Ribotら⁴⁾ の方法に準じてPFGE用のプラグを作製した. 作製したプラグはまず制限酵素 *Sma* I (Roche) で処理後, CHEF-Mapper (Bio-Rad) を用いて電気泳動を行い, 泳動後のPFGE解析はFingerPrinting II (Bio-Rad) を使用して行った. *Sma* I 処理によるPFGE解析で相互に同一のPFGEパターンを示した検体の分離菌株のプラグは, 次に2種類の制限酵素を使用して二重に処理するdouble-digestionにより *Sma* I と *Kpn* I (Roche) および *Sma* I と *Ksp* I (Roche) の組み合わせで, 泳動像の比較を行った. 泳動条件は単独処理および double-digestion共に電圧6V/cm, パルスタイム6.8秒から38.4秒, バッファー温度14°C, 泳動時間19時間で実施した.

表 カンピロバクターのPenner血清型および薬剤耐性パターン

検体 No.	菌種	Penner 血清型	薬剤耐性パターン (約菌集落数)
1	C.j	UT	NFLX・CPFX・OFLX・NA・ST・TC(5) NFLX・CPFX・OFLX・NA・ST(1)
	C.c	NT	NFLX・CPFX・OFLX・NA・TC・SM・KM(5)
2	C.j	G 群	ST・TC(6)
3	C.j	A 群	ST(6)
4	C.j	L 群	感受性(6)
5	C.j	B 群	NFLX・CPFX・OFLX・NA・ST(5) NFLX・CPFX・OFLX・NA(1)
		G 群	ST・TC(6)
7	C.j	C 群	ST(6)
8	C.j	D 群	ST(6)
9	C.j	Z ₆ 群	ABPC(4)
10	C.j	Y 群	ABPC・ST・TC(6)
11	C.j	C 群	感受性(6)
12	C.j	R 群	感受性(1)
		UT	感受性(4)
13	C.j	D 群	TC(6)

C.j : *C. jejuni* UT: 型別不能C.c : *C. coli* NT: 血清型別試験実施せず

結 果

1) 検出状況

カンピロバクターは168検体中13検体(7.7%)から検出された。このうち12検体から *C. jejuni* が、1検体から *C. jejuni* と *C. coli* が同時検出された。

2) 血清型別試験

検出されたカンピロバクターのPenner血清型および薬剤耐性パターンを表に示した。 *C. jejuni* の血清型はPennerのC群、D群、G群が各2検体から検出された。その他A、B、L、R、Y、Z₆群および型別不能が各1検体であった。同一検体の株は同じ血清型であったが、R群が検出された検体は型別不能の株も検出された。全てが型別不能となった検体は、 *C. jejuni* と *C. coli* が同時検出された1検体であった。

3) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は13検体から分離された株について行った(表)。この結果、3検体から分離された株は供試薬剤全てに感受性を示し、10検体から分離された株は供試薬剤のいずれか1剤以上に耐性を示した。耐性パターンは、単剤はSTが3検体、TCが1検体、ABPCが1検体、2剤はST・TCが2検体、3剤はABPC・ST・TCが1検体であった。4剤以上に耐性を示したのは2検体であり、これら2検体から分離された株は全てがNFLX・CPFX・OFLXのニューキノロン系薬剤とNAの4剤に耐性を示した。そのうちの1検体からはNFLX・CPFX・OFLXのニュー

キノロン系薬剤とNAの4剤耐性を示す株とニューキノロン系薬剤とNAおよびSTの5剤耐性を示す株が検出された。別の1検体は *C. jejuni* と *C. coli* が同時検出された検体で、分離された *C. jejuni* 株はニューキノロン系薬剤とNAおよびSTの5剤耐性を示す株と、ニューキノロン系薬剤とNA およびST・TCの6剤耐性を示す株で、 *C. coli* 株はニューキノロン系薬剤とNAおよびTC・SM・KMの7剤耐性であった。

4) PFGEによる解析

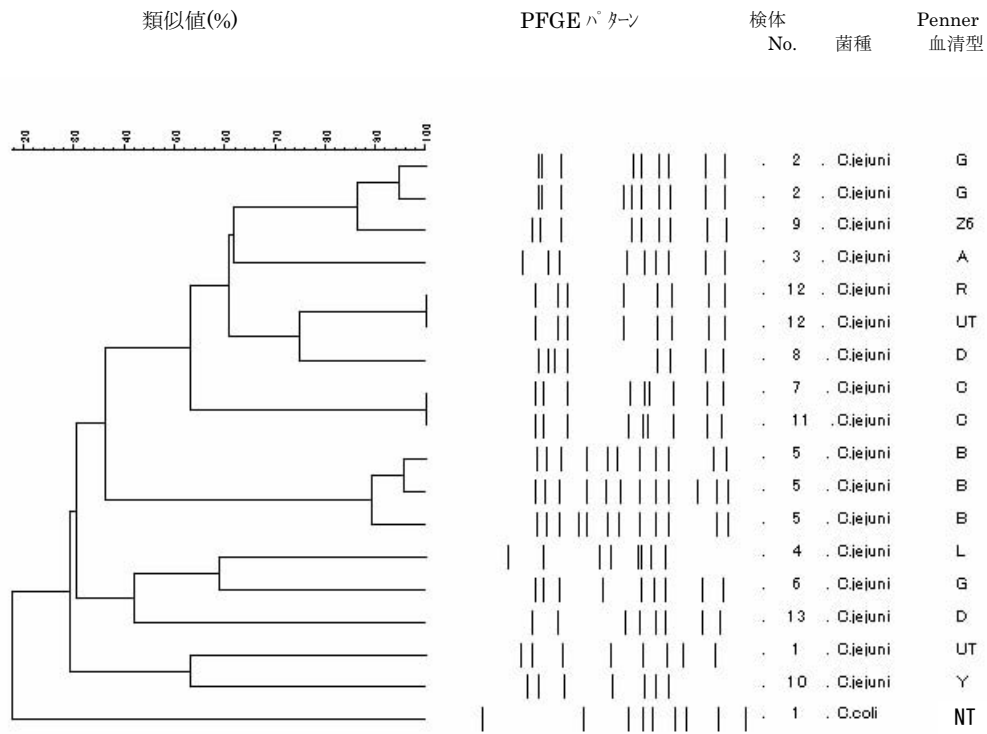
13検体から分離された株について、 *Sma* I 処理によるPFGEの結果をFingerPrinting IIで解析した。検体別分離代表株のPFGEパターンと菌種およびPenner血清型を図1に示した。同一検体からの *C. jejuni* 分離菌株においては、11検体は同一パターンを示したが、検体No.2の分離菌株はバンド1本の違いで2種類のパターンが確認され、検体No.5の分離菌株はバンド1本の違いで3種類のパターンを示した。

今回の散発性下痢症患者便から分離された代表株のPFGE解析の中で、相互に同一のパターンを示した検体はNo.7と11の分離菌株で血清型もC群で同一であった。この2検体について、さらに *Kpn* I と *Sma* I および *Ksp* I と *Sma* I でdouble-digestionした結果を図2と3にそれぞれ示した。どちらの処理方法でも2検体から検出された分離菌株は同一パターンを示した。その他に血清型が同じであったのはG群の2検体(検体No.2と6) およびD群の2検体(検体No.8と13)からの分離菌株であったが、これらの菌株は検体ごとに異なったパターンを示した。その他、血清型A、B、L、Z₆ およびY群の各検体からの分離菌株は検体ごとに異なったパターンを示した。R群が検出された1検体(検体No.12)からは型別不能の株も検出されたが、PFGEパターンは同じであった。また、検体No.1から検出された *C. coli* の分離菌株は *C. jejuni* から分離された株と全く異なるパターンを示した。

考 察

カンピロバクターは168検体中13検体(7.7%)から検出された。このうち12検体から *C. jejuni* が、1検体から *C. jejuni* と *C. coli* が同時検出され、カンピロバクター腸炎の主な起因菌は *C. jejuni* であること¹⁾ が、あらためて確認された。

近年、細菌性の感染性胃腸炎が疑われた場合にはニューキノロン系薬剤が用いられることが一般的であるが、このニューキノロン系薬剤に耐性を示す *C. jejuni* が増加しており¹⁾、ヒトの胃腸炎治療におけるニューキノロン系薬剤の使用により耐性菌が出現するとの報告がある⁵⁾。一方、ニューキノロン系薬剤耐性菌の増加はヒト由来株



UT:型別不能 NT:血清型別試験実施せず

図1 検体別分離代表株のPFGEパターン、菌種およびPenner血清型

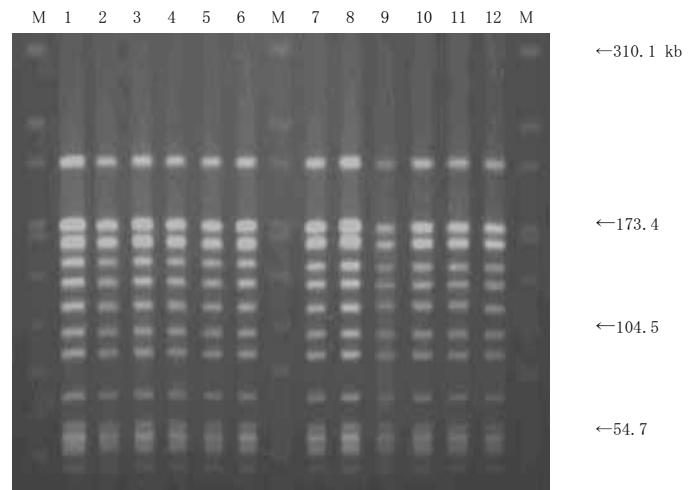
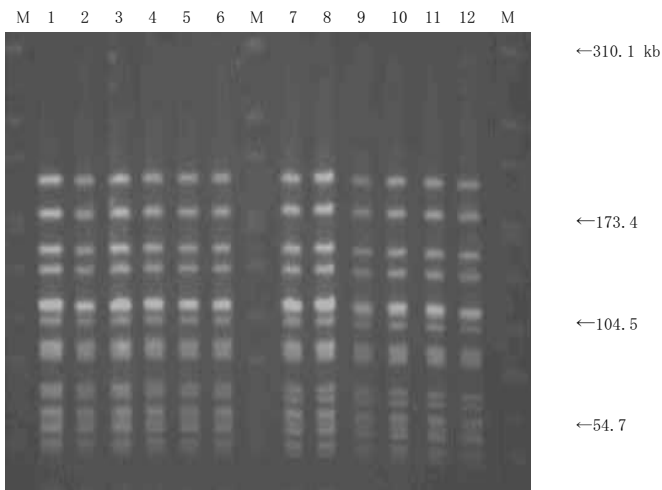


図2 Sma I と Kpn I の double-digestion による PFGE パターン

図3 Sma I と Ksp I の double-digestion による PFGE パターン

1 ~ 6 : 検体 No. 7 の分離菌株
 7 ~ 12 : 検体 No. 11 の分離菌株
 M : マーカー *Salmonella* Braenderup H9812

注釈は図2に同じ

のみならず、家畜由来株においても同様の傾向を示しており、ヒトから分離される耐性菌の多くは家畜由来の株であるとも考えられている⁶⁾。このように耐性菌出現の

背景が示されているなか、平成18年度は県域の散発性下痢症患者便からニューキノロン系薬剤に耐性を示す株は検出されなかったが⁷⁾、平成19年度は散発性下痢症患

者便からニューキノロン系薬剤に耐性を示す株が13検体中2検体(15.4%)から分離されていることから、今後薬剤耐性菌の動向を把握しておくことは必要であり、治療薬を選択する際の貴重なデータになると考える。

*C. jejuni*のPenner血清型別試験の結果は、13検体のうち血清型が判定できたのは12検体で、1検体から分離された株は型別不能であった。PFGE法と同様に遺伝子型別法に利用されているflagellin genotypingは、血清型別との相関があるとの報告もあり⁸⁾、型別不能株の精査をする上でも今後検討する必要があると考える。

PFGE解析の結果、同一検体からの分離菌株でバンドの数が1本程度異なる事例が2検体から観察された。PFGE解析において、この程度の違いを同一株と見なすかどうかを分子疫学的に判断するには、より多くの株についての解析と同時に、分離菌株の疫学情報が重要となってくる。今後は、摂食状況等を伴う集団感染事例についての解析を行う必要があると考える。

菌株間の血清型とPFGEパターンが同一であった検体No.7とNo.11の分離菌株は*Sma*Iの単独処理と、*Sma*Iと*Kpn*Iおよび*Sma*Iと*Ksp*Iのdouble-digestionの3種類いずれの処理においてもPFGEパターンが一致した。この2検体の薬剤感受性試験を比較すると、検体No.7の株はST単剤耐性で、検体No.11の株は供試薬剤全てに感受性を示した。この2検体の共通性を判断するには、摂食状況等の疫学調査が必要であるが、検体が採取された時期は約2ヶ月の間隔があることなどから調査を実施できず、疫学的解明には至らなかった。

カンピロバクターのPFGE解析の方法は報告ごとに使用される制限酵素や泳動条件が異なるが、第一選択の制限酵素としては*Sma*Iが広く使用されている。しかし、菌株間の関連性の推測は*Sma*Iのみでは十分でなく、制限酵素の違いによるPFGEパターンの比較がなされている。今回試みたdouble-digestionは2種類の制限酵素を組み合わせ二重に切断する方法で、菌株間の分別能は単独処理より高くなると考えられており、食中毒事例においてその有効性を示唆した報告もなされている⁹⁾。PFGE法はサンプルがプラグに包埋されており、制限酵素の違いでパターンの多形成が観察できる点でdouble-digestion法は今後も利用度の高い検査法であると考えられる。

制限酵素で処理したプラグは泳動後に、菌株間のバンドパターンを観察して解析が行われるが、そのパターンは複雑で、目視による判断は難しい。しかし、解析ソフトを利用することで菌株間の比較が容易になり、異なった散発事例から同一パターンが高率に分離される場合は散発的集団発生が疑われ、これらの事例が同一感染源に由来するかどうかを調査することにより、感染拡大の予

防ができると考える。

今回の解析は散発下痢症患者便13検体から分離されたカンピロバクターについて行ったが、今後も継続して分離菌株の解析を実施し、疫学データとして集積していくことが必要と考えられる。

最後に、本調査にご協力いただきました小児科医療機関および県健康増進課の方々に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

参考文献

- 1) カンピロバクター腸炎1999～2005, 病原微生物検出情報, 27, 167-175 (2006)
- 2) 伊藤武:新訂 食水系感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編, 中央法規出版, pp. 336-362, (2000)
- 3) Linton D., Lawson A.J., Owen R.J. and Stanley J.: PCR detection, Identification to species level and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples, J.Clin.Microbiol., 35, 2568-2572 (1997)
- 4) Ribot,E.M.,Fitzgerald,C.,Kubota,K.,Swaminathan,B. and Barret, T.J.:Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*, J. Clin. Microbiol., 39, 1889-1894(2001)
- 5) 小花光夫, 松岡康夫, 入交昭一郎, 殿岡弘敏: *Campylobacter* 腸炎患者の治療における問題点一特に、ニューキノロン剤使用後の耐性菌発現例に関しての検討一, 感染症学雑誌, 79, 169-175(2005)
- 6) 三澤尚明:カンピロバクター感染症, モダンメディア, 51, 45-52(2005)
- 7) 伊東久美子, 石原ともえ, 黒木俊郎: 県域の散発性下痢症患者から分離されたカンピロバクターの性状(平成18年度), 神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 70-71(2007)
- 8) Nachamkin,L.,Bohachick,K.,Patton,C.M.:Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis,J.Clin.Microbiol., 31, 1531-1536(1993)
- 9) 依田清江, 横山栄二, 内村真理子:制限酵素 double-digestion 法による pulsed-field gel electrophoresis法を用いた *Campylobacter jejuni* 集団食中毒の分子疫学的解析例, 感染症学雑誌, 80, 694-700(2006)

短報

神奈川県域で検出された ノロウイルスの解析

片山 丘, 宮原香代子, 古屋由美子

Analysis of norovirus in Kanagawa Prefecture.

Takashi KATAYAMA, Kayoko MIYAHARA
and Yumiko FURUYA

はじめに

ウイルスを原因とする感染性胃腸炎は、ノロウイルスやロタウイルスによる胃腸炎が一般的に知られている。神奈川県域（川崎市、横浜市、横須賀市、相模原市、藤沢市を除いた地域）ではこれらのウイルスの他にアデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルスによる胃腸炎も見られている^{1, 2)}。このなかでもノロウイルスを原因とした食中毒や感染性胃腸炎が毎年多数発生しており^{3, 4)}、社会的問題となっている^{5, 7)}。

そこで県域でのノロウイルスの流行状況と流行株との関連および発生地域とノロウイルス流行株との関連を調べるため感染性胃腸炎患者検体から検出されたノロウイルスについて遺伝子の解析を行った。

材料および方法

1. 検査材料

ノロウイルスの流行状況の把握には、平成17年4月から平成20年3月までに小児科定点医療機関から得られた感染性胃腸炎患者便489検体を用いた。また遺伝子解析のためには、定点医療機関からの検体でノロウイルスが検出された142検体の中から33検体とさらに平成17年5月にノロウイルスgenogroup I (G I) が検出された感染性胃腸炎集団発生の2事例から6検体（患者便および調理従事者便）を用いた（表1）。

2. RNAの抽出

便を滅菌リン酸緩衝液で10%乳剤とし、15,000rpm、5分間遠心分離後の上清140 μ lから、QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて、キット添付のプ

ロトコールに従いRNAを抽出した。

3. ノロウイルスの遺伝子検出

RNA抽出液とDNase I（タカラバイオ）を37°C、30分間反応させた後、Random Hexamer (Amersham) およびSuperScript II RT (Invitrogen) を用いて42°C、1時間の逆転写反応を行いcDNAを作製した。

定量PCRは影山らの方法⁸⁾に従ってTaqMan Universal PCR Master Mix (ABI) を用い、G IはプライマーにCOG1F, COG1R, プロープにRING1-TP(A), RING1-TP(B), genogroup II (G II)はプライマーにCOG2F, ALPF, COG2R, プロープにRING2AL-TPを使用し、G I, G IIについてそれぞれウイルス遺伝子の定量を行った。

4. ノロウイルスのキャプシドタンパク質遺伝子の解析

定量PCRによってノロウイルス遺伝子が検出された検体についてG IはプライマーにCOG1F, G1-SKR, G IIはプライマーにCOG2F, G2-SKRを用いてさらにPCRを行った。得られたPCR産物から1.5%アガロースゲル電気泳動により380bp付近（G I:381bp, G II:387bp）の目的バンドを切り出し、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(ABI)を用いて、キット添付のプロトコールに従い、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer(ABI)により塩基配列の決定を行った。

遺伝子の塩基配列が決定された検体についてはそれぞれG I/1からG I/15, G II/1からG II/18の塩基配列⁹⁾を基にその分布状況をGENETYX-MAC（ゼネティックス）を用いて解析した。

結 果

神奈川県域における感染性胃腸炎患者からの3年間のノロウイルス検出状況は、平成17年度患者100例中23例（鎌倉地域2例、厚木地域1例、小田原地域19例、藤沢地域1例）、平成18年度患者186例中71例（茅ヶ崎地域2例、厚木地域8例、小田原地域61例）、平成19年度患者203例中48例（茅ヶ崎地域3例、厚木地域19例、小田原地域26例）であった（表2）。またgenogroup別検出状況は、平成17年度はG Iが2例、G IIが20例、G IとG IIの混合が1例、平成18年度はG Iが2例、G IIが69例、平成19年度はG Iが5例、G IIが43例であった。各年ともにG IIの流行が起こり、その最後の頃にG Iが散発的に検出された（表3）。

キャプシドタンパク質遺伝子塩基配列から、平成17年度に小田原地域より検出されたG IはG I/8であり、平成17年5月に秦野保健所管内でおこった食中毒事例の患者および調理従事者から検出されたG Iと同時期に厚木保健所管内でおこった集団発生の感染性胃腸炎患者か

ら検出されたG IはともにG I /3であった(図1)。また、平成17年度に鎌倉地域、藤沢地域、厚木地域および小田原地域より検出されたG IIは共にG II /4であった(図2-4)。平成18年度では、小田原地域より検出されたG IはG I /7(図1)、茅ヶ崎地域と厚木地域より検出されたG IIは共にG II /4、小田原地域より検出されたG IIは平成18年5月がG II /2、11月がG II /10であった(図2-4)。平成19年度では、小田原地域より検出されたG Iは平成20年2月の1例がG I /14でその他はG I /4(図1)、茅ヶ崎地域より検出されたG IIは共にG II /4、厚木地域より検出されたG II 3例は平成19年6月がG II /2、7月がG II /13でその他の月はG II /4、小田原地域より検出されたG IIは平成19年4月、20年3月がG II /13でその他はG II /4であった(図2-4)。

考 察

ノロウイルスの検出率(検出数/検査数)は、平成17年度、19年度が共に23%程度であったのに対し、平成18年度は38.2%と増加しており、ノロウイルスの大流行が起こっていたことが伺われる。また、複数年でノロウイルスが検出されている地域を比較すると、茅ヶ崎地域では平成18年度が40.0%、19年度が13.6%であり、小田原地域では平成17年度20.6%、18年度39.9%、19年度19.3%と両地域とも全国的に流行のあった平成18年度⁷⁾に流行があったことが示唆された。また、厚木地域では平成17年度14.3%に比べ18年度32.0%、19年度41.3%と全国的な流行年の後もノロウイルスの流行があったことが示唆された。これらのことからノロウイルスの流行やその動向を把握する上で、小児科定点医療機関からのウイルス検索は大変有意義なものであると考えられる。

今回我々は、県域での流行状況を把握するため感染性胃腸炎患者検体を中心に、各年度の定点地域で検出された全てのノロウイルスG I 検出検体および年度最初に検出されたノロウイルスG II 検出検体、さらに平成19年度に関しては、各定点地域で各月最初にノロウイルスG II が検出された検体を選択し、キャプシドタンパク質遺伝子の解析を行った。晩秋から冬期のノロウイルスG II の流行は各定点地域ともにそのほとんどがG II /4のグループに属する株によるものであり、これらの株が継続的に流行を引き起こし、さらに、春や初夏の散发例はG II /2、G II /10およびG II /13のグループに属する株によるものであることが明らかとなった。ノロウイルスG II は、流行期にはそのほとんどがG II /4に属する株によるもので、流行期以外では他のグループに属する株によるものが、これら遺伝子の解析により見られたことは興味深いことである。

日本国内で全国的に発生しているノロウイルス感染症の流行のほとんどがG II /4のグループに属している株によるものであり⁷⁾、神奈川県域におけるノロウイルスの流行もこれらと同様にG II /4に属するウイルスによるものであることが示唆された。

近年の神奈川県域における感染性胃腸炎集団発生事例を見ると、秋から春にかけてのノロウイルスG II による事例が大問題となるなか、平成17年度のように5月に冬期の流行期とは別のノロウイルスG I による食中毒や感染性胃腸炎の集団発生が散発的に確認されており(表1)、秦野の食中毒事例および厚木の胃腸炎集団発生事例ではG I /3であった。しかしながら県域における定点医療機関からの検体では、ノロウイルスG I の検出は小田原地域のみで、平成17年度はG I /8であった。このことより、県域で少なくとも2種類のノロウイルスG I が散発的に活動していたことが確認された。さらに平成18年度はG I /7、19年度は平成20年2月のG I /14検出を除きG I /4であり、ノロウイルスG I は各年度で同じ株か同じグループに属する株であることがわかった。ノロウイルスG I はノロウイルスG II とは異なり発生年度、発生地域共に共通して継続的に検出されているグループの存在が無く、発生年度や発生地域により散発的に一つの株が発生する傾向が見られ、ノロウイルスG I とノロウイルスG II の流行性の違いであると示唆された。

秦野の食中毒患者2例と調理従事者2例から検出されたノロウイルスG I の遺伝子は同一であったが、厚木の感染性胃腸炎集団発生事例の患者2例とは、340番目の塩基がCとTとで異なるものであった。今回我々が行った塩基配列決定は、クローニングを行っていないPCR産物のダイレクトシーケンスであり、その領域も381bpと短いものであるため、この僅かに一ヶ所の違いで秦野の事例と厚木の事例からの検出株に変異があるとは言い切れず、さらに多くの遺伝子の領域について詳細な検討を行う必要があると考えられた。

今後は解析を行う検体数を増やすとともに他の領域の遺伝子の検討も加えることにより、県域におけるノロウイルスの動向をさらに詳しく探ることが可能であると考えられる。

謝 辞

最後になりましたが、検体および患者情報の収集にご協力いただきました小児科定点医療機関の先生方々に深謝いたします。さらに検体搬入や情報提供にご尽力いただきました各保健福祉事務所、県健康増進課および生活衛生課の方々に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) 伊達佳美, 片山 丘, 古屋由美子: 地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), 神奈川衛研報告, 36, 51-52 (2006)
- 2) 片山 丘, 宮原香代子, 古屋由美子: 感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況 (平成18年度), 神奈川衛研報告, 37, 75-77 (2007)
- 3) 宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子: 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), 神奈川衛研報告, 36, 48-50 (2006)
- 4) 宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子: 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18年度), 神奈川衛研報告, 37, 72-74 (2007)
- 5) 食品衛生専門監視班編: 食中毒, かながわの食品衛生, 12, 9 (2008)
- 6) 食品衛生専門監視班編: ノロウイルスを知って防ごう食中毒, かながわの食品衛生, 12, 10-12 (2008)

- 7) ノロウイルスの流行 2006/07シーズン, 病原微生物検出情報, 28, 1-2 (2007)
- 8) 影山努, 小嶋慈之, 福士秀悦, 片山和彦: 蛍光プローブを用いたNorwalk virus (NV) の高感度検出法の開発, Vita, 18, 14-17 (2001)
- 9) Okada, K., Ogawa, T., Kaiho, I. and Shinozaki, K.: Genetic analysis of norovirus in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. J. clin. Microbiol., 43, 4391-4401 (2005)

表 2 感染症発生動向調査定点からの年度別ノロウイルス検出状況

	定点地域	検体数	ノロウイルス		
			GI	GII	GI&GII
平成17年度	鎌倉	6	0	2	0
	平塚	2	0	0	0
	厚木	7	0	1	0
	小田原	84	2	16	1
	藤沢	1	0	1	0
年度合計	100	2	20	1	
18年度	茅ヶ崎	5	0	2	0
	平塚	3	0	0	0
	厚木	25	0	8	0
	小田原	153	2	59	0
年度合計	186	2	69	0	
19年度	茅ヶ崎	22	0	3	0
	厚木	46	0	19	0
	小田原	135	5	21	0
	年度合計	203	5	43	0
検査合計	489	9	132	1	

表 1 キャプシドタンパク質の塩基配列決定に用いた検体

1-1 定点医療機関症例

検体番号	検体情報				検査結果		
	定点地域	発病年月日	年齢		性別	定量PCR	
			歳	ヶ月		G1	G2
H17-5-Odawara1	小田原	H17.5.21	9		男	+	
H17-5-Odawara2	小田原	H17.5.23	5		女	+	
H17-10-Odawara3	小田原	H17.10.31	32		女		+
H17-12-Atsugi1	厚木	H17.12.15		10	女		+
H17-12-Kamakura1	鎌倉	H17.12.28	1	2	男		+
H18-2-Fujisawa1	藤沢	H18.2.6	1	1	男		+
H18-6-Odawara1	小田原	H18.5.6	13		女		+
H18-11-Atsugi1	厚木	H18.11.4		8	男		+
H18-11-Odawara2	小田原	H18.11.6	31		女		+
H18-11-Chigasaki1	茅ヶ崎	H18.11.22	1		男		+
H19-1-Odawara3	小田原	H19.1.25		10	女	+	
H19-2-Odawara4	小田原	H19.2.22	6	6	女	+	
H19-4-Atsugi1	厚木	H19.4.11	1	8	男		+
H19-4-Chigasaki1	茅ヶ崎	H19.4.17		11	女		+
H19-4-Odawara1	小田原	H19.4.23	1	10	男		+
H19-5-Odawara2	小田原	H19.5.11	0	5	女	+	
H19-6-Odawara3	小田原	H19.6.4	12		女	+	
H19-6-Atsugi2	厚木	H19.6.11	35		男		+
H19-7-Atsugi3	厚木	H19.7.5	2	1	女		+
H19-10-Odawara4	小田原	H19.10.26	1	5	男		+
H19-11-Chigasaki2	茅ヶ崎	H19.11.20	1	9	女		+
H19-11-Atsugi4	厚木	H19.11.25	1	2	女		+
H19-11-Odawara5	小田原	H19.11.29	1	4	女		+
H19-12-Odawara6	小田原	H19.12.1		7	女		+
H19-12-Chigasaki3	茅ヶ崎	H19.12.4		10	男		+
H19-12-Atsugi5	厚木	H19.12.7	2	1	女		+
H20-1-Odawara7	小田原	H20.1.5	72		女		+
H20-2-Atsugi6	厚木	H20.2.3	3	3	女		+
H20-2-Odawara8	小田原	H20.2.4	34		男	+	
H20-2-Odawara9	小田原	H20.2.4	12		女	+	
H20-2-Odawara10	小田原	H20.2.6	4	6	女		+
H20-3-Odawara11	小田原	H20.3.3	8	3	男	+	
H20-3-Odawara12	小田原	H20.3.3	7	7	女		+

1-2 集団事例

検体番号	検体情報				検査結果	
	発生地域	発生年月	発生施設	種別	定量PCR	
					G1	G2
H17-5-Hadano1	秦野	H17.5	飲食店	従事者	+	
H17-5-Hadano2				従事者	+	
H17-5-Hadano3				患者	+	
H17-5-Hadano4				患者	+	
H17-5-Atsugi1	厚木	H17.5	小学校	患者	+	
H17-5-Atsugi2				患者	+	

表 3 茅ヶ崎・厚木・小田原地域3定点からの月別ノロウイルス検出状況

	茅ヶ崎地域		厚木地域		小田原地域		
	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI&GII
H17.4							
5					2		
6							
7							
8							
9							
10							1
11							
12				1		7	
H18.1						7	1
2						1	
3							
4							
5						1	
6							
7							
8							
9							
10							1
11		1		5			8
12				2		22	
H19.1		1			1	14	
2					1	10	
3				1		4	
4		1		2		1	
5					1		
6				2		1	
7				1			
8							
9							
10							1
11		1		2		1	
12		1		10		5	
H20.1						3	
2				2	2	2	
3					1	8	

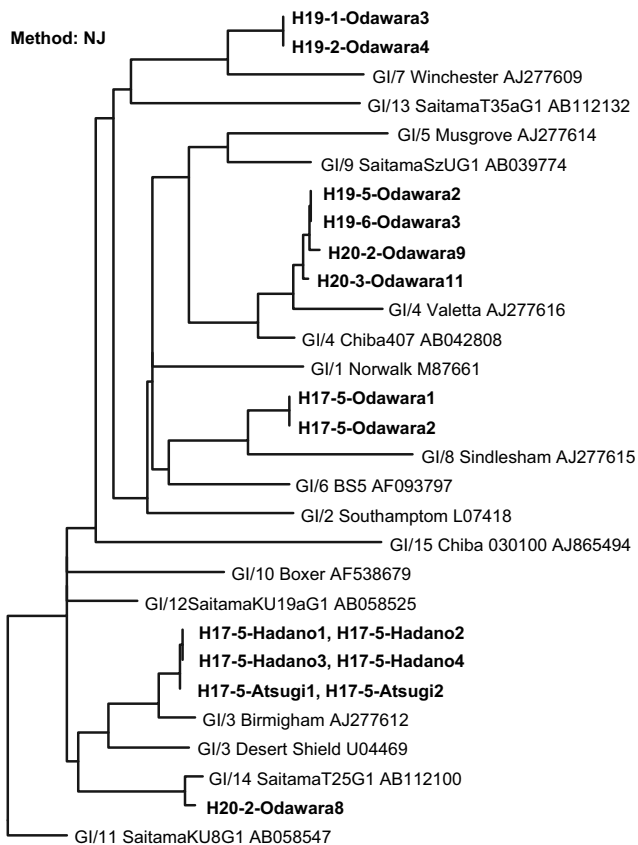


図1 ノロウイルスG I の系統樹

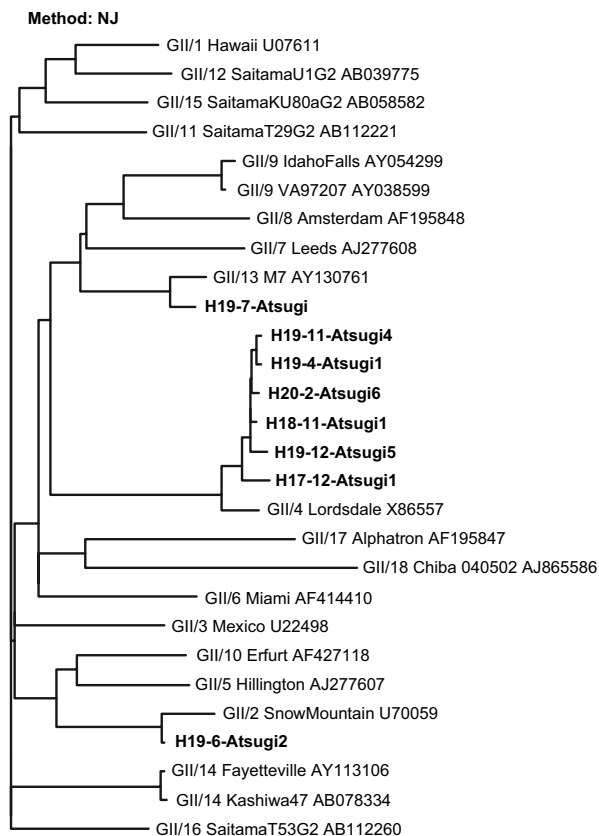


図3 ノロウイルスG II の系統樹 (厚木地域)

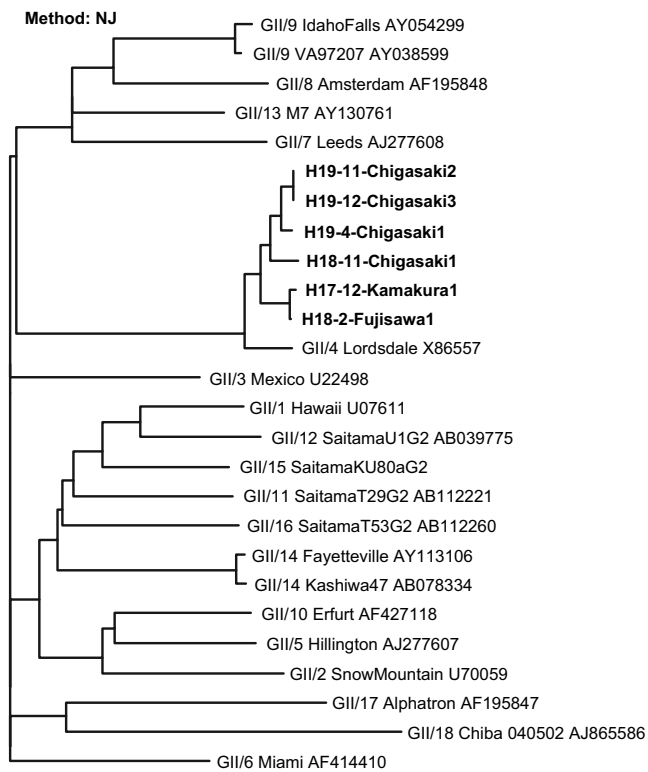


図2 ノロウイルスG II の系統樹 (茅ヶ崎・鎌倉・藤沢地域)

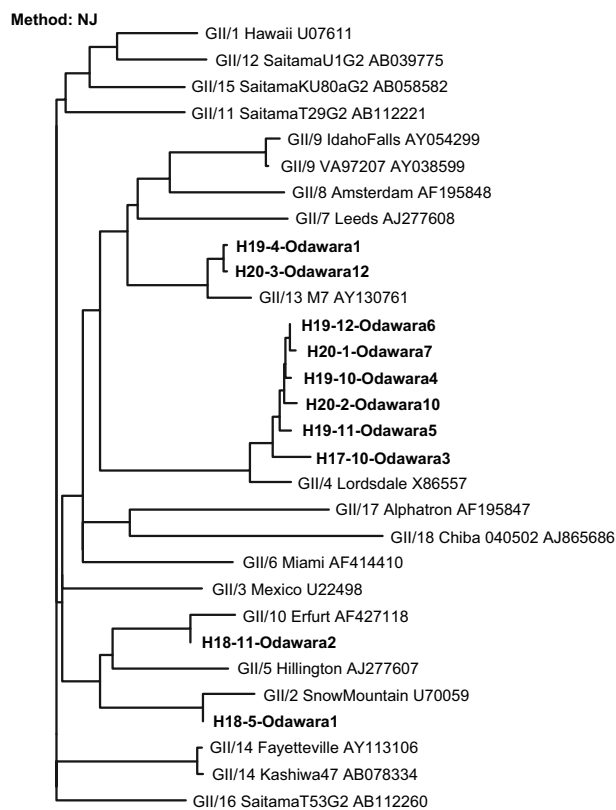


図4 ノロウイルスG II の系統樹 (小田原地域)

短報

呼吸器感染症からの ヒトメタニューモウイルスの検出

渡邊寿美, 齋藤隆行

Detection of human metapneumovirus from respiratory tract infection

Sumi WATANABE and Takayuki SAITO

はじめに

呼吸器感染症の原因ウイルスとして、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス、パラインフルエンザウイルス、RSウイルス (respiratory syncytial virus:RSV) などが検出されてくるが、原因不明とされる症例も少なくなかった。しかし、21世紀に入ってからヒトメタニューモウイルス (human metapneumovirus:hMPV)、SARSコロナウイルスなどが呼吸器感染症の原因ウイルスとして新たに発見され、研究が進められている。hMPVは、パラミクソウイルス科、ニューモウイルス亜科、メタニューモウイルス属に分類され、同じパラミクソウイルス科のパラインフルエンザウイルスやRSウイルスとは近縁である。平成13年にオランダの研究グループ¹⁾により小児の呼吸器感染症患者の鼻咽頭から分離されたウイルスで、SARS流行時には一時期病原体として疑われたこともある。国内においても、平成15年以降、hMPVの分離報告あるいは疫学調査報告²⁻⁴⁾がなされており、呼吸器感染症の原因の一部がhMPVであることが証明されている。そこで、本県にお

けるhMPVの侵淫状況を明らかにする目的で、呼吸器感染症患者検体についてhMPV検出を試みたので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

平成14年度～19年度 (平成14年4月～20年3月) の6年間に感染症発生動向調査の病原体定点から提供されたインフルエンザ等の呼吸器感染症患者検体 (鼻咽頭拭い液) のうち、原因ウイルスが特定できなかった261検体を用いた。

2. 検出方法

患者検体からQIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。抽出RNAは、Oligo(dt)₁₂₋₁₈ PRIMER (Invitrogen) および Super Script II RT (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを作製した。TaqポリメラーゼはTaKaRa EX Taq (TaKaRa) を使用した。検出対象遺伝子領域およびプライマーは表1のとおりとし、PCR条件は各プライマーの引用文献^{3, 4)}に従った。2ndPCR後のPCR産物サイズは、F (fusion) 蛋白遺伝子357bp、N (nucleocapsid) 蛋白遺伝子271bpである。PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外線を照射して特異バンドを確認した。また、PCRの陽性コントロールとして広島県立総合技術研究所保健環境センターから分与を受けた臨床検体を用いて、各プライマーの検出限界を比較した。

ウイルス分離は、LLC-MK2細胞およびVeroE6細胞を用い、1週間を1単位として2回継代し、計3週間の培養を行った。

結果および考察

261検体について遺伝子検出を行った結果、5検体 (1.9%) からhMPVのF蛋白遺伝子を検出したが、そのうちN蛋白遺伝子も検出できたのは2例のみで、残りの3

表1 検出対象遺伝子領域とプライマー

遺伝子領域	1stPCR	2ndPCR	
F (fusion)	MPVF1f (5'-CTTTGGACTTAATGACAGATG-3')	MPVF2f (5'-CATGCCGACCTCTGCAGGAC-3')	高尾ら ³⁾
	MPVF1r (5'-GTCTTCCTGTGCTAACTTTG-3')	MPVF2r (5'-ATGTTGCAYTCYTTGATTG-3')	
N (nucleocapsid)	f (5'-TTCAAGGGATTACCTGAGTG-3')	f (5'-TTCAAGGGATTACCTGAGTG-3')	鈴木ら ⁴⁾
	r (5'-TCCTTAAGCAAGGTTGCCAT-3')	r2 (5'-ACCACTTGGACTTCACTGCC-3')	

例は検出できなかった。LLC-MK2細胞およびVeroE6細胞からhMPVは分離されなかった(表2)。

表2 呼吸器感染症患者からの
ヒトメタニューモウイルス検出結果

	検体採取年度					
	14	15	16	17	18	19
検体数	41	38	79	45	36	22
RT-PCR						
F(fusion)	1	1	0	2	0	1
N(nucleocapsid)	1	0	0	1	0	0
ウイルス分離	0	0	0	0	0	0

各症例は、検体採取時期が異なっていることから散発症例と思われる。臨床診断名がインフルエンザであったことからわかるように臨床症状もインフルエンザと似ており、全症例が38℃以上の発熱および上気道炎あるいは下気道炎の呼吸器症状を呈していた(表3)。これまでに報告されているhMPV感染症の臨床像は、主として乳幼児の呼吸器感染症であり、多くは1週間程度で症状が改善される。RSV感染症の場合と同様に、再感染を繰り返すうちに次第に軽症化していき、成人では上気道感染症程度ですむようになると考えられている。しかし、乳幼児あるいは高齢者では、肺炎等の重篤な下気道感染症を引き起こす場合もあり⁵⁾、さらに、乳幼児では急性脳症の報告^{6,7)}もある。今回、下気道炎を呈した患者は症例1および2の乳幼児であり、一般的にいわれているhMPVの臨床像に合致していた。また、症例5のように、成人においてもhMPV感染により上気道感染症を引き起こすことを確認できた。なお、陽性症例数が少ないため、患者発生時期についての傾向を把握することはできなかった。

表3 RT-PCR陽性症例

症例	検体採取月	検体由来	年齢	症状				
				最高発熱	上気道炎	下気道炎	関節痛	倦怠感
症例1	H14.6	咽頭	1歳	40.0℃	×	○	×	×
症例2	H16.3	咽頭	3歳	38.8℃	×	○	×	○
症例3	H18.2	咽頭	13歳	39.0℃	○	×	○	×
症例4	H18.3	鼻腔	10歳	38.8℃	○	×	×	×
症例5	H19.10	咽頭	59歳	38.1℃	○	×	×	×

今回、hMPVのRT-PCR陽性率は1.9%であったが、高尾ら³⁾の報告による陽性率は20.4%である。この陽性率の差は、調査対象の違いに起因すると考えられる。一つ目は、臨床診断名である。我々の調査対象は、インフルエンザ(インフルエンザ様疾患を含む)と診断された患者が主であったが、高尾らの場合、急性呼吸器感染症と診断された患者を対象としており、hMPV陽性患者の診

断名は、急性気管支炎が最も多く、次いで急性肺炎、急性上気道炎の順となっている。二つ目は、対象年齢である。我々は、年齢制限を設けずに小児科定点およびインフルエンザ定点の両方から提供された検体を対象にしたが、高尾らは小児のみである。三つ目は、検体採取時期である。我々の場合、インフルエンザあるいはインフルエンザ様と診断された患者検体を用いたため、各年度ともに12月～3月に採取された検体が多かった。高尾らは単年で調査(平成15年1月～8月)しており、陽性者は3月～7月に確認された。こうした条件の違いが、陽性率に影響しているものと考えられる。

臨床検体からの病原体検出では、検出効率が問題となる。インフルエンザウイルスやアデノウイルスなど比較的培養が容易なウイルスの場合は、細胞培養が標準的な病原体検索方法となる。しかし、hMPVの場合は、LLC-MK2細胞での細胞変性効果(CPE)がわかり難く、臨床検体からの分離には2～3週間かかることもまれではないといわれている⁵⁾。VeroE6細胞の方がLLC-MK2細胞より分離効率が良いとの報告⁸⁾もあるが、現在のところ、RT-PCR法による遺伝子検出が最も鋭敏な検出方法である。インフルエンザウイルスの場合、nested-PCR法を用いると臨床検体からの検出効率が向上したため、今回もnested-PCR法を採用することにした。そこで、nested-PCR法での検出報告^{3,4)}のあるF蛋白遺伝子およびN蛋白遺伝子を検出対象に選んだ。また、各プライマーの検出限界を陽性コントロールと比較したところ、F蛋白遺伝子検出系の方が、N蛋白遺伝子検出系よりも10～1000倍程度感度が良いことがわかった(表4)。臨床検体でF蛋白遺伝子検出、N蛋白遺伝子不検出が3症例あったが、プライマーの検出感度の差が影響していると考えられ、今後のスクリーニングには、F蛋白遺伝子検出系を用いるのが良いと考える。

