

ISSN 2433-5819

研 究 年 報

平成 29 年度

第 1 号

ANNUAL REPORT
OF
OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.1
(2017)

はじめに

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 (OIPH) は、大阪府立公衆衛生研究所と大阪市立環境科学研究所の衛生部門を統合し、平成 29 年 4 月 1 日に発足しました。

当研究所はその名の通り、地域住民の健康と生活の安全を脅かす様々な事象の原因を明らかにし、その成果を社会に還元することにより、人々の命を守るという重要な役目を担う機関です。そのためには、普段から技術力、調査研究能力の維持、向上に努めることが重要で、学会発表や論文発表を通してその成果を公表します。

本研究年報は、平成 28 年度に旧大阪府立公衆衛生研究所並びに旧大阪市立環境科学研究所が取り組んだ成果をまとめています。当研究所としては初めての研究報告書となります。継続的に実施している研究報告としては、インフルエンザ、ノロウイルスや細菌による食中毒などがあります。各種食品中の残留農薬をはじめとする様々な化学物質を検出し、それらの解析結果を報告しました。生活環境中の汚染物質の検出法の検討等を行い、住民の安全、安心の確保に努めました。その他、新たなテーマにも取り組み、将来的に予測される危機事象の対応に寄与できる研究も実施しました。

本年度に入ってから、北朝鮮の核実験、腸管出血性大腸菌 O157 による広域的な食中毒、梅毒患者の急増など国内外で人々を不安に陥れる事象が発生しています。当研究所では、突発的な危機事象に対応すべく、地道な調査・研究を積み重ねてまいりますので、温かい目で見守っていただければ幸いです。

平成 30 年 1 月

地方独立行政法人
大阪健康安全基盤研究所
理事長 奥野良信

目 次

報 文

大阪府におけるエンテロウイルスおよびヒトパレコウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2016 年度)	
中田恵子, 弓指孝博, 久米田裕子	1
大阪府における食中毒事例から検出されたノロウイルスの流行状況と分子疫学的解析 (2016 年度)	
高田利香, 左近直美, 中田恵子, 本村和嗣, 弓指孝博	10
大阪府内における 2016/17 シーズンのインフルエンザ流行状況	
森川佐依子, 廣井聡, 弓指孝博	20
大阪府における蚊媒介性ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2016 年度)	
青山幾子, 山元誠司, 山口敬治, 石川温子, 弓指孝博	29
魚介類中メチル水銀のフェニル誘導体化 GC/MS 分析法の妥当性確認	
柿本幸子, 吉光真人, 阿久津和彦, 清田恭平, 藤原拓也, 昌山 敦, 高取 聡, 渡邊敬浩, 梶村計志, 山野哲夫	36
2007~2016 年度に実施した輸入柑橘類中の防かび剤の検査結果	
福井直樹, 北川陽子, 高取 聡, 柿本幸子, 小阪田正和, 柿本 葉, 山口聡子, 吉光真人, 阿久津和彦, 東恵美子, 梶村計志	41
農産物中の残留農薬の検査結果 (平成 28 年度)	
北川陽子, 東恵美子, 小阪田正和, 吉光真人, 福井直樹, 阿久津和彦, 梶村計志	47
新規脂質除去剤による分散固相抽出法を用いたホルモン剤分析法の構築と妥当性評価	
永吉晴奈, 柿本健作, 山口瑞香, 内田耕太郎, 吉田優子, 梶村計志	57
畜産物中の有機塩素系農薬の新規分析法の確立	
柿本健作, 永吉晴奈, 山口瑞香, 吉田優子, 徳永佑亮, 北川陽子, 小西良昌, 梶村計志	63
水道水中テフリトリオンの液体クロマトグラフィー質量分析法の検討と妥当性評価	

高木総吉, 安達史恵, 吉田 仁, 小林憲弘	67
水質検査における外部精度管理 (2015 年度) —銅及びその化合物— 吉田 仁, 木村明生	73
大阪府内 30 浄水場における浄水処理対応困難物質の存在実態 吉田 仁, 高木総吉, 安達史恵, 小泉義彦, 中島孝江, 木村明生	80
アゾ染料に由来する 2 種の特定芳香族アミンの分析における回収率の検討 味村真弓, 小泉義彦, 大山正幸, 吉田俊明	85
繊維製品に含まれるトリス (1-アジリジニル) ホスフィンオキシド (略称: APO) の分析法 の改定に向けた検討 味村真弓, 中島晴信, 河上強志, 伊佐間和郎	93
大阪府における環境および食品中放射能調査 (平成 28 年度報告) 肥塚利江, 大山正幸, 木村明生	101

抄 録

市販野菜浅漬のリストeria・モノサイトゲネス汚染と製造施設の安全性確保の取り組み (英文) 田口眞澄, 神吉政史, 山口侑子, 稲村秀一, 小金井洋輔, 佐野哲也, 中村寛海, 朝倉 宏	111
フルオロキノロン低感受性 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A による家族 内感染事例 酒井朱厘, 澤田加奈, 田口眞澄	111
ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子 (<i>cpe</i> および <i>becAB</i>) を同時に検出するマルチプレッ クス PCR 法の構築とその応用 (英文) 余野木伸哉, 神吉政史, 大西貴弘, 塩野将巳, 飯田哲也, 久米田裕子	112
ウエルシュ菌新型エンテロトキシン BEC, BECa の結晶構造 (英文) 河原一樹, 余野木伸哉, 棟朝亮太, 沖 大也, 吉田卓也, 久米田裕子, 松田重輝, 児玉年央, 大久保忠恭, 飯田哲也, 中村昇太	112
鶏肉および鶏肝臓肉から分離された新種 <i>Enterococcus saigonensis</i> (英文) 原田哲也, Van Chinh Dang, Do Pun Nguyen, Thi Anh Dao Nguyen, 坂本光央, 大熊盛也, 元岡大祐, 中村昇太, 内田耕太郎, 陳内理生, 余野木伸哉, 河原隆二, 神吉政史, 河合高生, 久米田裕子, 山本容正	113

タイ王国におけるウイルス性胃腸炎から検出されたノロウイルスおよびサポウイルスの月別 検出状況 (英文)	Pongsuwanna Y, Tacharoenmuang R, Prapanpoj M, 左近直美, 河本聡志, Guntapong R, 谷口孝喜	113
ヒトロタウイルス C の遺伝子解析 極東アジアにおけるインドーバンングラデシュ株の出現 (英文)	Doan YH, 芳賀 慧, 藤本 陽, 藤井克樹, 戸高玲子, 岡智一郎, 木村博一, 吉澄志麻, 重本直樹, 岡本玲子, 調 恒明, 四宮博人, 左近直美, 片山和彦	114
ヒトノロウイルス GII のカプシド領域の進化系統解析 (英文)	小林美保, 松島勇紀, 本谷 匠, 左近直美, 重本直樹, 岡本玲子, 西村浩一, 山下育孝, 黒田 誠, 猿木信裕, 梁 明秀, 皿谷 健, 森田幸雄, 調 恒明, 石川真理子, 高橋知子, 四宮博人, 岡部信彦, 長澤耕男, 鈴木善幸, 片山和彦, 木村博一	114
ノロウイルスの流行と遺伝子型	左近直美, 駒野 淳	115
2015 年から検出が続いている G 型ムンプスウイルスの分子系統解析—大阪府	中田恵子, 西村公志, 弓指孝博, 久米田裕子, 木所 稔	115
妊婦におけるヒトパレコウイルス 3 型感染事例の初報告 (英文)	篠本真紀子, 川崎達也, 菅原拓也, 中田恵子, 小谷知也, 吉武英隆, 湯浅健人, 佐伯雅史, 藤原康弘	116
周産期における麻疹ウイルス胎盤感染がもたらす胎児への影響に関する研究	倉田貴子	116
関西国際空港の麻疹事例の検査結果から得られた知見	倉田貴子, 山元誠司, 弓指孝博, 久米田裕子, 本村和嗣, 上山賀也子, 井戸美恵子, 福田直子, 宮本妙子, 川井奈々, 貞方菜月, 大西聖子, 今川和子, 松浦玲子, 西野裕香, 折井 郁, 牟田恵美子, 木下 優, 柴田敏之	117
TaqMan RT-PCR 法を用いた臨床検体における風疹ウイルス検出感度の評価 (英文)	岡本貴世子, 森 嘉生, 駒込理佳, 長野秀樹, 三好正浩, 岡野素彦, 青木洋子, 小倉 淳, 堀田千恵美, 小川知子, 七種美和子, 児玉洋江, 安井善宏, 皆川洋子, 倉田貴子, 上林大起, 加瀬哲男, 村田祥子, 調 恒明, 濱崎光宏, 加藤峰史, 大槻紀之, 坂田真史, 駒瀬勝啓, 竹田 誠	117
日本で分離された新規モザイク penA 遺伝子を有する新しいセフトリアキソンおよび多剤耐 性淋菌株 (英文)		

中山周一, 志牟田健, 古林敬一, 川畑拓也, 大西 真	118
大阪府域における梅毒の発生状況 (2006~2015 年)	
川畑拓也, 小島洋子, 森 治代	118
大気中塩素化多環芳香族炭化水素の粒径分布 (英文)	
柿本健作, 永吉晴奈, 小西良昌, 梶村計志, 大浦 健, 中野 武, 畑 光彦, 古内正美, 唐 寧, 早川和一, 鳥羽 陽	119
塩素系難燃剤デクロラン類の大気粉塵粒径分布の解明	
柿本健作, 東條俊樹, 先山孝則, 永吉晴奈, 小西良昌, 梶村計志, 中野 武, 畑 光彦, 古内正美, 唐 寧, 早川和一, 鳥羽 陽	119
LC-MS/MS による 5,6-ジヒドロチミジンを指標とした牛生レバーの放射線照射履歴検知法の開発 (英文)	
福井直樹, 高取 聡, 北川陽子, 起橋雅浩, 石川悦子, 藤山貴友, 梶村計志, 古田雅一, 尾花裕孝	120
LC/MS/MS を用いた柑橘類中における防カビ剤の一斉分析法の開発 (英文)	
柿本 葉, 高取 聡, 起橋雅浩, 梶村計志, 鳥羽 陽, 早川和一	120
大阪府におけるヒスタミン検査事例について	
粟津 薫, 高取 聡, 柿本幸子, 野村千枝, 昌山 敦, 山口瑞香, 柿本 葉, 梶村計志	121
1972 年から 2008 年までの大阪府における母乳中のダイオキシン、PCB およびその他有機ハロゲン化合物濃度の推移 (英文)	
小西良昌, 柿本健作	121
常温保存下における照射レトルト牛乳中 2-アルキルシクロブタノンの安定性について (2)	
北川陽子, 起橋雅浩, 高取 聡, 福井直樹, 梶村計志, 尾花裕孝, 古田雅一	122
ベトナムの都市部と農村部における水産物の残留抗菌剤モニタリング (英文)	
内田耕太郎, 小西良昌, 原田和生, 起橋雅浩, 山口貴弘, Mai Hoang, Ngoc Do, Long Thi Bui, Thinh Duc Nguyen, Phuc Do Nguyen, Diep Thi Khong, Hoa Thi Tran, Thang Nam Nguyen, Ha Viet Le, Vien Van Chau, Khanh Thi Van Dao, Hue Thi Ngoc Nguyen, 梶村計志, 久米田裕子, Khanh Tran Pham, Khai Ngoc Pham, Chien Trong Bui, Mai Quang Vien, Ninh Hoang Le, Chinh Van Dang, 平田収正, 山本容正	122

微生物学的キットと LC-MS/MS を用いたベトナム ホーチミン市における豚肉中残留抗菌剤の検査 (英文)	Mai Hoang Ngoc Do, 山口貴弘, 起橋雅浩, 原田和生, 小西良昌, 内田耕太郎, Long Thi Bui, Thinh Duc Nguyen, Ha Bich Phan, Huong Dang Thien Bui, Phuc Do Nguyen, 梶村計志, 久米田裕子, Chinh Van Dang, 平田収正, 山本容正	123
ベトナム ホーチミン市で購入した鶏卵中の残留抗菌剤の検出について (英文)	山口貴弘, 起橋雅浩, 原田和生, 内田耕太郎, 小西良昌, Mai Hoang Ngoc, Do Long Thi Bui, Thinh Duc Nguyen, Ha Bich Phanong, Dang Thien Bui, Phuc Do Nguyen, 梶村計志, 久米田裕子, Chinh Van Dang, 平田収正, 山本容正	123
残留農薬の GC/MS/MS 測定におけるマトリックス様効果の検証 (英文)	阿久津和彦, 吉光真人, 北川陽子, 高取 聡, 福井直樹, 小阪田正和, 山口聡子, 梶村計志, 尾花浩孝, 渡辺卓穂	124
オレンジの生鮮品と加工品に含まれるオレンジアレルゲン Cit s 2 定量 ELISA の開発 (英文)	清田恭平, 川津健太郎, 坂田淳子, 吉光真人, 阿久津和彦, 梶月 (村上) 太郎, 紀 雅美, 梶村計志, 山野哲夫	124
ポリプロピレン製給食用食器におけるきずの解析と卵アレルゲン残留性への影響	橋本博行, 吉光真人, 清田恭平	125
小麦粉ふるい操作後の小麦アレルゲンの飛散動態の解析	橋本博行, 吉光真人, 清田恭平	125
HILIC を用いた痩身用健康食品中に含まれる高極性医薬品成分の分析 (英文)	中村暁彦, 田上貴臣, 梶村計志, 山崎勝弘, 沢辺善之, 尾花裕孝	126
N-アダマンチルカルボキサミド型合成カンナビノイドの GC-EI-MS による異性体分析について (英文)	浅田安紀子, 土井崇広, 田上貴臣, 武田章弘, 沢辺善之	126
ナフチルエチルカラムを用いた液体クロマトグラフィー質量分析計による合成カチノンの位置異性体分離 (英文)	武田章弘, 田上貴臣, 浅田安紀子, 土井崇広, 川口正美, 梶月由香, 沢辺善之	127
ハーブ製品に含まれる合成カンナビノイド 5F-AB- PINACA および 5F-AMB の光学分離について (英文)	土井崇広, 浅田安紀子, 武田章弘, 田上貴臣, 片木宗弘, 鎌田寛恵, 沢辺善之	127

誘導体化-ガスクロマトグラフー質量分析法を用いた水道原水および水道水中ジチオカルバ メート系農薬の定量	高木総吉, 吉田 仁, 小泉義彦, 安達史恵, 中島孝江, 田中榮次, 足立伸一	128
誘導体化ー高速液体クロマトグラフー蛍光検出法による水中グルホシネート、 グリホサート、アミノメチルホスホン酸の同時分析	中島孝江, 安達史恵, 吉田 仁, 高木総吉, 小泉義彦, 田中榮次, 足立伸一	128
大阪府における精度管理基礎研修の実施	安達史恵, 吉田 仁, 高木総吉, 小泉義彦, 中島孝江, 田中榮次, 山本友梨子, 廣瀬正晃, 島野元伸, 土屋 誠, 足立伸一	129
アメーバ共培養ーLAMP 法を用いた水景施設におけるレジオネラ属菌生息調査	枝川亜希子, 木村明生, 足立伸一, 松島加代, 宮本比呂志	129
大阪府内水道原水におけるクリプトスポリジウムとジアルジアの存在状況とその遺伝子型	肥塚利江, 木村明生, 足立伸一	130
黄砂の飛来が下流域の生活環境の大気中の細菌群集に与える影響 (英文)	朴鍾旭, 一條知昭, 那須正夫, 山口進康	130
2016ー2017 シーズンに大阪府で認められたノロウイルス流行	入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 野田 衛, 小笠原 準	131
アイスクリーム製造施設の <i>Listeria monocytogenes</i> 汚染状況	中村寛海, 西 康之, 清水順子, 山本雅由, 宮木行雄, 黒岡伸夫, 小笠原 準	131
2016/17 シーズンの季節性インフルエンザウイルス分離状況ー大阪府	久保英幸, 改田 厚, 上林大起, 平井有紀, 入谷展弘, 山元誠司, 小笠原 準	132
LC-MS/MS による植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討	村上太郎, 紀 雅美, 山口之彦, 昌山 敦, 山野哲夫	132
水蒸気蒸留ー固相抽出ーHPLC 法による加工食品中の保存料の含有量調査	新矢将尚, 油谷藍子, 工藤鮎子, 山口之彦, 山野哲夫	133
大阪府内河川における人工甘味料の分布状況	山口之彦, 山本敦史, 角谷直哉	133

2016年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物

中村寛海, 後藤 薫, 梅田 薫, 山本香織, 入谷展弘, 阿部仁一郎,
久保英幸, 改田 厚, 上林大起, 山元誠司, 平山照雄, 平井有紀,
山崎一夫, 長谷 篤, 小笠原 準 134

ANNUAL REPORT OF OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

CONTENTS

Original Articles

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus and human parechovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2016 Report) (in Japanese)	
K. NAKATA, T. YUMISASHI and Y. KUMEDA · · · · ·	1
Epidemic and Molecular Epidemiological Analysis of Norovirus Outbreaks in Case of Food Poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2016 Report) (in Japanese)	
R. TAKADA, N. SAKON, K. NAKATA, K. MOTOMURA and T. YUMISASHI · · · · ·	10
Influenza activity during the 2016/2017 season in Osaka prefecture (in Japanese)	
S. MORIKAWA, S. HIROI and T. YUMISASHI · · · · ·	20
Mosquito-borne Virus Surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2016 Report) (in Japanese)	
I. AOYAMA, S. YAMAMOTO, K. YAMAGUCHI, A. ISHIKAWA and T. YUMISASHI · · · · ·	29
Evaluation of a method for the determination of methylmercury in three kinds of fish samples by GC/MS following phenylation (in Japanese)	
S. KAKIMOTO, M. YOSHIMITSU, K. AKUTSU, K. KIYOTA, T. FUJIWARA, A. MASAYAMA, S. TAKATORI, T. WATANABE, K. KAJIMURA and T. YAMANO · · · · ·	36
Monitoring result of fungicides in imported citrus fruits examined in 2007-2016 (in Japanese)	
N. FUKUI, Y. KITAGAWA, S. TAKATORI, S. KAKIMOTO, M. OSAKADA, Y. KAKIMOTO, S. YAMAGUCHI, M. YOSHIMITSU, K. AKUTSU, E. AZUMA and K. KAJIMURA · · · · ·	41
Pesticide Residues in Agricultural Products (May 2016 - February 2017) (in Japanese)	
Y. KITAGAWA, E. AZUMA, M. OSAKADA, M. YOSHIMITSU, N. FUKUI, K. AKUTSU and K. KAJIMURA · · · · ·	47
Development and Validation of Hormones Analysis Method using Dispersive Solid Phase Extraction Method with Novel Lipid Removing Agent (in Japanese)	
H. NAGAYOSHI, K. KAKIMOTO, M. YAMAGUCHI, K. UCHIDA, Y. YOSHIDA and K. KAJIMURA · · · · ·	57
Determination of Organochlorine Pesticides in Livestock Products by GC-MS/MS (in Japanese)	

K. KAKIMOTO, H. NAGAYOSHI, M. YAMAGUCHI, Y. YOSHIDA, Y. TOKUNAGA, Y. KITAGAWA, Y. KONISHI and K. KAJIMURA	63
Development and Validation of an Analytical Method for Tefuryltrione in Tap Water by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (in Japanese) S. TAKAGI, F. ADACHI, J. YOSHIDA and N. KOBAYASHI	67
Results of External Quality Control on the Analytical Measures for Tap Water in Osaka Prefecture. - Copper (2015)- (in Japanese) J. YOSHIDA and A. KIMURA	73
Concentrations of substances being difficult to be dealt with by water treatment in 30 Water Purification Plants in Osaka Prefecture, Japan (in Japanese) J. YOSHIDA, S. TAKAGI, F. ADACHI, Y. KOIZUMI, T. NAKAJIMA, and A. KIMURA	80
Study of the Principal Factors Associated with Recovery Rate of 2 Kinds of Certain Aromatic Amines Derived from Azo Colorants in Textile Products (in Japanese) M. MIMURA, Y. KOIZUMI, M. OHYAMA and T. YOSHIDA	85
Study for the Revision of Analytical Method for Tris(1-aziridinyl)phosphine oxide in Textiles (in Japanese) M. MIMURA, H. NAKASHIMA, T. KAWAKAMI and K. ISAMA	93
Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2016 Report) (in Japanese) T. HIZUKA, M. OHYAMA and A. KIMURA	101
Abstracts	
Prevalence of <i>Listeria monocytogenes</i> in retail lightly pickled vegetables and its successful control at processing plants M. TAGUCHI, M. KANKI, Y. YAMAGUCHI , H. INAMURA , Y. KOGANEI, T. SANO, H. NAKAMURA and H. ASAKURA	111
Familial infection caused by <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A with low sensitivity to fluoroquinolone: a case report (in Japanese) A. SAKAI, K. SAWADA and M. TAGUCHI	111
Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin-encoding genes <i>cpe</i> and <i>becAB</i> S. YONOGI, M. KANKI, T. OHNISHI, M. SHIONO, T. IIDA and Y. KUMEDA	112

Crystal structure of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of <i>Clostridium perfringens</i>	K. KAWAHARA, S. YONOGI, R. MUNETOMO, H. OKI, T. YOSHIDA, Y. KUMEDA, S. MATSUDA, T. KODAMA, T. OHKUBO, T. IIDA and S. NAKAMURA	112
<i>Enterococcus saigonensis</i> sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver	T. HARADA, V. C. DANG, D. P. NGUYEN, T. A. D. NGUYEN, M. SAKAMOTO, M. OHKUMA, D. MOTOOKA, S. NAKAMURA, K. UCHIDA, M. JINNAI, S. YONOGI, R. KAWAHARA, M. KANKI, T. KAWAI, Y. KUMEDA and Y. YAMAMOTO	113
Monthly Distribution of Norovirus and Sapovirus in Viral Gastroenteritis in Thailand	Y. PONGSUWANNA, R. TACHAROENMUANG, M. PRAPANPOJ, N. SAKON, S. KOMOTO, R.GUNTAPONG and K. TANIGUCHI	113
Genetic analysis of human rotavirus C: The appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries	YH. DOAN, K. HAGA, A. FUJIMOTO, Y. FUGII, R. TAKAI-TODAKA, T. OKA, H. KIMURA, S. YOSHIKUMI, N.SHIGEMOTO, R. OKAMOTO-NAKAGAWA, K. SHIRABE, H.SHINOMIYA, N. SAKON and K. KATAYAMA	114
Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II	M. KOBAYASHI, Y. MATSUSHIMA, T. MOTOYA, N. SAKON, N. SHIGEMOTO, R. OKAMOTO-NAKAGAWA, K. NISHIMURA, Y. YAMASHITA, M. KURODA, N. SARUKI, A. RYO, T.SARAYA, Y. MORITA, K. SHIRABE, M. ISHIKAWA, T.TAKAHASHI, H. SHINOMIYA, N. OKABE, K. NAGASAWA, Y. SUZUKI, K. KATAYAMA and H.KIMURA.	114
The circulatory dynamism of norovirus and impact to immunity (in Japanese)	N. SAKON and J. KOMANO	115
Phylogenetic analysis of the genotype G mumps virus detected in Osaka Prefecture since 2015 (in Japanese)	K. NAKATA, H. NISHIMURA, T. YUMISASHI, Y. KUMEDA and M. KIDOKORO	115
First report of human parechovirus type 3 infection in a pregnant woman	M. SHINOMOTO, T. KAWASAKI, T. SUGAHARA, K. NAKATA, T. KOTANI, H. YOSHITAKE, K. YUASA, M. SAEKI and Y. FUJIWARA	116
A study on the effect of measles virus infection of placenta on fetus during perinatal period (in Japanese)		

T. KURATA · · · · ·	116
Laboratory findings from the measles outbreak in Kansai International Airport, 2016 (in Japanese)	
T. KURATA, S. YAMAMOTO, T. YUMISASHI, Y. KUMEDA, K. MOTOMURAK, K. UEYAMA, E. IDO, N. FUKUDA, T. MIYAMOTO, N. KAWAI, N. SADAKATA, S. ONISHI, K. IMAGAWA, R. MATSUURA, Y. NISHINO, F. ORII, E. MUTA, Y. KINOSHITA and T. SHIBATA · · · · ·	117
Evaluation of sensitivity of TaqMan RT-PCR for rubella virus detection in clinical specimens	
K. OKAMOTO, Y. MORI, R. KOMAGOME, H. NAGANO, M. MIYOSHI, M. OKANO, Y. AOKI, A. OGURA, C. HOTTA, T. OGAWA, M. SAIKUSA, H. KODAMA, Y. YASUI, H. MINAGAWA, T. KURATA, D. KANBAYASHI, T. KASE, S. MURATA, K. SHIRABE, M. HAMASAKI, T. KATO, N. OTSUKI, M. SAKATA, K. KOMASE and M. TAKEDA · · · · ·	117
New ceftriaxone- and multidrug-resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> strain with a novel mosaic <i>penA</i> gene isolated in Japan	
S. NAKAYAMA, K. SHIMUTA, K. FURUBAYASHI, T. KAWAHATA, M. UNEMO and M. OHNISHI · · · · ·	118
Report on syphilis in Osaka prefecture (2006-2015) (in Japanese)	
T. KAWAHATA, Y. KOJIMA and H. MORI · · · · ·	118
Size Distribution of Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Particles	
K. KAKIMOTO, H. NAGAYOSHI, Y. KONISHI, K. KAJIMURA, T. OHURA, T. NAKANO, M. HATA, M. FURUUCHI, N. TANG D, K. HAYAKAWA and A. TORIBA · · · · ·	119
Size Distribution of Dechloranes in Particulate Matter (in Japanese)	
K. KAKIMOTO, T. TOJO, T. SAKIYAMA, H. NAGAYOSHI, Y. KONISHI, K. KAJIMURA, T. NAKANO, M. HATA, M. FURUUCHI, N. TANG, K. HAYAKAWA and A. TORIBA · · · · ·	119
Determination of irradiation histories of raw beef livers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry of 5,6-dihydrothymidine	
N. FUKUI, S. TAKATORI, Y. KITAGAWA, M. OKIHASHI, E. ISHIKAWA, T. FUJIYAMA, K. KAJIMURA, M. FURUTA and H. OBANA · · · · ·	120
Simple Method for Determination of Fungicides in Citrus Fruits by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	
Y. KAKIMOTO, S. TAKATORI, M. OKIHASHI, K. KAJIMURA, A. TORIBA and K. HAYAKAWA · · · · ·	120

Detection of Histamine in Fish and Fishery Products in Osaka Prefecture (Fiscal 2015 Report) (in Japanese)	
K. AWAZU, S. TAKATORI, S. KAKIMOTO, C. NOMURA, A. MASAYAMA, M. YAMAGUCHI, Y. KAKIMOTO and K. KAJIMURA · · · · ·	121
Trends of Dioxin, PCB, and Other Persistent Organohalogen Compound Concentrations in Human Breast Milk from 1972 to 2008 in Osaka, Japan	
Y. KONISHI and K. KAKIMOTO · · · · ·	121
Stability of 2-Alkylcyclobutanone in Irradiated Retort Pouch Gydon Topping During Room Temperature Storage (2) (in Japanese)	
Y. KITAGAWA, M. OKIHASHI, S. TAKATORI, N. FUKUI, K. KAJIMURA, H. OBANA and M. FURUTA · · · · ·	122
Monitoring of Antibiotic Residues in Aquatic Products in Urban and Rural Areas of Vietnam	
K. UCHIDA, Y. KONISHI, K. HARADA, M. OKIHASHI, T. YAMAGUCHI, M. DO, L. BUI, T. NGUYEN, P. NGUYEN, D. KHONG, H. TRAN, T. NGUYEN, H. LE, V. CHAU, K. DAO, H. NGUYEN, K. KAJIMURA, Y. KUMEDA, K. PHAM, K. PHAM, C. BUI, M. VIEN, N. LE, C. DANG, K. HIRATA and Y. YAMAMOTO · · · · ·	122
Screening of antibiotic residues in pork meat in Ho Chi Minh City, Vietnam, using a microbiological test kit and liquid chromatography/tandem mass spectrometry	
M. H. NGOC D., T. YAMAGUCHI, M. OKIHASHI, K. HARADA, Y. KONISHI, K. UCHIDA, L. T. BUI, T. D. NGUYEN, H. B. PHAN, H. D. THIEN B., P. D. NGUYEN, K. KAJIMURA, Y. KUMEDA, C. V. DANG, K. HIRATA and Y. YAMAMOTO · · · · ·	123
Detection of Antibiotics in Chicken Eggs Obtained from Supermarkets in Ho Chi Minh City, Vietnam	
T. YAMAGUCHI, M. OKIHASHI, K. HARADA, Y. KONISHI, K. UCHIDA, M. H. NGOC D., L. T. BUI, T. D. NGUYEN, H. B. PHAN, H. D. THIEN B., P. D. NGUYEN, K. KAJIMURA, Y. KUMEDA, C. V. DANG, K. HIRATA and Y. YAMAMOTO · · · · ·	123
Evaluation of matrix-like effects in multiresidue pesticide analysis by GC/MS/MS	
K. AKUTSU, M. YOSHIMITSU, Y. KITAGAWA, S. TAKATORI, N. FUKUI, M. OSAKADA, S. YAMAGUCHI, K. KAJIMURA, H. OBANA and T. WATANABE · · · · ·	124
Development of monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of orange allergen Cit s 2 in fresh and processed oranges	
K. KIYOTA, K. KAWATSU, J. SAKATA, M. YOSHIMITSU, K. AKUTSU, T. SATSUKI-MURAKAMI, M. KI, K. KAJIMURA and T. YAMANO · · · · ·	124

Analysis of Abrasions Generated on Polypropylene Tableware for School Lunch and its Effect on Egg Allergen Residues (in Japanese)	H. HASHIMOTO, M. YOSHIMITSU and K. KIYOTA	125
Analysis of Wheat Allergen Dispersed in Air By the Action of Three Types of Flour Sifter (in Japanese)	H. HASHIMOTO, M. YOSHIMITSU and K. KIYOTA	125
Simultaneous analysis of highly polar pharmaceutical adulterants in slimming products by hydrophilic interaction liquid chromatography	A. NAKAMURA, T. TAGAMI, K. KAJIMURA, K. YAMASAKI, Y SAWABE and H. OBANA	126
Isomeric discrimination of synthetic cannabinoids by GC-EI-MS: 1-adamantyl and 2-adamantyl isomers of <i>N</i> -adamantyl carboxamides	A. ASADA, T. DOI, T. TAGAMI, A. TAKEDA and Y. SAWABE	126
Regioisomeric Separation of Ring-Substituted Cathinones by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with a Naphthylethyl Column	A. TAKEDA, T. TAGAMI, A. ASADA, T. DOI, M. KAWAGUCHI, Y. SATSUKI and Y. SAWABE	127
Enantioseparation of the carboxamide-type synthetic cannabinoids <i>N</i> -(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1 <i>H</i> -indazole-3-carboxamide and methyl [1-(5-fluoropentyl)-1 <i>H</i> -indazole-3-carbonyl]-valinate in illicit herbal products	T. DOI, A. ASADA, A. TAKEDA, T. TAGAMI, M. KATAGI, H. KAMATA and Y. SAWABE	127
Determination of dithiocarbamate fungicides in raw and tap water using by derivatization-gas chromatography-mass spectrometry (in Japanese)	S. TAKAGI, J. YOSHIDA, Y. KOIZUMI, F. ADACHI, T. NAKAJIMA, H. TANAKA and S. ADACHI	128
Analysis of Glufosinate, Glyphosate and Its Metabolite, Amino- methylphosphonic Acid, in water sample by HPLC with a Fluorescence Detector (in Japanese)	T. NAKAJIMA, F. ADACHI, J. YOSHIDA, S. TAKAGI, Y. KOIZUMI, H. TANAKA, and S. ADACHI	128
Report of Trainings on Analytical Quality Control (in Japanese)	F. ADACHI, J. YOSHIDA, S. TAKAGI, Y. KOIZUMI, T. NAKAJIMA, H. TANAKA, Y. YAMAMOTO, M. HIROSE, M. SHIMANO, M. TSUCHIYA and S. ADACHI.	129
Investigation of <i>Legionella</i> Contamination in Amenity Water Samples Using Amoebic Co-culture with LAMP Methods (in Japanese)		

A. EDAGAWA, A. KIMURA, S. ADACHI, K. MATSUSHIMA and H. MIYAMOTO · · · · ·	129
Occurrence of <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> genotypes in drinking water sources in Osaka Prefecture (in Japanese)	
T. HIZUKA, A. KIMURA and S. ADACHI · · · · ·	130
Investigation of Bacterial Effects of Asian Dust Events through Comparison with Seasonal Variability in Outdoor Airborne Bacterial Community	
J. PARK, T. ICHIJO, M. NASU and N. YAMAGUCHI · · · · ·	130
Epidemic of noroviruses in Osaka City, Japan during 2016–2017 season (in Japanese)	
N. IRITANI, D. KANBAYASHI, A. KAIDA, N. ABE, S. P. YAMAMOTO, H. KUBO, Y. HIRAI, M. NODA and J. OGASAWARA · · · · ·	131
<i>Listeria monocytogenes</i> contamination in ice cream processing plants (in Japanese)	
H. NAKAMURA, Y. NISHI, J. SHIMIZU, M. YAMAMOTO, Y. MIYAKI, N. KUROOKA and J. OGASAWARA · · · · ·	131
Seasonal influenza viruses isolated in Osaka City, 2016/17 influenza season (in Japanese)	
H. KUBO, A. KAIDA, D. KANBAYASHI, Y. HIRAI, N. IRITANI, S. P. YAMAMOTO and J. OGASAWARA · · · · ·	132
Simultaneous analysis of phytotoxins by liquid chromatography tandem mass spectrometry (in Japanese)	
T. SATSUKI-MURAKAMI, M. KI, Y. YAMAGUCHI, A. MASAYAMA and T. YAMANO · · · · ·	132
Survey of preservatives content in processed foods by HPLC after steam distillation and solid- phase extraction (in Japanese)	
M. SHINYA, A. YUTANI, A. KUDO, Y. YAMAGUCHI and T. YAMANO · · · · ·	133
Distribution of artificial sweeteners in rivers throughout Osaka City (in Japanese)	
Y. YAMAGUCHI, A. YAMAMOTO and N. KAKUTANI · · · · ·	133
Enteric Pathogens Detected during Investigation of Food Poisoning Outbreaks in Osaka City in 2016 (in Japanese)	
H. NAKAMURA, K. GOTO, K. UMEDA, K. YAMAMOTO1, N. IRITANI, N. ABE, H. KUBO, A. KAIDA, D. KANBAYASHI, S. P. YAMAMOTO, T. HIRAYAMA, Y. HIRAI, K. YAMAZAKI, A. HASE and J. OGASAWARA · · · · ·	134

大阪府におけるエンテロウイルスおよびヒトパレコウイルス感染症の 流行状況と分子疫学的解析 (2016 年度)

中田恵子^a 弓指孝博^a 久米田裕子^b

2016 年度に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギーナ患者より採取された検体から検出されたウイルスはそれぞれ Human parechovirus 3 (HPeV3); 28%、Enterovirus A71 (EV-A71); 22% と Coxsackievirus A6 (CV-A6); 22% (EV-A71 と CV-A6 は同率)、CV-A4; 50% が最も多かった。Viral Protein (VP) 1 領域が増幅できた HPeV3 および EV-A71 に対する系統樹解析の結果、HPeV3 は 2014 年の流行株とは異なるクラスターを形成し、EV-A71 は B と C の二つの遺伝子型に分類された。各疾患の主要な原因ウイルス遺伝子型および系統樹解析から得られるウイルス株の遺伝子情報の傾向が毎年異なることから、今後も引き続き動向を調査する必要がある。

キーワード：無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ

毎年夏季に小児の患者数が増加するエンテロウイルス(Enterovirus; EV)感染症の中で、無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において 5 類感染症の定点把握疾患に指定されている。各疾患の原因となるウイルスの遺伝子型は年毎に変動があり、患者から検出されるウイルスは疾患ごとに特徴がある¹⁾。

ヒトパレコウイルス (Human parechovirus: HPeV) は、ウイルス学的性状の違いから 1999 年にヒトパレコウイルス属としてエンテロウイルス属から独立した。HPeV はパレコウイルス A 種に属し、現在 19 遺伝子型が確認されている²⁾。その中で 3 型による感染症は、本邦では EV 感染症と同様に夏から秋に流行し、呼吸器症状や胃腸炎症状が主症状である³⁾ことも EV 感染症と類似している。また、HPeV3 は新生児感染症^{4,5,6)}、敗血症様症状^{4,5,7)}、乳幼児突然死症候群患者⁷⁾からも検出されており、関連性が推測されている。一方、大阪府では 2014 年度に無菌性髄膜炎、手

足口病およびヘルパンギーナの患者からそれぞれ HPeV3 が検出され、患者の疫学的な特徴が他の EV 感染症の患者とは異なっていた¹⁴⁾ことから、EV 感染症のみならず HPeV 感染症の発生動向に注目してきた。本稿では、2016 年 4 月 1 日から 2017 年 3 月 31 日の間に無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギーナと診断され、感染症発生動向調査事業に基づいて当所に搬入された患者検体からの病原体検出情報を集約し、2016 年シーズンにおける EV および HPeV の流行状況を解析するとともに、各疾患で主に検出された EV または HPeV3 の分子疫学的解析を実施したので報告する。

調 査 方 法

1. 検体・情報収集および統計解析

2016 年 4 月 1 日から 2017 年 3 月 31 日の期間に、大阪府内の定点医療機関から当所に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギ

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪府立大学微生物制御研究センター

一ナと診断された 195 名から採取された 251 検体を対象とした（ただし大阪市および堺市を除く）。検体種別の内訳は髄液が 67 検体、咽頭ぬぐい液および鼻汁等の呼吸器由来検体が 142 検体、唾液 5 検体、消化器由来検体（糞便、腸内容物等）が 26 検体、尿が 4 検体、水疱擦過物が 1 検体、血清が 6 検体であった。患者情報（患者の年齢、性別、診断名、体温、発症日）は感染症法に基づく感染症発生動向調査事業によって得られた調査票より収集した。また、各疾患における患者と HPeV3 検出患者の年齢分布の比較には Mann-Whitney 検定を用いた。

2. 培養細胞によるウイルス分離

培養細胞によるウイルス分離には 48 ウェルプレートに播種した RDA、VeroE6、FL、Caco-2 細胞を用いた。咽頭拭い液等の呼吸器由来拭い検体は、綿棒で咽頭等の病巣を擦過後、検体輸送用培地に浸漬した溶液（呼吸器検体溶液）を、髄液は無処理でそれぞれ 100 μ l ずつを各細胞に接種した。糞便は、緩衝液で 10% 懸濁液（糞便乳剤）を作製し、15,000 rpm で 5 分間遠心分離後、その上清を 10 倍希釈し、0.45 μ m シリンジフィルターでろ過した溶液から 100 μ l を各細胞に接種した。各細胞への検体接種後、37°C の CO₂ インキュベーターで 1 週間培養し、細胞変性効果（CPE; cytopathic effect）を観察した。CPE が出現した場合に培養上清を回収した。なお、3 代盲継代を繰り返し、CPE が出現しなかった場合を陰性と判定した。

3. 検体および培養上清からのウイルス遺伝子検出および系統樹解析

呼吸器検体溶液、髄液および糞便乳剤の遠心上清からそれぞれ 200 μ l を採取し、RNA 抽出用検体とした。RNA 抽出は、Magtration®-MagaZorb RNA Common Kit（PSS 社）を用いて、全自動核酸抽出装置 Magtration® System 6GC または 12GC（PSS 社）で行った。EV の Viral Protein（VP）4-2 領域に対する seminested RT-PCR⁸⁾を実施後、増幅産物のダイレクトシーケンスを実施し、BLAST 相同性検索にて遺伝子型を決定した。また同時に、HPeV に対する RT-realtimePCR⁹⁾をスクリーニング検査として実施し、陽性検体については VP1 領域に対する RT-nestedPCR¹⁰⁾を実施

後、増幅産物のダイレクトシーケンスを行い、BLAST 相同性検索にて遺伝子型を決定した。VP1 領域が増幅できた HPeV3 については、ダイレクトシーケンスで得られた塩基配列に対し、ClustalW を用いた系統樹解析を実施した。

また、培養細胞によるウイルス分離の結果、CPE が認められた場合は、培養上清から 200 μ l を採取し、上述の方法で RNA を抽出した。培養上清から抽出した RNA を用いて EV¹¹⁾および HPeV¹⁰⁾の VP1 領域に対する RT-PCR を実施した。得られた増幅産物に対し、ダイレクトシーケンスを行ない、BLAST 解析により遺伝子型別をするとともに、ClustalW を用いた系統樹解析を実施した。

結 果

1. 患者情報およびウイルスの検出状況

検体が採取された患者のうち、無菌性髄膜炎と診断されたのは 75 名で、年齢の中央値は 1 カ月（範囲：22 日-40 歳 1 ヶ月）、性別は男性 48 名（64%）、女性 27 名（36%）であった。手足口病と診断された患者は 32 名で、年齢の中央値が 2 歳（6 カ月-13 歳）、性別は男性 17 名（53%）、女性 15 名（47%）であった。ヘルパンギーナと診断された患者は 88 名で、年齢の中央値は 3 歳（7 ヶ月-78 歳）、性別は男性 52 名（59%）、女性 36 名（41%）であった。

無菌性髄膜炎、手足口病あるいはヘルパンギーナと診断された合計 195 名中、120 名（62%）の患者から EV、ライノウイルス（Rhinovirus; RV）または HPeV が検出された。検出法別では遺伝子検査で陽性となった検体の割合が高く、251 検体中 122 検体（49%）であった。一方で細胞培養による分離で陽性であったのは、80 検体（32%）であった（表 1, 2, 3）。無菌性髄膜炎患者で、HPeV3 が検出された患者の年齢の中央値は、ウイルスが検出された患者全体よりも有意（P=0.072）に低かった。

2. 疾患別ウイルス検出割合および検出ウイルス遺伝子型

無菌性髄膜炎患者の 49%（37/75 名）から EV、RV または HPeV が検出され、検出内訳は、HPeV が 21%（8/35 名）、次いでコクサッキーウイルス

B5(Coxsackievirus B5:CV-B5)が 13%(5/37 名)、RV が 11% (4/35 名) を占めた (図 1)。検体別では、髄液からウイルス遺伝子が検出された検体が 15% (10/67 検体) で、検出ウイルスは HPeV が 40% (4/10 検体) と最も多かった (表 1)。手足口病では、75%(24/32 名)の患者から EV、RV または HPeV が検出され、そのうち EV-A71 および CV-A6 がそれぞれ 21%(5/24 名)、次いで CV-A16 および HPeV3 がそれぞれ 17% (4/24 名)であった (図 2)。同様に、ヘルパンギーナでは、77%(68/88 名)の患者検体から EV、RV または HPeV が検出され、そのうち、CV-A4 が 50%、次いで RV が 15%、CV-A2 が 10%であった (図 3)。

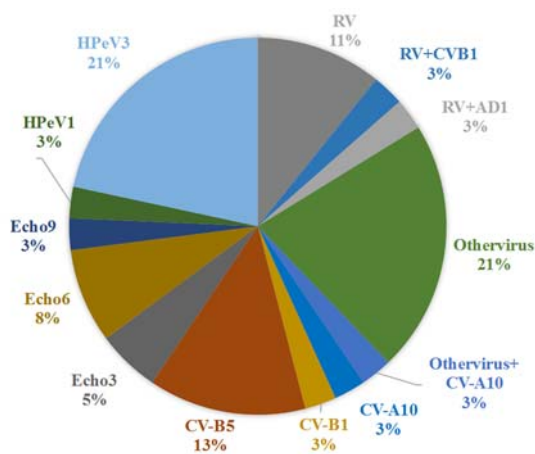


図 1 無菌性髄膜炎患者から検出されたウイルス遺伝子型 (N=37)

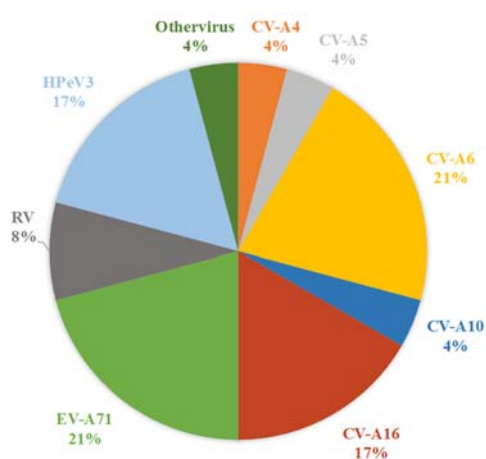


図 2 手足口病患者から検出されたウイルス遺伝子型 (N=24)

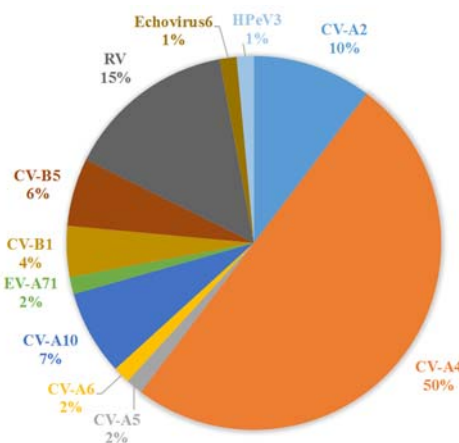


図 3 ヘルパンギーナ患者から検出されたウイルス遺伝子 (N=68)

3. 疾患別月別の検出 EV および HPeV の遺伝子型

無菌性髄膜炎患者由来検体からは 6 月から 10 月の期間に CV-B5 が検出され、HPeV3 は 7 月から 11 月までの期間に検出された (図 4)。手足口病患者では EV-A71 および CV-A6 は 9 月以降に検出されたが、HpeV3 は 7 月から 11 月の期間に検出された (図 5)。ヘルパンギーナ患者では CV-A4 が 5 月から 11 月の期間に検出されたが検出数が突出していたのは 6 月および 7 月であった (図 6)。

4. HPeV、EV-A71 および CV-A4 の系統樹解析

ウイルス抗原決定領域である VP1 領域の遺伝子解析が実施可能であった HPeV3 の 5 株について 585nt の系統樹解析を実施した。その結果、全ての株が同じクラスターを形成し、同クラスターには同年に新潟県で検出された株も含まれたが、2014 年の流行株とは異なるクラスターを形成した (図 7)。手足口病患者から分離した EV-A71 の 5 株については 620nt の系統樹解析を実施した。その結果、遺伝子型 C に 4 株、B5 に 1 株が分類された。C の 4 株は 2015 年のドイツで検出された株と同じクラスターを形成し、B5 の 1 株は 2012 年のベトナム株、2012 年のコロンビア株、2013 年の山形株と同じクラスターを形成した。今シーズンの B5 の 1 株は 2013 年の当所分離株と相同性が 96%と近縁であった (図 8)。ヘルパンギーナ患者から分離した CV-A4 の 15

表 1 無菌性髄膜炎患者由来検体におけるウイルス検出結果

	髄液 n=67		血清 n=6		呼吸器由来検体 (うがい液・鼻汁) n=23		唾液 n=5		尿 n=4		糞便 (腸内容物) n=26	
	遺伝子検査	細胞分離	遺伝子検査	細胞分離	遺伝子検査	細胞分離	遺伝子検査	細胞分離	遺伝子検査	細胞分離	遺伝子検査	細胞分離
CV-A10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
CV-B1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	1
CV-B5	3	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2	1
Echo3	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Echo6	2	2	0	0	2	2	0	0	0	0	2	2
Echo9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HPeV1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
HPeV3	4	2	0	0	2	2	0	0	0	0	2	2
Rhinovirus	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	2	0
合計 (%)	10(16)	7(11)	0	1(2)	11(48)	7(3)	0	0	0	0	14(54)	8(31)

一人の患者より複数の検体の提出あり
一種類の検体より複数のウイルスの検出あり

表 2 手足口病患者由来検体におけるウイルス検出結果

	呼吸器由来検体 (うがい液・鼻汁) n=31		水疱擦過物 n=1	
	遺伝子検査	細胞分離	遺伝子検査	細胞分離
CV-A4	1	1	0	0
CV-A5	1	1	0	0
CV-A6	5	2	0	0
CV-A10	1	0	0	0
CV-A16	4	1	0	0
EV-A71	4	5	0	0
HPeV3	4	4	0	0
Rhinovirus	2	0	0	0
合計 (%)	22(71)	14(45)	0	0

一人の患者より複数の検体の提出あり
一種類の検体より複数のウイルスの検出あり

表 3 ヘルパンギーナ患者由来検体におけるウイルス検出結果

	呼吸器由来検体 (うがい液・鼻汁) n=88	
	遺伝子検査	細胞分離
CV-A2	7	7
CV-A4	34	24
CV-A5	1	0
CV-A6	0	1
CV-A10	5	2
EV-A71	1	1
CV-B1	3	3
CV-B5	3	3
Echo6	1	1
HPeV3	0	1
Rhinovirus	10	0
合計 (%)	65(74)	43(49)