表4 各プライマーの検出限界

検出領域	陽性コントロール		
	no. 1	no. 2	no. 3
F (fusion)	1st	—	10 ^{-2*}
	2nd	10 ⁻²	10 ⁻⁴
N (nucleocapsid)	1st	—	—
	2nd	10 ⁻¹	10 ⁻¹

* 陽性と判定できた最大希釈濃度

平成18年3月～4月にかけて福岡県の高齢者福祉施設におけるhMPVの集団感染事例が報告されている⁹⁾。こ

の事例の場合、RSVによる呼吸器感染症が疑われたが、その後の調査（遺伝子検出）でhMPV感染が明らかになった。高齢者の場合も、乳幼児と同様にRSVやhMPVを視野に入れた検査を行う必要があると思われる。

当所では、インフルエンザに代表されるウイルス性呼吸器感染症の日常的病原検索に、インフルエンザ、パラインフルエンザ、RS各ウイルスの遺伝子検出を実施している。今回の調査で、通常の感染症発生動向調査の検体からhMPVが検出されたことから、今後は、hMPVも日常的病原体検索に導入していきたいと考えている。

最後に、RT-PCR検出用の陽性検体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広島県立総合技術研究所保健環境センターの高尾信一先生に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) van den Hoogen,B.G., de Jong,J.C., Groen,J., Kuiken,T., de Groot,R., Fouchier R.A.M. et al.: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease, *Nat.Med.*, 7, 719-724 (2001)
- 2) 後藤郁男, 山木紀彦, 植木洋, 佐藤千鶴子, 渡邊節, 秋山和夫ほか: インフルエンザ様患者からの human metapneumovirusの分離-宮城県, 病原微生物検出情報, 24, 64-65 (2003)
- 3) 高尾信一, 下藺広行, 柏弘, 松原啓太, 坂野堯, 池田政憲ほか: 本邦において初めて流行が確認された小児のhuman metapneumovirus感染症の臨床的, 疫学的解析, 感染症学雑誌, 78, 129-137 (2004)
- 4) 鈴木陽, 渡邊王志, 西村秀一: 喘鳴をきたした小児からのhuman metapneumovirusの検出, 感染症学雑誌, 77, 467-468 (2003)
- 5) 菊地英明: ヒト・メタニューモウイルス, ウイルス, 56, 173-182 (2006)
- 6) 津田雅世, 石川順一, 吉本昭, 外川正生, 塩見正司, 改田厚ほか: Human metapneumovirus感染に伴ったけいれん重責型急性脳症の1例, 病原微生物検出情報, 26, 153 (2005)
- 7) 清澤秀輔, 小山典久, 泰眞美, 伊藤雅, 長谷川晶子, 山下照夫ほか: ヒトメタニューモウイルスが検出された急性脳症死亡例, 病原微生物検出情報, 27, 318-319 (2006)
- 8) Abiko, C., Mizuta,K., Itagaki,T., Katsushima, N., Ito,S., Matsuzaki,Y. et al.: Outbreak of human metapneumovirus detected by use of the Vero E6 cell line in isolates collected in Yamagata, Japan, in 2004 and 2005, *J.Clin.Microbiol.*, 45, 1912-1919 (2007)
- 9) 白石博昭, 豊村研吾, 平泰子, 宮川春美, 三浦久吉, 田中浩二ほか: 高齢者福祉施設におけるヒト・メタニューモウイルス集団感染事例-福岡県, 病原微生物検出情報, 27, 178-179 (2006)

短報

新しい遺伝子型別法であるVariable Number of Tandem Repeat (VNTR) を利用したレジオネラ ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) の型別について

渡辺祐子, 高橋智恵子, 大屋日登美, 岡崎則男

Genotyping of *Legionella pneumophila* by using variable number of tandem repeat analysis

Yuko WATANABE, Chieko TAKAHASHI,
Hitomi OHYA and Norio OKAZAKI

はじめに

レジオネラ属菌は温泉をはじめとして、循環式浴槽、冷却塔等の環境水中で増殖し、これを含んだエアロゾルを吸引することで、肺炎等を主徴とするレジオネラ症を引き起こす。特に、免疫力の低下している高齢者等は感染しやすく、しばしば集団感染を引き起こし、死亡例も報告されている¹⁾。また、近年はレジオネラ症の散発例が増加傾向にあるため、感染源の究明が重要となっているが、多くの場合実施されていないのが現状である。

感染源の究明には原因施設を特定し、最終的にはその施設から検出されたレジオネラ属菌と患者から分離されたレジオネラ属菌が同一菌であることを確認する必要がある。この手段としては遺伝子型別法の一つである pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 法が主に利用されている。しかし、PFGE法は煩雑な操作と3~4日の日数を要し、加えてレジオネラ属菌の発育が遅いことから、結果が判明するまでに10日間以上を要する。このため、迅速な感染源の究明が難しく、効果的な予防対策や拡大防止対策の実施に支障をきたしている。あわせて、高価な装置が必要であること、得られる結果が画像データであること等から、検査施設間における結果の比較が容易ではない。

最近、PFGE法以外のレジオネラ属菌に対する迅速な

遺伝子型別法として、variable number of tandem repeat (VNTR) 法が注目されている^{2, 3)}。VNTR法は、DNA塩基配列の複数箇所が存在する反復塩基配列の反復数が多様性を示すことを利用した遺伝子型別方法であり、結核菌や大腸菌O157の疫学解析においては実用化されつつある。基本的には一般的に実施されているPCR操作と同様で、PFGE法よりも簡便かつ迅速に結果が判明することが特徴である。また、結果の数値化が可能であるため、検査施設間での比較が容易であり、将来的にはデータベース化も可能とされている。

本報では、*Legionella pneumophila*分離菌株49株を対象としてVNTR法による遺伝子型別を行い、結果をPFGE法と比較することでその有用性について調べた。

材料及び方法

1 菌株

1997年から2006年に神奈川県内で分離された冷却塔水由来19株、温泉水由来15株、家庭用24時間風呂水由来6株、循環式浴槽水由来1株、ミネラルウォーター製品及び原水等由来4株、腐葉土由来1株、超音波加湿器水由来1株、患者(同一)由来2株の計49株の*L. pneumophila*を用いた。

2 方法

(1) VNTR法

*L. pneumophila*のDNA塩基配列における解析部位は、Pourcelら³⁾の報告から、Lpms1b, Lpms3, Lpms13, Lpms17, Lpms19b, Lpms33の6か所とし、これらの各部位を増幅する6組のプライマーを用いた。

DNA抽出は以下のように行った。菌株をBCYE α 寒天培地で培養後、コロニーを滅菌蒸留水(DW)にかき取り、 1×10^8 CFU/mlの濃度に調製した。その菌液を100 $^{\circ}$ C、15分加熱後、14,000rpmで20分遠心分離し、上清をDWで100倍希釈してテンプレートDNAとした。

PCR反応液は、1アッセイあたりDW 15.8 μ l, $\times 10$ Ex taq Buffer 2.5 μ l, 2.5mM dNTPs 2.0 μ l, 0.1M MgCl 1.5 μ l, Upperプライマー(20 μ M) 0.25 μ l, Lowerプライマー(20 μ M) 0.25 μ l, Ex Taq 0.2 μ l, テンプレートDNA 2.5 μ l (DNA量2.5~5ng)の全量25 μ lに調製した。PCR条件は、Pourcelら³⁾の方法に従い、前加熱94 $^{\circ}$ C5分後、熱変性94 $^{\circ}$ C30秒、アニーリング60 $^{\circ}$ C30秒、伸長反応72 $^{\circ}$ C45秒を35サイクルとし、その後72 $^{\circ}$ C10分の伸長反応を追加した。PCR産物の電気泳動は、3%アガロースゲルを使用して行い、泳動後、エチジウムブロマイド染色し、KODAK 1D Image analysis software (version3.5)で解析を行った。

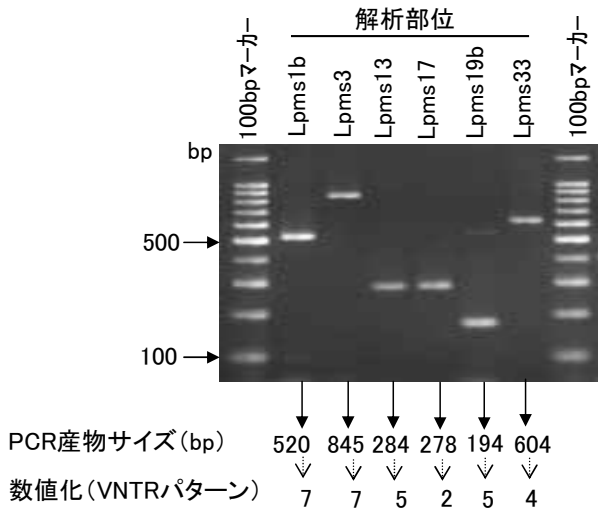


図1 VNTR法におけるPCR産物サイズからの数値化例

図1に、VNTR法におけるPCR産物サイズからの数値化例 (VNTRパターン) を示した。PCR産物の電気泳動像から各解析部位のPCR産物サイズ (bp) を読み取り、反復塩基配列の反復数を算出した³⁾。図1に示した例のVNTRパターンは7,7,5,2,5,4となる。

(2) PFGE法

PFGE法は、病原体検出マニュアル⁴⁾ に準拠し、制限酵素として *Sfi* I (New England Biolabs) を用い実施した。結果の解析にはFingerprinting II (BIO-RAD) を使用した。

結果及び考察

L. pneumophila 49株におけるVNTRパターンからのクラスター解析結果を図2に示した。パターンが一致した (類似度100%) 場合を同一菌株としたところ、16株のクラスターが1組、4株が2組、2株が4組の7クラスターを形成し、17株が単独パターンとなった。また、上記49

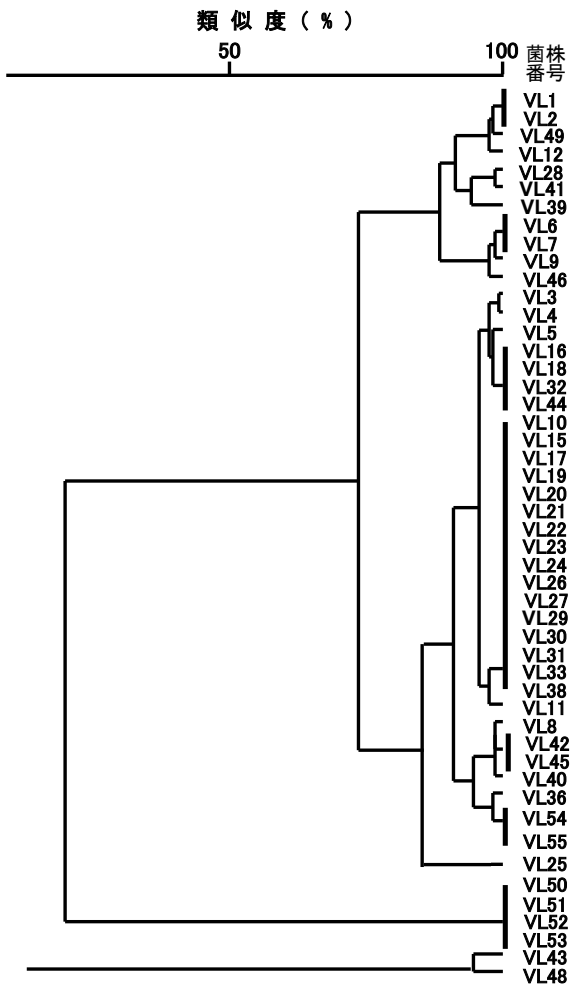


図2 *L. pneumophila* 49株のVNTR法におけるクラスター解析結果

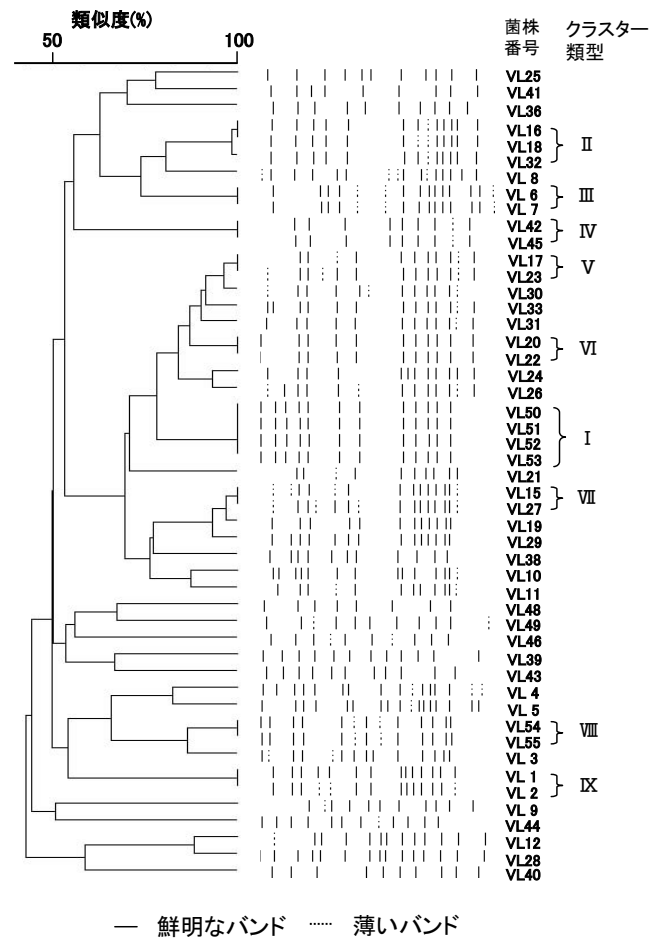


図3 *L. pneumophila* 49株のPFGE法におけるクラスター解析結果

株のPFGE法におけるクラスター解析結果を図3に示した。類似度98%以上を示す場合を同一菌株としたところ、4株のクラスターが1組、3株が1組、2株が7組の9クラスターを形成し、28株が単独パターンとなった。VNTR法で単独パターンとなった17株は、PFGE法でも単独パターンを示した。

表1 VNTR法で同一クラスターを形成した16株のPFGE結果と由来

菌株番号	PFGEパターン	血清型	由来	採水場所	検体採取日
VL17	V	1	冷却塔水	Kビル	97/08/04
VL23	V	1	冷却塔水	KI 荘	97/10/08
VL20	VI	1	冷却塔水	Oビル	97/08/04
VL22	VI	1	冷却塔水	Oビル	97/09/09
VL15	VII	1	冷却塔水	Uビル	97/07/09
VL27	VII	1	冷却塔水	Dストア	97/09/09
VL10	単独	1	冷却塔水	Eビル	07/09/01
VL19	単独	1	冷却塔水	Zセンター	97/08/04
VL21	単独	1	冷却塔水	KOビル	97/09/09
VL24	単独	1	家庭用24時間風呂水	M氏宅	97/02/01
VL26	単独	1	超音波加湿器加湿水	Kセンター	98/02/09
VL29	単独	1	冷却塔水	Zセンター	97/09/09
VL30	単独	1	冷却塔水	Kビル	97/09/09
VL31	単独	1	温泉水	M温泉	02/02/01
VL33	単独	1	冷却塔水	Kビル	97/08/04
VL38	単独	1	冷却塔水	Zセンター	97/10/08

VNTR法で最大クラスターを形成した16株のPFGE法による解析結果と由来を表1に示した。PFGE法では10株が単独パターンを示し、6株が3クラスターを形成した。このうちVL20及びVL22は、分離時期が約1ヶ月異なるものの、同一冷却塔から分離された菌株であった。VL17及びVL23の2株、VL15及びVL27の2株については地域性等に共通点は見当たらず、PFGEパターンが一致した理由は不明である。なお、16株の内13株は冷却塔水由来菌株であり、これらの菌株に対するVNTR法の型別精度がPFGE法に比べ劣る傾向が見られた。

VNTR法で7クラスターを形成したうちの最大クラスターを除く6クラスター16株について、PFGE法の解析結果を表2に示した。VL6及びVL7は、同一地域の泉源が異なる温泉水から分離された菌株であったが、VNTR法とPFGE法の両者において型別結果は一致した。また、VL42及びVL45も同一地域の異なる施設から分離されたものであるが、VNTR法とPFGE法の型別結果は一致した。これらのことは、レジオネラ属菌が土壌細菌であるため、土ぼこり等といっしょに地域の環境水に進入し、増殖したことを示唆するものと思われる。今後、各地域の環境水から分離された多数の菌株を使用して遺伝子型

表2 VNTR法で6クラスターを形成した16株*のPFGE法による解析結果

菌株番号	VNTRパターン	PFGEパターン	血清型	由来	検体採取日
VL1	7 7 5 2 4 4	IX	1	患者(同一)	06/10/04
VL2					
VL6	8 8 0 2 4 2	III	1	M温泉水	03/11/21
VL7				Y温泉水	03/11/27
VL16		II	1	家庭用24時間風呂水(S氏宅)	97/07/09
VL18	7 8 9 2 4 4				97/08/13
VL32					97/06/11
VL44		単独	3	C温泉水	02/02/15
VL42	9 8 8 2 4 2	IV	4	G温泉マンション	02/02/15
VL45				G温泉公衆浴場	02/02/15
VL50					05/09/13
VL51	9 7 5 5 3 4	I	1	ミネラルウォーター 製品等	05/09/13
VL52					05/10/04
VL53					05/10/04
VL54	7 8 10 2 4 2	VIII	1	R温泉水	01/11/11
VL55					01/11/11

*最大クラスターを形成した16株(表1)を除く

別を実施し、地域差を調べる必要があると考えられた。

さらに、VL50、VL51、VL52及びVL53は、ミネラルウォーターの製品(検出された際の菌数は浴槽水の検出基準である10CFU/100ml以下)とその原水輸送用容器等から分離された菌株で、VNTR法とPFGE法の結果はそれぞれ一致していた。一方、VL16、VL18、VL32及びVL44においては、同一家庭用24時間風呂水から分離された前三者とC温泉水から分離された後一者で異なるPFGEパターンを示したが、VNTR法では同一パターンであった。

これらのことから、VNTR法は*L. pneumophila*の遺伝子型別法として、精度における課題は残されているものの、迅速簡便であることから、現段階でもスクリーニング法としての利用価値はあると考えられる。今後、解析部位を追加し、精度の向上を図ることにより、実用化に向けた検討を進める予定である。

(平成20年7月28日受理)

文献

- 1) 感染症情報センター：レジオネラ症1999年4月～2006年(2007年2月28日現在)、感染症週報、9(17:18)、16-21(2007)<http://idsc.nih.go.jp/idwr/kanja/idwr/idwr2007/idwr2007-17-18.pdf>
- 2) Pourcel, C., Vidgop, Y., Ramisse, F., Vergnaud, G. and Tram, C.: Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping, J. Clin. Microbiol., 41, 1819-1826(2003)
- 3) Pourcel, C., Visca, P., Afshar, B., D'Arezzo, S., Vergnaud, G. and Fry, K. N.: Identification of

variable-number tandem-repeat(VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme, J. Clin. Microbiol., 45, 1190-1199 (2007)

- 4) 山内昌弘, 田中智之, 杉山 明, 山内昭則, 倉 文明, 前川純子: レジオネラ症, 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所, 衛生微生物技術協議会レファレンス委員会編, pp. 840-848(2005)
<<http://www.nih.go.jp/niid/reference/pathogen/-manual-60.pdf>>

短報

切り身魚からの ヒスタミン生成菌の検出

伊達佳美, 古川一郎, 相川勝弘,
浅井良夫, 尾上洋一

Incidence of histamine-producing bacteria in cut fish

Yoshimi DATE, Ichiro FURUKAWA,
Katsuhiko AIKAWA, Yoshio ASAI
and Yoichi ONOUE

はじめに

アレルギー様食中毒は、ヒスタミンが大量に蓄積された食品を摂食し、頭痛、じんま疹、発熱などアレルギー様の症状を呈することで発生する。原因食品の多くは、ヒスタミンの前駆物質である遊離ヒスチジンを多く含有するマグロやサバなどの赤身魚であり、遊離ヒスチジンは、ヒスチジン脱炭酸酵素を有する細菌（ヒスタミン生成菌）によってヒスタミンに変化し、蓄積される¹⁾。蓄積されたヒスタミンは、加熱により分解されず、加熱調理済みの魚でもアレルギー様食中毒は発生する。

魚介類を摂食する機会の多い我が国では、ヒスタミンを原因とする食中毒が諸外国と比較して多く発生していると言われながら、ヒスタミンに関する法規制は未だない。国内のアレルギー様食中毒事例は毎年数例～数十例発生しており、平成18年に発生したアレルギー様食中毒の原因食品のうち、多くはカジキやマグロなど大型の赤身魚の切り身であった²⁾。白身魚は遊離ヒスチジン量が少ないためアレルギー様食中毒の原因食品としての報告はほとんどみられないが、大型の白身魚であるアブラソコムツは、アレルギー様食中毒の原因食品として報告されている³⁾。冷蔵技術が発達した現在、魚介類は水揚げから販売まで低温で流通していると考えられるが、解体や解凍に時間のかかる大型魚は切り身になるまでの工程が多く、ヒスタミン生成菌に汚染する機会が多いと推測される。また、ヒスタミン生成菌は低温で増殖可能な

菌種も存在するため、低温貯蔵の際にもヒスタミンが蓄積されている可能性がある。

ヒスタミン生成菌として、腸内細菌科および海洋由来のビブリオ科の菌種がいくつか知られているが、ヒスタミン生成菌の検出方法は煩雑で時間を要するため、食中毒時でも原因菌が検出されない場合が多い。そこで、アレルギー様食中毒の原因究明の一助として、ヒスタミン生成菌の検出方法の検討ならびに県内に流通する大型魚の切り身におけるヒスタミン生成菌の汚染状況の把握を目的として、大型魚の切り身のヒスタミン量測定、ヒスタミン生成菌の菌数測定および分離菌の同定を行ったので報告する。

材料および方法

1. 調査対象

平成19年5月から平成20年2月に神奈川県下の小売店から購入した大型魚の切り身60検体を対象とし、赤身魚35検体（カジキ22, マグロ10, サワラ2, ブリ1）白身魚25検体（カレイ9, ギンダラ7, ムツ5, サケ3, タラ1）について調査した。

2. 切り身魚からのヒスタミン生成菌の分離と菌数測定

ヒスタミン生成菌の分離はTakahashiらの報告⁴⁾に準拠した。ヒスタミン生成菌の分離のため、選択増菌培地にPoly Peptone (Difco) 10g, Yeast extract (BBL) 3g, D(+)-Glucose (和光純薬) 5g, L-histidine·HCl·H₂O (和光純薬) 4.57gを人工海水500mlおよび蒸留水500mlで溶解後pH5.0に調整したHistidine Brothを使用し、MPN3本法で菌数測定を行った。すなわち、検体10gにHistidine Brothを90ml加え、ストマッカーで60秒間ホモジナイズしたもの（試料原液）を3本の滅菌中試験管に10mlずつ分注した。さらに、予め10mlのHistidine Brothが入った試験管に試料原液を1ml, 0.1mlそれぞれ3本ずつ接種し、30℃で18時間培養した。各培養試験管についてペーパークロマトグラフィーで、ヒスタミン生成が確認された試験管を陽性とし、その陽性本数からMPN値を求めて算出した。ヒスタミン生成が確認された試験管の培養液を、Niven Agar⁵⁾に1白金耳塗抹し、30℃, 18時間培養した。Niven Agarに発育し、集落の周辺が紫色に変化したと思われる菌株を1平板あたり5～10株程度釣菌し、再度Niven Agarに移植し、30℃, 18時間培養後、ヒスチジンを分解し集落周辺の紫色が明瞭になった株についてヒスタミン生成能の確認を行った。

3. ヒスタミン生成能の確認

分離した菌株を再度Histidine Brothに接種し、30℃, 18時間培養後、ペーパークロマトグラフィーでヒスタ

ミン陽性を確認できた菌株をヒスタミン生成菌とした。また、ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子を標的としたPCRを実施した⁴⁾。

4. ヒスタミン生成菌の同定

ヒスタミン生成能が確認された菌株について、形態学的検査およびチトクロームオキシダーゼ、TSI培地、SIM培地、リシン脱炭酸培地、VP培地における生化学的性状検査を実施した。チトクロームオキシダーゼ陽性菌については海洋由来の細菌を疑い、好塩性試験（塩化ナトリウム濃度0および3%での発育）を行った。形態学的検査でグラム陰性桿菌であることを確認し、生化学的性状検査の結果、同一検体に同一性状を示す菌株が多数あった場合は、代表株を同定に供した。同定キットはApi20E (Bio Merieux) を用いた。Api20E で *Klebsiella oxytoca* または *K. pneumoniae* と同定されたものについては、*Raoultella planticola* または *R. ornithinolytica* の可能性があるため、Api32E (Bio Merieux) を用いて再度同定を行った。また、低温での発育をみるため、Histidine Brothで4℃、7日間の培養を行った。

5. 魚肉のヒスタミン量の測定

魚肉中に含まれるヒスタミンの定量は、チェックカラーHistamine (キッコーマン) を用いた。

結 果

表1に魚種別のヒスタミン生成菌の検出状況と菌数の分布を示した。ヒスタミン生成菌は、60検体中23検体(38.3%)から分離され、赤身魚35検体中18検体(51.4%)、白身魚25検体中5検体(20.0%)であった。ヒスタミン生成菌が検出された魚種は、赤身魚ではカジキ22検体中14検体(63.6%)、マグロ10検体中4検体(40.0%)、白身魚ではサケ3検体中2検体(66.7%)、ムツ5検体中2検体(40.0%)、ギンダラ7検体中1検体(14.3%)であった。

ヒスタミン生成菌が検出された23検体について、菌数をMPN法により算出した結果、菌数が30~10²/100gが9検体、>10²~10³/100gが6検体、>10³~10⁴/100gが5検体、>10⁴/100gが3検体であった。>10³/100g検出された8検体中6検体はカジキ、2検体はマグロであり、白身魚は全て10³/100g以下であった。

分離菌種別検出状況を表2に示した。ヒスタミン生成菌が分離された23検体中19検体から腸内細菌科9菌種、5検体からビブリオ科1菌種が分離された。分離検体数が最も多かった菌種は *Morganella morganii* で、分離された12検体中カジキは9検体、マグロ、ギンダラ、ムツ各1検体であった。次いで *R.planticola* が8検体から分離され、カジキ3検体、マグロ2検体、ギンダラ1検体およびムツ2検体であった。ビブリオ科に属する *Photobacterium damsela* は、カジキ3検体とマグロ2検体から分離された。また、10検体からは複数の菌種が分離された。

4℃、7日間の低温発育性検査において発育が認められた菌株は *R.planticola*, *R.ornithinolytica*, *Serratia liquefaciens* であった。

魚肉のヒスタミン量測定の結果、60検体中1検体からヒスタミン142ppm検出された。この検体はカジキで、ヒスタミン生成菌数は>10⁴/100g(実際の計算値は1.1×10⁴/100g以上)であり、腸内細菌科である

表1 切り身魚におけるヒスタミン生成菌の検出状況と菌数の分布

魚種	検体数	陽性数 (陽性率%)	菌数(MPN/100g)					
			不検出 (<30)	30-10 ²	>10 ² -10 ³	>10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴	
赤身	カジキ	22	14 (63.6)	8	7	1	3	3
	マグロ	10	4 (40.0)	6	1	1	2	
	サワラ	2	0	2				
	ブリ	1	0	1				
白身	サケ	3	2 (66.7)	1		2		
	ムツ	5	2 (40.0)	3	1	1		
	ギンダラ	7	1 (14.3)	6		1		
	カレイ	9	0	9				
	タラ	1	0	1				
計	60	23 (38.3)	37	9	6	5	3	

表2 分離菌別検出状況

科	分離菌種名	分離 検体数	魚種																					
			カジキ											マグロ				サケ		ムツ		ギンダラ		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13	14	1	2	3	4	1	2	1	2
腸内細菌	<i>Morganella morganii</i>	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+							+				+	+	
	<i>Raoultella planticola</i>	8							+	+			+					+	+				+	+
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	3								+										+	+			+
	<i>Citrobacter youngae</i>	2							+									+						
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	2																+		+				
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2				+						+												
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	1																+						
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1					+												+					
	<i>Serratia liquefaciens</i>	1																						+
	ビブリオ	<i>Photobacterium damsela</i>	5				+						+	+					+	+				
	同定不能	1																					+	

*魚肉中ヒスタミン検出検体

Enterobacter aerogenes が分離された。これ以外の検体は、全て検出限界（20ppm）未満であった。

今回、分離菌のヒスタミン生成能の確認に、ペーパークロマトグラフィーとPCR法を併用したが、結果は全て一致した。

考 察

今回の調査で、切り身魚の38.3%からヒスタミン生成菌を分離したが、ヒスタミン生成菌の検出率、菌数ともに、ヒスチジン含有量の高い赤身魚が白身魚よりも高い傾向を示した。赤身魚のうち、カジキやマグロ以外は検体数が少ないため不明であるが、白身魚では、検体数の多いカレイからはヒスタミン生成菌は検出されず、サケやムツは検体数が少ないが検出率が高かったことなど、魚種によって検出されるヒスタミン生成菌の菌種や菌数が異なる傾向がみられた。その理由として、水揚げされる産地（海域）が推測されたが、水揚げ後の輸送方法・加工・流通ルート・温度管理状況によっても汚染率や検出菌種が異なることが考えられる。魚種により検体数にバラツキがあるため、比較は出来ないが、カジキから *M. morgani* を主としたヒスタミン生成菌が高率に分離され、また、ヒスタミン生成菌数が $>10^4/100g$ 検出された検体はカジキのみであったことから、カジキのヒスタミン生成菌の汚染率および汚染菌数は他の魚種より高い傾向にあると推察された。

ヒスタミンが142ppm検出されたカジキのヒスタミン生成菌数は $1.1 \times 10^4/100g$ 以上で、分離された *E. aerogenes* は強いヒスタミン生成活性を持つ可能性があること¹⁾ から、この検体は、水揚げ後に何らかの不適切な取り扱いがあり、保管条件によってはヒスタミン量が増加し、食中毒発生の危険性があつたと思われた。一般的には、ヒスタミン量が100mg/100g（1000ppm）以上の食品で発症するとされているが、食中毒事例から発症者のヒスタミン摂取量を計算した例では大人一人あたり22~370mgと報告されている⁹⁾。我が国では、食品中のヒスタミンに対する法的な規制が定められていないが、欧米では水産食品のヒスタミン量について規制値が設けられており、米国食品薬品局（FDA）では、魚介類については5mg/100g（50ppm）で注意喚起レベルの規制値が定められている。カジキを原因とするアレルギー様食中毒は、毎年国内で発生しており、カジキがヒスタミン生成菌による汚染率が高い原因について、食中毒防止に向けたさらなる調査が必要であると思われた。

腸内細菌科以外のヒスタミン生成菌として分離された *P.damselae* は、海水中に生息しており、分離されたカジキやマグロについては水揚げ時に汚染されていた可能

性がある。*P.damselae* は、今回分離率の高かった *M.morgani*、*R.planticola* などとともに強いヒスタミン生成活性をもつと報告されており¹⁾、ヒスチジンを多く含むカジキやマグロは、水揚げ時から一貫した衛生管理が必要である。また、切り身魚から低温で発育可能なヒスタミン生成菌が検出されたことで、冷蔵での取扱いでもヒスタミンが蓄積される可能性があることを、消費者を含めた取扱者に周知させることが食中毒を防止するために必要であると思われる。

鮮魚中のヒスタミン生成菌数は、全生菌数の0.01~10%程度であり¹⁾、今回の調査でも優勢菌の中からヒスタミン生成菌を分離することは、非常に煩雑で時間を要した。ヒスタミン生成菌が複数菌種分離されることは希ではなく、最終的な分離、同定は必要だが、分離されたヒスタミン生成菌のヒスタミン産生性と、ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子を標的としたPCRの結果が一致したことから、検査の効率化、迅速化のためには検査の早い段階でPCR法を用いることが有用であると思われた。

アレルギー様食中毒を防除するために、今後も引き続き実態調査を継続し、汚染率の高い魚種を把握するとともに、水揚げから販売までの管理状況を調査し、汚染の原因を解明することが必要であると考え。

謝 辞

本調査は県生活衛生課の事業で、検体搬入にご尽力いただいた県内保健福祉事務所の専門監視員の方々と、調査に対し、ご指導およびご助言をいただきました東京海洋大学の高橋肇先生に深謝いたします。

（平成20年7月28日受理）

文 献

- 1) 藤井健夫：アレルギー様食中毒，日本食品微生物学会誌，23(2)，61-71（2006）
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部企画情報課：平成18年度食中毒発生事例
- 3) 観公子，牛山博文，新道哲也，上原真一，安田和夫：アブラソコムツによるヒスタミン食中毒，食衛誌，41(2)，116-121，（2000）
- 4) Takahashi, H., Sato, M., Kimura, B., Ishikawa, T. and Fujii, T. : Evaluation of the PCR single strand conformational polymorphism analysis for identification gram-negative histamine-producing bacteria isolated from fish, J. Food Prot. 70(5), 1200-1205 (2007)
- 5) Niven, C. F., Jefferey, M. B. and Collet D. A. : Differential planting medium for quantitative

detection of histamine-producing bacteria ,
Applie. Environ. Microbiol. 41(1), 321-322,
(1981)

6) 井部明広：アレルギー用食中毒：食中毒（食品安全
セミナー①). pp. 215-227, 中央法規出版, 東京
(2001)

短報

チョコレート製品及びチューインガム 中のカフェイン及びテオブロミン 含有量の測定

岸 弘子

Measurements of contents of caffeine and theobromine in chocolate products and chewing gums

Hiroko KISHI

はじめに

カフェイン等のキサンチン誘導体 (図1) は、中枢神

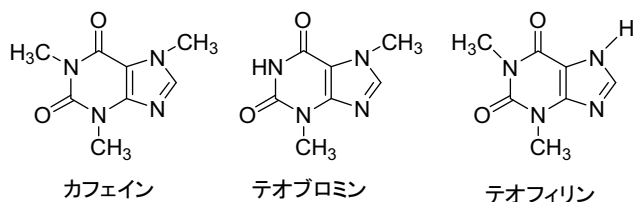


図1 キサンチン誘導体の構造式

経興奮、心筋刺激、利尿等の生理活性を有する。中枢興奮作用の強さはカフェイン、テオフィリン、テオブロミンの順である。低年齢児が摂取する機会の多い菓子類にも、これらが含まれおり、市販菓子の実態を把握し、過剰摂取の危険性を評価する目的で、含有量を調査した。今回は、テオブロミンとカフェインを含むことが知られているチョコレートを原料とする菓子(チョコレート製品)、さらに、カフェインによる眠気防止効果を謳った製品が販売されているチューインガムを調査対象とし、測定項目はカフェイン及びテオブロミンとした。

方法

1. 試薬等

標準品：カフェインは和光純薬製、テオブロミンは関東化学製の試薬特級を用いた。

神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

混合標準原液: テオブロミン50mgを、約80mlの水に加熱しながら溶解した。これに、カフェイン50mgを加えて溶解し、全量を100mlとしたものを混合標準原液とした。(各500 μ g/ml)

透析膜: 透析膜36/32(平面幅43mm, 直径27mm, 膜厚0.0203mm, 分画分子量14000, Viskase製)
その他の試薬等は、守安らの方法¹⁾に準じた。

2. HPLC条件

HPLC: Agilent Technologies製1100シリーズ, カラム: Atlantis dC18 (4.6mm i.d.×150mm, 5 μ m, Waters製), 移動相: アセトニトリル-0.01Mリン酸緩衝液pH3.5(1:9)混液, 流速: 1.0ml/min, 検出: フォトダイオードアレイ検出器(検出波長: 275nm), カラム温度: 40°C, 注入量: 20 μ l

3. 試験溶液の調製

1) チョコレート製品

試料を粉碎により均質化し、その2~10gを量り、水20mlを加えて沸騰水浴上で20分間加熱後、少量の水で透析膜に充填した。透析外液に80°C以上の温水を用い全量を約200mlとした後、沸騰水浴中で1時間加熱した。冷後水を加えて全量を200mlとし、時々揺り動かしながら室温で4時間透析し、その透析外液を試料溶液とした。

2) チューインガム

試料を細切しその10gを量り、水40mlを加えて沸騰水浴上で20分間加熱、よく混和し、その抽出液を分取した。更に残渣に水40mlを加え、同様の操作を行って得られた抽出液を合わせ、冷後全量を100mlとし、ろ紙(5A)でろ過し、ろ液を試料溶液とした。

3) HPLC用試験溶液の調製

守安らの方法¹⁾に準じ、試料溶液をBAKERBOND spe(SO₃H)カートリッジカラムで精製し、HPLC用試験溶液とした。HPLC試験溶液中のカフェインまたはテオブロミンの濃度が、検量線の濃度範囲を超えた場合は、試料溶液を適宜水で希釈し、これを試料溶液と同様にカートリッジカラムで精製して、HPLC用試験溶液とした。

4. 検量線の作成

混合標準原液を水で希釈し、0.5, 1, 5, 10, 50及び100 μ g/mlの検量線用混合標準溶液を調製し、得られたピーク面積から検量線を作成した。

5. 添加回収実験

試料は、ホワイトチョコレート(カフェイン41.7 μ g/g, テオブロミン13.6 μ g/g含有)及びチューインガム(カフェイン, テオブロミン不含有)を用いた。秤量した試料に、ホワイトチョコレートには1000 μ g/g, チューインガムには500 μ g/gとなるように混合標準原液を添加、試料溶液を調製し、回収率を求めた。さらに、守安

らの方法¹⁾の定量下限である10 μ g/g付近の濃度での添加を行い、回収率を確認した。

結果及び考察

1. 添加回収結果

ホワイトチョコレート、チューインガム共に回収率は90%以上で、良好な結果が得られた(表1)。また、10

表1 食品からのカフェイン及びテオブロミンの回収率

試料	添加量 (μ g/g)	回収率(%)	
		カフェイン	テオブロミン
ホワイトチョコレート	1000	98.5 \pm 0.9*	98.1 \pm 0.9*
チューインガム	500	97.3 \pm 1.7*	97.1 \pm 1.5*

*:平均 \pm S.D. n=5

μ g/g添加で65%以上の回収率が得られた。低濃度での添加回収結果と各試料のHPLCクロマトグラムを考慮し、本報告では、チョコレート製品は10 μ g/g、チューインガムは5 μ g/gを定量下限とし、定量下限未満の場合は不検出とした。

2. 市販食品の検査結果

チョコレート製品21検体、チューインガム7検体についてカフェイン及びテオブロミンの分析を行った。代表的なクロマトグラムを図2に示した。すべての試料で、定量を妨害するピークは認められなかった。また、検出されたピークについて、吸収スペクトルを標準品と比較したところ、良好に一致した。

表2 チョコレート製品中のカフェイン及びテオブロミン濃度

No.	名称	カフェイン (μ g/g)	テオブロミン (μ g/g)
1	チョコレート	177	1660
2	チョコレート	237	1580
3	チョコレート	228	1800
4	チョコレート	239	2300
5	チョコレート	67	514
6	チョコレート	358	2970
7	チョコレート	162	1580
8	チョコレート	42	14
9	チョコレート菓子	131	1180
10	準チョコレート	123	1370
11	準チョコレート菓子	123	1050
12	準チョコレート菓子	119	1030
13	準チョコレート菓子	103	811
14	準チョコレート菓子	51	583
15	準チョコレート菓子	142	1570
16	準チョコレート菓子	91	910
17	スナック菓子	143	1590
18	朝食シリアル	50	687
19	チョコレートケーキ	87	735
20	チョコレートケーキ	119	826
21	洋生菓子	66	701

チョコレート製品の分析結果を表2に示した。すべてのチョコレート製品からカフェイン及びテオブロミンが検出された。カカオの成分の割合が多いのは、チョコレート、チョコレート菓子、準チョコレート、準チョコレート菓子の順であるが²⁾、カフェイン及びテオブロミンの濃度順とは一致しなかった。No.8はホワイトチョコレートで、原材料中にテオブロミンをほとんど含まないココアバターが多く、製品中の濃度も低いと考えられた。その他の試料も、使用された原材料により、カフェイン、テオブロミンの濃度が影響を受けたと推定された。チョコレート製品中のカフェイン、テオブロミンの濃度は、すでに報告されている普通のチョコレート³⁾と同レベルかそれ以下の濃度で、過剰摂取の危険性は低いと考えられた。

チューインガムの分析結果を表3に示した。チューインガムについては、カフェイン、カカオ抽出物、茶抽出物の表示のある試料からカフェイン、テオブロミンが検

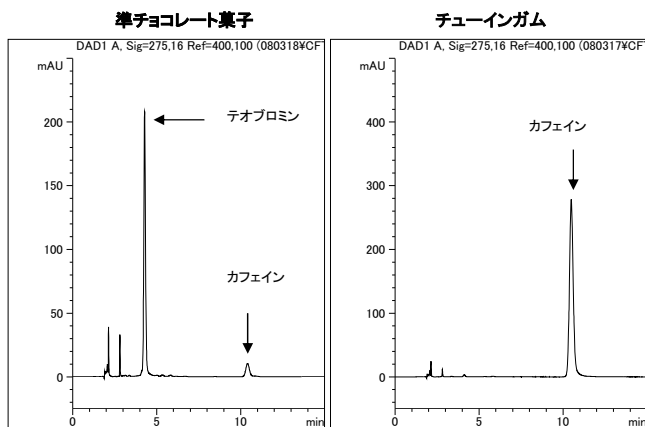


図2 食品中のカフェイン及びテオブロミンのHPLCクロマトグラム

カラム: Atlantis dC18 (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μ m)
 移動相: アセトニトリル-0.01Mリン酸緩衝液 pH3.5 (1:9)混液
 カラム温度: 40 $^{\circ}$ C 流速: 1.0ml / min 測定波長: 275 nm
 注入量: 20 μ l

表3 チューインガム中のカフェイン及びテオブロミン濃度

No.	カフェイン ($\mu\text{g/g}$)	テオブロミン ($\mu\text{g/g}$)
1	8430	不検出
2	3730	8
3	不検出	不検出
4	不検出	不検出
5	不検出	不検出
6	不検出	10
7	不検出	不検出

出された。特にカフェインの表示のあったNo.1とNo.2は高濃度に含まれていた。No.1は粒ガムで1粒1.41gであり、8430 $\mu\text{g/g}$ 含有されているため、1粒で約12mgとなる。カフェインの薬用量は0.1~0.3gとされており⁴⁾、10粒の摂取で同程度の摂取量となる。また、No.2は板ガムで、1枚2.95gであり、3730 $\mu\text{g/g}$ 含有されているため、1枚で約11mgとなる。1包装9枚入りで、1包装の摂取で薬用量と同程度となる。これらは、眠気防止効果を謳った商品で、低年齢児用ではないが、注意が必要と考えられた。

まとめ

菓子中のカフェイン及びテオブロミンの含有量の調査を行った。チョコレート製品すべてからカフェイン及びテオブロミンが検出された。チューインガムではカフェインを高濃度に含有する商品があることから、低年齢児はカフェインの表示のある製品を避ける等の注意が必要と考えられた。

本研究は、平成19年度食品衛生専門監視班先行調査事業により行った。

(平成20年7月28日受理)

文献

- 1) 守安貴子, 斉藤和男, 中里光男, 石川ふさ子, 藤沼賢司, 二島太郎ほか: HPLCによる食品中のカフェイン, テオブロミン及びテオフィリンの同時分析法, 食品衛生学雑誌, 37, 14-19 (1996)
- 2) 日本チョコレート・ココア協会: チョコレート類の表示に関する公正競争規約
<<http://www.chocolate-cocoa.com/statistics/rules/index.html>>
- 3) 国民生活センター: 商品テスト結果, 高力カオをうたったチョコレート
<http://www.kokusen.go.jp/test/data/s_test/n-20080206_2.html>
- 4) 第15改正日本薬局方解説書, pp.C-929-C-934, 廣川書店, 東京(2006)

短報

食品中の乳化剤，ポリソルベートの分析

岸 弘子

Analysis of emulsifier, polysorbate in foods

Hiroko KISHI

はじめに

ポリソルベート (PS) は、ソルビトールの水酸基の一部を脂肪酸でエステル化し、酸化エチレン約20分子を縮合させたもので、アメリカ、EU、韓国、タイ等で乳化、分散化、可溶化剤として広く使用されている。日本ではPS20、60、65、80が、平成20年4月30日に食品添加物として指定され¹⁾、使用基準の設定、食品中の分析法の通知が行われた²⁾。しかし、EUで許可されているPS40は指定されていない。これまでは、PSが検出されれば、種類や検出量によらず、すべて違反となっていた。今後は、指定外のPSとの判別及び食品中からの正確な定量が必要となる。当所ではこれまでに、PSの種類による検出感度や薄層クロマトグラフィー (TLC) の分離パターンの差を検証しながら、分析法の検討を行ってきたので報告する。

方法

1. 試料

ココナッツミルク、タイカレー、トマトソース、ケーキミックス、ビスケットは市販品を、粉末ラーメンスープは東洋水産株式会社より分与されたものを用いた。

2. 試薬等

PS20、40、60、65、80、85：アルドリッチ、シグマ、関東化学、東京化成、和光純薬工業の化学用を使用した。さらに、PS60は国立医薬品食品衛生研究所より分与された食品添加物規格(案)適合品 (N1、N2) も使用した。

PS溶液：各PSをジクロロメタンで溶解し、適宜希釈して使用した。

ドラーゲンドルフ試薬 (TLC・比色共通)：A液は次硝

酸ビスマス (塩基性硝酸ビスマス) 0.85gを水40mlと酢酸10mlの混液に溶かした。B液はヨウ化カリウム8gを水20mlに溶かした。使用前にA液5ml、B液5ml、酢酸20ml及び水100mlを混和した。

比色用チオシアン酸コバルト試薬：チオシアン酸アンモニウム50g、硝酸コバルト六水塩15g及び塩化ナトリウム25gを水に溶かして250mlとした。

TLC用チオシアン酸コバルト試薬：チオシアン酸アンモニウム17.4g及び硝酸コバルト六水塩2.8gを水に溶かして100mlとした。

薄層板：Silica gel 60 HPTLC plates, 10×10cm, Merck社製

アルミナカートリッジカラム：Waters社製Sep-PakアルミナA、N、B (2g)

グラファイトカーボンカートリッジカラム：シグマアルドリッチジャパン社スペルコ事業部製スペルクリンENVI-Carb(500mg)

3. 固相抽出による試料抽出液の精製法検討

カートリッジカラムを用いた精製法を検討し、PSの保持をアルミナA、N、Bについて比較した。さらに、クロロフィル除去のため、グラファイトカーボンによる精製の有効性を、粉末ラーメンスープにPS60を添加し検討した。

4. 試験溶液の調製

試料10gを採取し、5%メタノール含有酢酸エチル100ml、無水硫酸ナトリウム50g (粉末スープ、ケーキミックス等の水分の無い物は不要)を加えホモジナイズし、吸引ろ過した。残渣に5%メタノール含有酢酸エチル50mlを加え再度抽出した。ろ液を合わせ減圧濃縮し、残留物をヘキサン30ml、ヘキサン飽和アセトニトリル30mlで分液ロートに洗い込み、振とうして下層を分取した。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加え、再度振とう抽出し、下層を合わせ減圧濃縮した。酢酸エチル5mlで溶解し、試料抽出液とした。Sep-PakアルミナB (2g)に無水硫酸ナトリウム2gを積層し、酢酸エチル10mlで洗浄し、試料抽出液を負荷した。酢酸エチル20mlで洗浄し、酢酸エチル・メタノール (1:1) 20mlで溶出した。溶出液を減圧濃縮し、ジクロロメタン2mlで溶解し、TLC用試験溶液とした。さらに、TLC用試験溶液0.5mlにジクロロメタンを加えて5mlとして比色用試験溶液とした。

試料がクロロフィルを含む場合は、試料抽出液の負荷、酢酸エチル20mlで洗浄までは同様に行い、酢酸エチル・メタノール (1:1) 5mlで予め洗浄したスペルクリンENVI-Carb (500mg)をSep-PakアルミナBの下に接続し、酢酸エチル・メタノール(1:1)20mlを流した。ス

ペルクリンENVI-Carbを取り外し、通気乾燥した後、ジクロロメタン9mlで溶出し、ジクロロメタンを加えて10mlとして比色用試験溶液とした。その5mlを減圧濃縮し、ジクロロメタンを加えて0.5mlとし、TLC用試験溶液とした。

5. TLCによる定性

試験溶液と各PS溶液(1mg/ml) 各10 μ lを2枚のTLCプレートに塗布し、展開溶媒としてジクロロメタン・メタノール・アセトン・水(55:20:15:4)を用いて展開した。風乾後、それぞれのプレートにドラーゲンドルフ試薬またはTLC用チオシアン酸コバルト試薬を噴霧し、検出されたスポットを観察した。

6. 比色による定量

各PS溶液 5ml及び比色用試験溶液に、ドラーゲンドルフ試薬または比色用チオシアン酸コバルト試薬5mlを加え、5分間振り混ぜ、ジクロロメタン層を分取した。自記分光装置は日立U-3100を用い、ドラーゲンドルフ試薬による発色は波長500nm、チオシアン酸コバルト試薬による発色は波長620nmで吸光度を測定した。

添加回収試験は、PSが使用されていないことを確認した食品に、PS60を試料中濃度として0.1g/kg及び0.5g/kgになるように添加して行った。

結果および考察

1. PSの種類及びメーカーの比較

PSは、ドラーゲンドルフ試薬及びチオシアン酸コバルト試薬による発色の吸光度が、種類により異なることが報告されている³⁾。試薬として市販されているPSは、オキシエチレン基の含量が明確にされておらず、各脂肪酸の割合や酸化エチレンの分子数も不明であるが、定性、定量には、成分が明確な標準品が必要である。そこで、各メーカーの試薬について、TLCと比色で比較を行った。

1) TLC

TLCによる分離例を図1に示した。PS溶液では、それぞれ複数のスポットが検出され、3スポットが全種類に共通した。共通する3スポットの内では、脂肪酸が1カ所でエステル化しているPS20, 40, 60, 80は、いちばんRf値の小さいスポットの発色が強く、3カ所でエステル化しているPS65, 85はいちばんRf値の大きいスポットの発色が強かった。メーカーによるパターンの差は認められなかった。TLCは、クロロフィル等食品由来の着色の影響を受けにくく、PSの定性法として有効であった。

2) 比色

ドラーゲンドルフ試薬及びチオシアン酸コバルト試薬による方法で発色した各種PS溶液の吸光度を比較した。

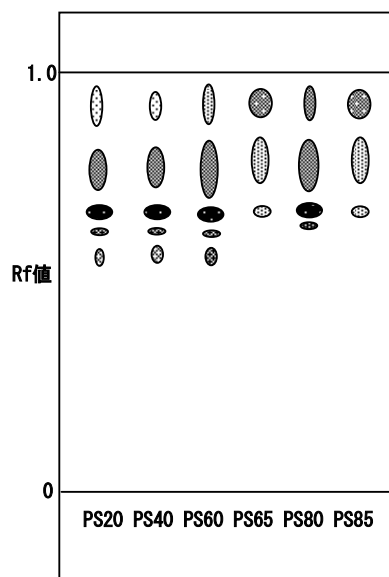


図1 TLC分離例
各PS：和光純薬工業製

表1 ポリソルベートの試薬メーカー別吸光度比較

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

A: アルドリッチ, S: シグマ, K: 関東化学,
T: 東京化成, W: 和光純薬工業,
N: 国立医薬品食品衛生研究所分与品

PS溶液の濃度は、PS60で吸光度が0.5付近となるように、ドラージェンドルフ試薬法では0.1mg/ml、チオシアン酸コバルト試薬法では0.2mg/mlとした。結果を表1に示した。PS65とPS85は両試薬で吸光度が低い傾向が認められた。

なお、PSはロット毎に品質が異なる製品があるといわれているが、この結果は各製品1ロットのみの比較であり、ロット間の差は検討していない。

チオシアン酸コバルト試薬による発色は、ドラージェンドルフ試薬に比べて吸光度は低い、同一濃度での種類による吸光度の差が少ない。食品に使用されているPSの種類が不明な場合、標準品として使用したPSと種類が異なっても、定量誤差を減少させることができる。また、食品の抽出物は黄色から赤を示す場合が多く、500nmで比色するドラージェンドルフ試薬法では、吸光度にプラスの誤差を与える場合が多かった。したがって、定量にはチオシアン酸コバルト試薬による発色が適していると考えられた。

2. 試験溶液の調製法の検討

有機溶媒での試料抽出時に水分が含まれると、糖等の水溶性成分により後の濃縮操作が困難となった。そこで、無水硫酸ナトリウムで脱水して抽出する必要があった。

精製に用いる固相抽出カラムについて、アルミナカートリッジA、N、Bについて比較した結果、Nは保持が弱く、AとBは同等であった。また、当所ではこれまでのPSの検査で、アルミナカラムによる精製法⁴⁾を採用し、塩基性のアルミナを使用していた。カートリッジカラムでは、類似した性質のアルミナBを使用することとした。

TLCでは食品由来の着色成分とPSの分離が可能であったが、比色では試験溶液の着色が発色後の測定溶液にも移行した。その結果、着色した試験溶液の発色後の吸光度は、添加したPS濃度に相当する吸光度より高くなった。測定波長付近に吸収のある試験溶液は、発色操作前

に、着色を除く精製操作が必要であった。クロロフィルを含む食品（ネギを含む粉末スープ等）は、アルミナBの精製のみでは、着色が残り、620nm付近に妨害があった。色素の除去に有効とされるグラファイトカーボン処理を追加したところ妨害が除かれ、PS溶液と同様の吸収スペクトルが得られるようになった。（図2）

3. 添加回収試験

試料に添加するPSは、純度等の品質が確認されていることが望ましいが、市販のPSは純度が不明であった。PS60については、食品添加物規格（案）適合品と比較が可能であり、4製品共にチオシアン酸コバルト法で食品添加物規格（案）適合品とほぼ同等の吸光度を示すことが確認できた。その中から、和光純薬工業のPS60を添加用の標準品として用いた。他のPSについては、品質が確認できなかったため定量には使用しなかった。

ココナッツミルク、タイカレー、ビスケットで良好な回収率が得られた。トマトソース、粉末スープは回収率が低かった（表2）。トマトソースは水分が多く、無水硫酸ナトリウムを加えると塊となったことにより、抽出効率が下がり回収率が低下したと考えられた。粉末スープは、アルミナBに加えてグラファイトカーボンによる精製を行うため、回収率が低下したと考えられた。

まとめ

PSの分析法として、TLCによる定性、比色による定量を検討し、精製にアルミナB及びグラファイトカーボンのカートリッジカラムを用いる分析法を作成した。TLCのスポットのパターンは、PS20、40、60、80のグループとPS65、85のグループの二つに分類された。TLCでは、PSの種類は確認できず、指定外のPSとの判別はできなかった。

比色の吸光度はPSの種類、メーカーにより差が認められた。このため、用いる標準品により食品中のPSの

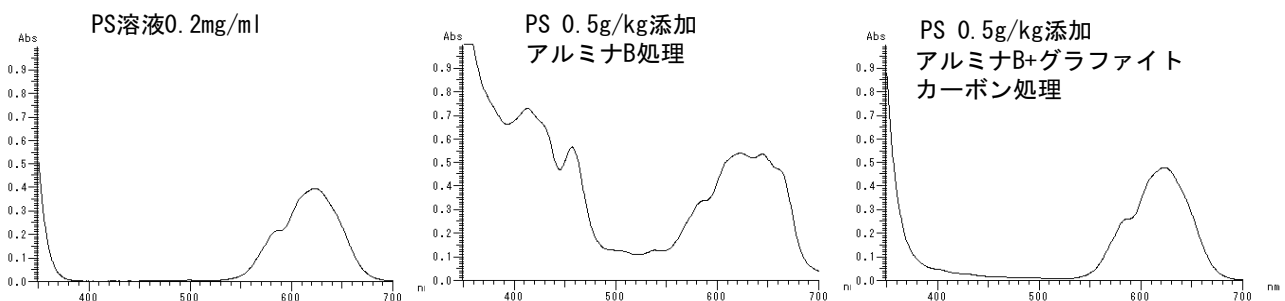


図2 グラファイトカーボン処理による試料抽出液の精製効果
試料：粉末ラーメンスープ（醤油味）
PS：PS60（和光純薬工業製）

表2 食品からのポリソルベート60の添加回収

試料名	添加濃度(g/kg)	回収率(%)
ココナッツミルク	0.1	82.0
	0.5	82.0
タイカレー	0.1	113.6
	0.5	100.2
トマトソース	0.1	54.3
	0.5	62.8
ケーキックス	0.1	70.2
	0.5	79.4
ビスケット	0.1	99.8
	0.5	79.1
醤油スープ*	0.1	42.6
	0.5	48.3
みそスープ*	0.1	48.7
	0.5	43.6
タンタンスープ*	0.1	43.7
	0.5	50.3
塩スープ*	0.1	55.8
	0.5	54.2

*: 粉末ラーメンスープ, グラファイトカーボン処理

分析値が異なる。市販食品の分析を行う場合は、添加されたPSの種類や純度が不明であり、添加量の正確な定量は困難である。定量には、品質の確認された標準品を用い、使用基準との比較はこの標準品と比較する方法が実用的であると考えられた。

この結果は、「食品中の食品添加物分析法の設定」事業で、国立医薬品食品衛生研究所に報告を行った。この結果を反映し、通知法のTLCによる定性には、PS65とPS80を使用するように規定された。また、PSの使用基準はPS80として設定され、比色法に用いるPS80の標準品が指定された。

さらに、通知法には確認試験法として液体クロマトグラフィー質量分析法が採用され、PSの種類を判別し、使用が許可されていないPS40及びPS85の確認が可能となった。

今後は、通知法にこれまでの検討成果を加え、行政検査に活用して行く予定である。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) 「食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について」(食安発第0430001号, 平成20年4月30日付)
- 2) 「「食品中の食品添加物分析法」の改正について」(食安基発第0430001号, 平成20年4月30日付)
- 3) 小川正彦, 林 克弘, 富森聡子, 橋爪 清: 問題発生時の試験法導入(1)-レトルトカレー中のポリソルベート試験法, 三重保環研年報, 47, 169-176(2002)
- 4) 川口徹, 飯塚太由, 伊藤一夫, 吉川礼次: 薄層クロマトグラフィーによる食品中ポリソルベートの分析, 日本食品衛生学会第70回学術講演会講演要旨集, 68 (1995)

短報

組換えDNA検査における
 食品の特性と結果の動向

—平成19年度 パパイヤ, コメ, トウモロコシ
 および大豆の組換えDNA検査結果より—

大森清美, 服部愛希, 渡邊裕子, 関戸晴子, 岸弘子

Characteristic of the processed food
 in the analysis of the genetically
 modified organisms and the trend
 of the analytical results

—Investigation on the qualitative and quantitative
 analysis of genetically modified foods
 in Kanagawa Prefecture (2007)—

Kiyomi OHMORI, Aki HATTORI,
 Hiroko WATANABE, Haruko SEKIDO
 and Hiroko KISHI

はじめに

神奈川県は、遺伝子組換え (GM) 食品の表示が義務化された平成13年度に、パパイヤの55-1, トウモロコシのCBH351, ジャガイモのNew leaf Yの定性試験を

40検体について開始した。その後、検査項目および検体数は年々増加し^{1-4,6)}、平成18年度からは、9種の組換え系統 (パパイヤの55-1, トウモロコシのCBH351およびBt10の定性試験, トウモロコシのMon810, T25, Bt11, Event176およびGA21, 大豆のRRSについての定量試験) について90検体の検査を実施している。さらに、平成18年度には、厚生労働省の輸入検疫所において中国産のコメ加工食品から安全性未審査の組換えDNAが検出されたことから、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」(食安監発第0220001号, 平成19年2月20日)が発令された。そこで本県は、平成19年度の検査項目としてコメのBtコメ検査 (定性試験) を追加し、90検体について10種の組換え系統の検査を行った (表1)。本報では、その結果について報告する。

方法

試験方法は、厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 (厚労通知)「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(食発第0629002号, 平成18年6月29日), JAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」(農林水産消費技術センター, 平成14年6月)および厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」(食安監発第0220001号, 平成19年2月20日)に従い、安全性未審査の組換え遺伝子については定性試験を、安全性審査済み組換え遺伝子については定量試験を実施した。表1に検査項目および品目ごとの試験方法を示した。

通知法では、定量試験は原則としてトウモロコシおよび大豆ともに穀粒のみを対象品目としている。冷凍枝豆、

表1 平成19年度 組換え遺伝子検査項目及び試験方法

原料	品目	検体数	項目	試験方法	DNA抽出精製法	組換え系統	内在性遺伝子
パパイヤ	パパイヤ青果	6	定性	PCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	55-1	Papain
	ライスペーパー	4					
コメ	ライスヌードル	2	定性	PCR法	(NIPPON GENE) GM quicker2変法	Btコメ	SPS
	上新粉	3					
	餅	3					
トウモロコシ	トウモロコシ青果	4	定性	PCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	CBH351 Bt10	Zein
	トウモロコシ穀粒	4					
	コーンスナック菓子	6					
	コーンスープ	6					
	トウモロコシ青果	4					
トウモロコシ穀粒	4	定量	PCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法	35S・GA21	SS II b	
大豆	大豆穀粒	11	定量	PCR法	(QIAGEN)DNeasy Plant Mini Kit 法 / (QIAGEN) Genomic-tip Kit 法	RRS	Le1
	冷凍枝豆	10					
	蒸し大豆	2					
	豆腐	13					
	豆乳	8					
	合計	38	定性				
		52	定量				

蒸し大豆、豆腐および豆乳は、大豆加工食品に分類されるため、通知法では定量試験を適用していない。しかしながら、加工食品へのGM作物混入に対する消費者の不安は大きいことから、神奈川県は、比較的加工程度が低いと考えられる大豆加工食品については定量試験を実施している。ただし、それらの加工食品の定量結果において違反が疑われた場合には、原料とされている大豆穀粒について通知法に従った定量試験を実施し、最終判定を行うこととしている。

使用機器類は、DNA測定装置にNanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologie (株))、遺伝子増幅装置にGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems (株))、電気泳動装置にMupid ミニゲル泳動装置 (アドバンス (株))、ゲル撮影装置にBIOINSTRUMENT AE-6905H Image Saver HR (ATTO (株))、遺伝子定量装置にABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems (株))を用いた。

結果および考察

平成19年度に実施した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。

1. 定性試験結果

パイヤ6検体の55-1組換え系統を対象とした定性試験結果、トウモロコシ穀粒および青果各4検体のCBH351組換え系統およびBt10組換え系統の定性試験結果は、いずれも不検出であった。

トウモロコシ加工食品は、厚労通知においてBt10組換え系統検査の適用品目とされていないことから、CBH351組換え系統のみの検査を実施した。その結果、コーンスナック菓子6検体中、No.20 (コーンパフにキャラメルを塗した形態)については、3回の抽出DNA濃度は0~0.3ng/ μ Lと極端に低く、トウモロコシ内在性遺伝子のZeinが不検出となり、検知不能と判定された。類似した形態の他のコーンスナック菓子では、約200ng/ μ Lの抽出DNAが得られていることから、No.20の抽出DNAがほとんど得られなかった原因は、表面を覆っていたキャラメル成分によるDNA抽出の妨害ではなく、コーンパフの製造工程における加圧等によるDNAの損傷であることが推察された。

コメ加工食品 (ライスヌードル、ライスペーパー、上新粉および餅) を対象としたBtコメの定性試験では、12検体全てにおいて組換え遺伝子は不検出であった。ただし、フォーおよびビーフン等のライスヌードル4検体から得られた抽出DNAの濃度については、4~111ng/ μ Lと製品による差が大きく、ライスヌードルの原料もしくは製法が、抽出DNAの濃度に影響を及ぼしていること

が考えられた。

2. 定量試験結果

トウモロコシ青果4検体および穀粒4検体の定量試験では、アメリカ産のトウモロコシ穀粒 (No.43) から定量下限値 (0.1%) 未満ではあるが、0.04%のGA21が検出された。

大豆穀粒11検体の定量試験においても、RRS組換え系統の定量下限値 (0.5%⁵⁾) 未満ではあるが、1検体 (No.47) で0.1%のRRSが検出された。冷凍枝豆10検体のRRS定量では全て不検出であった。

蒸し大豆2検体は、大豆内在性遺伝子Le1のコピー数が、当所において下限の目安としている10000コピー未満であったことから、検知 (定量) 不能の判定となった。これらの蒸し大豆の抽出DNA濃度は319~577ng/ μ Lと高濃度であり、また、260nm/280nmの吸光度比についても1.91~1.96と、DNAの良好な純度の目安とされている1.7~2.0の範囲内にあった。それにもかかわらず、20ng/ μ L (定量PCRに供するDNA濃度) に希釈後の定量PCR結果では、各蒸し大豆のLe1のコピー数の平均値は約2300および約7400であった。そこで、蒸し大豆2検体のDNA試料液をそれぞれ100ng/ μ Lに調製し、定量PCRを実施したところ、いずれも20ng/ μ LのDNA試料液におけるLe1コピー数の約5倍 (約10900コピーおよび36800) の値が得られた。この結果から、No.68および69の蒸し大豆の抽出DNAでLe1コピー数が低値であった原因は、DNA試料液中にPCR反応の鋳型となりうるDNAが少ないことによるものであり、DNA試料液中の共存物質によるPCR反応の阻害によるものではないと考えられた。検体は常温保存が可能な真空パック状の製品であり、製造および包装工程において滅菌を目的とした加圧および加熱処理が施された可能性がある。それらの処理によりDNAが損傷を受け、PCR増幅が困難となったことが推察された。

豆腐13検体のRRS組換え系統の定量値は、定量下限値未満ではあったが、13検体全てから0.002~0.2%のRRSを検出した。

豆乳についても、No.90の検知不能を除く7検体で0.02~0.3%のRRSを検出した。No.90の豆乳から得られた抽出DNAの濃度は、537~581ng/ μ Lと高濃度であり、260nm/280nmの吸光度比は1.89~1.90、260nm/230nmの吸光度比も2.2付近と高値であった。しかし、20ng/ μ Lに希釈後の定量PCR結果では、Le1のコピー数は3000前後と低値であった。DNAの断片化などにより、PCR反応の鋳型となりうるDNAが減少したことが原因であるならば、蒸し大豆における検討結果のように、PCR反応に供するDNA量を増やすことで、Le1のコピー

表2 平成19年度 組換え遺伝子定性試験結果

検体No.	品目	産地/原産国	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
1	パパイヤ青果	フィリピン	55-1	不検出	なし
2	パパイヤ青果	フィリピン	55-1	不検出	なし
3	パパイヤ青果	フィリピン	55-1	不検出	なし
4	パパイヤ青果	フィリピン	55-1	不検出	なし
5	パパイヤ青果	フィリピン	55-1	不検出	なし
6	パパイヤ青果	フィリピン	55-1	不検出	なし
7	トウモロコシ青果	埼玉県	CBH351/Bt10	不検出	なし
8	トウモロコシ青果	千葉県	CBH351/Bt10	不検出	なし
9	トウモロコシ青果	群馬県	CBH351/Bt10	不検出	なし
10	トウモロコシ青果	山梨県	CBH351/Bt10	不検出	なし
11	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
12	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
13	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
14	トウモロコシ穀粒	アメリカ	CBH351/Bt10	不検出	遺伝子組換えでない
15	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
16	コーンスナック菓子	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
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	遺伝子組換えでない
20	コーンスナック菓子	不明	CBH351	検知不能	遺伝子組換えでない
21	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
22	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
23	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
24	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	なし
25	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	なし
26	コーンスープ	不明	CBH351	不検出	なし
27	ライスヌードル	中国	Btコメ	不検出	なし
28	ライスヌードル	台湾	Btコメ	不検出	なし
29	ライスヌードル	タイ	Btコメ	不検出	なし
30	ライスヌードル	ベトナム	Btコメ	不検出	なし
31	ライスペーパー	ベトナム	Btコメ	不検出	なし
32	ライスペーパー	ベトナム	Btコメ	不検出	なし
33	上新粉	不明	Btコメ	不検出	なし
34	上新粉	不明	Btコメ	不検出	なし
35	上新粉	不明	Btコメ	不検出	なし
36	餅	不明	Btコメ	不検出	なし
37	餅	不明	Btコメ	不検出	なし
38	餅	不明	Btコメ	不検出	なし

数は増大するものと考えられる。そこで、No.90のDNA試料液の濃度を100ng/ μ Lに調製し、定量PCRを実施した結果、Le1のコピー数は0になった。DNA試料液の濃度を高濃度にしたことにより、Le1のコピー数が減少したことから、20ng/ μ LのDNA試料液でのLe1コピー数が低値であった原因の一つとして、No.90のDNA試料液中の共存成分により、PCR反応が阻害されていたことが考えられた。

まとめ

以上の平成19年度の組換え遺伝子検査結果において、パパイヤ、トウモロコシ、コメ加工食品の安全性未審査

の組換えDNA系統については、38検体中1検体の検知不能を除き、37検体全てが不検出であった。安全性未審査の組換えDNA系統の定性試験については、平成13年度から実施しているが、これまでの検査結果において陽性結果は得られていない。しかしながら、安全性未審査の組換えDNA系統が食品に混入した場合には、健康への影響も危惧されることから、今後も安全性未審査の組換えDNA系統に関する監視は必要であると考えられる。

安全性審査済み組換えDNA系統の定量試験については、トウモロコシ穀粒のCaM (Mon810, T25, Bt11, Event176のスクリーニング) およびGA21, 大豆穀粒のRRSは、いずれも定量下限値未満ながら、微量の混入が認められた。

表3 平成19年度 組換え遺伝子定量試験結果

検体No.	品目	産地/原産国	検査遺伝子	結果	GMに関する表示
39	トウモロコシ青果	埼玉県	35S-GA21	不検出	なし
40	トウモロコシ青果	千葉県	35S-GA21	不検出	なし
41	トウモロコシ青果	群馬県	35S-GA21	不検出	なし
42	トウモロコシ青果	山梨県	35S-GA21	不検出	なし
43	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	定量下限値未満検出(0.04%)	遺伝子組換えでない
44	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出	遺伝子組換えでない
45	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出	遺伝子組換えでない
46	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S-GA21	不検出	遺伝子組換えでない
47	大豆穀粒	カナダ	RRS	定量下限値未満検出(0.1%)	遺伝子組換えでない
48	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
49	大豆穀粒	カナダ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
50	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
51	大豆穀粒	アメリカ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
52	大豆穀粒	中国	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
53	大豆穀粒	不明	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
54	大豆穀粒	不明	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
55	大豆穀粒	不明	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
56	大豆穀粒	不明	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
57	大豆穀粒	不明	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
58	冷凍枝豆	中国	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
59	冷凍枝豆	中国	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
60	冷凍枝豆	中国	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
61	冷凍枝豆	中国	RRS	不検出	なし
62	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
63	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
64	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	なし
65	冷凍枝豆	台湾	RRS	不検出	なし
66	冷凍枝豆	タイ	RRS	不検出	遺伝子組換えでない
67	冷凍枝豆	タイ	RRS	不検出	なし
68	蒸し大豆	不明	RRS	検知不能	なし
69	蒸し大豆	不明	RRS	検知不能	なし
70	豆腐	アメリカ・カナダ	RRS	定量下限値未満検出(0.2%)	遺伝子組換えでない
71	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.1%)	遺伝子組換えでない
72	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.05%)	遺伝子組換えでない
73	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.05%)	遺伝子組換えでない
74	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.05%)	遺伝子組換えでない
75	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	遺伝子組換えでない
76	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	遺伝子組換えでない
77	豆腐	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	なし
78	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.01%)	遺伝子組換えでない
79	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.007%)	なし
80	豆腐	カナダ豆	RRS	定量下限値未満検出(0.004%)	遺伝子組換えでない
81	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.004%)	遺伝子組換えでない
82	豆腐	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.002%)	遺伝子組換えでない
83	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.3%)	遺伝子組換えでない
84	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.3%)	遺伝子組換えでない
85	豆乳	アメリカ	RRS	定量下限値未満検出(0.1%)	遺伝子組換えでない
86	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.07%)	遺伝子組換えでない
87	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.04%)	遺伝子組換えでない
88	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	遺伝子組換えでない
89	豆乳	不明	RRS	定量下限値未満検出(0.02%)	遺伝子組換えでない
90	豆乳	不明	RRS	検知不能	遺伝子組換えでない

大豆加工食品のRRS定量について、冷凍枝豆では10検体全てが不検出であり、平成15年度の検査開始以来、同様の結果であった。一方、平成19年度の豆腐および豆乳のRRS混入頻度は、定量下限値未満の混入では

あったが、20/20（検知不能を除く）の100%であった。平成18年度の遺伝子組換え食品の検査結果では、豆腐12検体中10検体（83%）、豆乳では検知不能以外の11検体中7検体（64%）でRRSの微量混入が認められてお

り⁶⁾、平成19年度における豆腐および豆乳のRRS混入頻度は、平成18年度に比べ増大していることが明らかになった。豆腐のRRS定量試験は平成14年度から、豆乳の同試験については平成18年度から実施しているが、これまでの検査結果において、RRS混入頻度は100%に至っていない。トウモロコシおよび大豆の生産量が多い国々では、生産性の高いGMトウモロコシの生産量が毎年増加し、非GMトウモロコシおよび非GM大豆の生産量は減少している⁷⁾。平成19年度の豆腐および豆乳の検査結果は、非GM作物およびGM作物の生産量における格差等により、非GM作物の完全な分別流通が困難になっている状況を伺わせる結果であった。GM作物の耕地比率はさらに増大することが予想される。消費者の「食品を選択する権利」をまもるためには、今後もGM作物の混入に対する監視を強化していく必要があると考える。

(平成20年7月28日受理)

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）、神奈川県衛生研究所研究報告、33、111-113（2003）
- 2) 大森清美ほか：遺伝子組換え食品の分析結果（平成15年度）、神奈川県衛生研究所研究報告、34、56-58（2004）
- 3) 大森清美ほか：遺伝子組換え食品の分析結果（平成16年度）、神奈川県衛生研究所研究報告、35、33-35（2005）
- 4) 大森清美ほか：遺伝子組換え食品の分析結果（平成17年度）、神奈川県衛生研究所研究報告、36、59-61（2006）
- 5) 米谷民雄：遺伝子組換え体の検知に関する調査研究、厚生労働科学研究費補助金 バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究 平成15年度総括・分担研究報告書（H15-食品-003）、65-97（2004）
- 6) 大森清美ほか：県内流通遺伝子組換え食品の分析結果（平成18年度）－パパイヤ、トウモロコシおよび大豆の組換えDNA検査結果－、神奈川県衛生研究所研究報告、37、41-44（2007）
- 7) 独立行政法人農業環境技術研究所、GMO情報：除草剤耐性品種でなぜ収量が増えるのか？、情報：農業と環境、97（2008）

短報

高速液体クロマトグラフィー/ 質量分析法を用いた 食品中の合成着色料の分析

関戸晴子, 岸 弘子

Analysis of artificial colorant in foods using liquid chromatography/ mass spectrometry

Haruko SEKIDO, Hiroko KISHI

はじめに

わが国の食品市場では年々輸入食品の占める割合が増加する一方であり、食品中においてわが国では食品添加物として許可されていない色素である指定外色素の検出事例がしばしば報告されている。

食品中の合成着色料の試験は、通常薄層クロマトグラフィー (TLC) あるいは液体クロマトグラフィー (HPLC) で定性による試験を実施している。TLCは試料液のスポットの色調とRf値から色素を同定する試験法である。操作は簡便ではあるが、TLC条件によっては展開後の試料液のスポット形状が悪く、標準液とRf値が異なり判定が困難となる場合や添加された色素が少量であった場合は検出できないという問題点がある。HPLCはグラジェントで一斉分析するのが主流であるが、グラジェント条件や分析カラムによって分離の仕方が微妙に異なり、保持時間が近接したり、検出する色素の順番が逆転したりするため、吸収スペクトル確認が必須となる。また、色素によっては吸収スペクトルが類似したものが多く、試料液の調製方法により保持時間の変動が顕著にみられたりすることもあるので¹⁾、吸収スペクトル確認だけでは判定が困難となる場合もある。

そこで今回、合成着色料 (酸性タール色素) の検査法として、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) を使用し、マススペクトル照合による確実な同定のできる確認方法としての一斉分析法を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

方 法

1. 色素標準品

指定色素12種類および指定外色素5種類を対象とした。表1に色素名、Color Index Number (C.I.No.) 等について示した。指定色素 (Y4, Y5, R2, R3, R102, R103, R104, R105, R106, R40, B1, B2, G3) は国立衛生試験所標準品または食品添加物公定書標準品を使用した。指定外色素はアゾルビン, グリーンS, オレンジIIは東京化成製, パテントブルーVは関東化学製, キノリンイエローはシグマ社製を使用した。

表1 色素標準品

指定色素12種					
略号	食品添加物名	C.I.No.	分子式	分子量	吸収極大波長(nm)
R2	食用赤色2号	16185	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	604.47	520
R3	食用赤色3号	45430	C ₂₀ H ₆ I ₄ Na ₂ O ₅	879.86	526
R40	食用赤色40号	16035	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	496.42	501
R102	食用赤色102号	16255	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	604.47	508
R104	食用赤色104号	45410	C ₂₀ H ₂ Br ₄ Cl ₄ Na ₂ O ₅	829.63	538
R105	食用赤色105号	45440	C ₂₀ H ₂ Cl ₄ I ₄ Na ₂ O ₅	1017.64	548
R106	食用赤色106号	45100	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	580.65	566
Y4	食用黄色4号	19140	C ₁₆ H ₉ N ₂ Na ₃ O ₉ S ₂	534.36	428
Y5	食用黄色5号	15985	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	452.37	482
B1	食用青色1号	42090	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	792.85	630
B2	食用青色2号	73015	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	466.35	612
G3	食用緑色3号	42053	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₁₀ S ₃	808.75	628
指定外色素5種					
色素名	C.I.No.	分子式	分子量	吸収極大波長(nm)	
アゾルビン	14720	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	502.43	516	
グリーンS	44090	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₇ S ₂	554.63	635	
オレンジII	15510	C ₁₆ H ₁₁ N ₂ NaO ₅ S	350.32	484	
パテントブルーV	42051	C ₂₇ H ₃₁ N ₂ NaO ₇ S ₂	582.66	638	
キノリンイエロー(モノ体)	47005	C ₁₈ H ₁₀ NNaO ₅ S	375.33	414	
(ジ体)		C ₁₈ H ₉ NNa ₂ O ₈ S ₂	477.38	416	

2. 試薬

アセトニトリルは和光純薬製HPLC用を用いた。その他の試薬は、すべて市販特級品を使用した。

3. 色素標準溶液の調製

各種標準品 (Y4, Y5, R2, R3, R102, R103, R104, R105, R106, R40, B1, B2, G3, アゾルビン, パテントブルー, グリーンS, オレンジII) 10mg, キノリンイエローは20mgを正確に量り、各々水を加えて正確に10mlとし、標準原液とした。各々の標準原液を1mlとり、指定色素12種を混合したものに水を加えて20mlとしたもの (12種混合標準溶液) と、指定外色素5種を混合したものに水を加えて20mlとしたもの (5種混合標準溶液) の2種類を作製し、LC/MS用標準溶液とした。

4. 装置

Agilent1100シリーズ LC/MSD SL(アジレント社製)

5. LC/MS条件

カラム: Inertsil ODS-2 2.1mmi.d.×150mm 粒子径

3 μ m (GLサイエンス社製)；移動相：0.01mol/l 酢酸アンモニウム溶液 (A) 及びアセトニトリル (B) をA:B=95:5(0min)→30:70(40min)→95:5(45~55min)の条件でグラジェント分析；流速：0.2ml/min；注入量：5 μ l；カラム温度：40°C；UV検出波長：254nm；イオン化法：ESI Negative；フラグメンター電圧：0~10.5min 60V, 10.5~16.5min 150V, 16.5min~55.0min 200V；ネブライザーガス：N₂ (35psi)；乾燥ガス：N₂ (12.0 l/min, 350°C)；キャピラリー電圧：4000V；SCAN： m/z =200~1100

結果及び考察

1. LC条件の検討

指定色素12種及び指定外色素5種ともに日常当所でHPLC分析の際使用している, 0.01mol/l酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリルを使用したグラジェント条件²⁾で再現性よく良好に分離したためこの条件を採用した。

2. MS条件の検討

今回使用した色素17種 (指定色素12種及び指定外色素5種) はESI法, ネガティブモードでイオン化が可能であった。各色素の脱プロトン化イオンの出現に適したフラグメンター電圧を測定したところ, それぞれの色素で異なる最適電圧を示したため, HPLCの保持時間を考慮して3グループに分けそれぞれの色素が最適条件近くになるよう設定した。

指定色素12種のLC/MSによる分析結果を図1に, またそれぞれの色素のMSスペクトルを図2に示した。12種類すべての色素から脱プロトン化イオンを確認することができた。キサンテン系色素のうちR3, R104, R105からは $[M-2Na+H]^-$ ³⁾, R106からは $[M-Na]^-$ が確認され, アゾ系色素のうちY4, R2, R102からは $[M-3Na+2H]^-$, Y5, R40とインジゴイド系色素であるB2, トリフェニルメタン系色素であるB1, G3からは $[M-2Na+H]^-$ が確認された⁴⁾。また, R104とR105は特徴のあるMSスペクトルが検出されたので図3に拡大したものを示した。R105は塩素原子を4個含むため, $m/z=972.4$ が最も強度が高く, 次に970.4, 974.4, 976.4の順の強度比で塩素由来の特徴的な同位体イオンが確認された。R104は塩素原子と臭素原子4個ずつ含むため, $m/z=784.5$ が最も強度が高く, 次に782.5, 786.5, 780.5, 788.5の順の強度比で特徴的な同位体イオンが確認された。これら複数のイオンの出現は, 化合物の構造情報を反映しているため, 定性分析の際の成分同定に有力な情報となる。

指定外色素5種のLC/MSによる分析結果を図4に, それぞれの色素のMSスペクトルを図5に示した。5種類す

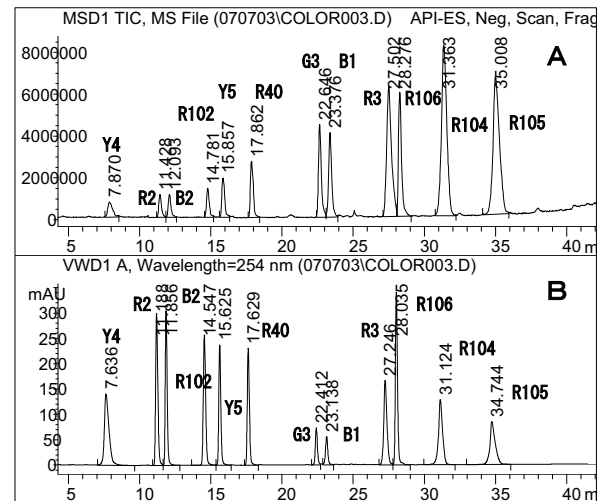


図1 指定色素12種のLC/MSクロマトグラム
A:MS(TIC)クロマトグラム B:UV254nmクロマトグラム

べての色素から脱プロトン化イオンを検出することができ, アゾルビンからは $[M-2Na+H]^-$, オレンジII, パテントブルーVからは $[M-Na]^-$, グリーンSからは $[M-H]^-$ が確認された。キノリンイエローはキノリルインダンジオン骨格にスルホン酸基 (ナトリウム塩) が付加したもので, その数が1個から3個のものの混合物であることは知られている⁵⁾。使用したシグマ社のキノリンイエローからUV254nmにおいて3本のピークが認められた。MSスペクトルを確認すると, 保持時間24.333分にモノスルホン化体由来の $[M-Na]^-$ である $m/z=352.0$ が, 14.580分にジスルホン化体由来の $[M-2Na+H]^-$ である $m/z=431.9$ が確認された。今回使用したシグマ社製のものを以外に当所に保管してある別のキノリンイエロー4検体 (東京化成工業株製ロット違い3検体, アルドリッチ社製1検体) について同様に測定したところ, それぞれUV254nmにおけるピーク数は1本から複数本と様々に検出された。MSスペクトルではすべての検体から保持時間24.5分付近にモノスルホン化体由来の $[M-Na]^-$ である $m/z=352.0$ が確認され, 複数本ピークが検出されたものからは, 保持時間14.5分付近にジスルホン化体由来の $[M-2Na+H]^-$ である $m/z=431.9$ も確認された。このことから, キノリンイエローについては, 標準品に用いる製品によって, 異性体であるモノ体, ジ体の存在する割合が異なり, モノ体とジ体由来の2つのMSスペクトルを確認に用いるのが有効であることが示唆された。

市販品への適用にあたり, 平成19年度の外部精度管理試験 (漬物中のR102,R106) と当所で以前キノリンイエローが検出されたりキュールの2検体を用いて本法を確認手段として活用したところ, 2検体ともマススペクトル照合による確実な同定結果を得ることができた。リ

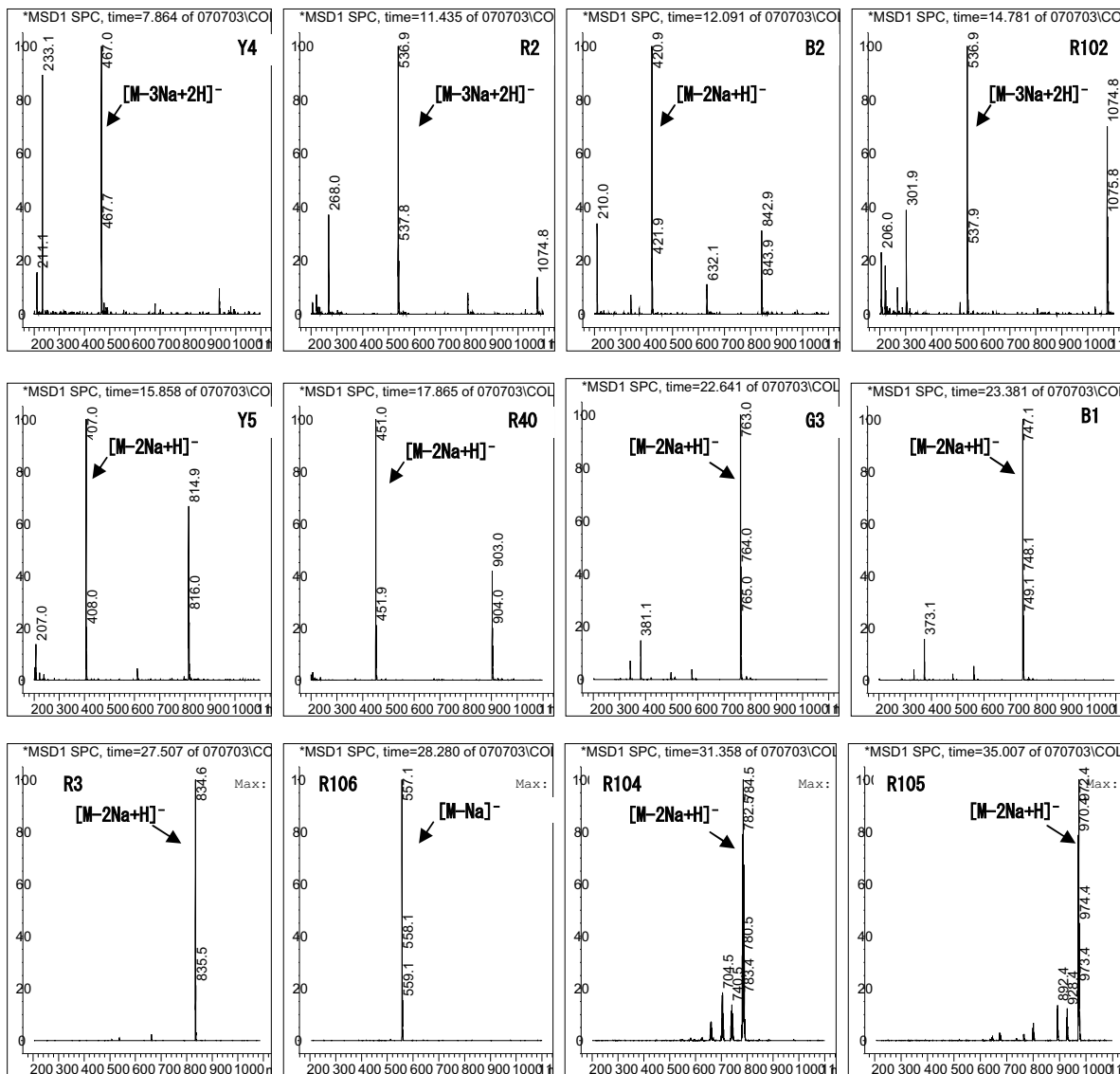


図2 指定色素12種のMSスペクトル

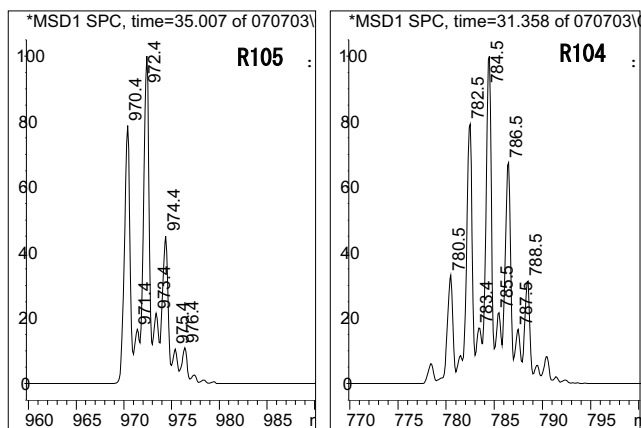


図3 R105, R104における [M-2Na+H]⁻のMSスペクトル(拡大)