一種類の検体より複数のウイルスの検出あり

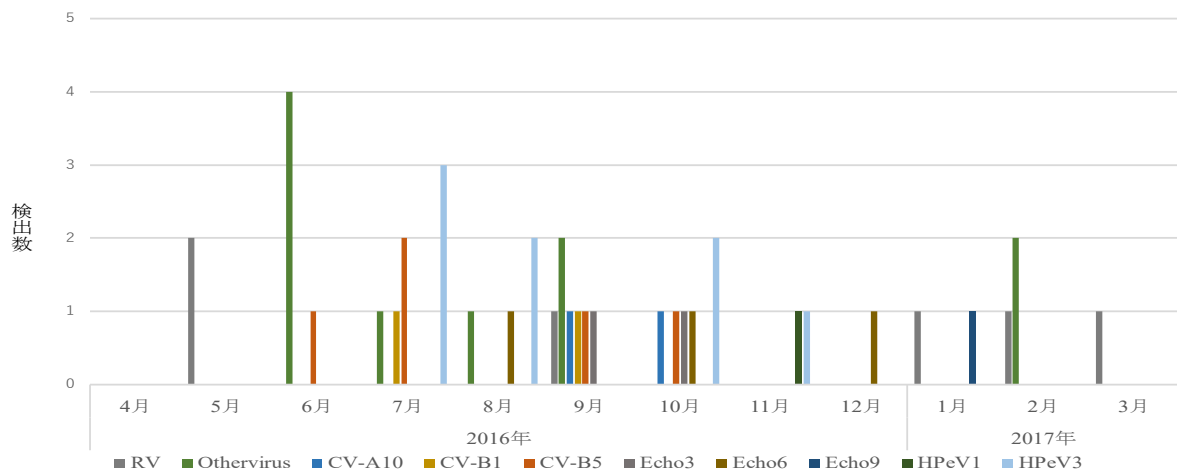


図4 無菌性髄膜炎患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

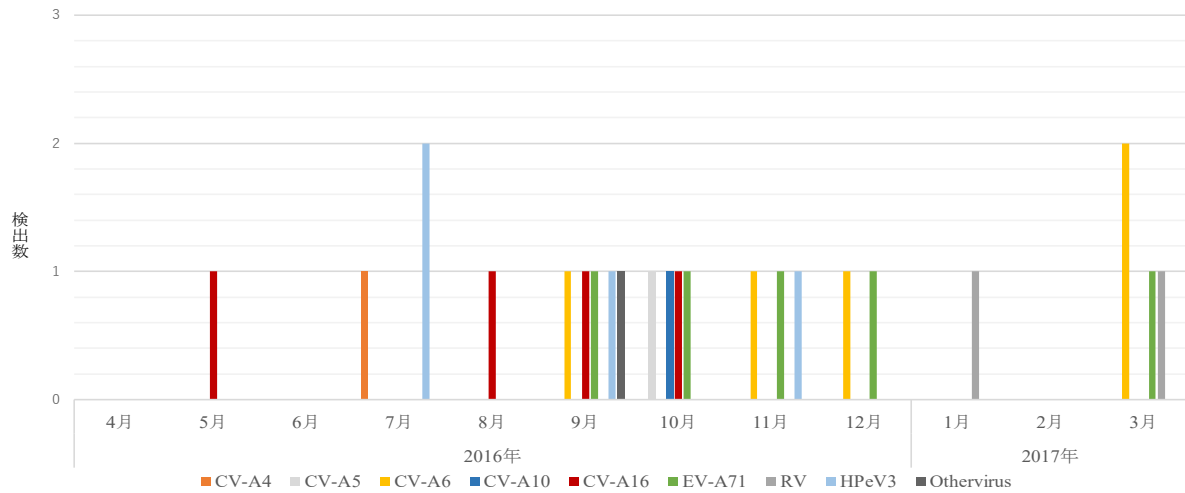


図5 手足口病患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

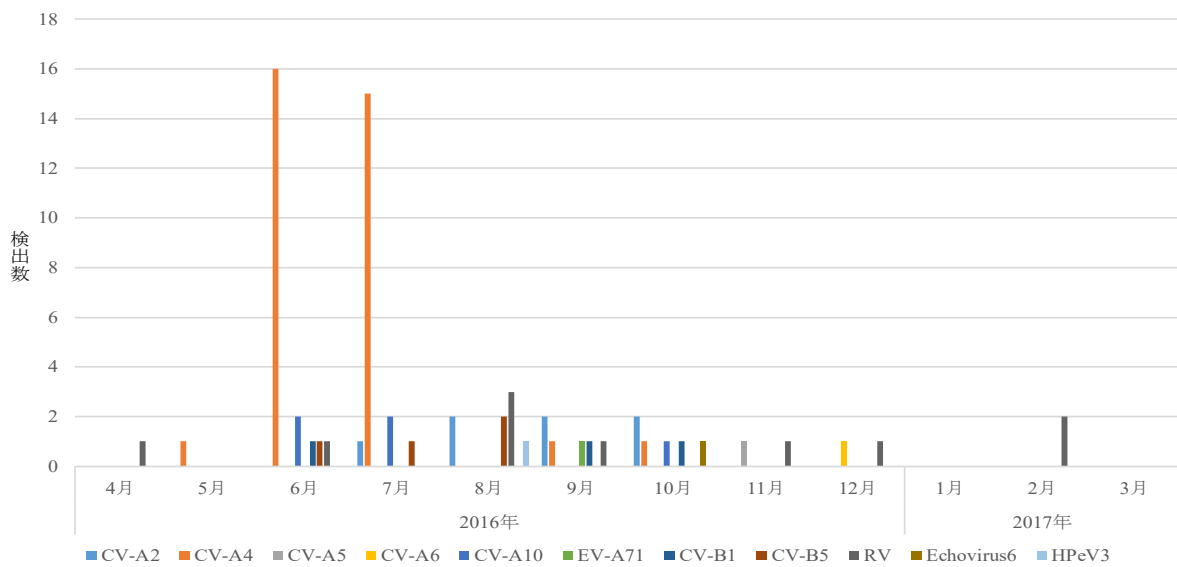


図6 ヘルパンギーナ患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

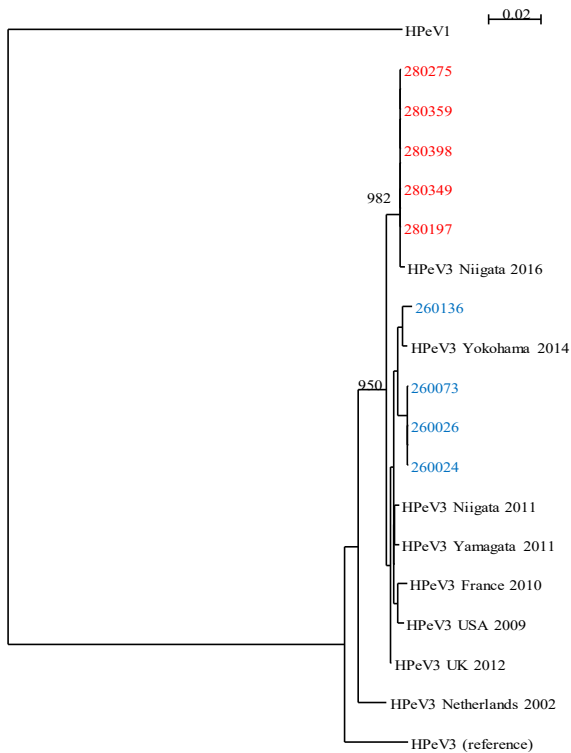


図 7 HPeV3 の系統樹解析 (585nt)

赤字：2016 年度当所検出株

青字：2014 年度当所検出株

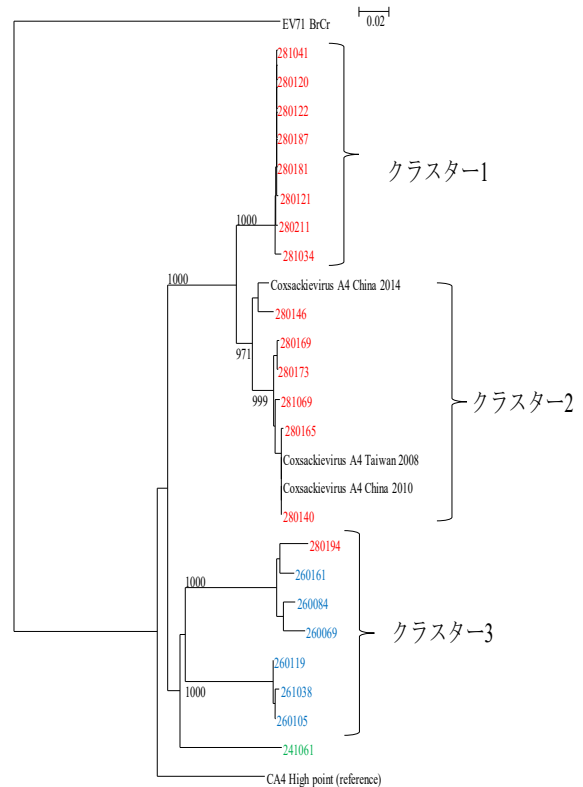


図 9 CV-A4 の系統樹 (597nt)

赤字：2016 年度当所分離株

青字：2014 年度当所分離株

緑字：2012 年度当所分離株

株については 597nt の系統樹解析を実施した。その結果、それぞれの株は 3 つのクラスターに分類され、そのうち 1 株のみは 2014 年の当所分離株で形成されるクラスターに分類された (図 9)。

考 察

2016 年シーズンは、無菌性髄膜炎疑いの患者から検出されたウイルスのうち CV-B5 が 13% であったのに対し、HPeV3 が 21%、RV が 11% と、非 EV が多数を占めた (図 1)。また、流行性耳下腺炎の流行を受けてムンプスウイルスが検出されたウイルスの 21% を占めた。無菌性髄膜炎は症候群として診断されるため一定の疫学的パターンをとらないが、原因ウイルスにおける EV の占める割合が高いために基本的な流行パターンは EV の流行状況を反映するとされている¹³⁾。しかし、大阪府では 2007 年以降、エ

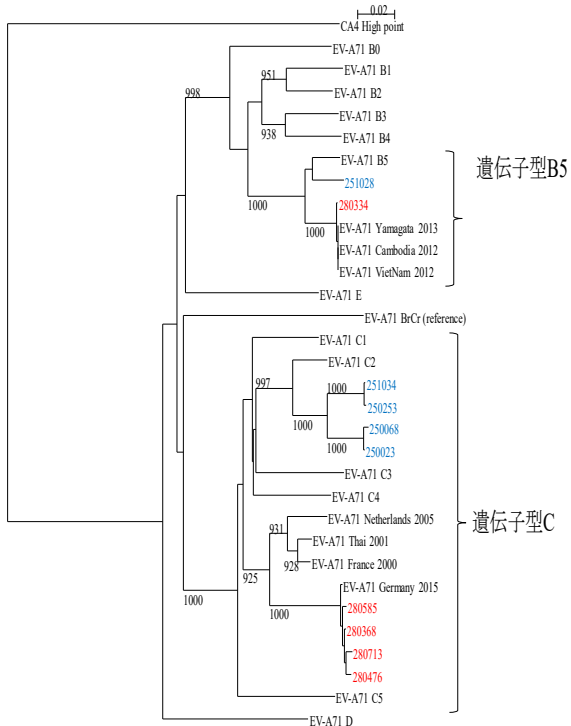


図 8 EV-A71 の系統樹解析 (620nt)

赤字：2016 年度当所分離株

青字：2013 年度当所分離株

コーウイルスやコクサッキーウイルス B 等の EV による無菌性髄膜炎の目立った流行がない¹²⁾だけでなく、2014 年から 3 年連続、無菌性髄膜炎の原因ウイルスの半数程度が非 EV であった^{14),15)}。過去にはエコーウイルスやコクサッキーウイルス B 群が原因となるアウトブレイクが報告されているが¹³⁾、上述の流行状況を考慮すると、これらのウイルスに対する抗体を保有していない感受性者の蓄積が推測される。今後、エコーウイルスやコクサッキーウイルス B 群が原因となる大規模な無菌性髄膜炎の流行が懸念されるため、患者から検出されるウイルスの動向を注視する必要があると考えられた。手足口病の流行規模は前年に比較して小さかったが^{12),15)}、2011 年以降 1 年おきに流行を繰り返している CV-A6^{15),16),17)}および 2013 年シーズン以来ほとんど検出されていなかった EV-A71 が主に検出され (図 2)、双方ともに 9 月以降に検出が始まった (図 5)。過去には、2014 年の冬季から検出され始めた CV-A16 と 2015 年の春から検出され始めた CV-A6 による混合流行で流行規模が拡大したこと¹⁵⁾を考慮すると EV-A71 あるいは CV-A6 が 2017 年シーズンの流行に影響する可能性が示唆された。2016 年シーズンはヘルパンギーナの流行が大きく、定点あたりの報告数の年平均は全国 3 位であり¹²⁾、患者から検出されたウイルスの半数が CV-A4 であった (図 3)。CV-A4 が検出された患者の年齢中央値は 2 歳 1 か月 (データ未掲載) であった。CV-A4 がヘルパンギーナの流行に関与したのが 2014 年以來¹⁴⁾であることを考慮すると、抗体を保有していない年齢層に感染が広がったことが流行規模の拡大に影響したと考えられた。

2016 年の無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギーナでウイルスが検出された患者のうち、それぞれ 21%、17%、1% から HPeV3 が検出された。HPeV3 の検出が増加した 2014 年と比較して検出割合は全ての疾患で低かったが、無菌性髄膜炎の患者で最も検出割合が高かったのは同様であった¹⁴⁾。また、無菌性髄膜炎患者で、HPeV3 が検出された患者の年齢の中央値が 1 か月齢で、患者全体の 1 歳 1 か月齢よりも有意 ($P=0.072$) に低かった。これは、2014 年の流行時期と同傾向であった¹⁴⁾。このことから、HPeV3 は低年齢層でより中枢神経症状を引き起

こしやすい可能性が示唆された。

検査法の比較では、全ての疾患で培養細胞によるウイルス分離よりウイルス遺伝子検査での陽性割合が高かった (表 1,2,3)。しかし、ウイルス分離陽性の検体の中にはウイルス遺伝子検査で陰性であった検体が含まれた。また、ウイルス遺伝子検査で RV が検出され、分離培養では EV が分離された検体が複数存在した (データ未掲載)。また、HPeV の流行状況から HPeV のウイルス遺伝子検査を遡ってシーズン中の全ての検体に対して実施するにあたり、分離培養で HPeV が分離されたことを契機に検査を開始した。これらのことより、近年、EV 感染症の検査においてウイルス遺伝子検査が主流となるなかで、ウイルス分離培養を遺伝子検査と並行して行うことの重要性が再確認された。

無菌性髄膜炎患者で、最も検出割合が高かった HPeV3 の系統樹解析では、2016 年の株は全て同じクラスターを形成し、同クラスターには同年に新潟県で検出された株も含まれた。また、2014 年の流行株とは異なるクラスターを形成した (図 7)。このことから、流行ごとに VP1 領域の塩基配列が変化している可能性が示唆された。手足口病患者から分離された EV-A71 の系統樹解析では、遺伝子型 C に 4 株、B5 に 1 株が分類された (図 8)。C の 4 株は 2015 年のドイツの株と同じクラスターを形成したが、2013 年当所分離株とはサブジェノグループが異なっていた。一方で、B5 に分類された株は 2013 年の当所分離株と同じクラスターを形成した。このことから、EV-A71 は国内外で異なるタイプのウイルスが複数循環し、複雑な流行形態をとると考えられた。ヘルパンギーナ患者から分離された CV-A4 の系統樹解析では、2016 年の分離株はそれぞれ 3 つのクラスターに分類されたが、1 株のみ 2014 年の当所分離株と同じクラスターを形成した (図 9)。この 1 株を除き、14 株の相同性は 93% 以上であり、なかには 2008 年の台湾、2010 年の中国の株と 100% 一致する株があった。これらのことから、CV-A4 は近隣の外国株が国内に流入し、国内で何等かの形で維持されていたものが感受性者の集団に感染することで流行を引き起こす可能性が考えられた。

無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギー

ナから主に検出されるウイルスは毎年異なる。EV に関しては流行株のウイルス学的知見および患者の疫学情報が蓄積されてきた。EV 感染症と HPeV 感染症が臨床症状だけでは区別が困難であることから、当所では流行の状況に合わせて HPeV の検査を実施している。その結果、無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナの患者から検出される HPeV のウイルス学的な動向や患者の疫学的な傾向が集約されつつある。今後も、これら 3 疾患の患者に対する検査については EV だけでなく HPeV も継続して実施する必要があると考えられた。

文 献

- 1) Heinz Z and Hans-Peter G. Clinical virology manual third edition-Enteroviruses. American society for microbiology, Wasington, D. C; 2000. 252-69.
 - 2) The Pirbright Institute, UK. Picornaviridae com. <http://www.picornaviridae.com/parechovirus/parechovirus.htm>
 - 3) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Kabashima Y, Hasegawa A, Nagaya S, Kawaguchi M, Kobayashi S, Fujiura A, Sakae K, Minagawa H. Detection of human parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. *J Clin Microbiol.* 2010; **48** (8): 2683-8.
 - 4) Abed Y, Boivin G. Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada. *Emerg Infect Dis.* 2006; **12** (6): 969-75.
 - 5) Abed Y, Boivin G. Molecular characterization of a Canadian human parechovirus (HPeV)-3 isolate and its relationship to other HPeVs. *J Med Virol.* 2005; **77**(4): 566-70.
 - 6) Boivin G, Abed Y, Boucher FD. : Human parechovirus 3 and neonatal infections. *Emerg Infect Dis.* 2005; **11** (1): 103-5.
 - 7) Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, Pajkrt D, Spanjerberg L, Kraakman HC, Berkhout B, Zaaijer HL, Beld MG, Wolthers KC. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis.* 2006; **42**(2): 204-10.
 - 8) 石古博昭、島田康司、奥那覇麻理、栄賢司. 遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定. *臨床とウイルス.* 1999; **27**(4): 283-93.
 - 9) Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008; **46**(8):2519-24 Nix WA, Maher K, Pallansch MA, Oberste MS. Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing. *J Clin Virol.* 2010; **48**(3):202-7.
 - 10) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999; **73**(3): 1941-8.
 - 11) 大阪府、大阪市、堺市、東大阪市、高槻市、豊中市、枚方市. 大阪府感染症発生動向調査事業報告書 第 35 報. 2017; 38-58.
 - 13) Cherry JD and Shields WD. Aseptic meningitis and viral meningitis. In Textbook of Pediatric infectious diseases 4th Ed. Saunders, Philadelphia, 1998; 457-467.
 - 14) 中田恵子、山崎謙治、左近直美、駒野淳、加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルスおよびヒトパレコウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2014 年度). 大阪府立公衆衛生研究所所報 (平成 27 年度). 2015; 7-14.
 - 15) 中田恵子、左近直美、弓指孝博、加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2015 年度). 大阪府立公衆衛生研究所所報 (平成 28 年度). 2016; 9-16.
 - 16) 中田恵子、山崎謙治、左近直美、加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルス検出状況と分子疫学的解析 (2011 年度). 大阪府立公衆衛生研究所所報 (平成 24 年度). 2012; 8-13.
 - 17) 中田恵子、山崎謙治、左近直美、駒野淳、加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2013 年度). 大阪府立公衆衛生研究所所報 (平成 26 年度). 2014; 7-14.
- 「WEB サイトの内容は 2017 年 8 月 21 日に確認した」

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus and human parechovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2016 Report)

K. NAKATA ^a, T. YUMISASHI ^a and Y. KUMEDA ^b

During April 2016 to March 2017, the most frequent viral types detected from patient specimens for aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease and herpangina were Human parechovirus (HPeV3) (28%), Enterovirus A71 (EV-A71) (22%) and Coxsackievirus A6 (22%), and Coxsackievirus A4 (50%), respectively. The phylogenetic trees constructed on the partial VP1 region indicated that the HPeV3 strains of 2016 epidemic formed different cluster from that of 2014 epidemic in Osaka. In addition, the 2016 epidemic strains of EV-A71 were classified into two genotypes, B and C. The main cause viruses of aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease and herpangina are rich in diversity on every year. As the changes of the dynamics of the epidemic viruses can be elucidated by analyzing viral genomes, it is necessary to continue the pathogen surveillance.

Key words : Aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease, Herpangina

a Osaka Institute of Public Health

b Former Osaka Prefectural Institute of Public Health Department of Infectious Disease

大阪府における食中毒事例から検出されたノロウイルスの流行状況と 分子疫学的解析 (2016 年度)

高田利香^a、左近直美^a、中田恵子^a、本村和嗣^a、弓指孝博^a

2016 年度に食中毒事例のノロウイルス検査は 97 事例で実施し、52 事例からノロウイルスが検出された。ノロウイルス陽性事例について、遺伝子型別を実施し分子疫学的解析を行なった。遺伝子型別は GII.2 が 25 事例 (48.1%) と最も多く、次いで GII.17 が 11 事例 (21.2%)、GII.4_Sydney2012 亜株が 7 事例 (13.5%) と続いた。GII.2 について RdRp 領域を組み合わせた遺伝子型は、GII.P16-GII.2 と GII.P2-GII.2 の 2 つの遺伝子型に分かれた。系統樹解析の結果、GII.P16-GII.2 は RdRp および VP1 の両領域において過去に検出された株とは異なるクラスターを形成していた。さらにアミノ酸配列について比較したところ、RdRp 領域 (262 アミノ酸) で 4 か所、VP1 領域 (542 アミノ酸) で 2 か所のアミノ酸置換が認められた。2016 年度は小児年齢層でも GII.2 を中心とした感染性胃腸炎が流行したが、流行規模には差があり、この原因として GII.2 のアミノ酸置換による変異が影響していると推測された。

キーワード：ノロウイルス、食中毒、遺伝子型、

ノロウイルス (NoV) は秋冬季を中心に嘔吐・下痢などの症状を起こす感染性胃腸炎の起因ウイルスである¹⁾。また食中毒の病因物質として最も多く報告されており²⁾、NoV の流行状況を把握することは食中毒防止対策など食品衛生管理において重要である。NoV は GI から GV までのグループがあり、このうち人に感染するのは主に GI および GII であるが、遺伝学的に多様で同グループ内においても GI には 9、GII には 22 の遺伝子型がある³⁾。

NoV はカリシウイルス科に分類されるプラス一本鎖 RNA ウイルスで、ゲノムは約 7500 塩基からなり 3 つの蛋白質翻訳領域 (ORF : Open Reading Frame) で構成されている。ORF1 は、ウイルスの複製に関与する非構造蛋白質を、ORF2 および ORF3 はそれぞれウイルス粒子を構成するカプシドタンパク質 VP1、VP2 をコードしている。VP1 は抗原性に関わっている部位であり¹⁴⁾、この部位のアミノ酸置換により抗原性を変

化させ免疫機構から逃れる抗原連続変異を起こす。また RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 領域を含む ORF1 領域と、それに続くカプシドタンパク質と ORF2 のジャンクション領域でゲノムの組換え (リコンビネーション) により、ゲノム増殖効率や免疫逃避能が変化した新たな性質を持ったウイルスが発生すると考えられており、RdRp 領域と ORF2 領域を含めた遺伝子解析を行うことが推奨されている⁵⁾。

NoV 食中毒事例について遺伝子解析および分子疫学的解析を実施したので、2016 年度の流行状況の特徴について報告する。

調 査 方 法

1. 検査材料

2016 年 4 月から 2017 年 3 月までの間に当所に搬入された食中毒事例 (疑い、有症苦情、他府県依頼分を含む) 97 事例 519 検体のうち、厚生

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

労働省通知の検査法⁹⁾に準拠したリアルタイムPCR法によりNoV遺伝子が検出された52事例を対象とした。

2. NoVの遺伝子解析

各NoV陽性事例から数検体を選択し、遺伝子解析を行った。ORF2のカプシドN/S領域に対し、NoV GIはG1-SKF/G1-SKR、NoV GIIはG2-SKF/G2-SKRのプライマーを用いた。

NoV GIIのうち一部の検体は、さらにORF1のRdRp領域についてYURI22F/G2-SKR、ORF2(VP1)領域についてG2-SKF/TX30SXNのプライマーを用いて解析を行った。(図1、表1)

各々のプライマーを用いてPCRを実施し、電気泳動で目的とするPCR増幅産物を確認し切り出した。BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems)を用いたダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定し、Norovirus Typing Tool Version 2

(<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>)により遺伝子型を決定した。

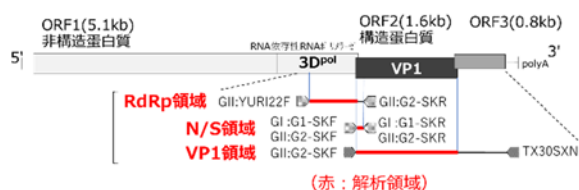


図1 NoVゲノム構造と解析領域

表1 プライマー配列

プライマー名	配列
G1-SKF	5'-CTGCCCGAATTGTAATGA-3'
G1-SKR	5'-CCAACCCARCCATTRTACA-3'
G2-SKF	5'-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3'
G2-SKR	5'-CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT-3'
YURI22F	5'-ATGAATGAGGATGGACCCAT-3'
TX30SXN	5'-GACTAGTTCTAGATCGCGAGCGCGCCGCC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

3. 系統樹解析

各NoV陽性事例から1検体を選択し、遺伝子解析を行った。解析については、MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/index.php>)を用い、最尤法(Maximum-Likelihood法)で系統樹解析を行った。

4. 統計データ

NoV食中毒事件数および患者数のデータは、厚生労働省の食中毒統計データ²⁾を基に4月～翌3月の年度計に集計した。

結果

1. NoV月別遺伝子型別の検出状況

食中毒事例から検出された52事例のNoV遺伝子型別月別の検出状況を図2に示す。遺伝子型別ではGII.2が25事例(48.1%、GI.6+GII.2およびGI.4+GII.2+GII.6混合事例各1事例ずつを含む)と最も多く、次いでGII.17が11事例(21.2%)、GII.4_Sydney2012亜株が7事例(13.5%)と続いた。2016年9月までは近年の主要遺伝子型であるGII.4_Sydney2012亜株やGII.17⁷⁾などが検出され、11月以降はGII.2が急激に増加し12月をピークに大勢を占めた。

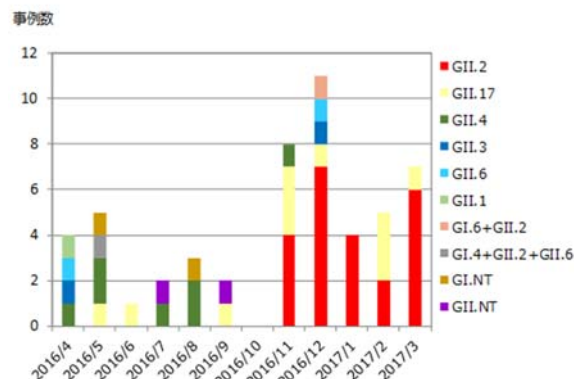


図2 NoV遺伝子型別月別検出状況 (n=52)

2. RdRp領域とカプシドN/S領域の組み合わせた遺伝子型別

最も多く検出されたGII.2と近年の主要遺伝子型であるGII.17およびGII.4_Sydney2012亜株について、RdRp領域とカプシドN/S領域を組み合わせた型別を行なった。型別ができたものは、GII.2についてGII.P16_GII.2が12事例、GII.P2_GII.2が2事例、GII.P17_GII.17が10事例、GII.Pe_GII.4_Sydney2012亜株が7事例であった。

これまで国内ではGII.2のRdRp型はGII.P2、GII.P12、GII.P16、GII.Peの4つの型が検出されているが⁹⁾¹⁰⁾、2016年度に検出されたものはGII.P16とGII.P2の2種類であった。

3. 系統樹解析

NoV GII 遺伝子型について塩基配列に基づき系統樹解析を行った。(●は 2016 年度当所検出株)

(1) GII.2 : RdRp 領域 (802 塩基)

GII.2 の RdRp 領域の系統樹解析結果を図 3 に示す。GII.P16_GII.2 (n=12) は、2つのクラスターに分かれ、1 株が 2012~2014 年に検出されたクラスター (P16-C) に分類され、11 株が過去に流行した株のクラスターとは異なる新たなクラスター (P16-A) を形成していた。またクラスター (P16-A) には、同時期にアジア地域で検出された¹¹⁾¹²⁾GII.2 株や、2016 年に検出された¹³⁾GII.P16 の組み合わせを持った

GII.4_Sydney2012 亜型のキメラウイルスが分類されていた。

GII.P2_GII.2 (n=2) は、過去に検出されたクラスターに分類された。

(2) GII.2 : ORF2 (VP1) 領域 (1627 塩基)

GII.2 の ORF2 (VP1) 領域の系統樹解析結果を図 4 に示す。RdRp 型別に伴って ORF2 (VP1) 領域は分類された。GII.P16_GII.2 (n=11) は、1 株が 2012~2014 年に検出されたクラスター (C) に分類され、10 株は独立した新たなクラスター (A) を形成していた。

GII.P2_GII.2 は 1 株のみ解析ができ、過去に検出されたクラスターに分類された。

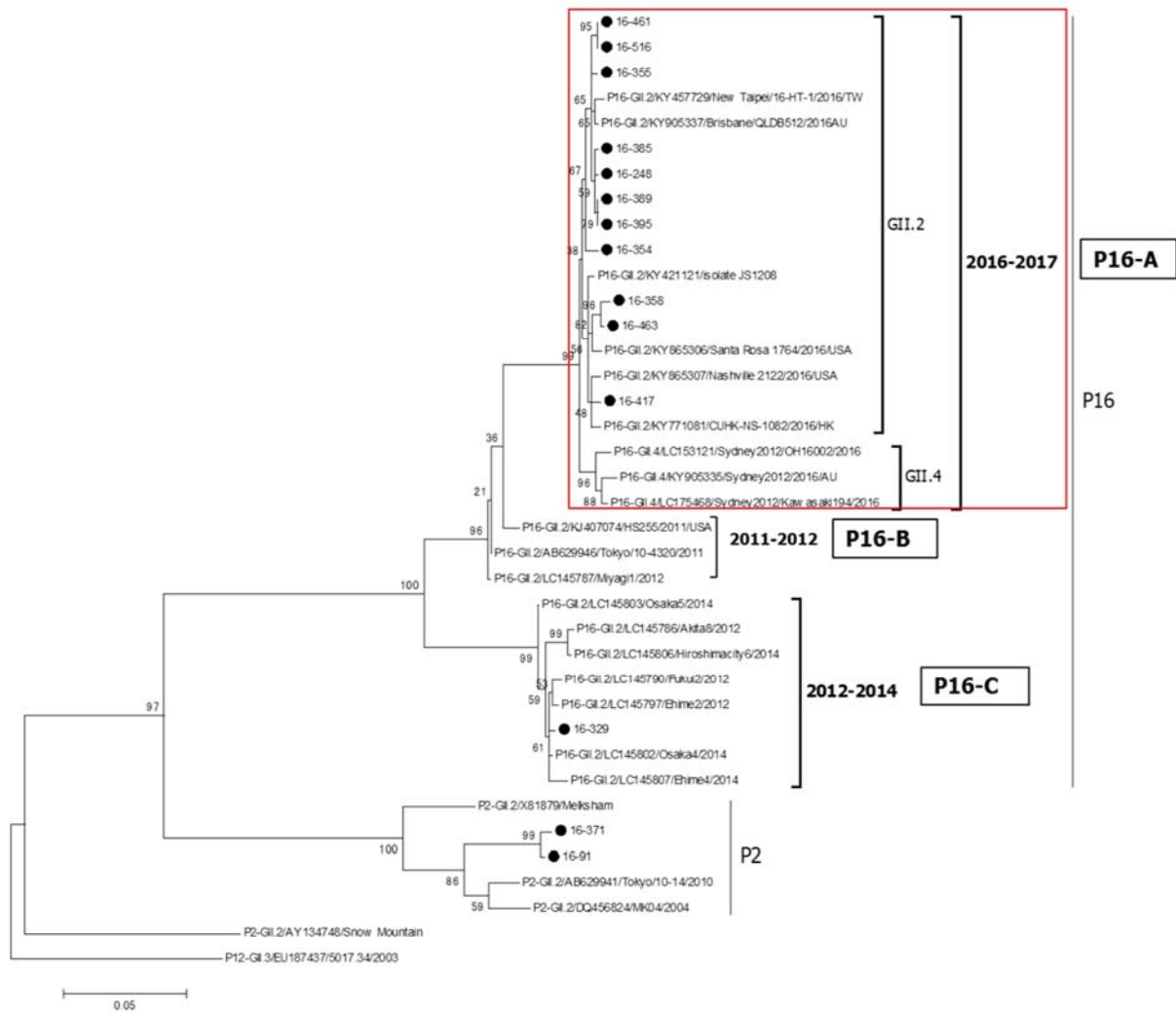


図 3 GII.2 の系統樹 (RdRp 領域 802 塩基)

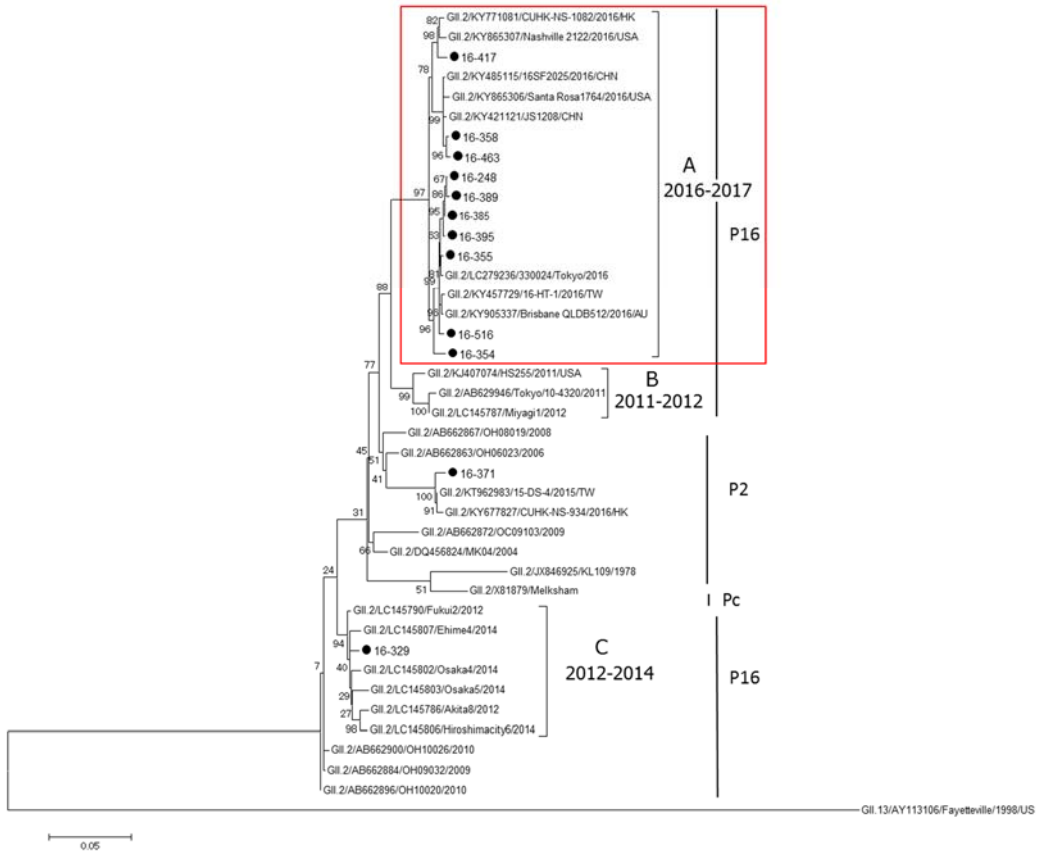


図4 GII.2 の系統樹 (ORF2 (VP1) 領域 1627 塩基)

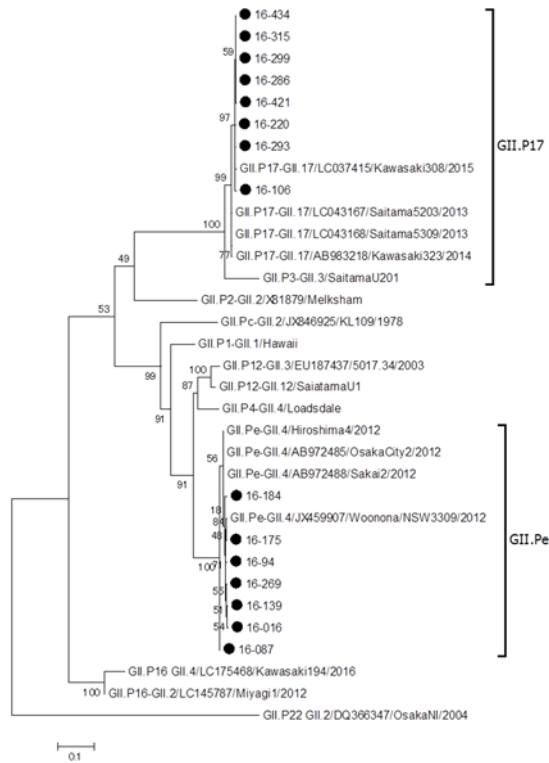


図5 GII.4_Sydney2012 亜株および GII.17 の系統樹 (RdRp 領域 858 塩基)

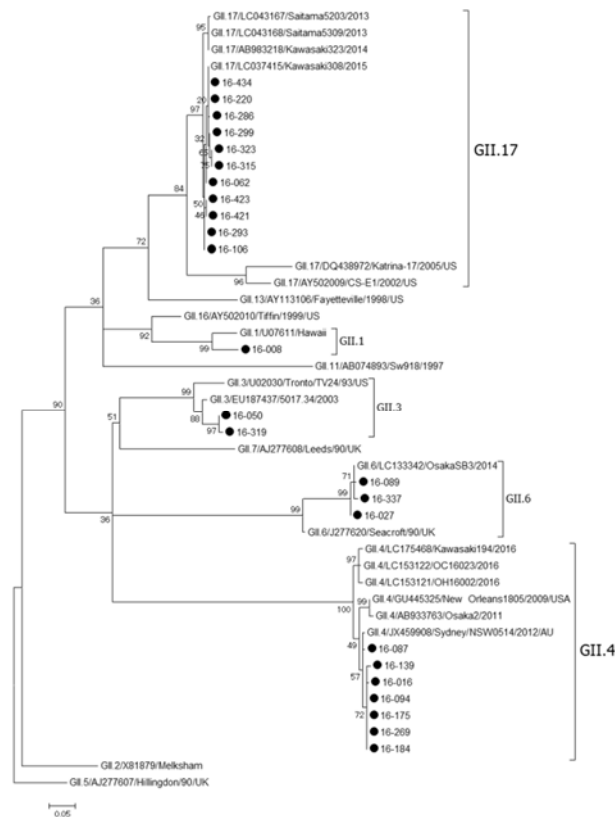


図6 GIIの系統樹 (GII.2を除く) (カプシド N/S 領域 282 塩基)

(3) GII.17 および GII.4_Sydney2012 亜株

GII.17 および GII.4_Sydney2012 亜株の RdRp 領域 (828 塩基) と GII.2 を除く NoV GII 遺伝子型のカプシド N/S 領域 (282 塩基) について系統樹解析結果を図 5, 6 に示す。

2016 年度検出された GII.P17-GII.17 は、両領域においてそれぞれ 1 つのクラスターを形成し、Kawasaki308 株 (LC037415) に近縁であった。

GII.Pe_GII.4_Sydney2012 亜株も同様に、両領域においてそれぞれ 1 つクラスターを形成し、RdRp 領域については NSW3309 株 (JX459907)、カプシド N/S 領域については NSW0514 株 (JX459908) にそれぞれ近縁であった。

GII.P17-GII.17 および GII.Pe_GII.4_Sydney2012 亜株は過去の検出株に近縁な株が継続して検出されたことが確認された。

4. GII.P16-GII.2 のアミノ酸配列

新たなクラスター (P16-A, A) を形成していた GII.P16-GII.2 のアミノ酸配列について、クラスター (P16-B, B) およびクラスター (P16-C, C) と比較した結果を表 2、表 3 に示す。

クラスター (P16-B, B)、クラスター (P16-C, C) と比較して異なる部位を色付けで示した。

(1) RdRp 領域

RdRp 領域の一部の領域 (262aa) において、クラスター (P16-A) はクラスター (P16-B) およびクラスター (P16-C) と 4 か所でアミノ酸の置換が見られ、293 番目が Serine (S) から Threonine (T)、332 番目が Valine (V) から Isoleucine (I) (16-417 は Valine)、357 番目が Lysine (K) から Glutamine (Q)、360 番目が Threonine (T) から Alanine (A) であった。さらにクラスター (P16-C) と 7 か所でアミノ酸配列に違いが認められた。

また同じクラスター (P16-A) に分類された GII.4 とはわずかに差異はあるが概ねアミノ酸配列は同じであり、GII.2 と GII.4 の間で組み換えが起こったことが示唆された。

(2) ORF2 (VP1) 領域

ORF2 (VP1) 領域 (542aa) においては、クラスター (A) はクラスター (B) の 4 株中の 3 株と比較して、2 か所 (319、440 番目) で Valine (V) から Isoleucine (I) へのアミノ酸置換が認

められたが (319 番目クラスター (A) の 1 株を除く)、1 株 (AB629941) とは同じアミノ酸配列であった。この株は他の部位でクラスター (A) とアミノ酸配列が異なっていた。

一方、クラスター (C) とは上述の 2 か所のアミノ酸は同じであったが、他の 7 か所 (71、335、344、354、400、448、541 番目) で異なっていた。

また、クラスター (A) 18 株中 9 株は、341 番目において Lysine (K) から Arginine (R) への置換がみられた。

5. 大阪府全域および全国における NoV 食中毒事件数およびその患者数の推移

2006 年度から 2016 年度の 11 年間の大阪府全域および全国における NoV 食中毒事件数および

その患者数の推移を図 7 に示す。

2016 年度は、昨年度に比べ NoV 食中毒事件数は大阪府全域では増加したが全国では減少し、NoV 食中毒患者数は大阪府全域および全国とも増加した。11 年間では、全国の NoV 食中毒事件数および患者数はともに 3 番目に少なかった。

これまで GII.4_2006b 亜株 (2006 年)、GII.4_New Orleans 亜株 (2009 年)、GII.4_Sydney2012 亜株 (2012 年)、GII.P17_GII.17 株 (2014 年) のように NoV 遺伝子に変異が入った新たな株が検出された年⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾は NoV 食中毒事件数が大きく増加する傾向が見られた。しかし 2016 年度は変異の入った GII.P16_GII.2 が検出され主要遺伝子型となったが、NoV 食中毒事件数の大幅な増加は見られなかった。

表 2 GII.P16 の RdRp 領域 (262aa) のアミノ酸配列比較

Cluster	Year	Name of strains	Amino acid number (RdRp region)															
			257	274	276	293	312	326	332	357	360	363	386	396	458	502		
P16-B	2010-2012	P16-GII.2LC145787/Myagi1/2012	A	I	A	S	A	K	V	K	T	K	N	T	I	N		
		P16-GII.2KJ407074/HS255/2011/USA	A	I	A	S	A	K	V	K	T	K	N	T	I	N		
		P16-GII.2/AB629946/Tokyo10-4320/2011	A	I	A	S	A	K	V	K	T	K	N	T	I	N		
P16-C	2012-2014	P16-GII.2LC145802/Osaka4/2014	A	T	A	S	S	N	V	K	T	R	D	S	I	S		
		P16-GII.2LC145790/Fuku2/2012	A	T	A	S	S	N	V	K	T	R	D	S	I	S		
		P16-GII.2LC145797/Ehime2/2012	A	T	A	S	S	N	V	K	T	R	D	S	I	S		
		P16-GII.2LC145803/Osaka5/2014	A	T	A	S	S	N	V	K	T	R	D	S	I	S		
		P16-GII.2LC145807/Ehime4/2014	A	T	A	S	S	N	V	K	T	R	D	S	I	S		
		16-329	A	T	A	S	S	N	V	K	T	R	D	S	I	S		
P16-A	2016	16-248	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		16-354	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		16-355	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	S		
		16-358	A	T	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	V	N		
		16-385	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		16-389	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		16-395	A	I	A	T	T	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		16-417	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		16-461	A	I	V	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		16-463	V	T	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		16-516	A	I	V	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		16-519	A	I	V	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		
		2016	P16-GII.2KY905337/BrisbaneQLDB512/2016/AU	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N	
			P16-GII.2LC279236/330024/Tokyo2016	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N	
P16-GII.2KY865306/Santa Rosa 1764/2016/USA	A		I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N			
P16-GII.2KY421121/Isolate_JS1208/2016	A		I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N			
P16-GII.2KY865307/Nashville 2123/2016/USA	A		I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N			
2016 (GII.4)	P16-GII.4LC153121/OH16002/2016	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N			
	P16-GII.4KY905335/2016/AU	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N			
		P16-GII.4LC175468/Kawasaki194/2016	A	I	A	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	I	N		

表 3 GII.2 の VP1 領域 (542aa) のアミノ酸配列比較

Cluster	Year	Name of strains	Amino acid number (VP1 region)																																												
			24	55	71	78	88	95	99	122	130	169	180	211	243	253	256	273	280	294	303	307	312	319	325	332	335	341	344	354	359	373	384	386	389	399	400	401	403	419	440	448	460	471	541		
B	2011-2012	GII.2/AB629946/Tokyo10-4320/2011	N	N	A	S	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	V	N	V	M	V	
		GII.2KJ407074/HS255/2011/USA	S	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	V	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	V	N	V	M	V	
		GII.2LC145787/Myagi1/2012	N	N	A	S	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	V	N	V	M	V	
		GII.2/AB629941/10-14/Tokyo2010	N	N	A	N	Y	L	Y	P	I	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V	
C	2012-2014	GII.2LC145786/Akita8/2012	N	N	S	N	Y	M	Y	A	V	S	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	K	T	A	V	I	T	N	P	T	D	H	N	T	I	T	V	M	I		
		GII.2LC145790/Fuku2/2012	N	N	S	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	K	T	A	V	I	T	N	P	T	D	H	N	T	I	T	V	M	I		
		GII.2LC145803/Osaka4/2014	N	N	S	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	D	H	N	T	I	T	V	M	I	
		GII.2LC145803/Osaka5/2014	N	N	S	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	K	T	A	V	I	T	N	P	T	D	H	N	T	I	T	V	M	I		
		GII.2LC145806/Hoshima6/2014	S	I	S	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	K	T	A	V	I	A	N	P	T	D	H	N	T	I	T	V	M	I		
		GII.2LC145807/Ehime4/2014	N	N	S	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	K	T	A	V	I	T	N	P	T	D	H	N	T	I	T	V	M	I		
		16-329	N	N	S	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	V	K	T	A	V	I	T	N	P	T	D	H	N	T	I	T	V	M	I		
A	2016-2011	16-248	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		16-354	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		16-355	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		16-358	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		16-385	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		16-389	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		16-395	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		16-417	N	N	A	N	F	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	I	V		
		16-463	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		16-516	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
				GII.2KY421121/US1208/CHN	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V
				GII.2KY457291/HS-1102/16/TH	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V
				GII.2KY485115/HSF2025/2016/CHN	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V
				GII.2KY71081/CLH/KNS-1082/2016/HK	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V
		GII.2KY865306/Santa Rosa 1764/2016/USA	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		GII.2KY865307/Nashville 2122/2016/USA	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	K	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		GII.2KY905337/Brisbane QLD8512/2016/AU	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		
		GII.2LC279236/330024/Tokyo2016	N	N	A	N	Y	M	Y	A	V	N	A	D	P	P	V	Q	V	L	V	N	P	I	V	V	I	R	S	G	V	I	T	N	P	T	E	H	N	T	I	N	V	M	V		

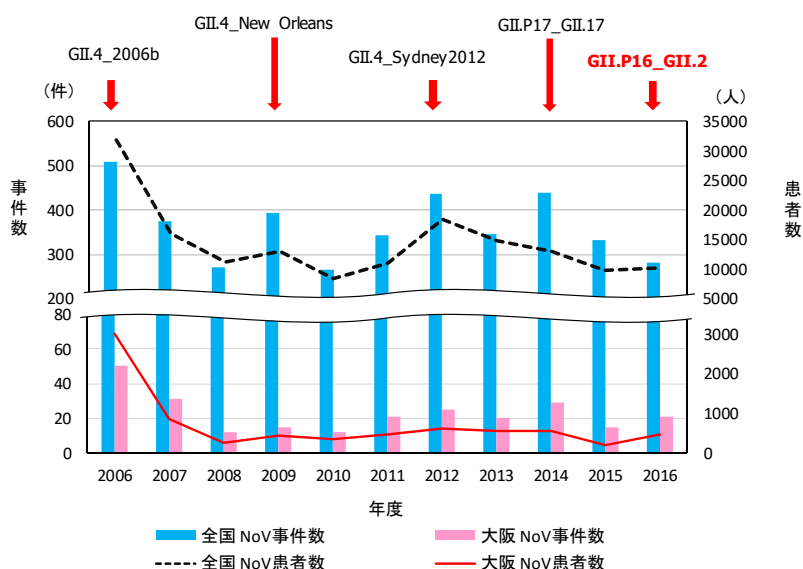


図7 大阪府全域および全国における NoV 食中毒事件数および患者数の推移 (2006～2016 年度)

考 察

2012 年度以降、大阪府において NoV 食中毒事例では GII.4_Sydney2012 亜株や GII.17 が主要な遺伝子型であったが、2016 年度は例年、食中毒事例では検出数が少ない GII.2 が冬季に急増し、食中毒事例の約半数を占めた。

当所では、発生動向調査に基づく散発性胃腸炎症例や集団発生事例について調査を行っているが、2016 年は主に小児年齢層が対象である感染性胃腸炎の定点医療機関あたりの患者数が過去 10 年で最も多く、GII.2 が主要な遺伝子型であった。また感染性胃腸炎集団発生の施設別においては、保育所・幼稚園、小学校での集団発生患者数は多かったが、老人ホームや社会福祉施設などの高齢者施設では少なかった。この傾向は国立感染症研究所で報告されている^{16) 17)} 全国の傾向と一致していた。

主に成人年齢層が対象である NoV 食中毒事例においても、GII.2 による患者数が増加したことから成人年齢層においても流行したことが示唆された。しかし食中毒事件数および患者数は過去 11 年で 3 番目に少なく、流行規模は大きくなかったと推測される。すなわち年齢層によって流行状況に差があったと考えられ、このことは、年齢層によって流行する遺伝子型に差異があり

GII.2 は小児年齢層で流行する遺伝子型の 1 つであること¹⁸⁾ とよく一致する。

成人年齢層で少なかった理由として、GII.2 の ORF2 (VP1) 領域のアミノ酸置換により抗原性が変化したため成人年齢層においても感染者が増加したが、抗原性の変化は小さく、過去の GII.2 感染による免疫応答¹⁸⁾により大きく流行しなかったと推察された。

しかし、(i) RdRp 領域の点変異により NoV にとって、有利な方向へ変化したのではないかと推測され、(ii) 2011 年以降 GII.2 は大きな流行がなく感受性者が蓄積していたこと、以上より、小児年齢層で流行が拡大した可能性が考えられた。

NoV の流行状況は遺伝子型や年齢層により異なるため、その動向を早期にとらえ流行拡大の防止対策をとることが重要であり、遺伝子型と流行の関連性について情報集積を継続して行うことが大切であると考えられる。

分 献

- 1) Green KY. Caliciviridae: The Noroviruses. Fields Virology, 5th ed., (eds. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B and Straus SE), Lippincott Williams & Wilkins; 2007: pp.949-979.

- 2) 厚生労働省 4.食中毒統計資料
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 3) 国立感染症研究所. ノーウォークウイルス (ノロウイルス) の遺伝子型 (2015年改訂版), 病原微生物検出情報(IASR), 2015年9月8日
<http://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrs/5913-pr4274.html>
- 4) Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology* 1992; **66**: 6527-6532.
- 5) Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology* 2013; **158(10)**: 2059-2068.
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発第 0514004 号「NoV の検出法について」, 平成 19 年 5 月 14 日
- 7) 田村務、渡邊香奈子、田澤崇、渡部香、広川智香、吉澄志磨、横井一、森功次、入谷展弘、藤井慶樹、木内郁代、加藤聖紀、仁平稔、野田衛. ノロウイルス GII/4 の新しい変異株の遺伝子解析と全国における検出状況. 病原微生物検出情報(IASR). 2012; **33**: 333-334.
- 8) Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan YH, Katayama K, Shimizu H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill* 2015; **20(26)**: pii: 21173.
- 9) Mizukoshi F, Nagasawa K, Doan YH, Haga K, Yoshizumi S, Ueki Y, Shinohara M, Ishikawa M, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Ochi A, Murakami K, Ryo A, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of Human Norovirus Genotype GII.2 in Japan during 2004-2015. *Front Microbiol* 2017; **8**: 705.
- 10) Motomura K, Boonchan M, Noda M, Tanaka T, Takeda N; Norovirus Surveillance Group of Japan. Norovirus epidemics caused by new GII.2 chimera viruses in 2012-2014 in Japan. *Infect Genet Evol.* 2016; **42**: 49-52.
- 11) Yuanyun Ao, Jinjin Wang, Hua Ling, Yaqing He, Xiaogeng Dong, Xuan Wang, Jingyao Peng, Hailong Zhang, Miao Jin, and Zhaojun Duan. Norovirus GII.P16/GII.2 - Associated Gastroenteritis, China, 2016. *Emerg Infect Dis* 2017; **23(7)**: 1172-1175.
- 12) Luke Tzu-Chi Liu, Ting-Yu Kuo, Ching-Yi Wu, Wan-Ting Liao, Aron J. Hall, and Fang-Tzy Wu. Recombinant GII.P16-GII.2 Norovirus, Taiwan, 2016. *Emerg Infect Dis* 2017; **23(7)**: 1180-1183.
- 13) Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, Shimizu H. Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. *Genome Announc.* 2016; **4(5)**: e01099-16.
- 14) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman SG, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of Monomorphic and Divergent Haplotypes in the 2006-2007 Norovirus GII/4 Epidemic Population by Genomewide Tracing of Evolutionary History. *J. Virol.* 2008; **82(22)**: 11247-11262.
- 15) van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinjé J, White PA, Koopmans M; NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill* 2013; **18(1)**: 8-9.
- 16) 国立感染症研究所 感染症発生動向調査週報 (IDWR)
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/10/2096-weeklygraph/1647-04gastro.html>
- 17) 国立感染症研究所 病原微生物検出情報 (IASR)
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html>
- 18) Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, et al. Impact of Genotype-Specific Herd

Immunity on the Circulatory Dynamism of
Norovirus: A 10-Year Longitudinal Study of Viral
Acute Gastroenteritis. *J. Infect. Dis* 2015; **211**:
879–888.