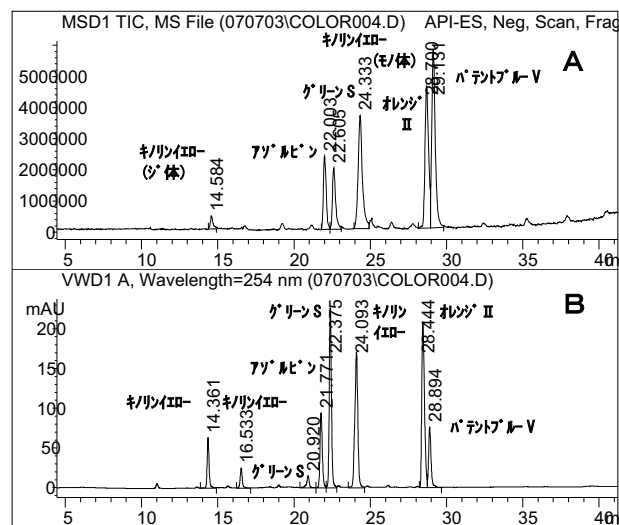


図4 指定外色素5種のLC/MSクロマトグラム
A:MS(TIC)クロマトグラム B:UV254nmクロマトグラム

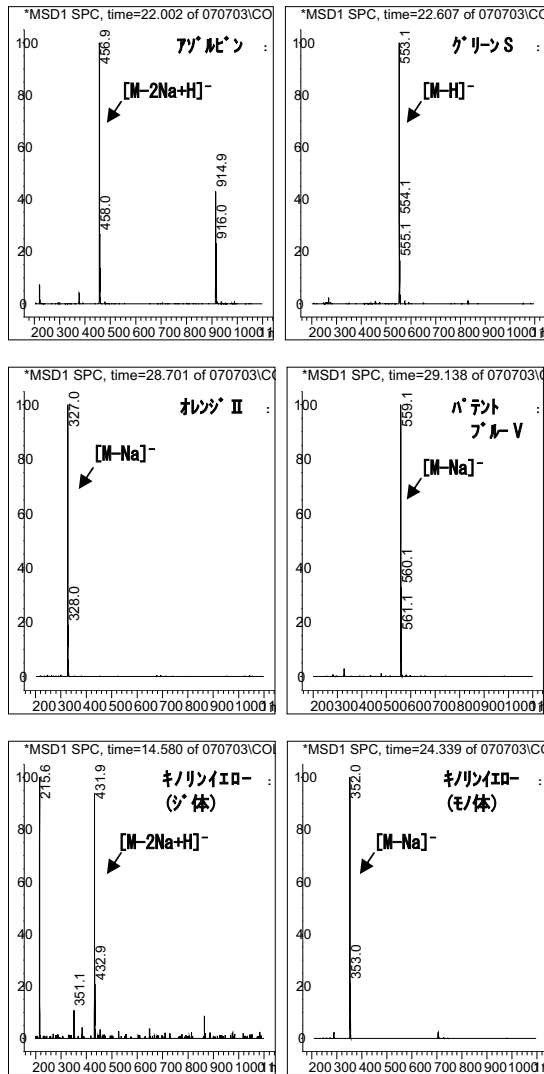


図5 指定外色素5種のMSスペクトル

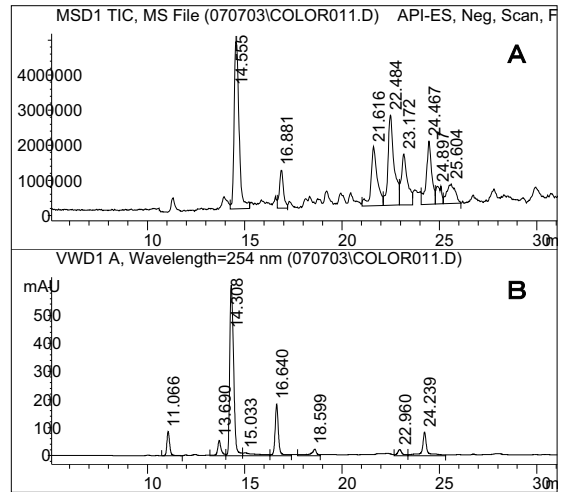


図6 リキュールのLC/MSクロマトグラム
A:MS(TIC)クロマトグラム B:UV254nmクロマトグラム

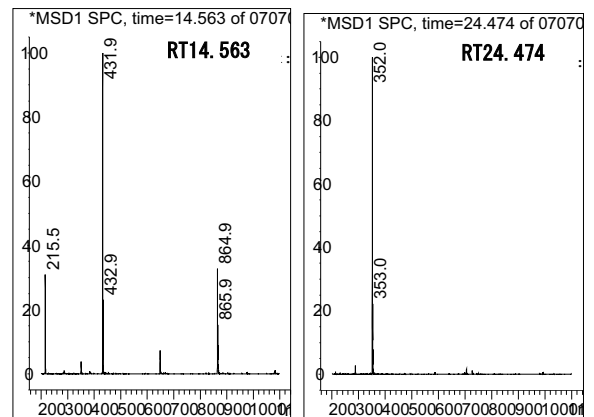


図7 リキュールのMSスペクトル

キュールのLC/MSクロマトグラムを図6に、MSスペクトルを図7に示した。UV254nmにおけるクロマトグラムからは複数本のピークが検出されたが、MSスペクトルを確認すると、保持時間24.474分にモノ体由来の $m/z=352.0$ が、14.563分にジ体由来の $m/z=431.9$ が確認された。標準品としたキノリンイエローからも同様のMSスペクトルが確認され、リキュールから検出された色素がキノリンイエローであることが証明された。

まとめ

合成着色料（酸性タール色素）について、LC/MSを用いた確認方法の実用化を検討した。その結果、指定色素12種、指定外色素5種について今回検討したLC/MSを用いた一斉分析法は、マススペクトル照合による確実な同定のできる確認方法として日常の行政検査に十分適用可能であることが確認された。

(平成20年7月28日受理)

参考文献

- 1) 新藤哲也, 大石充男, 石川ふさ子, 堀江正男, 安井明子, 伊藤弘一: 食用黄色4号のHPLC分析における保持時間の変動, 平成17年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第18回理化学研究部会総会・研究会資料, 40-43 (2005)
- 2) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針, 食品添加物編, pp.169-199, 社団法人日本食品衛生協会, 東京(2003)
- 3) 石井ふさ子, 大石充男, 新藤哲也, 堀江正男, 安井明子, 上原真一ほか: はじかみ(生姜)から検出された不明色素の構造, 食品衛生学雑誌, 46, 93-98 (2005)
- 4) 辻 澄子, 中野真希, 古川みづき, 吉井公彦, 外海泰秀: LC/MSおよびHPLCによる食用青色2号(インジゴカルミン)中の異性体および副成色素の同定・定量, 食品衛生学雑誌, 46, 116-119 (2005)
- 5) 宮武ノリエ, 永山敏廣: TLCとHPLCの併用による食品中合成着色料の一斉分析法, 東京衛研年報, 56, 145-151 (2005)

短報

高速液体クロマトグラフィー/ タンデム型質量分析計による 農産物中の残留農薬一斉試験法の検討

林 孝子, 藤巻照久, 伊藤伸一*

Analysis of pesticide residues in agricultural products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry

Takako HAYASHI, Teruhisa FUJIMAKI,
Shin-Ichi ITOH

キーワード：LC-MS-MS, 残留農薬, 一斉試験法,
ポジティブリスト

はじめに

平成 (H) 18年5月29日, 我が国の食品衛生法の大幅な改正のもと, ポジティブリスト制度が施行された。これに伴い加工食品を含む全ての食品に残留する農薬, 飼料添加物および動物用医薬品に規制がかかり, 原則として全ての農薬に一律基準, 暫定基準等の基準が適用されるようになった¹⁾。ポジティブリスト制度の導入により対象農薬は大幅に拡がり, これに対処するため液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS, LC-MS-MS) やガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) による一斉試験法が, 厚生労働省の「残留農薬分析法検討会」(食品中に残留する農薬等のポジティブリスト制に係る分析法の検討) を経て, まず7試験法がH17年11月29日に通知され, H19年に1試験法が追加された²⁾。

我々は食品中の残留農薬の行政検査を実施するため, 国に先行して独自のガイドラインを設け, 通知されている一斉試験法について農薬と対象作物との組み合わせでバリデーションを行い検査実施標準作業書 (SOP) を作成している。

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

神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

*現 地域調査部

今回, 「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I (農産物)」²⁾ について, 神奈川県内で市販されている農作物を用いて55農薬のバリデーションを行ったので報告する。

方法

1. 試料

試料は神奈川県内で流通, 販売している農作物としてりんご, オレンジ, キャベツ, じゃがいも (ばれいしょ), ほうれんそう, きゅうり, ピーマン, トマト, いちご, だいこんを用いた。

2. 試薬

標準品は関東化学 (株), 林純薬工業 (株), 和光純薬工業 (株) より入手した残留農薬試験用標準品を用いた。

標準溶液は各農薬標準品20mgを精秤し, アセトニトリルに溶解して1,000 μ g/mlとしたものを標準原液とした。これらの標準原液を混合しアセトニトリルで10 μ g/mlとなるように混合標準溶液を調製した。混合標準溶液はメタノールで適宜希釈し各濃度の標準溶液とした。

有機溶媒, 無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用を, 移動相用メタノールはLC-MS用を用いた。その他の試薬は特級を用いた。

固相抽出用ミニカラムはスぺルコ社製ENVI-Carb/LC-NH2 (500mg/500mg) を用いた。予め25%トルエン-アセトニトリル10mlでコンディショニングを行い, 実験に用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ: Agilent Technologies社製1100シリーズ

質量分析装置: Applied Biosystems社製API3000

4. HPLC条件

分析カラム: Waters社製XTerra MS C18 (粒子径3.5 μ m, 内径2.1mm, 長さ150mm)

カラム温度: 40°C

移動相: A液 5mmol/l酢酸アンモニウム水溶液, B液 5mmol/l酢酸アンモニウムメタノール

グラジエント条件: 0分 (A : B = 85 : 15) → 1分 ~ 3.5分 (60 : 40) → 6分 (50 : 50) → 8分 (45 : 55) → 17.5分 ~ 30分 (5 : 95) の直線グラジエント

流速: 0.2ml/min

注入量: 5 μ l

5. MRM (Multiple Reaction Monitoring) 測定条件

イオン化法: ESI, ポジティブモード, 測定モード: MRM, イオンスプレー電圧: 5000V, イオン源温度: 500°C, 農薬ごとのその他の測定条件は表1に示した。

表1 各農薬のLC-MS-MS測定条件

(H18年度検討27農薬)							(H19年度検討28農薬)										
No.	農薬名	相対保持時間	定量イオン			確認イオン			No.	農薬名	相対保持時間	定量イオン			確認イオン		
			MRM trace (m/z)	DP (V)	CE (V)	MRM trace (m/z)	DP (V)	CE (V)				MRM trace (m/z)	DP (V)	CE (V)	MRM trace (m/z)	DP (V)	CE (V)
1	アザフェニジン	1.01	338 → 264	46	43	338 → 112	46	77	1	イミダクロプリド	0.57	256 → 209	36	21	256 → 175	36	25
2	アシベンゾラルSメチル	1.10	211 → 136	36	39	211 → 69	36	83	2	インドキサカルブ	1.25	528 → 150	51	33	528 → 203	51	53
3	アゾキシストロビン	1.07	404 → 372	31	19	404 → 344	31	35	3	カルプロバミド	1.21	334 → 139	31	27	334 → 103	31	59
4	アラマイト	1.30	352 → 191	21	19	352 → 57	21	47	4	クロマフェノジド	1.14	395 → 175	26	19	395 → 339	26	11
5	アルジカルブ	0.77	208 → 116	6	11	208 → 89	6	23	5	シアゾファミド	1.16	325 → 108	31	19	325 → 261	31	15
6	アルドキシカルブ	0.42	240 → 86	16	29	240 → 76	16	19	6	シフルフェナミド	1.23	413 → 295	36	21	413 → 241	36	31
7	イプロジオン	1.17	330 → 245	51	23	330 → 288	51	17	7	シメコナゾール	1.15	294 → 70	31	39	294 → 135	31	31
8	イマザリル	1.20	297 → 159	41	29	297 → 255	41	25	8	チアクロプリド	0.69	253 → 126	46	29	253 → 90	46	55
9	エボキシコナゾール	1.15	330 → 121	26	29	330 → 101	26	69	9	チアメトキサム	0.48	292 → 211	31	17	292 → 181	31	31
10	オキサミル	0.44	237 → 72	11	29	237 → 90	11	13	10	テブフェノジド	1.18	353 → 133	11	25	353 → 297	11	11
11	カルバリル	0.92	202 → 145	21	15	202 → 127	21	39	11	テフルベンズロン	1.32	381 → 141	26	21	381 → 141	26	51
12	カルボフラン	0.88	222 → 165	26	17	222 → 123	26	29	12	ノバルロン	1.27	493 → 158	51	27	493 → 141	51	63
13	キサロホップエチル	1.28	373 → 299	56	25	373 → 271	56	35	13-1	フェンピロキシメートE	1.38	422 → 366	36	23	422 → 215	36	37
14	クレトジム	0.96, 1.05	360 → 164	26	29	360 → 166	26	37	13-2	フェンピロキシメートZ	1.32	422 → 366	26	19	422 → 215	26	35
15	クロフェンテジン	1.24	303 → 138	31	23	303 → 102	31	53	14	フルフェノクスロン	1.35	489 → 158	56	27	489 → 141	56	63
16	クロフルアズロン	1.38	540 → 383	51	31	540 → 158	51	31	15	ヘキシチアゾクス	1.34	353 → 228	31	21	353 → 168	31	35
17	クロロクスロン	1.13	291 → 72	41	49	291 → 164	41	25	16	ベンシクロン	1.24	329 → 125	31	35	329 → 89	31	89
18	ジウロン	1.01	233 → 72	36	37	233 → 160	36	37	17	ボスカリド	1.09	343 → 307	31	27	343 → 140	31	29
19	シクロエート	1.26	216 → 154	21	17	216 → 83	21	23	18	メトキシフェノジド	1.12	369 → 313	21	11	369 → 149	21	23
20	シクロプロトリン	1.36	499 → 181	26	47	499 → 229	26	31	19	ルフェスロン	1.32	511 → 158	56	29	511 → 141	56	67
21	ジノテフラン	0.36	203 → 129	21	17	203 → 157	21	13	20	アジンホスメチル	1.04	318 → 160	16	11	318 → 132	16	21
22	ジフルベンズロン	1.17	311 → 158	31	21	311 → 141	31	43	21	オキサジクロメホス	1.28	376 → 190	31	21	376 → 161	31	39
23	シプロジニル	1.21	226 → 93	36	47	226 → 77	36	61	22	テトラクロルピホス	1.18	367 → 127	36	21	367 → 206	36	49
24	ジメモルフ	1.08, 1.10	388 → 301	26	29	388 → 165	26	45	23	ピリミカルブ	0.96	239 → 72	31	33	239 → 182	31	23
25	シラフルオフェン	1.66	426 → 287	16	13	426 → 168	16	47	24	フェンアミドン	1.08	312 → 236	31	21	312 → 92	31	35
26-1	スピノシンA	1.45	733 → 142	51	41	733 → 98	51	95	25	フェンメディファム	1.03	301 → 168	31	13	301 → 136	31	29
26-2	スピノシンD	1.50	747 → 142	51	41	747 → 98	51	99	26	フタフェナシル	1.14	492 → 331	26	35	492 → 349	26	21
27	イソキサフルトール	1.00	360 → 251	41	19	360 → 220	41	53	27	ペンダイオカルブ	0.86	224 → 167	26	13	224 → 109	26	25
28	イソキサフルトール	1.00	360 → 251	46	21	360 → 220	46	53	28	イソキサフルトール	1.00	360 → 251	46	21	360 → 220	46	53

相対保持時間:イソキサフルトール(保持時間15-18分)を1とした相対値
 MRM Trace:MRM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
 DP:デクラスターリング ポテンシャル(Declustering Potential)
 CE:コリジョン エネルギー(Collision Energy)

6. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は通知法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」²⁾に準じて行った。

結果および考察

1. MRM測定条件の検討

MRM測定条件の検討は、対象農薬の各標準溶液を直接MSに導入するインフュージョン測定によりイオン化条件、解離条件、測定質量数等の最適化を行い、プロダクトイオンが高感度で得られる条件を求めた。H18年度は27農薬について厚生労働省「残留農薬分析法検討会」の担当として対象項目のモニターイオン、保持時間指標、定量限界の検討を行った³⁾。我々は0.1 μg/gの高濃度添加回収試験に併せて独自に0.01 μg/gの低濃度添加回収試験を追加して検討を行った。H19年度は通知法で示されている検査可能項目等を参考に27農薬を選び、相対保持時間指標農薬のイソキサフルトールとともに検討を行った。

プレカーサイオン1個から相対的に最も高感度で得られたプロダクトイオンを定量イオン、次に感度の高いプロダクトイオンを確認イオンとした。イオン化はESIとしたところ、全ての検討農薬がポジティブモードで分析可能であった。

MRM分析による検量線は、定量イオンを用いて0.005 μg/ml~0.15 μg/mlの範囲で絶対検量線を作成した。イプロジオンが相関係数(r)=0.95となったが、その他の農薬はr=0.98~1.00を示し良好な直線性が得られた。

2. バリデーション結果

当所で作成したガイドライン⁴⁾に則してバリデーションを実施した。結果を表2に示した。

定量限界は0.01 μg/ml混合標準溶液を3回以上測定して得られた標準偏差の5倍値とした⁵⁾。イプロジオンの定量限界が0.023 μg/ml、シクロプロトリンの定量限界が0.015 μg/mlとなったが、その他の農薬については0.0003~0.0084 μg/mlとなり、一律基準値である0.01 μg/mlを十分に担保できる値となった。

添加回収試験は2濃度(低濃度、高濃度)で実施した。低濃度(L)は検体濃度で一律基準値の0.01 μg/g相当、高濃度(H)は0.1 μg/g相当を添加した。真度(回収率)および精度(相対標準偏差)はCodex委員会「残留動物薬のガイドライン」⁶⁾を参考に、低濃度は回収率60~120%、相対標準偏差(RSD)25%以内、高濃度は回収率70~110%、RSD 15%以内を適用可能とした。なお、精度試験の繰り返し検査数(n)はH18年度n=4、H19年度n=5で行った。クレトジムは検討した5作物全てで

表2 バリデーシヨン結果および総合評価

No.	農薬名	りんご			オレンジ			キヤベツ			ほれいしょ			ほうれんそう											
		LC/MS/MS Trace ($\mu\text{g/ml}$)	LC/MS/MS 定定量 ($\mu\text{g/ml}$)	精度 (%)	LC/MS/MS Trace ($\mu\text{g/ml}$)	LC/MS/MS 定定量 ($\mu\text{g/ml}$)	精度 (%)	LC/MS/MS Trace ($\mu\text{g/ml}$)	LC/MS/MS 定定量 ($\mu\text{g/ml}$)	精度 (%)	LC/MS/MS Trace ($\mu\text{g/ml}$)	LC/MS/MS 定定量 ($\mu\text{g/ml}$)	精度 (%)	LC/MS/MS Trace ($\mu\text{g/ml}$)	LC/MS/MS 定定量 ($\mu\text{g/ml}$)	精度 (%)									
1	アザラジニジン	338-264	0.0052	81.7	2.4	82.3	3.6	83.0	7.5	87.6	3.7	83.4	6.1	86.4	7.7	86.5	5.8	87.6	4.6	82.8	6.0	89.5	2.8		
2	アンペシメチリン	211-136	0.0057	84.0	3.2	76.8	4.4	83.0	9.8	16.7	108.2	5.3	83.4	6.1	86.4	7.7	86.5	5.8	87.6	4.6	82.8	6.0	89.5	2.8	
3	アジメクトリン	404-372	0.0013	84.8	1.6	82.6	2.6	83.0	5.6	3.7	86.2	1.7	83.0	2.9	74.5	22.2	81.1	0.9	81.1	0.9	81.1	0.9	81.1	0.9	
4	アザラジニジン	352-191	0.0013	83.0	3.0	82.5	2.6	83.0	7.9	4.7	87.8	1.0	83.0	7.9	85.5	1.7	83.0	7.9	85.5	1.7	83.0	7.9	85.5	1.7	
5	アジメクトリン	208-116	0.0029	75.5	5.7	74.3	4.1	84.0	12.2	83.0	6.0	83.0	6.0	83.0	6.0	83.0	6.0	83.0	6.0	83.0	6.0	83.0	6.0	83.0	6.0
6	アジメクトリン	240-86	0.0018	76.0	2.1	77.3	2.3	85.0	7.3	4.7	80.7	3.2	85.0	7.3	4.7	80.7	3.2	85.0	7.3	4.7	80.7	3.2	85.0	7.3	
7	イメダゾール	330-245	0.0023	147.0	21.8	105.3	5.2	85.3	18.5	154.3	4.9	22.4	21.1	105.8	2.6	135.8	9.3	101.9	3.7	135.8	9.3	101.9	3.7	135.8	9.3
8	イメダゾール	297-159	0.0018	76.4	8.4	74.1	1.9	83.0	7.3	5.9	83.0	1.2	83.0	7.3	5.9	83.0	1.2	83.0	7.3	5.9	83.0	1.2	83.0	7.3	
9	エチピホスホリン	330-121	0.0039	89.4	2.0	79.4	4.3	83.0	7.9	13.3	86.4	0.8	83.0	7.9	13.3	86.4	0.8	83.0	7.9	13.3	86.4	0.8	83.0	7.9	
10	オキサリメチル	202-145	0.0064	82.2	2.6	81.1	2.3	83.0	7.5	4.3	87.4	0.7	83.0	7.5	4.3	87.4	0.7	83.0	7.5	4.3	87.4	0.7	83.0	7.5	
11	カルボベンチリン	222-165	0.0043	78.4	1.1	83.5	4.2	83.0	7.5	4.3	87.4	0.7	83.0	7.5	4.3	87.4	0.7	83.0	7.5	4.3	87.4	0.7	83.0	7.5	
12	キヤロトキシニジン	373-239	0.0025	83.8	1.8	81.4	2.5	83.0	7.3	3.0	86.4	2.1	83.0	7.3	3.0	86.4	2.1	83.0	7.3	3.0	86.4	2.1	83.0	7.3	
13	キヤロトキシニジン	360-164	0.0041	17.4	10.2	34.0	11.1	83.0	32.1	12.5	33.0	23.3	2.1	83.0	32.1	12.5	33.0	23.3	2.1	83.0	32.1	12.5	33.0	23.3	
14	クロロピリフェン	549-40	0.0023	54.9	4.0	59.9	10.6	83.0	5.9	5.0	71.9	7.2	83.0	5.9	5.0	71.9	7.2	83.0	5.9	5.0	71.9	7.2	83.0	5.9	
15	クロロピリフェン	540-383	0.0063	41.8	6.4	65.0	7.6	83.0	6.9	1.3	1.6	86.5	2.2	83.0	6.9	1.3	1.6	86.5	2.2	83.0	6.9	1.3	1.6	86.5	2.2
16	クロロピリフェン	299-172	0.0032	86.8	8.9	81.9	2.5	83.0	7.0	3.3	89.9	3.7	83.0	7.0	3.3	89.9	3.7	83.0	7.0	3.3	89.9	3.7	83.0	7.0	
17	クロロピリフェン	233-72	0.0032	82.2	6.2	81.2	4.5	83.0	8.5	4.3	89.9	3.7	83.0	8.5	4.3	89.9	3.7	83.0	8.5	4.3	89.9	3.7	83.0	8.5	
18	シメクトリン	216-154	0.0025	58.4	12.7	61.3	5.6	83.0	6.7	4.9	74.9	7.0	83.0	6.7	4.9	74.9	7.0	83.0	6.7	4.9	74.9	7.0	83.0	6.7	
19	シメクトリン	499-181	0.0015	61.1	11.6	76.8	7.9	83.0	7.0	19.2	87.9	8.1	83.0	7.0	19.2	87.9	8.1	83.0	7.0	19.2	87.9	8.1	83.0	7.0	
20	シメクトリン	203-129	0.0084	69.9	7.8	64.4	2.3	83.0	6.8	86.8	0.8	83.0	6.8	86.8	0.8	83.0	6.8	86.8	0.8	83.0	6.8	86.8	0.8	83.0	6.8
21	シメクトリン	311-158	0.0040	82.9	2.5	81.6	1.1	83.0	8.3	6.8	86.8	0.8	83.0	8.3	6.8	86.8	0.8	83.0	8.3	6.8	86.8	0.8	83.0	6.8	
22	シメクトリン	228-93	0.0047	83.5	2.9	82.9	2.1	83.0	9.1	8.3	87.3	3.9	83.0	9.1	8.3	87.3	3.9	83.0	9.1	8.3	87.3	3.9	83.0	8.3	
23	シメクトリン	388-301	0.0017	85.1	5.4	82.6	3.8	83.0	6.8	2.4	83.8	1.6	83.0	6.8	2.4	83.8	1.6	83.0	6.8	2.4	83.8	1.6	83.0	6.8	
24	シメクトリン	428-287	0.0018	81.4	2.2	83.4	4.3	83.0	7.1	10.4	92.3	6.4	83.0	7.1	10.4	92.3	6.4	83.0	7.1	10.4	92.3	6.4	83.0	7.1	
25	シメクトリン	733-142	0.0022	78.2	5.5	77.8	3.7	83.0	6.2	83.9	4.7	83.0	6.2	83.9	4.7	83.0	6.2	83.9	4.7	83.0	6.2	83.9	4.7	83.0	6.2
26-2	シメクトリン	747-142	0.0017	78.3	8.7	79.2	3.2	83.0	8.2	0.7	83.6	1.6	83.0	8.2	0.7	83.6	1.6	83.0	8.2	0.7	83.6	1.6	83.0	8.2	
26-3	シメクトリン	360-251	0.0031	84.8	3.2	79.4	2.4	83.0	7.9	7.5	81.0	2.7	83.0	7.9	7.5	81.0	2.7	83.0	7.9	7.5	81.0	2.7	83.0	7.9	
27	イソキサリメチル	360-251	0.0031	84.8	3.2	79.4	2.4	83.0	7.9	7.5	81.0	2.7	83.0	7.9	7.5	81.0	2.7	83.0	7.9	7.5	81.0	2.7	83.0	7.9	

LC/MS/MSの精度は、その標準偏差(SD)の5倍とした。平成18年度検定72農薬: n=3, 平成19年度検定72農薬: n=5
 精度は、LC/MS/MSの精度に、その標準偏差(SD)の5倍とした。平成18年度検定72農薬: n=3, 平成19年度検定72農薬: n=5
 回収率はマトリックス添加回収率を算出した。回収率はマトリックス添加回収率を算出した。
 総合評価は、定定量が0.01 $\mu\text{g/ml}$ 以下かつ追加回収率が真度、精度に適用範囲内であるものを○とし、いずれかが外れるものを×とした。

回収率が8.2%~66.4%と低く適用不可となった。イブ
ロジオンは定量限界が0.023 $\mu\text{g/ml}$ と高く、5作物の回
収率も99.1%~224.0%と高くなり適用不可と判断した。
ジノテフランは高濃度の添加回収率が62.8%~68.4%と
なり適用範囲から外れた。バリデーションの総合評価は、
定量限界が0.01 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、作物ごとの添加回
収試験が真度、精度共に2濃度で適用範囲内にあること
で判断した。その結果、H18年度検討27農薬ではりん
ごで20農薬、オレンジで21農薬、キャベツで18農薬、
ばれいしよで19農薬、ほうれんそうで20農薬が適用可
能となった。H19年度検討28農薬では神奈川県内で生
産量が高く流通量の多い農作物として選んだ6作物で試
験を行ったが、キャベツ、きゅうり、トマト、いちご、

だいこんで28農薬全てが適用可能となり、ピーマンで
は27農薬が適用可能となった。

3. MRM分析の確認法の検討

LC-MS-MSによるMRM分析の結果の確認法として、
EUのガイドライン⁷⁾を参考に、今回検討した農薬につ
いてピーク強度の比較を行った。LC-MS-MSのMRM分
析では1個のプレカーサーイオンに由来する2個のプロ
ダクトイオンのピーク強度比が一定の許容範囲内に収ま
るか否かで物質の同定を行う。今回検討した55農薬に
ついて、2濃度(0.01 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$)の溶媒標準
溶液とマトリックスを含む標準溶液(マトリックス添加
標準溶液)の定量イオンと確認イオンの相対イオン強度
比を比較した。結果を表3に示した。

表3 各農薬の定量イオンと確認イオンの相対強度比

		Low (0.01 $\mu\text{g/mL}$)						High (0.1 $\mu\text{g/mL}$)							
		STD		M-STD				STD		M-STD					
No.	農薬名	相対イオン 強度比	許容される強度 比の範囲	りんご	オレンジ	キャベツ	ばれいしよほうれん草	相対イオン 強度比	許容される強度 比の範囲	りんご	オレンジ	キャベツ	ばれいしよほうれん草		
1	アザフェニジン	0.34	0.25 ~ 0.42	0.32	0.30	0.34	0.30	0.31	0.32	0.24 ~ 0.40	0.33	0.34	0.32	0.34	0.33
2	アシベンゾラシメチル	0.39	0.29 ~ 0.49	0.36	0.46	0.36	0.34	0.35	0.35	0.26 ~ 0.43	0.35	0.34	0.32	0.35	0.33
3	アゾキシストロピン	0.16	0.11 ~ 0.20	0.15	0.20	0.16	0.15	0.16	0.17	0.12 ~ 0.22	0.17	0.18	0.17	0.16	0.17
4	アラマイト	0.07	0.04 ~ 0.11	0.06	0.07	0.07	0.06	0.07	0.07	0.04 ~ 0.11	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
5	アルジカルブ	0.44	0.33 ~ 0.55	0.51	0.45	0.45	0.44	0.42	0.43	0.33 ~ 0.54	-	0.44	-	-	-
6	アルドキシカルブ	0.70	0.56 ~ 0.84	0.67	0.71	0.59	0.69	0.73	0.66	0.53 ~ 0.80	0.68	0.69	0.68	0.67	0.65
7	イブロジオン	0.22	0.17 ~ 0.28	0.13	0.23	0.17	0.23	0.14	0.18	0.13 ~ 0.24	0.16	0.19	0.16	0.19	0.17
8	イマザリル	0.46	0.34 ~ 0.57	0.45	0.44	0.41	0.44	0.42	0.43	0.32 ~ 0.54	0.42	0.44	0.46	0.44	0.44
9	エボキシコナゾール	0.33	0.25 ~ 0.41	0.33	0.34	0.33	0.34	0.31	0.34	0.26 ~ 0.43	0.36	0.34	0.34	0.34	0.34
10	オキサミル	0.44	0.33 ~ 0.55	0.43	0.47	0.43	0.40	0.42	0.38	0.29 ~ 0.48	0.39	0.41	0.41	0.40	0.41
11	カルバリル	0.29	0.22 ~ 0.37	0.28	0.25	0.24	0.27	0.25	0.28	0.21 ~ 0.34	0.28	0.28	0.28	0.27	0.28
12	カルボフラン	0.62	0.50 ~ 0.74	0.60	0.62	0.54	0.60	0.61	0.62	0.50 ~ 0.75	0.61	0.63	0.62	0.60	0.61
13	キザロホップエチル	0.14	0.10 ~ 0.19	0.16	0.16	0.14	0.16	0.16	0.16	0.11 ~ 0.21	0.17	0.16	0.16	0.15	0.17
14	クレトジム	0.49	0.37 ~ 0.61	0.51	0.51	0.50	0.48	0.48	0.47	0.36 ~ 0.59	0.48	0.49	0.49	0.47	0.51
15	クロフェンテジン	0.24	0.18 ~ 0.30	0.26	0.25	0.26	0.27	0.25	0.27	0.20 ~ 0.33	0.26	0.27	0.25	0.25	0.25
16	クロルフルアズロン	0.44	0.33 ~ 0.56	0.44	0.45	0.49	0.47	0.49	0.50	0.40 ~ 0.60	0.46	0.51	0.50	0.49	0.49
17	クロロクソロン	0.15	0.11 ~ 0.20	0.13	0.12	0.10	0.13	0.14	0.11	0.08 ~ 0.15	0.12	0.12	0.13	0.12	0.13
18	ジウロン	0.08	0.04 ~ 0.12	0.09	0.07	0.20	0.07	0.07	0.07	0.04 ~ 0.11	0.07	0.09	0.06	0.06	0.07
19	シクロエート	1.17	0.94 ~ 1.40	1.39	1.20	1.13	1.23	1.18	1.19	0.95 ~ 1.43	1.16	1.15	1.17	1.21	1.21
20	シクロプロトリン	0.78	0.62 ~ 0.93	0.88	0.83	1.20	0.77	0.87	0.91	0.73 ~ 1.09	0.92	0.90	1.08	1.02	0.90
21	ジノテフラン	0.72	0.57 ~ 0.86	0.83	0.90	0.64	0.75	0.88	0.76	0.61 ~ 0.91	0.79	0.77	0.81	0.77	0.75
22	ジフルベンズロン	0.47	0.35 ~ 0.59	0.49	0.43	0.45	0.45	0.46	0.46	0.35 ~ 0.58	0.47	0.46	0.46	0.46	0.46
23	シプロジニル	0.59	0.47 ~ 0.71	0.55	0.58	0.71	0.57	0.51	0.52	0.41 ~ 0.62	0.56	0.53	0.54	0.55	0.55
24	ジメトモルブ	0.36	0.27 ~ 0.46	0.37	0.40	0.36	0.36	0.37	0.37	0.28 ~ 0.46	0.36	0.37	0.37	0.36	0.37
25	シラフルオフェン	0.14	0.10 ~ 0.18	0.10	0.07	0.11	0.11	0.10	0.09	0.05 ~ 0.14	0.10	0.08	0.10	0.09	0.10
26-1	スピノシンA	0.24	0.18 ~ 0.30	0.25	0.25	0.24	0.24	0.24	0.25	0.19 ~ 0.31	0.24	0.24	0.24	0.23	0.23
26-2	スピノシンD	0.20	0.14 ~ 0.26	0.20	0.20	0.20	0.20	0.21	0.20	0.14 ~ 0.26	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19
27	イソキサフルトール	0.05	0.03 ~ 0.08	0.06	0.06	0.04	0.07	0.05	0.05	0.02 ~ 0.07	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05

		Low (0.01 $\mu\text{g/mL}$)						High (0.1 $\mu\text{g/mL}$)									
		STD		M-STD				STD		M-STD							
No.	農薬名	相対イオン 強度比	許容される強度 比の範囲	キャベツ	きゅうり	ピーマン	トマト	いちご	だいこん	相対イオン 強度比	許容される強度 比の範囲	キャベツ	きゅうり	ピーマン	トマト	いちご	だいこん
1	イミダクロプリド	0.84	0.67 ~ 1.00	0.91	0.78	0.87	0.88	0.78	0.89	0.87	0.69 ~ 1.04	0.80	0.87	0.88	0.86	0.83	0.92
2	インドキサカルブ	0.79	0.63 ~ 0.95	0.77	0.83	0.87	0.81	0.83	0.80	0.83	0.67 ~ 1.00	0.83	0.82	0.82	0.80	0.83	0.85
3	カルプロバミド	0.52	0.42 ~ 0.63	0.55	0.51	0.53	0.53	0.47	0.48	0.52	0.41 ~ 0.62	0.53	0.52	0.53	0.53	0.50	0.50
4	クロマフェノジド	0.37	0.27 ~ 0.46	0.37	0.36	0.38	0.38	0.37	0.37	0.37	0.28 ~ 0.46	0.37	0.37	0.36	0.36	0.37	0.37
5	シアゾファミド	0.14	0.10 ~ 0.18	0.14	0.14	0.14	0.12	0.15	0.14	0.14	0.09 ~ 0.18	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14
6	シフルフェナミド	0.60	0.48 ~ 0.72	0.59	0.62	0.59	0.62	0.63	0.58	0.59	0.47 ~ 0.71	0.59	0.59	0.58	0.58	0.58	0.59
7	シメコナゾール	0.32	0.24 ~ 0.40	0.34	0.31	0.32	0.34	0.32	0.32	0.32	0.24 ~ 0.40	0.32	0.32	0.31	0.32	0.32	0.32
8	チアクロプリド	0.14	0.10 ~ 0.18	0.13	0.13	0.13	0.15	0.14	0.15	0.14	0.10 ~ 0.18	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
9	チアトキササム	0.44	0.33 ~ 0.54	0.43	0.37	0.37	0.41	0.42	0.39	0.41	0.30 ~ 0.51	0.38	0.43	0.48	0.40	0.41	0.40
10	テブフエノジド	0.92	0.74 ~ 1.11	0.94	0.91	0.93	0.90	0.93	0.95	0.92	0.74 ~ 1.11	0.92	0.97	0.94	0.96	0.92	0.93
11	テフルベンズロン	0.56	0.45 ~ 0.67	0.59	0.51	0.59	0.53	0.64	0.55	0.57	0.46 ~ 0.69	0.55	0.58	0.57	0.61	0.54	0.57
12	ノバルロン	0.55	0.44 ~ 0.66	0.53	0.54	0.48	0.54	0.55	0.55	0.44 ~ 0.66	0.53	0.54	0.53	0.54	0.53	0.56	0.56
13-1	フェンピロキシメートE	0.07	0.04 ~ 0.11	0.08	0.07	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.04 ~ 0.11	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
13-2	フェンピロキシメートZ	0.11	0.08 ~ 0.14	0.11	0.11	0.11	0.12	0.10	0.11	0.08 ~ 0.14	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10
14	フルフェノクスロン	0.51	0.41 ~ 0.61	0.49	0.53	-	0.52	0.52	0.52	0.49	0.37 ~ 0.62	0.47	0.50	0.49	0.49	0.51	0.52
15	ヘキシチアゾクス	0.80	0.64 ~ 0.96	0.80	0.80	0.80	0.77	0.77	0.77	0.77	0.62 ~ 0.93	0.80	0.75	0.75	0.78	0.76	0.76
16	ペンシクロン	0.10	0.05 ~ 0.15	0.09	0.10	0.09	0.10	0.10	0.09	0.10	0.05 ~ 0.15	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
17	ボスカリド	0.25	0.19 ~ 0.32	0.28	0.28	-	0.28	0.28	0.26	0.20 ~ 0.33	0.26	0.26	0.25	0.26	0.26	0.25	0.25
18	メトキシフェノジド	1.01	0.81 ~ 1.21	0.93	0.89	0.93	0.99	0.91	0.93	0.95	0.76 ~ 1.14	0.95	0.95	0.91	0.90	0.92	0.87
19	ルフェスロン	0.72	0.58 ~ 0.86	0.77	0.80	0.72	0.74	0.75	0.72	0.78	0.62 ~ 0.94	0.71	0.73	0.72	0.71	0.77	0.78
20	アジンホスメチル	0.49	0.37 ~ 0.62	0.53	0.59	0.61	0.54	0.54	0.47	0.56	0.45 ~ 0.67	0.52	0.64	0.58	0.54	0.55	0.53
21	オキサジクロメホン	0.26	0.19 ~ 0.32	0.26	0.25	0.25	0.25	0.24	0.25	0.26	0.19 ~ 0.32	0.25	0.25	0.25	0.26	0.25	0.25
22	テトラクロリンボンホス	0.14	0.10 ~ 0.18	0.12	0.14	0.13	0.14	0.14	0.15	0.14	0.10 ~ 0.18	0.14	0.13	0.14	0.14	0.15	0.14
23	ピリミカルブ	0.50	0.40 ~ 0.60	0.52	0.50	0.51	0.53	0.51	0.53	0.50	0.37 ~ 0.62	0.51	0.51	0.50	0.51	0.51	0.52
24	フェンアミド	0.92	0.73 ~ 1.10	0.89	0.96	0.96	0.91	0.95	0.90	0.93	0.74 ~ 1.12	0.93	0.93	0.93	0.95	0.91	0.92
25	フェンメチファム	0.60	0.48 ~ 0.73	0.61	0.61	0.60	0.63	0.62	0.61	0.61	0.49 ~ 0.74	0.63	0.61	0.61	0.61	0.62	0.61
26	ブタフェナシル	0.76	0.60 ~ 0.91	0.79	0.74	0.73	0.79	0.73	0.75	0.76	0.61 ~ 0.91	0.77	0.75	0.77	0.74	0.75	0.77
27	ベンダイオカルブ	0.75	0.60 ~ 0.90	0.73	0.72	0.72	0.71	0.76	0.67	0.71	0.57 ~ 0.85	0.73	0.73	0.70	0.71	0.72	0.67
28	イソキサフルトール	0.05	0.03 ~ 0.08	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.03 ~ 0.08	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.06

STD : 標準溶液
許容される強度比の範囲
H18年度検討27農薬:
M-STD : マトリックス添加標準溶液
STD相対イオン強度比 : >0.5 ±20% >0.2 to 0.5 ±25% >0.1 to 0.2 ±30% ≤0.1 ±50%
H19年度検討28農薬:
STD, M-STD n=3
H19年度検討28農薬:
STD n=5
0.1 $\mu\text{g/mL}$ n=5
0.1 $\mu\text{g/mL}$ n=4
M-STD : n=2

その結果、H18年度に検討した27農薬では0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のイプロジオン、ジノテフラン、シラフルオフェンで2作物、アゾキシストロピン、クロロクスロン、ジウロン、シクロプロトリン、シプロジニルで1作物のマトリックス添加標準溶液の相対イオン強度比が許容範囲から外れたが、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では27農薬全てが許容範囲内に入った。またH19年度検討28農薬は0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 共に28農薬全ての相対イオン強度比が許容範囲内に入る結果となった。このことより溶媒標準溶液とマトリックス添加標準溶液の定量イオンと確認イオンの相対イオン強度比の比較は、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では若干許容範囲から外れるものがあったが、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では今回検討した農薬全てが許容範囲内に収まった。

今回検討したH19年度に検討した28農薬の対象6作物では、きゅうりからイミダクロプリド (0.0032ppm (= $\mu\text{g}/\text{g}$), 基準値1ppm), ボスカリド (0.0023ppm, 基準値5ppm), ピーマンからフルフェノクスロン (0.025ppm, 基準値2ppm), ボスカリド (0.032ppm, 基準値10ppm), ルフェヌロン (0.0027ppm, 基準値1ppm), トマトからボスカリド (0.021ppm, 基準値5ppm), いちごからヘキシチアゾクス (0.0011ppm, 基準値2ppm)のピークが検出された。今回検討した抽出法は最終的に等倍の試験溶液となるため、検出された試験溶液濃度が作物からの検出濃度となる。いずれも基準値以下の微量であるが、検出されたピークの相対イオン強度比を求めて0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶媒標準溶液の相対イオン強度比と比較し、許容される範囲内に収まるか確認を行った。その結果、きゅうりのイミダクロプリドがイオン強度比1.07となり、0.67~1.00の許容範囲から若干外れたものの、他

6つの検出ピークの相対イオン強度比はそれぞれ許容範囲内となり (きゅうりのボスカリド:0.27, ピーマンのフルフェノクスロン:0.46, ボスカリド:0.28, ルフェヌロン:0.77, トマトのボスカリド:0.26, いちごのヘキシチアゾクス:0.78), 検出農薬の確認が可能であった。

以上のように、MRM法における相対イオン強度比の比較は定量測定時のデータから同時にできるため、再検査を必要とせず迅速に物質確認ができる有効な手法であると考えられた。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) 厚生労働省告示第497号 (平成17年11月29日)
- 2) 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)
- 3) 厚生労働省ホームページ: 分析法検討結果の詳細, 平成17年度 農薬一斉分析法検討結果
<<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/index.html>>
- 4) 神奈川県衛生研究所: 衛生研究所における検査実施標準作業書 (SOP) 作成ガイドライン—理化学編— (2006)
- 5) 厚生省生活衛生局食品保健課: 分析法のバリデーションについて (回答) (平成11年10月8日)
- 6) Official Standards of Codex Alimentarius Commission: CAC/GL 19-1993 (1993)
- 7) Official Journal of the European Communities: 2002/657/EC, L221/8 (2002)

短報

誘導結合プラズマ質量分析装置
(ICP-MS)による
ミネラルウォーター中の金属の
分析方法の検討

岩淵真樹, 長谷川一夫

On the method for determination of
metals in mineral water by ICP-MS

Masaki IWABUCHI and Kazuo HASEGAWA

はじめに

水道水の味への不満や安全性への不安から、ミネラルウォーターの需要が年々増加している¹⁾。しかし、ミネラルウォーター中の含有成分については、報告例がなく不明な点が多い。とりわけ金属について分析方法を確立して、成分濃度を把握することは重要な課題である。

水道水中の金属の分析に関しては、フレイムレス原子吸光光度計、フレイム原子吸光光度計、誘導結合プラズマ発光分光分析装置及び誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)による分析法が告示法²⁾となっている。この中でICP-MS法は、金属の一斉分析が可能で、他に比べて低濃度まで測定可能な方法として近年急速に利用されてきている。しかし、試料によっては共存元素に起因して分子イオンが生成され、その質量数が目的元素の質量数と同じになるので、分析を困難にしているという問題が知られている^{3)~5)}。

そこで、今回我々は、共存物質が多く含まれる可能性があるミネラルウォーター中の金属濃度を精度よく測定することを目的に、アルゴンガスの他に水素ガス又はヘリウムガスを反応ガスとして使用する方法を装備したICP-MS装置を用いて、共存物質の影響を低減化する条件を検討したので報告する。

方法

1 試料

県内に流通している国産及び輸入のミネラルウォーター

53試料を用いた。

2 測定元素

水道法における水質基準項目 (B, Al, Cr, Fe, Mn, Cu, Zn, As, Se, Cd, Pb), 水質管理目標設定項目 (Ni, Sb, U), 要検討項目 (Mo, Ag, Ba, Bi) 及びその他 (Be, V, Tl) の21元素とした。

3 試薬, 標準液

硝酸は関東化学社製の超高純度試薬を用いた。

B, Al, Cr, Fe, Mn, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sb, Pb及びUの15元素は, SPEX社製 XSTC-760Aを15元素混合標準液として用いた。Ag, Ba及びVの3元素は関東化学社製の原子吸光分析用1,000mg/l溶液を超純水で100倍希釈した硝酸(以下,(1+99)硝酸)で希釈して各濃度を10mg/lに調製した。また, Bi, Be及びTlの3元素は関東化学社製の原子吸光分析用又は化学分析用1,000mg/l溶液を(1+99)硝酸で希釈して各濃度を1mg/lに調製した。

内部標準液は, 関東化学社製の原子吸光分析用又は化学分析用Co, Y及びIn各 1,000mg/l溶液を超純水で20倍希釈した硝酸(以下,(5+95)硝酸)で希釈して各濃度を10mg/lに調製した。使用した内部標準物質と対象とする元素の関係を表1に示した。

Ca標準液は, MERCK社製硝酸カルシウムを用いて5,000mg/lに調製した。Mg標準液は, 和光純薬工業社製硝酸マグネシウム溶液原子吸光分析用(10,000mg/l)を

表1 測定元素と検討濃度

元素	測定質量数	内部標準物質	基準値等濃度 (μg/l)	検討濃度 (μg/l)
Be	9	Co	4	1
B	11	Co	1,000	10
Al	27	Co	200	10
V	51	Co	-	10
Cr	52,53	Co	50	5
Fe	54,56	Co	300	30
Mn	55	Co	50	5
Ni	60,62	Co	10	1
Cu	63,65	Co	1,000	10
Zn	64,66	Co	1,000	10
As	75	Y	10	1
Se	78,82	Y	10	1
Mo	95,98	Y	70	7
Ag	107,109	In	100	10
Cd	111,114	In	10	1
Sb	121,123	In	15	0.2
Ba	136,137	In	700	10
Tl	205	In	2	1
Pb	208	In	10	1
Bi	209	In	-	1
U	238	In	2	0.2

使用した。Na及びK標準液は和光純薬工業社製硝酸ナトリウム及び硝酸カリウムを用いて各5,000mg/lに調製した。

Cl及びSO₄標準液は、和光純薬工業社製容量分析用1mol/l塩酸及び0.5mol/l硫酸を用いた。

4 装置と分析条件

装置と測定条件は表2に示した。共存元素の影響の低減化を確認するために、反応ガスを使用しない方法と反応ガスとして「水素ガス」、「ヘリウムガス」を使用した方法で測定した。測定質量数は表1に示した。

表2 ICP-MSの測定条件

ICP-MS	: Agilent 7500 c
RFパワー	: 1,490 W
プラズマガス(Ar)	: 15 l/min
キャリアガス(Ar)	: 1.18 l/min
ネブライザー	: Babington type
H ₂ ガス	: 5.2 ml/l
Heガス	: 4.6 ml/l
測定	: 内部標準法

5 検討溶液の調製

水道水質基準値、水質管理目標値、要検討項目の目標値、EPAの飲水基準の1/2から1/100の濃度への共存元素の影響を明らかにするために、以下の検討溶液を調製した。21元素の濃度は下記の(1)、(2)に記した元素の添加、無添加ともに表1のとおりとした。

(1) Ca, Mg, Na及びK

共存元素としてCa, Mg, Na及びKの影響を検討するために、3種の混合標準液を一定量メスフラスコに採取して混合した後、Ca, Mg, Na及びKを添加したものと、しないものを調製した。添加後のCa, Mg, Na及びK濃度はそれぞれ200, 100, 200及び20mg/lになるようにした。

(2) Cl及びS

共存元素としてCl及びSの影響を検討するために標準液に塩酸及び硫酸を使用した。3種の混合標準液を一定量メスフラスコに採取して混合した後、1mol/l塩酸及び0.5mol/l硫酸を添加したものと、しないものを調製した。添加後のClとSO₄濃度設定はミネラルウォーター53試料について測定した結果から、低濃度用としてそれぞれ100, 200mg/l及び高濃度用としてそれぞれ500, 2,000 mg/lになるようにした。

6 試料溶液の調製

各ミネラルウォーターは水道水と同様な前処理方法²⁾を用いて調製した。

結果及び考察

1 検量線の検討

反応ガスを用いない方法 (Arモード) と反応ガスと

して水素ガスまたはヘリウムガスを用いた方法 (それぞれH₂モード, Heモード) について、表1に示す検討濃度からその10倍濃度の範囲で検量線を作成したところ、相関係数は0.9852以上であり、すべての元素で良好な直線性を示した。

Arモードでは特に、Fe (54), Fe (56), Se (78) のブランクの信号は51,400cps, 645,000cps, 3,330cpsと高かったが、H₂モードでは61cps, 97cps, 2cps, Heモードでは56cps, 194cps, 7cpsに減少した。一般にArモードではAr(40)-N(14), Ar(40)-O(16), Ar(40)-Ar(38)による分子イオン干渉が生じるが、H₂モード, Heモードではこの干渉が低減化するためと報告されている⁶⁾。従ってFe, Seを低濃度まで精度よく測定するには、H₂モードまたはHeモードの検量線を用いることが必要であると考えられる。

2 Ca, Mg, Na及びKの影響

検討溶液について、Arモード, H₂モード及びHeモードの3つの方法で濃度を測定した。測定誤差を考慮して、Ca, Mg, Na, Kの添加により、測定結果が無添加の検討溶液濃度と比して±20%値を超えた元素を、添加元素により影響を受けたと考えた。その元素を表3に示した。

表3 Ca, Mg, Na, K¹⁾添加による影響

元素 (質量数)	濃度比 ²⁾		
	Arモード	H ₂ モード	Heモード
Fe(54)	1.26	1.07	1.13
Fe(56)	2.24	1.07	1.09
Ni(60)	2.34	1.25	1.09
Zn(66)	0.76	0.88	0.88
Se(78)	3.11	0.90	1.39

1) Ca濃度:200mg/l, Mg濃度:100mg/l, Na濃度:200mg/l
K濃度:20mg/l

2) Ca, Mg, Na, Kが無添加の検討溶液濃度に対する添加した検討溶液濃度の比

Arモードの濃度比に比べてH₂モード, Heモードの濃度比がより1に近い場合を反応ガスの効果があると考えられると、該当する元素は、Fe(54,56), Ni(60), Zn(66), Se(78)であった。Fe(54,56), Zn(66)は、ArモードではCa, Mg, Na, Kの影響を受けたが、H₂モード, Heモードではこれらの添加元素の影響をなくすことができ、反応ガスの効果があった。Ni(60), Se(78)は、Arモードでは添加元素の影響を受けたが、Ni(60)はヘリウムガス, Se(78)は水素ガスの効果により、添加元素の影響をなくすことができた。表3に示した以外の元素とその質量数について

はCa, Mg, Na, Kの影響を受けなかった。

ミネラルウォーターの中には、今回の検討条件よりCa, Mg, Na, Kを多く含むものがあることから、Arモードで影響がみられる元素は、反応ガスを使用することが必要である。

3 Cl及びSの影響

Ca, Mg, Na及びKと同様に、Cl, Sが無添加の検討溶液濃度に対するCl, S添加の検討溶液濃度の比を測定モードごとに求め、Cl, Sの添加の影響のあった元素を表4にまとめた。それらの元素はZn(64), As(75), Bi(209)で

表4 Cl, S添加による影響

元素 (質量数)	添加濃度	濃度比 ¹⁾		
		Arモード	H ₂ モード	Heモード
Zn(64)	低濃度 ²⁾	1.60	1.06	1.05
	高濃度 ³⁾	5.77	1.08	1.06
As(75)	高濃度	1.28	1.14	1.09
Bi(209)	高濃度	1.42	1.38	1.43

1) Cl, Sが無添加の検討溶液濃度に対する添加した検討溶液濃度の比
 2) Cl濃度：100mg/l S04：濃度200mg/l
 3) Cl濃度：500mg/l S04：濃度2,000mg/l

あった。このうち低濃度の添加では影響を受けないが、高濃度になると影響を受ける元素は、As(75), Bi(209)であった。As(75)は水素ガス、ヘリウムガスの効果はあったが、Bi(209)は反応ガスの効果はなかった。As(75)はAr(40)-Cl(35)の干渉を受けたが、水素ガス、ヘリウムガスによって低減化されたと思われる。また、Arモードで低濃度添加でも影響を受けるが高濃度でさらに影響が増す元素は、Zn(64)であった。Zn(64)はS(32)-S(32)の干渉を受けたが、水素ガス、ヘリウムガスによって低減化されたと思われる。ミネラルウォーター中のSO₄濃度は1,000mg/l程度含まれるものもあり、ZnについてはH₂モード、Heモードで測定することが必要である。表4に示した以外の元素とその質量数についてはCl, Sの影響を受けなかった。

4 試料溶液

アルゴン、水溶液に起因する干渉や試料中の共存物質による干渉を考慮に入れて最適な測定モードを選択した後、ミネラルウォーター53試料中の21元素の濃度を測定した。B, Mn, Fe, As, Ba及びUは表5に示すように水道水の水質基準値等を超過していた。しかし、超過した元素のうち食品衛生法によるミネラルウォーター類の規制に該当する元素(B, Mn, As, Ba)は規格基準に適合していた。水道水の基準が一人一日2リットル飲用するという想定で作られていること、日本におけるミネラルウォーターの消費量が20リットル/年・人¹⁾である

ことを考慮すると、現在では問題とする濃度ではないと考えられる。ミネラルウォーターは、いろいろな成分を溶解している可能性があることを考慮すると、ICP-MS

表5 水質基準等を超過していた元素
(ミネラルウォーター：53試料)

元素	超過試料数	基準値等濃度 (μg/L)	最大値(μg/L)
B	2	1,000	1,400
Mn	2	50	310
Fe	1	300	460
As	1	10	39
Ba	1	700	1,500
U	5	2	21

法による金属を分析する際には、これらの影響に十分注意することが重要である。

まとめ

ICP-MS装置を用いてミネラルウォーター中の共存物質の影響を低減化する条件を検討した。

反応ガスなしの従来法で試料中の金属を測定すると、Ca, Mg, Na, K, Cl, Sの影響を受けるものがあるが反応ガスを使用することによりこれらの影響を低減化することができた。したがって、共存物質を多く含むミネラルウォーターは、反応ガスを使用して測定する必要がある。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) 日本ミネラルウォーター協会：ミネラルウォーターの一人当たり消費量の推移
 <<http://www.minekyo.jp/sub3.htm>>
- 2) 厚生労働省告示第261号(2003), 平成15年7月22日
- 3) 大沼章子, 池田清栄, 富田伴一：誘導結合プラズマ質量分析による環境水の多元素一斉分析について, 愛知衛研報, 53, 51-63 (2003)
- 4) 吉川循江, 田中礼子, 荒井恵子, 林宏子, 山口正：コリジョン型ICP-MSによる自己水源型(地下水)水道水中のNa, K, Ca, Mg, Feの定量, 横浜衛研年報, 45, 119-123 (2006)
- 5) 安部隆司, 八重樫香, 佐々木和明, 高橋悟, 斎藤憲光：コリジョン型ICP-MSによる環境試料中の金属分析への適応性, 岩手県環境研センター年報, 3, 73-77 (2003)
- 6) 森田久男, 森永安司, 川名孝雄, 堀江正一：反応セルICP-MSによる鉄およびセレンの分析について, 平成16年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第17回理化学研究部会総会・研究会, 89-92 (2005)

短報

温泉源泉周辺土壌からの レジオネラ属菌の分離について

石野珠紀¹, 安藤利恵¹, 山本陽子¹, 沖津忠行²

Isolation of *Legionella* spp. from soil surrounding hot spring wells

Tamaki ISHINO, Rie ANDO,

Yoko YAMAMOTO and Tadayuki OKITSU

はじめに

レジオネラ症はレジオネラ属菌が原因で起こる感染症で、その病型には肺炎型（レジオネラ肺炎）と感冒様のポンティアック熱とがあり、前者が重篤である。近年、レジオネラ属菌に汚染された浴槽水や冷却塔水を原因とするレジオネラ肺炎の発生が各地で報告されており、特に高齢者、乳幼児あるいは慢性基礎疾患保有者等の免疫機能低下者での発症率が高い。レジオネラ属菌は自然環境に広く分布する土壌性の細菌で、土埃が浴槽水等を汚染する一因になると言われているが、土壌等の自然環境における本菌の分布状況に関する報告例は少ない。

今回我々は、神奈川県西部地域の温泉源泉の周辺土壌について、レジオネラ属菌の有無を直接および増菌培養法で調査し、さらにレジオネラ属菌が疑われる分離株の一部について、遺伝子増幅法の一つであるLAMP（Loop mediated isothermal amplification）法による同定を試みたところ、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1 検査材料

平成19年10～11月の間に、神奈川県西部地域で採取された温泉源泉周辺の表層土壌33検体を供試した。

2 レジオネラ属菌の分離培養法

(1) 直接培養法

田中らによる方法¹⁾に従った。すなわち検体の各々25gを滅菌容器に採り、滅菌水225mlを加えてよく攪拌

した後、30分間静置した。ついで2重滅菌ガーゼにて上清をろ過し、ろ液を6,000rpm 30分間冷却遠心分離後、得られた沈渣に遠沈管内壁を洗いながら滅菌水5mlを加えたものを懸濁液とした。懸濁液1mlについて15分間酸処理（0.2M HCl-KCl buffer pH2.2を1ml添加して混和）を行い、その0.1mlをMWY寒天培地（OXOID）及びWYO α 寒天培地（栄研化学）の各々に塗抹して、37℃、10日間の培養を行った。

(2) 増菌培養法

腐葉土からのレジオネラ属菌の増菌培養法²⁾を用いた。すなわち検体の各々50gに滅菌精製水100mlを加え、33℃、3ヶ月間の培養を行った。その後、このサスペンション1mlを直接培養法と同様に酸処理して、その0.1mlをMWY寒天培地及びWYO α 寒天培地の各々に塗抹して、37℃、10日間の培養を行った。

3 レジオネラ属菌の同定

分離培地上でレジオネラ属菌が疑われる湿潤灰白色、大小不同で淡い酸臭を示す集落について、まず羊血液寒天培地（栄研化学）に塗抹後、ついでBCYE α 寒天培地（栄研化学）に塗抹して両培地とも37℃で24～48時間培養した。

BCYE α 寒天培地に発育し、血液寒天培地には発育しなかった菌株は、BCYE α 寒天培地上の菌株についてグラム染色を実施した。グラム陰性桿菌の形態を示した菌株は同様の菌株について馬尿酸水解試験並びにレジオネラ免疫血清（デンカ生研）による血清型別を行い、それらの結果からレジオネラ菌種を同定した。

さらに血清型別が不能で同定出来なかった菌株についてはLAMP法による遺伝子検査をつぎのとおり試みた。BCYE α 寒天培地で培養した集落を40 μ lの滅菌蒸留水に浮遊させ、レジオネラ検出キットE（栄研化学）を使用して、アルカリ熱抽出後に中和処理した溶液をサンプル溶液とし、6領域を認識する4種類のPrimerにより65℃、60分間の核酸増幅を行い、副産物であるピロリン酸マグネシウム（白色沈殿物質）の濁度の変化をLoopampリアルタイム濁度測定装置（LA-320C、栄研化学）にて測定した。

結 果

1 直接培養法による分離および分離株の血清型別

土壌33検体のうち3検体（9.1%）からレジオネラ属菌が分離され、菌数は各々 8.4×10^1 、 1.6×10^2 、 2.4×10^2 CFU/gであった。3検体由来株はいずれも分離培地上でレジオネラ属菌であることが濃厚に疑われる集落を形成し、BCYE α 寒天培地に発育し、血液寒天培地には発育しないグラム陰性桿菌で、レジオネラ属菌と同定でき

1. 神奈川県衛生研究所地域調査部小田原分室
〒250-0042 神奈川県小田原市荻窪350-1
2. 同上（現、藤沢市保健所）

表1 レジオネラ属菌の分離結果一覧

検体NO.	直接培養法		増菌培養法	
	結果(CFU/g) ^{*1}	分離株血清型	結果(定性) ^{*3}	分離株血清型
1	< 4		—	
2	2.4 × 10 ²	型別不能 ^{*2}	+	<i>L.pneumophila</i> SG1
3	< 4		—	
4	< 4		—	
5	< 4		—	
6	< 4		—	
7	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG1 <i>L.pneumophila</i> SG5 型別不能
8	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG13
9	< 4		—	
10	< 4		—	
11	< 4		—	
12	< 4		—	
13	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG6
14	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG5
15	< 4		—	
16	< 4		—	
17	< 4		—	
18	< 4		—	
19	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG6
20	< 4		—	
21	< 4		+	型別不能
22	< 4		—	
23	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG6 型別不能
24	< 4		—	
25	1.6 × 10 ²	型別不能	+	型別不能
26	< 4		—	
27	8.4 × 10	型別不能	+	<i>L.pneumophila</i> SG5
28	< 4		—	
29	< 4		—	
30	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG2 <i>L.pneumophila</i> SG6 型別不能
31	< 4		+	型別不能
32	< 4		+	型別不能
33	< 4		—	

*1: CFUはコロニー形成単位, <4は検出限界.

*2: 型別不能は市販レジオネラ抗血清(デンカ生研)に凝集せず.

*3: —は不検出, +は検出.

た。しかしながら、市販レジオネラ抗血清のいずれにも非凝集で血清型別は不能であった（表1）。

2 増菌培養法による分離および分離株の血清型別

土壌33検体のうち13検体（39.4%）からレジオネラ属菌が分離された。13検体中 *Legionella pneumophila* が9検体（69.2%）分離され、それら分離株の血清型の内訳は *L. pneumophila* SG1が2検体、*L. pneumophila* SG2が1検体、*L. pneumophila* SG5が3検体、*L. pneumophila* SG6が4検体、*L. pneumophila* SG13が1検体であった（うちSG1およびSG5、SG2およびSG6は同一検体から各1例同時に分離された）。その他、分離培地上でレジオネラ属菌であることが濃厚に疑われる集落を形成し、BCYE α 寒天培地に発育し、血液寒天培地には発育しないグラム陰性桿菌で、市販レジオネラ抗血清のいずれにも非凝集の型別不能株7菌株（7検体由来）をレジオネラ属菌とした（表1）。

3 LAMP法によるレジオネラ属菌の同定

直接または増菌培養法で分離同定したが、市販抗血清のいずれにも非凝集で、型別不能であった分離株が10菌株認められた。これらについて、レジオネラ属菌に特異的な16SrRNAをコードするDNA領域の一部を増幅するLAMP法、並びに馬尿酸水解試験を行ったところ、10菌株すべてがLAMP法でレジオネラ属菌陽性、馬尿酸水解試験では陰性を示した。（表2）

考 察

レジオネラ属菌は、温泉源泉周辺の土壌から直接培養法で9.1%、増菌培養法では39.4%の割合で分離され、本菌が土壌性細菌として自然環境に広く分布することを

支持できる結果であった。源泉周辺土壌の汚染が直ちに温泉浴場水の汚染に関与するとは思われないが、土埃が浴場水の汚染の原因となり得ることは強く示唆されたと見えよう。

今回のレジオネラ属菌分離率は、直接培養法で9.1%であったが、増菌培養法では39.4%と高い割合を示し、増菌培養法が本菌の分離に有用な手段であることも分かった。この分離率の差は、培養に7~10日間必要とするレジオネラ属菌の直接培養法では、土壌中の真菌などが分離培地上に夾雑微生物として発育することによって、本来のレジオネラ属菌の発育を妨害してしまうことが推測されるが、増菌培養法では3ヶ月の間に真菌などは死滅し、レジオネラ属菌は土壌中に生息するアメーバ内で増殖し高率に分離培養できたと思われる。一部検体について増菌培養途中の培養液を鏡検したところ、アメーバが観察できることを確認した。

レジオネラ属菌の同定では、直接培養法で分離された3菌株とも菌種同定することができなかった。一方、増菌培養法では *L. pneumophila* が高率に分離されるようになった。これはもともと土壌中には *L. pneumophila* が広範に分布しており、本菌種および本菌種の宿主となるアメーバの増殖に適した増菌環境を与えられたことにより、他のレジオネラ菌種よりも優勢に増殖した結果とも考えられるが、この点はさらなる同様の調査を行い確認する必要がある。いずれにしても浴槽水のような有機物の豊富な環境は、レジオネラ属菌およびアメーバの増殖に好適であることは間違いなく、設備の適切な維持管理を怠ると *L. pneumophila* が優勢に分離されるような増菌環境になり得ると予想される。

表2 レジオネラ属菌市販抗血清に非凝集の菌株の性状

	検体 No.	グラム染色 形態	L-システイン 要求性	馬尿酸水解 試験	抗血清 凝集	LAMP法
直 接 法	2	GNR ^{*1}	+	-	UT ^{*2}	+
	25	GNR	+	-	UT	+
	27	GNR	+	-	UT	+
増 菌 法	7	GNR	+	-	UT	+
	21	GNR	+	-	UT	+
	23	GNR	+	-	UT	+
	25	GNR	+	-	UT	+
	30	GNR	+	-	UT	+
	31	GNR	+	-	UT	+
	32	GNR	+	-	UT	+

*1 GNR: グラム陰性桿菌

*2 UT: 型別不能

2005年の段階でレジオネラ属菌は50菌種、72血清型が認められている²⁾。本菌の同定では、BCYE α 寒天培地に発育しシステイン不含BCYE α 寒天培地（血液寒天培地で代用できる）に発育しないグラム陰性桿菌がレジオネラ属菌と推定されるが、入手可能な診断用抗血清の種類が限られているため、血清型が特定出来ないことも多い。本調査においても直接または増菌培養法で分離された分離株21株中10株については、市販抗血清で血清型の特定はできなかった。しかしながらこれら10株は全て、LAMP法によりレジオネラ属菌特異遺伝子を保持することが確認された。レジオネラ肺炎の原因菌として問題視される*L. pneumophila*をはじめ、疫学調査の際に実施される環境材料中のレジオネラ属菌の検査に、LAMP法等の遺伝子検査法の導入は有用で、特に環境材料中の遺伝子を直接検出するような活用が期待される。

今回の調査において、土壌中にはレジオネラ属菌が高率に存在することが、増菌培養法の結果から改めて証明された。増菌培養法は土壌に滅菌水を入れて放置した

けのものであったが、実際の浴槽水中にはレジオネラ属菌が増殖するための栄養分がたくさん含まれていると考えられるので、かけ流しの温泉水であっても定期的に浴槽の洗浄等の管理が不可欠である。また、テーマパークのような入浴施設では特に衛生管理が望まれる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、検体採取にご協力いただいた小田原保健福祉事務所温泉課、横山洋司課長はじめ課員の皆様に深謝いたします。

（平成20年7月28日受理）

文 献

- 1) 田中忍, 木股裕子, 南出正之, 貫名正文: 神戸市における*Legionella*検査の状況 (H15~H17), 神戸市環境保健研究所報, 34, 43-46 (2006)
- 2) 小出道夫: レジオネラ感染症ハンドブック, 斉藤厚編, 38-43, 日本医事新報社, 東京 (2007)

短報

高速液体クロマトグラフィーによる 化粧品中の紫外線吸収剤 2,2'-メチレンビス (6-(2Hベンゾトリアゾール-2-イル)- 4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル) フェノール) の分析

仲野富美¹, 河合伸亮², 佐藤信夫², 小島 尚¹

Analytical method of 2,2'-Methylenebis (6-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4- (1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenol) in cosmetics with HPLC

Fumi NAKANO, Shinsuke KAWAI,
Nobuo SATO and Takashi KOJIMA

はじめに

現在、太陽光線に含まれる紫外線の生体への有害性が問題視され、紫外線吸収剤を配合したスキンケア製品が多く販売されている。化粧品に配合される紫外線吸収剤は、薬事法上の化粧品基準¹⁾に収載されている成分についてのみ認められており、また、その配合上限値が厳密に定められている。2,2'-メチレンビス(6-(2Hベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール)(MBBT)は平成16年10月1日に化粧品基準に収載された紫外線吸収剤で、粘膜に使用されることがない化粧品について配合が認められ、100g中の最大配合量は10.0gと設定されている。

化粧品中に含まれる紫外線吸収剤の分析法は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた多成分スクリーニング法が報告されている²⁻⁴⁾。横山らの方法²⁾では、MBBTは約52分に溶出し、分析対象とした13種類の紫外線吸収剤の中で分析に最も時間を要する成分である。また、MBBTは多種類の溶媒に難溶の性質である^{2,3)}。そこで、横山らの報告^{2,3)}を参考に、希釈溶媒、HPLCカ

ラム及び各種測定条件について、MBBTに適した方法を検討したので報告する。

試験方法

1. 標準品、試薬及び器材

MBBT(CAS No. 103597-45-1)標準品は東京化成(株)製試薬を用いた。構造式を図1に示す。アセトニトリル及びテトラヒドロフラン(THF)は和光純薬(株)製HPLC用試薬を、メタノール及びエタノールは和光純薬(株)製特級試薬を用いた。p-メトキシケイヒ酸エチルヘキシル、4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタンは和光純薬(株)製試薬を、サリチル酸エチルヘキシル及びオキシベンゾン-3は東京化成(株)製試薬を用いた。シリンジフィルターはDISMIC-13HP(孔径0.45 μ m, アドバンテック製)及びGHPアクロディスク(孔径0.45 μ m, ポール製)を用いた。

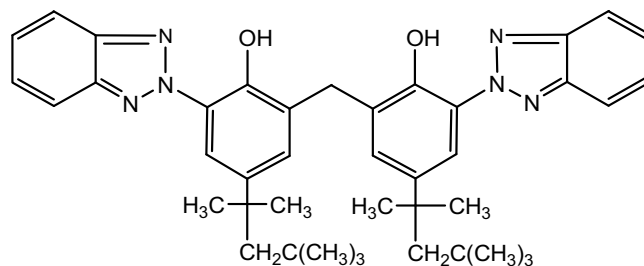


図1 MBBTの構造式

2. 化粧品中の定性及び定量分析法

(1) 標準溶液の調製

MBBT標準品約0.1gを精密に量りとり、THFに溶かして正確に100mlとした。この溶液5mlにアセトニトリルを加え、正確に25mlとしたものを標準原液とした。標準原液をアセトニトリル/THF混液(4:1)で希釈し、標準溶液(1, 5, 10, 50及び100 μ g/ml)を調製した。

(2) 試料溶液の調製

試料とした化粧品はMBBT1%配合クリーム、MBBT0.1%配合クリーム及び無配合クリームを用いた。

MBBT1%配合クリームは約0.1gを、0.1%配合クリームは約1gを精密に量りとり、THF10mlに溶解した。さらにアセトニトリル15mlを加え、超音波浴を用いて10分間抽出した後、アセトニトリルを加えて正確に50mlとした。この溶液をメンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。

(3) MBBTの定性

標準溶液をHPLCにより分析して得られたクロマトグラムのピーク保持時間及び紫外線吸収スペクトルと、試

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. 株式会社コーセー 基礎研究室

料溶液から得られたクロマトグラムのピーク保持時間及び紫外線吸収スペクトルを比較して定性を行った。

(4) MBBTの定量

試料溶液をHPLCにより分析し、得られたクロマトグラムからピーク面積値を測定し、別に作成した検量線により、試料溶液中のMBBTの濃度を求め、試料100 g中に含有するMBBT量 (g) を計算した。

(5) HPLC条件

装置：HP1100シリーズ (アジレント社製)、カラム：Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6mm×150mm (粒径5 μm, アジレント社製)、カラム温度：40℃、移動相：アセトニトリル、移動相流量：1.0ml/分、検出器：ダイオードアレイ検出器、測定波長：200～400nm (検出波長305nm)、注入量：10 μl

結果及び考察

1. 希釈溶媒の検討

MBBTは溶媒により溶解性が大きく異なることが報告されていることから^{2, 3)}、標準溶液の希釈に用いる最適な溶媒について検討した。

MBBT溶液 (4mg/ml, THF溶液) を、アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトニトリル/THF (1 : 1) 混液、(4 : 1) 混液及び (9 : 1) 混液で希釈したのち、100 μg/mlの標準溶液を調製し、密栓容器で4℃に保存した。調製当日、保存1日後、2日後、3日後及び7日後の標準溶液をHPLCで分析し、クロマトグラムのピーク面積値を測定した。調製当日の標準溶液のピーク面積値を100%として、4℃保存1日後、2日後、3日後及び7日後の標準溶液のピーク面積値の割合を計算した。結果を図2に示す。アセトニトリルは、保存1日後で約90%の面積値に減少し、それ以降も減少した。エタノールでは保存2日後まで、アセトニトリル/THF (1 : 1) 混液及び (4 : 1) 混液は7日後まで、アセトニトリル/THF (9 : 1) 混液は1日後まで、調製当日の標準溶液のピーク面積値のほぼ100%であった。メタノールは調製直後からMBBTが析出したため、希釈溶媒に適さなかった。MBBTはTHFに可溶であるが、アセトニトリル、エタノールには難溶の性質であるため、調製後時間が経つと、一旦溶解したMBBTが徐々に析出すると考えられた。実際の検査では分析する試料数が多くなると、分析時間が長時間になることもあり得るため、標準溶液の安定性は正確な定量結果を出すために非常に重要な条件であると思われる。以上の結果から、標準溶液はTHFを約2割以上含むアセトニトリルで希釈することが必要であり、アセトニトリル/THF (4 : 1) 混液を用いて希釈することとした。

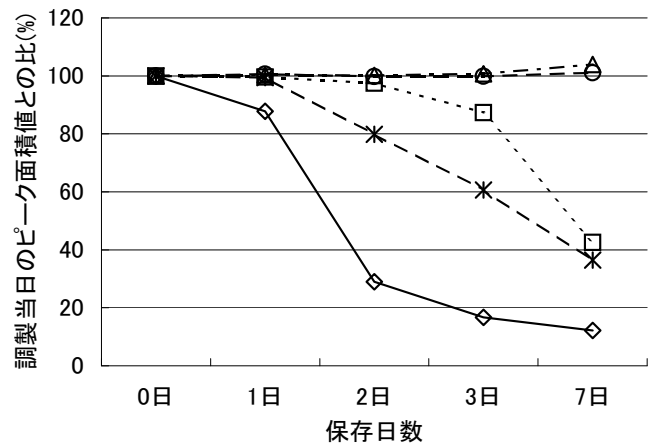


図2 希釈溶媒の種類によるMBBT標準溶液の安定性
◇：アセトニトリル、□：エタノール、△：アセトニトリル/THF (1:1)
○：アセトニトリル/THF (4:1)、×：アセトニトリル/THF (9:1)
標準溶液は4℃で保存した。

2. HPLC条件の検討

(1) カラム及び移動相

MBBTはODSカラムを用いて、アセトニトリル・水系の移動相で分析すると、溶出が遅く、分析時間が長くなったため、オクチルシリル化カラムを用いて分析を行った。オクチルシリル化カラムはZorbax Eclipse XDB-C8 4.6×150mm (粒径5 μm, アジレント社製) 及び XTerra RP8 4.6×150mm (粒径3.5 μm, ウォーターズ社製) を用い、移動相はアセトニトリル、アセトニトリル/水混液の混合比率9 : 1及び8 : 2を用い、流量0.5～1.0ml/分で最適条件の検討を行った。

Zorbax Eclipse XDB-C8カラムでは、移動相をアセトニトリルとし、流量1.0ml/分で分析を行ったところ、MBBTは保持時間7.0分にピークを認めた。紫外線吸収スペクトルは208nm, 305nm及び344nmに極大吸収を認め、検出波長305nmのとき、シンメトリー係数1.02, 理論段数10000段以上で、ピーク形状も良好であった (図3, 4)。XTerra RP8カラムを用いた場合、移動相をアセトニトリル、流量0.5ml/分としたとき、保持時間6.7分にピークを認めた。検出波長305nmのとき、シンメトリー係数0.94, 理論段数11000段以上で良好なピーク形状であった。オクチルシリル化カラムでは、分析時間も短く、良好な分析結果が得られた。以上のことから、今回の分析では、より一般的なシリカベースのカラムであるZorbax Eclipse XDB-C8を用いた条件により分析を行うこととした。

(2) 再現性の確認

標準溶液 (10 μg/ml) を6回繰り返して測定した。その結果、クロマトグラムのピーク保持時間の相対標準偏差が0.10%、ピーク面積値の相対標準偏差が0.50%であっ

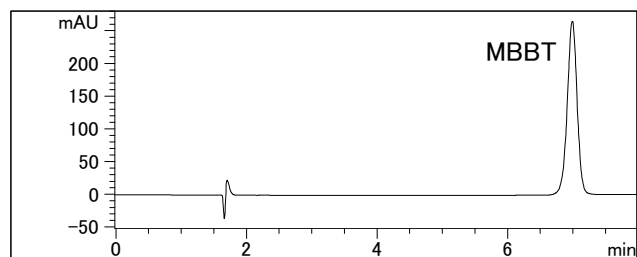


図3 標準溶液 (100 μg/mL) のHPLCクロマトグラム

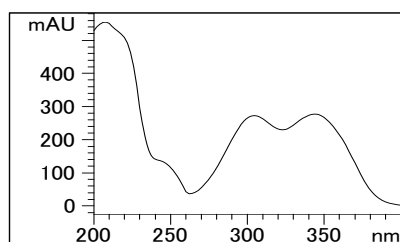


図4 標準溶液 (100 μg/mL) の紫外線吸収スペクトル

た。日本薬局方においては、HPLC法における試験の再現性は、通常、標準溶液を6回繰り返し注入し、ピーク面積値の相対標準偏差が1.0%以下であることが望まれる⁵⁾とされており、今回の分析法は再現性が高い結果が得られた。

(3) 検量線

検量線の直線性を確認するため、0.1~200 μg/mlの濃度範囲の標準溶液を用いて分析を行ったところ、0.2~200 μg/mlで直線性が認められた。標準溶液1, 5, 10, 50及び100 μg/mlを用いて、検量線を3回作成したところ、回帰直線の傾きは 0.0354 ± 0.0001 、y切片は 0.190 ± 0.008 、相関係数は1.00であった(図5)。なお、今回の分析法の定量限界は、S/N比10で求めた結果、1.5ngであった。

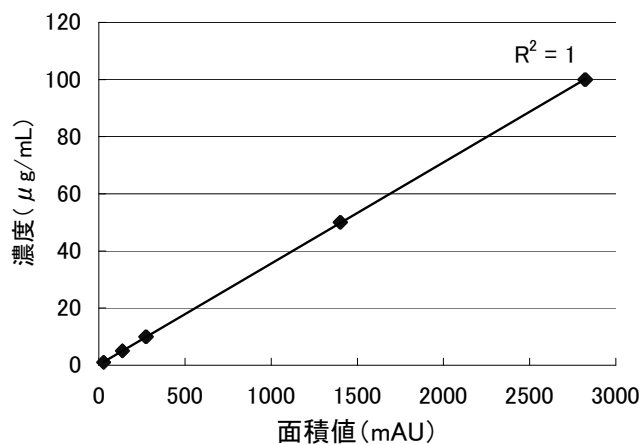


図5 標準溶液1~100 μg/mLにおける検量線

(4) その他の紫外線吸収剤の影響

現在、市販製品で多く使用されている4種類の紫外線吸収剤⁴⁾ p-メトキシケイヒ酸エチルヘキシル、4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタン、サリチル酸エチルヘキシル及びオキシベンゾン-3について、今回の分析法により分析を行ったところ、これらの物質はほとんど保持されず、MBBTのクロマトグラムの保持時間付近にはピークを認めなかった。

3. 化粧品中のMBBTの測定結果

(1) 試料溶液の調製方法の検討

試料0.1 gに標準溶液の希釈溶媒として最適であったアセトニトリル/THF (4:1) 混液を加え、超音波抽出を行ったところ、試料がうまく溶解、分散せず、抽出に適さないことが確認できた。そのため、横山らの方法^{2, 3)}に準じて、試料を一定量のTHFで溶解させた後、アセトニトリルを加えて、超音波抽出する方法で調製することとした。抽出に使用するアセトニトリルとTHFの容量の比率は4:1となるようにした。

(2) 添加回収試験

無配合クリームにMBBTが1%及び0.1%となるようにMBBT溶液(THF溶液)を添加し、添加回収試験を行った。その結果、1%量のMBBTを添加したときの回収率は98.0~99.3%(n=6, 相対標準偏差0.49%)、0.1%量添加したときの回収率は96.4~100.6%(n=6, 相対標準偏差1.72%)であった。回収率はほぼ100%に近い結果となり、良好な結果となった。

(3) MBBTの定性結果

標準溶液及び試料溶液をHPLCにより分析した結果、得られたクロマトグラムのピーク保持時間及び紫外線吸収スペクトルは一致した(図6, 図7)。クリーム中のMBBTを定性測定することが可能であった。

(4) MBBTの定量結果

定量結果を表1に示す。1%配合クリーム及び0.1%配合クリームは、いずれもほぼ配合量どおりの定量結果が得られ、今回行った抽出方法でクリーム中のMBBTを定量することが可能であった。3回の定量結果は相対標準

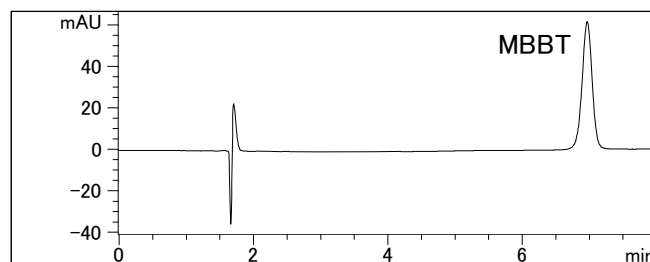


図6 1%MBBT配合クリームのHPLCクロマトグラム

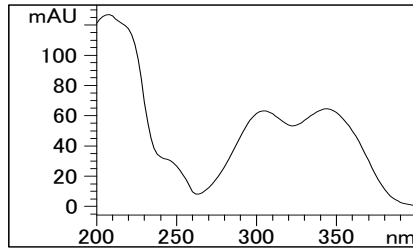


図7 1%MBBT配合クリームの紫外線吸収スペクトル

偏差が5.2%及び3.7%であり、ややばらつきが認められた。試料として用いたMBBT配合クリームは、MBBTが溶解性の悪い物質であるため、クリーム中に溶解させるのではなく、顔料のように分散させたものであった。そのため試料中のMBBTの均一性がやや悪かったことが原因であったと考えられた。

表1 1%及び0.1%配合クリームの定量結果 (n=3)

	1%配合 クリーム	0.1%配合 クリーム
試料100g中の 含有量 (g)		
1	1.018	0.1009
2	1.107	0.0963
3	1.008	0.1036
平均	1.04	0.100
標準偏差	0.06	0.004
相対標準偏差 (%)	5.2	3.7

まとめ

HPLCによる化粧品中のMBBTの分析法を検討した。カラムはオクチルシリル化カラムを、移動相はアセトニトリルを用いて分析を行うことで良好な結果が得られた。MBBT標準品はアセトニトリルなどに難溶であるため、標準溶液を調製する際、THFを一定量(20%程度)含むアセトニトリルに溶解する必要があった。なお、検量線は1~100 μ g/mlの濃度範囲で良好な直線性を示し、定量限界は1.5ngであった。

謝辞

本研究を実施するにあたり、御助言及び化粧品の御提供を頂きました日本薬学会衛生試験法化粧品専門委員会徳永裕司委員長をはじめ、委員の先生方に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

参考文献

- 1) 化粧品基準, 厚生省告示第331号, 平成12年9月29日
- 2) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 寺島潔, 大貫奈穂美, 宮本道子ほか: 医薬部外品及び化粧品中の紫外線吸収剤同時分析法についての改良, 東京都健康安全研究センター研究年報, 57, 145-150 (2006)
- 3) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 寺島潔, 大貫奈穂美, 荻野周三: 医薬部外品及び化粧品中の紫外線吸収剤同時分析法, 東京都健康安全研究センター研究年報, 56, 105-110 (2005)
- 4) 五十嵐良明, 山田真生, 内野正, 徳永裕司: 液体クロマトグラフィーによる化粧品中の9種の紫外線吸収剤の一斉分析, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 125, 65-71 (2007)
- 5) 第15改正日本薬局方解説書, pp.B101-130, 廣川書店, 東京 (2006)

短報

高等学校における薬物乱用防止
 講話の効果について

—統計手法を用いた考察—

佐藤善博, 折原直美, 小島 尚

The effectiveness of lecture
 on the prevention of drug abuse
 at a high school

—A review using statistical technique—

Yoshihiro SATO, Naomi ORIHARA
 and Takashi KOJIMA

緒言

今回、神奈川県衛生研究所で企画する出前講座で高校生を対象に「薬物乱用防止」に係る講話を行い、講話の前と後でアンケートをとる機会を得た。講話の効果を知るために講話前後の設問項目に同じ設問を4つ配置し、講話の中でそれらについて説明を行った。今回のアンケートは複数回答を求めるものが含まれており、これらを単純に合計し比較することは問題が生じた。

また、講話の効果に言及するとき、講話前に「知らない」「聞かない」などと回答したものが、講和後にどのように理解できたかを知る必要がある。これも単純に回答数の合計と比率を求めるだけでは解析できない。そこで、複数回答のまとめ方を工夫したうえで、いくつかの解析(分析)手法を用い解析を加えることにより、講話の効果について考察を行ったので報告する。

材料及び方法

平成19年12月に県内のA高校で「薬物乱用防止」に係る講話を行い、1年生(204名;男67名,女137名),2年生(213名;男60名,女153名)合計417名からアンケート回答を得た。

アンケート内容は、導入部分にダイエット用健康食品(以下,DF)について、途中から薬物乱用(以下,薬乱)