「WEB サイトの内容は 2017 年 8 月 16 日に確
認した」

Epidemic and Molecular Epidemiological Analysis of Norovirus Outbreaks in Case of Food Poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2016 Report)

Rika TAKADA ^a, Naomi SAKON ^a, Keiko NAKATA ^a, Kazushi MOTOMURA ^a and Takahiro YUMISASHI ^a.

Norovirus is a leading cause of acute gastroenteritis in the world. In 52 out of 97 suspected cases, norovirus were detected in our institute during 2016 epidemic season. We conducted comprehensive genome analysis to perform a molecular epidemiological study. As the results, GII.2 was found to be the most prevalent genotype (25/52: 48.1%), followed by GII.17 (11/52: 21.2%) and GII.4_Sydney2012 (7/52: 13.5%). GII.2 strains were further analyzed for sequence of RdRp region (14 strains) and whole capsid region (11 strain). Regarding to above analysis, 12 strains of GII.2 were determined to be GII.P16_GII.2 and 2 strains were GII.P2_GII.2. According to phylogenetic analysis, 11 strains belonged to a single cluster (P16-A) that is distantly related to GII.P16_GII.2 identified in the past study. Comparison of amino acid sequences of our samples with the past epidemic strains showed that 4 amino acids substituted in the RdRp region (262 amino acids) and 2 amino acids in the VP1 region (542 amino acids), respectively. In the winter season in 2016, GII.P16_GII.2 strain was prevalent among food-poisoning cases, especially for the children less than 11 years old in Osaka area, while GII.Pe_GII.4_Sydney 2012 subtype, which was a pandemic strain during 2012-2013 season, has not been identified. The study revealed that the minor changes of ability in replication and antigen might have caused outbreaks in Osaka area in 2016.

Key words : Norovirus, food poisoning, genotype

a Osaka Institute of Public Health

大阪府内における 2016/2017 シーズンのインフルエンザ流行状況

森川佐依子、廣井聡、弓指孝博

2016/17 シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの流行は、2016 年第 47 週に定点あたり患者数 1.0 を越え、2017 年第 4 週をピーク(定点あたり 39.80)として漸減した。例年に比較して、定点あたり 1.0 を下回ったのは遅く、2017 年第 19 週以降であった。2016 年第 36 週から 2017 年第 26 週に搬入された検体は 291 検体で、254 検体(87.3%)からインフルエンザウイルスが検出された。内訳は AH3 亜型 86.2%(219 検体)、AH1pdm09 亜型 4.3%、B 型 Victoria 系統 4.3%、同 Yamagata 系統 5.1%であった。A 型流行株について、HA 遺伝子全長の系統樹解析を行った結果、いくつかの特徴的なアミノ酸置換を伴うグループに分類された。各グループの多様性は、全国の分離株を解析した報告と同様の傾向であった。インフルエンザウイルス陰性の 37 検体のうち、11 検体から 1 種類、5 検体から 2 種類の呼吸器ウイルスが検出された。今冬は、ヒトメタニューモウイルスの検出が目立った。

キーワード：インフルエンザウイルス、病原体サーベイランス、HA 全長、系統樹解析、呼吸器ウイルス

インフルエンザはインフルエンザウイルスによって引き起こされる急性熱性の呼吸器疾患である。インフルエンザでは、世界的に大流行を起こす「パンデミックインフルエンザ」が注目されがちであるが、季節性インフルエンザも、流行規模の大小はあるものの、日本では毎冬流行を繰り返し、過去 3 年間においても、推計で毎年約 1500 万人が医療機関を受診していると考えられる¹⁾。特に高齢者のインフルエンザ流行関連の冬期超過死亡や、小児での重症呼吸器疾患の主要因となっており、季節性インフルエンザ対策は我が国の医療施策において重要な課題である。インフルエンザワクチンは感染や発症そのものを完全には防御できないが、重症化や合併症の発生を予防する効果が証明されている^{2),3)}。インフルエンザ流行株サーベイランスは WHO 世界インフルエンザ監視・対応システム(Global Influenza Surveillance and Response System: GISRS)によって、地球規模で実施されており、このサーベイランスの結果をもとに流行予測とワクチン株選定が行われている。

当課は、国立感染症研究所との共同研究である「厚生労働省発生動向調査に基づくインフルエンザサーベイランス」事業の一環として、毎冬の流行期に流行規模、流行株の分離、型別を行っており、ここで 2016/2017 シーズンの大阪府内のインフルエンザの流行について報告する。さらに、A 型インフルエンザウイルスが検出された検体および分離株の一部を用いて各亜型別に HA 遺伝子全長部分の分子系統樹解析を行ったので併せて報告する。

研 究 方 法

1. インフルエンザ定点サーベイランス
感染症発生動向調査事業に則り、大阪府感染症情報センターから発出される患者情報を用いた⁴⁾。
2. インフルエンザ病原体サーベイランス
感染症発生動向調査事業に基づき、大阪府内のインフルエンザ指定提出機関、および各保健所からの学級閉鎖等集団発生事例より搬入され

た上気道由来検体を対象とした。

2016/17年インフルエンザシーズンのうち、2016年第36週～2017年第26週に得られた291検体を対象とした。集団発生は1事例を1検体、同一患者から複数検体が搬入された場合は一人につき1検体として集計した。

3. ウイルス遺伝子検査

搬入された上気道由来検体の200 μ Lを核酸抽出に供した。核酸抽出はMagDEA Viral DNA/RNA200(GC)キット(プレジジョン・システムサイエンス社)を用い、全自動核酸抽出機にて行った。抽出した核酸はインフルエンザ診断マニュアル⁵⁾に従い、リアルタイム RT-PCR法によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出を行った。インフルエンザウイルスの検出が陰性であった検体については、リアルタイム PCR法によるその他の呼吸器ウイルスの検出を行った⁶⁾。本法では、エンテロウイルス(EV)およびライノウイルス(RV)は共通領域を検出するため、陽性となった場合は、核酸を用いてVP4-2領域に対するsemi-nested RT-PCRを行い、増幅産物のダイレクトシーケンスにて遺伝子配列を決定し、BLASTにて型別を行った⁷⁾。増幅産物が得られなかった場合、「EV/RV not typed」とした。

4. ウイルス分離培養と分離株の解析

24ウェルプレートに単層培養したMadin-Darby Canine Kidney (MDCK)細胞および、MDCK細胞にヒト2,6-シアル酸転移酵素cDNAをトランスフェクションし、細胞表面の糖鎖末端をアルファ2-6結合のシアル酸が多く占めるよう作製されたMDCK-SIAT1細胞⁸⁾(ともにDSファーマバイオメディカル)に各ウェル300 μ Lの検体を接種し34 $^{\circ}$ C、30分吸着後、分離用培地である3 μ g/mLアセチルトリプシン(SIGMA)添加DMEM(SIGMA)に培地を交換し、34 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で1週間培養しCPEを観察した。CPEが観察された場合、培養上清を回収し、型別に供した。CPEが観察されない場合は盲継代を行い、2代目でCPEが観察されない場合は、分離陰性とした。

CPEが陽性であった培養上清は、3 μ Lを蒸留水にて50倍に希釈し、その5 μ Lを検体として、直接リアルタイム RT-PCRを行い型別した。

また、A型分離株の一部、もしくは陽性検体からRNAを抽出後、HA遺伝子の全長の塩基配列を決定し、インフルエンザウイルス遺伝子データベースGISAID(Global Initiative on Sharing All Influenza Data)⁹⁾から入手したワクチン株、昨年度の流行株とともに系統樹解析を行った。

結 果

1. 大阪府内のインフルエンザ流行状況とインフルエンザウイルス検出結果

2016/17シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの検出開始時期は2016年第40週からで、定点あたり患者数が1.0を越えたのは第47週～2017年第18週であった(図1)。過去2シーズンと比較すると、患者数の推移、流行期間は2014/15シーズンに類似しており、同シーズンも主流行はAH3亜型であり、B型が散発的に見られたシーズンであった。患者数は2017年第4週、5週をピークとしてその後漸減したが、例年に比較して終息するまでの期間は長く、第29週にかけて断続的にB型の検出が見られた。

2016年度より感染症法が改正され、インフルエンザ検体は指定提出機関から定められ、当所へは政令市、中核市を除く小児科9定点、内科5定点の府内14定点および、中核市である高槻市、豊中市、枚方市の小児科、内科各1定点から検体が搬入されることとなった。

感染症法の改正に伴い、搬入された全検体に対し遺伝子検査を行い、一部を分離培養に供する事と定められた。当所においても、法に従い、検体搬入後、全例にリアルタイム RT-PCRによる検出を行い、同時に細胞による分離培養を開始した。その結果、臨床的もしくは迅速診断キットにてインフルエンザと診断され、流行期に当所に搬入された291検体のうち、87.3%にあたる254検体からインフルエンザウイルスが検出された。

一方、ウイルス分離については、シーズン当初、MDCK細胞を用いて分離を行っていたが、AH3亜型において、リアルタイム RT-PCR陽性検体からの分離率が低かった(11/23, 47.8%)ため、AH3亜型陽性の検体に対して、MDCK SIAT-1を用いた分離培養に変更したところ、分離率が回復した(184/197, 93.4%)。今シーズンのAH3亜

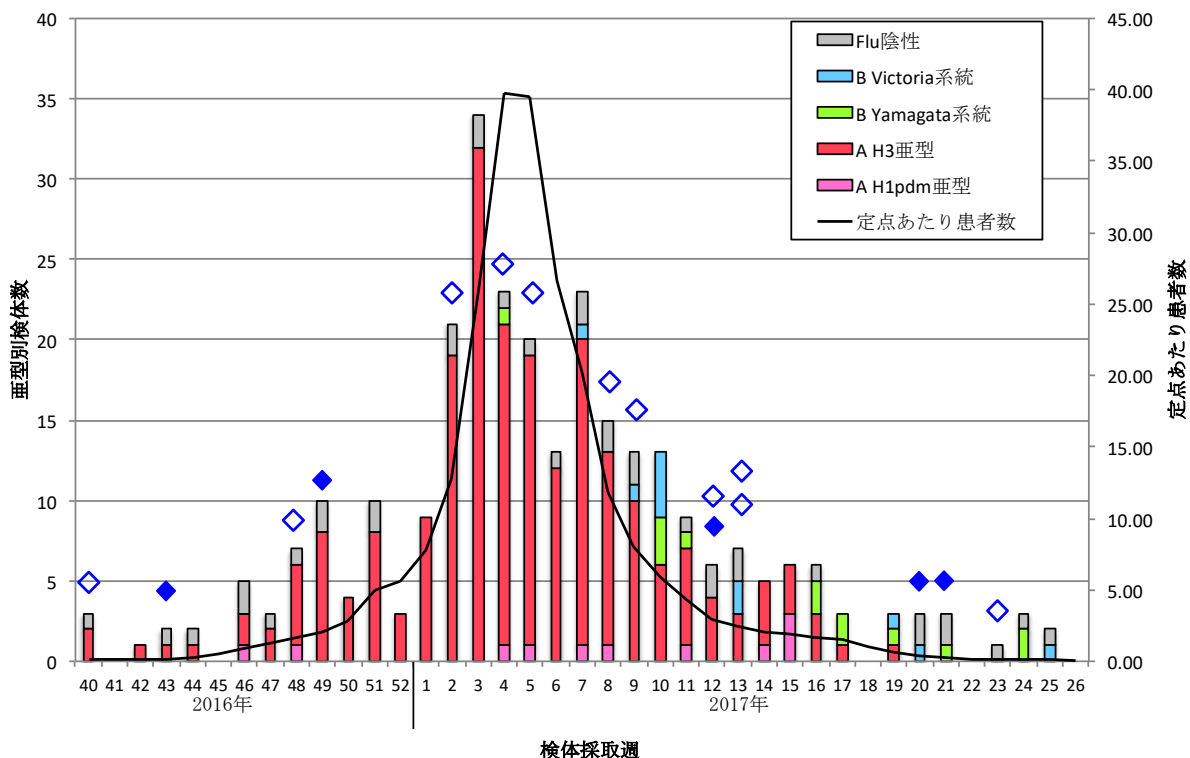


図 1. 2016 年第 40 週～2017 年第 26 週のインフルエンザウイルス検出状況と定点あたり患者数の推移棒グラフ上に、インフルエンザウイルス(Flu)陰性であった検体からその他の呼吸器ウイルスが 1 種(◇) または 2 種(◇●) 検出された事を示す。ウイルス種は表 1 に掲載。

型の分離株は、分離培養時に明らかな CPE が観察され、十分にウイルスが増殖していると考えられる場合であっても、赤血球凝集活性(HA 活性)が低く、赤血球凝集抑制(HI)試験に用いる 8HA 単位/50uL を満たさない株がほとんどであった。また、細胞種の変更で分離株の HA 活性は改善されなかった。そのため、「AH3 分離株の遺伝子検査の簡便化とコスト削減に関する情報提供」¹⁰⁾を参考に、分離株の型別を細胞上清の 50 倍希釈液を用いてリアルタイム RT-PCR にて行った。

最も多かったのは AH3 亜型で 86.2%(219 検体)を占め、ほぼ単独流行であったことが伺えた。地域小流行的に AH1pdm09 亜型(4.3%)、B 型 Victoria 系統(4.3%)、同 Yamagata 系統(5.1%)が検出された。

2. 分離株の解析

AH1pdm09 亜型ウイルスについては、分離株

数が少なく、国立感染症研究所で実施された当所からの今年度の分離株 2 株を加えた 7 株全てと、分離は陰性であったが、リアルタイム RT-PCR にて AH1pdm09 亜型と判定された 4 検体および、昨シーズンの分離株 3 株から得られた計 14 の HA 全長のシーケンスを、GISAID から得られた、今年度までのワクチン株 A/California/7/2009 と次年度の WHO 推奨ワクチン株 ¹¹⁾A/Michigan/45/2015 のシーケンスとともに系統樹解析を実施した(図 2)。解析に用いた臨床株のシーケンスは昨シーズンに引き続き、全てサブクレード 6B に属し、その内、今シーズンの 1 株が 6B.2 に属したが、残りの 10 株は S84N, S162N, I216T のアミノ酸置換を持つ 6B.1 に属した。サブクレード 6B.1 内で集団はさらに分岐し、A215G または A215E 置換を持つグループと、共通のアミノ酸置換を持たないグループを形成した。4 月に入ってから検出された A/Osaka/170/2017～172/2017 および、検体 290011

表 1. インフルエンザウイルス陰性検体からの他の呼吸器ウイルス検出状況

検体採取週		検出ウイルス
2016年	第40週	ヒトメタニューモウイルス (老人福祉施設集団発生)
	第43週	C群ライノウイルス + コロナウイルスNL63 重感染
	第48週	コロナウイルスOC43
	第49週	アデノウイルス + EV/RV not typed 重感染
2017年	第2週	コロナウイルスNL63
	第4週	A群ライノウイルス
	第5週	ヒトメタニューモウイルス
	第8週	アデノウイルス
	第9週	アデノウイルス
	第12週	アデノウイルス
	第13週	ヒトメタニューモウイルス + ヒトボカウイルス 重感染 ヒトメタニューモウイルス コロナウイルスOC43
	第20週	ヒトメタニューモウイルス + B群ライノウイルス 重感染
	第21週	ヒトパレコウイルス + C群ライノウイルス 重感染
	第23週	C群ライノウイルス

はともに南河内地区の定点病院で採取された検体であるが、N451T, K454R の共通のアミノ酸置換を持ち、地域での 1 つの流行を反映していると思われた。

AH3 亜型ウイルスについては、豊能・三島地区、北河内・中河内地区、南河内・泉州地区の 3 地区内の各 1 定点からの 12 月、1 月初旬、中旬、2 月初旬、中旬、3 月初旬～中旬の 6 時点で採取された分離株の HA 遺伝子の全長についてダイレクトシーケンスを実施し、国立感染症研究所で実施された当所からの分離株および、過去 5 シーズンのワクチン株とともに系統樹解析を実施した。変異の傾向を見る上で、上述の 3 定点以外より 5 月、7 月に分離された株についても検討に加えた(図 3)。解析に用いた 20 株は全株とも、サブクレード 3C.2a に属しており、その中の 75%(15 株)が、サブクレード 3C.2a から派生し、アミノ酸の置換、N171K, I406V, G484E を特徴とするサブクレード 3C.2a1 に属していた。一部の例外があるものの、K92R, N121K, H311Q, I406V の共通のアミノ酸置換を持つグループに属する株は、2017 年 3 月以降の株が多く、今後このグループから主流株が出現する可能性があると考えられた。AH3 亜型では、同一地区のみで形成されたグループは無く、流行の地域が AH1pdm

09 亜型と比較して広いことが推察された。A/Osaka/109/2017 は、今回検討した定点ではない中河内地区の定点より分離された株であるが、国立感染症研究所での中和試験による抗原解析の結果¹²⁾、2016/17 シーズンワクチン株である、A/Hong Kong/4801/2014 と比較して抗原変異株と判定された。国立感染症研究所にて実施された AH3 亜型株の中和試験による詳細な抗原解析結果は、随時還元されている。7 月 10 日現在、大阪府内で分離された株については、12 株が解析されているが、変異株と判定されたのは A/Osaka/109/2017 株のみであった。同株は Y94H, I230V, A372S のアミノ酸置換を持ち、同じグループに 2 月に北河内の定点で分離された 2 株が含まれている。3 月以降の分離株はこのグループに属する株がなかったが、この抗原変異株を含むグループが今後、流行するのか注目される。

3. インフルエンザウイルス以外の呼吸器ウイルスの検出

期間中にインフルエンザウイルスが検出されなかった 37 検体のうち、16 検体からその他の呼吸器ウイルスが検出された(図 1、表 1)。11 検体からは 1 種類のウイルスが検出され、5 検体からは 2 種のウイルスが検出された。最も多く検出

されたのは、ヒトメタニューモウイルス 5 検体であった。その内の 2 検体は他のウイルスが同時に検出されていた。

第 40 週に検出されたヒトメタニューモウイルスは、老人福祉施設での集団発生の原因であった。次いで多かったのは、アデノウイルスであり、4 検体から検出された。他に、コロナウイルス OC43 および NL63、ライノウイルス A 群～C 群、ボカウイルス、パレコウイルス、EV/RV not typed が検出された。

考 察

2016/17シーズンの大阪府内でのインフルエンザの流行期は、定点あたり患者数が 1.0 を越えた 2016 年第 47 週～2017 年第 18 週であった。ウイルス検出の結果、AH3 亜型が検出されたウイルスの 86.2%を占めた。AH1pdm09 亜型は 4.3%、B 型 Victoria 系統は 4.3%、同 Yamagata 系統は 5.1% 検出され、AH3 亜型が大きく流行しピークも一峰性となった。国の全国報告¹⁾においても、今シーズンのインフルエンザは AH3 亜型が主流であり、全体の 85%を占めたと報告されている。定点あたりの患者数の推移も、2016 年第 46 週に 1.0 を上まわった後、2017 年第 4 週をピークとして漸減しており、大阪府内と同様の傾向であった。このことから、2016/2017 シーズンは、AH3 亜型のほぼ単独の流行であったために、全国的に一斉に流行が見られたと考えられた。近年流行している AH3 亜型においては、全国的に HA 活性の低下が問題となっている。当所では、シーズン初めに、リアルタイム RT-PCR 陽性検体からの分離率が低く、MDCK SIAT-1 を用いた分離培養に変更し、分離率の回復を見た。しかしながら、細胞種の変更後も分離株の HA 活性は 8HA 単位/50uL を満たさない株が大半を占めた。このことより、細胞表面のレセプターへの結合効率に関与する HA タンパク上のアミノ酸と、血球に対し HA 活性を示す部位のアミノ酸は、HA タンパク質上の異なる部位に存在するか、それぞれが結合に必要な立体構造が異なっているか、または、感染に必要な結合力と、赤血球凝集に必要な結合力に差があることが示唆された。

A 型インフルエンザウイルスの HA タンパク

質について行った遺伝系統樹解析では、AH1pdm09 亜型ウイルスに関しては、検討に供した 2016/17シーズンの大阪府内の分離株 7 株およびリアルタイム RT-PCR で陽性であった 4 検体のうち 1 株のみが 6B.2 クレードに属し、他の 10 株が 6B.1 クレードに属していた。国立感染症研究所より発表された 2016/17 シーズンの全国での分離株の系統樹解析情報では¹³⁾、6B.2 クレード(V152T, V173I, E491G, D501E)に属する株の検出は無いことから、2016 年 11 月採取の検体「280389」の HA 遺伝子は、昨シーズンの流行の名残なのか、今後も 6B.2 クレードに属するウイルスが再度検出されるのか、注目される。

AH3 亜型については解析に用いた 20 株は全株とも、サブクレード 3C.2a に属しており、その中の 75%がサブクレード 3C.2a1 に属していた。全国での分離株の系統樹解析情報でも解析株の 66.7%がサブクレード 3C.2a に属しており、同様の傾向が示された。大阪府内で流行期後半に主に見られた、K92R, N121K, H311Q, I406V のアミノ酸置換と類似の置換を持つグループは、全国からの分離株の中にも出現しているが、全国の株の解析では、その他にも N121K, G142R, G479E を持つグループ、Y94H, F193S, I230V, A372S を持つグループが出現している。従って、今回の株数では HA アミノ酸置換の多様化を全て追うことが難しく、検索する株数を増やす必要があると考えられた。しかしながら、全国の株にみられた Y94H, F193S, I230V, A372S を持つグループの一部の置換が同じ、Y94H, I230V, A372S のアミノ酸置換を持つグループは大阪の解析株に存在しており、2016/2017 シーズンワクチン株の抗原変異株と判定された A/Osaka/109/2017 株と、2 月に北河内の定点で分離された 2 株が含まれている。インフルエンザウイルスの流行株は、抗体から回避できる株が選択されるため、このグループから流行株が選択されるか継続して調査したい。

A 型インフルエンザウイルスの流行形態は「global migration」と表現されるように、世界各地の流行株の変異が、地域ごとに異なるのではなく、ある流行株から派生した変異ウイルスの中から、常に 1 種類のウイルス株が世界中でほぼ同時に選択淘汰されて次の流行株となる事が示されている¹⁴⁾。大阪府内の分離株で見られた

以外のグループから次の流行株が出現する可能性もあり、できるだけ多数の流行株を解析することが必要であることが再確認された。

医療機関にてインフルエンザと診断されたが、インフルエンザウイルスが陰性であった検体から、他の呼吸器ウイルスの検出を試みた。過去2シーズンにわたりインフルエンザウイルス陰性検体から呼吸器ウイルスを検索したところ、2014/15シーズンはRSウイルス、ヒトメタニューモウイルスの検出が多かったのに対し、2015/16シーズンでは、アデノウイルス、C型インフルエンザウイルスが目立っていた¹⁵⁾。今回の検討では、2016/17シーズンは、ヒトメタニューモウイルス、アデノウイルスの検出が多かった。C型インフルエンザウイルスについては日本では偶数年の冬から初夏にかけて流行することが知られているが¹⁶⁾、ヒトメタニューモウイルスについても同様に隔年の春に流行する事が伺えた。2016/17シーズンは、老人福祉施設における呼吸器疾患の集団発生の原因として本ウイルスが検出されており、インフルエンザウイルスやRSウイルスと同様、抵抗力の低い小児や老人の集団生活の場において、ウイルスの持ち込みに注意する必要がある。インフルエンザと診断されたが、インフルエンザウイルスが検出されなかった37検体については、インフルエンザワクチンの有効性を低く判定する要因となることが考えられるため、流行期にあっても他のウイルスが検出されることを念頭に置かなければならない。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働行政推進調査事業費補助金「ワクチンの有効性・安全性評価とVPD (vaccine preventable diseases) 対策への適応に関する分析疫学研究」の一環として行われた。

本研究において、検体採取、情報提供、諸連絡等に携わって頂きました、すべての皆様に深謝致します。

文 献

- 1) 厚生労働省 情報提供 「今冬のインフルエンザについて(2016/17シーズン)」
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/influenza/>

dl/2016_17season.pdf

- 2) 国立感染症研究所 IDWR 感染症の話「インフルエンザとは」
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/219-about-flu.html>
- 3) 6歳未満児におけるインフルエンザワクチンの有効性:2013/14および2014/15シーズン(厚生労働省班研究報告として)福島若葉 IASR Vol. 37 p.230-231: 2016年11月号
- 4) 大阪感染症情報センター インフルエンザ情報
<http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/influ/shingata.html>
- 5) 国立感染症研究所 インフルエンザ診断マニュアル(第3版) 平成26年9月 6.2 リアルタイム RT-PCR(TaqMan Probe法)による同定 p.24-28
- 6) S. Morikawa, S. Hiroi, T. Kase. Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *Journal of Clinical Virology*. 2015; **64** : 59-63.
- 7) H. Ishiko, Y. Shimada, M. Yonaha, O. Hashimoto, A. Hayashi, K. Sakae, N. Takeda. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 2002; **185**(6): 744-754.
- 8) Mikhail Matrosovich, Tatyana Matrosovich, Jackie Carr, Noel A. Roberts, and Hans-Dieter Klenk . Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors . *Journal of Virology*. 2003; **77**: 8418-8425
- 9) GISAID (The Global Initiative on Sharing All Influeza Data) Epi Flu™
<http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#1832a9>
- 10) 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 連絡文書 「AH3分離株の遺伝子検査の簡便化とコスト削減に関する情報提供」平成27年3月5日
- 11) WHO Recommended composition of Influenza virus vaccines for use in the 2017-2018 northern hemisphere influenza season.
<http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/rec>

- ommendations/2017_18_north/en/
- 12) 厚生労働省 NESID 「病原体検出システム」
全国データダウンロード
- 13) 国立感染症研究所 HP 感染症情報 インフル
エンザウイルス流行株抗原性解析と遺伝子
系統樹 2017年6月26日
インフルエンザウイルス研究センター
第一室 全国地方衛生研究所
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-m/flutoppage/2382-flu/flu-antigen-phylogeny/7345-2017-2-25.html>
- 14) Nelson MI., Simonsen L., Viboud C., Miller
MA., Holmes EC. Phylogenetic analysis
reveals the global migration of seasonal influenza
A viruses. *PLoS Pathogens* 2007; Sep 14; **3**(9):
1220-8

- 15) 厚生労働行政推進調査事業費補助金 ワク
チンの有効性・安全性評価と VPD(vaccine
preventable diseases)対策への適応に関する分
析疫学研究 平成 28 年度分担研究報告書
- 16) Matsuzaki Y, Sugawara K, Abiko C, Ikeda T,
Aoki Y, Mizuta K, Katsushima N, Katsushima
F, Katsushima Y, Itagaki T, Shimotai Y, Hongo S,
Muraki Y, Nishimura H. Epidemiological
information regarding the periodic epidemics of
influenza C virus in Japan (1996-2013) and the
seroprevalence of antibodies to different
antigenic groups. *J Clin Virol.* 2014; **61**(1):
87-93.
- WEB サイトの内容は 2017 年 8 月 23 日に確認し
た。

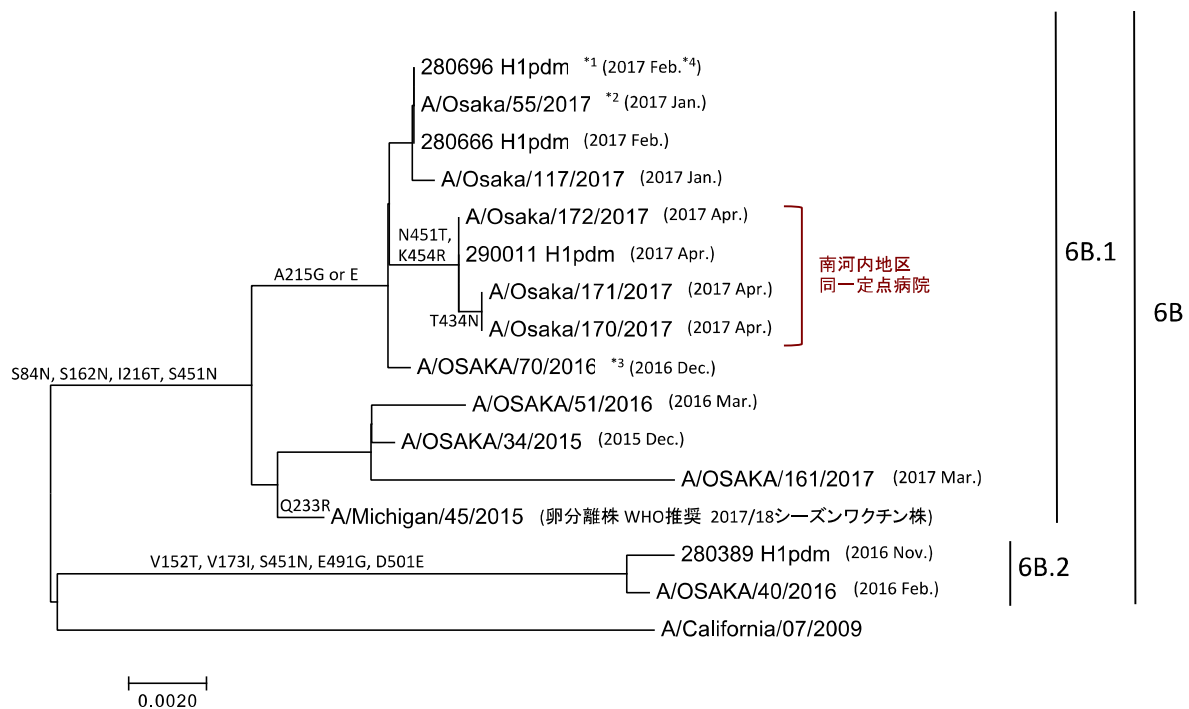


図 2. A H1pdm 亜型 HA 全長の遺伝子系統樹解析

- *1 6桁の数字は、分離陰性のため直接検体中の RNA から HA 遺伝子を検出した株の検体番号
- *2 OSAKA 表記は、国立感染症研究所での解析データ
- *3 Osaka 表記は当所での解析データ。
- *4 () 内は検体採取年月を示す。

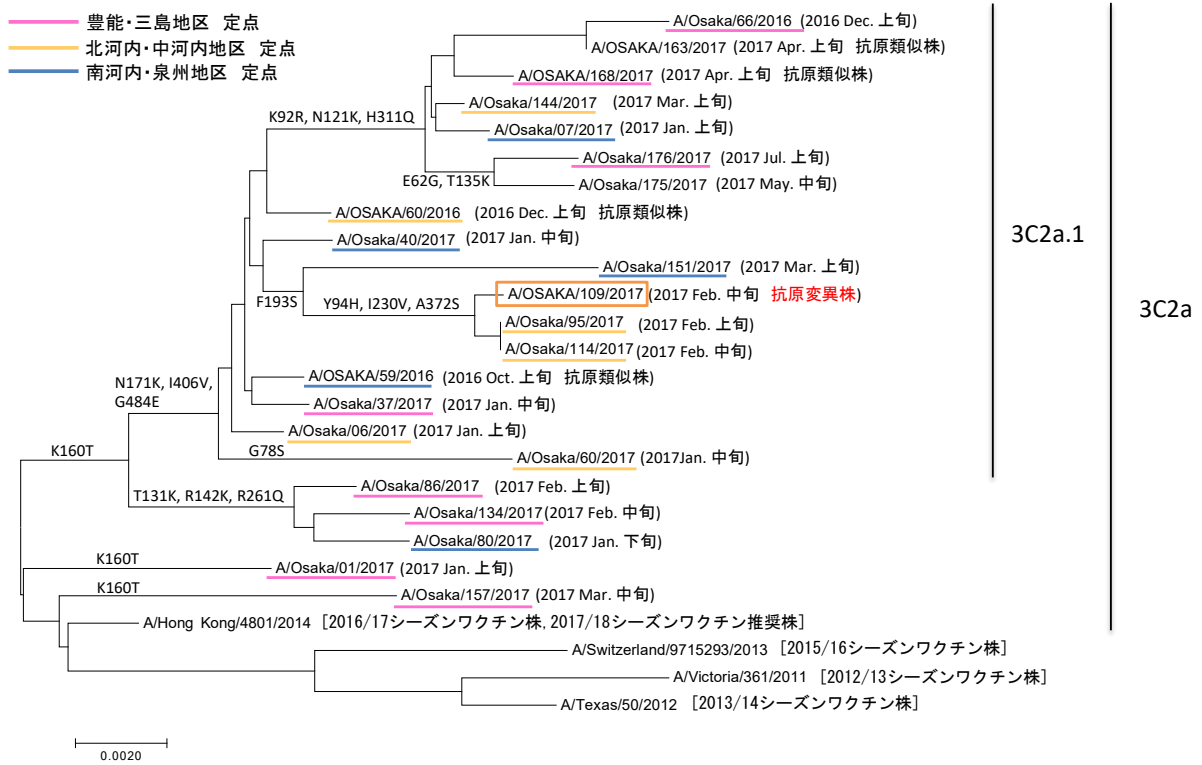


図 3. AH3 亜型 HA 全長の遺伝子系統樹解析

無下線の株は選択した 3 定点以外の定点からの分離株を示す。

表記等は図 2. と同様。

Influenza activity during the 2016/2017 season in Osaka prefecture.

Saeko Morikawa, Satoshi Hiroi, Takahiro Yumisashi.

During the 2016/17 influenza season in Osaka prefecture, influenza activity increased in the 47th week in 2016, peaked in the 4th week in 2017 (number of cases per sentinel 39.80), and gradually decreased toward the 19th week. We tested a total of 291 specimens during September 5, 2016 to July 2, 2017, and 254 were found positive for influenza virus. The specimen types were as follows: 86.2%, AH3; 4.3%, AH1pdm 09; 4.3%, B/Victoria lineage; and 5.1%, B/Yamagata lineage. The HA genes of some influenza A positive specimens and isolates were analyzed, and it was elucidated that they belong to the several different groups with some characteristic amino acid substitutions. The diversity of the amino acid sequences in each group showed the same trend compared to those of virus strains collected from all over Japan. We also tested 37 influenza negative specimens for other respiratory viruses. As a result, five of the 16 positive samples contained two viruses, and the most frequently detected virus was human metapneumovirus.

Key words : influenzavirus, infectious agents surveillance, HA protein, phylogenetic tree analysis , respiratory viruses

大阪府における蚊媒介性ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2016年度)

青山幾子^a 山元誠司^b 山口敬治^a 石川温子^a 弓指孝博^a

大阪府では2003年度より蚊媒介性ウイルス感染症の発生を監視する目的で、媒介蚊と死亡カラスについてサーベイランス事業を実施している。

2016年度は6月から9月にかけて府内24カ所で蚊の捕集を行った。捕集された雌の蚊(9種5027匹、413プール)について、蚊媒介性ウイルスの検出を試みたが、ウエストナイルウイルス(WNV)、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルスは検出されなかった。また、死亡カラス2頭の脳についてWNV遺伝子検査を行ったが、WNVは検出されなかった。

キーワード：蚊媒介性感染症、ウエストナイルウイルス、媒介蚊、サーベイランス、RT-PCR

蚊が媒介するウイルス性感染症には日本脳炎やデング熱、ジカウイルス感染症、チクングニア熱などがある。日本脳炎は以前から国内で発生の見られる疾患だが、その他の感染症は現在国内には常在しない。しかし、2014年夏に東京都内の公園を中心にデング熱の流行が起こり、162人のデング熱患者が発生した¹⁾。また近年、海外でジカウイルス感染症やチクングニア熱の流行が報告されている。これらの病原体を媒介することのできる蚊の種類はわが国にも広く分布しているため、これらの国内への侵入、流行を監視する必要がある、国のガイドラインにおいて地方自治体における媒介蚊の調査体制が求められている^{2,3)}。

大阪府ではWNVの侵入を早期発見し、蔓延を防止するために、2003年度より蚊のサーベイランス調査を開始し^{4,5)}、WNVに対する継続的な監視を実施してきた^{6,7)}。さらに、2004年にウエストナイル熱対応指針を策定し、WNV侵入前のサーベイランス調査や、侵入後の対応が速やかに行える体制を整えている⁸⁾。蚊のウイルス検査は、WNVに加え、他のアルボウイルス(節足動

物媒介性ウイルス)のうち、蚊が媒介するフラビウイルス科フラビウイルス属の日本脳炎ウイルス(JEV)、デングウイルス(DENV)、ジカウイルス(ZIKV)、トガウイルス科アルファウイルス属のチクングニアウイルス(CHIKV)⁹⁾についても実施している。

また、カラスはWNVの感受性が高く、WNV感染により死亡しやすいため、モニタリング調査に利用されている。大阪府においても厚生労働省の通知に従い¹⁰⁾、死亡原因の不明なカラスの死骸が同地点で2羽以上見られた場合、そのカラスについてWNV検査を実施している。ここでは2016年度の調査結果について報告する。

方 法

1. 捕集地点および調査実施期間

図1に示したように大阪府管内、東大阪市、高槻市、豊中市、枚方市の市街地域に計24カ所の定点を設定し、2016年6月第4週から9月第4週(東大阪市及び高槻市は9月第2週)までの期間、隔週の火曜日から水曜日に蚊の捕集調査

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

を実施した。地点 13、14 は今年度同市内で地点を変更した。また、地点 7 と地点 8 は実施日によってどちらかの定点を選択して実施した。

2. 蚊の捕集方法

蚊の捕集には CDC ミニライトトラップ (John. W.Hock Company) を使用し、蚊の誘引のためドライアイス (1~2kg) を併用した。トラップは調査実施日の夕刻 16~17 時から翌朝 9~10 時までの約 17 時間設置した。トラップを設置する高さは地上 1.5~2m とした。

3. 蚊からのウイルス検出

各定点で捕集された蚊のうち、ヒトを吸血する雌のみを検査の対象とし、定点毎に種類別にプールし、ウイルス検査に用いた。1 定点 1 種類あたりの検体数が 50 匹を超える場合は、複数のプールに分割した。蚊の破碎は 2mL のマイクロチューブに検体と滅菌したステンレス製クラッシャーを入れ、0.2%ウシ血清アルブミン (BSA) 加ハanks液を 250 μ L 加えた後、多検体細胞破碎

装置 (シェイクマスター Ver1.2 システム、バイオメディカルサイエンス) で約 1 分間振とうして行った。破碎後、マイクロチューブを軽く遠心してからクラッシャーを除去し、0.2%BSA 加ハanks液を 500~750 μ L 追加して攪拌した。それを 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm で 15 分間遠心し、その上清を 0.22 μ m もしくは 0.45 μ m Millex フィルター (ミリポア) で濾過して蚊乳剤を作製した。このうち 150 μ L について E.Z. N.A. Viral RNA Kit (OMEGA bio-tek) を使用して RNA を抽出した。WNV は多くの種類の蚊が媒介するため、全プールについてフラビウイルス共通プライマー (YF-1,3) と、WNV 特異的検出プライマー (WNNY 514/904) を用いて RT-PCR を実施した。CHIKV の媒介蚊はヒトスジシマカのため、CHIKV についてはヒトスジシマカのプールのみ CHIKV 特異的検出プライマー (chik10294s/ 10573c) を用いてウイルス遺伝子の検出を実施した。またヒトスジシマカについては検査感度を上げるために DENV 特異的検出プライマー (Dus/Duc) も使用してウイルス遺伝子の検出を試みた。^{11~14)}



	番号	設置市	担当保健所
北摂	1	池田市	池田
	2	吹田市	吹田
	3	茨木市	茨木
	4	高槻市	高槻
	5	豊中市(西)	豊中
	6	豊中市(中)	
	7	豊中市(北)	
	8	豊中市(南)	
北河内	9	守口市	守口
	10	寝屋川市	寝屋川
	11	大東市	四條畷
	12	枚方市(A)	枚方
	13	枚方市(B)	
中南河内	14	八尾市	八尾
	15	藤井寺市	藤井寺
	16	富田林市	富田林
	17	東大阪市(西)	東大阪
18	東大阪市(東)		
泉州	19	和泉市	和泉
	20	泉大津市	岸和田
	21	岸和田市	
	22	貝塚市	
	23	泉佐野市	
	24	阪南市	泉佐野

図1 蚊の捕集地点

4. カラスからのウイルス検出

死亡原因の不明なカラスの死骸が同地点で2羽以上確認され、ウジが発生しておらず、腐乱していない新鮮な個体の場合、WNV 検査を実施した。死亡カラスは、解剖して採脳した後、カラスごとに0.2%BSA加ハックス液を用いて10%脳乳剤を作製し、蚊と同様にRNA抽出後、WNV 遺伝子検査を実施した。

結 果

1. 蚊の捕集結果について

捕集された雌の蚊は9種 5027匹であった。その構成はヒトスジシマカ 2951匹 (58.70%)、アカイエカ群 1689匹 (33.60%) の2種で大部分を占め、次いでコガタアカイエカが353匹 (7.02%) 捕集された (図2)。その他に捕集された蚊の種類はオオクロヤブカ 13匹、シナハマダラカ 11匹、キンバラナガハシカ 4匹、トウゴウヤブカ 3匹、カラツイエカ 2匹、ヤマトヤブカ 1匹であった。

調査期間を通じた捕集数の推移をみると (図3)、アカイエカ群は、調査期間中常に捕集され、捕集数の推移はサーベイランス開始時の6月末から7月初めにかけてピークに達しており、その後捕集数は減少するが、また9月中旬にやや増加傾向が

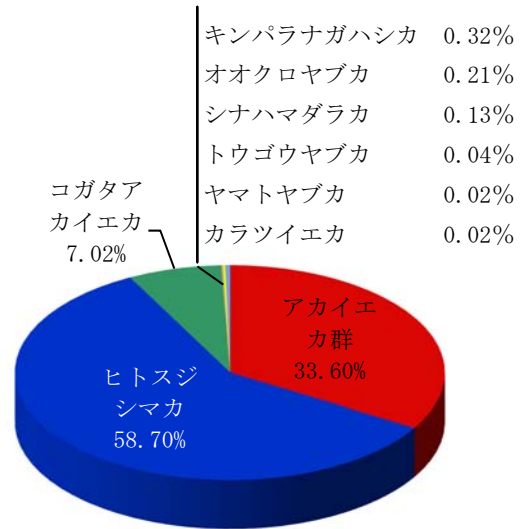


図2 捕集された蚊の比率 (24地点)

見られ、その後減少した。ヒトスジシマカも、調査期間中常に捕集され、7月末をピークに捕集数は減少したが、9月末に捕集数が急激に増加した。コガタアカイエカは7月から9月前半まで捕集され、8月になだらかなピークを示した。

定点別の捕集数では (図4)、各定点によって捕集数や捕集される種類の大きな差がみられたが、アカイエカ群とヒトスジシマカはすべての地点で捕集された。ヒトスジシマカは、高槻、寝屋

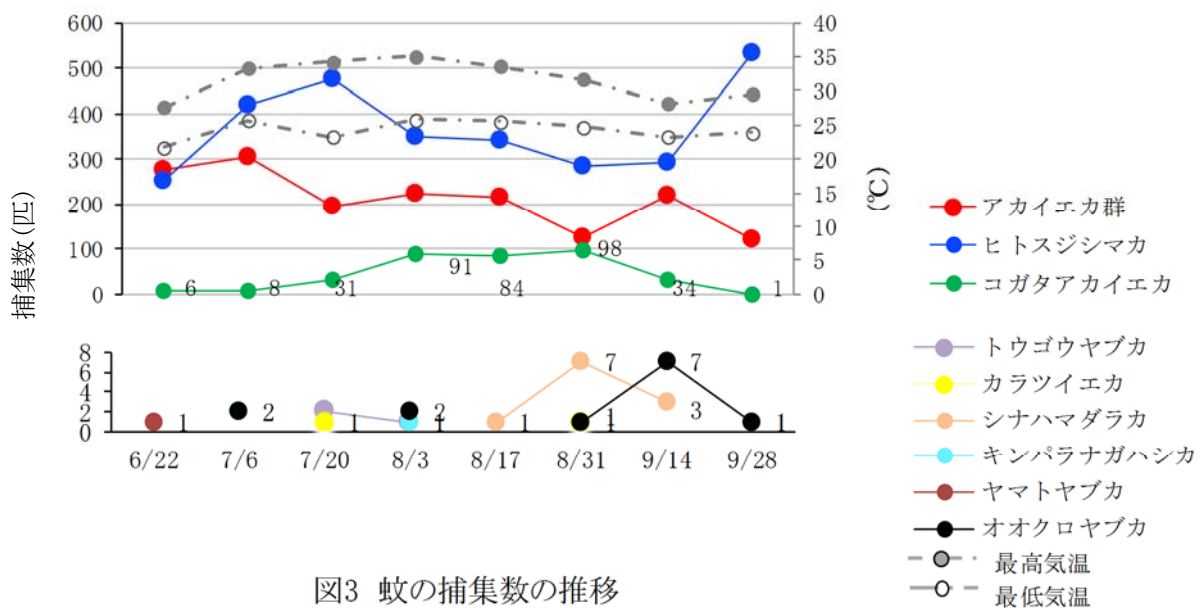


図3 蚊の捕集数の推移

川、豊中(西)、東大阪(東)、和泉で多く捕集された。アカイエカ群は特に東大阪(東)で 417 匹が捕集され、大きな割合を占めた(24.7%)。コガタアカイエカは 13 地点で捕集され、東大阪(東)、高槻、貝塚で多く捕集され、それぞれ 253 匹、33 匹、23 匹で、東大阪(東)が大きな割合を占めた(71.7%)。オオクロヤブカは東大阪(東)、岸和田、和泉の 3 地点、シナハマダラカは高槻、富田林、東大阪(東)の 3 地点、トウゴウヤブカは、東大阪(西)、(東)の 2 地点、キンバラナガハシカは和泉の 1 地点、ヤマトヤブカは守口の 1 地点、カラツイエカは豊中(西)、東大阪(東)の 2 地点でそれぞれ捕集された。

各定点で捕集された蚊を種類別に分け 413 プールの乳剤を作製して RT-PCR 法による遺伝子検査を実施したところ、すべての検体において WNV、JEV、DENV、ZIKV を含むフラビウイルスの遺伝子は検出されなかった。またヒトスジシマカの 185 プールについて、DENV と CHIKV の遺伝子検査を実施したが、いずれの遺伝子も検出されなかった。

3. 死亡カラスのウイルス遺伝子検査結果

今年度回収されたカラス 2 頭から、WNV の遺伝子は検出されなかった。

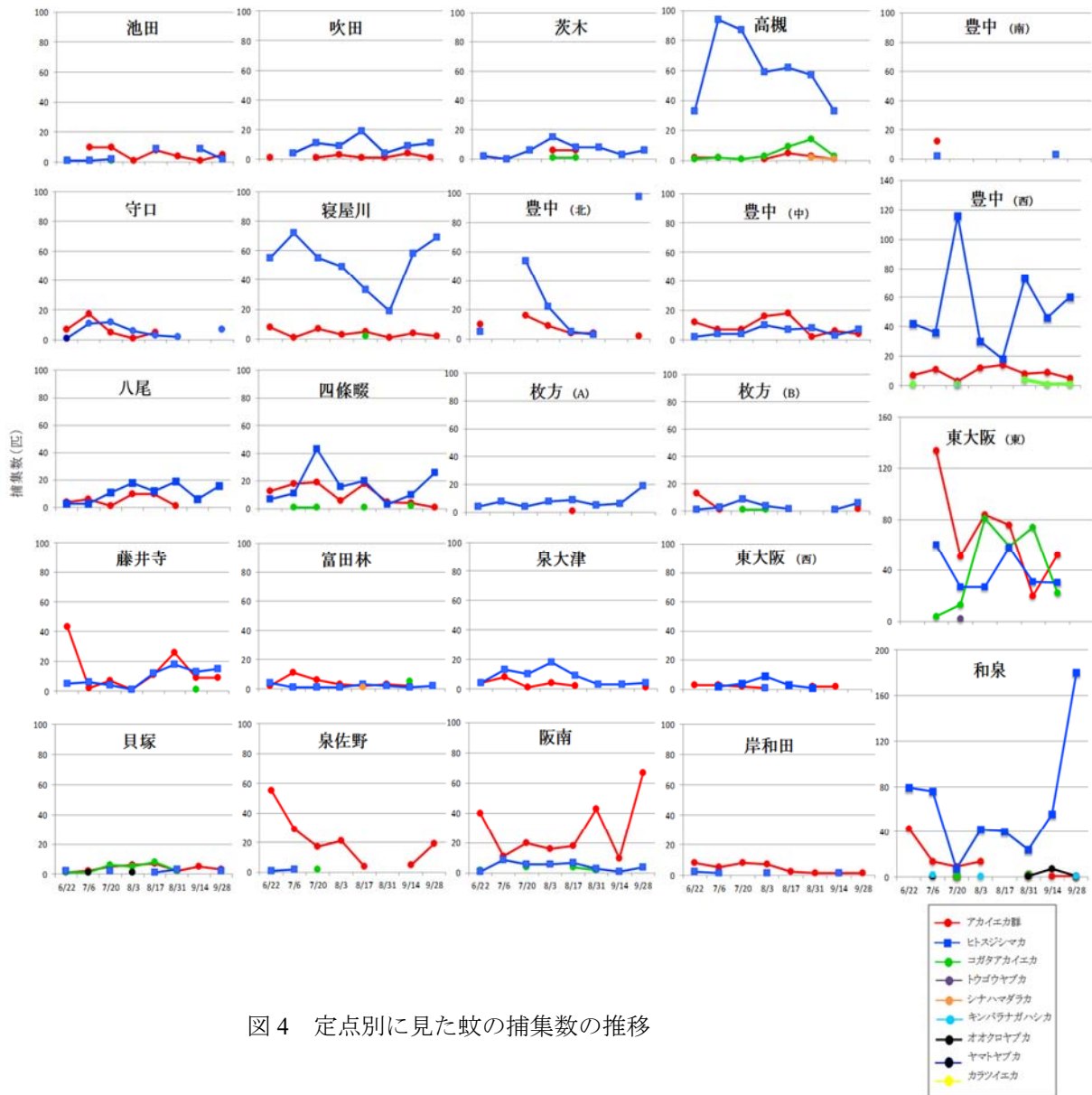


図 4 定点別に見た蚊の捕集数の推移

考 察

各調査地点で捕集される蚊の種類や数の変動には、気温、降水量などの気候変動と、調査実施日の天候、気温、風速などが大きく影響すると考えられる。調査を開始した6月末の最高気温は25℃を超えており、アカイエカ群のピークが6月末と考えられる定点は藤井寺、東大阪東部、枚方B、和泉、泉佐野、阪南の6地点あり、アカイエカ群は6月には既に多く発生していることが示された。ヒトスジシマカは多くの地点でよく捕集されたが、9月末に寝屋川、豊中(中)、四條畷、和泉で捕集数が非常に増加したため、全体として9月末の捕集数が増加したと考えられる。また、今年度は捕集日に降雨がみられた回が2回あったが降水量は少なく、捕集日に台風の上陸なども見られなかったため、大きな風雨の影響はなく調査が実施できたと考えられた¹⁵⁾。

5年間の捕集蚊の種類構成を比較すると(図5)、この間に定点の場所変更や、定点数の増加などがあるが、主要な3種の蚊の構成比に大きな影響は見られなかった。その他の蚊の種類も大きな変化は見られず、ほぼ同じ種類が捕集された。従って、大阪府の市街地における媒介蚊対策は、ヒトスジシマカとアカイエカ群を筆頭に、これらの蚊の種類が対象として中心になることが確認された。

2003年以降の大阪府内における媒介蚊サーベイランスでは、感染症の原因となるウイルスは検出されていない。しかし、ウイルスの侵入が確認された場合、媒介種となる蚊を根絶することは困難である。DENVやZIKV、CHIKVは国内ではヒトスジシマカが媒介種となる。媒介蚊が限定できる場合、感染推定地を特定できれば、東京のデング熱国内発生事例のように対処が可能となる

かもしれないが、WNVはアカイエカ群を筆頭に、多くの蚊が媒介種となり、今回捕集された蚊の種類はほぼWNVの媒介種となることが示されている¹⁶⁾。このように媒介蚊の種類が多い場合、根絶は不可能である。そのようなときに対応すべく、我々はウエストナイル熱対応指針などを策定し、この調査を通じて、ウイルス保有蚊の存在する地点などの特定に努め、幼虫・成虫の媒介蚊対策を実施し、感染症の正確な情報や個人レベルでの対策法を府民に適宜情報発信できる準備を整えている。流行の拡大に遅れを取らないよう、緊急時に即時対応するためには、保健所と行政、自治体同士の連携が不可欠であり、本サーベイランスは危機管理対策の一つとして重要だと考えられる。

謝 辞

本調査は、元大阪府立公衆衛生研究所、大阪府健康医療部環境衛生課および各保健所の協力のもとに大阪府健康医療部保健医療室医療対策課の事業として実施されたものであり、調査に関与した多くの方々に深謝致します。また、データの提供にご協力頂いた東大阪市保健所、高槻市保健所、豊中市保健所、枚方市保健所の関係者の方々に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Kutsuna S, Kato Y, Moi ML, Kotaki A., et al : Autochthonous dengue fever, Tokyo, Japan. *Emerg Infect Dis.* Mar; **21** (3), 517-520 (2015)
- 2) 国立感染症研究所：ウエストナイル熱媒介蚊対策に関するガイドライン (2003)
- 3) 国立感染症研究所：デング熱・チクングニア

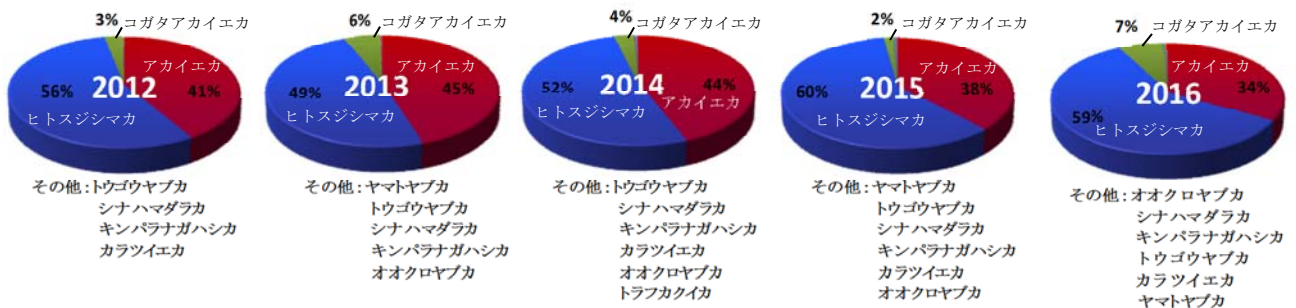


図5 捕集した蚊の種類構成5年間の比較

- 熱等蚊媒介感染症の対応・対策の手引き 地方公共団体向け（2015）
- 4) 弓指孝博, 瀧幾子, 齋藤浩一ら:大阪府におけるウエストナイル熱に関する蚊のサーベイランス, 大阪府立公衛研所報,**42**, 57-63 (2004)
 - 5) 瀧幾子, 弓指孝博, 吉田永祥ら:大阪府の住宅地域における蚊の分布調査, 大阪府立公衛研所報,**42**, 65-70 (2004)
 - 6) 瀧幾子, 弓指孝博, 吉田永祥ら:大阪府の住宅地域における蚊の分布調査, 大阪府立公衛研所報,**42**, 65-70 (2004)
 - 7) 青山幾子, 山元誠司ら:大阪府における蚊媒介性ウイルス感染症に対するサーベイランス調査, 大阪府立公衛研所報,**54**, 1-8 (2015)
 - 8) 大阪府健康福祉部:ウエストナイル熱対応指針 (2004)
 - 9) 青山幾子, 弓指孝博, 中田恵子ら:大阪府におけるウエストナイル熱に関する蚊のサーベイランス, 大阪府立公衛研所報,**47**, 1-7 (2008)
 - 10)厚生労働省健康局結核感染症課長通知:ウエストナイル熱の流行予測のための死亡カラス情報の収集等について (2003.12.13)
 - 11)国立感染症研究所:ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル Ver.4 (2006)
<https://www0.niid.go.jp/niid/reference/WNV-manual.pdf>
「WEB サイトの内容は2017年10月10日に確認した」
 - 12)弓指孝博, 青山幾子:ウエストナイル熱(脳炎),大阪府立公衆衛生研究所感染症プロジェクト委員会編 感染症検査マニュアル第Ⅲ集, 1-13 (2004)
 - 13)国立感染症研究所:デングウイルス感染症診断マニュアル
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf>
「WEB サイトの内容は2017年10月10日に確認した」
 - 14)国立感染症研究所:チクングニアウイルス検査マニュアル (2012)
<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/CHIKV.pdf>
「WEB サイトの内容は2017年10月10日に確認した」
 - 15)気象庁:過去の気象データ検索
<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
「WEB サイトの内容は2017年10月10日に確認した」
 - 16)ウエストナイル熱媒介蚊対策研究会:ウエストナイル熱媒介蚊対策ガイドライン, 日本環境衛生センター, 神奈川 (2003)

Mosquito-Borne Virus Surveillance in Osaka Prefecture. (Fiscal 2016 Report)

Ikuko AOYAMA^a, Seiji YAMAMOTO^a, Keiji YAMAGUCHI^a,
Atsuko ISHIKAWA^a, and Takahiro YUMISASHI^a

In Osaka Prefecture, mosquito-borne arbovirus surveillances have been conducted since 2003 to monitor the invasion of imported infectious diseases caused by arboviruses such as West Nile virus (WNV) and dengue virus together with domestic Japanese encephalitis virus. Examination of Chikungunya virus and Zika virus have also been added as mosquito-based surveillance since 2008 and 2015, respectively.

In 2016, we conducted RT-PCR examinations for arboviruses on a total of 5,027 female mosquitoes (9 species) collected at 24 points in Osaka Prefecture from June to September. Additionally, two dead crows were examined in our institute, because crows are the birds highly susceptible to WNV. In conclusion, all mosquitoes' examinations gave negative results for any arboviruses, and WNV was not detected in the brains of dead crows.

Key words : mosquito-borne infection, West Nile Virus, vector mosquitoes, surveillance, RT-PCR

a Osaka Institute of Public Health

魚介類中メチル水銀のフェニル誘導体化

GC/MS 分析法の妥当性確認

柿本幸子^a 吉光真人^a 阿久津和彦^a 清田恭平^a 藤原拓也^a 昌山敦^a 高取聡^a 渡邊敬浩^b
梶村計志^a 山野哲夫^a

メチル水銀は、微量でも胎児の神経発達に影響を与える有害物質である。食品としての魚介類における水銀濃度の暫定的規制値は、総水銀 0.4 mg/kg、メチル水銀 0.3 mg/kg (水銀として) に設定されている。検査では、総水銀濃度が 0.4 mg/kg を超過した場合にメチル水銀の分析を行い、その濃度が 0.3 mg/kg (水銀として) を超えているかを判定する。通知法のメチル水銀分析法については、いくつかの問題点が指摘されているが、近年、渡邊らが開発したフェニル誘導体化 GC/MS 分析法では、これらの問題点が解消されている。そこで今回、著者らは、大阪健康安全基盤研究所で実施する検査に本法を適用するための基礎検討を行った。検査でメチル水銀分析を行う可能性が高い代表的な食用魚介類として、サバ、タイおよびブリを用いて、本法の性能評価を行った。その結果、いずれも目標値を満たし妥当性が確認されたことから、本法は当所での食用魚介類中メチル水銀の検査における適用が可能と考えられた。

キーワード：メチル水銀、GC/MS、食用魚介類

メチル水銀は、微量でも胎児の神経発達に影響を与える有害物質である。昭和48年7月には、魚介類中における水銀濃度が規制され、総水銀 0.4 mg/kg、メチル水銀 0.3 mg/kg (水銀として。以下、特に注記しない)¹⁾が暫定的規制値として設定された。暫定的規制値の設定に合わせ、総水銀およびメチル水銀分析法¹⁾が通知されている。当所では、年間約 40 件の魚介類を対象とした総水銀検査を実施し、総水銀濃度が 0.4 mg/kg を超えた試料については、通知分析法によりメチル水銀の分析を行ってきた。しかし、このメチル水銀分析法には、魚種による抽出率の違い²⁾、発がん性のある試薬の使用、管理が煩雑な電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフの使用等、いくつかの問題点があった。近年、渡邊らにより、これらの問題点を解消したフェニル誘導体化 GC/MS 分析法(以下、本法)が考案された³⁾。

そこで、本研究では、検査でメチル水銀の分

析を行う可能性が高い代表的な食用魚介類(サバ、タイおよびブリ)を対象に本法の性能を評価し、妥当性を確認することで、本法が当所における検査で適用可能か検討した。

実験方法

1. 試料

大阪府内の小売店で購入したサバ、タイおよびブリを試料として選択した。試料はフードプロセッサーで均質化したものを、小分けした後、冷凍し、分析前に解凍して使用した。

2. 標準品および試薬

メチル水銀標準品はジーエルサイエンス社製の塩化メチル水銀を使用した。添加回収実験用 3 mg/L メチル水銀水溶液は塩化メチル水銀 58.2 mg を正確に量り、水を加えて超音波処理により溶解した後 500 mL に定容し、その溶液 3 mL

a 大阪健康安全基盤研究所

b 国立医薬品食品衛生研究所

を水で 100 mL とした。測定用 1000 mg/L メチル水銀標準原液は、塩化メチル水銀 58.2 mg を正確に量り、トルエンで 50 mL に定容した。これをトルエンで段階的に希釈し、1~100 ng/mL の検量線用標準溶液とした。

臭化カリウム（試薬特級）、硫酸銅(II)五水和物（試薬特級）、L-システイン塩酸塩一水和物（試薬特級）、酢酸ナトリウム三水和物（試薬特級）、無水硫酸ナトリウム（残留農薬・PCB 試験用）、リン酸二水素ナトリウム 2 水和物（試薬特級）、リン酸水素二ナトリウム 12 水和物（試薬特級）、テトラフェニルホウ酸ナトリウム（試験研究用）、PEG200（和光一級）、アセトン（残留農薬・PCB 試験用）、ヘキサン（残留農薬・PCB 試験用）、トルエン（残留農薬・PCB 試験用）、硫酸（有害金属測定用）、塩酸（有害金属測定用）は和光純薬工業製を使用した。水は Millipore 社製 Milli-Q システムにより調製した精製水（超純水）を使用した。

3. 機器および器具

GC/MS : Agilent 社製 5973inert GC/MS、分析カラム : ジーエルサイエンス社製 InertCap 5MS/NP(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m)。ガラス器具は全てアセトンおよびヘキサンで洗浄し使用した。

4. 分析条件

オープン温度 : 70°C (1 min) → 20°C /min → 280°C (5 min) 注入口温度 : 250°C、トランスファーライン温度 : 280°C、キャリアガス流量 : 1.0 mL/min (He) 分析モード: SIM、注入量 : 1 μ L、モニターイオン: m/z 277、292、294* (* 定量イオン)、イオン源温度 : 230°C、イオン化法: EI、試料注入法 : スプリットレス

5. 分析方法

分析は渡邊らの方法³⁾に準拠して以下のように行った。試料 10.0 g を 250 mL 遠心管に正確に秤量し、アセトン 100 mL、トルエン 100 mL を順次加え振とうし、1,880 \times g で 5 分間遠心し、上清を除去した。試料に 1 mol/L 臭化カリウム溶液 40 mL を加え混合したのち、硫酸銅(II)飽和 4 mol/L 硫酸溶液 40 mL およびトルエン 80

mL を加え 30 分間振とうし、1,880 \times g で 20 分間遠心分離し、トルエン層を分取した。残渣にトルエン 50 mL を加え、10 分間振とう抽出し、1,880 \times g で 20 分間遠心分離し、上清を先のトルエン層とあわせて抽出液とした。抽出液に 1%L-システイン水溶液 50 mL を加え、5 分間振とうし、水層を分取した。水層に 6.3 mol/L 塩酸 30 mL およびトルエン 30 mL を加え 5 分間振とう抽出し、トルエン層を回収した後、水層にトルエン 30 mL を加えて同様に 2 回振とう抽出し、得られたトルエン層をあわせて 100 mL に定容し試験溶液とした。試験溶液 4 mL に、0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 mL および 1%テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液 1 mL を加え、室温で 10 分間振とうし、メチル水銀を誘導体化した。その後、遠心分離し、トルエン層を分取し無水硫酸ナトリウムを適量加え脱水した。脱水トルエン溶液 1.0 mL に対し、1.5 mg/mL の PEG200 溶液 0.5 mL を加えて測定溶液とした。

6. 性能評価

サバおよびタイを基材とし、メチル水銀の暫定的規制値である 0.3 mg/kg に相当する濃度の添加試料を調製し分析した。性能評価では、分析者 1 名が 2 併行の分析を、5 日間実施する枝分かれ実験計画を採用した。食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン⁴⁾に従って分析法の真度、併行精度および室内精度を推定し、目標値と比較して妥当性を確認した(添加試料:n=10、ブランク試料:n=5)。

また、精度管理の一般ガイドライン⁵⁾に準拠して基準値 a と定量下限値 b の中点値程度の濃度((a+b)/2)である 0.15 mg/kg の濃度でも添加試料を調製し併行分析し、真度と併行精度を求めた(添加試料:サバ n=5 およびタイ n=6、ブランク試料:サバ n=5 およびタイ n=6)。ブリについては、参考値として分析法の妥当性評価ガイドライン⁶⁾に準拠して 0.3 mg/kg に相当する濃度の添加試料を調製し、併行分析を行った(添加試料:n=5、ブランク試料:n=2)。

検量線の下限である 1 ng/mL(試料の濃度として 0.01 mg/kg 相当)を定量下限値の目標に設定し、この濃度での S/N を、Agilent 社の定量解析ソフトウェア拡張 ChemStation を用い、ピークの約 1 分間をノイズ範囲とし、算出した。

結果および考察

1. 性能評価に用いた試料の選定理由

平成 20～26 年に当所で検査を行った全 326 試料 32 魚種中、サバは 19 試料、タイは 10 試料、ブリは 30 試料であり、いずれも魚種別の試料内訳の上位を占めていた。また、総水銀の最大値は、サバ：0.48 mg/kg、タイ：0.34 mg/kg、ブリ：0.37 mg/kg であり、暫定的規制値である 0.4 mg/kg 前後の値であった。総水銀の検出率はサバで 100% (19 試料中 19 試料)、タイが 100% (10 試料中 10 試料)、ブリが 97% (30 試料中 29 試料) であり、サバにおいては暫定的規制値を超過する濃度⁷⁾であることが確定した事例も認められた。したがって、これらの魚種は今後も一定の検査数が見込まれ、暫定的規制値を超過する可能性があると考えられる。そこで、性能評価にはサバ、タイおよびブリを試料として選択した。

2. 検量線

検量線は、1～100ng/mL の範囲で相関係数 0.999 以上であり、直線性は良好であった。検量線の下限である 1 ng/mL (試料の濃度として 0.01 mg/kg 相当) の濃度で S/N=31.5 であり、検査の目的においては十分な濃度での定量下限が確保されていることが確認された。

3. 性能評価

妥当性確認のための性能評価には、測定対象物質が検出されない試料を用いることが望ましい。しかし、多くの魚介類は微量の水銀を体内に蓄積しており、不検出試料を入手することは極めて難しい。試験法の妥当性評価ガイドライン⁴⁾には、基準値の 1/2 以下であることを確認した試料をブランク試料としても良いとすると記載がある。多くの魚類中の総水銀の 9 割以上がメチル水銀であることが報告されている⁸⁾ことから、総水銀測定値はその全てがメチル水銀に由来すると仮定し、総水銀の値が 0.15 mg/kg 以下と確認された試料をブランク試料として使用した。分析に先立ち、本来なら不検出試料で行うべきだが入手困難であるため、試薬のみを用いた操作ブランクを分析した。その結果、メチル水銀の妨害となるピークが観察されないことを

確認した。

試験法の妥当性評価ガイドラインにおいて、基準値が設定されている物質では、基準値に相当する濃度の試料を枝分かれ実験計画に従い分析した結果を示された目標値と比較することにより、妥当性を確認することが求められている。そこで、添加濃度は、暫定的規制値 0.3 mg/kg とした。また、試料への添加濃度が 0.3 mg/kg の場合、真度の目標値は 80～110%、併行精度の目標値は 10%未満、室内精度の目標値は 15%未満⁴⁾と設定されている。得られた分析値の解析結果として、サバを試料とした時の真度は 96.4%、併行精度は 2.1%、室内精度は 2.1%、タイの場合の真度は 95.3%、併行精度は 2.4%、室内精度は 2.5%と推定され (表 1)、目標値を満たしたことから、本法の妥当性が確認された。また、精度管理の一般ガイドライン⁵⁾に準拠し、0.15 mg/kg の濃度で調製した添加試料を併行分析したところ、基材がサバの場合の真度は 97.3%、併行精度は 2.3%、タイの場合の真度は 90.1%、併行精度は 3.6%と推定され、暫定的規制値の 1/2 の濃度でも十分な性能を有する方法であることが強く示された (表 2)。

試験法の妥当性評価ガイドラインの別紙 1⁶⁾には、妥当性確認された分析法あるいは検証実験を行って導入した分析法を、評価対象となった食品と類似の食品に適用する場合は、選択性および真度を評価し、また必要と判断される場合には併行精度を評価することが記載されている。ブリについては、同じ青身魚であるサバと同様に脂肪酸含有量が高く⁹⁾、抽出効率に影響を与えるエマルジョン生成が同程度であると考えられた。そのため、試験法の妥当性評価ガイドラインの別紙 1⁶⁾に準拠して、ブリはサバと類似の食品と判断し、枝分かれ実験は実施せず、暫定的規制値の 0.3 mg/kg に相当するように調製した添加試料の併行分析結果から真度、併行精度を推定した。ブランク試料の試行回数は n=2 であり参考値となるが、真度は 96.8%、併行精度は 1.8%と推定され、目標値を満たした (表 2)。

以上から、本法は、当所での検査において、食用魚介類を対象とするメチル水銀分析法として適用可能であると考えられた。

4. 今後の課題

他の魚種についても本法が適用可能かどうか性能を評価し、検査において使用する事の妥当性を確認する予定である。

文献

- 1) 昭和 48 年厚生省環境衛生局長通達. 魚介類の水銀の暫定的規制値について. 昭和 48 年 7 月 23 日環乳第 99 号
- 2) 板野一臣. 海産魚介類等に含まれる水銀とそのリスク評価. *生活衛生* 2007; **51**(2): 57-65.
- 3) Watanabe T., Kikuchi H., Matsuda R., Hayashi T., Akaki, K., Teshima R. Performance evaluation of an improved GC-MS method to quantify methylmercury in fish. *Food Hyg. Saf. Sci.* 2015; **56**: 69-76.
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて. 平成 20 年 9 月 26 日付食安発第 0926003 号
- 5) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知. 食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について. 平成 9 年 4 月 1 日付食第 117 号 (別添) 精度管理の一般ガイドライン
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について. 平成 22 年 12 月 24 日付食安発 1224 第 1 号
- 7) 柿本幸子, 吉光真人, 野村千枝, 栗津薫, 山口瑞香, 清田恭平, 阿久津和彦, 高取聡, 梶村計志, 尾花裕孝. 国産・輸入魚介類中の総水銀実態調査(平成 20 年～平成 26 年). *大阪府立公衛研所報 食品衛生編* 2015; **53**: 31-35.
- 8) Bloom NS. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Can J Fish Aquat Sci* 1992; **49**: 1010-1017.
- 9) 山口迪夫編集. 五訂日本食品成分表. 医歯薬出版株式会社; 2001. 156-157, 170-171.

表1. サバおよびタイにおけるメチル水銀分析法の妥当性確認

魚種	添加試料平均値 (mg/kg)	ブランク試料平均値 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
サバ	0.324	0.035	96.4	2.1	2.1
タイ	0.433	0.147	95.3	2.4	2.5

【添加試料】 サバ：n=10、タイ：n=10

(n=2で5日間)

【ブランク試料】 サバ：n=5、タイ：n=5

添加濃度：0.3 mg/kg

表2. サバ、タイおよびブリを用いた性能評価

魚種	添加試料平均値 (mg/kg)	ブランク試料平均値 (mg/kg)	標準偏差 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)
サバ※1	0.181	0.035	0.003	97.3	2.3
タイ※1	0.280	0.145	0.005	90.1	3.6
ブリ※2	0.437	0.146	0.005	96.8	1.8

【添加試料】 サバ：n=5、タイ：n=6、ブリ：n=5

【ブランク試料】 サバ：n=5、タイ：n=6、ブリ：n=2

※1添加濃度：0.15 mg/kg

※2添加濃度：0.3 mg/kg

Evaluation of a method for the determination of methylmercury in three kinds of fish samples by GC/MS following phenylation

Sachiko KAKIMOTO^a, Masato YOSHIMITSU^a, Kazuhiko AKUTSU^a, Kyohei KIYOTA^a,
Takuya FUJIWARA^a, Atsushi MASAYAMA^a, Satoshi TAKATORI^a, Takahiro WATANABE^b, Keiji
KAJIMURA^a and Tetsuo YAMANO^a

Methylmercury causes adverse effects on the central nervous system of the developing fetus even at the extremely small level. The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan set the provisional regulation value for mercury in fish and shellfish. The value is 0.4 mg/kg for total mercury and 0.3 mg/kg for methylmercury(as mercury), respectively. When total mercury is detected at more than 0.4 mg/kg, subsequent analysis of methylmercury is needed. However, it is known that the official method for methylmercury analysis has defects such as insufficient recovery rate in some fish species. Recently, Watanabe et al. reported the improved method using GC/MS with phenylation. In this study, we validated this improved method using representative fish samples such as mackerel, sea-bream and Japanese amberjack. As a result, the applicability of the improved method for edible fish and shellfish samples, which are tested in our laboratory, was confirmed.

Key words : methylmercury, GC/MS, edible fish and shellfish

a Osaka Institute of Public Health

b National Institute of Health Sciences

2007～2016 年度に実施した輸入柑橘類中の防かび剤の検査結果

福井直樹^a 北川陽子^a 高取聡^a 柿本幸子^b 小阪田正和^a 柿本葉^a
山口聡子^c 吉光真人^a 阿久津和彦^a 東恵美子^a 梶村計志^a

2007 年度から 2016 年度に、輸入柑橘類中の防かび剤の検査を行った。140 検体についてチアベンダゾール (TBZ)、イマザリル (IMZ) およびオルトフェニルフェノール (OPP) を測定したところ、TBZ は 65 検体、IMZ は 134 検体から検出され、OPP は検出されなかった。28 検体についてジフェニル (DP) を測定したところ、検出されなかった。レモン 1 検体について、IMZ が食品衛生法の使用基準を超過した。

キーワード：防かび剤、柑橘類、食品添加物、使用基準

当所では、輸入柑橘類中の防かび剤 (チアベンダゾール (TBZ)、イマザリル (IMZ)、オルトフェニルフェノール (OPP) およびジフェニル (DP)) の検査を行っている。2005 年度までは、高速液体クロマトグラフで検出器に蛍光または UV を用いた方法により検査を実施してきたが、夾雑物質の影響を受けにくい LC-MS/MS を用いた一斉分析法を開発し¹⁾、2006 年度より運用を開始した。1993～2006 年度の結果をまとめた前報²⁾に引き続き、2007～2016 年度の 10 年間に実施した輸入柑橘類中の防かび剤の検査結果について報告する。

調査方法

1. 試料

大阪府内の小売店より収去された 140 検体を用いた。それぞれ全果を対象に包丁で切断後、500～1000 g をフードプロセッサにより細切均一化した。

2. 試薬、装置、測定条件および前処理法

試薬、装置、測定条件および前処理法等は、当所の検査実施標準作業書に従った。詳細は、既報^{1,2)}に示した。

結果および考察

1. 検体の内訳および原産国

検体の内訳は、グレープフルーツ 67 検体 (48%)、オレンジ 64 検体 (46%)、レモン 9 検体 (6%) であった。検体の原産国は、グレープフルーツは南アフリカ共和国産 (97%)、オレンジはオーストラリア産 (88%)、レモンはチリ共和国産 (89%) が最も多かった (表 1)。

2. 防かび剤使用の現状

食品に防かび剤を使用した場合、食品添加物として使用した旨の表示が義務付けられる。140 検体の使用履歴の表示は、TBZ が 126、IMZ が 136、OPP が 4、DP が 0 であった。使用の多い TBZ および IMZ に着目し、柑橘類ごとに表示の有無について 4 種類のカテゴリに分類した (表 2)。OPP の使用表示があった 4 検体は、すべてグレープフルーツのカテゴリ A に分類された。3 種類の柑橘類に共通して TBZ および IMZ を併用した検体が多く、TBZ を単独で使用した検体はなかった。防かび剤不使用の検体はグレープフルーツ 4 検体のみであった。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

b 大阪健康安全基盤研究所企画部精度管理室

c 大阪府藤井寺保健所生活衛生室検査室

3. 防かび剤残存量の現状

防かび剤の使用表示がなかった 4 検体から防かび剤の検出は確認されなかった。また、表示違反の検体もなかった。

OPP および DP は検出されなかった。OPP および DP は、前報²⁾において、それぞれ検出率が 24% および 0.5% であり、今回の結果においても、使用した旨の表示も少なくかつ検出されなかったことから、食品添加物としての使用頻度が減少していると考えられた。

防かび剤の使用表示のあった検体を対象に、検出された TBZ および IMZ の使用基準に対する濃度比を算出し、その割合を示した (図 1、2)。TBZ の使用の表示があった 126 検体のうち 65 検体から定量下限値 (0.0002 g/kg) 以上の残存値で検出された (検出率 52%)。グレープフルーツやレモンの残存値が低い一方、オレンジの残存値が高い傾向が確認された。最大残存値でも使用基準 (0.010 g/kg) に対して 40% 未満の値で、50% を超える検体は確認されなかった。

IMZ の使用の表示があった 136 検体のうち 134 検体が定量下限値 (0.0002 g/kg) 以上の残存値で検出された (検出率 99%)。IMZ は TBZ に比べて定量下限値以上で検出された割合が高く、前報²⁾同様の傾向を示した。また、使用基準 (0.0050 g/kg) の 50% を超えた検体 (グレープフルーツで 9、オレンジで 10、レモンで 1) も確認され、これらは検体数の約 15% であった。また、レモン 1 検体から IMZ が 0.0066 g/kg 検出され、使用基準を超過した。超過原因に関するその後の調査において、日本より基準が高い他国向けの輸出品が、日本向けの箱詰めラインで誤って混入していたことが判明した。

財務省貿易統計³⁾のデータをもとに、2002～2016 年度のグレープフルーツ輸入量の推移を示した (図 3)。グレープフルーツの輸入量は 2002 年度の約 30 万トンから、2016 年度には約 8 万トンまで激減した。アメリカ合衆国、南アフリカ共和国からの輸入が多く 2 国で全体の約 90% を占めた。今回の検体の原産国の内訳は輸入量が 2 番目に多い南アフリカ共和国が 97% を占め、輸入量を反映した検体が採取できていなかった。これは検体の採取時期に起因すると考えられた。財務省貿易統計³⁾のデータをもとにアメリカ合衆国および南アフリカ共和国の 2016 年の月別

輸入量を示した (図 4)。今回のとりまとめの対象とした 2007～2016 年度の 10 年間の検査は、すべて 9 月に採取された検体であり、9 月はアメリカ合衆国からの輸入量が少ない時期である。検体は店頭から収去されたもので、9 月に店頭と並ぶグレープフルーツの輸入月を 8～9 月頃と推定し、2 ヶ月間の輸入量合計について年別の推移を示した (図 5)。2016 年だけでなく、8～9 月はアメリカ合衆国からの輸入量が少ないため、アメリカ合衆国産を入手することが難しい。前報²⁾において、アメリカ合衆国産の割合 (81%) が高いのは、1 および 4 月をはじめ、ほぼ 9 月以外に採取された検体であったことに起因すると考えられた。同様にオレンジ、レモンも 8～9 月にアメリカ合衆国からの輸入量が少ないことが、財務省貿易統計³⁾から確認できたため、オーストラリア産オレンジや、チリ共和国産レモンが多数を占めたと考えられた。

今後、柑橘類の輸入量を勘案した監視を実施するためには、隔年で検体の採取時期を変えることや、原産国の輸入量の統計データをもとに入手可能な時期を推測し、複数月で実施することが望ましいと考えられた。

まとめ

- ・2007 年度から 2016 年度の調査結果より、使用基準を満たさなかった検体は、140 検体中 1 検体であった。
- ・食品添加物としての表示違反は確認されなかった。
- ・柑橘類に使用された防かび剤は、IMZ および TBZ が多く、特に IMZ が残存していた。OPP や DP は検出されなかった。
- ・検体の原産国は、輸入量を反映しておらず、偏りがあったことから、検体の採取時期を考慮する必要がある。

今後の予定

食品添加物である防かび剤は IMZ、TBZ、OPP および DP 以外にも、フルジオキシニル、アゾキシストロピンおよびピリメタニルが新たに追加された。また、使用できる農産物も、柑橘類以外に、防かび剤の種類に応じて、バナナ、キウ

イ、もも、りんご、西洋なしなどに拡大された。店頭に並ぶ柑橘類も、ピリメタニルやフルジオキソニル使用の表示が増えている。今後、追加された防かび剤および農産物を対象とした検査法を新たに整備し対応していく予定である。

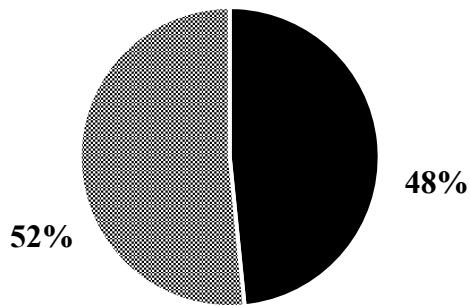
さらに、防かび剤は、使用基準に近い値で検出される実態をふまえ、継続した監視ならびに原産国別による検出状況についてもデータを蓄積したいと考えている。

謝辞

検体の搬入に御尽力いただきました大阪府内各保健所の食品衛生監視員の皆様に深謝致します。

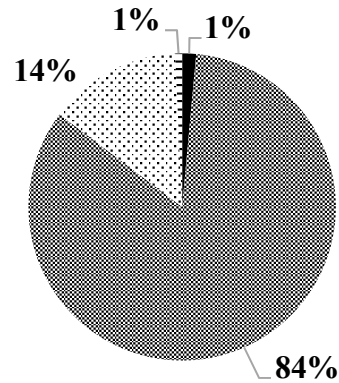
文献

- 1) Kakimoto Yo, Takatori Satoshi, Okihashi Masahiro, Kajimura Keiji, Toriba Akira, Hayakawa Kazuichi. Simple Method for Determination of Fungicides in Citrus Fruits by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food analytical methods* 2016; **9**(12): 3345-3351
- 2) 岡本葉, 高取聡, 起橋雅浩, 柿本幸子, 阿久津和彦, 北川陽子, 尾花裕孝, 村田弘, 住本建夫, 田中之雄. 1993~2006 年度に実施した柑橘類中における防かび剤の残留実態調査. *大阪府立公衆衛生研究所研究報告* 2007; **45**: 23-28
- 3) 財務省貿易統計：
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/>)
「WEB サイトの内容は 2017 年 7 月 19 日に確認した」



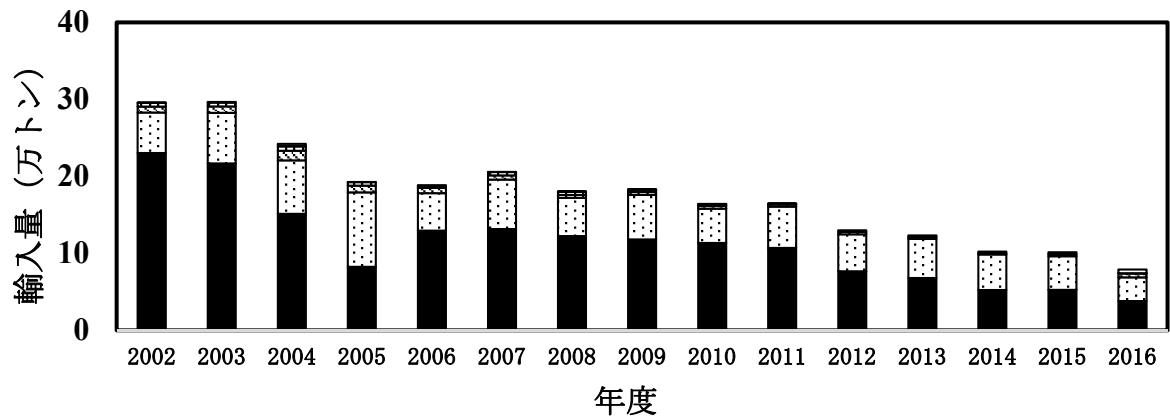
- 定量下限値 (0.0002 g/kg) 未満
- ※ 定量下限値～使用基準の50%

図1 TBZ 使用表示があった柑橘類の使用基準に対する検出状況



- 定量下限値 (0.0002 g/kg) 未満
- 定量下限値～使用基準の50%
- ※ 使用基準の50～100%
- = 使用基準 (0.0050 g/kg) 超過

図2 IMZ 使用表示があった柑橘類の使用基準に対する検出状況



- アメリカ合衆国 □ 南アフリカ共和国 ■ イスラエル ▨ スワジランド ▩ その他

図3 グレープフルーツの輸入量
(資料) 財務省「貿易統計」を参考に著者作成

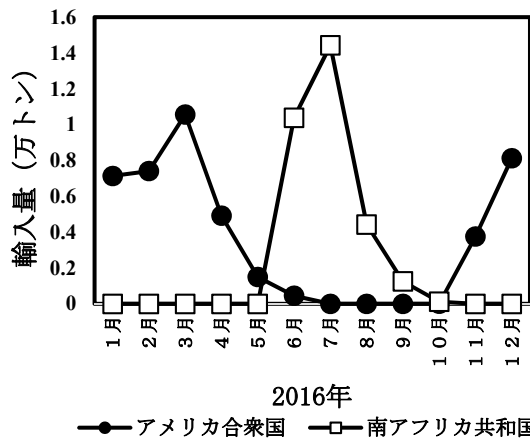


図4 2016年グレープフルーツの月別輸入量

(資料) 財務省「貿易統計」を参考に著者作成

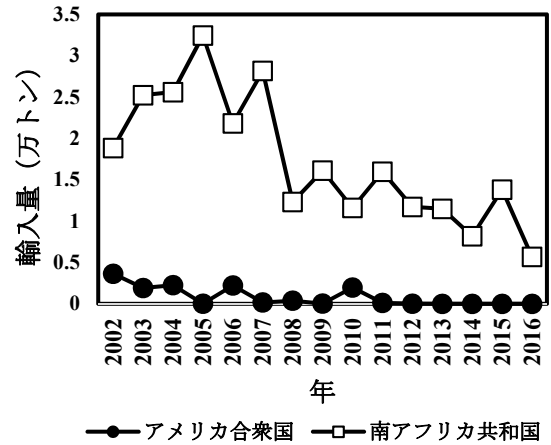


図5 グレープフルーツの8～9月の年別輸入量

(資料) 財務省「貿易統計」を参考に著者作成

表1 検体の原産国

	原産国	検体数
グレープフルーツ	南アフリカ共和国	65
	アメリカ合衆国	1
	スワジランド	1
オレンジ	オーストラリア	56
	アメリカ合衆国	5
	南アフリカ共和国	3
レモン	チリ共和国	8
	アメリカ合衆国	1
計		140

表2 防ばい剤使用の表示による分類

カテゴリ	TBZ 表示	IMZ 表示	グレープフルーツ	オレンジ	レモン
A	有	有	55	62	9
B	有	無	0	0	0
C	無	有	8	2	0
D	無	無	4	0	0

Monitoring result of fungicides in imported citrus fruits examined in 2007-2016

Naoki FUKUI^a, Yoko KITAGAWA^a, Satoshi TAKATORI^a, Sachiko KAKIMOTO^a, Masakazu OSAKADA^a,
Yo KAKIMOTO^a, Satoko YAMAGUCHI^b, Masato YOSHIMITSU^a, Kazuhiko AKUTSU^a, Emiko AZUMA^a
and Keiji KAJIMURA^a

From 2007 to 2016, residual fungicides in imported citrus fruits were surveyed. Thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ) and orthophenylphenol (OPP) were examined in total of 140 samples. As a result, TBZ and IMZ were detected from 65 and 134 samples, respectively, and OPP was not detected. Diphenyl (DP) was examined for 28 samples and not detected. For one sample of lemon, IMZ exceeded maximum residue limit under the Japanese Food Sanitation Act.

Key words: fungicide, citrus, food additives, standards for use of food additives

a Osaka Institute of Public Health

b Osaka Fujiidera Public Health Center

農産物中の残留農薬の検査結果

(平成 28 年度)

北川陽子^a 東恵美子^a 小阪田正和^a 吉光真人^a 福井直樹^a 阿久津和彦^a 梶村計志^a

平成 28 年度に実施した農産物中の残留農薬検査結果をまとめた。検査総数 272 検体について分析した結果、殺虫剤のべ 77 件、殺菌剤のべ 70 件を検出した。国産の甘長唐辛子からプロシミドン（殺菌剤）が検出され、適用外での農薬使用が認められたが、食品衛生法の残留基準値を超えた事例はなかった。

キーワード：農産物、残留農薬、行政検査、モニタリング

大阪府では農産物中の残留農薬の実態調査¹⁻⁸⁾を継続的に実施し、府民の食の安全確保に努めている。

厚生労働省から示された「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」^{9,10)}（以下、ガイドライン）により、分析精度の確認を目的とした妥当性評価の実施が試験機関毎に求められることとなった。当所においても、代表的な農産物であるほうれんそう、きゅうり、ばれいしょ、玄米、りんごおよびウーロン茶等 15 種類について妥当性評価試験^{11,12)}を行い、ガイドラインへの対応を行っている¹³⁾。

本稿では、平成 28 年度に実施した農産物中の残留農薬検査結果について報告する。

実験方法

1. 試料

平成 28 年 5 月から平成 29 年 2 月の間に搬入された 272 検体（国産農産物 124 検体、輸入農産物 148 検体）を対象とした。検体の内訳を表 1 に示した。

2. 測定対象農薬

表 2 に示した 221 項目の農薬を対象とした。

3. 農薬標準品および試薬

農薬の標準品は、和光純薬工業（株）、関東化学（株）、Riedel-de Haën および Dr. Ehrenstorfer GmbH 製の残留農薬分析用標準品又は同等品を用いた。各標準品をアセトン、またはメタノールで溶解し、1000 ppm 標準溶液を調製した。各標準溶液を混合し、標準混合溶液を調製した。その他の試薬および精製カラムは既報⁸⁾に準じた。

4. 器具および機器

使用器具および機器は既報⁸⁾に準じた。使用機器の概略を以下に記す。

・GC-MS/MS 装置

GC : 7890A (Agilent 製)、MS/MS : 7000B (Agilent 製)、分析カラム : DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm ; Agilent 製)、イオン化方式 : EI

・LC-MS/MS 装置

LC : NEXERA ((株)島津製作所製)、MS/MS : 4000QTRAP (ABSciex 製)、分析カラム : ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm ; 2.1 × 100 mm ; Waters 製)、プレカラム : ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm ; 2.1 × 5 mm ; Waters 製)、イオン化方式 : ESI (ポジティブ)

5. 前処理方法

当所の標準作業書に従った。試験法の概略を

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

図1に示す。なお、定量限界はいずれの農薬も0.01 ppmであった。ただし、茶の熱湯抽出液を試料として用いる場合（試験法V）のみ、定量限界を0.05 ppmとした（8項目；アセタミプリド、ジフェノコナゾール、ジフルベンズロン、ジメトエート、テトラコナゾール、テブフェンピラド、ピラクロホス、フルフェノクスロン）。

結果および考察

1. 検体搬入実績

表1に検体搬入実績を示した。国産農産物は、だいこん（11）、きゅうり（11）、玄米（10）、たまねぎ（9）等、輸入農産物はバナナ（33）、オレンジ（22）、グレープフルーツ（15）、えだまめ（12）等の搬入数が多く、特にバナナは総検体数の1割以上を占めた。

2. 農薬検出状況および検出濃度について

全272検体中、何らかの農薬が検出された検体数は96（検出率35%）であった。検出率を比較すると国産が21%（124検体中26検体）、輸入が47%（148検体中70検体）となり、輸入農産物の検出率が高い傾向であった。

類型別検出農薬を表3にまとめた。類型5（たまねぎ）および類型6（芋類・根菜類）を除き、全ての類型で農薬が検出された。検出率が特に高い（60%以上）農産物は、セロリ（100%）、レモン（100%）、ぶどう（100%）、りんご（100%）、グレープフルーツ（87%）、きゅうり（82%）、なす（67%）およびバナナ（64%）であった。外皮や果皮を除去せずに分析に供することが要因と考えられた。

検査対象農薬221項目のうち、検出が確認されたのは34項目であった。検出頻度の高い殺虫剤はクロルピリホス（34）、アセタミプリド（9）およびイミダクロプリド（8）等、殺菌剤はアゾキシストロビン（16）、ピラクロストロビン（14）、プロシミドン（11）およびボスカリド（8）等であった。これらの農薬は、不特定多数の農産物から検出されるのではなく、限定的に特定農産物から検出された。高頻度に検出された事例を表4に示した。ボスカリド（ぶどうおよびりんご）、ピラクロストロビン（グレープフルーツ）、プロシミドン（きゅうり）、トリフロキシストロ

ビン（りんご）およびクロルピリホス（レモン）等は当該農産物における検出率が60%を超過したが、検出値は概ね基準値の1/10以下であり、過去の検出傾向と同様⁸⁾であった。一方で、近年検出率が増加している農薬として、ピフェントリン（バナナ）があげられる。平成28年度の検出率は18%（検体数33、検出数6）であり、平成26～27年度の9%（検体数58、検出数5）、平成24～25年度の2%（検体数46、検出数1）に比べて増加傾向であった。平成27年度には食品衛生法違反事例（検出値0.2 ppm；基準値0.1 ppm）が確認されたことから、今後も継続的な検査の必要性が示唆された。

平成28年度の検査結果において、食品衛生法で定める基準値を超過する事例は認められなかった。しかし、甘長唐辛子から適用外のプロシミドン（殺菌剤）が検出された。調査の結果、生産農家の誤認識が要因と判明し、適切な農薬使用の指導を行った。その他の検出事例においては、すべて基準値以下であり、国内外を問わず、適切な農薬の使用が反映されていると考えられた。

3. 妥当性評価試験

残留農薬検査においては、分析精度の確認を目的に、妥当性評価試験の実施が求められている。全ての搬入検体について、妥当性評価を行うことは望ましいが、実際は農産物の種類が多く、困難な状況である。当所では、これまでにほうれんそう、きゅうり、ばれいしょ、玄米、りんごおよびウーロン茶等15種類の農産物について評価を実施した。平成28年度は未評価の農産物のうち、搬入数の多いグレープフルーツおよびえだまめを対象に妥当性を評価した。これにより、搬入数が上位を占める農産物については概ね評価済みとなった（表1）。搬入状況を考慮し、次年度以降も継続的に評価試験を行う予定である。

4. 今後の予定

消費者の残留農薬への関心は高い。日々の食生活に密接する残留農薬の検査は、精度を高めるだけでなく、農薬の使用実態に則した対応が必要となる。現在、測定項目外であるが、他の機関で検出報告が多いものとしてピレスロイド

系農薬（シペルメトリン、シフルトリン、フェンバレートおよびシハロトリン等）およびネオニコチノイド系農薬（クロチアニジン、チアメトキサムおよびジノテフラン等）があげられる¹⁴⁻¹⁸⁾。近年、ジノテフランは国産農産物からの検出が増加しており、玄米、にらおよびほうれんそう等への残留事例が報告¹⁹⁾されている。これらの農薬については、重点項目として今後検討を行い、残留実態の把握に努める予定である。

謝辞

分析検体の搬入に御尽力いただきました大阪府健康医療部食の安全推進課および各保健所の食品衛生監視員の皆様に深謝致します。

文献

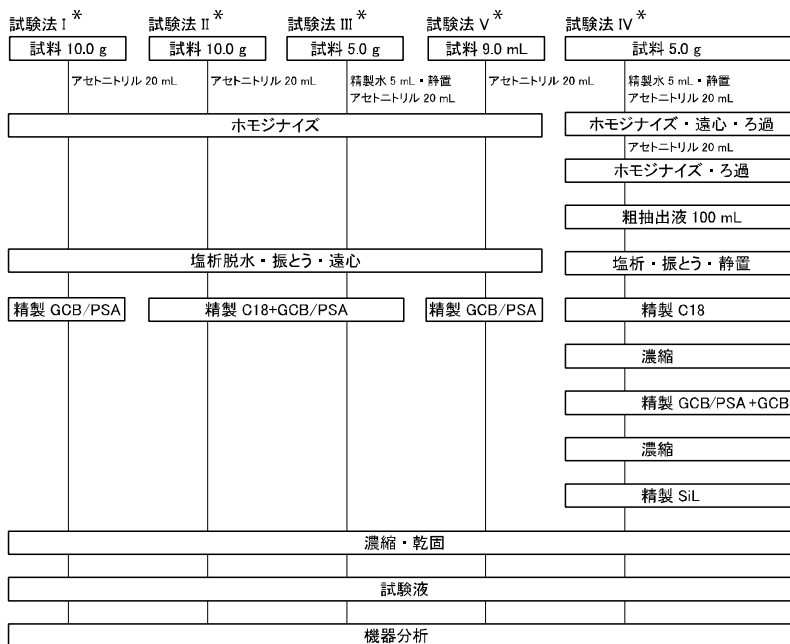
- 1) 小西良昌, 吉田精作, 今井田雅示. 野菜および果実中の残留農薬汚染実態 - 昭和 61 年度～平成 2 年度 -. 大阪府立公衆衛生研究所報 食品衛生編 1987; **18**: 63-68.
- 2) 北川幹也, 村田弘, 今井田雅示, 堀伸二郎. 野菜および果実中残留農薬汚染実態 - 平成 3 年度～平成 7 年度 -. 大阪府立公衆衛生研究所報 食品衛生編 1996; **27**: 49-52.
- 3) 福島成彦, 北川幹也, 高取聡, 吉光真人, 桑原克義, 堀伸二郎. 野菜および果実中の残留農薬の汚染実態 - 平成 8 年度～平成 12 年度 -. 大阪府立公衆衛生研究所報 食品衛生編 2002; **40**: 117-125.
- 4) 北川陽子, 起橋雅浩, 尾花裕孝, 阿久津和彦, 柿本幸子, 岡本葉, 他. 輸入農産物中の残留農薬の調査結果 - 平成 11 年度～平成 18 年度 -. 大阪府立公衆衛生研究所報 2007; **45**: 29-36.
- 5) 柿本幸子, 高取聡, 北川幹也, 吉光真人, 北川陽子, 岡本葉, 他. 国産野菜および果実中の残留農薬の汚染実態 - 平成 13 年度～平成 18 年度 -. 大阪府立公衆衛生研究所報 2007; **45**: 37-42.
- 6) 北川陽子, 高取聡, 福井直樹, 柿本葉, 柿本幸子, 山本晃衣, 他. 輸入農産物中の残留農薬の検査結果 - 平成 19 年～平成 21 年. 大阪府立公衆衛生研究所報 2010; **48**: 8-13.
- 7) 福井直樹, 高取聡, 北川陽子, 柿本葉, 柿本幸子, 山本晃衣, 他. 国産農産物中の残留農薬の検査結果 - 平成 19 年～平成 21 年 -. 大阪府立公衆衛生研究所報 2010; **48**: 14-21.
- 8) 北川陽子, 福井直樹, 山口聡子, 小阪田正和, 吉光真人, 阿久津和彦, 他. 農産物中の残留農薬の検査結果 - 平成 26 年～平成 27 年度. 大阪府立公衆衛生研究所報 2016; **54**: 17-28.
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品中に残留する農薬等に関する試験報の妥当性評価ガイドラインについて. 平成 19 年 11 月 15 日付食安発第 1115001 号
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について. 平成 22 年 12 月 24 日付食安発 1224 第 1 号
- 11) 高取聡, 山本遥菜, 福井直樹, 山口聡子, 北川陽子, 柿本葉, 他. LC-MS/MS を用いた迅速な野菜類および果実中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価. 日本食品衛生学雑誌 2013; **54**: 237-249.
- 12) 福井直樹, 高取聡, 山口聡子, 北川陽子, 吉光真人, 小阪田正和, 他. マトリックス添加標準溶液を活用した野菜類および果実類中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価. 日本食品衛生学雑誌 2015; **56**: 178-184.
- 13) 山口聡子, 高取聡, 福井直樹, 北川陽子, 吉光真人, 小阪田正和, 他. 妥当性ガイドラインを踏まえた残留農薬検査における大阪府の取り組み. 第 51 回全国衛生化学技術協議会講演集 2014; 60-61.
- 14) 中島涼, 丸山量子, 佐藤徳子, 大久保祥嗣, 米田篤司, 八木正博. 農産物中の残留農薬の検査結果. 神戸市環境保健研究所報 2016; **44**: 42-50.
- 15) 富澤早苗, 大塚健治, 田村康宏, 八巻ゆみこ, 増渕珠子, 岩越景子, 他. 国内産野菜・果実中の残留農薬実態調査-平成 26 年度-. 東京都健康安全センター年報 2015; **66**: 189-195.
- 16) 須藤将太, 大塚健治, 富澤早苗, 田村康宏, 八巻ゆみこ, 増渕珠子, 他. 輸入農産物中の残留農薬実態調査 (野菜・その他) -平成 26 年度-. 東京都健康安全センター年報 2015;

66: 197-204.