に関する設問からなっており、生徒の意識に関する設問も含み20問からなっているが、表1に抜粋した設問が講話前後にそれぞれ配置され対をなしている。今回の設問には複数回答が多く、特に問2と問13は単一回答を求めているのに複数回答をしたものが多く見られた。そこで、解析にあたっては表2に示す方針でまとめを行った。すなわち講話前を「知識度」、講和後を「理解度」と位置づけランク付けを行った。これ以外の回答を行ったものは「あいまい」とした。

解析¹⁻³⁾には統計解析ソフトDr.SPSSII(エス・ピー・エス・エス(株)),スプレッドサーチ((株)富士通ソフトウェア生産技術研究所)ならびにエクセル統計2006((株)社会情報サービス)を用いて行った。統計解析を行うにあたり、原則的に無回答,その他を除外した。

表1 講話前後で対になるアンケート項目

講話前		講話後
問2	ダイエット用健康食品とはどんなものだと思いますか。1つ選んで下さい。	問13
1. 健康を維持しながら自然にやせられる食品	2. やせ薬が入っている食品	同左
3. 1,2の両方あると思う	4. その他	
問5	健康被害が出るダイエット用健康食品に入っている可能性のある薬剤にはどのようなものがあると思いますか。(複数回答可)	問14
1. 食欲抑制剤	2. 覚せい剤	3. 下剤
同左		
問8	薬物乱用とはどんなことだと思いますか。(複数回答可)	問17
1. 何かのガスを吸ったりすること	2. 治療の目的以外に薬などを使うこと	同左
3. 麻薬などを使うこと	4. わからない	5. その他
問10	「やせられるよ」などと、友達や先輩から薬を勧められたらどうしますか。1つ選んで下さい。	問18
1. 使う	2. 受けとるが使わない	3. 受けとらない
4. わからない	5. その他	

表2 複数回答のまとめかた

設問対	正解は	回答	講話前 知識度	講話後 理解度
問2 -問13	3. 1,2の両方あると思う	・3に○ ・1と2の両方に○	よく知っている	正しく理解
		・1だけ、 2だけに○	一般的	一般的
問5 -問14	1. 食欲抑制剤 2. 覚せい剤 3. 下剤	・3つに○	よく知っている	よく理解
		・2つに○	知っている	理解
		・1つに○	一般的	一般的
問8 -問17	1. 何かのガス 2. 治療の目的以外... 3. 麻薬など...	・3つに○	よく知っている	よく理解
		・2つに○	知っている	理解
		・1つに○	一般的	一般的

結果及び考察

1. 問2と問13の比較(DFについて)

SPSSを用いクロス集計表から検定したところ、マクネマー検定で5%の危険率で有意差が認められ(正確有意確率(両側):0.018),「正しく理解」した生徒が増え、全体として講話の効果があったと判断された。解析結果

神奈川県衛生研究所 企画情報部
 〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
 sato.4hjt@pref.kanagawa.jp

は表3のような形で出力される。

表 3 講話前DF知識度と講和後DF理解度のクロス表 (問2-問13)

度数		講話後理解度		合計
		正しく理解	一般的	
講話前知識度	よく知っている	64	56	120
	一般的	85	125	210
	合計	149	181	330

カイ2乗検定

	値	自由度	漸近有意 確率(両側)	正確有意 確率(両側)	正確有意 確率(片側)
Peasonのカイ2乗	5.097 ^b	1	.024		
連続修正 ^a	4.591	1	.032		
尤度比	5.092	1	.024		
Fisherの直接法				.029	.016
線形と線形による連関	5.082	1	.024		
McNemar検定				.018 ^c	
有効なケースの数	330				

a. 2×2表に対してのみ計算
 b. 0セル(0%)は期待度数が5未満です。最小期待度数は54.18です。
 c. 2項分布を使用

続いてスプレッドサーチによる分析を試みた (図1)。スプレッドサーチはエクセルシートのようなスプレッドデータを平行座標上に表現するソフトであり、同じ回答をしたものはそこに収束することで表現される。生徒417名の全データ (生徒No.) を講話前 (問2) と講和後 (問13) の間に配置することで、全生徒の前後の動きが連続した線で表現される。ここでは、その直前の設問 (ダイエット用健康食品を知っていますか) で「知っている」ものを除外 (フィルタリング) し、「知らない」と答えた生徒のみを選別し、その動きを比較した。除外された項目の線は非表示とした。選別に使用したフィールド名を「DFを」とした。

「2DF知識度」(講話前) で無回答であったものが減り、「13DF理解度」(講話後) で「一般的」から「正しく理解」へ移行していることが認められた。

2. 問5と問14の比較 (DFと薬剤について)

クロス集計表から検定したところ、マクネマー検定で1%の危険率で有意差が認められ (正確有意確率 (両側): 0.000)、講話の効果があったと判断された (表4)。

スプレッドサーチで、その直前の問 (DFには健康に被害がでる製品があることを知っていますか) で「知らない」と答えた生徒206名を選別し分析を試みたところ、講話後「よく理解」した生徒が33名現れ (元データから)、講話前「知っている」42名が講話後「理解」55名と増加し、さらに、講話前「一般的」149名が講話後「一般的」104名と減少し、「知らない」と答えた生徒に対する講話の効果があったものと推定された (図2)。選別に使用したフィールド名を「DFの被害を」とした。

3. 問8と問17の比較 (薬物乱用について)

クロス集計表から検定したところ、マクネマー検定で

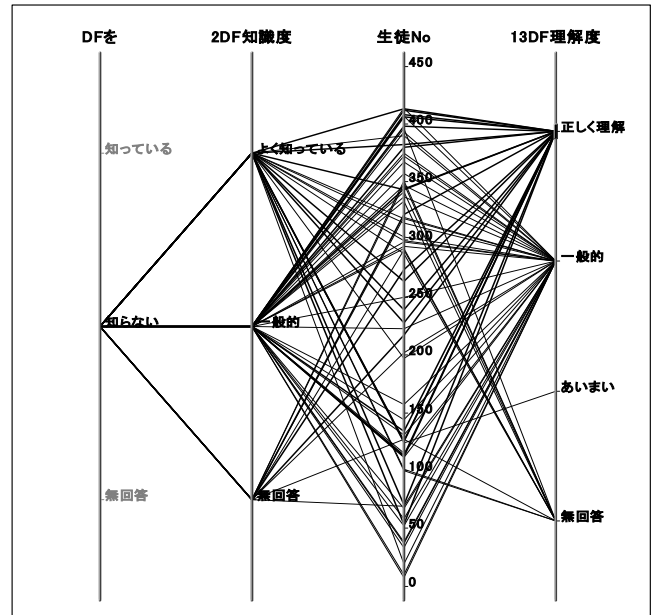


図 1 DFについての知識度と理解度 (DFを知らない生徒)

表 4 DFに入っている可能性のある薬剤の講話前後クロス表 (問5-問14)

度数		講話後理解度			合計
		よく理解	理解	一般的	
講話前知識度	よく知っている	18	5	6	29
	知っている	30	33	25	88
	一般的	38	77	154	269
	合計	86	115	185	386

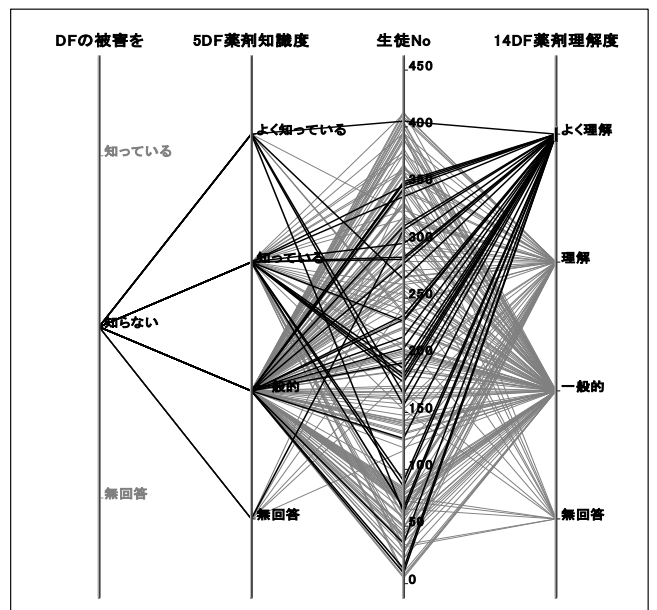


図 2 DFと薬剤の知識度と理解度 (DFの被害を知らない生徒)

1%の危険率で有意差が認められ(正確有意確率(両側):0.000), 講話の効果があったものと判断された(表5).

表5 講話前薬乱知識度と講話後薬乱理解度のクロス表(問8-問17)

度数		講話後理解度			合計
		よく理解	理解	一般的	
講話前知識度	よく知っている	88	10	9	107
	知っている	60	41	17	118
	一般的	31	34	76	141
	合計	179	85	102	366

スプレッドサーチでは直前の問(薬物乱用について聞いたことがありますか)で「聞いたことがない」と答えた生徒を選別し分析したところ、講話前に「わからない」12名が、講話後には3名と減少し、「よく理解」6名が現れているので講話の効果があったものと推定された(図3). 選別に使用したフィールド名を「薬乱を」とした.

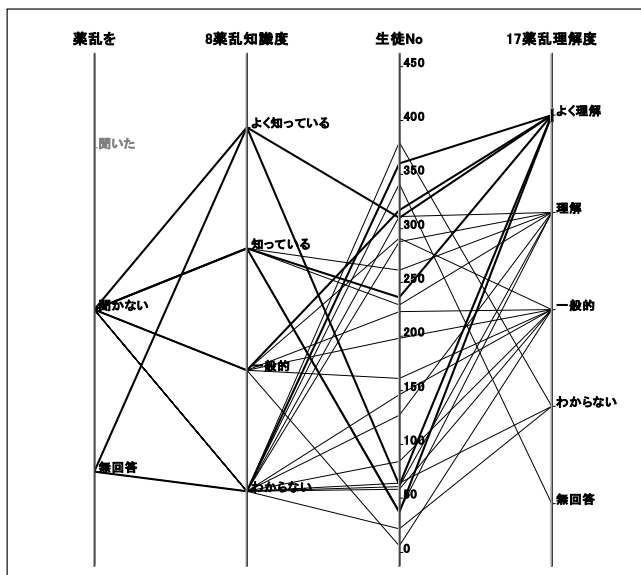


図3 薬乱の知識度と理解度(薬乱を知らない・無回答の生徒)

4. 問10と問18の比較(薬を勧められた時の意志について)

選択肢が多岐にわたり、回答に5未満のセルが多く正しい解析結果が得られないと推定されたので、「受けとるが使わない」「受けとらない」という意志の強さに着目して解析した結果、マクネマー検定で5%の危険率で有意差が認められたので(正確有意確率(両側):0.035), 「受けとらない」という強い意志をもつものが増え、講話の効果があったものと判断された(表6).

スプレッドサーチでは、前項と同じく「薬乱を聞いたことがない」と答えた生徒を選別し、無回答も含め分析したところ、講話前に「わからない」と答えた生徒5名が講話後にはなくなり、「受けとらない」に移行してお

表6 薬を勧められた時の意志変化のクロス表(問10-問18)

度数	講話前	講話後		合計
		使わない	受けとらない	
	使わない	10	17	27
	受けとらない	6	299	305
	合計	16	316	332

り講話の効果があったと推定された. しかし、「使う」と答えた生徒が1名現れた(図4).

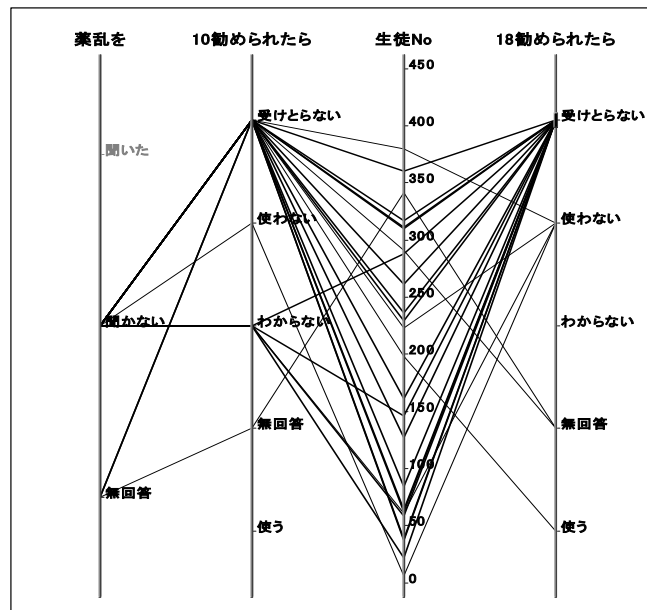


図4 講話前後の意識の推移(薬乱を知らない・無回答の生徒)

5. 数量化Ⅲ類による解析

アンケートの対応のある設問項目(アイテム)を主体に変数にとり、数量化Ⅲ類を用いて解析を行い2次元平面に現した(図5). 解析には「その他」、無回答を対象からはずし、生徒の意識に関する設問項目ならびに自由回答も変数から除外した.

カテゴリスコアグラフから、おおまかに楕円で囲んだ3つのグループに分かれることが読み取れた. 左下は「よく知っている」「知っている」「正しく理解」「理解」のラベルが多くみられ、知識度・理解度とも良好なグループと推定された. なお、講話後を示すラベルは「後」を頭に付けている. 右下は「わからない」「知らない」「理解せず」のラベルが見られ、知識度・理解度の低いグループと推定された. 上部に位置するのは「一般的」が付いたラベルが見られ、中間的なグループと推定された.

しかし、各グループは重なり合う部分が多く、寄与率も大きい値でなかったため、断定的なことはいえない.

第1軸は知識度・理解度を分ける軸と推定され、第2軸は属性別平均(後述)から、男女を分ける性別の軸と

解釈された。カテゴリスコアから算出されたサンプルスコアのグラフを見ると、知識度・理解度の低いグループは人数的には多くなく、回答者は中間的なグループに集中している。各サンプルは性別、学年等の属性を持っており、これに最後の設問（内容は理解できたか）の回答も属性として属性別平均を求めグラフに示した。カテゴリスコアグラフと比較すると、男より女、1年生より2年生のほうが知識・理解度も高いことが推定された。知識度・理解度の低いグループには、講話の内容を「理解できなかった」「あまり理解できなかった」ものが多く含まれていることが推定された。しかし、このグループには、「使う」→「後使わない」の移行がみられ、講話の効果がある程度あったものと推定された。

数量化Ⅲ類の解析結果で、中間層に多くのものが集中していることが見られることから、より明瞭な結果を得るには設問項目中に中間的な回答(選択肢)を設けないことも必要であると思われた。

まとめ

- ①複数回答をその内容から、講話前後についてそれぞれ「知識度」「理解度」でランクづけすることにより、講話の効果を推定することが可能となった。
- ②統計検定結果より、全体として講話の効果があったものと推定できた。
- ③スプレッドサーチ分析で「知らない」「聞かない」と答えた生徒の講話前後の動きがつかめた。
- ④数量化Ⅲ類で生徒のグループ分けと、属性別の差が推定できた。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) 加藤千恵子, 廬 志和, 石村貞夫: SPSSでやさしく学ぶアンケート処理, pp206-214, 東京図書株式会社, 東京(2007)
- 2) 石村貞夫: SPSSによる統計処理の手順, pp180-193, 東京図書株式会社, 東京 (2007)
- 3) 菅 民郎: 多変量解析の実践, 下巻, pp118-159, 現代数学社, 京都 (1993)

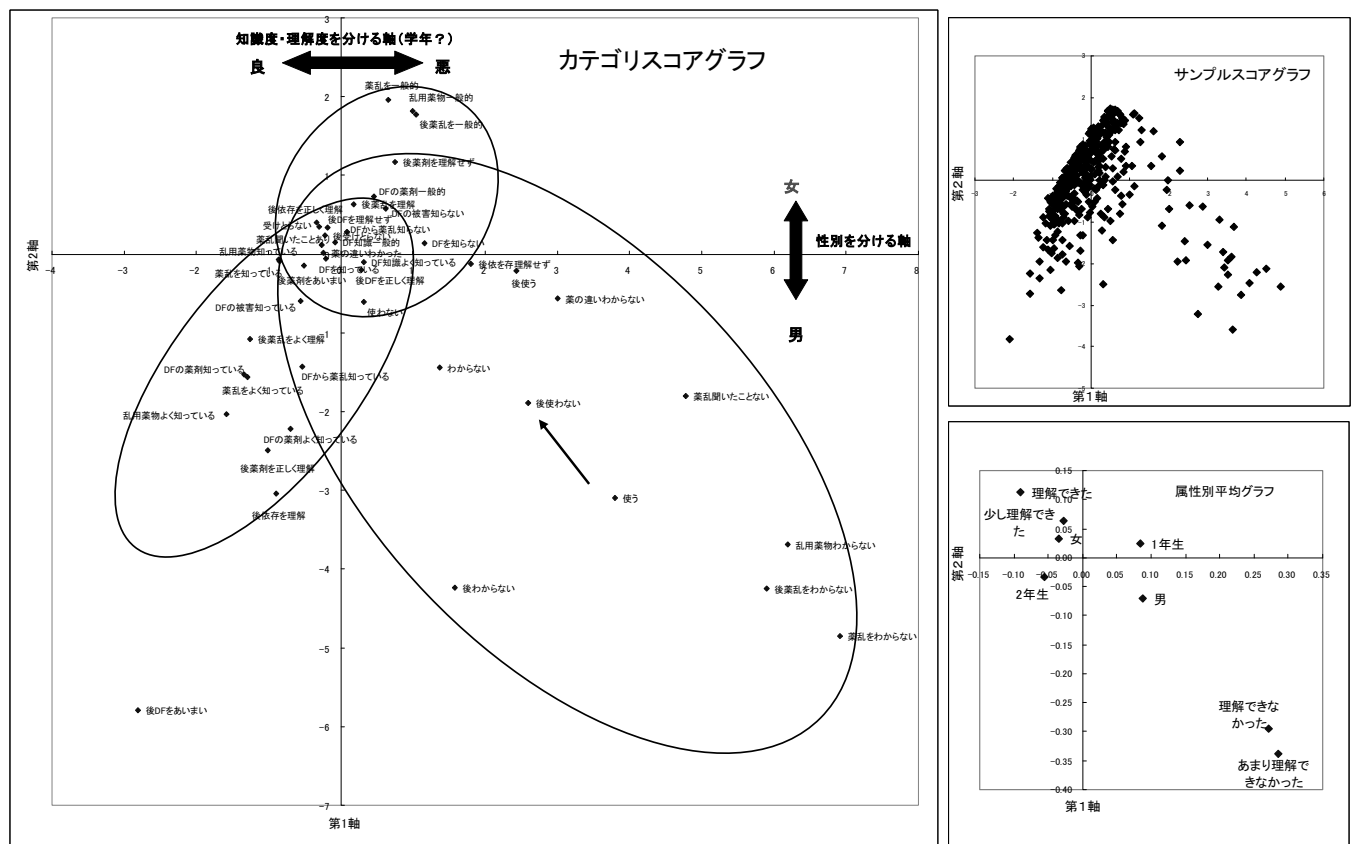


図 5 数量化Ⅲ類による解析結果

短報

薬物乱用防止講話における
 高校生の意識について

—統計的手法を用いた考察—

折原直美, 佐藤善博, 小島 尚

The conscious of high school students
 regarding lectures
 on prevention of drug abuse
 —A review using a statistical approach—

Naomi ORIHARA, Yoshihiro SATO
 and Takashi KOJIMA

緒言

神奈川県民への専門的な知識の普及・啓発をめざした神奈川県衛生研究所の企画による出前講座が平成19年12月より実施されている。その出前講座の中で高校生を対象に「薬物乱用防止に関わる講話」を行い、同時に、高校生の薬物に対する知識・理解・意識について解析することを目的としたアンケート調査を実施した。アンケート内容は女子の数が優位な高校であることを考慮し、ダイエット用健康食品を導入部とし、薬物乱用防止に終わる講話に併せたものとした。高校生の薬物に対する意識の解析については、自由感想を主体とするため、多変量解析の一手法である数量化Ⅲ類¹⁾を用い、解析結果を2次元平面に配置することによりカテゴリあるいはサンプル間の類似性や位置関係の解釈を試み、薬物乱用防止に対する高校生の意識について考察したので報告する。

方法

平成19年12月に県内のA高校で「薬物乱用防止に関わる講話」を行い、1年生204名(男67名, 女137名)、2年生213名(男60名, 女153名)からアンケート回答を得た。

アンケート内容は、ダイエット用健康食品(以下DF)に関する設問及び薬物乱用(以下薬乱)に関する設問からなっており、講話の前後にアンケート調査を行い、前後

で対になった設問、個人が持つ知識等を聞く対のない設問及び生徒の感想を聞く設問が配置されている(表1)。

解析には、エクセル統計2006((株)社会情報サービス)を用いて行った。解析を行うにあたり、対になった設問の回答、無回答及びその他を除外した。問12、問17、問20の自由回答は内容ごとにグループ化してラベルを付けカテゴリ化し、また、各質問(アイテム)に対しては回答項目をカテゴリ化し、いずれも「はい」を1、「いいえ」を0として1/0データに数値変換したものを解析に供した。

自由回答のグループ化に対しては、DFや薬物に対する危険意識を持つグループ化は「DFの落とし穴」「ひどさ・怖さの再認識」「薬物が身近に迫っている」「海外製品に注意」などのラベルを付けた。また、DFの知識を持つグループ化は「DFが薬乱につながることを知っている」「健康被害も知っている」などのラベルを付け、薬物の知識を持つグループ化は「乱用薬物とは体に影響が出る薬物」「法律で規制されている薬物」などのラベルを付けた。さらに、薬乱防止意識を持つグループ化は「薬物は絶対に使わない」「違法薬物は栽培しない」「薬物には関わらない」「誘惑に注意する」などのラベルを付けた。これらをそのままカテゴリ化して解析に供した。

表1 アンケート内容(対になった設問を除く)

ダイエット用健康食品について	
問1	ダイエット用健康食品を知っていますか 1. 知っている 2. 知らない
問3	あなたはダイエット用健康食品を・・・に続く語句を1つ選んでください 1. 使ったことがある 2. 今使っている 3. 使いたい 4. 使うかもしれない 5. 使いたくない 6. わからない
問4	ダイエット用健康食品には、健康に被害が出る製品があることを知っていますか 1. 知っている 2. 知らない
問6	ダイエット用健康食品が薬物乱用につながる例があることを知っていますか 1. 知っている 2. 知らない 3. その他
問12	ダイエット用健康食品についてどのような感想をもちましたか また、下欄から選べる物があれば1つ選んでください 1. おどろいた 2. 知っていたがたいしたことないと思っていた 3. 全然知らなかった 4. 知っていたがこれほどひどいことがあると思わなかった
問15	ダイエット効果のある薬剤のうち薬物への依存性のあるものはどれですか 1. 食欲抑制剤 2. 覚せい剤 3. 下剤
問20	今日の講話を聞いて感じたことを書いてください
薬物乱用について	
問7	薬物乱用について聞いたことがありますか 1. 聞いたことがある 2. 聞いたことがない
問9	乱用される薬物としてどのようなものがありますか(複数回答可) 1. 薬局や病院でもらうもの 2. 身体に悪い影響のするもの 3. 法律で禁止されている薬 4. わからない 5. その他
問11	薬物と日頃使っている薬との違いはわかりましたか 1. わかった 2. わからない
問17	薬物依存にならないためには、どうすればいいとおもいますか また、下欄から選べるものがあればいくつでも選んでください 1. 麻薬・覚せい剤に近づかない 2. 友人や先輩からの誘いには気をつける 3. 大麻のような違法薬物を栽培しない 4. 違法ドラッグを使わない

結果及び考察

アンケートの回答項目（カテゴリ）を変数にとり数量化Ⅲ類を用いて解析を行い2次元平面図に現した（図1、図2）。解析には「その他」、無回答を対象から外した。

1 ダイエット健康食品に対する意識について

図1のカテゴリスコアグラフからおおまかに楕円で囲んだ3つのグループに分かれることが読み取れた。右下のラベルを見るとDFに対する危険性を認識しているグループと推定された。左下に向かっては「DFを知らない」「健康被害が出るDFを知らない」「DFが薬乱につながることを知らない」「DFにおどろいた」などのラベルが見られDFに対する危険性の認識が低いグループと推定された。また、右上に向かってのラベルを見ると、薬物の知識もありDFの危険性も認識しているグループと推定された。しかし、カテゴリに対する累積寄与率は14.53%であり、DFに対して生徒が持つ意識について3つのグループに完全には分離されていない。このことから第1軸はDFに対する危険意識を分ける軸と推定され、属性別平均からは、第1軸は「理解できた」「理解できなかった」で分けられており、理解できた人がDFの危険性を認識し、理解できなかった人がDFの危険性をあまり強く認識で

きなかったと推定される。これにより、第1軸はDFに対する危険意識を分ける軸と解釈された。

第2軸については、カテゴリスコアグラフからは右下、左下のラベルにみられるように、DFについては関心が薄いように推定された。また、右上、左上では「DFが薬乱につながることを知っている」「健康被害も知っている」のラベルにみられるように、薬物の知識を持っておりDFの関心も高いことが推定された。このことから第2軸はDFに対する関心を分ける軸、さらに薬物の知識を分ける軸と解釈された。カテゴリスコアから算出されたサンプルスコアのグラフをみると、薬物の知識も少ないがDFに対する危険性を認識するグループ（危険意識グループ）は人数的には多くなく、また、DFへの関心もあり、知識も持ち、危険性も認識しているグループ（良識的なグループ）、及びDFへの関心も危険性の認識も低いグループ（無関心グループ）に密集していた。しかし、サンプルスコアから算出された属性別平均グラフから、男より女の方が、1年生より2年生の方がDFに対する関心が高いことが推定された。

2 薬物乱用に対する意識について

図2のカテゴリスコアグラフからおおまかに楕円で囲

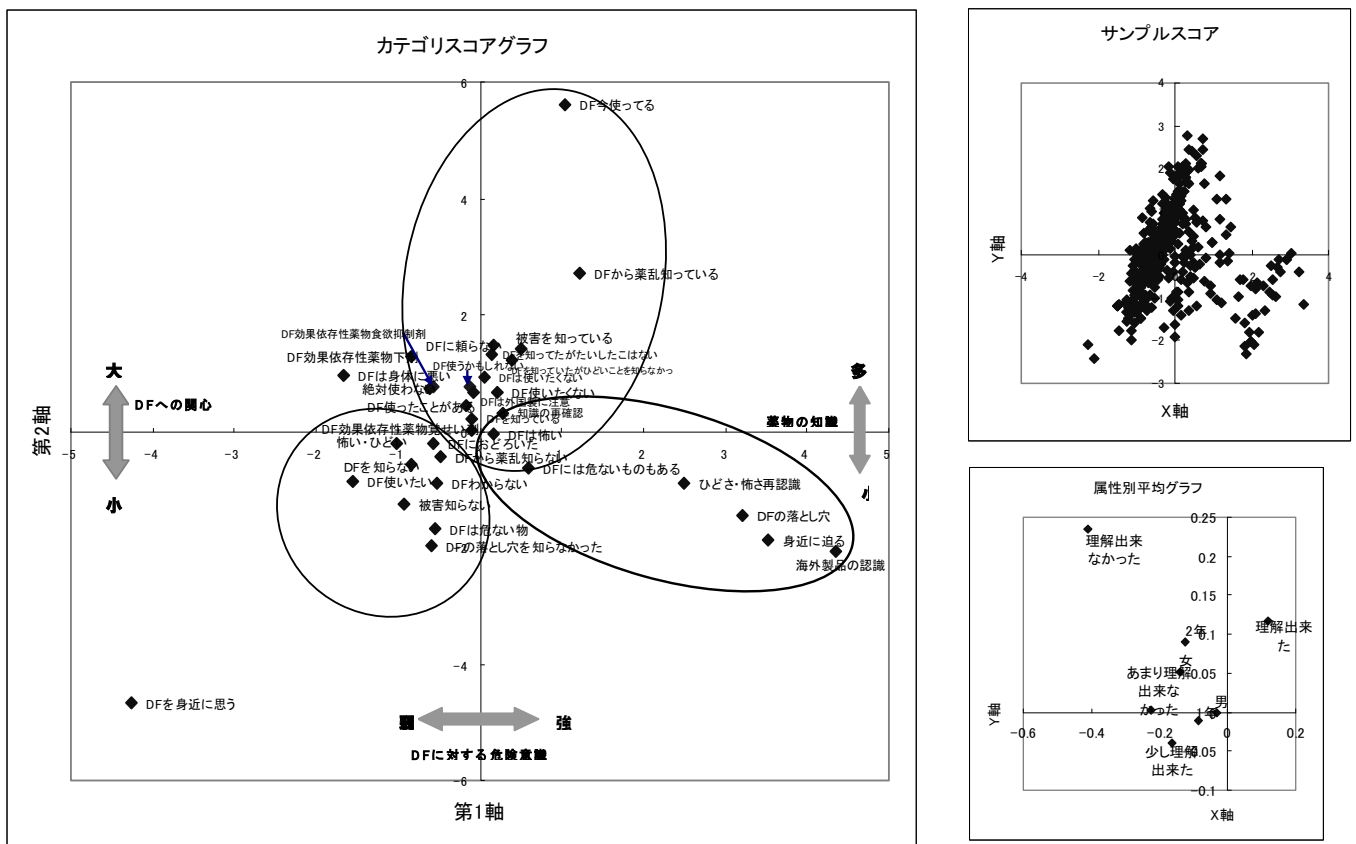


図1 ダイエット用健康食品における意識の散布図

んだ3つのグループに分かれることが読み取れた。右上は「聞いたことがない」「乱用薬物は何があるかわからない」「薬と薬物の違いがわからない」などのラベルが見られ薬物に対する知識も少なく危険性の認識も低いグループと推定された。左上のラベルからこのグループは薬物に対する危険性を認識しているグループと推定された。また、グラフの中心部近くから左下のラベルからはこのグループは薬物、特に乱用薬物に対して危険性も認識し、薬物乱用防止を積極的に考えていく意識が高いグループと推定された。しかし、カテゴリに対する累積寄与率は27.87%であり、薬物乱用に対して生徒が持つ意識について3つのグループに完全には分離されていない。属性別平均からは第1軸で「理解できた」「理解できず」で分けられている。このことから第1軸はDFと同様に薬物に対する危険意識を分ける軸と解釈された。

第2軸については、カテゴリスコアグラフからは右下、左下の中心付近のラベルにみられるように、薬物乱用防止を積極的に考えていく意識が高いと推定された。右上、左上のラベルを見ると薬物乱用防止を積極的に考えていく意識は低いように推定された。このことから第2軸は薬物乱用防止意識の軸と解釈された。カテゴリスコアか

ら算出されたサンプルスコアのグラフをみると、薬物に対する知識も少なく危険性の認識も低いグループ（無関心グループ）は人数的には多くなく、また、薬物に対する危険性を認識しているグループ（危険性認識グループ）、及び薬物乱用防止を積極的に考えていく意識が高いグループ（防止積極的グループ）に密集していた。しかし、サンプルスコアから算出された属性別平均グラフから、男より女の方が、1年生より2年生の方が薬物乱用防止に対して積極的な意識を持つことが推定された。

まとめ

薬物乱用防止講話における高校生の意識をみると、ダイエット用健康食品、薬物乱用のいずれについても無関心グループが少数であるが見られ、しかし、1年生より2年生が、男より女が薬物乱用防止に対して積極的な意識を持つことが推定された。今後はこの解析結果を生かして、無関心グループや男に対する薬物乱用の危機意識付けなど薬物乱用防止講話に盛り込んでいきたい。また、自由感想のカテゴリ化をする際にラベルの文言が長く（例えば「違法ドラッグ非使用で防ぐ」など）、明確に端的に現す文言（6文字以内程度）でカテゴリ化を行うと

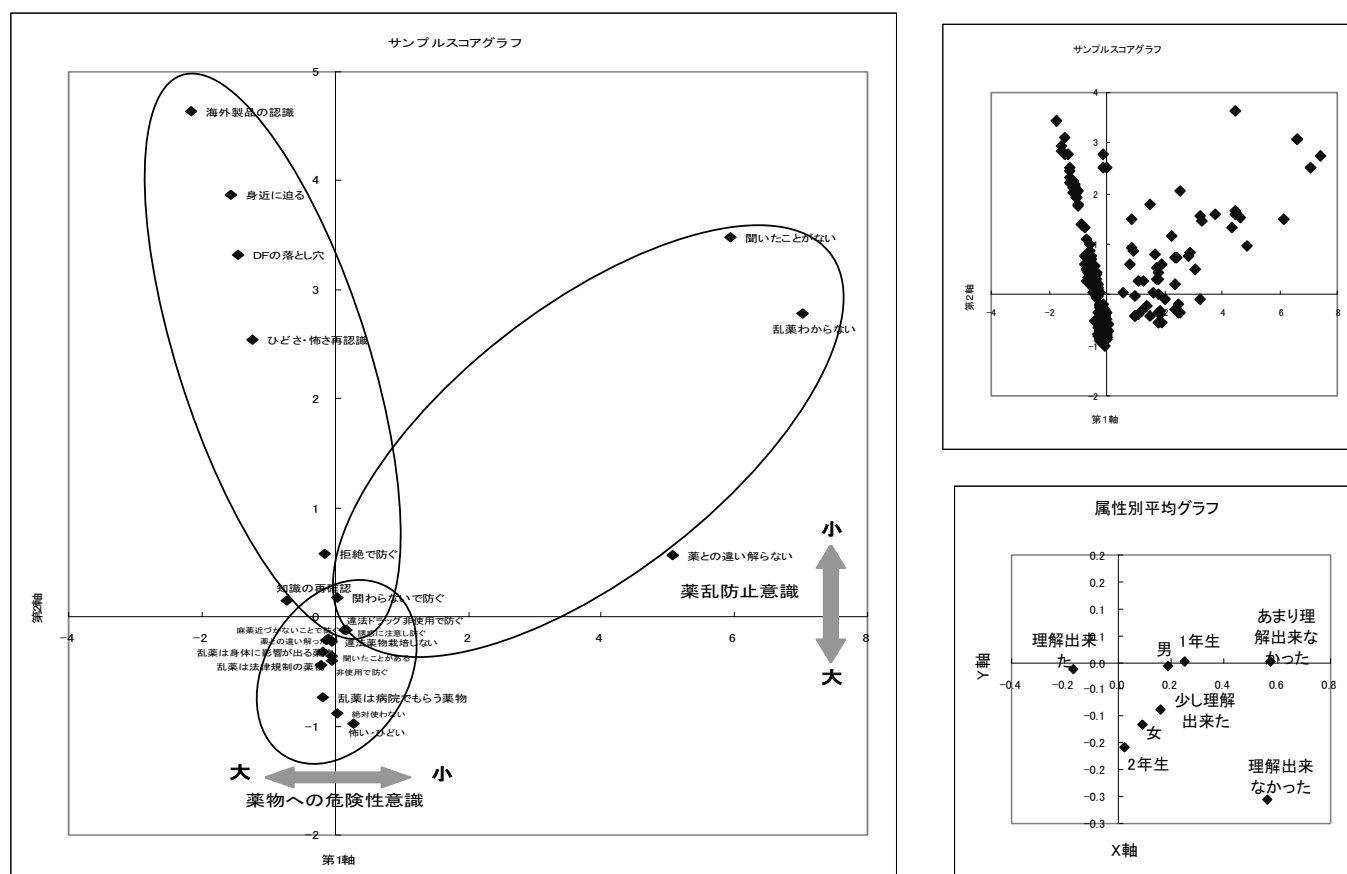


図2 薬物乱用における意識の散布図

さらに明瞭な解析結果が得られると思われた。

従来行われている薬物乱用防止教育におけるアンケート調査は単純集計であるため、知識、理解及び自由感想との相互関係を知ることはできず、単純に回答項目に対する割合でしか示すことができない。しかし、知識や理解の程度また自由感想などのカテゴリデータから相互関係を探ろうとするようなアンケート調査では数量化Ⅲ類による解析が有効といわれている。今回、この解析法を用いて回答者の類似度や回答項目の類似度からグループ化の

推定を行い、グループ間の相互関係を推定するなど、今後の薬物乱用防止教育の改善のための有用な情報が得られた。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) 菅 民郎：多変量解析の実践，下巻，pp118-159，現代数学社，京都（1993）

資料

神奈川県域の定点調査における 百日咳菌の検出状況 (平成19年度)

高橋智恵子, 大屋日登美, 渡辺祐子, 岡崎則男

Surveillance of *Bordetella pertussis* in Kanagawa Prefecture (April, 2007~March, 2008)

Chieko TAKAHASHI¹, Hitomi OHYA¹,
Yuko WATANABE¹ and Norio OKAZAKI¹

百日咳の発生は、世界各国でワクチン接種が普及するとともに激減しているが、近年、先進諸国ではワクチン接種の効果が減弱した青年・成人層での百日咳罹患が新たな問題となっている。わが国においても2002年以降成人患者の罹患率が上昇傾向にあり、2007年には大学での百日咳集団感染が発生している¹⁾。

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染により引き起こされる小児の急性呼吸器感染症であり、その感染経路は、鼻咽頭や気道からの分泌物による飛沫感染および接触感染である。この疾患は厚生労働省の感染症発生動向調査事業実施要項において5類感染症の小児科定点把握疾患とされており、全国的な調査が進められている。当研究所においても神奈川県域の小児科病原体定点医療機関から送付される検体について、培養および遺伝子診断法による検査を実施している。2006年以前は、送付される検体数も少なく、この数年間は検出例も無かったが、2007年には検体数が急増し、検出例も見られたのでその検出状況を報告する。

検体は、2007年4月より2008年3月までに県域内病原体定点医療機関において、百日咳を疑われた患者より採取された咽頭ぬぐい液22検体、鼻腔ぬぐい液51検体および由来不明6検体の計79検体であった。これらの検体はカルチャースワブチャコール (ベクトン・ディッキンソン) を用いて採取され、検査時まで-40℃に保存した。患者の年齢分布は15歳以下が47名で全体の約6割を占

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

めたが、成人を含む広い範囲 (0~66歳) におよび、性別は男性28名、女性51名であった。また、検体数は8月より急増した。

百日咳菌の検出は、培養法および遺伝子診断法で行った。培養法は、ボルデー・ジャング培地を使用して実施するのが定法であるが、分離率は低いとされ、遺伝子診断法による検出に期待が寄せられている。本菌の遺伝子診断法には Polymerase chain reaction (PCR) 法と Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法があるが、当所では前者を利用しており、百日咳菌DNAの挿入塩基配列IS481を標的にした方法 (IS481-PCR)²⁾ と百日咳毒素遺伝子を標的にした方法 (PTp1/p2-PCR)³⁾ を実施している。これら両法の感度を調べた結果、IS481-PCRがPTp1/p2-PCRよりも100倍高かった (図1)。IS481は染色体DNA上に50~250コ

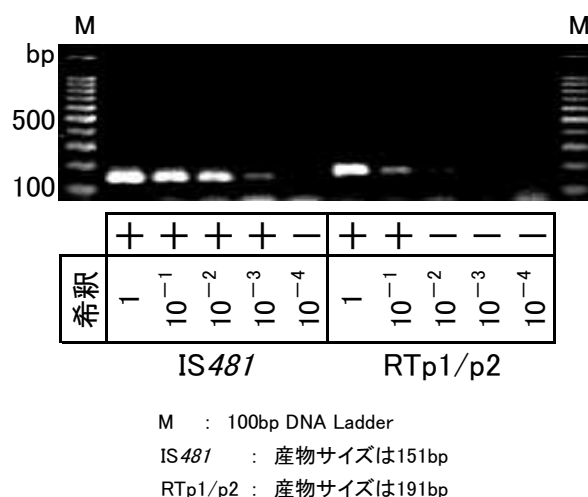


図1 IS481-PCRとPTp1/PTp2-PCRの感度の比較

ピー存在するため感度は高いが、他の *Bordetella* 属細菌にも存在するため、これを標的にしたPCR法は特異性に欠ける。一方、PTp1/p2-PCRは百日咳菌の毒素遺伝子を標的にしているため特異的ではあるものの、上述のように十分な感度が得られない。これらのことから、感度の高いIS481-PCRは検体からの直接検出に、特異性の高いPTp1/p2-PCRは百日咳菌の同定に用いることとし、以下のように検査を実施した。

検体をボルデー・ジャング培地に塗抹し、3日目以降に発育してきた百日咳菌様コロニーから抗百日咳菌血清 (デンカ生研) によるスライド凝集反応およびPTp1/p2-PCRを実施して同定した。また、検体から直接DNAを抽出し、IS481-PCR法に利用した。

以上の方法で実施した結果、培養法およびIS481-PCR法ともに79検体中3検体 (3.8%) が陽性であった。検体

は、検査時まで-40℃に保存されたが、今回の陽性検体はいずれも12日間凍結保存されたもので、ある程度の期間は検体を凍結保存しても菌分離が可能と思われた。また、培養法とPCR法の検出例が一致していたことから、菌が死滅していないことが示された。

百日咳は春から夏が流行のシーズンといわれているが、19年度は8月から検体が急増し、秋から冬にかけて多少減少したものの、再び春先に検体の増加がみられた。菌検出は3月に提出された検体からの3検体のみであった(図2)。その3検体の患者年齢は5、6および7歳の小児で、5歳と7歳は姉妹で同時期の感染であった(表1)。検体は鼻腔ぬぐい液の方が咽頭ぬぐい液より雑菌の混入が少ない傾向があり、平板上のコロニー観察を容易に行うことができた。今回の陽性例はすべて鼻腔ぬぐい液由来であった。

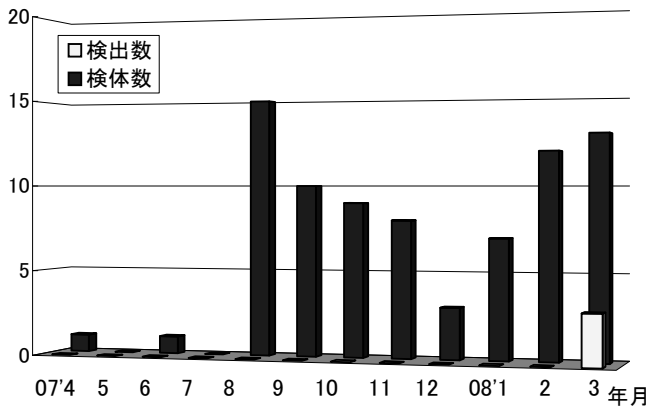


図2 月別百日咳菌検体数と検出数

表1 年齢別百日咳菌の検出数

年齢	検体数	検出数
0	2	0
1	8	0
2	4	0
3	5	0
4	8	0
5	4	1
6	4	1
7	4	1
8	5	0
9	0	0
10	0	0
11~15	3	0
16~20	2	0
21~30	4	0
31~40	17	0
41~50	3	0
51~60	3	0
61~70	3	0
計	79	3

百日咳は、7から10日程度の潜伏期を経て発症し、約2週間の風邪症状(カタル期)が続き、この時期の後半に高率に菌が検出されるが、以後、病日を追うごとに検出率は低下していくとされている⁴⁾。今回の検体採取時期は第1病日から第60病日で、52検体(65.8%)が発病1週間以内であった(表2)。菌検出陽性の3検体は第14、30および60病日に採取されており、長期間経過後に菌が検出されている例も見られた。したがって、百日咳菌の検出率は検体採取の病日を配慮することで上がると考えられた。同時に、少ない菌量を検出するために検出感度の向上を図ることにより改善される可能性があり、今後、LAMP法等の高感度遺伝子検出法への取り組みも必要と考えられた。

表2 病日別百日咳菌の検出数

病日	検体数	検出数
1	36	0
2	3	0
3	3	0
4	1	0
5	2	0
6	4	0
7	3	0
8	1	0
9	3	0
10	2	0
11~20	10	1
21~30	9	1
31~40	0	0
41~50	1	0
51~60	1	1
計	79	3

百日咳は、青年および成人においては軽症例が多いため百日咳と診断されないまま、ワクチン接種をしていない乳幼児への感染源となることも懸念されている。しかし、本疾患は感染症発生動向調査において小児科定点把握となっているため、小児以外における発生を正確に把握することができない現状にある。今回もすべて小児科定点からの検体であったが、百日咳が疑われる成人からの検体が多く含まれていた。これら成人からの検出陽性例はみられず、確認することはできなかったが、知らないうちに感染源にならないためにも、小児だけの調査に留まらず、百日咳の調査は成人を含めたものとしていく必要があると思われた。

謝 辞

検体の収集にご協力いただきました小児科定点医療機関の方々に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