- 17) 小鍛冶好恵, 大塚健治, 富澤早苗, 田村康宏, 八巻ゆみこ, 増淵珠子, 他. 輸入農産物中の残留農薬実態調査 (果実類) -平成 26 年度-. 東京都健康安全センター年報 2015; 66: 205-216.
- 18) 農林水産省. 国内産農産物における農薬の使用状況および残留状況調査の結果について (平成 26 年度) . http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouyaku/26_mo

[nitor.html](#)

- 19) 渡邊美奈恵, 上野英二, 梅村優子, 市川義多加, 戸塚昌子, 棚橋高志, 他. 愛知県内に流通する農産物中のネオニコチノイド系殺虫剤の実態調査. 第 39 回農薬残留分析研究会講演要旨集 2016; 231-236.
- 「WEB サイトの内容は 2017 年 8 月 1 日に確認した」



*: 表1に各試験法の適用農産物を示す

図1 試験法の概略

表1 農産物の類型分類および搬入検体数

類型	分類	農産物	搬入総数(件)	国産農産物(件)	輸入農産物(件)	妥当性評価*2	試験法*3	
1	野菜・葉菜・花菜	緑黄色	かいわれだいこん					I
			クレソン					
			ケール					
			こまつな	3	2	1		
			しゅんぎく					
			チンゲンサイ					
			ブロッコリー	11	5	6	GC/LC	
			ほうれんそう	6	1	5	GC/LC	
			みずな(きょうな)					
			アスパラガス					
2	野菜・未成熟豆類	淡色	カリフラワー	1		1		I
			キャベツ(芽キャベツを含む)	3	3		GC/LC	
			さやいんげん	3		3		
			さやえんどう					
			サラダ菜					
			セロリ	2	1	1		
			チシャ					
			トレビス					
			はくさい	1	1			
			パセリ					
3	ナス科、ウリ科、結実	みつば					I	
			レタス	7	7			GC/LC
			オクラ	1		1		
			かぼちゃ(スカッシュを含む)	12	6	6		
			きゅうり(ガーキンを含む)	11	11			GC/LC
			ししとう					
			しろりり					
			とうがん	1	1			
			トマト	4	4			GC/LC
			なす	3	3			
4	ネギ類	地上部	にら				I	
		地下部	ねぎ	13	7	6		
5	ネギ類	地上部	わけぎ				I	
		地下部	たまねぎ	13	9	4		GC/LC
6	芋類・根菜類		らっきよ				I	
			かぶ					
			かんしょ	3	3			
			ごぼう					
			さといも類(やつがしらを含む)	1		1		
			だいこん	11	11			GC/LC
			にんじん	12	8	4		
			ばれいしょ	7	7			GC/LC
			やまいも(長いもを含む)	1	1			
			れんこん	4	4			
7	穀類	種実類	えだまめ	12		12	GC/LC	II
			とうもろこし					
			玄米	10	10		GC/LC	
8	果樹/柑橘類		あまなつみかん				II	
			オレンジ	22		22		GC
			その他のかんきつ類*					LC
			グレープフルーツ	15		15		GC/LC
			なつみかん					
			ライム					
9	果実		レモン	5		5	I	
			あんず					
			いちご					GC/LC
			うめ					
			おうとう(チェリーを含む)					
			キウイー	4		4		GC/LC
			すもも					
			なし(西洋なしを含む)					
			ネクタリン					
			パイナップル	5		5		
10	その他		ぶどう	2		2	I	
			みかん	5	5			
			もも	5	5			
			りんご	3	3			GC/LC
			かき					
			すいか	2	2			
			バナナ	33		33		GC/LC
			びわ					
	まくわうり							
	メロン類	4	2	2				
11	茶	ウーロン茶	4		4	LC	IV(抽出液) V(茶葉)	
12	アボカド	アボカド	1		1	GC/LC	II	
99	類型外	その他*	4	2	2		I	

*1: 甘長唐辛子, グリンピース, しょうが, そら豆

*2: 添加濃度2濃度(0.01 ppmおよび0.05 ppm)で実施

*3: 図11に概略を示す

表2 類型別検査対象項目

No.	農薬	類型													分析機器
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	99	
1	BHC (γ)	○	×	○	○	○	×	○	○	×	○	-	×	×	GC
2	EPN	×	○	×	×	○	○	○	×	×	○	-	×	×	GC
3	XMC	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	LC
4	アザコナゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	×	○	×	LC
5	アセタミプリド*	○	×	○	○	○	×	○	○	○	○	●	○	×	LC
6	アセトクロール	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	×	○	×	LC
7	アゾキシストロピン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	LC
8	アトラジン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
9	アニロホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
10	アミノカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	LC
11	アメトリン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC/GC
12	アラクロール	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	×	LC
13	アレスリン	○	○	○	○	○	×	○	○	×	○	×	×	×	LC
14	イサゾホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
15	イソウロン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	LC
16	イソキサチオン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
17	イソプロカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
18	イソプロチオラン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
19	イプロバリカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
20	イプロベンホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
21	イマザメタベンズメチルエステル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	LC
22	イミダクロプリド	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	LC
23	インダノファン	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	×	○	×	LC
24	エスプロカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	×	LC
25	エタルフルラリン	×	○	○	×	×	×	○	○	○	○	-	×	×	GC
26	エチオン	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	-	×	×	GC
27	エチロール	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	×	○	×	LC
28	エディフェンホス	×	×	×	○	○	×	○	○	×	×	-	○	×	GC
29	エトキサゾール	○	○	×	○	○	×	○	○	×	○	×	×	×	LC
30	エトファンブロックス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
31	エトフメセート	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	LC/GC
32	エトプロホス	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	-	○	×	GC
33	エトベンザニド	×	○	×	○	○	×	×	×	○	×	×	×	×	LC
34	エトリムホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	○	GC
35	エボキシコナゾール	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	LC
36	オキサジアゾン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
37	オキサジキシル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	LC
38	オキサジクロメホン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	LC
39	カズサホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
40	カルフェントラゾンエチル	○	×	○	○	○	×	○	○	○	○	-	×	×	GC
41	カルプロバミド	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	×	○	LC
42	カルボフェノチオン	×	○	×	○	○	○	×	○	×	○	×	×	×	LC
43	キナルホス	○	○	×	○	○	○	○	×	○	-	○	○	×	GC
44	キノキシフェン	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	-	×	×	GC
45	キノクラミン	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	-	○	×	GC
46	キントゼン	○	○	○	○	○	×	○	○	×	○	-	○	×	GC
47	クミルロン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
48	クリミジン	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	×	×	×	LC
49	クロキシセツトメキシル	○	○	×	○	○	×	×	○	○	○	○	○	×	LC
50	クロチオホス	○	○	○	○	○	○	×	○	×	○	×	×	×	LC
51	クロマゾン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
52	クロメプロップ	○	○	○	○	○	×	○	○	×	○	-	○	×	GC
53	クロルタルジメチル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	×	GC
54	クロルピリホス	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	-	○	×	GC
55	クロルピリホスメチル	×	○	○	○	○	○	×	○	○	○	-	○	×	GC
56	クロルフェンソ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
57	クロルフェンビンホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	LC
58	クロルフルアズロン	○	○	×	○	○	○	○	○	×	○	×	×	×	LC
59	クロルベンジド	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	-	×	×	GC
60	クロルベンジレート	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
61	シアナジン	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	×	LC
62	シアノホス	×	×	○	×	×	×	○	○	○	○	-	○	×	GC
63	ジウロン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	LC
64	ジエトフェンカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
65	ジクロトホス	×	×	○	○	○	×	○	×	×	○	-	×	×	GC
66	ジクロファンチオン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
67	ジクロフトラゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	LC
68	ジクロホップメチル	○	○	×	○	○	×	○	○	○	○	-	○	×	GC
69	ジクロラン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
70	ジチオビル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
71	ジニコナゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	LC
72	シハロホップブチル	×	○	○	×	○	×	○	×	○	-	×	×	×	GC
73	ジフェオミド	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC/GC
74	ジフェノコナゾール*	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	×	○	LC
75	ジフルフェナミド	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	GC/LC
76	ジフルベンズロン*	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	●	○	×	LC
77	シプロジニル	×	○	×	×	○	○	○	○	×	○	-	○	×	GC
78	シマジン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	×	○	GC
79	シメコナゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	LC/GC
80	ジメタメトリン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
81	ジメチルビンホス	×	×	○	×	×	×	○	○	○	○	-	×	×	GC
82	ジメトエート*	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
83	ジメトモルフ	○	○	○	○	×	○	○	○	×	○	×	×	×	LC
84	シメトリン	×	○	○	○	○	×	○	○	×	○	-	○	×	GC
85	ジメビレート	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	GC/LC
86	シラフルオフェン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	×	○	GC
87	スルプロホス	×	○	○	○	○	×	○	×	○	-	○	×	○	GC
88	スルホテップ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	LC
89	ターバシル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
90	ダイアジノン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
91	ダイアレート	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	×	×	×	LC
92	ダイムロン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
93	チアクロプリド	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	×	○	×	LC
94	チアゾビル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	LC
95	チオベンカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	LC
96	チオトリン	×	○	×	○	○	×	○	×	×	-	○	×	○	GC
97	チフルザミド	×	○	○	×	○	○	×	○	×	○	-	×	×	GC

表2 類型別検査対象項目(続き)

No.	農薬	類型																	分析機器
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	99					
98	テトラクロロピホス	x	x	○	x	x	x	○	x	x	○	-	○	x	GC				
99	テトラコナゾール*	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	LC/GC					
100	テトラジホシ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	GC					
101	テニルクロール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC					
102	テブコナゾール	○	○	○	x	○	○	○	○	○	○	○	x	LC					
103	テブフェノジド	x	○	○	○	○	○	x	○	x	○	x	x	LC					
104	テブフェンピラド*	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	●	x	LC					
105	テフルトリン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
106	テフルベンズロン	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	x	x	LC					
107	テルブカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	x	LC					
108	テルブトリン	x	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
109	トリアジメノール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	LC					
110	トリアジメホシ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC					
111	トリアゾホス	x	x	○	○	○	○	○	○	○	○	-	x	GC					
112	トリアレート	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	x	GC/LC					
113	トリシクラーゾール	x	○	○	○	○	x	○	○	○	○	x	○	LC					
114	トリチヨナゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
115	トリブホス	x	○	○	x	○	○	○	○	○	x	-	x	GC					
116	トリフルムロン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
117	トリフルラリン	○	○	○	x	x	○	○	○	○	○	-	○	GC					
118	トリフロキシストロピン	○	○	○	x	x	x	○	○	○	○	○	x	LC					
119	トリホリン	x	x	x	x	○	○	x	x	x	x	x	x	LC					
120	トルクロホスメチル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
121	トルフェンピラド	x	x	○	x	○	○	x	○	x	x	-	x	GC					
122	ナフチルアセタミド	x	○	○	x	○	○	x	○	○	○	-	x	GC					
123	ナフロアニリド	○	○	○	○	○	○	x	○	○	○	○	x	LC					
124	ナフロバミド	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC					
125	ニトロタールイソプロピル	○	○	○	x	x	○	○	○	○	○	-	x	GC					
126	バクログラゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
127	バラチオン	x	○	○	x	x	x	○	○	x	-	-	x	GC					
128	バラチオンメチル	x	x	○	○	○	x	○	○	○	○	-	x	GC					
129	ビテルタノール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
130	ビフェントリン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
131	ビベロニルプロキシド	○	○	○	○	○	○	○	○	x	-	○	x	GC					
132	ビベロホス	x	○	○	x	○	○	○	○	○	○	-	x	GC					
133	ピラクロストロピン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
134	ピラクロホス*	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	●	○	LC					
135	ピラゾホス	x	x	○	x	○	○	x	○	○	-	-	x	GC					
136	ピラフルフェンエチル	○	x	x	○	○	x	○	○	○	○	-	x	GC					
137	ピリダフェンチオン	x	x	○	○	○	x	○	○	○	○	-	x	GC					
138	ピリダベン	x	○	○	x	○	○	x	○	○	○	-	x	GC					
139	ピリダリル	○	○	x	○	○	○	○	○	○	○	x	x	LC					
140	ピリフェノックス	○	○	○	○	○	○	x	○	x	○	-	○	GC					
141	ピリプロチカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	x	GC					
142	ピリプロキシフェン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	x	LC/GC					
143	ピリミカブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
144	ピリミジフェン	○	x	x	x	x	x	x	○	○	-	-	x	GC					
145	ピリミノバククメチル	○	○	○	○	○	○	x	○	○	○	-	x	GC					
146	ピリミホスメチル	○	x	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
147	ピンクロリリン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
148	フェナミホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
149	フェナリモル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
150	フェニトロチオン	x	x	○	x	○	x	○	○	○	○	-	x	GC					
151	フェノキサニル	○	○	○	○	○	x	○	○	○	○	-	x	GC					
152	フェノキシカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
153	フェノチオカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC/GC					
154	フェノブカルブ	x	○	○	○	○	○	○	x	○	x	○	x	LC					
155	フェンアミド	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC					
156	フェンクロルホス	x	x	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
157	フェンズルホチオン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
158	フェントエート	x	x	○	○	○	x	x	○	○	○	-	○	GC					
159	フェンプロナゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
160	フェンプロバトリン	x	○	○	x	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
161	フェンプロビモルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC/GC					
162	フサライド	○	○	○	x	x	x	○	○	○	○	-	○	GC					
163	フタクロール	○	○	○	○	○	x	○	○	○	○	-	○	GC					
164	フタミホス	x	○	○	x	○	○	○	○	○	○	-	x	GC					
165	フビリメート	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
166	フプロフェジン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
167	フラムプロップメチル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC/GC					
168	フラメトビル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC					
169	フリラゾール	○	○	x	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
170	フルアクリピリム	○	x	x	x	x	x	○	○	x	-	-	○	GC					
171	フルジオキシニル	x	○	○	x	○	○	x	x	○	-	○	x	GC					
172	フルシラゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	LC					
173	フルトラニル	x	x	○	x	○	○	○	○	x	-	○	x	GC					
174	フルトリアホール	○	○	○	○	○	○	x	○	○	x	○	x	LC					
175	フルフェンクスロン*	○	○	x	○	○	○	○	○	x	○	○	x	LC					
176	フルミオキサジン	○	x	x	○	○	x	○	○	x	○	-	x	GC					
177	フルリドン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC/GC					
178	フレチラクロール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC					
179	プロシミド	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
180	プロチオホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
181	プロバクロー	x	○	○	○	○	x	○	○	○	○	-	○	GC					
182	プロバジン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
183	プロバニル	○	○	○	○	○	○	○	○	x	-	-	○	GC					
184	プロバホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
185	プロピコナゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	x	GC					
186	プロピザミド	○	○	○	○	○	○	○	x	○	x	○	x	LC					
187	プロフェノホス	x	○	○	x	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					
188	プロホキスル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	LC					
189	プロマシル	x	x	○	x	○	○	x	○	○	-	-	x	GC					
190	プロメトリン	x	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	GC					

表2 類型別検査対象項目(続き)

No.	農薬	類型													分析機器
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	99	
191	プロモホス	x	x	○	○	○	x	○	○	○	○	-	○	x	GC
192	ヘキサコナゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	LC
193	ヘキサジノン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	LC
194	ヘキシチアゾクス	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	x	x	x	LC
195	ベナラキシル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC/GC
196	ベノキサコール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
197	ヘブタクロル	○	○	○	○	○	○	○	x	x	○	-	x	x	GC
198	ベルメトリン	x	x	x	x	x	x	x	○	○	-	x	x	GC	
199	ベンコナゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
200	ベンシクロン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	○	LC
201	ベンゾフェナップ	○	○	○	x	x	○	○	○	○	○	x	x	x	LC
202	ベンチアバリカルブイソプロピル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	LC
203	ベンフルラリン	○	○	○	x	x	x	○	○	○	○	-	○	x	GC
204	ベンフレゼート	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	GC
205	ボスカリド	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	○	○	x	LC
206	ホスチアゼート	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
207	ホスファミドン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	○	LC
208	ホレート	○	○	○	○	○	x	○	○	x	○	-	○	x	GC
209	マラチオン	x	x	○	x	○	x	○	○	○	○	-	x	x	GC
210	マイクロブタニル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	LC/GC
211	メタベンズチアズロン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
212	メチダチオン	x	x	○	x	x	x	○	○	○	○	-	○	x	GC
213	メトキシクロール	x	x	○	x	○	x	○	○	○	○	-	○	x	GC
214	メトミノストロビン	○	○	x	○	○	x	x	○	x	x	-	○	x	GC
215	メトルカルブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	LC
216	メビホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	LC/GC
217	メフェナセット	○	○	x	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	LC
218	メフェンビルジエチル	○	○	○	○	○	x	○	○	○	○	-	○	x	GC
219	メプロニル	x	○	○	x	○	○	x	x	○	○	-	x	x	GC
220	モノクロトホス	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	LC
221	モノニユロン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	○	LC
検査対象項目数		173	191	196	183	206	171	204	199	179	210	53	153	107	

○:検査対象項目(定量下限 0.01 ppm), ●:検査対象項目(定量下限 0.05 ppm), ×:検査対象外項目, -:未評価項目
*:類型11で茶熱湯抽出物を試料とする項目

表3 農産物中の残留農薬検査結果一覧

()内は検出件数

類型	農産物	検体		検出率 (%)	殺虫剤	殺菌剤
		総数	検出			
1	こまつな	3	1	33	アセタミプリド(1) フルフェノクスロン(1)	
	ブロッコリー	11	1	9		ボスカリド(1)
	ほうれんそう	6	3	50	イミダクロプリド(3)	
2	カリフラワー	1	0	0		
	キャベツ(芽キャベツを含む)	3	1	33		プロシミドン(1)
	さやいんげん	3	1	33	イミダクロプリド(1) フルフェノクスロン(1)	
	セロリ	2	2	100	フルフェノクスロン(1)	ジフェノコナゾール(1) ピラクrostロビン(1) プロビコナゾール(1) ボスカリド(1)
	はくさい	1	0	0		
	レタス	7	1	14		ボスカリド(1)
3	オクラ	1	0	0		
	かぼちゃ	12	1	8	イミダクロプリド(1) フェンプロパトリン(1)	マイクロブタニル(1)
	きゅうり	11	9	82	アセタミプリド(1) ホスチアゼート(1)	プロシミドン(8) ベンチアバリカルブイソプロピル(3) ボスカリド(1)
	とうがん	1	0	0		
	トマト	4	2	50	トルフェンピラド(1)	フルジオキシニル(1) プロシミドン(1)
	なす	3	2	67	エトフェンブロックス(1)	プロシミドン(1)
	ピーマン(パプリカ)	2	1	50	アセタミプリド(1)	アゾキシストロビン(1) テトラコナゾール(1)
4	ねぎ	13	4	31	テフルベンズロン(1)	アゾキシストロビン(2) ジメトモルフ(1)
5	たまねぎ	13	0	0		
6	かんしょ	3	0	0		
	さといも類(やつがしらを含む)	1	0	0		
	だいこん	11	0	0		
	にんじん	12	0	0		
	ばれいしょ	7	0	0		
	やまいも(長いもを含む)	1	0	0		
7	れんこん	4	0	0		
	えだまめ	12	6	50	アセタミプリド(4) エトフェンブロックス(1) クロルピリホス(1) ピフェントリン(1)	アゾキシストロビン(3)
	玄米	10	2	20	エチプロール(1)	イソプロチオラン(1) トリシクラゾール(1)

表3 農産物中の残留農薬検査結果一覧(続き)

()内は検出件数

類型	農産物	検体		検出率 (%)	殺虫剤	殺菌剤
		総数	検出			
8	オレンジ	22	9	41	クロルピリホス(7) フェンプロパトリン(2)	
	グレープフルーツ	15	13	87	イミダクロプリド(1) クロルピリホス(6) トルフェンピラド(1) フェンプロパトリン(1) プロフェジン(2) メチダチオン(1)	アゾキシストロビン(2) ピラクロストロビン(11) フェンプロコナゾール(2)
	レモン	5	5	100	クロルピリホス(3) マラチオン(1)	アゾキシストロビン(2) ピラクロストロビン(1) フルシラゾール(1)
9	キウイ	4	0	0		
	パイナップル	5	0	0		
	ぶどう	2	2	100	アセタミプリド(1)	テフコナゾール(1) ピラクロストロビン(1) ボスカリド(2)
	みかん	5	0	0		
	もも	5	1	20	チアクロプリド(1)	
	りんご	3	3	100	チアクロプリド(1)	トリフロキシストロビン(2) ボスカリド(2)
10	すいか	2	0	0		
	バナナ	33	21	64	クロルピリホス(17) ピフェントリン(6)	アゾキシストロビン(4)
	メロン類	4	1	25	イミダクロプリド(1) ベルメトリン(1)	
11	ウーロン茶	4	2	50	アセタミプリド(1)	トリアジメノール(1)
12	アボカド	1	1	100	イミダクロプリド(1)	アゾキシストロビン(1)
99	その他(甘長唐辛子)	1	1	100		アゾキシストロビン(1) プロシミドン(1)*
	その他(グリーンピース)	1	0	0		
	その他(しょうが)	1	0	0		
	その他(そら豆)	1	0	0		

*::適用外使用

表4 特定農産物から高頻度(検出率25%以上)に検出された農薬

農産物	農薬名	検体数	検出数	検出率(%)
ぶどう	ボスカリド	2	2	100
グレープフルーツ	ピラクロストロビン	15	11	73
きゅうり	プロシミドン	11	8	73
りんご	トリフロキシストロビン	3	2	67
りんご	ボスカリド	3	2	67
レモン	クロルピリホス	5	3	60
バナナ	クロルピリホス	33	17	52
ほうれんそう	イミダクロプリド	6	3	50
グレープフルーツ	クロルピリホス	15	6	40
レモン	アゾキシストロビン	5	2	40
えだまめ	アセタミプリド	12	4	33
オレンジ	クロルピリホス	22	7	32
きゅうり	ベンチアバカルフィンプロピル	11	3	27
えだまめ	アゾキシストロビン	12	3	25

Pesticide Residues in Agricultural Products
(May 2016 – February 2017)

Yoko KITAGAWA^a, Emiko AZUMA^a, Masakazu OSAKADA^a, Masato YOSHIMITSU^a,
Naoki FUKUI^a, Kazuhiko AKUTSU^a and Keiji KAJIMURA^a

We have investigated the pesticide residues in 272 agricultural products as administrative examination in fiscal 2016. Seventy-seven kinds of insecticides and 70 kinds of fungicides were detected in 96 samples. Although procymidone, which is not permitted for use to pepper in the Agricultural Chemicals Control Act, was detected in one sample of pepper, no pesticide residue exceeded the maximum residues limits (MRLs) or the uniform limit stipulated in the Food Sanitation Act.

Key words : agricultural products, pesticide residues, administrative examination, monitoring

a Osaka Institute of Public Health

新規脂質除去剤による分散固相抽出法を用いたホルモン剤分析法の 構築と妥当性評価

永吉晴奈^a 柿本健作^a 山口瑞香^a 内田耕太郎^a 吉田優子^a 梶村計志^a

牛肉及び牛乳中に残留するホルモン剤の分析法を検討した。抽出溶媒に0.5%酢酸含有アセトニトリルを使用し、ヘキサン分配とシリカゲルに酸化ジルコニウムを化学結合させた担体を利用した新規脂質除去剤による分散固相抽出で脂質を除去したものを液体クロマトグラフータンデム質量分析計(LC-MS/MS)に供する試験液とした。残留基準値を考慮して試料(牛乳及び牛筋肉)あたり0.5 ng/g、2 ng/g、10 ng/gで添加回収試験を実施し、真度、併行精度、室内精度を評価したところ、クロステボル、酢酸メレンゲステロール、ゼラノール、デキサメタゾン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、メチルプレドニゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロンの9種類のホルモン剤について妥当性評価ガイドラインの目標値を満たす結果を得た。

キーワード：ホルモン剤、分散固相抽出、液体クロマトグラフータンデム質量分析計、妥当性評価

当所では、液体クロマトグラフータンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた畜産食品中の残留ホルモン剤の検査を実施している。実施項目は牛肉では、ゼラノール、デキサメタゾン、メチルプレドニゾン、 β -トレンボロン、酢酸メレンゲステロールであり、牛乳ではゼラノール、デキサメタゾン、メチルプレドニゾン、ヒドロコルチゾンである。ホルモン剤は他の動物用医薬品と比較すると残留基準値の低い物質が多く、高感度な分析法が要求される。従来法では、検出下限値を2 ng/gとしており、試験液中の試料由来成分を溶液1 mLあたり5 g相当まで濃縮する必要があるため、試験開始から分析まで2日を要していた。また、濃縮によって脂質に代表される試料由来成分(マトリックス)の濃度も高くなるため、しばしば分析値に影響を与えるほどのマトリックス効果が観察されていた。

今回、これらの課題の解決を目的として、りん脂質等の脂質除去に有効であることが期待される、シリカゲルに酸化ジルコニウムを化学結合させた新規脂質除去剤(Z-sep)を用いた迅速

簡便で高感度な前処理法を構築した。さらに構築した前処理法を用いて従来から検査を実施している6物質と、 α -トレンボロン、クロステボル、プレドニゾンについて「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」²⁾(以後、ガイドラインとする)に基づく真度、併行精度、室内精度を評価し、目標値を満たす結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

大阪府内で牛肉及び牛乳を購入し、試験対象物質の残留がないことを確認して用いた。牛肉はフードプロセッサを用いて細切混合したものを、牛乳は購入したものをそのまま使用した。

2. 試薬及び器具等

(1) 標準品

動物用医薬品混合標準液(クロステボル、ゼラノール、プレドニゾン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、メチルプレドニゾン、各

^a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

20 µg/ml) 及びヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、酢酸メレンゲステロールは和光純薬工業(株)製のいずれも分析用標準品を用いた。

(2) 試薬及び器具

ギ酸(試薬特級、HPLC用)、アセトニトリル及びメタノール(LC/MS用)、*n*-ヘキサン(残留農薬分析用)、ジメチルスルホキシド(ダイオキシン分析用)は和光純薬工業(株)製を用いた。固相抽出用試薬はSigma-Aldrich社製Z-Sep(20 µm, 120 Å, 350 m²/g, ZrO₂% = 3.5)を用いた。メンブランフィルターはアドバンテック東洋(株)製DISMIC(親水性PTFE, 13 mm, 孔径0.2 µm)を用いた。

3. 装置および測定条件

(1) 装置

ホモジナイザーはKINEMATICA社製ポリトロンPT-MR3100、遠心機は日立工機(株)製Centrifuge CF7D2、振盪機は東京理科機械(株)製CUTE MIXER CM-1000、遠心エバポレーターは東京理化学器械(株)製CYE-3100型、LC-MS/MSはLC部:Waters社製ACQUITY UPLC I-Class System、MS部:Waters社製Xevo TQ-S Mass Spectrometer、分析カラム:Waters社製CORTECS UPLC C18(1.6 µm, 2.1×100 mm)を用いた。

(2) LC-MS/MS測定条件

移動相: 0.1%ギ酸水溶液(A)および0.1%ギ酸含有メタノール(B)

移動相条件: B 10% (0-5 min), 10-74% (5-17 min), 74-90% (17-20 min)

流速: 0.2 mL/min

カラム温度: 40 °C

注入量: 5 µL

イオン化モード: ESI (+/-)

測定モード: 選択反応モニタリング (Selected reaction monitoring, SRM)

イオン源温度: 150 °C

キャピラリー電圧: 3 kV

脱溶媒ガス(N₂)温度および流量: 400 °C、1000 L/hr

コーンガス(N₂)流量: 150 L/hr

化合物ごとのSRM条件は表1に示した。

4. 試験液の調整

試料2gを50 mL容のポリプロピレン(PP)製遠沈管に秤量し0.5%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル18 mLを加えホモジナイザーで均一化後、毎分3000回転で5分間遠心分離した。上清を新しいPP製遠沈管に移し、0.5%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリルで20 mLに定容した。そこに*n*-ヘキサン10 mLを加え振盪機で5分間攪拌後、毎分3000回転で5分間遠心分離した。下層のアセトニトリル層を5 mL採取し、Z-sep 0.5 mgを予め秤量した15 mL容PP製遠沈管に移した。振とう機で5分間攪拌後、毎分3000回転で5分間遠心分離し、上清2.5 mLを新しいPP製試験管に採取した。ここに25 µLのジメチルスルホキシドを加え、遠心エバポレーターを用いて残留溶媒がジメチルスルホキシドのみとなるまで濃縮した。濃縮残渣に20%アセトニト

表1 MS/MS測定条件及び基準値

	イオン化モード	マストランジション 1		マストランジション 2		牛筋肉基準値(ppm)	牛乳基準値(ppm)
		プリカーサイオン	プロダクトイオン	プリカーサイオン	プロダクトイオン		
クロステボル	ESI(+)	323	143	323	131	0.0005	0.0005
酢酸メレンゲステロール	ESI(+)	397	337	397	279	0.001 ^{*1}	不検出 ^{*1}
ゼラノール	ESI(-)	321	303	321	277	0.002	0.002
デキサメタゾン	ESI(+)	393	337	393	355	0.04	0.02
α-トレンボロン	ESI(+)	271	199	271	253		不検出 ^{*2}
β-トレンボロン	ESI(+)	271	199	271	253	0.002 ^{*2}	不検出 ^{*2}
メチルプレドニゾロン	ESI(+)	375	161	375	357	0.01	0.01
ヒドロコルチゾン	ESI(+)	363	121	363	327		0.01

※1 平成30年1月19日より適用。牛乳における検出限界値は0.0005 ppm

※2 牛肉はβ-トレンボロンとして、また牛乳はαとβの和として。なお牛乳における検出限界値は0.002 ppm

リル水溶液を 475 μL 加え、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。なお、試験溶液 1 mL 中の試料由来成分は 0.5 g 相当であった。試料の前処理スキームを図 1 に示した。

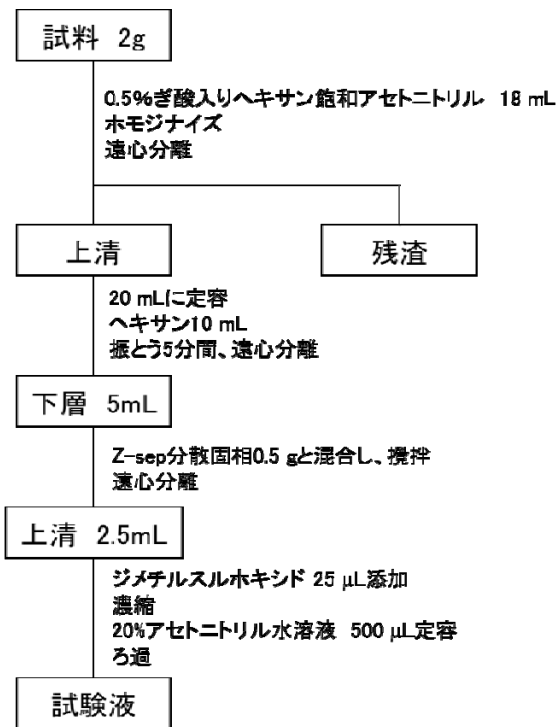


図 1 前処理スキーム

5. 定量

4)と同様の前処理法で得た濃縮残渣に最終濃度が 0.2、0.5、1、2、5、10 ng/mLとなるように混合標準溶液を添加したマトリックス標準溶液を 6 点作成し、検量線を得た。

6. 妥当性評価の実施

分析対象としたホルモン剤の残留基準値が広範囲に及ぶため、添加濃度を 0.5 ng/g、2 ng/g、10 ng/g の 3 種類設定した。分析者 5 名が 2 併行、1 日で枝分かれ試験を実施した。測定濃度の添加濃度に対する比から真度を得た。結果を用いて二元配置分散分析を実施し、併行精度と室内精度を求めた。

結果及び考察

1. 分析法の構築

(1) 試料の前処理法の検討

ホルモン剤の分析においては、試料が空気に触れることにより生じる妨害成分による影響があるため、従来はフードプロセッサを用いた細切混合を行わずに塊肉から直接試料を採取していた。しかし、近年の LC-MS/MS の高感度化に伴い分析の選択性が向上したことから、本法においてフードプロセッサ使用の有無によるピークの選択性の違いを検討したところ、差は認められなかった。以上から検査ではフードプロセッサで均一化した試料の使用を可能とした。

(2) 抽出溶媒の検討

従来法で使用していた 85%アセトニトリル水溶液とアセトニトリル、アセトニトリルに 0.2%、0.5%、1% (v/v) のぎ酸をそれぞれ混合したものの (全てヘキサン飽和アセトニトリルを使用) を抽出溶媒に使用し、マトリックス検量線及び添加回収試験の結果を比較した。本検討においては、当所で実施している検査の対象物質のみ

表 2 抽出溶媒によるマトリックス検量線の傾き比と決定係数の比較

抽出溶媒	酢酸メレンゲ ステロール		ゼラノール		デキサメタゾン		β -トレンボロン		メチルプレドニゾン	
	傾き比 (%)	決定係数	傾き比 (%)	決定係数	傾き比 (%)	決定係数	傾き比 (%)	決定係数	傾き比 (%)	決定係数
85%MeCN	70.9	0.9978	60.2	0.9942	73.6	0.9999	51.7	0.9997	80.5	0.9935
MeCN	92.6	0.9749	73.3	0.9962	98.8	0.9986	76.6	0.9998	85.2	0.9999
0.2%FA+MeCN	19.9	0.9579	30.8	0.9978	74.1	1.0000	50.9	0.9991	61.9	0.9985
0.5%FA+MeCN	75.1	0.9951	74.7	0.9901	101.6	0.9937	79.6	0.9936	78.3	0.9946
1%FA+MeCN	76.8	0.9896	68.3	0.9968	104.1	0.9996	79.0	0.9985	94.8	0.9961

MeCN:アセトニトリル FA:ぎ酸

表 3 抽出溶媒による回収率の比較

抽出溶媒	回収率 (%)				
	酢酸メレンゲ ステロール	ゼラノール	デキサメタゾン	β -トレンボロン	メチル プレドニゾン
85%MeCN	66.8	73.3	68.6	73.7	62.7
MeCN	47.2	68.9	74.4	71.3	79.2
0.2%FA+MeCN	28.8	63.9	81.2	68.1	76.9
0.5%FA+MeCN	74.1	72.8	79.0	70.2	66.6
1%FA+MeCN	33.9	79.5	86.1	70.6	81.5

MeCN:アセトニトリル FA:ぎ酸

を検討物質とし、抽出以降の工程は従来法¹⁾で行った。表 2 に溶媒検量線の傾きを 100%としたときの各マトリックス検量線の傾きの比率（以後、傾き比とする）及び直線の決定係数（R²値）を示す。また、表 3 に添加回収試験の結果を示す。検量線の直線性は、85%アセトニトリルと 0.5%ギ酸含有アセトニトリルで全ての物質において 0.99 以上の良好な決定係数を得た。また回収率も上記 2 種の抽出溶媒が良好であった。含水溶媒の使用は抽出液を濃縮する際に律速要因となることから、本法においては 0.5%ギ酸含有アセトニトリルを抽出溶媒とした。さらに、マトリックス検量線と溶媒検量線を比較したところ、無視できないイオン化抑制が観察された。そこで本法ではマトリックス検量線を用いた定量を行うこととした。

(3) 精製の検討

LC-MS/MS 分析におけるマトリックス効果の原因物質としてりん脂質が挙げられている³⁾。りん脂質は生体由来物質の一種で、食品分析以外にも血清などの生体試料を分析する際に生じるマトリックス効果の原因物質と考えられている。脂質除去に際して一般的な脱脂方法であるヘキサン分配は低極性の物質に有効な手法であるため、極性を持つりん脂質には効果的ではない。最近、りん脂質の除去を謳った固相抽出カラムや分散固相が複数販売されていることから、これらの製品を使用した抽出液の精製について検討した。なお、使用した固相抽出は Waters 社製 Oasis HLB PRiME (2step 法および 3step 法)、アジレントテクノロジー社製 Captiva ND^{lipids}、Sigma-Aldrich 社製 Z-sep、Z-sep+であった。

Z-sep を用いた場合、固相への負荷の際に抽出液を水と混合する必要がなく、その後の濃縮過程が迅速であった。また、カートリッジ型固相抽出において必須のコンディショニングや洗浄・溶出の過程が不要であるために所要時間の短縮が図れた。以上から本分析法では、Z-sep による分散固相抽出を選択した。なお、Z-sep

と類似の分散固相である Z-sep⁺ではホルモン剤が固相に吸着したため回収率が不良であった。

次に、分散固相抽出に使用する Z-sep 量を段階的に変えて、溶媒検量線との傾き比を比較した。結果を表 4 に示す。Z-sep 量の増加に伴って溶媒検量線との差が縮小する傾向を認めた。しかし、0.4 g と 0.6 g の場合では定量値に影響を及ぼすほどの差ではなく、さらに 0.5 g の Z-sep を予め充填した分散固相抽出用チューブが市販されていることから、本分析法では 0.5 g の Z-sep を用いて精製を行うこととした。なお、本法は 10 検体を処理するための所要時間が約半日であり、従来法（約 2 日）と比較して大幅に時間を短縮した。

2. 妥当性評価

ガイドラインに従い、分析者 5 名が 2 併行で 1 日間、枝分かれ試験を実施した。妥当性評価の実施にあたり、対象物質にクロステボル、 α -トレンボロン、プレドニゾロンを追加した。クロステボルの牛の筋肉中残留基準値が 0.5 ng/g と低いこと、また他のホルモン剤の基準値にも幅があることから、添加濃度を 0.5 ng/g、2 ng/g、10 ng/g の 3 点として妥当性評価を実施した。結果を表 5（牛肉）ならびに表 6（牛乳）に示す。

デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、牛肉におけるゼラノールは感度不足のため 0.5 ng/g 添加試料においては定量できなかった。しかし、いずれも表 1 に示した基準値付近では定量可能であり、検査の実施には問題がないと判断した。また、牛肉のヒドロコルチゾンについては試料由来のヒドロコルチゾンの影響を受けたため全ての添加濃度において定量できなかった。その他の物質はいずれの添加濃度においてもガイドラインの要求を満たし、検査の実施において十分な性能を持つ分析法であると判定した。すなわち、牛肉の 0.5 ng/g 添加試料で、真度 70~93%、併行精度 5.1~17.0%、室内精度 4.2~12.9%、2 ng/g 添加試料では、真

表 4 Z-sep 量によるマトリックス検量線の傾き比と決定係数の比較

Z-sep量	酢酸メレンゲ ステロール		ゼラノール		デキサメタゾン		β -トレンボロン		メチルプレドニゾロン	
	傾き比 (%)	決定係数	傾き比 (%)	決定係数	傾き比 (%)	決定係数	傾き比 (%)	決定係数	傾き比 (%)	決定係数
0.2 g	79.6	0.9993	84.3	0.9983	96.0	1.0000	70.2	0.9999	97.3	0.9978
0.4 g	82.6	0.9997	93.0	0.9990	100.1	0.9987	74.8	0.9999	102.8	0.9984
0.6 g	93.3	0.9988	100.5	0.9995	102.2	0.9996	75.5	0.9990	101.8	0.9971

度 79~99%、併行精度 2.3~11.0%、室内精度 2.1~12.3%、10 ng/g 添加試料では、真度 82~101%、併行精度 1.1~6.2、室内精度 2.3~7.3%であった。牛乳では、0.5 ng/g 添加試料では、真度 88~116%、併行精度 4.0~13.2%、室内精度 4.1~20.0%、2 ng/g 添加試料では、真度 79~109%、併行精度 2.7~18.1%、室内精度 3.3~13.4%、10 ng/g 添加試料では、真度 79~104%、併行精度 2.3~7.4%、室内精度 2.5~7.2%であった。

まとめ

迅速簡便で高感度なホルモン剤分析法を検討した結果、0.5%ぎ酸含有ヘキサノールとアセトニトリルで抽出した後ヘキサノール及び Z-sep 分散固相抽出による精製を用いる前処理法を構築した。本研究において構築した分析法の所要時間は約半日（10 検体）であった。

構築した前処理法を用いて妥当性評価を実施

したところ、真度、併行精度、室内精度において、ガイドラインの性能パラメーターを満たす結果が得られ、検査にも十分適用可能であった。

文献

- 1) 山口貴弘, 柿本健作, 永吉晴奈, 山口瑞香, 尾花裕孝. LC/MS/MS による畜産食品中のホルモン剤一斉分析法の検討. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2011; **49**: 20-23.
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について. 平成 22 年 12 月 24 日付食安発 1224 第 1 号
- 3) Shafeeque Ahmad, Harsh Kalra, Amit Gupta, Bharat Raut, Arshad Hussain, Md Akhlaquer Rahman. HybridSPE. A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC-ESI-MS Bioanalysis. *J Pharm Bioall Sci* 2012; **4**: 267-275.

表 5 妥当性評価の結果（牛肉）

	添加濃度								
	0.5 ng/g			2 ng/g			10 ng/g		
	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度
クロステボル	93	17.0	12.9	99	4.6	7.2	101	2.2	3.6
酢酸メレンゲステロール	88	5.1	4.2	93	2.5	2.1	94	1.7	2.3
ゼラノール				85	8.5	8.3	88	6.2	5.1
デキサメタゾン				89	11.0	12.3	88	4.3	7.3
α-トレンボロン	74	8.9	11.0	91	2.3	5.0	97	2.3	3.1
β-トレンボロン	70	8.2	12.2	90	3.2	5.8	95	1.1	3.8
プレドニゾロン				79	9.5	9.4	82	3.1	4.5
メチルプレドニゾロン				80	6.5	6.2	85	5.2	5.1

表 6 妥当性評価の結果（牛乳）

	添加濃度								
	0.5 ng/g			2 ng/g			10 ng/g		
	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度
クロステボル	116	4.0	4.1	109	8.1	5.9	104	2.7	2.5
酢酸メレンゲステロール	102	6.9	6.3	97	3.3	4.1	93	3.0	4.3
ゼラノール	98	8.6	9.3	101	7.7	7.2	94	7.4	6.1
デキサメタゾン				84	18.1	13.4	92	7.0	7.0
α-トレンボロン	115	3.8	4.4	105	2.7	3.4	101	2.3	2.5
β-トレンボロン	116	6.1	5.2	105	3.0	3.3	100	2.5	2.6
ヒドロコルチゾン	88	13.2	20.0	83	11.7	12.6	79	4.4	7.2
プレドニゾロン				97	8.0	6.3	86	4.0	5.9
メチルプレドニゾロン				79	8.7	7.1	83	4.0	5.4

Development and Validation of Hormones Analysis Method using Dispersive Solid Phase Extraction with Novel Lipid Removing Agent

Haruna NAGAYOSHI^a, Kensaku KAKIMOTO^a, Mizuka YAMAGUCHI^a, Kotaro UCHIDA^a,
Yuko YOSHIDA^a and Keiji KAJIMURA^a

We developed a novel analysis method for residual hormones in beef and milk using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Target agents were extracted by *n*-hexane saturated acetonitrile containing 5% (v/v) formic acid. Removal of fatty components was carried out by *n*-hexane distribution and dispersive solid phase extraction with zirconia-coated silica. Method validation test was conducted at the concentrations of 0.5 ng/g, 2 ng/g and 10 ng/g, then trueness, repeatability and within-run reproducibility were evaluated. As a result, all parameters satisfied acceptable limits required by the validation guideline for following 9 types of hormones: clostebol, melengesterol acetate, zeranol, dexamethasone, trenbolones (α - and β -), methylpredonisolone, hydrocortisone, and predonisolone.

Key words : hormones, dispersive solid phase extraction, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, validation

a Osaka Institute of Public Health

畜産物中の有機塩素系農薬の新規分析法の確立

柿本健作^a 永吉晴奈^a 山口瑞香^a 吉田優子^a 徳永佑亮^a 北川陽子^a 小西良昌^a 梶村計志^a

畜産物中に残留する有機塩素系農薬を分析する迅速な方法を確立した。抽出にはアセトン/ヘキサン混液を用い、脱脂にはアセトニトリル/ヘキサン分配および酸化ジルコニウム (ZrO) を化学結合させたシリカゲル、精製にはエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルカラムを用いた。測定にはガスクロマトグラフ-タンデム質量分析計を使用した。標準溶液を添加した試料からの平均回収率は 72-117%、室内精度は 13%以下であった。

キーワード：畜産物、有機塩素系農薬、ガスクロマトグラフ-タンデム質量分析計

有機塩素系農薬 (HCH 類 (α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH)、ドリソ剤 (アルドリソ、デイルドリソ、エンドリン)、ヘプタクロル類 (ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキサイド)、DDT 類 (4,4'-DDT、4,4'-DDE、4,4'-DDD、2,4'-DDT)) は難分解性のため自然環境中に残留し、生物に様々な影響を及ぼしていることが明らかとなっている。そのため、これらの大部分が「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs 条約) において規制されている。それに伴い我が国でも「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」において第一種特定化学物質に指定され、製造又は輸入が原則禁止され、また、食品中の残留基準が設定されている。当所では従来より食肉、牛乳試料中の分析を行っており、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) による脱脂操作を前処理操作に使用してきたが、一検体あたりに要する時間が長く、溶媒量が多いことから今回新たな脱脂精製方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配および酸化ジルコニウム (ZrO) を化学結合させたシリカゲルを用いた脂質除去を検討したので報告する。

実験方法

1. 標準物質及び試薬

標準品：HCH 類は和光純薬工業社製、安定同位体で標識された δ -HCH および o,p' -DDE は Cambridge isotope laboratory 社製、その他の標準品は Dr.Ehrenstorfer 社製から入手したものを使用した。

前処理用固相：酸化ジルコニウム剤-酸化ジルコニウム (ZrO) を化学結合させたシリカゲル

(Z-sep) (500 mg) は Sigma-Aldrich 社製を、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルカラム (PSA ミニカラム 500 mg) は、Agilent 社製を用いた。

有機溶媒：残留農薬試験用アセトン、ヘキサン、硫酸ナトリウム、LC-MS 用アセトニトリル、は和光純薬工業社製を使用した。

2. 試料

大阪府内で市販されている豚肉、牛肉、鶏肉、および牛乳を用いた。

3. 装置

高速ホモジナイザーはポリトロン PT3100 (KINEMATICA 社製)、遠心分離器は himac CF7D2 (日立工機社製)、エバポレーターは DPE-2130 (東京理化学器械社製)、測定は 7010GC-MS/MS (Agilent 社製) を使用した。

4. 試料溶液の調製

抽出：筋肉試料は細切均一化し、牛乳はそのまま試験に供した。試料 5 g を 50 mL の遠沈管に秤取し、Table 1 に示す内標準物質 (50 ng) およびヘキサン/アセトン混液 (2/1) 30 mL を加え、高速ホモジナイザーで混合粉碎した後 (試験品が牛乳の場合は 5 分間振とう混合)、これを 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上澄液 (2 層に分かれた場合は上層のみ採取) を無水硫酸ナトリウムを半分程度充填したフィルターロート (11G1) でろ過しナス型フラスコに捕集した。ろ液をロータリーエバポレーターを用いて溶媒留去した。

脱脂：濃縮した抽出物を 3 mL のヘキサンで溶解し 15 mL の遠沈管に移した、ナス型フラスコ

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

をヘキサン 3 mL で洗い込み同じ遠沈管に移した。これにヘキサン飽和アセトニトリル 6 mL を加えて激しく振とうし、静置または 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。下層のアセトニトリル層を 20 mL 試験管に採取した。この操作をさらに 2 度繰り返し、合わせたアセトニトリル層をヘキサン飽和アセトニトリルで 20 mL に定容した。定容したアセトニトリルのうち 10 mL を Z-sep 500 mg を分注した遠沈管に採取し、5 分間振とうし、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。アセトニトリル層 8 mL (2 g 相当) をナス型フラスコに採取しロータリーエバポレーターを用いて溶媒留去した。溶媒留去後ヘキサン/アセトン混液 (1/1) 混液 2 mL に再溶解した。

精製: PSA ミニカラムをヘキサン/アセトン混液 (1/1) 10 mL でコンディショニングし、試験液全量を負荷、さらに、ヘキサン/アセトン混液 (1/1) 20 mL を注入し、ナス型フラスコに全溶出液を採取した。ロータリーエバポレーターを用いて 2 mL 以下に濃縮した後、ヘキサン/アセトン混液 (1/1) で 2 mL に定容したものを試験溶液とした。

5. 標準溶液の調製

マトリックス入り標準溶液は各試料の種類に応じて調製した。添加試料と同様に抽出および精製を行ったブランク溶液に対し標準溶液を添加し、マトリックス濃度が添加試料と同様となるように 4 濃度 (添加濃度の 0.5 倍、1.0 倍、1.5 倍、2.5 倍相当) 調製した。各種マトリックス入り標準溶液から得た検量線の相関係数はいずれも 0.99 以上であった。

6. 測定条件

分析カラム: VF5-MS (25 m × 0.25 mm i.d. 膜厚 0.25 μm) (Agilent 社製)
 昇温 60 °C (1min) -20 °C /min-140 °C -8 °C /min-300 °C (5min)
 キャリアーガス: ヘリウム
 流量: 1.0 mL/min
 注入量: 0.1 μL
 イオン化モード: EI
 測定モード: 選択反応モニタリング (SRM)
 イオン源温度: 280 °C
 モニターイオン: 化合物ごとの条件は Table 1 に示した。

結果

牛乳および牛肉試料について妥当性評価試験難となる場合も想定された。本方法による脱脂

Table 1 Monitoring ions and corresponding internal standards (I.S.) for GC-MS/MS analyses

Compound	Quantification	Qualification	I.S.
<i>alpha</i> -HCH	181 > 145	219 > 183	¹³ C- <i>delta</i> -HCH
<i>beta</i> -HCH	181 > 145	219 > 183	¹³ C- <i>delta</i> -HCH
<i>gamma</i> -HCH	181 > 145	219 > 183	¹³ C- <i>delta</i> -HCH
<i>delta</i> -HCH	181 > 145	219 > 183	¹³ C- <i>delta</i> -HCH
Aldrin	263 > 193	257 > 222	¹³ C-2,4'-DDE
Dieldrin	277 > 206	279 > 243	¹³ C-2,4'-DDE
Endrin	263 > 193	265 > 230	¹³ C-2,4'-DDE
Heptachlor	272 > 237	274 > 239	¹³ C- <i>delta</i> -HCH
Heptachlor epoxide A	217 > 182	253 > 218	¹³ C-2,4'-DDE
Heptachlor epoxide B	353 > 263	355 > 265	¹³ C-2,4'-DDE
2,4'-DDT	235 > 165	237 > 165	¹³ C-2,4'-DDE
4,4'-DDT	235 > 165	237 > 165	¹³ C-2,4'-DDE
4,4'-DDD	235 > 165	237 > 165	¹³ C-2,4'-DDE
4,4'-DDE	246 > 176	248 > 176	¹³ C-2,4'-DDE
¹³ C- <i>delta</i> -HCH	187 > 151	225 > 189	
¹³ C-4,4'-DDE	258 > 188	260 > 188	

(分析者 5 名、2 併行 × 1 日間) を行った。鶏肉および豚肉試料については併行精度評価 (5 併行) のみを行った。試料毎に設定されている対象物質の残留基準値を参考に各標準物質を添加した。添加濃度及び妥当性評価試験結果を Table 2 に示した。いずれの試料においても平均回収率 (真度)、併行再現性の相対標準偏差 (併行精度) および室内再現性の相対標準偏差 (室内精度) はいずれにおいても「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」²⁾ の目標値 (真度 70%-120%、併行精度 <10-25%、室内精度 <15-30%) を満たしていた。以上、アセトニトリル/ヘキサン分配および Z-Sep を用いた脱脂精製処理方法が、食品に残留する有機塩素系農薬の分析に有用であることが明らかとなった。

考察

GC-MS/MS を使用し、畜産物中から有機塩素系農薬を迅速に分析する方法を確立した。20 試料前処理するのに要する時間は約 4 時間である。抽出にはアセトニトリル、脱脂にはアセトニトリル/ヘキサン分配および Z-Sep、精製には PSA による固相抽出を用いた。試料抽出液に直接 Z-Sep を添加することで、脱脂操作を迅速簡便化した。

GPC 処理による脱脂操作は、一般的に試料あたり 50 分、20 試料でおよそ 17 時間を要し、移動相として 5 L の有機溶媒が必要である。また、試料によっては GPC 試験液が懸濁し、カラムの目詰まりを引き起こすため円滑な検査業務が困

精製操作では脱脂精製に要する時間及び使用する有機溶剂量は 20 試料でそれぞれおよそ 1 時間および 500 mL であり迅速分析および省溶媒化を可能とした。

添加回収試験の結果は、妥当性評価ガイドラインを満たすものであり日常の検査に利用できると考えられた。

文献

- 1) 昭和 34 年厚生省告示第 370 号
- 2) 平成 22 年厚生労働省食安発 1224 第 1 号

Table 2 Precision and accuracy in the determination of organochlorine pesticide using matrix matched calibration curve

	milk				beef				pork			chicken		
	spike(ppm)	rec. ^a	repeat. ^b	Inter.Pre. ^c	spike(ppm)	rec. ^a	repeat. ^b	Inter.Pre. ^c	spike(ppm)	rec. ^a	repeat. ^b	spike(ppm)	rec. ^a	repeat. ^b
<i>alpha</i> -HCH	0.01	92%	2%	2%	0.02	100%	2%	4%	0.02	89%	1%	0.7	103%	2%
<i>beta</i> -HCH	0.01	94%	2%	3%	0.02	104%	2%	4%	0.02	92%	3%	0.7	106%	2%
<i>gamma</i> -HCH	0.01	92%	2%	2%	0.02	100%	2%	4%	0.02	95%	2%	0.7	107%	2%
<i>delta</i> -HCH	0.01	91%	1%	3%	0.02	101%	2%	4%	0.02	87%	2%	0.7	103%	2%
Aldrin	0.006	75%	3%	4%	0.2	72%	3%	3%	0.2	72%	1%	0.2	82%	3%
Dieldrin	0.006	95%	4%	5%	0.2	115%	2%	2%	0.2	92%	1%	0.2	111%	2%
Endrin	0.005	97%	9%	9%	0.05	113%	1%	1%	0.05	85%	1%	0.05	106%	2%
Heptachlor	0.006	85%	3%	4%	0.2	83%	3%	4%	0.2	74%	2%	0.2	89%	1%
Heptachlor epoxide A	0.006	96%	5%	5%	0.2	117%	1%	2%	0.2	109%	2%	0.2	116%	2%
Heptachlor epoxide B	0.006	94%	4%	4%	0.2	116%	1%	2%	0.2	106%	2%	0.2	117%	2%
2,4'-DDT	0.02	89%	13%	13%	1	95%	3%	4%	1	85%	2%	0.3	101%	3%
4,4'-DDT	0.02	104%	8%	9%	1	105%	4%	6%	1	92%	5%	0.3	110%	3%
4,4'-DDD	0.02	101%	7%	7%	1	116%	1%	2%	1	114%	3%	0.3	109%	1%
4,4'-DDE	0.02	93%	12%	12%	1	94%	2%	3%	1	107%	2%	0.3	97%	2%

^a recovery

^b repeatability

^c intermediate precision

Determination of Organochlorine Pesticides in Livestock Products by GC-MS/MS

Kensaku KAKIMOTO ^a, Haruna NAGAYOSHI ^a, Mizuka YAMAGUCHI ^a, Yuko YOSHIDA ^a,
Yusuke TOKUNAGA ^a, Yoko KITAGAWA ^a, Yoshimasa KONISHI ^a and Keiji KAJIMURA ^a

The method of analyzing organochlorine pesticides in livestock products using GC-MS/MS was developed. The pesticides were extracted with acetone/hexane, defatted by acetonitrile-hexane distribution and zirconia-coated silica, and purified by ethylenediamine-N-propyl bonded silica column. The average recoveries of tested pesticides from the spiked samples were between 72-117%, and intermediate precision CVs were under 13%.

Key words : animal livestock product, organochlorine pesticide, solid phase extraction, GC-MS/MS

^a Osaka Institute of Public Health

水道水中テフリルトリオンの液体クロマトグラフィー-質量分析法の 検討と妥当性評価

高木総吉^a、安達史恵^a、吉田 仁^a、小林憲弘^b

水道水中テフリルトリオンの直接注入-LC/MS/MS 法を検討した結果、0.005~0.08 µg/L の濃度範囲で直線性のある検量線が得られた。水道水に目標値の 1/100 である 0.00002 mg/L になるように調製した試料を用いて妥当性評価を実施した結果、真度、併行精度および室内精度は妥当性評価ガイドラインの目標を満たし、良好に定量できることが判明した。また、他の農薬との多成分一斉分析する際はデータ取り込み時間である Dwell Time の設定に留意する必要があることが明らかとなった。

キーワード：テフリルトリオン、LC/MS/MS、水道水、妥当性評価

トリケトン系除草剤は植物色素生合成阻害作用により除草効果を発揮する農薬で、日本においてはテフリルトリオンとメソトリオンの 2 種類が農薬登録されている¹⁾。テフリルトリオンは 1999 年に開発され、2010 年 2 月に農薬登録された比較的新しい農薬のひとつである。水に対する溶解度は 64.2 g/L (pH 7) と非常に水に溶けやすい性質を持っている¹⁾。わが国におけるテフリルトリオンの出荷量は 2011 年に急増し、それ以降横ばいとなっており、大阪府においても同様の傾向であり、2014 年の出荷量は 0.168 トンとなっている²⁾。

水道水における農薬類については現在、水質基準項目 (51 項目) を補う項目として位置づけられている水質管理目標設定項目に分類されており³⁾、水質管理目標設定項目の中の農薬類は対象農薬リスト掲載農薬類として 120 種類が挙げられている。

厚生労働省は水道原水で目標値に対して検出濃度が高い値を示すデータが集積されたことから⁴⁾、2017 年 4 月 1 日からテフリルトリオンを対象農薬リスト掲載農薬類の 1 つに追加し、目標値を 0.002 mg/L とした⁵⁾。

我々はすでに 2013 年 6 月と 2014 年 2 月に、大阪府健康医療部環境衛生課および大阪府内水道事業体と協力して 22 ヶ所の浄水場を対象に水道原水と浄水中のテフリルトリオンの検出状況を調査した⁶⁾。その結果、浄水からは検出されなかったものの、水道原水での検出濃度は 0.0000027~0.00015 mg/L で、検出率は 6 月が約 36%、2 月が約 14%と大阪府においてもテフリルトリオンが検出されることを明らかにした⁶⁾。しかし、この調査での分析法は固相抽出-液体クロマトグラフィー-質量分析法であったため、前処理が煩雑で時間のかかる分析法であった。厚生労働省は、非常に迅速かつ簡便に分析できる方法として、水試料をそのまま LC-MS/MS に供する標準的な方法を通知法別添方法 20 の 2 に例示している⁷⁾。そこで現在当所を含めて多くの水道事業体や検査機関で農薬検査に適用している直接注入-LC/MS/MS 法が適用可能か検討を行い、実試料での妥当性評価を実施した。

調 査 方 法

1. 試薬および機器

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部第三室

85 は[M-CH₂O-C₁₃H₉ClO₃-SO₂CH₃], *m/z* 341 は[M-(O-CH₂-C₄H₇O)]であると考えられた (図 3)。

古川らは LC-MS/MS を用いたテフリルトリオンの分析には *m/z* 443 をプリカーサーイオンとして選択しており、プロダクトイオンとしては *m/z* 341 と *m/z* 262 を選択している¹⁰⁾。我々の検討で

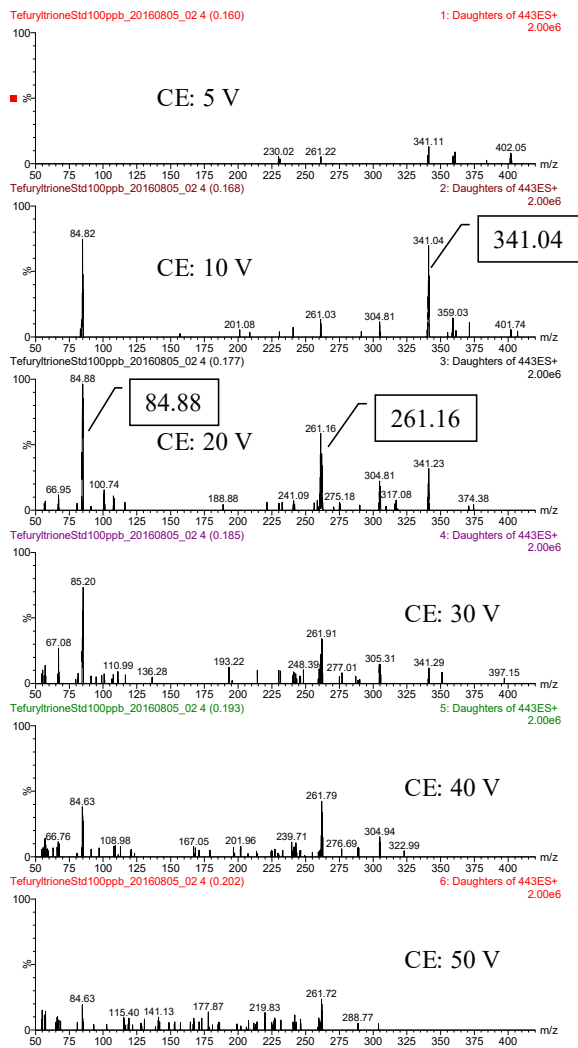


図 2. テフリルトリオンのプロダクトイオンスクランの結果

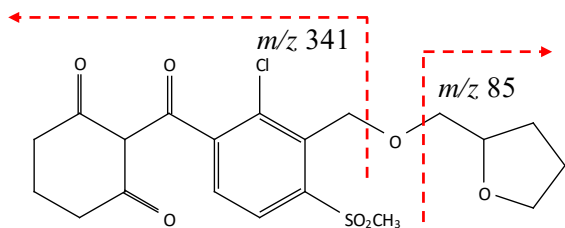


図 3. テフリルトリオンの構造式とプロダクトイオンの推定

もコリジョンエネルギー 20 V で *m/z* 262 は確認されたが、*m/z* 85 の強度の方が強い結果となった。

2. 検量線

テフリルトリオンの検量線を図 4 に示した。検量点は 0.005、0.01、0.02、0.04 および 0.08 μg/L の 5 点とした。相関係数は 0.999 以上となり、良好な直線性が得られた。

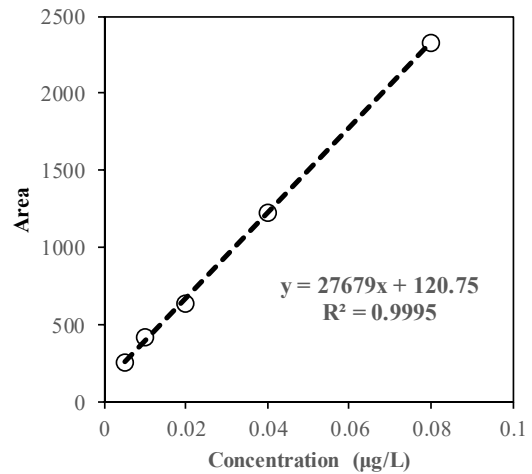


図 4. テフリルトリオンの検量線

3. 妥当性評価

水道水を用いて妥当性評価を実施した結果、真度が 100%、併行精度が 13.2% および室内精度が 14.8% と妥当性評価ガイドラインの目標¹¹⁾を満たす良好な結果が得られた (表 2)。このことから、テフリルトリオンは直接注入-LC/MS/MS 法で目標値の 1/100 まで定量できることが明らかとなった。また、本法において妨害ピーク等もなく選択性も良好であり、真度、併行精度および室内精度が適合した濃度である 0.00002 mg/L が定量下限値となった。

表 2. 水道水を用いた妥当性評価の結果

添加濃度 (mg/L)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.00002	100	13.2	14.8

4. 多成分一斉分析への適用

今回使用した UPLC のカラムでは 1 回の分析

時間が 35 分間であったが、同じような保持時間で多くの農薬が検出されるため、同時間帯にモニターするチャンネル数が多くなった。その結果、自動でデータ取り込み時間である Dwell Time を設定した場合、十分な時間を確保することができなかったことから、添加濃度 0.00001 mg/L の試料ではテフリトリオンのシグナルとノイズの差が区別できず、ピークが検出されなかった (図 5)。

そこで、手動で Dwell Time を 1 msec からテフリトリオンのみで妥当性がとれた時の Dwell Time である 130 msec へと長く設定し、分析を行った結果、S/N 比が改善され、ピークが検出された。添加濃度 0.00001 mg/L では真度 98%、併行精度 7.7%、添加濃度 0.0001 mg/L では真度 99%、併行精度 2.5% の良好な結果が得られた (表 3)。

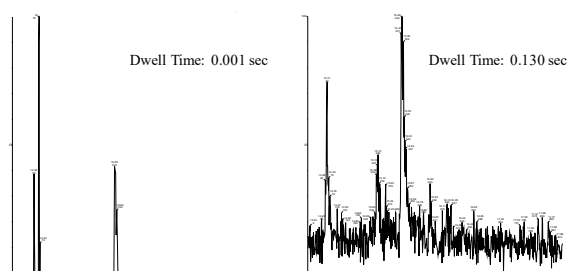


図 5. Dwell Time の違いによるテフリトリオンのクロマトグラム例 (0.00001 mg/L)

表 3. 多成分一斉分析における真度および併行精度の結果

添加濃度 (mg/L)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
0.00001	98	7.7
0.0001	99	2.5

このことから、農薬類について直接注入-LC/MS/MS 法のような多成分一斉分析法を適用する場合は 1 回の分析時間を長くとり、十分に各農薬類を分離させ Dwell Time を長めに確保できるようにするか、定量する必要のある濃度での S/N 比に合わせて Dwell Time の設定を工夫することなどが必要があることが明らかとなった。

謝 辞

本研究の一部は厚労科研 (H28-健危-一般-005) により実施されたものである。

文 献

- 1) 社団法人日本植物防疫協会. 農薬ハンドブック 2011 年版
- 2) 国立環境研究所. 農薬データベース.
http://db-out.nies.go.jp/kis-plus/index_3.html
- 3) 厚生労働省健康局長. 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について (健発第 1010004 号、平成 15 年 10 月 10 日) .
- 4) 厚生労働省. 平成 27 年度第 2 回水質基準逐次改正検討会資料 2、水道原水での検出濃度が高い農薬への対応について (案) .
http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000068171_2.pdf
- 5) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長. 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法の一部改正及び「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について」の一部改正. (生食発 0328 第 9 号、平成 29 年 3 月 28 日) .
- 6) 大阪府. 平成 25 年度大阪府水道水中微量有機物質調査.
<http://www.pref.osaka.lg.jp/attach/26657/000000/H25biryoyuukityousa.pdf>
- 7) 厚生労働省健康局水道課長. 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について (健水発第 1010001 号、平成 15 年 10 月 10 日、最終改正 平成 29 年 3 月 28 日) .
- 8) 厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会. 水質基準の見直し等について (平成 15 年 4 月)
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/04/dl/s0428-4e.pdf>
- 9) 小林憲弘、久保田領志、五十嵐良明. 水道水の検査対象農薬の LC/MS/MS 一斉分析法の開発と妥当性評価. 第 53 回全国衛生化学技術協議会年会講演集 2016; 186-187.
- 10) 古川浩司、橋本真、萩尾珠世、岡佑季、坂

倉功達、金子聡. LC/MS/MS による水道水中のテフリトリオン分析法の検討. *環境技術* 2016; **45**(12): 650-655.

11) 厚生労働省健康局水道課長. 水道水質検査方

法の妥当性評価ガイドラインについて（健水発 0906 第 1 号、平成 24 年 9 月 6 日）.

WEB サイトの内容は 2017 年 7 月 10 日に確認した。

Development and Validation of an Analytical Method for Tefuryltrione in Tap Water by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

Sokichi TAKAGI ^a, Fumie ADACHI ^a, Jin YOSHIDA ^a, Norihiro KOBAYASHI ^b

We developed a liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis method for the determination of tefuryltrione in tap water. Calibration curve showed good linearity and correlation coefficient was over 0.999. Recovery tests of tefuryltrione spiked into tap water at the concentration of 1/100 of the target value (0.00002 mg/L) were performed in accordance with the notification of Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. The trueness, repeatability, and intermediate precision obtained by the recovery tests satisfied the criteria of the test method for drinking water. In addition, it was elucidated that changing dwell time is efficient to accurately analyse tefuryltrione together with other pesticides by multicomponent simultaneous analysis method.

Key words : tefuryltrione, LC/MS/MS, tap water, validation test

a Osaka Institute of Public Health

b National Institute of Health Sciences

水質検査における外部精度管理(2015 年度)

—銅及びその化合物—

吉田 仁^a 木村 明生^a

大阪府では、水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、1993 年度より府内水道事業体、保健所、地衛研(以下、水道事業体等)の協力を得て外部精度管理事業を実施している。さらに 2015 年度より(一社)大阪ビルメンテナンス協会の受託研究により、大阪府登録建築物飲料水水質検査業者(登録水質検査業者)を対象に外部精度管理事業を開始した。府内水道事業体等 31 機関及び登録水質検査業者 17 機関を対象に、銅及びその化合物を対象項目として外部精度管理を実施した結果、それぞれ 1 及び 4 機関が「外れ値」となった。「外れ値」となった機関を対象にフォローアップ及び再測定を実施したところ、いずれも良好な検査値を得た。

キーワード：水道水、外部精度管理、銅

大阪府水道水質検査外部精度管理は、水道水質検査精度の向上を図ることを目的として 1993 年度より大阪府健康医療部環境衛生課と共同で、水道事業体等の協力を得て実施している¹⁻¹⁰⁾。さらに 2015 年度より当所は、一般社団法人大阪ビルメンテナンス協会から依頼を受けて大阪府登録建築物飲料水水質検査業者(登録水質検査業者)を対象とした外部精度管理事業を開始した。その目的は、登録水質検査業者が、自主的かつ継続的に外部精度に参加することで、検査精度の向上、信頼性及び安全性を確保することである。

2015 年度の対象項目は、無機項目として「銅及びその化合物」を選定した。銅は、重要な熱・電気伝導体であり、水管、屋根材、家庭用品や化学設備、また芸術品や多くの合金に用いられている¹¹⁾。そして銅の酸化物、塩化物、硫酸塩、酢酸塩、臭化物や炭酸塩は無機染料、食品添加剤、写真術、種子消毒剤、殺菌剤や殺草剤、電鍍として広く用いられている¹¹⁾。水道分野では、硫酸銅、塩化銅は、藻類など水中生物の繁殖抑制処理に使用されている¹²⁾。また銅は微量必須元素で成人の必要量は約 2 mg/日である¹³⁾。哺乳

類に対する銅の毒性は低く、銅の体内ホメオスタシスの遺伝的障害のない成人にとって 1~10 mg/日の濃度で食品から長期間摂取しても明らかな有害影響はないとされている¹¹⁾。銅及びその化合物の水質基準は、1958 年の水質基準に関する省令(厚生省令第 23 号)で「1 mg/L を超えてはならない」と規定され、1966 年の水質基準に関する省令(厚生省令第 11 号)では「1 mg/L 以下であること」と規定された¹³⁾。2003 年に開催された水質基準の見直しの検討においても、「毒性で問題となるレベルの濃度よりも利水障害からの閾値が低く、利水障害に関する評価値に関し、1992 年以降、新たに追加すべき知見はないことから、1992 年の専門委員会の評価値を維持し、洗濯物等への着色を防止する観点から 1.0 mg/L 以下とすることが適当である。」とされ、現在も数値の変更はない¹¹⁾。

調 査 方 法

1.参加機関

水道事業体等及び登録水質検査業者はそれぞれ、31 及び 17 機関であった。

a 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部 生活環境課

2.実施方法

2-1. 精度管理試料の調製方法

2015年9月28日に大阪健康安全基盤研究所に給水されている水道水約100Lをポリタンクに採水し、銅標準液(和光純薬:Cu:1002mg/L)を15mL(銅濃度0.15mg/L相当)、また硝酸濃度が1%になるように硝酸(和光純薬、有害金属測定用)を添加した後に攪拌した。なお、水道水中の銅濃度は0.001mg/L未満であった。試料を十分に攪拌した後、1Lのポリエチレン瓶70本に採取して2015年9月30日に当所において各機関へ配布した。

2-2. 精度管理試料の均一性及び安定性

試料の均一性を調べるために、2015年9月28日に精度管理試料を分注順に等間隔で5本抜き取って測定した。5試料の平均値は0.151mg/L、試料間の変動係数(CV)は0.75%で、均一性に問題がないことを確認した。また、調製日、配布後1、5、8、15日後に測定した結果を図1に示す。配布後15日までの期間において近似直線の傾きがほぼ0で減少傾向は見られなかった。以上により配布試料の均一性に問題はなく、配布後15日間は安定であることを確認した。なお、すべての参加機関は配布後15日以内に検査を開始したことを確認している。

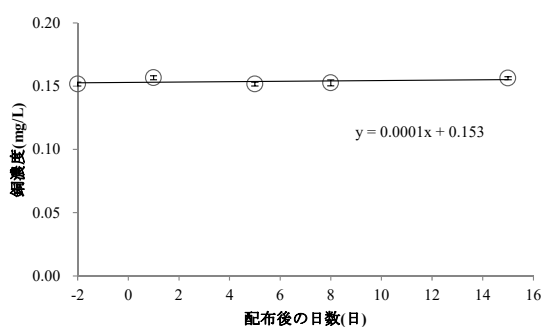


図1 精度管理試料の安定性(n=3)

2-3. 試料の測定方法

検査方法は「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」のフレイムレス-原子吸光光度計による一斉分析法(以下FLAA法)、フレイム-原子吸光光度計による一斉分析法(以下AAS法)、誘導結合プラズマ発光分光分析装置による一斉分析法(以下ICP-AES

法)及び誘導結合プラズマ質量分析装置による一斉分析法(以下ICP-MS法)とした。配布した精度管理試料について5回の測定値の平均を検査値とし、結果を「外部精度管理検査結果報告書」にて報告し、検査作業手順書、分析チャート、検量線、分析に係るメモ等の資料も合わせて提出することとした。「外れ値」に該当した機関に対してフォローアップ調査を実施した。

2-4. 評価の検証方法

検査結果は、「真値」に対する誤差率(以下、誤差率)およびZスコアで評価を行い、両方の評価方法において許容範囲を超過した検査値を「外れ値」とした。「真値」は、各機関からの検査値を用いて、有意水準を5%としてGrubbsの棄却検定¹⁴⁾を行い、棄却された検査値を除いた検査値から平均を求め、これを「真値」とした。誤差率は、以下の式から算出し、±10%を許容範囲とした。

$$\text{誤差率(\%)} = (\text{各機関の検査値} - \text{「真値」}) / \text{「真値」} \times 100$$

Zスコアは四分位数法で算出し¹⁵⁾、Zスコアの絶対値3未満を許容範囲とした。なお、各機関内で測定された精度管理試料のCVが10%を超過した機関の検査値は評価対象外とした。

結果及び考察

1. 分析方法

水道事業者等及び登録水質検査業者が用いた試験方法を表1に示す。

水道事業者等ではICP-AES法を用いて銅を検査する機関は存在せず、ICP-MSが主要な分析装置であると考えられた。

表1 各検査機関の試験方法

試験方法	水道事業者等	登録水質検査業者
フレイムレス-原子吸光光度法 (FLAA法)	8	4
フレイム-原子吸光光度法 (AAS法)	2	3
誘導結合プラズマ-発光分光分析法 (ICP-AES法)	0	6
誘導結合プラズマ-質量分析法 (ICP-MS法)	21	4
計	31	17

2. 検査結果の検証

2-1. 誤差率、Zスコア及び「外れ値」

水道事業者等31機関及び登録水質検査業者17機関から報告された検査値、変動係数、誤差率及びZスコアを表2に示す。また、検査値の度数分布を図2及び3に示す。

水道事業者等において、機関内変動係数が10%を超過した機関は存在しなかったため、すべての機関を評価対象とした。Grubbsの棄却検定を実施したところ、機関A-31が棄却されたため、残りの30機関の検査値の平均値0.155 mg/Lを「真値」とした。誤差率の許容範囲を超過した機関は1機関(A-31)であった。また、Zスコアの許容範囲を超えた機関は1機関(A-31)であった。したがって誤差率及びZスコアの両方の許容範囲を超過した「外れ値」に該当した機関は1機関(A-31)となり、全体の3.2% (1/31)であった。

登録水質検査業者において、機関内変動係数が10%を超過した機関は存在しなかったため、すべての機関を評価対象とした。Grubbsの棄却検定を実施したところ、棄却された機関は存在しなかったため、17機関の検査値の平均値0.150 mg/Lを「真値」とした。誤差率の許容範囲を超えたのは5機関(B-1、B-2、B-3、B-16、B-17)であった。一方、17検査値を用いてZスコアを求めた結果、Zスコアの範囲は、-7.93～6.68となり、Zスコアの許容範囲を超えた機関は4機関(B-1、B-2、B-3、B-17)であった。したがって誤差率及びZスコアの両方の許容範囲を超過した「外れ値」に該当した機関は4機関(B-1、B-2、B-3、B-17)となり、全体の23.5%(4/17)となった。

A-17、B-1、B-2、B-3、B-17を対象に、「外れ値」の原因の把握と精度の改善を目的にフォローアップを実施した。

2-2. フォローアップ調査

機関A-31(FLAA法、検査値0.637 mg/L)に対してフォローアップを実施した。その結果、乾燥機の中で器具が銅に汚染されたことおよびオートサンプラーのアーム部分の洗浄が不十分であったことが明らかになった。オートサンプラーの洗浄液量を増やし、さらに新品の容器を用いて再測定した結果0.159 mg/Lと良好な検査値を得ることができた。

表2 検査機関の測定結果

水道事業者等				
機関番号	報告値 (平均値) (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
A-1	0.145	1.02	-6.74	-2.26
A-2	0.146	0.920	-5.71	-1.91
A-3	0.151	1.72	-2.88	-0.957
A-4	0.151	2.73	-2.75	-0.914
A-5	0.151	0.470	-2.75	-0.914
A-6	0.151	0.720	-2.62	-0.870
A-7	0.152	1.23	-2.10	-0.696
A-8	0.152	0.660	-2.10	-0.696
A-9	0.152	0.810	-2.10	-0.696
A-10	0.152	0.290	-1.98	-0.653
A-11	0.152	1.42	-1.98	-0.653
A-12	0.154	0.540	-0.687	-0.218
A-13	0.154	1.26	-0.558	-0.174
A-14	0.155	1.75	-0.429	-0.131
A-15	0.155	1.40	-0.301	-0.0870
A-16	0.155	1.54	-0.0429	0.000
A-17	0.155	0.350	0.0859	0.0435
A-18	0.156	0.350	0.730	0.261
A-19	0.157	0.350	0.859	0.305
A-20	0.157	1.32	1.37	0.479
A-21	0.158	0.690	1.63	0.566
A-22	0.158	1.95	1.76	0.609
A-23	0.158	0.820	1.89	0.653
A-24	0.158	2.34	1.89	0.653
A-25	0.159	0.350	2.15	0.740
A-26	0.159	1.60	2.40	0.827
A-27	0.159	0.530	2.53	0.870
A-28	0.160	5.34	2.92	1.00
A-29	0.166	3.49	7.04	2.39
A-30	0.168	3.02	8.46	2.87
A-31 **	0.637	7.85	310	105
平均値	0.171			
最大値	0.637			
最小値	0.145			
標準偏差	0.08666			
変動係数(%)	50.7			
n	31			
真値	0.155			
登録水質検査業者				
機関番号	報告値 (平均値) (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
B-1 **	0.102	3.12	-31.8	-7.93
B-2 **	0.119	6.32	-20.7	-5.33
B-3 **	0.126	3.21	-16.4	-4.30
B-4	0.146	1.77	-2.63	-1.07
B-5	0.148	1.07	-1.43	-0.780
B-6	0.149	1.80	-0.630	-0.600
B-7	0.149	2.58	-0.490	-0.560
B-8	0.150	2.46	0.0400	-0.440
B-9	0.153	0.460	1.90	0.00
B-10	0.154	0.990	2.30	0.0900
B-11	0.154	0.920	2.57	0.160
B-12	0.155	0.290	3.37	0.350
B-13	0.157	2.69	4.30	0.560
B-14	0.159	2.71	5.90	0.940
B-15	0.164	0.960	9.23	1.73
B-16 *	0.171	2.13	14.2	2.89
B-17 **	0.196	3.85	30.3	6.68
平均値	0.150			
最大値	0.196			
最小値	0.102			
標準偏差	0.0206			
変動係数(%)	13.7			
n	17			

*真値に対する誤差率が±10%を超えた機関

**真値に対する誤差率が±10%を超え、Zスコアの絶対値が3以上の機関(外れ値)

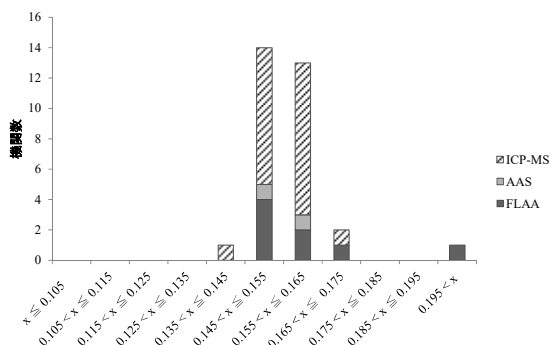


図2 水道事業体等における検査値の度数分布

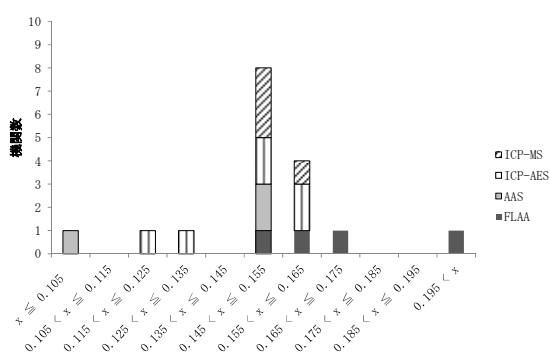


図3 登録水質検査業者における検査値の度数分布

機関B-1(AAS法、検査値0.102 mg/L)に対してフォローアップを実施した。その結果、B-1は普段はFLAA法で検査を実施していたが、機器が故障したため急遽AAS法に変更して検査したことが明らかになった。機器を修理後、FLAA法で再測定を実施した結果、0.148 mg/Lと良好な検査値を得た。

機関B-2およびB-3(ICP-AES法、0.119 mg/L、ICP-AES法、0.126 mg/L)では、検量線の濃度範囲が告示の濃度範囲から逸脱していた。告示の範囲内で検量線を作成した結果、0.147 および0.142 mg/Lと良好な検査値を得た。

機関B-17(FLAA法、0.196 mg/L)は、標準系列を検体と同様に加熱処理を実施していた。告示から逸脱しているため、標準系列の加熱を止め、なおかつ検体を穏やかに加熱するようにした結果、0.146 mg/Lと良好な検査値を得た。

2-3. 全体的な留意点

2-3-1. 検量線の検証

告示では別表に記載された濃度範囲内で4段

階以上の標準液を用いて検量線を作成するように記載されている¹⁶⁾。水道事業所等の内の3.2%、登録水質検査業者の内の17.6%の機関が検量点4点未満で検量線を作成していた。そして、水道事業体等の内の87.1%、登録水質検査業者の内の88.2%の機関が、検量線の点に0 mg/Lを用いていた。告示においては検量線の点に0 mg/Lを用いないこととなっているが、水道GLPでは0 mg/Lを含めるように指導している。一部の機関では、公定法を理解した上で水道GLPに従い0 mg/Lを含めた検量点で妥当性試験を実施し信頼性を担保した上で検査を実施していた。

告示では測定法別に元素ごとの濃度範囲を提示し、検量線はその範囲を超えてはならないとしている。FLAA法、AAS法、ICP-AES法およびICP-MS法の上限はそれぞれ0.1、0.4、0.06および0.02 mg/Lである。水道事業体等の内の12.9%、登録水質検査業者の内の35.3%の機関では、最も高い検量点が告示の範囲を超えていた。これらの機関では検量線の範囲を告示の範囲内に修正する必要がある。

告示では空試験の判定の際、空試験の値が測定法ごとの濃度範囲の下限値(AAS法0.04 mg/L、FLAA法0.001 mg/L、ICP-AES法0.0006 mg/L、ICP-MS法0.0002 mg/L)を下回る必要がある。水道事業体等の内の77.4%、登録水質検査業者の内の88.2%の機関においては報告書の検量線で空試験を判定することができなかった。これらの機関は検量線を告示の濃度範囲の下限値まで設定し、空試験の評価を行う必要がある。所定の是正措置を講じたにもかかわらず、空試験の値が告示の濃度範囲の下限値を下回ることができなかった場合に限り、平成25年3月6日付の事務連絡に従い、「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて(平成24年9月6日付健水発0906第1号空4号)」を参考に定量下限値の見直しを行った後に空試験の判定基準の見直しを行うこととされている^{17, 18)}。これら空試験の判定方法変更の経緯は、SOP等に明記することが望ましい。なお、平成29年4月1日より告示が改正された結果、空試験における定量下限値の評価対象について、検水の濃度範囲の下限値から検量線の濃度範囲の下限値に変更されている¹⁹⁾。

2-3-2. 前処理

告示では前処理の際、加熱操作を行うこととされているが、水道事業体等の 16.1%、登録水質検査業者の 17.6%の機関が加熱操作を実施していなかったため、SOP の改善が必要である。

2-3-3. 標準液

告示では、「試薬における標準原液は、計量法(平成 4 年法律第 51 号)第 136 条若しくは第 144 条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書が添付され、かつ、各号の別表に定める標準原液と同濃度のものを用いることができること。」と別表に示した濃度の認証付標準原液の使用が認められている。今回の試験では、すべての機関で市販の標準原液を使用していた。そのうち、使用している標準原液の濃度が別表に記載された 1000 mg/L であった機関は、水道事業体等では 25.8%、登録水質検査業者では 58.8%であった。標準系列について、告示では用時調製することとされているが、水道事業体等では 3.2%、登録水質検査業者では 11.8%の機関が用時調製していなかった。

2-3-4. 妥当性試験

平成 24 年 9 月 6 日付で厚生労働省より水道水質検査における妥当性ガイドラインについて通知され、標準検査法においても妥当性試験を行うことが望ましいとされている¹⁷⁾。今調査では 6 機関が妥当性試験を実施していた。水道事業体等では 48.4%、登録水質検査業者では 35.3%の機関が妥当性評価を実施していた。

3. まとめ

大阪府の水道水質検査外部精度管理として、銅及びその化合物の検査結果を「真値」に対する誤差率 $\pm 10\%$ と Z スコア ± 3 を許容範囲とする 2 つの方法で評価を行った。

水道事業体等では、報告された 31 検査値の内、変動係数が 10%を超えた機関は存在しなかった。31 検査値のうち、誤差率 $\pm 10\%$ を超えたのは 1 機関であった。また、Z スコア ± 3 を超えたのは 1 機関であった。両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当したのは 1 機関であった。「外れ値」の存在率は、3.2%であった。

登録水質検査業者では、17 検査値の内、変動係数が 10%を超えた機関は存在しなかった。17 検査値のうち、誤差率 $\pm 10\%$ を超えたのは 5 機関であった。また、Z スコアの絶対値が 3 以上であったのは 4 機関であった。両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当したのは 4 機関であった。「外れ値」の存在率は、23.5%であった。

検証の結果、検査精度を向上するためには、以下の留意点が考えられた。

- (1) 検量線は告示の濃度範囲内に収めて、0 を除く 4 点以上で作成する
- (2) 前処理方法は、告示の方法に遵守して行う
- (3) 告示から逸脱しない方法で SOP を整備して、この SOP を基に検査を実施する
- (4) 分析機器を定期的にメンテナンスして、機器の状態を正常に維持する
- (5) 空試験の結果が高い場合は、作業中に汚染を受けて分析精度が保たれない可能性が高いため、原因を特定して改善する必要がある

謝 辞

本研究は「平成 27 年度大阪府水道水質検査外部精度管理」および「平成 27 年度大阪府建築物飲料水水質検査業外部精度管理」により実施された。研究実施にあたり協力していただいた大阪府環境衛生課ならびに(一社)大阪ビルメンテナンス協会の各位に感謝いたします。

文 献

- 1) 小泉義彦, 宮野啓一, 足立伸一, 高木総吉, 安達史恵, 渡邊功. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-フェノール類(平成17年度)-. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2008; 46: 61-73.
- 2) 小泉義彦, 宮野啓一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-トリハロメタン (平成19年度)-. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2008;46:75-90.
- 3) 宮野啓一, 小泉義彦, 高木総吉, 安達史恵, 渡邊功. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果-陰イオン界面活性剤(平成18年度)-. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2009; 47: 81-88.

- 4) 田中榮次, 安達史恵, 渡邊功. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果-ナトリウム及びその化合物(平成19年度)-. *大阪府立公衆衛生研究所研究報告* 2010; **48**: 50-57.
- 5) 田中榮次, 安達史恵, 小川有理, 吉田直志, 木村直昭, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理-蒸発残留物(平成21年度)-. *水道協会雑誌* 2011; **80**(10): 12-22.
- 6) 小泉義彦, 宮野啓一, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-シス-1,2-ジクロロエチレン及びトランス-1,2-ジクロロエチレン(平成21年度)-. *大阪府立公衆衛生研究所研究報告* 2011; **49**: 61-72.
- 7) 小泉義彦, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点 -1,4- ジオキサン(平成23年度)-. *大阪府立公衆衛生研究所研究報告* 2014; **52**: 49-52.
- 8) 小泉義彦, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-全有機炭素(TOC)の量(平成24年度)-. *大阪府立公衆衛生研究所研究報告* 2014; **52**: 53-57.
- 9) 小泉義彦, 足立伸一. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-ハロ酢酸(平成26年度)-. *大阪府立公衆衛生研究所研究報告* 2016; **54**: 50-58.
- 10) 小泉義彦, 木村明生. 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-ジクロロメタン(平成27年度)-. *大阪府立公衆衛生研究所研究報告* 2016; **54**: 59-63.
- 11) 水質基準の見直しにおける検討概要(銅), 厚生労働省ホームページ
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k36.pdf>, WEB サイトの内容は2017年3月21日に確認した
- 12) 真柄泰基. 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社; 1994. 54-55.
- 13) 上水試験方法解説編 2001年版. 日本水道協会.; 2001. 397-400.
- 14) JIS Z8402-2. 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度-第2部: 標準測定方法の併行精度及び再現性を求めるための基本的な方法. 日本規格協会; 1999.
- 15) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験(1). *環境と測定技術* 2000; **27**(2): 51-56.
- 16) 厚生労働省健康局水道課長. 水質基準に関する規定に水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法の一部を改正する件、資機材等の材質に関する試験の一部を改正する件並びに給水装置の構造及び材質の基準に係る試験の一部を改正する件等について(健水発 0228 第1号、平成24年2月28日) .
- 17) 厚生労働省健康局水道課長. 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて(健水発 0906 第1号、平成24年9月6日) .
- 18) 厚生労働省. 検査方法告示における空試験の取扱について. (事務連絡、平成25年3月6日)
- 19) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長. 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法の一部改正及び「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について」の一部改正について(生食発 0328 第9号、平成29年3月28日) .

**Results of External Quality Control on the Analytical Measures for Tap Water in Osaka Prefecture.
-Copper(2015)-**

Jin YOSHIDA and Akio KIMURA

In Osaka Prefecture, external quality control on the analytical measures for tap water has been implemented since 1993, collaborated with water supply corporations, public health centers and institutes of public health (referred as water supply corporation etc.). From 2015, by request of Osaka building maintenance association, we started to implement the quality control program for building inspection contractors. Thirty one water supply corporation etc. and 17 building inspection contractors participated in the external quality control on analytical measure of copper and its compound in 2015. As a result, one water supply corporation etc. and four building inspection contractors were evaluated as outliers. We executed the follow up survey for these five facilities and retesting was performed. In conclusion, after unfolding and correcting the causes, all facilities obtained the accurate results in retesting.

Key words : drinking water, external quality control, copper

大阪府内 30 浄水場における浄水処理対応困難物質の存在実態

吉田 仁^a、高木総吉^a、安達史恵^a、小泉義彦^a、中島孝江^a、木村明生^a

浄水処理対応困難物質は、浄水処理によってホルムアルデヒド等の水質基準項目を高い比率で生成する物質で、平成 27 年 3 月に厚生労働省により位置付けられた。14 種の浄水処理対応困難物質の内、分析法が示されている臭化物を除いた 13 種について分析法を検討した。その内、10 種の化合物について分析法を確立し、府内の水道原水及び浄水における存在実態を調査した。その結果、いずれの物質も夏季及び冬季において原水・浄水ともに定量下限値未満であった。府内の水源及び浄水において水質基準に影響を与える程度の浄水処理対応困難物質は存在していないことが明らかになった。

キーワード：浄水処理対応困難物質、高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計

平成 24 年 5 月に利根川水系において、ホルムアルデヒドが水質基準を超過する水質事故が発生し、千葉県及び東京都の広範囲にわたり断水が生じた^{1,2)}。この水質事故は、ホルムアルデヒドそのものが河川に流入したわけではなく、塩素処理によりホルムアルデヒドに変換されるヘキサメチレンテトラミン(HMT)という化学物質が原因であることが国立医薬品食品衛生研究所等の調査により明らかにされた^{2,3)}。この水質事故を受け、厚生労働省は平成 27 年 3 月、通常の浄水処理により水質基準項目等を高い比率で生成する物質を「浄水処理対応困難物質」として位置付けた⁴⁾。14 種類の内、取扱事業所や排出量が把握できる PRTR 物質に指定されているのは 3 物質のみであり、それ以外の物質の使用状況は把握できていない。また、臭化物を除いた浄水処理対応困難物質 13 種については、標準検査法は示されていない。そこで本研究では、これら 13 化合物について分析法の確立を試みた。対象とした化合物の概略を表 1 に示す。

その内、10 種の化合物について分析法を確立し、大阪府内の浄水場における存在実態を調査したので報告する。

調 査 方 法

1. 試薬及び分析機器

HMT(水質試験用)、1,1-ジメチルヒドラジン(DMH)(特級)、*N,N*-ジメチルアニリン(DMAN)(特級)、トリメチルアミン標準液(TMA)(悪臭物質試験用)、テトラメチルエチレンジアミン(TMED)(特級)、ジメチルアミノエタノール(DMAE)(特級)、1,3-ジハイドロキシルベンゼン(特級)、アセチルアセトン(特級)、2'-アミノアセトフェノンは和光純薬工業(株)製を使用した。1,3,5-トリヒドロキシベンゼン、3'-アミノアセトフェノンはワコーケミカル(株)製を使用した。*N,N*-ジメチルエチルアミン(DMEA)は東京化成(株)製を使用した。アセトンジカルボン酸は COB 社製を使用した。ヘキサメチレンテトラミン-d₁₂(HMT-d₁₂)、1,1-ジメチル-d₆-ヒドラジン塩酸塩(DMH-d₆)、*N,N*-ジメチルアニリン(DMH-d₁₂)、トリメチル-d₉-アミン塩酸塩(TMA-d₉)は C/D/N Isotope 製を使用した。高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)は、LC が Shimadzu Nexera ((株)島津製作所製)、MS/MS が 3200Q-Trap (AB Sciex 製)を使用した。分析カラムは、Atlantis T3 (4.6×150 mm、3 μm)(Waters 製)

a 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部 生活環境課

を用いた。

表 1 調査対象物質の性状

化合物名	CAS番号	構造式	分子式	分子量	副生成物名
ヘキサメチレンテトラミン (HMT)	100-97-0		(CH ₂) ₆ N ₄	140.19	ホルムアルデヒド
1,1-ジメチルヒドラジン (DMH)	57-14-7		(CH ₃) ₂ N·NH ₂	60.1	ホルムアルデヒド
N,N-ジメチルアニリン (DMAN)	121-69-7		C ₈ H ₁₁ N	121.18	ホルムアルデヒド
トリメチルアミン (TMA)	75-50-3		(CH ₃) ₃ N	59.11	ホルムアルデヒド
テトラメチルエチレンジアミン (TMED)	110-18-9		C ₆ H ₁₆ N ₂	116.2	ホルムアルデヒド
N,N-ジメチルエチルアミン (DMEA)	598-56-1		C ₈ H ₁₇ N	73.14	ホルムアルデヒド
ジメチルアミノエタノール (DMAE)	108-01-0		C ₄ H ₁₀ NO	89.14	ホルムアルデヒド
アセトンジカルボン酸	542-05-2		C ₅ H ₆ O ₅	146.1	クロロホルム
1,3-ジハイドロキシベンゼン	108-46-3		C ₆ H ₆ O ₂	110.11	クロロホルム
1,3,5-トリヒドロキシベンゼン	108-73-6		C ₆ H ₆ O ₃	126.11	クロロホルム
アセチルアセトン	123-54-6		CH ₃ COCH ₂ COCH ₃	100.12	クロロホルム
2'-アミノアセトフェン	551-93-9		C ₈ H ₉ NO	135.16	クロロホルム
3'-アミノアセトフェン	99-03-6		C ₈ H ₉ NO	135.16	クロロホルム

2.分析法

浄水処理対応困難物質の多くは水溶性が非常に高く、固相等による抽出操作は極めて困難である。そのため、直接注入-高速液体クロマトグラフ-質量分析(LC/MS)法による一斉分析法を採択し、分析条件を検討した。LC-MS/MS の測定条件を表 2 に示す。分析法の概略は以下の通りである。浄水試料に含まれる残留塩素をアスコルビン酸ナトリウムで消去した。原水試料は孔径 0.20 μm の酢酸セルロース製メンブランフィルターでろ過した。試料 10 mL に内部標準溶液

(5.0 mg/L HMT-d₁₂、DMH-d₆、TMA-d₉ 及び 1.0 mg/L DMAN-d₁₁)を 0.1 mL 加えた後、LC-MS/MS で測定した。その後、水道水及び河川水を使用して 0.001~0.01 mg/L の濃度で添加回収実験を実施し、真度 (回収率) 及び併行精度が、厚生労働省の示す妥当性評価ガイドラインの目標を満たした最も低い濃度を定量下限値として算出した。

3.浄水場における実態調査

調査施設は、大阪府内の水源を網羅する目的で 30 施設 (水源: 表流水 14 施設、伏流水 4 施設、湖沼水 3 施設、ダム水 2 施設、浅井戸 2 施設、深井戸 5 施設) を選定し、原水と浄水を対象とした。浄水処理方法としては、急速ろ過処理: 14 施設、緩速ろ過処理: 5 施設、膜処理: 4 施設、活性炭処理: 2 施設、オゾン-活性炭処理: 2 施設、曝気+急速ろ過処理: 2 施設、生物接触ろ過+急速ろ過処理: 1 施設であった。調査は夏季(平成 27 年 7 月)及び冬季(平成 28 年 1 月)の 2 回に実施した。

結果及び考察

1. 分析法の開発

各化合物の標準品を用いてスキャン測定を行い、もっとも強度の強いイオンをプリカーサーイオン(Q1)とした。選択した Q1 から得られるプロダクトイオン(Q3)のスキャン測定を行い、強度の強い 2 つのイオンを定量及び確認イオンとして選択した。その結果、アセトンジカルボン酸及びアセチルアセトンはイオン化されなかったため、本分析法の対象外とした。

直接注入-LC/MS 法では試料の濃縮を行わないため、分析の感度を決定する因子として機器への注入量が重要になる。分析カラムを検討した結果、内径が 4.6 mm と大きく、注入量 50 μL という大量注入を実施してもクロマトグラムが安定する AtlantisT3 カラム(4.6×150mm、3μm)を採用した。また、直接注入-LC/MS 法は試料に含まれているマトリックスがそのまま機器に導入されるため、試料中のマトリックスによる感度変動を受ける可能性が高くなる。そのため、内部標準物質を用いて感度変動の影響を最小限に抑えた。結果として、HMT、DMH、DMAN、

表2 LC-MS/MS 測定条件

ESIポジティブ				
HPLC				
装置	Nexera((株)島津製作所)			
カラム	AtlantisT3 (4.6 x 150 mm, 3 μm)(Waters)			
移動相(A)	0.1v/v%ギ酸			
移動相(B)	アセトニトリル			
流量	0.4mL/分			
グラジエント	5%B (5分)B→10分→80%B (5分)			
カラム温度	40℃			
注入量	50 μL			
MS/MS				
装置	3200 Q-Trap (AB Sciex)			
イオン化法	ESI-Positive			
測定方法	SRM			
モニターイオン		Q1	Q3	内部標準
	HMT	141	112, 42	HMT-d ₁₂
	DMH	61	45, 44	DMH-d ₆
	DMAN	122	107, 106	DMAN-d ₁₁
	TMA	60	44, 45	TMA-d ₉
	DMEA	74	46, 44	TMA-d ₉
	DMAE	90	72, 45	HMT-d ₁₂
	TMED	117	70, 72	使用せず
	2'-アミノアセトフェノン	136	91, 118	使用せず
	3'-アミノアセトフェノン	136	94, 93	使用せず
	HMT-d ₁₂	153	122, 94	-
	DMH-d ₆	67	49, 51	-
	DMAN-d ₁₁	133	115, 113	-
	TMA-d ₉	69	49, 51	-

ESIネガティブ				
HPLC				
装置	Nexera ((株)島津製作所)			
カラム	AtlantisT3 (4.6 x 150 mm, 3 μm)(Waters)			
移動相(A)	5.0 mM酢酸アンモニウム水溶液			
移動相(B)	アセトニトリル			
流量	0.4mL/分			
グラジエント	20%B → 10分 → 100%B (2分)			
カラム温度	40℃			
注入量	50 μL			
MS/MS				
装置	3200 Q-Trap (AB Sciex)			
イオン化法	ESI-Negative			
測定方法	SRM			
モニターイオン		Q1	Q3	内部標準
	1,3-ジハイドロキシベンゼン	109	65, 41	使用せず
	1,3,5-トリヒドロキシベンゼン	125	83, 41	使用せず

TMA、DMEA、DMAE、1,3-ジハイドロキシベンゼン、1,3,5-トリヒドロキシベンゼン、2'-アミノアセトフェノン、3'-アミノアセトフェノンを定量することが可能となった。なお、TMED

については試料によって感度の増加が著しくなりマトリックス効果を取り除くことができなかったため、本分析法の対象外とした。

分析法の妥当性を検討した結果及び定量下限値を表3に示す。

表3 浄水処理対応困難物質の分析法の妥当性パラメータ及び定量下限値

試料の種類	添加濃度 (mg/L)	(n)	真度 (%)	併行精度 (RSD)(%)	定量下限値	
HMT	水道水	0.001	7	117	11.8	0.0010
	河川水	0.001	7	110	6.4	0.0010
DMH	水道水	0.01	7	97	11.7	0.010
	河川水	0.01	7	86	8.4	0.010
DMAN	水道水	0.001	7	93	5.5	0.0010
	河川水	0.001	7	93	6.3	0.0010
TMA	水道水	0.01	7	99	4.6	0.010
	河川水	0.01	7	94	6.0	0.010
DMEA	水道水	0.01	7	89	5.4	0.010
	河川水	0.01	7	81	9.0	0.010
DMAE	水道水	0.002	7	89	4.9	0.0020
	河川水	0.002	7	93	4.5	0.0020
1,3-ジハイドロキシベンゼン	水道水	0.01	7	86	6.2	0.010
	河川水	0.01	7	89	9.4	0.010
1,3,5-トリヒドロキシベンゼン	水道水	0.01	7	88	7.4	0.010
	河川水	0.01	7	87	14.0	0.010
2'-アミノアセトフェノン	水道水	0.001	7	98	5.1	0.0010
	河川水	0.001	7	98	8.3	0.0010
3'-アミノアセトフェノン	水道水	0.002	7	112	8.1	0.0020
	河川水	0.002	7	118	6.4	0.0020

浄水処理対応困難物質には目標値が設定されていない。そこで、論文等から得られたホルムアルデヒドもしくはクロロホルム生成率の情報から水道基準値の1/10を生成する濃度を算出した値を判定値とし、定量下限値と比較した(図1,5,6)。

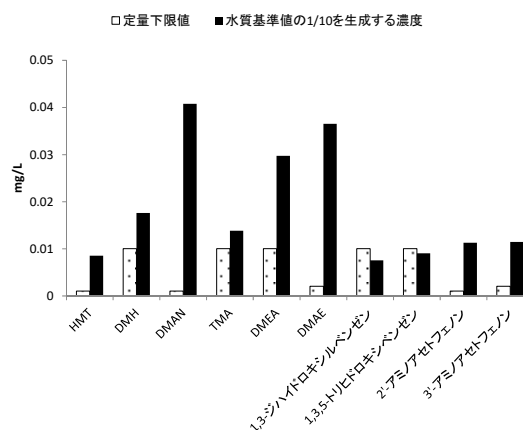


図1 各化合物の定量下限値と水質基準値の1/10を生成する濃度(判定値)との比較

その結果、1,3-ジハイドロキシベンゼン及び1,3,5-トリヒドロキシベンゼンを除く8物質について、判定値を定量することが可能であった。

また、1,3-ジヒドロキシベンゼン及び 1,3,5-トリヒドロキシベンゼンは、水道基準値の 12% のクロロホルムを生成する濃度を定量することが可能であった。

原水試料に定量下限値となるように各化合物を添加したクロマトグラムを図 2 に示す。

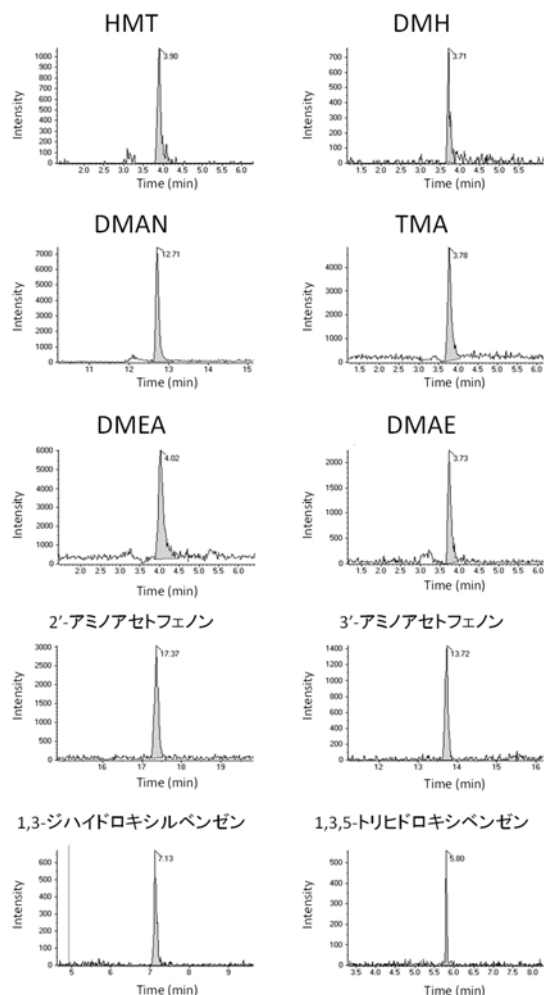


図 2 原水試料における各化合物の定量下限値でのクロマトグラム

2. 大阪府内浄水場における検出状況

平成 27 年 6 月及び平成 28 年 1 月に採水した原水・浄水試料において本研究で分析対象とした 10 種の浄水処理対応困難物質は定量下限値未満であった。この結果から、府内においてこれらの浄水処理対応困難物質は、水質基準値に影響を与える量は存在していないことが明らかになった。

本研究では、様々な浄水処理工程を持つ浄水

場で調査を行った。その目的の一つは、浄水処理工程による各物質の処理効率を明らかにすることであった。しかし、すべての原水試料において 10 種の浄水処理対応困難物質が定量下限値未満であったため、これらの浄水処理効率を明らかにすることはできなかった。今後は各処理工程について処理効率の違いをジャーテスト等実験装置を用いて明らかにすることにより、事故対策に活用できる知見を収集していきたいと考えている。

謝 辞

本研究は、平成 27 年度大阪府水道水中微量有機物質調査により実施された。採水、試料の搬入に関してご協力いただいた各水道事業体の職員の方々に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局水道課水道水質管理室長. 利根川水系におけるホルムアルデヒドによる水道への影響について(第 5 報). 平成 24 年 5 月 23 日
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r985200002cd2z-att/2r985200002cd6v.pdf>
- 2) 厚生労働省健康局水道課水道水質管理室長. 利根川水系におけるホルムアルデヒドによる水道への影響について(第 6 報). 平成 24 年 5 月 23 日.
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r985200002cd75-att/2r985200002cdb1.pdf> WEB サイトの内容は 2017 年 3 月 27 日に確認した
- 3) 小林憲弘, 久保田領志, 杉本直樹, 野本雅彦, 五十嵐良治. 利根川水系の浄水場におけるホルムアルデヒド水質汚染の原因物質の特定. *水道協会雑誌* 2012; **81**(7): 63-68.
- 4) 厚生労働省健康局長. 「浄水処理対応困難物質」の設定について(健発第 0306 号第 1~3 号, 平成 27 年 3 月 6 日)
- 5) 平成 25 年度第 2 回逐次改正委員会資料(平成 25 年 12 月 11 日)
- 6) 長谷川一夫, 相澤貴子, 内藤昭治, 真柄泰基. 塩素処理による有機化合物のクロロホルム生成特性. *水質汚濁研究* 1983; **6**: 151-160.