参考文献

- 1) 鎌野 寛, 森 知美, 前田 肇, 岸本伸人, 形見智彦, 佐藤 誠ほか: 香川大学における百日咳感染事例, 病原微生物検出情報, 29, 68-69 (2008)
- 2) Ditte, M. D. , Birthe, D., Jesper, M. and Jensen, J. S. : Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions, J. Bacteriol., 53, 749-754 (2004)
- 3) 蒲池一成, 近田俊文, 落合雅樹, 山本昭彦, 堀内善信, 荒川宣親ほか: 百日咳, 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所, 衛生微生物技術協議会レファレンス委員会編, pp1002-1025 (2003)
<<http://www.nih.go.jp/niid/reference/pathogen-manual-60.pdf>>
- 4) 多田有希, 岡部信彦: 感染症の話, 百日咳, 感染症週報, 5(36)12-15 (2003)
<<http://idsc.nih.go.jp/idwr/kanja/idwr/idwr2003-36.pdf>>

資料

神奈川県における
 腸管出血性大腸菌の検出状況
 (平成19年度)

石原ともえ, 伊東久美子, 黒木俊郎

Occurrence of enterohemorrhagic
Escherichia coli in
 Kanagawa Prefecture (2007)

Tomoe ISHIHARA, Kumiko ITOH
 and Toshiro KUROKI

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: 以下, EHECと略す) は平成11年4月に施行された「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下, 感染症法と略す) で三類感染症に分類され, EHEC症の患者と診断した医師は, 保健所長を経由して都道府県知事に届け出なければならない。これを受けて, 保健所は分離された菌株をそれぞれの地方衛生研究所 (以下, 地研と略す) に送付している。地研は集められた菌株について生化学的性状, 血清型, 毒素型等を確認したのち, 厚生省生活衛生局食品健康課長通知

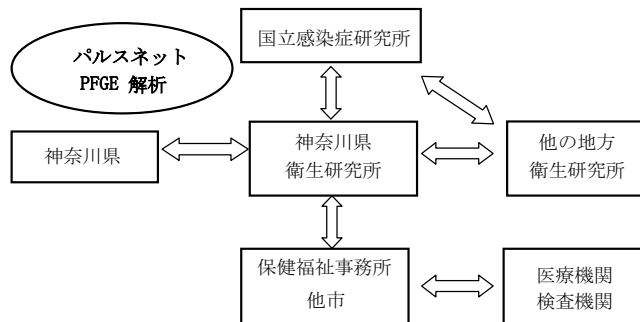


図1 腸管出血性大腸菌の情報の流れ

(平成8年6月19日付衛食第160号) により国立感染症研究所 (以下, 感染研と略す) 細菌第一部に送付している。全国から送付された菌株について感染研は, 分子疫学的調査の手法としてパルスフィールド・ゲル電気泳動 (以下, PFGEと略す) 解析を実施して感染症の大規模化, 散発的集団発生 (diffuse outbreak), すなわち, 一見散発事例の多発に見えるが, 実は同じ原因で起こっている集団事例の検出と抑止に力を注いでおり, また, 感染研で得られた結果は, それぞれの地研に還元されている (図1)。

当所においても, 地域における感染拡大防止のため, 送付されたすべてのEHEC菌株についてPFGE解析を実施した。

平成19年度の菌株受領状況の内訳は, 横浜市, 川崎市, 横須賀市, 相模原市および藤沢市をのぞく神奈川県内 (県域) の医療機関や保健福祉事務所から当所に送付された19株, 食肉衛生検査所から送付されたウシ由来5

表1 施設別菌株受領状況

施設	O157		O26	O111	菌株数
	VT1&2	VT2	VT1	VT1&2	
厚木保健福祉事務所	2	1	1		4
大和保健福祉事務所	1	1			2
秦野保健福祉事務所	3				3
茅ヶ崎保健福祉事務所	4	3			7
平塚保健福祉事務所	1				1
鎌倉保健福祉事務所		1			1
小田原保健福祉事務所		1			1
藤沢市保健所				1	1
食肉衛生検査所		5			5
計	11	12	1	1	25

表2 患者の年齢構成および性別 (20株)

年 齢	男性	女性	計
1 - 5	1	2	3
6 - 10	1		1
11-20	3	1	4
21-30		4	4
31-40	1		1
41-50		1	1
51-60		2	2
61-70		1	1
71-80	1		1
81-90		1	1
不 明		1	1
計	7	13	20

株、藤沢市分離1株の計25株であった(表1)。血清型および毒素の違いによる内訳は、O157(VT1&2)が11株、O157 (VT2)は12株、O26 (VT1)は1株、また、O111 (VT1&2)が1株であった。ヒト由来株では、女性がやや多いものの、年齢は1歳から87歳までの広い層から分離された(表2)。

PFGEについては、平成19年度は受領したすべての菌株について産生毒素型別に実施した。制限酵素としてはXba I を使用し、6V、2.2 - 54.2秒で12℃の条件で20時間泳動を実施した(図2)。参考菌株として、いずれも平成19年度の受領株であるO111 (VT1&2: レーン12)とO26 (VT1: レーン25)をおき、泳動を実施した。レーン18および19は、同時期に食肉衛生検査所内の同一施設に搬入された、異なったウシ個体から分離された菌株で、同じパターンを示した。他の23株はすべて異なったパターンで、散発的集団発生事例は認められなかった。

受領した25菌株について、アミノベンジルペニシリン (ABPC)、セフトキシム (CTX)、クロラムフェニコール (CP)、ホスホマイシン (FOM)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、ストレプトマイシン (SM)、スルフィソキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST)およびテトラサイクリン (TC)の11薬剤についてCLSI (米国臨床検査標準化協会)法に準拠して薬剤感受性試験を実施した。この結果(表3)、3剤 (ABPC, SM, TC)耐性は2株、2剤 (FOM, SMあるいはSM, TC)耐性2株、単剤 (ABPCあるいはTC)耐性2株で、20株中14株が供試した11薬剤に感受性であった。このうち、O111は3剤耐性、O26は2剤耐性 (FOM, SM)であった。

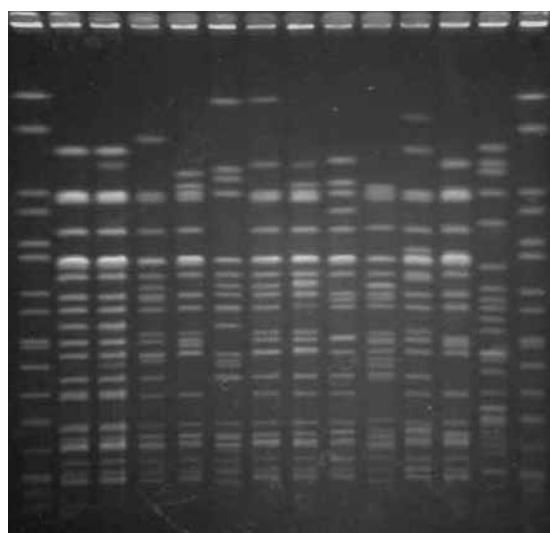
平成19年度は、全国的にはEHECの事例が多数報告¹⁾されており、県域においても、大規模な感染を懸念したが、2003~2007年の5年間でもっとも少ない菌株受領

表3 薬剤耐性パターン

耐性薬剤	耐性パターン		耐性株数
3 剤	ABPC	SM TC	2
2 剤		FOM SM	1
		SM TC	1
単 剤	ABPC		1
		TC	1
感受性			14
計			20

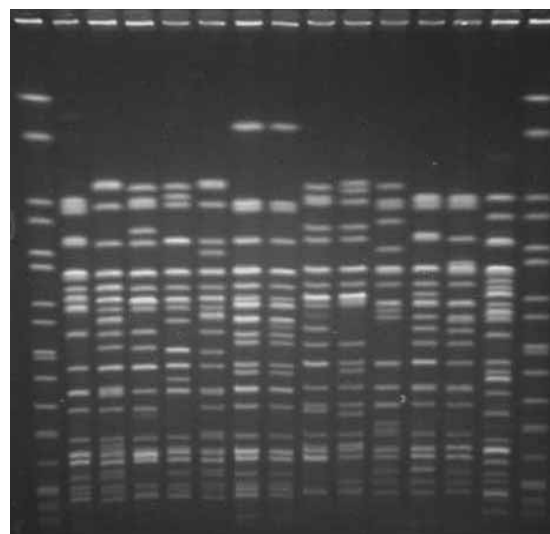
VT1&2

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



VT2

M 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 M



Xba I 使用, 6V, 2.2 - 54.2 s, 12℃で20時間泳動。
レーン12 (O111:VT1&2) とレーン25 (O26:VT1) は参考株。
M:マーカー:Salmonella Braenderup

図2 平成19年度分離25株のPFGE

数であった。

平成18年度は複数の集団食中毒事例²⁾が有り、PFGE法を用いた分子疫学的解析の重要性について啓発したが、平成19年度は、全国的にEHECによる集団事例が多数報告されたものの県域での届出はなかった。

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知(平成19年5月14日)、「飲食店における腸管出血性大腸菌出血性大腸菌食中毒対策について」³⁾の中で、EHECによる食中毒の未然防止の観点から関係者への指導と、EHEC食中毒の調査にあたり患者便および食材等からEHECが検出された場合には、引き続き感染研細菌第一部へ分離菌株を送付して頂きたいとの内容で重ねて地研への協力要請がなされた。また、「平成18年に発生したEHECによる食中毒事例(速報値:事件数24件、患者数179名)は、飲食店、とくに焼肉店が原因施設となった事例が18件(75%)、患者数158名(88%)発生しており、原因食品の多くが牛肉および牛レバーの料理(焼肉、ユッケ、レバー刺し等)であった(抜粋)」ことから、EHEC食中毒予防にあたって食肉取扱関係者への衛生管理の指導と、消費者への注意を喚起するよう通知³⁾された。

焼肉店での広域事例あるいはバーベキューによる感染等で原因食は特定されていないものの、牛肉と何らかの関連が確認²⁾されていることから、今後も菌株を収集し、分子疫学調査を加えた感染源の特定と感染拡大防止を重視した迅速な対応を心がけていきたい。

最後に、ご協力を頂きました各医療機関、医療検査機関、衛生研究所各分室および菌株搬入にご尽力いただきました各保健福祉事務所、県生活衛生課および健康増進課、藤沢市保健所の方々に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) <特集>腸管出血性大腸菌感染症 2008年4月現在、病原微生物検出情報, 29, 117-128 (2008)
- 2) 石原ともえ他: 神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況(平成18年度), 神奈川県衛生研究所研究報告 37, 68-69 (2007)
- 3) <通知>飲食店における腸管出血性大腸菌食中毒対策について, 病原微生物検出情報, 28, 197-198 (2007)

資料

神奈川県における ウイルス性胃腸炎の集団発生状況 (平成19年度)

宮原香代子, 片山 丘, 原田美樹, 古屋由美子

Occurrence of viral gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (April, 2007-March, 2008)

Kayoko MIYAHARA, Takashi KATAYAMA,
Miki HARADA and Yumiko FURUYA

ウイルスによる胃腸炎の集団発生は、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冬期を中心に起きている。ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスなどがその原因ウイルスであるが、特にノロウイルスによる事例が多く、平成18年11月から平成19年1月には、全国的にノロウイルスによる食中毒や感染性胃腸炎の大流行がみられた。厚生労働省平成18年全国食中毒発生状況の病因物質別統計では、ノロウイルスを原因とする食中毒が総事件数1,491件中499件(33.5%)、総患者数39,026名中27,616名(70.8%)で、事件数および患者数ともに第1位であった。

我々は胃腸炎の集団発生時にその感染拡大を防止するため、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19年4月から平成20年3月にかけて神奈川県で発生した胃腸炎の集団発生事例について、原因ウイルス検出状況を報告する。

ウイルス検査を行った胃腸炎の集団発生は85事例で、検体数は便および吐物661検体、食品8検体、ふきとり21検体の690検体であった。平成18年度には98事例1,318検体と急増したが、今年度は平成17年度の72事例625検体と同程度の検体数であった。

ウイルスの検出については、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

タウイルスとアデノウイルスはイムノクロマトを用いた。また原因ウイルスを広く迅速に検索するため、発症者の検体を中心に電子顕微鏡観察を行った。定量PCRでノロウイルスgenogroup Iが検出された食中毒1事例の一部の検体については、さらにプライマーCOG1F/G1-SKRを用いたPCRを行い、その産物の塩基配列をダイレクトシーケンシングにより決定した。

その結果、52事例の便および吐物261検体、食品1検体、ふきとり2検体からウイルスが検出された。検出されたウイルスはノロウイルスが46事例で最も多く、サポウイルスが4事例、A群ロタウイルスとC群ロタウイルスがそれぞれ1事例であった。これらの検査結果および疫学調査から、食中毒と判定されたものが8事例、感染性胃腸炎と判定されたものが9事例であった。その他の35事例は有症苦情が14事例、他の自治体からの関連調査が21事例であった。ふきとり検査では、飲食店の刺身用まな板1検体と宿泊施設のトイレ便器1検体からノロウイルスを検出したが、いずれの事例も有症苦情と判定された。

食中毒8事例はノロウイルスを原因とするものであり、検出されたノロウイルス遺伝子は事例CとHの2事例がgenogroup I(以下GI)、それ以外の6事例はgenogroup II(以下GII)であった(表1)。事例Cでは発症者便からGIのみが検出されたが、調理従事者便からはGIのみとGIとGIIの混合が検出された。GIとGIIが混合して検出される場合は魚介類の生食を原因とすることが多いが、調理従事者の感染原因については不明であった。また定量PCRと同時にを行った電子顕微鏡観察では、5事例の発症者便16検体から小型球形ウイルス粒子が検出され、これらの粒子はノロウイルスであると確定された。

食中毒事例の発生時期は、8事例中6事例が12月から1月と冬期に集中していた。また原因食品や施設の汚染場所を調べるため、事例D、F、Hについては食品やふきとりの検査を行った。その結果、事例Fでは発症者便および参考品の生カキからノロウイルスGIIが検出された。しかし今回ノロウイルスが検出された生カキは、当日の残品ではなく参考品のため原因食品と決定されなかった。一方事例F以外の7事例においては、調理従事者便からノロウイルスが検出されたことから、その調理従事者を介して食品が汚染され食中毒が発生した可能性が考えられた。

食中毒事例Eでは、ノロウイルスGIIが検出された調理従事者3名(検出例a、b、c)について、ノロウイルスが便中に排泄される期間を調査することができた(表2)。ウイルス遺伝子量は定量PCRの結果から便1g当た

りのコピー数を算出し、ウイルスの便中への排泄期間は初回の検出日を基準とした。初回検出のウイルス遺伝子量は検出例aが 7.3×10^5 コピー/g、bが 7.2×10^6 コピー/g、cが 2.6×10^8 コピー/gであり、いずれの例でも大量のノロウイルスを排泄していた。aは6日後、bは10日後の検査でノロウイルスが検出されなくなったが、初回検出でウイルス遺伝子量が最も多かったcは25日後まで検出が続いた。我々は昨年度、約4週間にわたりノロウイルスが排泄された例を経験したが、今回の調理従事者の調査においても長期間排泄される例を確認することができた。食中毒予防の観点から調理従事者は、ノロウイルス

スに感染すると便や吐物には大量のウイルスが含まれていることや、症状が改善された後も長期間ウイルスが排泄される可能性があることを認識して、日頃から自己の健康管理および手洗いの励行や調理手袋着用などさらなる注意が必要である。

ノロウイルスによる食中毒はG IIの事例が多いが、3月にG Iによる事例が発生した(表1)。この事例Hについて、当該飲食店を利用した3グループの発症者便および調理従事者便から検出されたノロウイルス遺伝子と、遺伝子型G I /1からG I /15の代表株遺伝子の塩基配列を用いて、Neighbor-Joining法による系統樹を作成した

表 1 平成19年度食中毒事例

事例	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	検出遺伝子	検体数	陽性数
A	H 19. 4	茅ヶ崎	飲食店	不明	発症者便	4	4	G II	4	2
					調理従事者便	2	2	G II	N.T.	
B	H 19.12	秦 野	飲食店	不明	発症者便	21	14	G II	2	0
					摂食者便	30	6	G II	N.T.	
					調理従事者便	32	5	G II	N.T.	
C	H 19.12	小田原	旅 館	不明	発症者便	2	1	G I	2	0
					調理従事者便	10	2	G I, G I & II	N.T.	
D	H 20. 1	小田原	仕出し屋	不明	発症者便	5	4	G II	5	4
					調理従事者便	11	3	G II	N.T.	
					食品	5	0		N.T.	
E	H 20. 1	平 塚	飲食店	不明	発症者便	14	9	G II	9	6
					調理従事者便	8	3	G II	N.T.	
F	H 20. 1	平 塚	飲食店	不明	発症者便	11	9	G II	8	3
					調理従事者便	3	0		N.T.	
					食品	1	1	G II	N.T.	
G	H 20. 1	小田原	従業員食堂	不明	発症者便	10	10	G II	10	1
					調理従事者便	2	1	G II	N.T.	
H	H 20. 3	小田原	飲食店	不明	発症者便	35	28	G I	N.T.	
					摂食者便	3	2	G I	N.T.	
					調理従事者便	19	3	G I	N.T.	
					ふきとり	2	0		N.T.	

G I : genogroup I G II : genogroup II N.T. : 検査せず

表 2 調理従事者の便中におけるノロウイルス遺伝子の検出状況

検出例	初回検出の ノロウイルス遺伝子量*	初回検出後の経過日数					
		4日	6日	10日	14日	25日	32日
a	7.3×10^5	+	—				
b	7.2×10^6	+	+	—			
c	2.6×10^8	+	+	+	+	+	—

* : 定量PCRから便1g当たりのコピー数を算出

+: 検出 -: 不検出

(図1). その結果, 検出されたノロウイルスの塩基配列は全て一致し, GI/8に分類された. この時期に神奈川県でGI/8の集団発生が確認されたが, この遺伝子型が今後も流行するのか, その動向に注意する必要があると考えられた.

感染性胃腸炎9事例で検出された原因ウイルスは, ノロウイルスが7事例, C群ロタウイルスが1事例, サポウイルスが1事例であった(表3). ノロウイルスが検出された7事例は全てGIIであった.

感染性胃腸炎の発生施設は高齢者施設が6事例で最も多く, 小学校が2事例, 福祉施設が1事例であった.

C群ロタウイルス(事例A)およびサポウイルス(事例B)による集団発生事例は, 平成17年5月に神奈川県で初めて確認されて以来の発生であった. C群ロタウイルスによる事例は平成17年度も今回も, 春期における小学校での発生であった. この事例A, Bは定量PCRでノロウイルスが検出されず, 同時に進めていた電子顕微鏡観察によりロタウイルス粒子, ノロウイルス以外の小型球形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.

平成19年度の神奈川県におけるウイルス性胃腸炎の集団発生は, ノロウイルスが大流行した前年度と比較すると食中毒事例, 感染性胃腸炎事例共に減少した. しかしこの傾向が続くかどうかは疑問であり, 特にノロウイルスについては今後の動向を監視する必要がある. 集

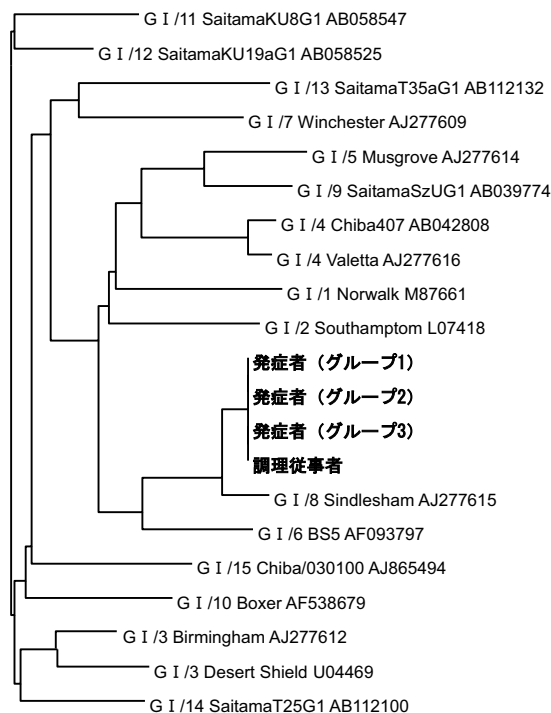


図1 ノロウイルスgenogroup Iの系統樹

団発生時には速やかに原因ウイルスを検出し感染の拡大を防止するとともに, 集団発生を予防するために感染源および感染経路の解明が重要であると考えられた.

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20年7月28日受理)

表3 平成19年度感染性胃腸炎事例

事例	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
A	H 19.5	鎌倉	小学校	発症者便	3	3	C群ロタウイルス	3	3
				調理従事者便	10	1		N.T.	
				ふきとり	6	0		N.T.	
B	H 19.10	茅ヶ崎	福祉施設	発症者便	4	2	サポウイルス	4	2
C	H 19.11	鎌倉	高齢者施設	発症者便	2	2	ノロウイルス(GII)	2	1
D	H 19.12	小田原	小学校	発症者便	2	2	ノロウイルス(GII)	N.T.	
E	H 20.1	鎌倉	高齢者施設	発症者便	3	3	ノロウイルス(GII)	3	3
F	H 20.1	厚木	高齢者施設	発症者便・吐物	6	6	ノロウイルス(GII)	4	1
				調理従事者便	9	0		N.T.	
G	H 20.2	鎌倉	高齢者施設	発症者便	3	1	ノロウイルス(GII)	3	0
				介護職員便	1	1		N.T.	
H	H 20.2	厚木	高齢者施設	発症者便	6	6	ノロウイルス(GII)	N.T.	
I	H 20.2	厚木	高齢者施設	発症者便	2	1	ノロウイルス(GII)	N.T.	

GII : genogroup II

N.T. : 検査せず

資料

感染性胃腸炎患者からの
原因ウイルス検出状況
(平成19年度)

片山 丘, 原田美樹, 宮原香代子, 古屋由美子

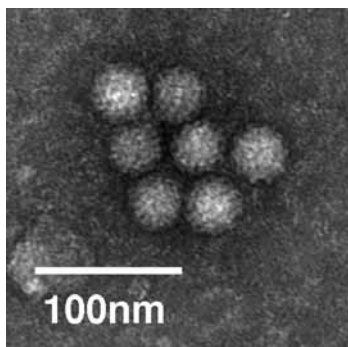
Surveillance of Viral Gastroenteritis
in Kanagawa Prefecture
(April, 2007~March, 2008)

Takashi KATAYAMA, Miki HARADA,
Kayoko MIYAHARA and Yumiko FURUYA

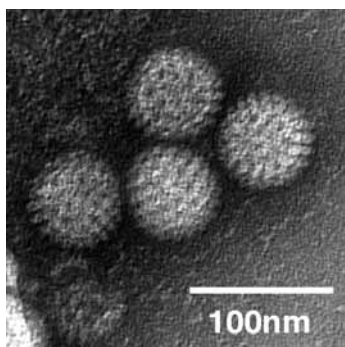
感染症予測監視事業の一環として、感染性胃腸炎の原因ウイルスを把握する目的で、神奈川県域の小児科定点医療機関から得られた感染性胃腸炎患者の検体から原因ウイルスの検索を行っている。ウイルスを原因とする感染性胃腸炎は、冬期の前半を中心に流行がみられるノロウイルス(図1-1)による乳幼児から成人に至るまで幅広い年齢層での胃腸炎と、冬期の後半を中心に流行がみられるロタウイルス(主にA群:図1-2)による乳幼児の胃腸炎が良く知られている。県域ではこれらのウイルスの他にアデノウイルス(図1-3)、サポウイルス(図1-4)、アストロウイルス(図1-5)も検出されている。さらに、過去2、3年の間に県域において、5月、6月の春から初夏や10月の秋に幼稚園や小学校および老人福祉施設で感染性胃腸炎の集団発生からノロウイルス、サポウイルス、A群ロタウイルスおよびC群ロタウイルスが検出されている。そこで、時期・年齢に関わらず原因ウイルスの検索を行った。

平成19年4月から平成20年3月に感染性胃腸炎と診断された患者の便203検体を用いた。ウイルスの検出はノロウイルス、A群ロタウイルス、アデノウイルス、サポウイルスおよびアストロウイルスを対象とした。ノロウ

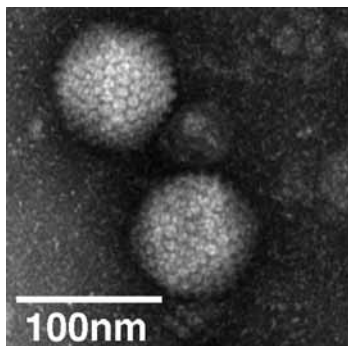
【1-1】 ノロウイルス



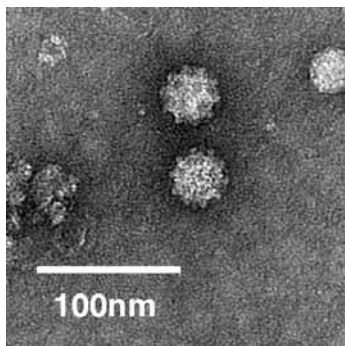
【1-2】 ロタウイルス



【1-3】 アデノウイルス



【1-4】 サポウイルス



【1-5】 アストロウイルス

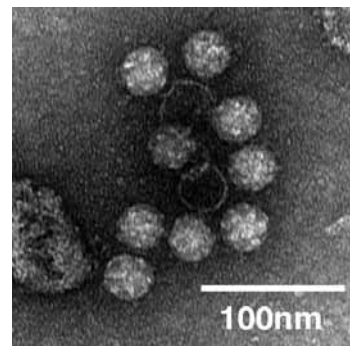


図1 平成19年度に検出されたウイルスの電顕像

ウイルスには定量PCR, A群ロタウイルスおよびアデノウイルスにはラピッドテストローアデノ (Orion Diagnostica社製), サポウイルスおよびアストロウイルスにはPCRを用いた. また電子顕微鏡によるウイルス検索も併せて行った.

検査の結果, 203検体中98検体から感染性胃腸炎の原因ウイルスが検出された. 検出されたウイルスは, ノロウイルスが48検体, A群ロタウイルスが19検体, アデノウイルスが7検体, サポウイルスが20検体, アストロウイルスが4検体であった (表1). これらウイルスの検出状況は, 18年度に比べノロウイルスが約2/3に減少し, A群ロタウイルス, アデノウイルスは同程度, サポウイルスがおよそ2倍に増加した. さらにアストロウイルスが複数検出されたことは県域で初めてのことであり, サポウイルス, アストロウイルスの流行が確認された.

患者の年齢を6歳以下, 7歳から12歳, 13歳から22歳, 23歳から64歳および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群ロタウイルスとアデノウイルスは6歳以下からの検出数が多く, A群ロタウイルスは僅かながら23歳以上からも検出されている. ノロウイルスは全ての年齢層で検出された. サポウイルスはノロウイルスと同様に低年齢層に次いで, 23歳から64歳からも検出されている. またノロウイルスとサポウイルス以外のウイルスは, 13歳から22歳では検出されなかった (表1).

月別の検出状況をみると, 平成19年4月には18年度の流行の最後と思われるノロウイルスとA群ロタウイルスが4例ずつ検出された. 5月にはノロウイルスとアストロウイルスが1例ずつとサポウイルスが4例検出された. 6月にはアデノウイルス以外のウイルスが少数であるが検出され, 7月にアデノウイルスが2例, ノロウイルス, サポウイルスが1例ずつ検出された. 19年度は感染性胃腸炎からウイルスが検出されなかったのは8月の一ヶ月のみで, それ以外の月には散発的ではあるが何れかのウイルスが検出されていた. 9月にアデノウイルス, 10月にノロウイルスが1例ずつ検出され, 11月のノロウイルスが4例, サポウイルスが1例, アデノウイルスが2例を皮切りにそれ以降は12月にノロウイルスが16例, アデノウイルスが1例, 平成20年1月にノロウイルスが3例, サポウイルスが2例, 2月にノロウイルスが6例, サポウイルスが4例, A群ロタウイルスが5例, 3月にノロウイルスが9例, サポウイルスが6例, アストロウイルスが2例, A群ロタウイルスが9例, アデノウイルスが1例と全てのウイルスが多数検出されている (表2).

検出されたノロウイルスのgenogroupをみると, 48検体のうち43検体がgenogroup II, 5検体がgenogroup Iであり, ノロウイルスの流行は平成19年11月から平成20年3月であった. ノロウイルスのgenogroup Iは, 18年度のgenogroup IIの流行が終わった5月と6月に1例ずつと19年度の流行が終盤に近づいてきた平成20年2月に2例, 3月に1例と散発的に検出されている. サポウイルスの流行は二ヶ月遅れて平成20年1月から3月であった. A群ロタウイルスの流行は18年度より一ヶ月早い平成20年2月からであった. アデノウイルスは検出数も少なく流行は見られなかった (表2).

19年度の調査において興味深いのはアストロウイルスが平成19年の5月と6月, 平成20年3月に合計4例見られたことであった. 県域においてアストロウイルスが検出されたのは10年程前に1例確認されたのみで, それ以降は確認されていない. アストロウイルスの検出された4例について検体情報と臨床症状をまとめた (表3). 検出されたのは厚木と茅ヶ崎地域でいずれも乳幼児であった. 厚木地域では平成19年5月と6月に散発症例から検出され, 茅ヶ崎地域では平成20年3月に地域流行の2症例から相次いで検出された. しかしこれら2つの地域でのアストロウイルスの関連については不明であり, 今後遺伝子解析等をする事によりこれらウイルスの詳細が明らかになると考えられる. また臨床症状は嘔吐が無く, 下痢のみの場合が多いようである. 特に厚木地域の散発症例では下痢のみであり, 茅ヶ崎地域の地域流行症例では嘔吐や発熱を伴っていることから, 感染したウイルス株が違っているのか, 患者自身に関係しているのか注目される.

今後も引き続き本調査を継続するにあたり, 定点医療機関への検査結果の迅速な還元や病原微生物検出情報等により広く情報の提供に努めていきたい.

最後になりましたが, 検体および患者情報の収集にご協力いただきました小児科定点医療機関の先生方々に深謝いたします. さらに本事業にご尽力いただきました県健康増進課の方々に深謝いたします.

(平成20年7月28日受理)

表 1 年齢別ウイルス検出状況

年齢層	ノロウイルス	A群ロタウイルス	アデノウイルス	サポウイルス	アストロウイルス	合計
6歳以下	29 * ¹	16	6	12	4	67
7～12歳	5 * ¹	1	1	4	0	11
13～22歳	1	0	0	1	0	2
23～64歳	10 * ¹	2	0	3	0	15
65歳以上	3	0	0	0	0	3
合計	48	19	7	20	4	98

*1 : genogroup I が検出された検体を含む。

表 2 発病月別ウイルス検出状況

年月	陽性数						合計
	ノロウイルス		A群ロタウイルス	アデノウイルス	サポウイルス	アストロウイルス	
	genogroup I	genogroup II					
平成19年 4月	0	4	4	0	0	0	8
5月	1	0	0	0	4	1	6
6月	1	2	1	0	2	1	7
7月	0	1	0	2	1	0	4
8月	0	0	0	0	0	0	0
9月	0	0	0	1	0	0	1
10月	0	1	0	0	0	0	1
11月	0	4	0	2	1	0	7
12月	0	16	0	1	0	0	17
平成20年 1月	0	3	0	0	2	0	5
2月	2	4	5	0	4	0	15
3月	1	8	9	1	6	2	27
合計	5	43	19	7	20	4	98

表 3 感染性胃腸炎患者に対する臨床症状（アストロウイルス検出事例）

検体情報						臨床症状						備考		
定点地域	発病日	検体採取日	病日	年齢		性別	発熱	最高℃	胃腸炎					
				歳	ヶ月				下痢	血便	嘔気		嘔吐	腹痛
厚木	H19.5.29	H19.5.31	3	1	7	女			+					
厚木	H19.6.18	H19.6.19	2	1	1	男			+					
茅ヶ崎	H20.3.10	H20.3.11	2	3	10	男			+		+	+	+	地域流行
茅ヶ崎	H20.3.19	H20.3.21	3	1	5	男	+	38.3	+					地域流行

資料

神奈川県における
つつが虫病の発生状況
(平成19年度)

原田美樹, 片山 丘, 宮原香代子, 古屋由美子

Occurrence of Tsutsugamushi disease
in Kanagawa Prefecture
(April, 2007 – March, 2008)

Miki HARADA, Takashi KATAYAMA

Kayoko MIYAHARA and Yumiko FURUYA

つつが虫病は秋田, 山形および新潟地方の特定河川流域に局限して発生し, 夏期にアカツツガムシが媒介する古典的な型と, さらに日本各地で春期や秋期にフトゲツツガムシやタテツツガムシが主として媒介する新型が知られている。

全国患者数は1980年以降, 各地で新型つつが虫病患者が急増し, 1984年と1990年, 1991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にあったが, 2000年には約800名と一時増加がみられた。しかし2002年以降毎年約300名から400名で推移し, 2007年は370名であった。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18名, 2005年19名, 2006年15名と推移し, 2007年は25名と増加した(図1)。

神奈川県では, つつが虫病の病原体である *Orientia tsutsugamushi* を用いた immunofluorescence assay (IF) により, つつが虫病患者の血清抗体検査を行っている。さらに polymerase chain reaction (PCR) による急性期血液からの *Orientia tsutsugamushi* 遺伝子の検出および感染株の型別を実施し, 医療機関へ迅速に検査結果の報告を行っている。また県内の発生状況などの情報還元も行っている。

2007年4月から2008年3月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26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3例, 平塚保健福祉事務所管内2例の合計34例であった。IFによる

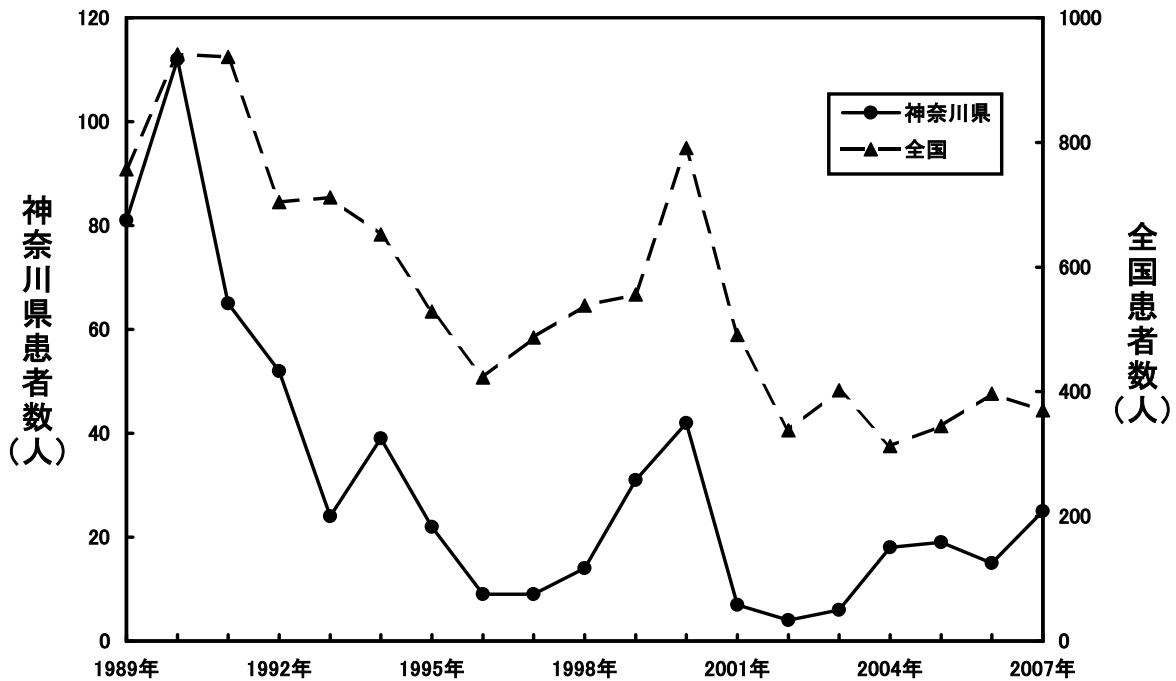


図1 つつが虫病患者発生状況

急性期と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22例がつつが虫病と判定された（表1）。また急性期の血液のみの搬入で抗体が検出されず、IFで判定保留となった10例のうち3例からPCRにより遺伝子が検出され、合

計25例がつつが虫病と判定された。また7例は遺伝子が検出されず、つつが虫病ではないと判定された。

遺伝子検査には血液（全血）が必要であるため、血清しか保存されていない場合には遺伝子検査は困難である。そこで痂皮から *O. tsutsugamushi* 遺伝子が検出可能

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	採血月日	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			
2007-1	男	62	2007/5/29	<10	20	<10	20	<10	20	<10	<10	<10	40	保留	陰性	陰性
2007-2	男	15	2007/8/6	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2007-3	男	66	2007/9/12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2007-4	男	53	2007/9/26 2007/10/9	80 160	40 80	40 80	20 40	40 40	20 20	160 320	40 160	20 40	20 20	陽性(Kw)	陰性	陽性
2007-5	男	39	2007/9/27 2007/10/4	<10 <10	<10 <10	<10 <10	<10 <10	<10 <10	<10 <10	<10 <10	<10 <10	<10 <10	<10 <10	陰性	陰性	陰性
2007-6	男	23	2007/10/23	80	40	40	40	40	40	320	80	40	20	陽性	陽性(Kw)	陽性 分離陽性
2007-7	男	77	2007/10/25 2007/11/1	<10 <10	<10 320	<10 160	<10 320	<10 <10	<10 320	<10 <10	<10 80	<10 320	<10 320	陽性	陽性(Kr)	陽性
2007-8	女	72	2007/10/26	20	40	160	40	160	40	10	20	320	40	陽性	陽性(Kr)	陽性
2007-9	女	80	2007/10/26 2007/11/13	<10 <10	<10 40	<10 <10	<10 <10	<10 <10	<10 40	<10 <10	<10 40	<10 <10	20 80	陽性(Kr)	陰性	陽性
2007-10	女	68	2007/10/26	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2007-11	男	59	2007/10/29	<10	20	<10	20	<10	20	<10	10	<10	20	保留	陽性(Kw)	陽性
2007-12	女	88	2007/10/31	640	<10	<10	<10	<10	<10	2560	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性 分離陽性
2007-13	男	79	2007/10/31	10	<10	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	保留	陽性(Kw)	陽性
2007-14	女	64	2007/11/5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陽性(Kr)	陽性
2007-15	男	68	2007/11/5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2007-16	男	64	2007/11/5 2007/11/19	10 160	160 1280	<10 80	160 1280	<10 160	160 160	80 1280	160 1280	<10 40	160 1280	陽性	陽性(Kw)	陽性
2007-17	女	47	2007/11/7 2007/11/14	<10 320	<10 320	<10 80	<10 320	<10 40	<10 160	<10 640	<10 320	<10 80	<10 320	陽性	陽性(Kw)	陽性
2007-18	女	73	2007/11/8	80	40	160	160	160	160	20	40	320	160	陽性	陽性(Kr)	陽性
2007-19	男	67	2007/11/5 2007/11/15	80 1280	<10 640	10 320	<10 320	10 320	<10 320	320 2560	<10 2560	10 320	<10 160	陽性	陽性(Kw)*1	陽性
2007-20	男	79	2007/11/9 2007/11/22	<10 640	20 80	<10 160	<10 20	<10 160	<10 20	160 2560	20 2560	<10 160	<10 40	陽性	陽性(Kw)	陽性
2007-21	女	73	2007/11/9 2007/11/19	40 40	20 160	<10 <10	<10 40	<10 <10	<10 80	160 320	80 640	<10 <10	<10 40	陽性	陽性(Kw)	陽性
2007-22	女	47	2007/11/12 2007/11/22	40 320	<10 80	<10 160	<10 40	<10 160	<10 40	320 320	<10 640	<10 160	<10 40	陽性	陽性(Kw)	陽性 分離陽性
2007-23	女	73	2007/11/16 2007/11/30	320 1280	40 320	160 640	160 160	640 640	320 160	40 5120	640 2560	40 1280	160 160	陽性	陽性(Kw)	陽性 分離陽性
2007-24	男	72	2007/11/26	160	<10	160	<10	80	<10	320	<10	80	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性 分離陽性
2007-25	男	65	2007/11/26 2007/12/6	40 640	<10 320	10 320	<10 160	10 320	<10 80	40 2560	<10 640	10 320	<10 80	陽性	陽性(Kw)	陽性 分離陽性
2007-26	男	72	2007/11/29	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2007-27	男	69	2007/11/30 2007/12/14	20 640	40 640	<10 80	10 320	<10 80	10 320	40 1280	40 1280	<10 80	20 320	陽性	陽性(Kw)	陽性 分離陽性
2007-28	男	84	2007/12/1 2007/12/17	<10 640	<10 640	<10 320	<10 1280	<10 320	<10 320	80 1280	<10 1280	<10 320	<10 640	陽性	陽性(Kw)	陽性
2007-29	女	69	2007/11/30 2007/12/14	320 640	80 320	320 320	40 320	320 320	40 320	2560 2560	160 2560	320 320	40 320	陽性	陽性(Kw)	陽性
2007-30	女	65	2007/12/3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性
2007-31	男	44	2007/11/30 2007/12/12	<10 320	<10 320	<10 1280	<10 320	<10 1280	<10 320	<10 2560	<10 640	<10 640	<10 320	陽性	陽性(Kw)*2	陽性 分離陽性
2007-32	女	50	2007/12/3 2007/12/20	<10 <10	80 80	<10 <10	40 40	<10 <10	40 80	<10 <10	80 40	<10 <10	80 40	陰性	陰性	陰性
2007-33	男	65	2007/12/8 2007/12/19	<10 1280	<10 2560	<10 5120	<10 2560	<10 640	<10 1280	<10 1280	<10 2560	<10 2560	<10 1280	陽性	陽性(Kp)	陽性
2007-34	男	64	2007/12/13 2008/1/4	640 640	320 320	320 160	160 80	320 160	40 80	1280 2560	640 640	320 160	40 40	陽性	陽性(Kw)	陽性

Kw : Kawasaki 株 Kr : Kuroki 株 Kp : Karp 株

*1 : 痂皮から検出

*2 : 血液、痂皮から検出

表2 分離株のIFによるモノクローナル抗体の反応性とPCR型別

分離株番号	IF 価					PCR型別
	抗 Gilliam	抗 Karp	抗 Kato	抗 Kawasaki	抗 Kuroki	
Kawasaki *	<100	<100	<100	20480	<100	
2007-6	<100	<100	<100	6400	<100	Kw
2007-12	<100	<100	<100	3200	<100	Kw
2007-22	<100	<100	<100	3200	<100	Kw
2007-23	<100	<100	<100	3200	<100	Kw
2007-24	<100	<100	<100	3200	<100	Kw
2007-25	<100	<100	<100	3200	<100	Kw
2007-27	<100	<100	<100	3200	<100	Kw
2007-31	<100	<100	<100	1600	<100	Kw

* : 標準株(1981年, 宮崎県)

Kw : Kawasaki 株

であるか検討した。検体番号2007-19と2007-31（血液から遺伝子が検出されている）から痂皮が得られ、遺伝子検出を試みたところ、*O. tsutsugamushi* 遺伝子が検出され、痂皮も遺伝子検査の有効な検査材料であることが示された。

神奈川県内で発生しているつつが虫病の感染株を決定するために、患者25例について型別を実施した。遺伝子検査で遺伝子が検出された23例について、PCRによる型別を行った。また遺伝子が検出されなかった2例（検体番号2007-4, 2007-9）はIFの結果から感染株を推定した。その結果、Kawasaki株19例（76%）、Kuroki株5例（20%）、Karp株1例（4%）となり、その大部分がKawasaki株による感染であった（表1）。

患者の聞き取り調査からKarp株による1例（検体番号2007-33）の推定感染場所は、静岡県駿東郡小山町であり足柄上郡や南足柄市に隣接する地域であった。またKawasaki株、Kuroki株24例の推定感染場所は、足柄上郡山北町、南足柄市とその周辺に集中しており、過去の発生状況とほぼ同じであった。

つつが虫病患者血液から培養細胞により*O. tsutsugamushi* の分離を試みたところ、8株分離することができた。分離された*O. tsutsugamushi* はGilliam, Karp, Kato, KawasakiおよびKurokiの5株にそれぞれ特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を使用したIFで、8株ともKawasaki株特異的モノクローナル抗体と1:1600倍以上の反応性が示された（表2）。またPCRにより培養細胞の感染株の型別を行ったところ、IFの結果と同様にKawasaki株に型別された。以上のことから、つつが虫病患者から分離された