Concentrations of substances being difficult to be dealt with by water treatment in 30 Water Purification Plants in Osaka Prefecture, Japan

Jin YOSHIDA, Sokichi TAKAGI, Fumie ADACHI, Yoshihiko KOIZUMI, Takae NAKAJIMA, and Akio KIMURA

Substances being difficult to be dealt with by water treatment are the ones which produce the drinking water quality standard compounds such as formaldehyde and chloroform by water treatment process. These substances were listed by Ministry of Health, Labour and Welfare in March 2015. We developed analytical methods for 10 substances out of the listed 14. Using the methods, we surveyed the actual concentrations of these substances in 30 water purification plants in Osaka prefecture. As a result, levels of all substances were lower than corresponding quantitation limits both in summer and winter survey.

Key words : substances being difficult to be dealt with by water treatment, liquid chromatography / tandem mass spectrometer

アゾ染料に由来する2種の特定芳香族アミンの分析における回収率の検討

味村真弓^a 小泉義彦^a 大山正幸^a 吉田俊明^a

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」の改正により平成28年4月1日から「特定芳香族アミンを容易に生成するアゾ染料」の家庭用繊維製品等への使用が禁止された。24種の特定芳香族アミン(CAAs)とその分解生成物質であるアニリン、1,4-フェニレンジアミンを含む26物質が測定対象物質とされ、分析は政令で定める方法を用いて行うこととされたが、平成28年2月22日付化学物質安全対策室長通知により試験実施に先立ち、JIS L 1940を参考に所定の回収率が確保されていることを確認することが求められた。JIS L 1940-1:2014に基づき23種のCAAs回収率を求めたところ、2,4-ジアミノトルエン(2,4-DAT)及び2,4-ジアミノアニソール(2,4-DAA)はJIS法で示される目標値よりも顕著に低かった。そこで、これら2物質の目標回収率達成を目的とし、回収率に寄与する要因について検討した。その結果、エバポレーターによる濃縮工程の寄与率が最も大きく、溶媒回収装置条件を最適化することで両化合物の回収率が改善された。また、調製試験液と標準品に使用する溶媒の組成比を一定にすることで定量値の精度が改善し、2,4-DAT及び2,4-DAAの目標回収率である50%及び20%を満足することが可能となった。

キーワード：特定芳香族アミン、アゾ染料、2,4-ジアミノトルエン、2,4-ジアミノアニソール、繊維製品

アゾ染料は、繊維や皮革製品等の染料として、現在世界で3000種類以上使用されているといわれている。一部の染料は経口あるいは経皮的に吸収され、皮膚表面あるいは腸内の細菌や肝臓等で還元分解されて、発がん性を有する、もしくは疑われる「特定芳香族アミン(24物質)」を生成する可能性があることから、我が国でも使用が規制された¹⁾。1990年代半ばにドイツで初めて禁止され、その後2002年にはEuropean Union(EU)²⁾で、また、中国³⁾をはじめとするアジア諸国や国内において、EUと同様の規制もしくは自主基準^{4,5)}が既に運用されている。特定芳香族アミンの中には、平成27年12月に染料工場の労働者で膀胱がんが多発した事件で、その原因物質として問題となった「オルトトルイジン」も含まれている。

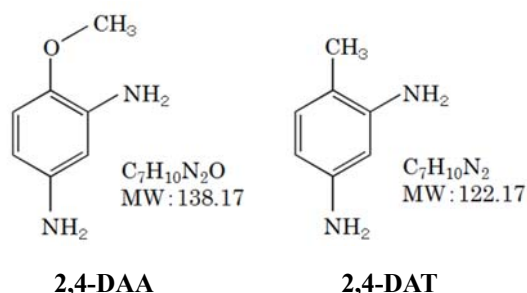
我が国の規制値は成分ごとに家庭用品1グラ

ムあたり30 µg以下で、分析法は政令で定める方法^{1,6)}を用いて行うこととされたが、平成28年2月22日付化学物質安全対策室長通知⁷⁾により、試験実施に先立ち、JIS L 1940^{8,9)}を参考に所定の回収率が確保されていることを確認することが求められた。JIS L 1940は、EN 14362-1:2012¹⁰⁾及びEN 14362-3:2012¹¹⁾を基に作成されたISO 24362-1:2014¹²⁾及びISO 24362-3:2014¹³⁾と同じ内容である。

当所においてJIS L 1940-1:2014⁸⁾に基づき回収率試験を実施したところ、示された分析上の注意事項を遵守しても2,4-ジアミノトルエン(2,4-DAT)及び2,4-ジアミノアニソール(2,4-DAA)(図1)の回収率は、目標値(2,4-DAT:50%及び2,4-DAA:20%)よりも顕著に低かった。そこで、2,4-DAT及び2,4-DAAについて目標回収率達成を目的とし、回収率に

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

影響を及ぼす要因について検討したので報告する。



	2,4-DAA	2,4-DAT
水溶解度(mg/L)	1.95×10^4 (25°C)	3.5×10^4 (20°C)
分配係数(log P_{ow})	-0.31	0.35
蒸気圧(mmHg)	4.68×10^2 (25°C)	1.70×10^4 (25°C)

図1 2,4-DAA 及び 2,4-DAT の構造式及び性状

実験方法

1. 試薬

2,4-DAT は東京化成工業製（純度 99.9%）、2,4-DAA はシグマアルドリッチ製の analytical standard（純度 99.6%）、21 種混合標準液は関東化学製、内部標準物質のアントラセン- d_{10} とナフタレン- d_8 は和光純薬工業製、亜ジチオン酸ナトリウムは和光純薬工業製の化学用（純度 80%以上）、*t*-ブチルメチルエーテル（MTBE）は関東化学製特級、珪藻土カラムはアジレント製 Chem Elute（20mL）を用いた。

2. 装置及び測定条件

2-1. GC/MS :

GC/MS 装置は、Agilent 製 5890GC に日本電子製 MSD 検出器 (JMS-Q1000GC K9) を装着した装置を用い、自動注入装置は、Agilent 製 7673 型を用いた。キャピラリーカラムは、DB-35MSUI (0.25 mmφ×30 m、膜厚 0.25 μm、Agilent 製) を用いた。注入口温度は 250°C、カラム温度は公定法通り 55°C (5 min) - 15°C/min - 230°C (0 min) - 5°C/min - 290°C (0 min) - 20°C/min - 310°C (5 min) とした。注入方法はスプリットレス、注入量は 2 μL、インターフェイス及びイオン源温度は 230°C、キャリアーガスにはヘリウムを用い、流量は 1 mL/min に設定した。イオン化法は Electron Ionization (EI) 法で、イオン化電圧は 70eV

とした。スキャンモード (SCAN: $m/z=50 \sim 500$) 及び SIM モードで測定し、SIM モード測定時の定量イオン (m/z) は公定法に示された通り (2,4-DAT : 121、2,4-DAA : 123) とした。

2-2. ロータリーエバポレーター :

ロータリーエバポレーターは IWAKI 製の REN-1 Series、溶媒回収装置は関東化学製の CST-20 を使用し、真空度は 31~36 kPa、回転数は中速でポンプのオン・オフの頻度が少ない省エネモード、水浴の温度は 40°C とした。

3. 標準溶液及び内部標準液の調製と検量線の作成

2,4-DAT、2,4-DAA のそれぞれ 10 mg を正確に量り採り、それぞれアセトニトリル 10 mL で溶解し、標準原液 (1000 μg/mL) を調製した。その液を正確に 1:1 で混合し、500 μg/mL 2 種混合標準液を調製した。それを希釈し、それぞれ 0、0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 μg/mL の 1%アセトニトリル含有 MTBE 溶液となるように調製した。別途、内部標準物質としてアントラセン- d_{10} とナフタレン- d_8 の各 500 μg/mL メタノール溶液を調製し、MTBE で希釈して各 20 μg/mL とした (内部標準液)。各濃度の標準溶液 1 mL に対して内部標準液 50 μL を正確に添加し、GC/MS 測定による検量線を作成した。なお、成分毎に定量値をはさむようにして 4 点以上の値を用いて検量線を作成し、直線性を確認した後、定量値算出に用いた。

4. 添加回収試験

JISL1940-1:2014「繊維製品—アゾ色素由来の特定芳香族アミンの定量方法—第 1 部: 繊維の抽出及び非抽出による特定アゾ色素の使用の検出」⁸⁾ の「9.6 確認手順」(JIS 法) に従って回収率を求めた。

添加回収試料液の調製: 50 mL のねじ口遠沈管にメタノール 2 mL と 2,4-DAT 及び 2,4-DAA の混合標準液 (各 50 μg/mL アセトニトリル溶液) を 0.6 mL (各 30 μg 相当) 添加し、調製した。その試料液に、70°C に加温した 0.06 M クエン酸緩衝液 (pH 6) 15 mL を添加し、70°C 30 分間加温後、20 w/v% 亜ジチオン酸ナトリウム溶液を 3 mL 添加した。再び 70°C で 30 分間加温後、2 分以内に約 20°C まで冷却し、10 w/w% 水酸化ナトリウムを直ちに 0.2 mL 添加した。その液を珪藻土カラ

ムに負荷し、15 分間放置後 80 mL の MTBE で溶出し、ナス型フラスコに回収した。次に、ロータリーエバポレーターを用いて約 1 mL に濃縮し（水浴 40°C）、濃縮液をメスフラスコに移し、容器を MTBE 2 mL で 3 回洗浄して濃縮液とあわせ、MTBE で 10 mL に定容した。その 1 mL に内部標準液を 50 μ L 添加して GC/MS 分析に供した。なお、2 種の内部標準物質（アントラセン-d₁₀ とナフタレン-d₈）のうち 2,4-DAT 及び 2,4-DAA の定量値算出にはナフタレン-d₈ を用いた。

結果及び考察

1. 前処理条件

1-1.珪藻土カラム

珪藻土カラムはアジレント製 Chem Elute (20 mL) と GL サイエンス製 InertSep K-solute (20 mL) を用いて回収率を比較した (各 n=4)。

メタノール 2 mL に 2,4-DAT と 2,4-DAA の混合標準液 (各 50 μ g/mL アセトニトリル溶液) 0.6 mL (各 30 μ g) 添加した液を JIS 法に従い処理した。

なお、InertSep K-solute の流下速度は事前に検討した。すなわち、速度無調整の「非常に速い」、「Chem Elute よりも遅い (約 75 滴/分)」、「Chem Elute と同程度 (約 150 滴/分)」の 3 つの流速で比較したところ、約 75 滴/分と約 150 滴/分では殆ど差はなかったが、「非常に速い」では、2 物質共に他の条件の 50% 以下の回収率であった。そこで、InertSep K-solute の流下速度は Chem Elute と同程度の速度 (約 150 滴 (5~6 mL) /分) となるようにコックで調節して、2 種類の珪藻土カラムの回収率を比較した。その結果、2,4-DAT では 2.5% 程度 Chem Elute の方が回収率は高かったが、2,4-DAA はほぼ同じ値で (表 1)、珪藻土カラムの種類による顕著な差が認められなかったため、Chem Elute を用いることにした。

表 1 2 種の珪藻土カラムの回収率 (各 n=4)

珪藻土カラム	2,4-DAA		2,4-DAT	
	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)
InertSep K-solute	23.6	6.7	50.6	3.9
Chem Elute	23.6	6.3	53.2	4.8

1-2. ロータリーエバポレーター減圧条件

メタノール 2 mL とアセトニトリル 0.6 mL の混

合液を政令で定める方法^{1,6)} (公定法) に従い処理し、固相 (Chem Elute) に負荷して MTBE で溶出した液を回収し、その容量をメスシリンダーで計量した。平均値 (n=10) は約 60 mL であった。また、その液の溶媒比を GC/FID で分析したところ、60 mL 中メタノールは約 1 mL、アセトニトリルは約 0.6 mL でほぼ一定であった。

次に、上記の回収液を一度合し、その内 60 mL をナス型フラスコにとり、そこに 2,4-DAT と 2,4-DAA の混合標準液 (各 500 μ g/mL アセトニトリル溶液) 60 μ L 添加した。使用したエバポレーターの稼働可能な真空度上下値の差が 5 kPa 以上であったため、26~31、31~36、36~41、41~46 kPa の 4 つの減圧条件 (通常モード) で約 1 mL まで濃縮後、MTBE で 10 mL に定容し (各 n=2)、GC/MS で測定して、濃縮過程における回収率を算出した。最も回収率が高い真空度 31~36 kPa を 100% とし、それに対する比率でその他の条件の回収率を示した (図 2)。2,4-DAT と 2,4-DAA の構造式及び物理的性状¹⁴⁻¹⁶⁾の一部は図 1 に示した通りで、2,4-DAT はオクタノール/水分係数から脂溶性もあるが、両物質は共に水溶性で、揮散する特性を有するため、濃縮時の真空度を上げすぎると回収率は低くなり、また、真空度は低くても (36~41、41~46 kPa) 濃縮時間が長くなると (約 1 mL まで濃縮するのに要する時間約 10 分、約 14 分) 低下した。そこで、最も回収率が高い、真空度 31~36 kPa の条件 (同約 8 分程度) で濃縮することとした。

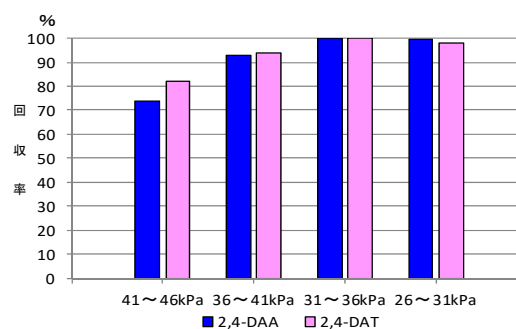


図 2 エバポレーターの減圧条件と回収率

また、通常モードと省エネモードの回収率の変動係数を求めた結果、2,4-DAT 及び 2,4-DAA ともにポンプのオン・オフの頻度が少ない省エネモードの方が変動係数は小さくなった (表 2)。そこで、省エネモードを使用することとした。

この時の約 1mL まで濃縮し MTBE で 10 mL に定容した試験液について GC/FID で分析したところ、アセトニトリル及びメタノール残存量はそれぞれ 0.5%以下であることを確認した。

表 2 31～36kPa における変動係数 (CV%) (n=4)

エバポレーターモード	2,4-DAA	2,4-DAT
通常	23.4	20.1
省エネ	12.6	5.4

1-3. 10 w/w%水酸化ナトリウム添加量

還元処理・冷却後に添加する水酸化ナトリウム溶液の濃度及び添加量を、通常の 10 w/w%溶液を 0.2 mL と、「4-アミノアゾベンゼンを生ずる恐れのあるアゾ染料に係る試験」の追加試験で用いられる 2 w/w%を 9 mL で比較したところ、水分量の違いによる固相からの回収率の違いについては検討できていないものの、2 w/w%を 9 mL 添加する方が回収率は高くなる傾向が認められた。公定法通り行うため、10 w/w%水酸化ナトリウムを 0.2 mL 正確に添加する点に注意して行う事とした。

1-4. その他

試薬の純度及び規格や使用器具による回収率への影響を検討した。

還元剤の亜ジチオン酸ナトリウムの純度による影響を検討するため関東化学製（純度 75%以上）と和光純薬工業製（化学用、純度 80%以上）を用いて回収率を比較したが、回収率に差はなかった。そのため、純度が高く、常温保存可能な和光純薬工業製を用いることとした。

MTBE は和光純薬工業製の残留農薬 PCB 試験用 5000 と関東化学製の残留農薬 PCB 試験用 300 及び鹿特級を用いて比較した。回収率ならびに夾雑ピークの検出状況等に差はなかったため、安価な関東化学製鹿特級を用いることとした。

次に、2,4-DAA は光分解性を有するという情報がある。また、処理中のガラス器具表面を観察すると、付着物が認められた。それらによる回収率低下が疑われたため、前処理に使用する容器・器具の影響を検討した。ガラス（透明及び褐色）、ポリプロピレン、テフロン等容器材質と、ガラス容器をシリル化し、器壁への吸着低減化して比較したが、回収率に差はなかった。そこで、試験には無処理のガラス容器（透明）を使用することと

した。

2. 検量線の作成

装置及び測定条件に示した条件で、市販の 21 種混合標準液を用い 2,4-DAT 及び 2,4-DAA の検出下限値 (IDL) (S/N=3) と定量下限値 (IQL) (S/N=10) を求めた。使用開始直後のカラムでは、2,4-DAT 及び 2,4-DAA の IDL ($\mu\text{g/mL}$) と IQL ($\mu\text{g/mL}$) はそれぞれ 0.0054 と 0.018 及び 0.0092 と 0.031 であったが、処理後の試料液注入を繰り返すと、ピークがテーリングし、感度もそれぞれ 0.044 と 0.15 及び 0.082 と 0.27 まで低下した。そこで、両物質共に IQL が 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 以下の状態で分析することとした。

次に、市販の混合標準液に用いられているアセトニトリルと、アセトニトリルよりも 2,4-DAT 及び 2,4-DAA が溶解しやすく、かつ公定法で標準品の溶解に用いることとされているメタノールを用いて、溶媒による影響を比較した。5%アセトニトリル含有 MTBE 溶液と 5%メタノール含有 MTBE 溶液で、2,4-DAT 及び 2,4-DAA がそれぞれ 0.5、1、2、3、5 $\mu\text{g/mL}$ の混合標準液を調製し、その 1 mL に内部標準液 50 μL を添加して検量線を作成した (図 3)。2,4-DAT 及び 2,4-DAA の 5%メタノール含有 MTBE 溶液のピーク面積は、5%アセトニトリル含有 MTBE 溶液のピーク面積のそれぞれ約 60%及び約 50%であった。また、1%と 50%アセトニトリル含有 MTBE 溶液で調製した標準液について分析したところ、50%アセトニトリル含有 MTBE 溶液ではピークトップがスプリットするなどピーク形状が悪化し、正確な面積値を求めることが困難であった。そのため、あくまでも傾向を考察する範疇にとどめざるを

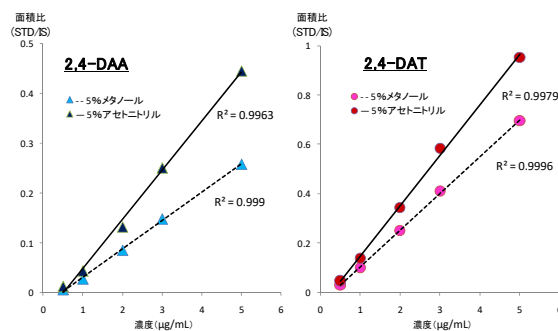


図 3 2,4-DAT 及び 2,4-DAA の 5%メタノールまたはアセトニトリル含有 MTBE 標準液の検量線

えないが、1%と50%アセトニトリル含有MTBE溶液では50%アセトニトリル含有MTBE溶液で調製した標準系列の方がピーク面積比は小さくなり、直線性が低下する傾向が認められた。

以上の結果から、目的成分を溶解する溶媒組成により成分のピーク面積値が異なることが明らかとなり、標準品の溶解溶媒は、GC/MS分析用試料液と類似の溶媒組成にすることが必要であると推察された。前項1-2で示したように、約1 mLまでエバポレーターで濃縮後10 mLに定容した試験液中のメタノール及びアセトニトリル含量はそれぞれ0.5%以下であったことと、保存安定性の理由から、1%アセトニトリル含有MTBE溶液で検量線の標準系列を調製することとした。

3. 各工程における回収率低下

3-1.還元処理

EN 14362-1: 2012¹⁰⁾の「9.6 Check procedure」(EN法)に示された方法とJIS法で回収率試験を実施し、値を比較した。

EN法に示された回収率試験法は図4の通りである。すなわち、メタノール2 mLに標準物質を添加し、そこに70°Cのクエン酸/NaOH buffer添加後の「70°Cで30分加温し、更に亜ジチオン酸を添加して70°Cで30分加温する」工程がない点が、JIS法とは異なっている。

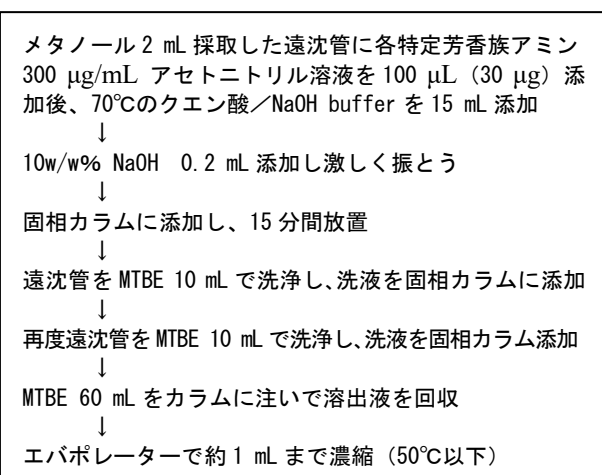


図4 EN法による添加回収試験

同時に行ったJIS法とEN法による2,4-DAT及び2,4-DAAの回収率は、JIS法が57.7%と28.2%、EN法が76.6%と60.6%であった。70°Cでの加温と亜ジチオン酸による還元工程を含むJIS法では、両物質共に20%以上回収率が低くなった。

3-2.エバポレーターによる濃縮

真空度が31~36 kPaの条件で、亜ジチオン酸や固相カラムの違いによる回収率の違いを検討した際に、エバポレーターによる濃縮前後の試験液についてGC/MS分析を行い、濃縮工程における目的成分の損失について調べた。濃縮前の濃度はカラムからの溶出平均液量の60 mL中の量として概算値を算出した。その値と濃縮後の値について比較したところ、2,4-DATと2,4-DAA共に濃縮前が高く、平均すると濃縮後は濃縮前の2,4-DATが約80%、2,4-DAAは約50%であった。

3-3. 70°C加温処理

クエン酸/NaOH buffer添加後の70°Cで30分加温処理の有無による回収率の比較を行ったが、回収率に差は認められなかった。

4. 回収率試験

エバポレーター真空度を31~36 kPa(省エネモード)に最適化し、JIS法に従い分析した2,4-DAT及び2,4-DAAの回収率は表3に示した通りで、共にJISの目標値を満足した。

更に、実際の試買検査時に使用する関東化学製の21種混合標準液でも実施した。2,4-DATについては2-アミノ-4-ニトロトルエンから分解した分も追加されるため、2,4-DAT由来のみの回収率は求められなかったが、2,4-DAAは21.3~16.9%、平均値19.0%で、目標値に近い値が得られた。

表3 2,4-DAT及び2,4-DAAの回収率 (n=3)

特定芳香族アミン	2,4-DAA		2,4-DAT	
	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)
	22.5	8.40	52.8	3.54
	(20)		(50)	

* () JIS目標値

まとめ

各処理過程による回収率への影響を検討したところ、両化合物ともに亜ジチオン酸ナトリウムによる還元処理、固相抽出、エバポレーター濃縮工程で減少することがわかった。中でも、エバポレーターによる濃縮工程が大きく回収率に影響していた。そこで真空度等の濃縮条件を最適化したところ両化合物共に回収率がアップし、再現性が改善された。しかし、最適条件下でも2,4-DAT

では約 20%、2,4-DAA は約 50%低下することが判明した。

また、検量線の標準系列を調製する溶媒として 5%メタノール含有 MTBE 溶液と 5%アセトニトリル含有 MTBE 溶液で比較した。内部標準物質のナフタレン-d₈ 及びアントラセン-d₁₀ のピーク面積値は溶媒による差は認められなかったが、2,4-DAT 及び 2,4-DAA のピーク面積は、5%メタノール含有 MTBE 溶液では 5%アセトニトリル含有 MTBE 溶液のピーク面積のそれぞれ約 60% 及び約 50%となった。つまり、処理後の試験液の溶媒組成比と標準品の溶解に使用する溶媒組成を近似させることも定量精度を上げ、目標回収率を満たす上で重要な要因であることが明らかとなった。

初期の回収試験実施時に 2,4-DAT 及び 2,4-DAA は殆ど回収されなかったが、最適化した条件で処理すると、回収率は 2,4-DAT で 52.8%、2,4-DAA では 22.5%で、共に JIS の目標値（それぞれ 50%及び 20%）を満足した。

また、同じ条件でその他の規制対象特定芳香族アミンの回収率を求めたところ、一部目標値に満たない成分が認められたが、全般的に回収率は改善された。全ての規制対象成分について目標回収率を満足するためには、より精密に真空度を調整できるエバポレーターなどハード面の整備が不可欠と推測されるが、今後更に回収率の改善に努め、試験精度の向上に努めたい。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律第2条第2項の物質を定める政令の一部を改正する政令(平成27年政令第175号)
- 2) European Commission. Commission Regulation (EC) No 552/2009 of 22 June 2009, amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annex XVII, Official Journal of the European Union, L 164/23, 2009
- 3) 中華人民共和国国家繊維製品基本安全技術

規範、GB/T 17592-2011,繊維製品 使用禁止アゾ染料の測定 (2011 改定)

- 4) 日本繊維産業連盟. 繊維製品に係る有害物質不使用に関する自主基準.
<<http://www.jtf-net.com/news/120329VSNHS.htm>>, WEB サイトの内容は 2017 年 6 月 27 日に確認した
- 5) 日本皮革産業連合会. 皮革製品に係る有害物質の不使用に関する自主基準.
<http://www.jlia.or.jp/library/document/20120323_guideline.pdf>, WEB サイトの内容は 2017 年 6 月 27 日に確認した
- 6) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則の一部を改正する省令(平成27年厚生労働省令第124号)
- 7) 化学的変化により容易に特定芳香族アミンを生成するアゾ化合物を含有する家庭用繊維製品等について(薬生化発0222第1号, 平成28年2月22日, 改正 薬生化発0620第10号, 平成28年6月20日, 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課化学物質安全対策室長)
- 8) JIS L 1940-1:2014 (ISO 24362-1:2014), 繊維製品—アゾ色素由来の特定芳香族アミンの定量方法—第 1 部: 繊維の抽出及び非抽出による特定アゾ色素の使用の検出
- 9) JIS L 1940-3: 2014 (ISO 24362-3:2014), 繊維製品—アゾ色素由来の特定芳香族アミンの定量方法—第 3 部: 4-アミノアゾベンゼンを放出する特定アゾ色素使用の検出
- 10) European Committee for Standardization, EN 14362-1:2012, Textiles-Methods for determination of certain aromatic amines derived from azo colorants-Part 1: Detection of the use of certain azo colorants accessible with and without extracting the fibers, 2012.
- 11) European Committee for Standardization, EN 14362-3:2012, Textiles—Methods for determination of certain aromatic amines derived from azo colorants-Part 3 : Detection of the use of certain azo colorants, which may release 4-aminoazobenzene.
- 12) ISO 24362-1 : 2014. Textiles—Methods for determination of certain aromatic amines derived from azo colorants-Part 1 : Detection of the use of certain azo colorants accessible with

and without extracting the fibres.

- 13) ISO 24362-3 : 2014. Textiles—Methods for determination of certain aromatic amines derived from azo colorants-Part 3 : Detection of the use of certain azo colorants, which may release 4-aminoazobenzene.
- 14) 環境省.
<<https://www.env.go.jp/chemi/report/h23-01/pdf/chpt2/2-2-2-12.pdf>>. WEB サイトの内容は 2017 年 6 月 7 日に確認した
- 15) 環境省.
<<https://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/profile/pf1-13.pdf>>. WEB サイトの内容は 2017 年 6 月 7 日に確認した
- 16) 国立医薬品食品衛生研究所.
<<http://www.nihs.go.jp/ICSC/icssj-c/icss0582c.html>>. WEB サイトの内容は 2017 年 6 月 7 日に確認した

**Study of the Principal Factors Associated with Recovery Rate of 2 Kinds of Certain Aromatic Amines
Derived from Azo Colorants in Textile Products**

Mayumi MIMURA^a, Yoshihiko KOIZUMI^a, Masayuki OHYAMA^a and Toshiaki YOSHIDA^a

Azo colorants that generate certain aromatic amines (CAAs) in textile products are subject to regulation by the “Act on Control of Household Products Containing Harmful Substances” in Japan since April 1, 2016. The target compounds are 26 primary aromatic amines containing aniline and 1,4-phenylenediamine which are produced by further decomposition of a CAA, 4-aminoazobenzene. An official analytical method for the CAAs was established by Japanese government (July 9, 2015), and the government notified that the recoveries of each CAA during the analytical procedures must satisfy the criteria indicated in an analytical method “JIS L 1940” (February 22, 2016). In the present study, the recoveries of two kinds of CAAs, 2,4-diaminotoluene (2,4-DAT) and 2,4-diaminoanisole (2,4-DAA), were examined using the official method. The losses of both compounds were found to occur during various sample preparation processes, such as reductive degradation of the original azo colorants, solid-phase extraction of the CAAs, and concentration by evaporation of the extraction solvents. Among them, the concentration step was considered to be most important, and by optimizing the conditions of evaporation system, the recoveries significantly improved to meet the criteria, namely 50% for 2,4-DAT and 20% for 2,4-DAA, indicated in the analytical method “JIS L 1940”.

Key words : certain aromatic amines, azo colorants, 2,4-diaminotoluene, 2,4-diaminoanisole, textile products

a Osaka Institute of Public Health

繊維製品に含まれるトリス (1-アジリジニル) ホスフィンオキシド (略称：APO) の分析法の改定に向けた検討

味村真弓^a 中島晴信^b 河上強志^b 伊佐間和郎^c

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」により、繊維製品への使用が禁止されている防炎加工剤のトリス (1-アジリジニル) ホスフィンオキシド (APO) の公定法を改定するために、APO-d₁₂をサロゲート物質として用いたGC/MS分析法の検討を行った。SIMモードにおける定量・定性イオンを、APOでは m/z 131、 m/z 90、APO-d₁₂では m/z 139、 m/z 95とした。設定した分析条件で作成した検量線は、0.25~10 µg/mLの間で相関係数0.998以上の良好な直線性が得られた。検出限界はS/N=3として0.075 µg/mLであった。また、フロリジルカラムを用いた試料の精製法を検討し、APO及びサロゲート物質共に良好な回収率が得られる前処理法を確立した。次に、素材の異なる複数の繊維製品を用いて添加回収試験を行った。綿製品では良好な回収率が得られたが、化繊やその混紡製品では回収率が非常に低いものがあつた。そこで、低回収率を示した製品のメタノール抽出液に標準品を添加し添加回収試験を行ったところ、APO及びサロゲート物質共に低回収率となり、製品からメタノール中に抽出された夾雑物質が影響していることが推測された。今回作成した分析法は、サロゲート物質の使用により回収率が補正され、製品中の正確なAPO残留量を知ることができる。構築した方法は公定法の改良法として十分適用できる可能性があると考えられた。この方法で、市販の防炎加工製品8製品を分析調査したが、いずれの製品からもAPOは検出されなかつた。

キーワード：トリス(1-アジリジニル)ホスフィンオキシド、防炎加工剤、GC/MS、繊維製品、家庭用品

トリス (1-アジリジニル) ホスフィンオキシド (APO) (図1) は、綿製品の耐久性防炎加工剤として、1960年代後半に主にアメリカで使用され、日本では1970年代前半に使用されていたが、環境や人への有害性を示すことや、動物を使った毒性試験の結果、経口・経皮毒性が強く、特に造血機能障害等の特殊毒性が顕著であることが明らかになった^{2,5)}。

日本では、1978年に「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」⁶⁾により、家庭用品にAPOを使用することが禁止され、公定法も

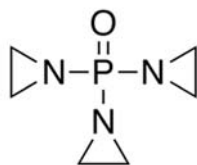
定められた。その分析法は、試料をメタノール抽出した後、回収率が良好でないアルミナ (中性) カラムクロマトグラフィーによる精製を行い、分離能の低いパックドカラムを用いた炎光光度型検出器 (リン用干渉フィルター) (FPD) 付きガスクロマトグラフ (GC/FPD) により測定する方法である。また、アルミナカラムでの精製時には有害なジクロロメタンが用いられる。そこで、有害な溶媒を使用せず、回収率に優れた精製法や、より選択性及び精度の高いキャピラリーカラムを使用したガスクロマトグラフ質

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 国立医薬品食品衛生研究所

c 帝京平成大学

量分析計 (GC/MS) を導入するための検討を行い、APO -d₁₂ をサロゲート物質として用いたより精度の高い分析法を開発し、良好な結果を得たので報告する。



分子式 : C₆H₁₂N₃OP
分子量 : 173.15

図 1. APO の化学構造式

実験方法

1. 試料

市販の防炎加工繊維製品 8 製品 (8 部位) を試験試料とした。

2. 試薬

APO の標準試薬及びサロゲートの APO -d₁₂ は、カナダの Toronto Research Chemicals Inc. 社に合成依頼した。内部標準物質のアセナフテン-d₁₀ は、和光純薬工業社製の 1 mg/mL (アセトン溶液) 標準液を用いた。メタノールは和光純薬工業社製 LC/MS 用、酢酸エチル、シクロヘキサン、ジクロロメタン、n-ヘキサン及びアセトンは和光純薬工業社製残留農薬・PCB 試験用 (5000 倍濃縮検定品) を用いた。フロリジルカートリッジカラムは Waters 社製の Sep-Pack plus (910 mg/1.4 mL) を用いた。

3. GC/MS 装置及び測定条件

3-1. GC/MS 条件 (1) :

GC/MS 装置は、Hewlett Packard (HP) 製 5890 Series II GC に MSD 検出器 (HP-5971) を装着した装置を用い、自動注入装置として Hewlett Packard 製 7673 型を用いた。キャピラリーカラムは、VF-17 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.15 μm、Agilent 製) を用いた。キャリアーガスにはヘリウムを用い、流量は 1 mL/min に設定した。カラム温度は、60°C (1 min 保持) - 30°C/min - 180°C (2.5 min 保持) - 30°C/min - 300°C にプログラミングし、注入口温度は 250°C、インターフェイス温度は 290°C、イオン源温度は 180°C に設

定した。注入方法はスプリットレスで、注入量は 1 μL とした。イオン化法は Electron Ionization (EI) 法で、イオン化電圧は 70 eV とした。

スキャンモード (SCAN: $m/z = 50\sim 550$) 及び Selected Ion Monitoring (SIM) モードで測定した。SIM モードにおける定量・定性イオンを、APO では m/z 131、 m/z 90、APO -d₁₂ では m/z 139、 m/z 95 とした。同様に内部標準物質アセナフテン-d₁₀ では m/z 164、 m/z 162 とした。

3-2. GC/MS 条件 (2) :

GC/MS 装置は、Agilent 製 7890AGC に日本電子製 MSD 検出器 (JMS-Q1050GC UltraQuad GC/MS) を装着した装置を用いた。自動注入装置は、Agilent 製 7693 型を用いた。イオン源温度は 230°C に設定したが、その他の測定条件及び使用カラムは GC/MS 条件 (1) と同様とした。

4. 検量線の作成

4-1. 絶対検量線 (GC/MS 条件 (1)) :

APO 標準品 50 mg をアセトン 10 mL で溶解し、APO 標準原液 (5000 μg/mL) を調製した。溶解前と後の試薬瓶重量を秤量し、内容重量がほぼ 50 mg であることを確認した。その溶液をアセトンで希釈し、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、40、60、80、100、200 μg/mL の標準溶液系列を調製した。

4-2. サロゲート法による検量線 (GC/MS 条件 (2)) :

APO 標準原液 (5000 μg/mL) をアセトンで希釈し、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、40、60、80、100、200 μg/mL の標準溶液系列を調製した。各濃度の溶液に、サロゲート物質が 2.5 μg/mL、内部標準物質が 1.5 μg/mL となるように添加して、標準溶液系列を調製した。なお、サロゲート物質は、APO -d₁₂ 5 mg をアセトン 5 mL で溶解し、APO -d₁₂ 原液 (1000 μg/mL) を調製し、適宜アセトンで希釈して用いた。

5. 試験溶液の調製

細切した試料 1.0 g をナス型フラスコに秤量し、メタノール 50 mL とサロゲート物質を添加した後、30 分間 70°C で還流抽出した。抽出液をガラスろ過器でろ過し、200 mL のナス型フラスコに採取した。20 mL のメタノールでガラス器具及び試料を洗浄して、洗液とろ液をあわせた。抽出液

を留去し、残渣をヘキサン 2 mL で溶解した。予めメタノール 10 mL、次いでヘキサン 10 mL でコンディショニングしたフロリジルカラムに試料溶液を負荷した。ヘキサン 10 mL、続いてアセトン 10 mL で洗浄した後、メタノール 10 mL で APO を溶出した。溶出液を留去した後、アセトンで分析に適した濃度に溶解・希釈し、内部標準物質としてアセナフテン-d₁₀ を一定の比率で添加して GC/MS 測定試料とした。

結果及び考察

1. 検出法の検討

APOは、GC測定時の熱分解や、精製過程で再現性の良い回収率が得られないことがある²⁾。そこで、その回収率を補正するために、サロゲート物質としてAPO-d₁₂を、内部標準物質としてアセナフテン-d₁₀を使用することとした。

APOとAPO-d₁₂及び内部標準物質の3物質の相互分離が良好となるキャピラリーカラムを検索した。その結果、VF-17を用いることで、良好な相互分離が得られた。そこで、このカラムを用いて分析することとした。GC/MSの測定条件は文献⁷⁾を参考にして作成した。その条件でGC/MS (SCAN, m/z = 50~550) 分析した際のクロマトグラムと、APO及びAPO-d₁₂のマススペクトルを図2に示した。

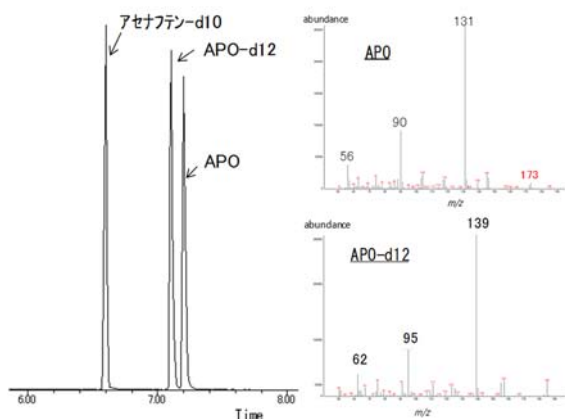


図2. APO、APO-d₁₂、内部標準物質の混合溶液のGC/MS (SCAN) クロマトグラムとAPO及びAPO-d₁₂のマススペクトル

2. 検量線の作成

2-1.絶対検量線

各精製工程における APO 回収率の検討には絶対検量線を用いた。GC/MS 装置は、HP 製 GC/MS (GCMS 条件 (1)) を使用した。この検量線は、2.0~80 µg/mL の範囲で、相関係数 0.980 の直線性を示した (図 3)。検出限界は、S/N=3 として 1.0 µg/mL であった。

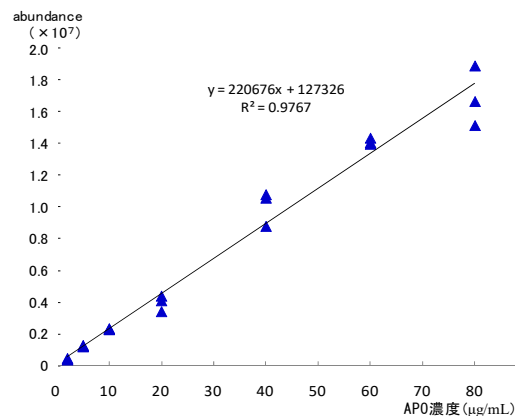


図 3. APO の絶対検量線 (HP 製 GC/MS、GC/MS 条件 (1))

2-2.サロゲート法による検量線

市販製品の分析や添加回収試験にはサロゲート法による検量線を使用した。GC/MS 装置は、日本電子製 GC/MS (GC/MS 条件 (2)) を用いた。この検量線は、0.25~10 µg/mL の間で相関係数 0.998 以上の良好な直線性が得られた (図 4)。検出限界は、S/N=3 として 0.075 µg/mL であった。繰り返し注入の再現性も良好であった。

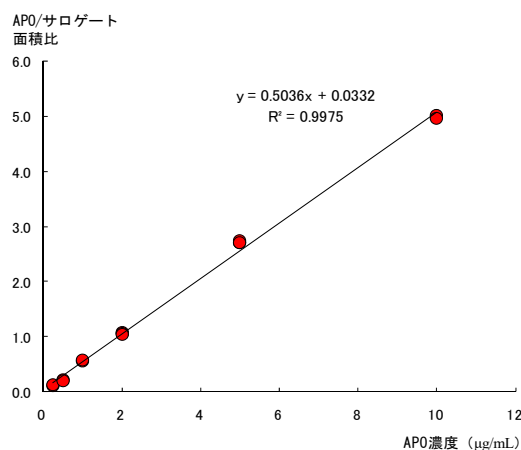


図4. サロゲート法によるAPOの検量線 (JEOL製GC/MS、GC/MS条件 (2))

3. 液々分配による極性物質除去法の検討

繊維製品からの抽出法は、現公定法に従ってメ

タノールによる還流抽出法で行うこととした。その抽出液には、繊維製品中の極性物質、非極性物質及び界面活性剤等が含有されている。

まず、液々分配法で、メタノール抽出液から極性物質を除去する方法を検討した。メタノール溶液に水を添加し、酢酸エチル、ヘキサン、シクロヘキサン、ジクロロメタン等の有機溶媒を添加混合し、APO が有機溶媒層に抽出可能か検討した。ジクロロメタンでは約 30%程度の抽出ができたが、他の溶媒では殆ど抽出できなかった。この値は過去に報告された結果と同傾向であった⁸⁾。APO の極性が高いため⁹⁾有機溶媒層に抽出できないことを確認した。

次に、APO のメタノール溶液からメタノールを留去してヘキサンに転溶したところ、2~1000 µg レベルの APO は殆どヘキサンに溶解していた。実試料のメタノール抽出液を乾固した場合、夾雑極性物質（残渣）によりトラップ（マスキング）されて、回収率が悪くなる可能性があるため、メタノールが少し残る状態でヘキサンに転溶することとした。しかし、これだけでは夾雑極性物質の除去は不十分である。そこで、固相カラムを用いた夾雑物質の除去法を検討することとした。

4. フロリジルカラムによる精製法の検討

現行法では、アルミナ（中性）をガラス製カラムに充填し、ジクロロメタンで溶出・精製を行うこととなっているため、市販のアルミナ（中性）ミニカラムを用い、ジクロロメタン以外の溶媒を用いて精製する方法を検討した。この場合、最も高い回収率でも 70%に満たなかった。

そこで、アルミナ以外の固相カラムを用いる精製法を検索したところ、石橋らは、フロリジルカラムを用いた良好な精製法を報告していた¹⁰⁾。その方法は、APO 含有のヘキサン溶液をカラムに負荷し、ヘキサンで夾雑非極性物質を、30%エタノール/ヘキサン及びアセトンで中極性物質を溶出・除去した後、メタノールで APO を溶出させるという方法である。その方法に従って APO の回収試験を行ったところ、25~100 µg の添加で 80~90%以上の回収率が得られた。なお、Waters 社製の Sep-Pack plus シリカゲルカラム（690 mg/1.6 mL）を用いる方法も検討し、80~90%近い回収率を得たが、フロリジルカラムの方が優れていた。

次に、それぞれ 250 µg の APO と APO-d₁₂ を含有するヘキサン溶液 2 mL をフロリジルカラムに負荷し、10 mL のヘキサン及びアセトンを流出したところ、両物質共に全く溶出しなかった。その後、10 mL メタノールで溶出し、両物質共に 90%以上が溶出することを観察した（図 5）。そのため、本法ではフロリジルカラムをヘキサン、アセトンで洗浄しメタノールで溶出させた。石橋らの報告と同等の結果となり、サロゲート物質についても同様の挙動を示すことが確認できた。

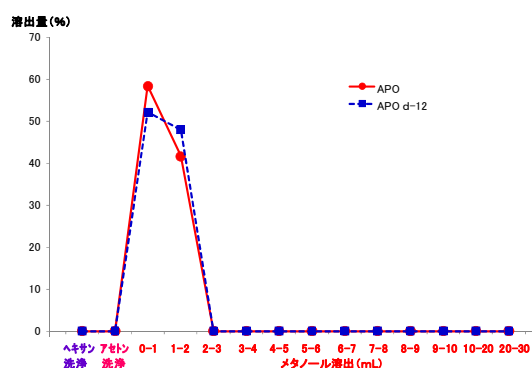


図 5. APO 及び APO-d₁₂ のフロリジル固相カラム溶出パターン

また、APO のみであるが、500、1000 µg とカラムへの負荷量を増やしたところ、1000 µg 負荷では、アセトン流出の段階で添加量の 10%程度の溶出が認められたため、カラムへの負荷量は 500 µg よりも少ない量にすべきであることがわかった。

次に、夾雑物質の除去例として、市販製品の分析の際に GC/MS (SCAN モード) 分析で夾雑ピークが多かった試料 No.6 (絨毯) を用いて、フロリジルカラム未精製のメタノール抽出液と精製後の試験溶液について、同じ濃縮率で GC/MS (SCAN モード) で分析を行い、得られたクロマトグラムの夾雑ピークの増減を観察した。カラム精製前に比べて精製後の試験溶液では夾雑ピーク数は減少し、残存するピークも小さくなった（図 6）。同様にシリカゲルカラムを用いた検討も行った。こちらも、カラム精製後は夾雑ピーク数が減少し、残存するピークも小さくなったが、フロリジルカラムの方がより除去効果は優れていた。

更に、目視により共存色素の除去もある程度で

表 1. 市販製品の分析と繊維試料への添加回収試験 (n=3)

Sample No.	製品	材質	APO ($\mu\text{g/g}$)	2 $\mu\text{g/g}$ (試料)		25 $\mu\text{g/g}$ (試料)		250 $\mu\text{g/g}$ (試料)	
				回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)
1	タオル(白)	綿100%	N.D.	75.3 (481.7)	3.61 (4.78)	110.4 (77.3)	2.61 (14.6)	100.4 (98.7)	1.48 (16.6)
2	枕カバー(白)	綿100%	N.D.	92.4 (27.0)	3.46 (7.35)	103.6 (70.9)	2.39 (38.5)	107.3 (60.9)	1.64 (20.3)
3	枕カバー(薄青)	アクリル 20% + 綿 80%	N.D.	-	-	112.4 (68.7)	12.8 (18.3)	-	-
4	シーツ(白)	アクリル 30% + 綿 70%	N.D.	-	-	-	-	-	-
5	ねまき(薄青)	アクリル 60% + 綿 40%	N.D.	-	-	113.9 (9.79)	2.04 (22.0)	-	-
6	絨毯(ベージュ)	アクリル 100%	N.D.	-	-	113.5 (41.8)	2.41 (24.8)	-	-
7	カーテン(レース, 白)	ポリエステル 100%	N.D.	-	-	135.6 (1.13)	35.7 (9.80)	119.9 (3.22)	5.53 (23.9)
8	カーテン(遮光, 薄緑)	ポリエステル 100%	N.D.	-	-	116.4 (0.35)	19.9 (72.6)	-	-

N.D.: not detected. - : untested
()はサロゲートによる補正無しの値

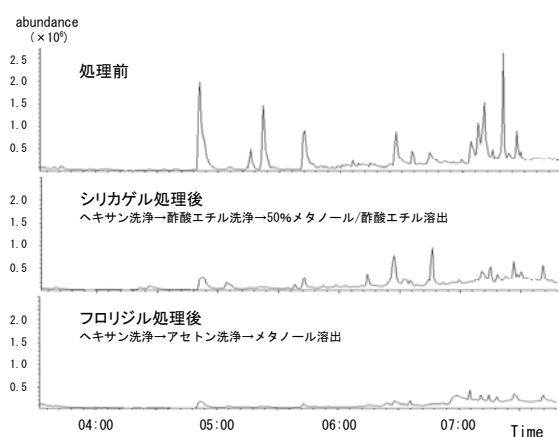


図 6. フロリジル及びシリカゲル固相カラム処理による試料 No.6 (絨毯) メタノール抽出液の GC/MS (SCAN) クロマトグラム

きていることが観察された。

以上のことから、実試料でもフロリジルカラムを用いた精製法の有用性が確認できた。

5. 市販防炎加工繊維製品の分析及び市販製品への添加回収試験

作成した方法で、市販防炎加工繊維製品 8 試料を分析したが、いずれの製品からも APO は検出されなかった (表 1)。

次に、APO が検出されなかった市販製品への添加回収試験を実施し、繊維に残留する未反応の

APO が正確に定量可能か検討を行った。

まず、繊維試料を用いずに APO 標準品 (2、25、250 μg) とサロゲート (2、25、250 μg) のみで添加回収試験を行い、サロゲート補正を行った場合、いずれの添加量でもほぼ 100% の回収率が得られることを確認した。

APO による防炎加工法は、綿などの天然繊維中のセルロースの OH 基と、APO のアジリジン環を反応させ、繊維にリン化合物を結合させて加工する方法である²⁾。そこで、天然繊維である綿 100% の 2 製品 (No.1、No.2) 1 g に、APO を 2、25、250 μg とサロゲートを 2、25、250 μg それぞれ添加し、サロゲート補正の有無による回収率を検討し (n=3)、結果を表 1 に示した。サロゲート補正を行わず、絶対検量線法で試験した場合、25 μg および 250 μg の添加では回収率が 60.9~98.7% とおおむね良好であったが、変動係数は最大 38.5% と大きくなり、低濃度の 2 μg ではさらに検討が必要な結果となった。一方、サロゲート補正を行った場合、低濃度 (2 μg) 添加ではやや低い値であったが、25、250 μg 添加では 100% 近い回収率で変動係数が 3% 以下の良好な結果が得られた。Wang らは、サロゲート物質を用いない標準添加法で、綿製品の外、絹、ウール、麻等の天然繊維製品で APO の添加回収試験を実施し、良好な回収率を得たと報告している⁷⁾。製品の分

析数を増やし検討する必要があるものの、今回作成したサロゲート物質を用いる方法は、天然繊維中の APO 定量法として有効であると考えられる。

一般的に、APO は主に天然繊維の綿製品に、防災目的として使用されるが、化繊（アクリル、ポリエステル）及び混紡の防災加工製品 5 製品（No.3 と No.5～8）に対しても、APO 25 µg とサロゲート 25 µg をそれぞれ添加して、回収率を観察した（n=3）。その結果、サロゲート補正を行わない場合には、No.3 のアクリル 20%、綿 80% の混紡製品や No.6 のアクリル 100% 素材では、回収率はそれぞれ 68.7%、41.8% であり、サロゲート補正後の回収率も 112.4%、113.5% と良好であったが、アクリル 60%、綿 40% の混紡製品で回収率が低く、ばらつきが見られることから、更に検体数を増やして確認する必要がある。また、ポリエステル 100% 製品では、絶対検量線法での回収率が 25 µg 添加では著しく低いことから、本分析法を化繊および混紡製品に適用するには更なる検討が必要と考えられた。

両物質が回収されない原因として、ポリエステルの抽出効率の影響が懸念されたため、試料 No.7 を用いて以下の検討を行った。試料 No.7（カーテン）をメタノールで 70℃、30 分間環流抽出して抽出液のみを分取した。その液に APO 及びサロゲートを各 25 µg 添加し、環流抽出以降の操作を行い回収率を求めたところ、両物質共に検出されなかった。この結果から、今回のポリエステル 100% 製品における APO の回収率低下の原因は、メタノールで抽出される夾雑物質の影響によるものであることが推測された。

まとめ

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」によって、綿などの天然繊維に防災加工剤として用いられる APO の使用が禁止されている。その公定分析法を改定するために、フロリジルカラムによる前処理法と、サロゲート物質（APO-d₁₂）と内部標準物質（アセナフテン-d₁₀）を用いた GC/MS 分析法の検討を行った。その結果、綿製品ではサロゲート法を用いることで、公定法より 10 倍以上高感度で、変動係数も 3% 以下という良好な分析が可能となった。また、化繊及びその混紡製品については更に検討が必要であること

がわかった。このように綿製品について、公定法として十分適用できる可能性があると考えられた。

今回構築した方法で、市販防災加工繊維製品 8 試料を分析したが、いずれの製品からも APO は検出されなかった。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

文献

- 1) 中村晃忠, 小嶋茂雄, 鹿庭正昭. Tris (1-aziridinyl) phosphine oxide (APO) で防災加工した綿製品の鑑別法. *衛生研究所報* 1978; **96**: 42-46.
- 2) 保健衛生安全基準家庭用品規制関係実務便覧 技術編 トリス (1-アジリジニル) ホスフィンオキシド. 2045 の 2-2045 の 14.
- 3) 石津澄子. 難燃剤の安全性評価—含リン難燃剤を例として—. *高分子* 1975; **24**: 788-792.
- 4) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. 1975; **9**: 75-84.
- 5) G.C. Labrecque, R.L. Fye. Cytogenetic and other effects of the chemosterilants tepa, metepa, apholate and hempa in insects (a review). *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 1978; **47**(2): 99-113.
- 6) 厚生省令第 34 号. 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則. 昭和 49 年 9 月 26 日.
- 7) S. Wang, C. Dong, H. Guo, J. Yu, G. Wang. Determination of TEPA Residue in Natural Textiles Using Accelerated Solvent Extraction Procedure by GC-MS/SIM Analysis. *International Conference on Agricultural and Natural Resources Engineering Advances in Biomedical Engineering* 2011; **3-5**: 145-151.
- 8) M. C. Bowman and M. Beroza. Identification of Compounds by Extraction p-Values Using Gas Chromatography, *ANALYTICAL CHEMISTRY* 1966; **38**(11): 1544-1549.
- 9) Merck Index, 9745. Triethylene phosphoramidate. CAS No. 545-55-1, pp1723-1724, 13th EDITION
- 10) 石橋正博, 真鍋静子, 篠原純子, 江口征夫,

城戸浩三. 繊維製品中の有機リン系防炎加工剤の一斉分析－有害な溶媒を用いない方法－. 第34回全国衛生化学協議会講演要旨集 1997; 176-177.