表3 つつが虫病患者の発生時期

発生月	患者数	(%)
2007年 9月	1	(4)
2007年 10月	9	(36)
2007年 11月	13	(52)
2007年 12月	2	(8)
合計	25	(100)

O. tsutsugamushi は、Kawasaki株であると確定することができた。

つつが虫病患者の発生時期は9月1名（4%）、10月9名（36%）、11月13名（52%）、12月2名（8%）で10月と11月がおおよそ90%を占めていた（表3）。感染時の行動は、山地の畑での農作業が多く、次に山地での山菜採りやレジャー、平地での庭仕事や田畑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。今後も迅速に判定可能なPCRによる遺伝子検出とIFによる抗体検出を併用し、つつが虫病を迅速かつ確実に判定する必要があると思われる。

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20年7月28日受理)

資料

食品汚染物質残留実態調査結果
 (平成19年度)

—動物用医薬品, カビ毒, 農薬, ベンゼン等—

佐藤久美子, 赤星 猛, 林 孝子, 甲斐茂美,
 中村廣志, 藤巻照久

On the residual levels of food
 chemical contamination in
 Kanagawa Prefecture (2007)

Kumiko SATO, Takeshi AKABOSHI,

Takako HAYASHI, Shigemi KAI,

Hiroshi NAKAMURA and Teruhisa FUJIMAKI

我々は、食品の安全性を確保する目的で、残留動物用医薬品、カビ毒、残留農薬等について実態調査を継続して行っている。平成19年度は、さらに清涼飲料水のベンゼン等の実態調査を行った。本報では平成19年度のそれらの結果を併せて報告する。

1. 食肉, 魚介類中の動物用医薬品・抗生物質残留検査結果

動物用医薬品・抗生物質の除去検査を平成8年度より継続して行っている。平成19年度は食肉28検体、魚介類25検体について検査を行った。結果を表1および2に示した。すべての検体で不検出であった。

2. 輸入香辛料, ナッツ類, りんご果汁等のカビ毒(アフラトキシンおよびパツリン) 検査結果

県域流通の輸入香辛料, 乾燥果実および穀類・豆類34検体についてアフラトキシン, 輸入りんご果汁等6検体についてパツリンの除去検査を行った。結果を表3に示した。平成18年度は濃縮りんご果汁のパツリンの検出例があった¹⁾が, 平成19年度はアフラトキシン, パツリンはいずれも不検出であった。

表1 食肉中の動物用医薬品・抗生物質残留検査結果

動物用医薬品 および 抗生物質名	検出頻度 (検出数/検体数)		
	牛肉	豚肉	鶏肉
	国産(5) オーストラリア(3) アメリカ(1)	国産(3) アメリカ(3) 刊(1)	国産(6) ブラジル(4) アメリカ(2)
オキシテトラサイクリン*1	0/9	0/7	0/12
スピラマイシン*2	0/9	—	0/12
チルミコシン	0/9	0/7	—
エンロフロキサシン*3	0/9	0/7	0/12
オフロキサシン	0/4	0/7	0/12
オルビフロキサシン	0/9	0/7	0/8
ジフロキサシン	—	0/7	0/4
ダノフロキサシン	0/5	—	—
オキシリニック酸	0/9	—	0/12
ナリジクス酸	0/9	—	0/4
フルベンダゾール	0/4	—	—
スルファモノメトキシ	0/4	0/7	0/12
スルファジメトキシ	0/4	0/7	0/12
スルファメトキサゾール	—	0/7	0/12
スルファジアジン	0/4	—	0/8
スルファキノキサリン	—	—	0/12
スルファジミジン	—	0/7	0/4
スルファメトキシピリダジン	—	0/7	0/4
スルファクロピリダジン	—	0/7	0/4
スルファドキシ	—	0/7	0/4
エトバベート	—	—	0/12
ピリメタミン	—	—	0/12
レバミゾール	0/4	—	0/12

—: 未実施

*1: クロルテトラサイクリンおよびテトラサイクリンを含む

*2: ネオスピラマイシンを含む

*3: シプロフロキサシンを含む

定量限界: スピラマイシン, ネオスピラマイシンおよびチルミコシン 0.05ppm

クロルテトラサイクリン 0.03ppm

オキシテトラサイクリンおよびテトラサイクリン 0.02ppm

上記以外の動物用医薬品 0.01ppm

表2 魚介類中の動物用医薬品・抗生物質残留検査結果

動物用医薬品 および 抗生物質名	検出頻度 (検出数/検体数)			
	サケ	エビ	ブリ	うなぎ加工品
	刊(7) 国産(1)	ベトナム(3) インドネシア(1) マレーシア(1)	国産(2)	中国(9) 台湾(1)
オキシテトラサイクリン	0/8	0/5	0/2	—
クロルテトラサイクリン	0/3	0/4	0/2	—
テトラサイクリン	0/3	0/4	0/2	—
エンロフロキサシン*1	—	—	—	0/10
オキシリニック酸	0/8	0/5	0/2	0/10
スルファモノメトキシ	0/8	0/5	0/2	0/10

—: 未実施

*1: シプロフロキサシンを含む

定量限界: エンロフロキサシン 0.05ppm

クロルテトラサイクリン 0.03ppm

オキシテトラサイクリンおよびテトラサイクリン 0.02ppm

オキシリニック酸およびスルファモノメトキシ 0.01ppm

3. トータルダイエットスタディによる有機塩素系一日摂取量調査結果

有機塩素系農薬(総BHC, 総DDT, エンドリン, ディルドリン, アルドリン, エンドスルファンおよびヘプタクロル)について, 食生活を通じて一日に摂取する量を推計する目的で, 残留調査を行った。試料は神奈川県内の食品をマーケットバスケット方式で購入し調製した。調査結果を表4-1に示し, 検出値の一日許容摂取量(ADI)に対する摂取割合を表4-2に示した。

検出値(0.6, 0.8ppb)は, 定量下限に近い低濃度であり, 油脂類の一日摂取量²⁾とDDT, エンドスルファン

表3 輸入香辛料、ナッツ類、りんご果汁等のカビ毒検査結果

検体名	検体数	生産地(検体数)	検出頻度(検出数/検体数)	
			アフラトキシン*1	パツリン
香辛料				
ブラックペッパー	3	マレーシア(3)	0/3	—
ホワイトペッパー	3	マレーシア(2), インドネシア(1)	0/3	—
トウガラシ(レッドペッパー)	2	中国(2)	0/2	—
ナツメグ	2	インドネシア(2)	0/2	—
混合品	2	ドイツ(2)	0/2	—
乾燥果実および穀類・豆類				
イチジク	3	トルコ(2), アメリカ(1)	0/3	—
落花生	8	中国(8)	0/8	—
ピスタチオ	8	アメリカ(8)	0/8	—
ポップコーン	3	アメリカ(3)	0/3	—
濃縮果汁およびジュース等				
濃縮りんご果汁	2	中国(1), オーストラリア(1)	—	0/2
りんごジュース	3	中国(1), オーストラリア(1), アメリカ(1)	—	0/3
アップルタイザー	1	南アフリカ(1)	—	0/1

—: 未実施

*1 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を含む

定量限界: アフラトキシンおよびパツリン 0.01ppm

表4-1 トータルダイエットスタディによる有機塩素系農薬一日摂取量調査結果

食品群	総BHC*1	総DDT*2	エンドリン	ディルドリン	アルドリン	エンドスルファン*3	ヘプタクロル*4
I群(米)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
II群(米以外の穀類・種実類・いも類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
III群(砂糖・菓子類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IV群(油脂類)	ND	0.8*5	ND	ND	ND	0.6*6	ND
V群(豆類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VI群(果実類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VII群(緑黄色野菜)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VIII群(その他の野菜類・きのこ類・藻類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IX群(嗜好飲料)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
X群(魚介類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
XI群(肉類・卵類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
XII群(乳・乳製品)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
XIII群(調味料・香辛料類)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
XIV群(水道水)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

単位: ppb

ND: 定量限界未満により不検出 定量限界: 0.5ppb

*1 α-BHC, β-BHC, γ-BHCおよびδ-BHCの総和

*2 op'-DDT, pp'-DDT, op'-DDD, pp'-DDDおよびpp'-DDEの総和

*3 α-エンドスルファン, β-エンドスルファンおよびエンドスルファンスルフェートの総和

*4 ヘプタクロルエポキシドを含む

*5 pp'-DDE

*6 エンドスルファンスルフェート

表4-2 検出された有機塩素系農薬のADIに対する摂取割合

検出された農薬名	検出値 (μg/g)	検出食品群		農薬の 一日摂取量 (μg)	ADI		50kg体重の ADIに対する 摂取割合(%)
		食品群	食品の 一日摂取量 (g)		ADI (μg/kg 体重)	体重50kgの人がADI に達する 一日量(μg)	
DDT	0.0008	IV	10.5	0.0084	5	250	0.0034
エンドスルファン	0.0006	IV	10.5	0.0063	5.7	285	0.0022

のADI³⁾より、体重50kgのヒトのADIに対する摂取割合は0.0022、0.0034%であることから、食品衛生上問題ない濃度レベルと考えられた。

4. 清涼飲料水中のベンゼン実態調査結果

アスコルビン酸と安息香酸を含む清涼飲料水に発ガン性のあるベンゼンが生成する⁴⁾ことが報告されている。報告された中には、WHO飲料水ガイドライン（第3版）のベンゼンに関するガイドライン値10ng/mlを超える例もあった⁴⁾。そこで、神奈川県内に流通する清涼飲料水50検体についてベンゼンの実態調査を行い、併せて安息香酸及びアスコルビン酸について測定を行った。結果は表5-1、5-2に示した。

安息香酸が検出されない検体からはベンゼンは検出されなかった。50検体中23検体に安息香酸ナトリウム等の表示があり、そのすべての検体から0.01g/kg以上の安息香酸が検出された。安息香酸が検出された23検体中、9検体からベンゼンが検出され、そのうち4検体は16~130ng/mlの濃度範囲でガイドライン値を超えて検出された。10ng/mlを超えて検出された検体はサワー用の炭酸飲料およびレモン果汁で、いずれももうすめて飲用されるものであった。一方、安息香酸とアスコルビン酸が両方検出されたが、ベンゼンが検出されなかったものが4検体あった。

調査を行った検体からはベンゼンの生成量と安息香酸、アスコルビン酸の存在量との相関は見られなかった。ベ

表 5 - 1 清涼飲料水中のベンゼン等実態調査結果

検体名	検体数	ベンゼン		安息香酸		アスコルビン酸	
		検出頻度	検出濃度 (ng/ml)	検出頻度	検出濃度 (g/kg)	検出頻度	検出濃度 (g/kg)
炭酸飲料	16	7/16	1.5~130	13/16	0.08~0.52	8/16	0.004~2.1
レモン果汁	2	1/2	16	2/2	0.09~0.18	2/2	0.41~0.47
清涼飲料水（炭酸飲料，茶類を除く）	14	1/14	9.0	8/14	0.03~0.41	9/14	0.058~1.8
茶類（緑茶・烏龍茶・紅茶・ブレンド茶等）	17	0/17	ND	0/17	ND	17/17	0.03~0.47
リキュール類	1	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND

検出頻度：検出数/検体数

ND：定量限界未満

定量限界：ベンゼン1ng/ml, 安息香酸0.01g/kg, アスコルビン酸0.025g/kg

表 5 - 2 安息香酸が検出された清涼飲料水中のベンゼン，安息香酸，アスコルビン酸の濃度

検体名	表示	ベンゼン (ng/ml)	安息香酸 (g/kg)	アスコルビン酸 (g/kg)
炭酸飲料（サワー用）	ビタミンC, レモン	130	0.08	ND
炭酸飲料（サワー用）	レモン果汁	81	0.36	ND
炭酸飲料（サワー用）	レモン果汁	42	0.32	ND
炭酸飲料（サワー用）	レモン果汁	6.7	0.52	ND
炭酸飲料（サワー用）	レモン果汁	2.2	0.16	0.10
清涼飲料水（カクテル用）	ビタミンC	9	0.29	0.28
清涼飲料水（カクテル用）	ライム果汁	ND	0.41	0.06
レモン果汁	レモン, ビタミンC	16	0.18	0.47
レモン果汁	レモン	ND	0.09	0.41
炭酸飲料	レモン	9.3	0.43	ND
炭酸飲料	—	1.5	0.49	ND
炭酸飲料	レモン	ND	0.32	0.32
炭酸飲料	—	ND	0.24	ND
炭酸飲料	—	ND	0.15	ND
炭酸飲料	—	ND	0.15	ND
炭酸飲料	レモン	ND	0.15	ND
炭酸飲料	—	ND	0.15	ND
清涼飲料水	—	ND	0.23	ND
清涼飲料水	—	ND	0.23	ND
清涼飲料水	—	ND	0.13	ND
清涼飲料水	レモン, ビタミンC	ND	0.08	0.63
清涼飲料水	—	ND	0.04	ND
清涼飲料水	—	ND	0.03	ND

—: ビタミンC, レモン果汁等の表示なし

ND: 定量限界未満

ンゼンの生成には熱、pH、紫外線、金属イオンの存在が関係するという報告⁴⁾があるが、今回の結果からも、安息香酸やアスコルビン酸の存在のほかに、清涼飲料水の製造、流通過程における保存温度等のさまざまな因子が関係していることが示唆された。

今回、高濃度で検出された検体は、うすめて飲用してもガイドライン値を超える可能性がある。しかし、ヒトにおけるベンゼン摂取源の大半が大気等による環境由来であり、一時的に摂取したとしても、環境由来のリスクに比べて飲用によるリスクは低いものと考えられている⁵⁾。また、ベンゼンの濃度が10ng/mlを超えた製品については、厚生労働省が事実の公表、製品の回収、改良を行うよう要請しており、業界団体も製造業者に対して製造方法の改善及び成分の変更を行うよう指示を行っている⁵⁾。本件の事例でも業者に対して行政側での指導が行われており、今後は高濃度の検出事例は少なくなるものと考えられる。

なお、本調査は県保健福祉部生活衛生課の事業であり、県内保健所の専門監視員の協力により行ったものである。
(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) 佐藤久美子, 赤星 猛, 林 孝子, 甲斐茂美, 中村 廣志, 藤巻照久: 食品汚染物質残留実態調査結果 (平成18年度), 神奈川県衛生研究所報告, 37, 81-84 (2007)
- 2) 健康・栄養情報研究会編: 平成16年国民健康・栄養調査報告, 第一出版, p65
- 3) 農薬等ADI関連情報データベース, 国立医薬品食品衛生研究所
- 4) ソフトドリンク中のベンゼンについて (「食品安全情報から」抜粋), 国立医薬品食品衛生研究所 (2006年7月31日)
- 5) 清涼飲料水中のベンゼンに関するQ&A, 厚生労働省 (2006年7月28日)

資料

ミネラルウォーター中の全有機炭素 (TOC) 調査結果

長谷川一夫, 岩淵真樹

The concentration level of Total Organic Carbon (TOC) in mineral water

Kazuo HASEGAWA and Masaki IWABUCHI

水中の有機物の指標として全有機炭素 (TOC), 化学的酸素要求量 (COD), 生物学的酸素要求量 (BOD), 過マンガン酸カリウム消費量等が知られている¹⁾. この中で, 水道原水及び浄水等については, TOCが水中の有機物の指標として最も有効であることが報告されている²⁾. 平成16年4月1日施行の水道水質基準改正では, 過マンガン酸カリウム消費量の代わりにTOCが基準に加えられ, 5mg/Lの基準値が定められた³⁾.

一方, 水源汚染, 消毒副生成物の発ガン性等の水道水に対する安全性や味の問題から, ミネラルウォーターの需要が年々増加してきている⁴⁾. ミネラルウォーターは水道法ではなく食品衛生法の規制をうけるが, その規格基準では, 原水だけに過マンガン酸カリウム消費量の基準値が設定されている⁵⁾. しかし, 原水の有機物汚染だけでなく, 製造工程, 輸送時及び容器等からの有機物汚染も考えられる. TOCはこれらの判別に有用と思われるが, ミネラルウォーター中のTOCの報告はほとんどない. そこで, 我々はミネラルウォーター中のTOC調査を行った.

試料は県内に流通している国産及び外国産のミネラルウォーターで, 平成16年7月から平成20年4月までに入手した72試料 (日本産43試料, 外国産29試料) を用いた. 試料番号は入手順にNoをつけた. 測定は前報⁶⁾ に示した方法及び条件に従って実施した.

ミネラルウォーターのTOC測定結果と原産国を表1に示した. 平均濃度は全体が0.192mg/l, 日本産は0.161mg/l, 外国産は0.237mg/lであり, 外国産に高い

傾向が見られた. 濃度範囲は日本産が0.03~0.35, 外国産が0.09~0.52mg/lであった. 0.11~0.20 mg/lの濃度範囲ものが日本産24試料, 外国産13試料と最も多く, 各々の割合を求めると56%, 45%となった. すなわちこの濃度範囲に約50%前後の試料が存在した. 今回の結果と神奈川県企業庁の水道水のTOC⁷⁾と比較すると, 相模川を水源とする浄水の年間測定値0.5~1.0 mg/lより低く, 箱根の地下水源 (5カ所) の年間測定値0.1未満~0.3 mg/lと同程度であった. 前報で⁶⁾ TOC測定条件に影響を及ぼすことを報告した炭酸入り試料はすべて外国産であった.

表2に同一銘柄でロット別及び同一ロット容器別のTOC測定結果を示した. 同一ロット容器別の結果は変動係数3.5%であり, 繰り返しの測定誤差内と考えられた. したがって, 同一ロットであれば容器間の差はないと推定された. ロット別の結果は0.06~0.14 mg/lの範囲で変動し, この銘柄ではロット間に差があることが分かった. ミネラルウォーターは, 原水の水質変動, 水源の違い, 採取, 製造, 輸送及び容器の汚染等の要因によりTOC濃度が変化する可能性が考えられた.

次に, ミネラルウォーター33試料についてTOCと過マンガン酸カリウム消費量を測定して, 両者の関係を図1に示した. その結果, 相関係数は0.0832でTOCと過マンガン酸カリウム消費量の相関は認められなかった. TOC及び過マンガン酸カリウムが高い値を示す河川水⁸⁾やプール水⁹⁾の場合は両者に非常に高い相関が, また, 水道水²⁾でもTOCが高い場合には過マンガン酸カリウムとの相関が報告されている. TOCは有機物量を正確に測定することが可能であるが, 過マンガン酸カリウム消費量は無機の被酸化物の存在で正の誤差を生じる. また分解力が弱い測定できない有機物が多くあることが知られている^{1), 2)}. 今回のようにTOC濃度が低い場合には, これらの影響を受け相関が認められなかったことが推察される. したがってミネラルウォーター中の有機物汚染の指標としてTOCは過マンガン酸カリウム消費量より有用と考えられる.

(平成20年7月28日受理)

文献

- 1) 上水試験方法解説編2001年版, 日本水道協会, 東京 (2001)
- 2) 平成14年度厚生科学研究・分担研究報告「WHO飲料水ガイドライン改訂等に対応する水道化学物質等に関する研究」: 過マンガン酸カリウム消費量と全有機炭素の関係について <<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/04/s0421-4a.htm>>

表1 ミネラルウォーター中のTOC濃度

No.	TOC (mg/l)	原産国	No.	TOC (mg/l)	原産国	No.	TOC (mg/l)	原産国
1	0.17	日本	25*	0.12	イタリア	49	0.09	日本
2	0.15	日本	26*	0.24	イタリア	50	0.07	日本
3	0.13	日本	27	0.35	アメリカ	51	0.14	日本
4	0.06	日本	28	0.20	カナダ	52	0.17	日本
5	0.22	日本	29	0.14	フランス	53	0.16	日本
6	0.30	日本	30	0.14	フランス	54	0.23	日本
7	0.30	日本	31	0.19	日本	55	0.16	日本
8	0.09	韓国	32	0.24	日本	56	0.31	カナダ
9	0.22	中国	33	0.13	日本	57	0.12	日本
10	0.28	フランス	34	0.50	イタリア	58*	0.19	イタリア
11	0.20	ベルギー	35	0.48	フランス	59	0.17	日本
12	0.10	イタリア	36*	0.21	ドイツ	60	0.20	日本
13*	0.33	ドイツ	37	0.13	イギリス	61	0.24	日本
14*	0.53	英国	38*	0.15	フランス	62	0.19	日本
15*	0.22	フランス	39	0.11	イタリア	63	0.07	日本
16	0.16	日本	40	0.12	韓国	64	0.16	日本
17	0.14	日本	41	0.18	アメリカ	65	0.22	日本
18	0.03	日本	42	0.17	アラブ 首長国連邦	66	0.14	日本
19	0.13	日本	43	0.49	カナダ	67	0.16	日本
20	0.35	日本	44	0.13	日本	68	0.10	日本
21	0.13	日本	45	0.07	日本	69	0.28	日本
22	0.10	日本	46	0.12	日本	70	0.14	日本
23	0.15	日本	47	0.07	日本	71	0.28	ドイツ
24	0.12	アラブ 首長国連邦	48	0.22	日本	72*	0.31	ドイツ
平均値		0.192mg/l(全体 n=72)	0.161mg/l(国産 n=43)		0.237mg/l(外国産 n=29)			

* : 炭酸入り、発泡性等の表示有り

表2 ミネラルウォーターのロット別及び同一ロット容器別のTOC測定結果

ロット別のTOC濃度		同一ロット容器別のTOC濃度		
ロットNo.	TOC濃度 (mg/l)	ロットNo.	容器No.	TOC濃度 (mg/l)
A	0.10	F	1	0.146
B	0.07	F	2	0.140
C	0.06	F	3	0.136
D	0.09	F	4	0.146
E	0.11	F	5	0.136
F	0.14	変動係数(%)		3.5

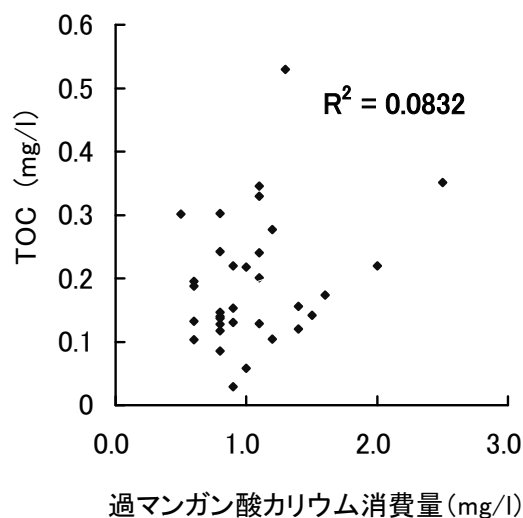


図1 TOCと過マンガン酸カリウム消費量の関係 (n=33)

- 3) 厚生労働省令第101号 (2003), 平成15年5月30日
- 4) 日本ミネラルウォーター協会: ミネラルウォーター類各種統計 (各年1-12)
<<http://www.minekyo.jp/sub3.htm>>
- 5) 厚生省告示第370号 (1959), 昭和34年12月28日
- 6) 岩淵真樹, 長谷川一夫: ミネラルウォーター中の全有機炭素 (TOC) の分析方法の検討, 神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 20-23 (2007)
- 7) 平成17年度県営水道の水質 (第27集), 神奈川県企業庁水道電気局, 神奈川 (2005)
- 8) 合田悟ほか: 燃焼酸化赤外線分析法による水中の全有機炭素(TOC)分析法の検討, 北海道立衛生研究所報, 54, 47-49 (2004)
- 9) 長谷川一夫, 内藤昭治: 水泳プール水の水質項目間の関係, 用水と廃水, 32, 121-127 (1990)

他誌掲載論文抄録

(平成19年4月～平成20年3月)

Mycoplasma pneumoniae isolated from patients with respiratory infections in Kanagawa prefecture in 1976-2006: Emergence of macrolide-resistant strains

(神奈川県における1976～2006年の肺炎マイコプラズマ分離状況：特にマクロライド耐性株の出現について)

岡崎則男, 大屋日登美 (神奈川県衛研), 佐々木次雄 (国立感研), Jpn. Infect. Dis., 60, 325-326 (2007)

神奈川県において, 1976～2006年までに検査した咽頭スワブ2,414件中, 肺炎マイコプラズマ分離陽性は585件(陽性率24.2%)で, 1990年代前半まで見られた肺炎マイコプラズマ分離数と分離率の4年周期性ピークは, それ以降消失した。1986年～2006年に分離された肺炎マイコプラズマのEM, JM, TCおよびMINOに対する感受性を調べた結果, 1998年以前の分離株296株中にこれらの薬剤に対する耐性菌は認められなかったが, 2003年以降, EMおよびJM等のマクロライド系薬剤に耐性を示す株が分離され始めた。2003年～2006年までの分離株85株中15株(17.6%)がマクロライド耐性で, これらの耐性株の23S rRNA遺伝子ドメインV領域の塩基配列を調べたところ, 2063位あるいは2064位のアデニンがグアニンに置換する点変異(A2063GまたはA2064G)が認められた。神奈川県以外の地域でも, 2000年以降マクロライド耐性肺炎マイコプラズマが分離されている(3,4)ことから, 国内では2000年以降, このような耐性菌が急増したものと推察される。

VNTR法を利用した*Legionella pneumophila*の遺伝子型別

渡辺祐子 大屋日登美 高橋智恵子 岡崎則男 (神奈川県衛研) 感染症誌, 81, 669-674 (2007)

髄膜炎菌性髄膜炎は全国の年間届け出数が10～20例と少なく, 稀な感染症のため菌株の収集が難しく薬剤感受性に関する報告が少ない。そこで1990年から2004年までに収集した髄膜炎菌100株の薬剤感受性を主要治療薬12薬剤について調査した。その結果, PC系薬剤に対して中等度耐性を示す株が2株検出されたが耐性株は検出されなかった。しかし, 予防内服に使用されるCPFXに耐性株が3株検出された。これらの結果から今後とも, 薬剤感受性調査の動向把握が必要と考えられた。

HIV検査相談体制について—HIV即日検査の導入から普及まで—

今井光信, 嶋 貴子, 須藤弘二, 宮崎裕美, 近藤真規子 (神奈川県衛研) 保健医療科学, 56(3), 203-209, 2007

HIV検査相談は, 効果的なエイズ対策を進めるうえで極めて重要な役割を担っている。しかしながら, 保健所等の行政機関で行われている検査数は, 1990年代半ばより減少し続け, 大きな問題となっていた。我々は各行政機関との協力により, 今までの検査体制に加え, 休日検査, 夜間検査, 即日検査等のより受けやすいHIV検査相談の導入と普及に努めている。HIV即日検査は2003年1月に保健所検査に初めて試験的に導入され, 大幅な受験者増に繋がることが実証された。その後即日検査を実施する保健所が徐々に増え, 2006年末には全体の45%の保健所で実施されるまでに普及した。その結果, 長年にわたり減少または横這いの状況が続いていた受験者数が2003年以降は増加傾向に転じ, 2006年末の受験者数は2002年のおよそ2倍にまで増加した。しかし, 受験者数が増加傾向に転じたとはいえ, HIV検査相談体制の今後の課題も明らかになってきている。本論文ではより効果的なHIV検査相談体制の確立のために行ってきたこれまでの取り組みと, 今後の課題について論じている。

日本におけるHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ

藤崎誠一郎, 藤崎彩恵子, 伊部史朗, 金田次弘 (名古屋医療センター) 浅 黄司, 伊藤俊広(仙台医療センター), 吉田 繁 (北海道大学病院検査部), 小池隆夫 (北海道大学医学部), 大家正泰(新潟大学), 渡邊香奈子 (新潟保健環境科学研究所), 正兼亜季, 上田幹夫 (石川県立中央病院), 瀧永博之, 岡 慎一 (国立国際医療センター), 松田昌和 (国立感研), 貞升健志, 長島真美 (東京都健康安全センター) 岡田清美 (北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所), 近藤真規子 (神奈川県衛研), 秦 真美(愛知県衛研), 溝上泰司, 白坂琢磨 (大阪医療センター), 森 治代 (大阪府公衛研), 南 留美(九州医療センター), 杉浦 互(国立感研)

日本エイズ学会誌, 9, 136-146 (2007)

HIV感染者において薬剤耐性検査は, 有効な薬剤治療

を行うために重要であり、HIV遺伝子の薬剤耐性変異を解析するgenotype検査が2006年4月より保険適用されるようになった。我々は、日本で薬剤耐性検査を実施している主な施設、15施設について、検査手順の精度と信頼性を調べることを目的としてバリデーションを実施した。その結果、HIV-1遺伝子型薬剤耐性検査の質は、正解率が97.3%と、非常に高いことが明らかとなった。エラーの原因は、不適切なプライマーの使用、エレクトロフォレグラムの乱れ、人為的エラーが存在することがわかった。日本で実施されているHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査の水準をより一層向上させる為に、今回明らかになった問題に対してトラブルシューティングを提案した。

インフルエンザの迅速診断—「鼻かみ液」検体の可能性

三田村敬子（永寿総合病院）、清水英明（川崎市衛研）、渡邊寿美（神奈川衛研）、川上千春（横浜市衛研）、菅谷憲夫（けいゆう病院）、臨床検査、52、41-45（2008）

インフルエンザ迅速診断キットの検体として、患者に鼻をかませて採取した「鼻かみ液」が使用可能かどうか検討した。ウイルス分離と比較した感度は、鼻咽頭拭い液に比べてやや低いが、A型で86%、B型で77%と良好な数値であった。鼻かみ液の量が少ない場合には検出率が低くなるため、検体量の確認をすることが必要である。鼻かみ液の採取は、侵襲もなく痛みも伴わないため採取は円滑に行われ、有用な検体であると考えられる。

蛍光酵素免疫測定法による新しいHIV抗原抗体同時検出試薬（第4世代）の検討

嶋 貴子、須藤弘二、近藤真規子、今井光信（神奈川衛研）、倉井華子、相楽裕子（横浜市立市民病院）
感染症学雑誌、81(5)、562-572（2007）。

ELFA法を原理とした第4世代のHIV抗原抗体同時検出試薬バイダスアッセイキットHIVデュオII（以下バイダスデュオII）の評価を行った。HIV抗体陽性血漿95検体、HIV陰性血漿1228検体を検討した結果、感度100%、特異性99.8%であった。各ジェノタイプとの反応性はHIV-1グループMに含まれるサブタイプA、B、C、D、A/E、F、G、B/D、グループO、HIV-2は全て検出可能であった。HIV-1p24抗原検出感度は5pg/mlであり、他の抗原抗体同時検出試薬に比べ高いことがわかった。感染初期セロコンバージョンパネル血清での検討により、バイダスデュオIIは他の抗原抗体同時検出試薬と同等あるいはより早い時期からの検出が可能であった。また、バイダスの従来品では検出できなかった抗IgM抗体の検出も可能となり、セカンドウィンドウ期が解消されている

ことが確認できた。以上の結果から、バイダスデュオIIはHIVスクリーニング検査法として十分な感度、特異性を有するとともに感染初期検出にも優れており、有用であることが分かった。

Enterovirus detection status of patients with herpangina and hand, foot and mouth disease in epidemic season 2007, Kanagawa Prefecture, Japan （2007年神奈川県におけるヘルパンギーナ、手足口病患者からのエンテロウイルス検出状況）

佐野貴子、齋藤隆行、近藤真規子、渡邊寿美、尾上洋一（神奈川衛研）、近内美乃里、佐藤善博、折原直美（神奈川県感染症情報センター）、Jpn.J.Infect.Dis., 61, 162-163（2008）

2007年の神奈川県域（横浜市、川崎市を除く）におけるヘルパンギーナの週別患者報告数は、第25週に定点当たり1.0人を超え、第30週に6.82人とピークを迎えたが、第35週においても1.35人と流行が続いている。一方、手足口病の週別患者報告数は、第27週に定点当たり1.0人を越え、第30週に3.05人と比較的中規模なピークを迎え、第33週には定点当たり1.0を下回った。しかし地域によって局地的流行が見られ、小田原地区では第17週から定点当たり1.0人前後と継続的に流行が見られ、第30週には8.50人とピークを迎えた。ヘルパンギーナ患者からは、コクサッキーウイルス（C）A10型が14株、A5型が2株、A16型が1株、B2型が1株、B5型が2株、エンテロウイルス以外では単純ヒトヘルペスウイルス1型（HSV-1）が2株分離された。このことから今シーズンのヘルパンギーナ流行の主因ウイルスはCA10と推測された。手足口病患者検体からは、エンテロウイルス（EV）71型が19株、CA16が10株、CA10が4株、CA5が1株、エンテロウイルス以外ではCA16との重複感染でアデノウイルス2型が1株、ワクチン接種後に分離されたポリオウイルス1型が1株分離された。このことから今シーズンの手足口病流行はEV71とCA16による混合流行と推測された。

Detection of the rotavirus A genome from the cerebrospinal fluid of a gastroenteritis patient :A case report

（胃腸炎患者髄液からのA群ロタウイルス遺伝子検出：一症例）

古屋由美子、片山 丘、宮原香代子（神奈川衛研）、小林明日香、船曳哲典（藤沢市民病院）、Jpn.J.Infect.Dis., 60, 148-149（2007）

2006年4月に感染性胃腸炎を発症後、脳炎症状を示し

た症例があった。この患者の便、髄液および咽頭ぬぐい液を調べたところ、すべてからA群ロタウイルス遺伝子が検出され、血清型はG3であった。また便の電子顕微鏡観察によりロタウイルス粒子が確認された。これらの結果と患者の症状および経過から、この症例はロタウイルスによる急性脳炎と診断された。髄液中にロタウイルスRNAが認められた急性脳炎・脳症のうち、多くの場合は後遺症なく軽快しているが、発達障害や麻痺を残すなど重篤な神経学的後遺症を残した例も報告されており、A群ロタウイルスが流行している時期の胃腸炎発症後の髄膜炎患者について、髄液のA群ロタウイルス検査が必要であると思われた。

食品添加物の不溶性鉱物性物質から食品擬似溶媒への重金属元素の溶出挙動

藤巻照久（神奈川衛研）、天笠高志（星葉大）、堀江正一（埼玉衛研）、伊藤理恵、斉藤貢一、中澤裕之（星葉大）、分析化学、56、1197-1203（2007）

試料として活性白土、酸性白土、グリーンタフ、花こう斑岩、タルク、ベントナイト、珪藻土、パーライトの8種類の既存添加物を用い、材質試験及び溶出試験を行った。不溶性鉱物性物質を構成する主要な元素は、Siで約7割の含有量であった。次いでAl、Fe、Na、Caなどが比較的多く存在していた。また、タルク以外の不溶性物質からAs、Pb、Cdの含有が認められた。

エタノール及び酢酸を含有する食品擬似溶媒を用いてAs、Pb、Cr、Cd、及びHgの溶出試験を検討した結果、いずれの不溶性鉱物性物質との組合せにおいてもCd及びHgは検出されなかった。

液状食品の製造工程で珪藻土を濾過助剤として使用する場合、AsやPb等の溶出が示唆された。しかし、今回の検討では特に食品衛生上、問題ないと考えられた。

畜水産物中動物用医薬品スクリーニング分析法としての高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法の検討

甲斐茂美、赤星猛、藤巻照久、伊藤伸一（神奈川県衛生研究所）、金澤秀子（共立薬科大学）、分析化学、56、12、1105-1113（2007）

畜水産物中に残留する動物用医薬品のスクリーニング分析について、イオントラップ機能を有す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）の活用を検討した。MS/MS条件はポジティブ及びネガティブモード、LC条件はカラムにCadenzaCD-C18を、移動相に0.1%ギ酸-アセトニトリル系を用いて分析した。試料はアセトニトリル/アセトニトリル飽和n-ヘキサンで

抽出し、OasisHLBカートリッジカラムにより精製した。44種の動物用医薬品を対象に検討を実施したところ、高感度プロダクトイオンキャン（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、またマルチプルリアクションモニタリング（MRM）分析により高感度な分析が可能となった。ポジティブリスト制度施行に際し、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による分析は有用な手段であり、動物用医薬品のスクリーニング検査に適用できることがわかった。

HPLCによる食品中の9種保存料の分析

岸 弘子、山田利治（神奈川衛研）

食品衛生学雑誌、48、58-63（2007）

食品中の保存料9種の分析法の検討を行った。固体食品はメタノールで抽出し、5 mmol/Lクエン酸緩衝液（pH 4.0）を加えてOasis HLBに負荷し、メタノール溶出液を安息香酸、ソルビン酸およびデヒドロ酢酸測定用試験溶液とした。さらに、メタノール溶出液の一部をBond Elut PSAに負荷し、その通過液をパラオキシ安息香酸エステル類測定用試験溶液とした。液体食品は5mmol/Lクエン酸緩衝液を加えてOasis HLBに負荷し、以下同様に操作した。10種類の食品に各保存料を0.01および0.10 g/kgとなるように添加したときの回収率は76.4~107.4%、定量限界は各々0.005g/kgであった。

Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products

（ビーフン中に混入した安全性未承認の遺伝子組換え米の検出）

穂山浩（国立衛研）、佐々木伸大（東京農工大）、坂田こずえ（国立衛研）、大森清美（神奈川衛研）、豊田安基江（広島県総技研）、菊池裕、渡邊敬浩（国立衛研）、古井聡、橘田和美（国立食総研）、米谷民雄（国立衛研）、Journal of Agricultural and Food Chemistry、vol.55、No.15、5942-5947（2007）

我々は、4種のビーフンから抽出したDNAフラグメントの分析を行った。殺虫活性を示すBacillus thuringiensis (Bt) 米は、GM Shanyou 63系統と類似したコンストラクトをもつ。このBt系統はいくつかのビーフン中で検出され、CryIAcタンパク質のコード領域配列とNOS terminator配列の境界領域およびコメActin I promoter 配列とCryIAcタンパク質のコード領域配列の境界領域が特定された。加えて、我々は異なるBtコメ系統を、いくつかのビーフン中で、トウモロコシubiquitin promoter と cry 1 Ab の境界領域およびcauliflower

mosaic virus 35S promoterとhygromycin phosphotransferaseの境界領域で検出した。したがって、我々は、ビーフサンプルの中に、2種の遺伝子組換えBtコメ系統のコンタミネーションをはじめて検出した。更に、我々は、duplex real-time PCR法を用いて、両Btコメ系統を同時に検出する方法を開発した。

トウモロコシ加工食品からのイオン交換樹脂タイプキットを用いたDNA抽出精製法の検討

大森清美, 土屋久世 (神奈川衛研), 渡邊敬浩, 穂山浩, 米谷民雄 (国立衛研), 山田利治, 伊藤伸一, 佐藤修二 (神奈川衛研), 食品衛生学雑誌, 49, 45-50 (2008)

安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシCBH351の検知法において、DNA回収が困難なトウモロコシ加工食品からのイオン交換樹脂タイプキットを用いたDNA抽出精製法を検討した。コーンフレークおよびジャンボコーンについては、粉碎試料4gを採取し、KNG-Gtip法を用いてDNAの抽出精製を行うことにより、現行法である厚生労働省通知法またはJAS分析試験ハンドブック法に比べDNA試料原液の濃度は増大し、Zein遺伝子の検出率も向上した。

Rapid and sensitive determination of tryptophan, serotonin and psychoactive tryptamines by thin-layer chromatography/fluorescence detection.

(迅速で高感度な蛍光検出による薄層クロマトグラフィーのトリプトファン、セロトニン及び幻覚系トリプタミン化合物の分析法)

Kato N*, Kojima T, Yoshiyagawa S*, Ohta H*, Toriba A*, Nishimura H*, Hayakawa K*.

* : 神奈川県警察本部科学捜査研究所

J Chromatogr A. 2007; 1145 (1-2) : 229-233.

トリプタミン、セロトニン及び幻覚系トリプタミン化合物の迅速、簡易、高感度の分析法を蛍光検出による薄層クロマトグラフィーで検討した。これらの化合物は塩酸、過酸化水素や塩化第2鉄試液を噴霧し加熱後、紫外線 (365nm) 照射により青色系蛍光を発する。トリプタミン、セロトニン及び幻覚系トリプタミン化合物の検出限界は 0.01から0.06マイクログラムであった。本法は幻覚系トリプタミン化合物の粉末や乱用者の尿サンプルに応用できる。

Determination of (R)-xanthoanthrafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement

(強壮・強精効果を標榜した健康食品より検出された(R)-キサントアントラフィルの分析)

熊坂謙一, 土井佳代, 小島尚(神奈川衛研), 川原信夫, 合田幸広(国立医薬品食品衛生研究所), Chem. Pharm. Bull., 56, 227-230 (2008)

強壮・強精効果を標榜する健康食品より初めて検出された、キサントアントラフィルの分析事例を報告する。当該製品のメタノール抽出液について、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー及び液体クロマトグラフィー-質量分析計により、含有医薬品成分の分析を行った。その結果、既存の医薬品成分とは異なる化合物の含有が推定された。そのため、本成分を単離・精製し、NMR測定、旋光度の測定を行った結果、過去に医薬品として開発過程にあり、また、ホスホジエステラーゼ-5阻害作用を有する化合物FR226807であることが判明した。また、本化合物の名称について、新たに「(R)-キサントアントラフィル ((R)-xanthoanthrafil)」と命名した。

Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptide (ラン藻由来の環状ペプチドの微生物分解)

加藤 創, 今西 進 (名城大学), 辻 清美 (神奈川衛研), 原田健一 (名城大学), Water Research 41, 1754-1762 (2007)

津久井湖より単離されたミクロシスチン分解菌B-9によるラン藻由来の環状ペプチドの分解性を検討した。B-9株抽出液による環状ペプチドとノジュラリンについて分解挙動をLC/ITMSを用いて観察した。B9株はペプチド結合の加水分解により、これらの環状ペプチドを分解した。この細菌は構造的に異なる環状ペプチドに対しても加水分解活性を有していることが判明した。これは有害な環状ペプチドの無毒化に効果的であることが示された。

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health No.38 (September, 2008)

CONTENTS

Short reports

Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease

Analysis of fecal indicator bacteria in estuary area.

Toshiro KUROKI, Kumiko ITO, Tomoe ISHIHARA and Yoichi ONOUE 1

Epidemiological study of *Campylobacter* isolated from patients with sporadic diarrhea
in Kanagawa Prefecture

Kumiko ITOH, Tomoe ISHIHARA and Toshiro KUROKI 4

Analysis of norovirus in Kanagawa Prefecture.

Takashi KATAYAMA, Kayoko MIYAHARA and Yumiko FURUYA 8

Detection of human metapneumovirus from respiratory tract infection

Sumi WATANABE and Takayuki SAITO 12

Genotyping of *Legionella pneumophila* by using variable number of tandem repeat analysis

Yuko WATANABE, Chieko TAKAHASHI, Hitomi OHYA and Norio OKAZAKI 15

Surveillance study to assure safety of food products and medicine

Incidence of histamine-producing bacteria in cut fish

Yoshimi DATE, Ichiro FURUKAWA, Katsuhiko AIKAWA, Yoshio ASAI and Yoichi ONOUE 19

Measurements of contents of caffeine and theobromine in chocolate products and chewing gums

Hiroko KISHI 23

Analysis of emulsifier, polysorbate in foods

Hiroko KISHI 26

Characteristic of the processed food in the analysis of the genetically modified organisms
and the trend of the analytical results

— Investigation on the qualitative and quantitative analysis of genetically modified foods
in Kanagawa Prefecture (2007) —

Kiyomi OHMORI, Aki HATTORI, Hiroko WATANABE, Haruko SEKIDO and Hiroko KISHI 30

Analysis of artificial colorant in foods using liquid chromatography/mass spectrometry

Haruko SEKIDO, Hiroko KISHI 35

Analysis of pesticide residues in agricultural products by liquid chromatography with tandem
mass spectrometry

Takako HAYASHI, Teruhisa FUJIMAKI, Shin-Ichi ITOH 39

On the method for determination of metals in mineral water by ICP-MS

Masaki IWABUCHI and Kazuo HASEGAWA 44

Surveillance study on the safety of living

Isolation of *Legionella* spp. from soil surrounding hot spring wells

Tamaki ISHINO, Rie ANDO, Yoko YAMAMOTO and Tadayuki OKITSU 47

Analytical method of 2,2'-Methylenebis(6-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)
phenol) in cosmetics with HPLC

Fumi NAKANO, Shinsuke KAWAI, Nobuo SATO and Takashi KOJIMA 51

Surveillance study on healthy enhancement and prevention of diseases

The effectiveness of lecture on the prevention of drug abuse at a high school

— A review using statistical technique —

Yoshihiro SATO, Naomi ORIHARA and Takashi KOJIMA 55

The conscious of high school students regarding lectures on prevention of drug abuse

— A review using a statistical approach —

Naomi ORIHARA, Yoshihiro SATO and Takashi KOJIMA 59