- 11) 森謙一郎, 西田茂一, 原田裕文. 家庭用品の衛生化学的研究(第2報) 防炎加工布に含まれる Tris (1-aziridinyl) phosphine oxide (APO) の分析法, 東京衛研年報 1977; **28-1**: 74-78.

Study for the Revision of Analytical Method for Tris(1-aziridinyl)phosphine oxide in Textiles

Mayumi MIMURA^a, Harunobu NAKASHIMA^b, Tsuyoshi KAWAKAMI^b and Kazuo ISAMA^c

The official analytical method for tris(1-aziridinyl)phosphine oxide (APO), which is banned from use in textile products by the “Act on Control of Household Products Containing Harmful Substances,” has several disadvantages and requires revision. A method for qualitative and quantitative analysis for APO residue in textile products by GC/MS with APO-d₁₂ as clean-up spike, using the selected ion monitoring mode (SIM) was proposed in this paper. The quantitative ion of APO was *m/z* 131 and the qualitative ion was *m/z* 90. The quantitative ion of APO-d₁₂ was *m/z* 139 and the qualitative ion was *m/z* 95. A linear calibration curve ($R^2=0.998$) of GC/MS was obtained in the concentration range of 0.25-10 µg/mL. The detection limit estimated by $S/N = 3$ method was 0.075 µg/mL. The repeatability for repetitive injections was satisfactory. Extraction using methanol, followed by purification with a florisil cartridge column, showed the recovery rate of 75~110% in textiles made of cotton. However, significant losses of APO and APO-d₁₂ were observed in recovery examination of textiles made of chemical fiber, especially polyester. When APO and APO-d₁₂ were added to the methanol extract solution of the polyester fiber product (Sample No.7), similar loss of them were observed. The result suggested that the losses were likely to be caused by contaminants in the methanol extract solution. APO was not detected in any of the eight commercial products tested.

Key words : tris(1-aziridinyl)phosphine oxide, organophosphate flame retardant, GC/MS, textile, household product

a Osaka Institute of Public Health

b National Institute of Health Sciences

c Teikyo Heisei University

大阪府における環境および食品中放射能調査 (平成 28 年度報告)

肥塚利江^a、大山正幸^a、木村明生^a

平成 28 年度の原子力規制庁委託により実施した大阪府における環境および各種食品中放射能調査結果を報告する。調査は、降水中の全ベータ放射能測定、環境試料（降下物、大気浮遊じん、上水、海水、土壌、海底土）および各種食品試料中のガンマ線放出核種分析および空間放射線量率（モニタリングポスト）について実施した。

また、平成 22 年度より行っている福島第 1 原子力発電所の事故を受けたモニタリングの強化を引き続き行った。さらに、平成 28 年 9 月 9 日に北朝鮮が 5 回目となる地下核実験を行ったことを受け、当日から 9 月 15 日まで原子力規制庁の指示によりモニタリングの強化を行った。

キーワード：環境放射能、全ベータ放射能、核種分析、空間放射線量率

当所（大阪府立公衆衛生研究所；現大阪健康安全基盤研究所）では、昭和 35 年（1960 年）度より大阪府における環境および食品中の放射能測定調査を実施している。この調査は、人工放射性降下物および原子力施設等からの放射性物質の漏洩による環境汚染の有無およびそのレベルを明らかにする目的で行っており、主として原子力規制庁の委託によるものである。

降水（雨水）については全ベータ放射能測定、その他の環境試料および食品試料についてはガンマ線核種分析〔セシウム 134 (¹³⁴Cs)、セシウム 137 (¹³⁷Cs)、ヨウ素 131 (¹³¹I)、カリウム 40 (⁴⁰K) 等〕を行った。

また、モニタリングポストに関しては平成 24 年度より、平成 23 年 3 月 11 日の東北地方太平洋沖地震により発生した福島第 1 原子力発電所の事故を受けて増設された 5 ヶ所（茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、泉佐野市）に既設の大阪市を加えた 6 ヶ所において調査を行っている。

ガンマ線核種分析に関しては、測定値の信頼性確保のため、(公財)日本分析センターとの間で、既知量の放射性核種を添加した試料 7 検体について、クロスチェック（標準試料法による相互比較分析）を行った。

さらに、福島第 1 原子力発電所の事故を受け、毎月第 2 週の水曜日にサーベイメータによる地上 1m の高さにおける空間放射線量率調査を行った。

また、平成 28 年 9 月 9 日に北朝鮮が地下核実験を行ったことによる大阪府内への影響の有無を調査するため、当日から 9 月 15 日までモニタリングの強化を行い、連日、降下物（定時降下物）および大気浮遊じんのガンマ線核種分析を行った。

本報告では、平成 28 年度に実施した上記の放射能調査結果を、過去の測定結果との比較も含め報告する。

a 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部 生活環境課

表 1 放射能調査項目および試料等

調査項目	試料名	種別	採取場所	採取回数等	件数
全ベータ放射能	定時降水	雨水	大阪市東成区 当所屋上	降雨毎	83
ガンマ線核種分析	大気浮遊じん		大阪市東成区 当所屋上	3ヶ月毎	4
	降下物	雨水・ちり	大阪市東成区 当所屋上	毎月	12
	上水	原水 蛇口水	守口市大庭町 大阪府庭窪浄水場 大阪市東成区 当所本館1F	年1回(平成28年6月) 年1回(平成28年6月)	1 1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(平成28年7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(平成28年7月)	1
	土壌	0~5cm 5~20cm	大阪市中央区 大阪城公園内 大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成28年7月) 年1回(平成28年7月)	1 1
	牛乳	原乳(生産地)	大阪府羽曳野市	年1回(平成28年8月)	1
	野菜	タマネギ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成28年7月)	1
		キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成28年12月)	1
	相互比較分析試料 (標準試料)	模擬牛乳 模擬土壌 寒天	(公財)日本分析センターで調製 (公財)日本分析センターで調製 (公財)日本分析センターで調製	年1回(平成28年8月) 年1回(平成28年8月) 年1回(平成28年8月)	1 1 5
	モニタリング強化 (北朝鮮核実験)	大気浮遊じん		大阪市東成区 当所屋上	平成28年9月9~15日
降下物		雨水・ちり	大阪市東成区 当所屋上	平成28年9月9~15日	6
空間線量率	モニタリングポスト		大阪市東成区 当所屋上	毎日/年間	365
			茨木市大住町 茨木保健所	毎日/年間	365
			寝屋川市八坂町 寝屋川保健所	毎日/年間	365
			東大阪市西岩田 東大阪市環境衛生検査センター	毎日/年間	365
			富田林市寿町 富田林保健所	毎日/年間	365
			泉佐野市羽倉崎 市立佐野中学校	毎日/年間	365
	モニタリング強化 (福島第1原発事故)	サーベイメータ		大阪市東成区 当所中庭	毎月

実験方法

試料の採取、処理および測定は、「環境放射能水準調査委託実施計画書(平成28年度)」¹⁾に基づいて行った。表1に調査項目および試料等を示す。

1. 全ベータ放射能測定

1-1 降水(雨水)試料

当所(大阪市東成区)観測室屋上(地上約20m)に設置したデポジットゲージ(表面積1000cm²)で雨水を集めた。毎朝9時30分に採取し、100mL(1mm)以上の降水があった場合には100mLを測定試料とした。

1-2 測定方法

蒸発皿に試料100mLとヨウ素担体(1mg I⁻/mL)1mL、0.1mol/L硝酸銀1mLおよび10%硝酸1mLを加えて加熱濃縮させた。濃縮物を直径25mmのステンレス製試料皿に移して蒸発乾固させ、測定用試料とした。測定は低バックグラウンド放射能自動測定装置(キャンベラ製、S5X2050E型)で行った。比較試料は、酸化ウラン(U₃O₈:日本アイソトープ協会製、35.3dps)を用いた。測定は試料採取から6時間後に行った。測定時間は、比較試料5分、降水試料30分とした。

2. 核種分析

2-1 測定試料

(1) 大気浮遊じん: 当所観測室屋上(地上約20m)に設置したハイボリウム・エアサンプラー(柴田科学株式会社製、HV-1000R)を用いて、ろ紙(東洋濾紙、HE-40T)上に大気浮遊じんを捕集した。毎月3回、午前10時から翌日の午前10時までの24時間捕集を行った。3ヶ月分のろ紙試料(測定に供した吸引量:約10000m³)をカッターで円形(直径50mm)に切り取り、ポリプロピレン製容器(U-8容器)に詰め測定用試料とした。

(2) 降下物(雨水・ちり): 当所観測室屋上(地上約20m)に設置した水盤(表面積5000cm²)に降下した雨水およびちりを1ヶ月間採取し、採取した試料全量を上水自動濃縮装置(柴田理化器械製)を用いて蒸発濃縮させた。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固させた後、残留物をU-8容器に移し測定用試料とした。

(3) 上水: 原水(淀川河川水)は大阪府庭窪浄水場(守口市)原水取水口から、蛇口水は当所本館1階の実験室内蛇口から採取した。採取試料各100Lを上水自動濃縮装置を用いて蒸発濃縮させた。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固させた後、残留物をそれぞれU-8容器に移し測定用試料とした(時期および測定数は表1を参照)。

(4) 食品：牛乳（原乳）は、2Lをマリネリビーカー（2L容）に入れ、測定用試料とした。野菜類（タマネギおよびキャベツ）は、食用部約4kgを65℃の乾燥器（Panasonic社製、MOV-212-PJ）で乾燥させた後に、石英製容器に移して電気マッフル炉（ADVANTEC社製、FUW263PA）で450℃、24時間灰化した。それぞれの灰試料は0.35mmメッシュのふるいに通し、U-8容器に移して測定用試料とした（試料採取場所、時期および測定数は表1を参照）。

(5) 海水、土壌、海底土：2Lの海水をマリネリビーカー（2L容）に入れ、測定用試料とした。土壌および海底土は、採取後に105℃の乾燥器で乾燥させた後、2mmメッシュのふるいを通して得られた乾燥細土約100gをU-8容器に入れ、測定用試料とした（試料採取場所、時期および測定数は表1を参照）。

(6) 標準試料法による相互比較分析：（公財）日本分析センターが数核種を添加して調製した放射能標準容積線源（寒天）（以下「寒天」という）および放射能標準容積線源（模擬土壌（アルミナ））（以下「模擬土壌」という）ならびに分析比較試料（模擬牛乳）（以下「模擬牛乳」という）について、寒天（U-8容器：5試料）および模擬土壌（U-8容器：1試料）はU-8容器のまま、模擬牛乳（1試料）は全量（2L）をマリネリビーカー（2L容）に入れ測定を行った。

測定結果については、（公財）日本分析センターにおいて基準値（添加値）と比較し評価を行った。評価は、当所（分析機関）の分析値と基準値の拡張不確かさ（ U ）から En 数を算出し、 $|En| \leq 1$ を基準値内（基準値と一致）とした。なお、 En 数は下記の式により求められる。

$$En \text{ 数} = \frac{(\text{分析値}_{\text{分析機関}} - \text{基準値})}{\sqrt{U^2_{\text{分析機関}} + U^2_{\text{基準値}}}}$$

2-2 測定方法

あらかじめエネルギーの異なる核種を含んだ標準線源を用いてエネルギー校正および検出効率校正を行ったゲルマニウム半導体検出器（キャンベラ製、GC2018）を用い、試料中の核種より放出されるガンマ線量を測定した。測定時間は原則80000秒とし、寒天のみ20000秒から

80000秒とした。得られた計測結果をバックグラウンド補正した後、エネルギー補正および検出効率補正を行ない、測定試料中の核種（ ^{134}Cs 、 ^{137}Cs 、 ^{131}I および ^{40}K 等）の定性定量分析を行った。

3. 空間放射線量率測定

モニタリングポスト（NaIシンチレーション式、エネルギー補償型、アロカ製MAR-22型）による空間放射線量率の測定は、当所観測室屋上に設置したモニタリングポスト（地上約20m）に、茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、泉佐野市に設置した5基（地上1m）を加えた6基で連続測定を行った（設置場所は表1を参照）。結果は1時間平均値による1日の変動をメモリーカードから読み取った。

なお、モニタリングポスト6基の測定結果は、自動測定・配信システムにより10分間の平均値が原子力規制委員会のホームページにリアルタイムで公表されている²⁾。

4. 福島第1原子力発電所の事故によるモニタリング強化

毎月第2週の水曜日の午前10時に当所中庭においてサーベイメータ（NaIシンチレーション式、アロカ製TCS-171B型）で空間放射線量率を測定した。測定は、「環境放射能水準調査委託実施計画書（平成20年7月）」³⁾に準じて行った。測定器の時定数を30秒とし、地表1mの高さにおけるサーベイメータの指示値を30秒間隔で5回以上読み取り、平均値を算出した。但し、原子力規制庁の指示により上記計画書で加えることとなっている宇宙線による線量率30nGy/hは、加えていない。

5. 北朝鮮核実験によるモニタリング強化

平成28年9月9日に北朝鮮が地下核実験を行ったことを受け、原子力規制庁から「国外における原子力関係事象発生時の対応について」の協力依頼があり、当日から9月15日までモニタリングの強化を行い、連日、降下物（定時降下物）および大気浮遊じんのガンマ線核種分析を行った。

5-1 測定試料

(1)降下物（定時降下物）

前日 15 時から当日 15 時までの 24 時間に降水用デポジットゲージ（表面積 1000 cm²）で採取された降水、降水がなければ 160 mL の精製水でデポジットゲージについたちりを洗い流して採取し、80mL を U-8 容器に入れ、測定試料とした。

(2) 大気浮遊じん

上記の大気浮遊じんと同様の方法[2-1(1)参照]で前日 9 時から当日 9 時までの 24 時間捕集を行った。1 日分のろ紙試料を円形（50mm φ）に切り取り、U-8 容器に詰め、測定試料とした。

5-2 測定方法

2-2 と同様の方法でガンマ線核種分析を行った。測定時間は 20000 秒とした。降下物データは翌日 10 時までに、大気浮遊じんデータは当日 17 時までに原子力規制庁へ報告した。

結果および考察

1. 全ベータ放射能

表 2 に降水中の全ベータ放射能測定値を示す。

降水中の全ベータ放射能は、83 試料中 22 例から検出されたが、異常値は検出されなかった。

表2 降水中全ベータ放射能測定結果

年 月	降水量 mm	件数 (検出数)	濃度 Bq/L	月間降下量 MBq/km ²
平成28年 4月	118	8 (3)	ND~0.52	12.89
平成28年 5月	130	8 (2)	ND~0.37	4.61
平成28年 6月	285	12 (2)	ND~0.60	3.81
平成28年 7月	59	7 (0)	ND	ND
平成28年 8月	162	5 (3)	ND~0.62	10.61
平成28年 9月	174	8 (1)	ND~0.46	8.12
平成28年 10月	43	9 (3)	ND~0.62	4.59
平成28年 11月	70	7 (1)	ND~0.44	4.31
平成28年 12月	105	6 (2)	ND~0.37	4.68
平成29年 1月	35	3 (2)	ND~0.41	5.30
平成29年 2月	45	6 (1)	ND~0.68	3.64
平成29年 3月	31	4 (2)	ND~0.75	5.38
平成28年度 ¹⁾	1257	83 (22)	ND~0.75	67.9
過去3年間の値				
平成25年度	1424	82 (8)	ND~0.9	13.1
平成26年度	1270	85 (20)	ND~1.1	41.0
平成27年度 ²⁾	1584	95 (8)	ND~1.27	10.3

ND:計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

1):北朝鮮核実験に伴うモニタリング強化のため、平成28年9月10日~16日まで休止。

2):北朝鮮核実験に伴うモニタリング強化のため、平成28年1月7日~14日まで休止。

2. 核種分析

環境試料および食品試料中の¹³⁴Cs、¹³⁷Cs、¹³¹I および⁴⁰Kの分析結果を表3に示す。

(1) ¹³⁴Cs および ¹³⁷Cs : 今年度も例年同様、¹³⁷Cs が土壌、海底土の各試料から検出されたが、そのレベルは過去の値と同程度であった。¹³⁴Cs は、どの試料からも検出されなかった。

(2) ¹³¹I : ¹³¹I は、上水原水試料から微量 (0.65 mBq/L) 検出された。他の環境試料および食品試料からは検出されなかった。上水中の¹³¹Iについては、原水が平成元年度から、上水が平成2年度から検出されており、そのレベルも過去の値 (0.4~4.9 mBq/L)⁴⁾と同程度であることや他の環境試料等から検出されていないこと、半減期が8日と短いことなどから、既報⁵⁾に述べたように、その起源は医学利用によるものであらうと推定される。

上水中に存在する¹³¹Iによる府民への健康影響については、既報⁵⁾でも論じたように、そのレベルは飲食物摂取制限の基準⁶⁾(飲料水中の放射性ヨウ素:300Bq/kg)の30万分の1程度の低値であり、問題はないと考えられる。

(3) ⁴⁰K : 天然放射性核種である⁴⁰K レベルは過去の値と同程度であり、特に異常値は認められなかった。

(4) 標準試料法による相互比較分析:(公財)日本分析センターの報告書によると、当所の分析結果は基準値(添加値)とよく一致しており、かつ、En 数も「1」以下であり、ガンマ線核種分析の精度は確保されている事が認められた。

表3 環境および食品試料中の¹³⁴Cs、¹³⁷Cs、¹³¹Iおよび⁴⁰K濃度

試料	採取年月日	単位	¹³⁴ Cs	¹³⁷ Cs	¹³¹ I	⁴⁰ K
大気浮遊じん						
平成28年 4月～6月	H28.4.5 ～H28.6.15	mBq/m ³	ND	ND	ND	0.21±0.039
7月～9月	H28.7.5 ～H28.9.27	〃	ND	ND	ND	0.16±0.038
10月～12月	H28.10.6 ～H28.12.16	〃	ND	ND	ND	0.17±0.037
平成29年 1月～3月	H29.1.5 ～H29.3.14	〃	ND	ND	ND	0.14±0.036
平成28年度		mBq/m ³	ND	ND	ND	0.14～0.21
過去3年間の値		mBq/m ³	ND	ND	ND	0.18～0.37
降下物						
平成28年 4月	H28.3.31 ～H28.5.2	MBq/km ²	ND	ND	ND	0.99±0.20
5月	H28.5.2 ～H28.6.2	〃	ND	ND	ND	0.61±0.17
6月	H28.6.2 ～H28.7.1	〃	ND	ND	ND	ND
7月	H28.7.1 ～H28.8.1	〃	ND	ND	ND	ND
8月	H28.8.1 ～H28.9.1	〃	ND	ND	ND	0.56±0.18
9月	H28.9.1 ～H28.9.30	〃	ND	ND	ND	ND
10月	H28.9.30 ～H28.10.31	〃	ND	ND	ND	1.1±0.19
11月	H28.10.31 ～H28.12.1	〃	ND	ND	ND	ND
12月	H28.12.1 ～H29.1.4	〃	ND	ND	ND	ND
平成29年 1月	H29.1.4 ～H29.1.31	〃	ND	ND	ND	ND
2月	H29.1.31 ～H29.2.28	〃	ND	ND	ND	ND
3月	H29.2.28 ～H29.3.31	〃	ND	ND	ND	1.1±0.19
平成28年度		MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.1
過去3年間の値		MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.1
上水・原水	H28.6.3	mBq/L	ND	ND	0.65±0.083	83±2.6
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	1.0～3.8	64～96
上水・蛇口水	H28.6.10	mBq/L	ND	ND	ND	90±2.7
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	0.63～1.4	71～81
海水	H28.7.12	Bq/L	ND	ND	ND	2.9±0.32
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	4.7～6.8
海底土	H28.7.12	Bq/kg dry	ND	2.0±0.26	ND	670±12
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	1.3～2.6	ND	630～670
土壌 0～5cm層	H28.7.29	Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	1.9±0.21 (90±10)	ND (ND)	690±11 (33000±510)
過去3年間の値		Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	1.9～2.0 (85～96)	ND (ND)	650～730 (28000～35000)
土壌 5～20cm層	H28.7.29	Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	2.8±0.27 (380±37)	ND (ND)	680±10 (91000±1400)
過去3年間の値		Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	3.4～3.9 (500～580)	ND (ND)	670～680 (100000～100000)
牛乳 原乳	H28.8.24	Bq/L	ND	ND	ND	52±0.97
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	48～49
農産物 タマネギ	H28.7.4	Bq/kg生	ND	ND	ND	46±0.31
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	42～46
農産物 キャベツ	H28.12.9	Bq/kg生	ND	ND	ND	58±0.37
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	66～95

ND:計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

表4-1 モニタリングポストによる空間放射線量率
(大阪市 府立公衆衛生研究所：地上20m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：大阪市)		
		最高値	最低値	平均値
平成28年 4月	30	53	40	42
5月	31	50	40	41
6月	30	61	40	42
7月	31	49	39	41
8月	31	56	40	41
9月	30	61	40	41
10月	31	53	40	41
11月	30	50	41	42
12月	31	82	40	42
平成29年 1月	31	55	40	42
2月	28	54	40	42
3月	31	51	41	42
平成28年度	365	82	39	42
過去3年間の値				
平成25年度	365	63	41	43
平成26年度	365	62	40	42
平成27年度	366	65	40	42

表4-2 モニタリングポストによる空間放射線量率
(茨木市 茨木保健所：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：茨木市)		
		最高値	最低値	平均値
平成28年 4月	30	75	53	56
5月	31	71	53	56
6月	30	88	52	56
7月	31	72	52	55
8月	31	81	53	57
9月	30	72	53	55
10月	31	75	53	56
11月	30	68	54	57
12月	31	92	53	56
平成29年 1月	31	67	53	55
2月	28	75	53	55
3月	31	71	53	56
平成28年度	365	92	52	56
過去3年間の値				
平成25年度	365	88	53	57
平成26年度	365	92	53	57
平成27年度	366	91	51	56

表4-3 モニタリングポストによる空間放射線量率
(寝屋川市 寝屋川保健所：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：寝屋川市)		
		最高値	最低値	平均値
平成28年 4月	30	90	70	72
5月	31	85	70	72
6月	30	96	70	72
7月	31	89	70	71
8月	31	97	70	72
9月	30	89	70	71
10月	31	87	70	72
11月	30	84	70	72
12月	31	117	70	72
平成29年 1月	31	81	70	72
2月	28	87	69	71
3月	31	85	69	71
平成28年度	365	117	69	72
過去3年間の値				
平成25年度	365	92	70	72
平成26年度	365	103	70	72
平成27年度	366	111	70	72

表4-4 モニタリングポストによる空間放射線量率
(東大阪市 東大阪市環境衛生検査センター：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：東大阪市)		
		最高値	最低値	平均値
平成28年 4月	30	98	75	78
5月	31	89	75	78
6月	30	107	75	78
7月	31	91	74	77
8月	31	99	76	79
9月	30	98	75	77
10月	31	110	75	78
11月	30	90	76	79
12月	31	124	76	78
平成29年 1月	31	97	76	77
2月	28	98	75	77
3月	31	94	76	78
平成28年度	365	124	74	78
過去3年間の値				
平成25年度	365	112	75	79
平成26年度	365	103	75	78
平成27年度	366	113	74	78

表4-5 モニタリングポストによる空間放射線量率
(富田林市 富田林保健所：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：富田林市)		
		最高値	最低値	平均値
平成28年 4月	30	75	61	63
5月	31	75	61	63
6月	30	81	61	63
7月	31	70	61	62
8月	31	84	61	63
9月	30	79	61	62
10月	31	82	61	62
11月	30	75	61	63
12月	31	97	61	63
平成29年 1月	31	82	61	62
2月	28	87	61	63
3月	31	76	61	63
平成28年度	365	97	61	63
過去3年間の値				
平成25年度	365	82	60	63
平成26年度	365	87	61	63
平成27年度	366	86	60	63

表4-6 モニタリングポストによる空間放射線量率
(泉佐野市 佐野中学校：地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：泉佐野市)		
		最高値	最低値	平均値
平成28年 4月	30	64	49	51
5月	31	74	49	51
6月	30	74	48	51
7月	31	62	49	51
8月	31	65	50	52
9月	30	88	48	51
10月	31	73	49	51
11月	30	71	49	52
12月	31	133	50	52
平成29年 1月	31	73	49	51
2月	28	74	49	51
3月	31	68	50	52
平成28年度	365	133	48	51
過去3年間の値				
平成25年度	365	77	48	51
平成26年度	365	105	48	51
平成27年度	366	85	48	51

3. 空間放射線量率

モニタリングポストによる空間放射線量率調査結果（1時間平均値に基づく変動範囲を1月毎にまとめたもの）を表4-1から表4-6に示す。

大阪府内6ヶ所のモニタリングポスト全てで12月に最高値を示したが、それ以外は、全て、過去3年間の値の範囲内であった。

12月の最高値は、全ての地点で12月27日に観測されており、茨木市を除く5ヶ所で過去の値をやや上回っていたため、その原因について検討を行った。

最高値を観測した12月27日における各地点の空間放射線量率（10分値）の時系列変化を図1に示す。各地点とも早朝より徐々に上昇し、9時から11時すぎまでの間に最高値を記録した

後、下降し、17時ごろから19時頃までの間に再びやや上昇していた。

図2に大阪市（当所）における12月27日の空間放射線量（10分値）の時系列変化とその近傍にある大阪管区気象台における降雨状況（10分値）⁷⁾を示す。空間放射線量率の上昇は降雨時に起こり、雨がやむとすみやかに下降していた。また、図3にピーク時として9:30～9:40（線量率：87nGy/h、平常時として14:50～15:00（線量率：42nGy/h）の10分間のエネルギー分布を示した。ピーク時では、平常時に比べて、ラドン（Rn-222）の娘核種であるPb-214およびBi-214の上昇が見られたが、人工放射性核種の上昇は認められなかった。他の5ヶ所のピーク時のエネルギー分布も同様であった。

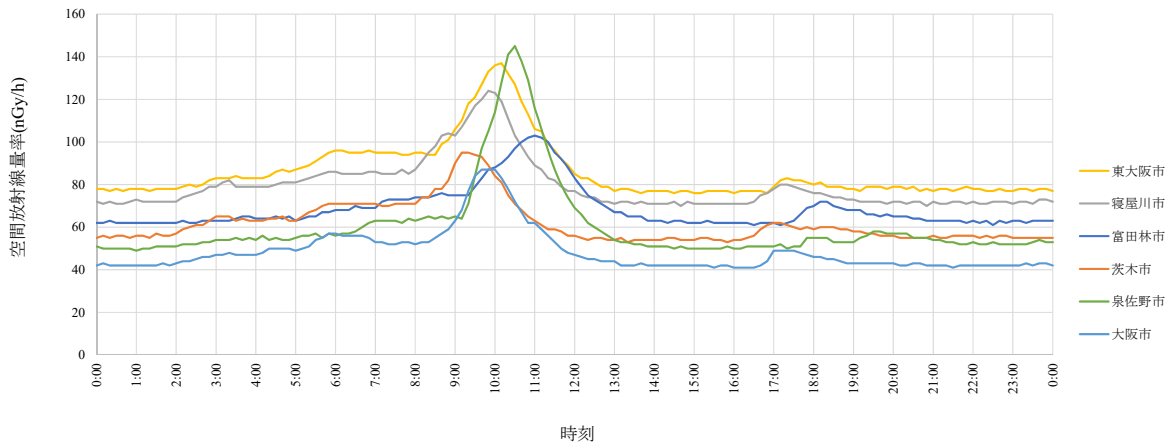


図1 平成28年12月27日の空間放射線量率（10分値）の時系列変化

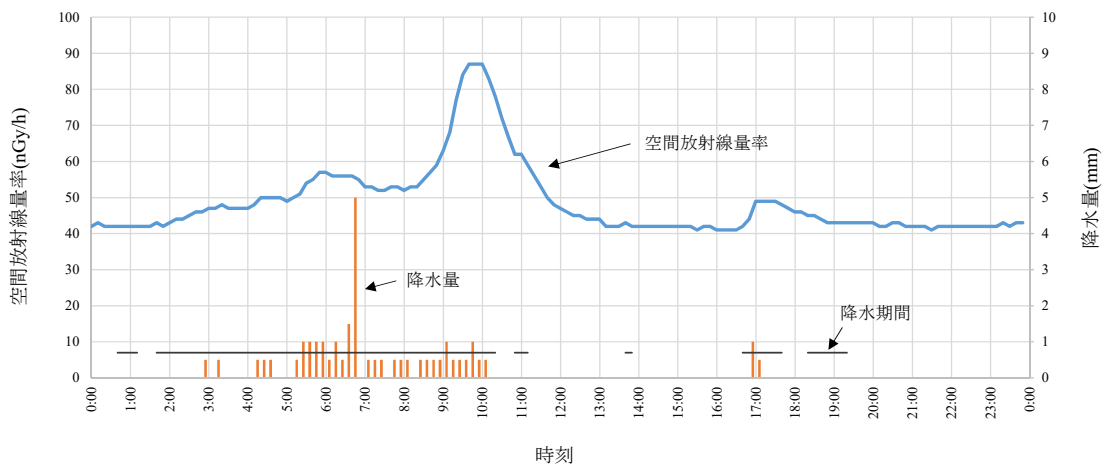


図2 平成28年12月27日の大阪市における空間放射線量率及び降水状況の時系列変化（10分値）

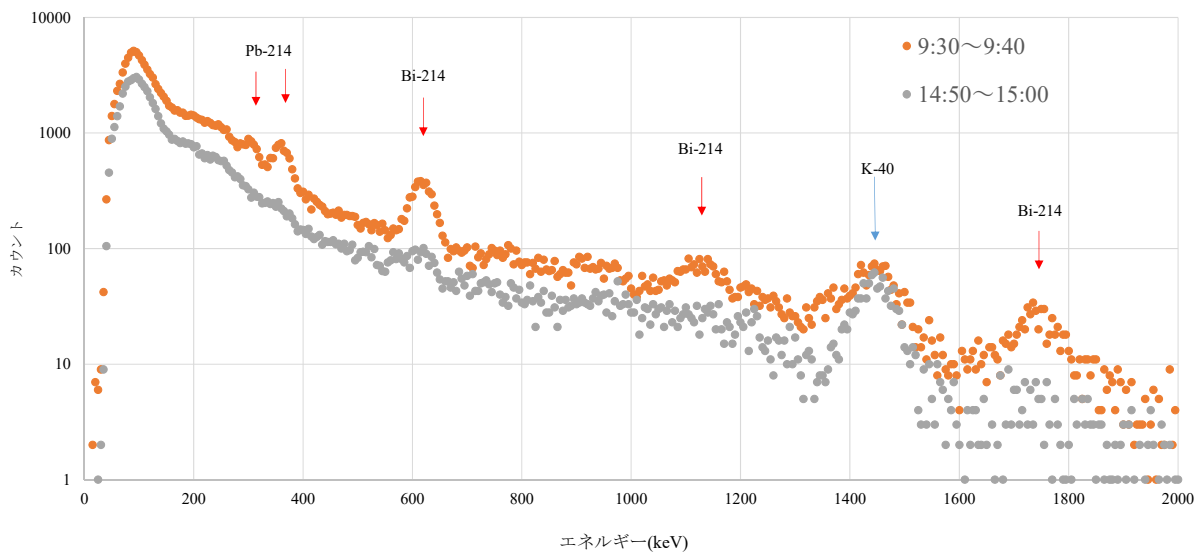


図3 大阪市におけるピーク時(9:30~9:40)および通常時(14:50~15:00)の γ 線スペクトル
(平成28年12月27日)

この日は、大阪府全域において同様な降雨状況であったりこと、また、他の5ヶ所のピーク時におけるスペクトルも大阪市のものと同様にPb-214(半減期:19.7分)およびBi-214(半減期:26.8分)とみられるピークが認められたこと、雨がやむとすみやかに下降していたことから、12月27日の空間放射線量率の上昇は、降雨による大気中の半減期の短いラドン娘核種の降下が原因と推定できた。

表5 サーベイメータによる空間放射線量率
(地上1m、当所中庭)

測定年月	サーベイメータ (nGy/h)			
	測定回数	測定値		
平成28年	4月	1	73	
	5月	1	72	
	6月	1	76	
	7月	1	74	
	8月	1	82	
	9月	1	83	
	10月	1	71	
	11月	1	75	
	12月	1	74	
	平成29年	1月	1	80
		2月	1	75
		3月	1	75
平成28年度	12	71~83(平均:76)		
過去3年間の値				
平成25年度	12	74~88(平均:78)		
平成26年度	12	66~80(平均:75)		
平成27年度	12	63~81(平均:74)		

4. 福島第1原子力発電所の事故によるモニタリング強化

当所中庭で行った測定の結果を表5に示す。

当所中庭での値は、測定期間中71~83 nGy/hの範囲であり、過去3年間の値や同じ場所で測定していた過去の値(平成8年度~20年度:77~108 nGy/h)から見て平常値の範囲内であった。

5. 北朝鮮核実験によるモニタリング強化

ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析の結果、モニタリングの強化期間中、降下物(定時降下物)および大気浮遊じんから人工放射性核種は検出されなかった。

まとめ

核種分析により人工放射性核種である ^{131}I および ^{137}Cs が検出された。医学利用等に由来すると考えられる ^{131}I は上水(原水および蛇口水)に極低レベルで検出された。 ^{137}Cs は土壌や海底土から例年と同様に検出されたが、そのレベルは低値であった。また、他の人工放射性核種はいずれの試料からも検出されなかった。また、空間放射線量率値では、12月27日に6ヶ所中5ヶ所のモニタリングポストの値に過去3年間の最高値より高い値が認められたが、降雨による

大気中の半減期の短いラドン娘核種の降下が原因と推定できた。その他は、過去3年間の値の範囲内であった。また、サーベイメータによる空間放射線量率調査も過去3年間の値の範囲内であった。

また、北朝鮮核実験時のモニタリング強化で実施された、ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析調査の結果でも異常値は認められず、大阪府内への影響は認められなかった。

謝 辞

本調査の遂行にあたり、調査試料の採取にご協力いただきました大阪城パークセンター、熊取町役場、大阪府環境農林水産総合研究所、大阪広域水道企業団庭窪浄水場の各機関に感謝致します。また、調査実施にあたり、ご指導をいただきました原子力規制庁監視情報課放射線環境対策室、日本分析センターの皆様に謝意を表します。

注：本報告は、電源開発促進対策特別会計法に基づく原子力規制庁からの受託事業として、大阪府立公衆衛生研究所（現大阪健康安全基盤研究所）が実施した平成28年度「環境放射能水準調査」の成果です。

文 献

- 1) 原子力規制庁 監視情報課放射線環境対策室. 環境放射能水準調査委託実施計画書. 平成28年度.
- 2) 原子力規制委員会. 放射線モニタリング情報 全国及び福島県の空間線量測定結果.
<http://radioactivity.nsr.go.jp/map/ja/index.html>
WEBサイトの内容は2017年7月3日に確認した
- 3) 文部科学省科学技術・学術政策局原子力安全課防災環境対策室. 環境放射能水準調査委託実施計画書. 平成20年7月.
- 4) 肥塚利江, 東恵美子, 足立伸一: 大阪府における環境および食品中放射能調査 (平成25年度報告). *大阪府立公衛研所報* 2014; **52**: 67-74.
- 5) 田村幸子, 渡辺功, 布浦雅子. 大阪府における環境および食品中放射能調査 一平成元年4

月～平成2年3月一. *大阪府立公衛研所報 公衆衛生編* 1990; **28**: 165-170.

- 6) 原子力規制委員会. 原子力災害対策指針 (平成24年10月31日, 平成27年8月26日改正, 平成28年3月1日部分改正)

- 7) 気象庁. 過去の気象データ検索.

<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>

WEBサイトの内容は2017年7月10日に確認した

**Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture
(Fiscal 2016 Report)**

Toshie HIZUKA ^a, Masayuki Ohyama ^a, Akio Kimura ^a

We investigated the radioactivity of environment and foods in Osaka prefecture by commission from Nuclear Regulatory Agency in 2016 program year. The gross beta radioactivity in precipitation and the gamma ray radiation nuclide of various food samples and environmental samples such as radioactive fallout, airborne dust, tap water, sea water, soil, and seabed soil, were measured. And the air radiation dose rates at several sites in Osaka prefecture were monitored.

We have continued additional monitoring after the accident at Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in 2011. Furthermore, as North Korea conducted the fifth underground nuclear test, the additional monitoring was conducted from 9th September 2016 to 15th September 2016, according to the instructions of the Nuclear Regulatory Agency.

Key words: environmental radioactivity, gross β activity, radionuclide analysis, environmental γ activity

a Osaka Institute of Public Health

Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retail lightly pickled vegetables and its successful control at processing plants

M. TAGUCHI^a, M. KANKI^a, Y. YAMAGUCHI^b,
H. INAMURA^b, Y. KOGANEI^c, T. SANO^d,
H. NAKAMURA^e and H. ASAKURA^f

J. Food Prot., 80(3), 467-475 (2017)

市販の野菜浅漬製品の細菌汚染実態把握を目的として、55施設で製造された浅漬100検体について、衛生指標菌（一般細菌、大腸菌群、β-グルクロニダーゼ産生大腸菌）の定量試験、ならびに生鮮野菜に関連する主要食中毒菌と位置づけられる腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネス(Lm)の汚染実態を調査した。全ての検体から腸管出血性大腸菌およびサルモネラは検出されなかったが、5施設で製造された12検体からLmが検出された。

そこで陽性検体製造の2施設の協力を得て製造環境の改善に向けた調査を行った。ふき取り等の調査によりLm汚染箇所が判明し、さらに分離株の遺伝子型別により施設内で本菌による持続汚染を示す知見も得られた。複数回の調査結果、両施設ともに衛生対策が改善され、製品のLm陰性化が実現した。浅漬製造施設では、製品にLmが混入する可能性のある場所の管理状態を評価するための、モニタリングプログラムの設計が重要であると考えられた。

フルオロキノロン低感受性 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A による家族内感染事例

酒井朱厘^a, 澤田加奈^a, 田口眞澄^b

日臨微誌, 27(2), 16-24 (2017)

2012年2月、2歳の男児（第一子）がインフルエンザ感染後の発熱持続を主訴に医療機関を受診し、血液培養から *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A（パラチフスA菌）が検出された。父親・母親・第二子の3名の接触者検便でインド渡航歴があった父親からパラチフスA菌が分離された。2ヶ月後の4月、祖父が発熱・下痢・血便を呈し、糞便培養からパラチフスA菌が検出された。3名由来株について各種疫学マーカー解析を行ったところ、すべて同一であり、家族内感染事例と考えられた。本事例の分離株は全て南アジアで多いと報告されているフルオロキノロン低感受性菌であり、適切な治療を行うためにも今後の世界的な薬剤耐性菌出現動向を注視するとともに、チフス性疾患患者が受診した場合は本事例のような家族内感染を想定した検査や除菌治療、さらなる伝播の防止に努める必要がある。

a 大阪府立公衆衛生研究所

b 大阪府泉佐野保健所

c 大阪府岸和田保健所

d 滋賀県健康医療福祉部生活衛生課

e 大阪市立環境科学研究所

f 国立医薬品食品衛生研究所

市販野菜浅漬のリステリア・モノサイトゲネス汚染と製造施設の安全性確保の取り組み

a 箕面市立病院

b 大阪府立公衆衛生研究所

Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the *Clostridium perfringens* enterotoxin-encoding genes *cpe* and *becAB*

S. YONOGI^{a,d}, M. KANKI^a, T. OHNISHI^b,
M. SHIONO^c, T. IIDA^d, Y. KUMEDA^a

Journal of Microbiological Methods, 127, 172–175
(2016)

エンテロトキシン (CPE: *Clostridium perfringens* Enterotoxin) を産生するウエルシュ菌は汚染された食品を喫食することで下痢症を起こす食中毒の原因菌の一つである。近年、我々は CPE 非産生性ウエルシュ菌による食中毒事例から新規のエンテロトキシン BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) を同定した。このことからウエルシュ菌食中毒が発生した際には CPE に加えて BEC に対する検査が必要となった。本研究では *cpe* 遺伝子と *becAB* 遺伝子および *plc* 遺伝子 (全てのウエルシュ菌が保有する遺伝子) に対するマルチプレックス PCR 法による同時検出系を構築した。

構築した系を用いてヒトの糞便およびウシの直腸スワブを検体として、エンテロトキシン遺伝子を保有するウエルシュ菌の汚染実態を調査した。分離されたすべてのウエルシュ菌 169 株のうち *becAB* 遺伝子保有株はとて少なく (0.59%)、*cpe* 遺伝子保有株の 10 分の 1 であった。本法は簡便かつ十分な感度と高い特異性を有しており、*becAB* 遺伝子保有ウエルシュ菌の分布調査に広く使用できる。

Crystal structure of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*

K. KAWAHARA^a, S. YONOGI^{b,c},
R. MUNETOMO^a, H. OKI^a, T. YOSHIDA^a,
Y. KUMEDA^b, S. MATSUDA^c, T. KODAMA^c,
T. OHKUBO^a, T. IIDA^c, S. NAKAMURA^c

Biochemical and Biophysical Research
Communications, 480, 261-267 (2016)

当所において同定したウエルシュ菌が産生する新規エンテロトキシン BEC (Binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*) は BECa と BECb で構成される。これまでに BECa は NADase 活性とアクチンに対する ADP リボシル化活性を示すことがわかっているが、BEC の培養細胞に対する毒性発現機序の詳細は不明である。本研究において我々は BECa のアポ体および NADH との複合体の結晶構造を初めて決定した。BECa は他の ADP リボシル化 2 成分毒素ファミリーと全体構造が類似しており、特に基質認識部位が非常によく類似していた。さらに、我々は BECa が NADH に作用する詳細な像を捉え、酵素活性にとって重要である ADP-ribosylating turn-turn (ARTT) loop の立体構造の変化と基質結合領域の近傍で水分子を確認した。

a 大阪府立公衆衛生研究所

b 国立医薬品食品衛生研究所

c 松原食肉衛生検査所

d 大阪大学微生物病研究所

ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子 (*cpe* および *becAB*) を同時に検出するマルチプレックス PCR 法の構築とその応用

a 大阪大学大学院薬学研究科

b 大阪府立公衆衛生研究所

c 大阪大学微生物病研究所

ウエルシュ菌新型エンテロトキシン BEC、BECa の結晶構造

Enterococcus saigonensis sp. nov., isolated from
retail chicken meat and liver

T. HARADA^a, V. C. DANG^b, D. P. NGUYEN^b, T.
A. D. NGUYEN^b, M. SAKAMOTO^c, M.
OHKUMA^c, D. MOTOOKA^d, S. NAKAMURA^d,
K. UCHIDA^a, M. JINNAI^a, S. YONOGI^a, R.
KAWAHARA^a, M. KANKI^a, T. KAWAI^a, Y.
KUMEDA^a and Y. YAMAMOTO^a

International Journal of Systematic and Evolutionary
Microbiology, 66, 3779-3785 (2016)

ベトナムホーチミン市で市販された鶏肉および鶏肝臓肉より分離された *Enterococcus* 属菌について、16S rRNA 遺伝子、ATP 合成酵素 α サブユニット遺伝子、RNA ポリメラーゼ α サブユニット遺伝子およびフェニルアラニル tRNA 合成酵素 α サブユニット遺伝子の塩基配列解析、近縁種との DNA-DNA ハイブリダイゼーション、GC 含量測定ならびに菌体脂肪酸組成分析を実施した。さらに、市販キットおよび conventional な方法による生化学的性状解析を行った。これらの結果から、分離株は新種の *Enterococcus* 属菌であることが明らかとなり、*Enterococcus saigonensis* と命名した。

Monthly Distribution of Norovirus and Sapovirus
in Viral Gastroenteritis in Thailand.

Pongsuwanna Y^a, Tacharoenmuang R^b, Prapanpoj
M^b, Sakon N^c, Komoto S^d, Guntapong R^b,
Taniguchi K.^{d*}

Jpn J Infect Dis., 70, 84-86 (2017)

タイ王国におけるウイルス性胃腸炎から検出されたノロウイルスおよびサポウイルスの月別検出状況について。

2006 年から 2008 年の間にタイ王国の 4 つの地域にある病原体定点病院から収集したロタウイルス陰性の 1,141 検体について RT-PCR 法を用いてノロウイルスおよびサポウイルスの検出を行った。

ノロウイルスは 303 検体 (26.6%) で陽性となり、GI は 34、GII が 269 であった。サポウイルスは 12 検体 (1.1%) から検出された。ノロウイルス GI は 6 月と 7 月を中心に検出されたが、ノロウイルス GII は 9 月から 2 月にかけて検出されていた。ランダムに抽出した検体におけるノロウイルス GII の主要遺伝子型は GII.4 であり、中学校で発生した 2 件の集団胃腸炎からは GII.4 と GII.6 がそれぞれ検出された。

a 大阪府立公衆衛生研究所

b ホーチミン公衆衛生医療院

c 国立研究開発法人理化学研究所

d 大阪大学微生物病研究所

鶏肉および鶏肝臓肉から分離された新種
Enterococcus saigonensis

a タイ国立衛生研究所 主任医学官

b タイ国立衛生研究所 医療科学部

c 大阪府立公衆衛生研究所

d 藤田保健衛生大学

タイ王国におけるウイルス性胃腸炎から検出された
ノロウイルスおよびサポウイルスの月別検出状況

Genetic analysis of human rotavirus C: The appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries.

Doan YH^a, Haga K^a, Fujimoto A^a, Fujii Y^a, Takai-Todaka R^a, Oka T^a, Kimura H^b, Yoshizumi S^c, Shigemoto N^d, Okamoto-Nakagawa R^e, Shirabe K^e, Shinomiya H^f, Sakon N^g, Katayama K^a.

Infect Genet Evol., 41, 160-173 (2016)

ロタウイルス C は人や動物などに広く存在し、胃腸炎を引き起こす。ロタウイルスは 11 本の分節型二本鎖 RNA をもつ。これまでに全ゲノム解析が実施されたのは 18 株しか全存在しない。そこで、本調査では 2005 年から 2012 年に日本で検出された 8 株のロタウイルス C の全ゲノムを決定し解析に用いた。系統樹解析により人から検出されるロタウイルス C は動物由来株とは明確に分岐することが明らかとなった。ヒト由来ロタウイルス C は 3 つの lineage に分かれ、それぞれの地域性を示しながら共循環していることがわかった。その中で、インドーバングラデシュ株に属するタイプのウイルスが 2012 年大阪で検出された。このことは、ロタウイルス C の拡大が地域性を超えて発展していく状況を示している。

Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II.

Kobayashi M^a, Matsushima Y^b, Motoya T^c, Sakon N^d, Shigemoto N^e, Okamoto-Nakagawa R^f, Nishimura K^g, Yamashita Y^h, Kuroda Mⁱ, Saruki N^a, Ryo A^{lj}, Saraya T^k, Morita Y^l, Shirabe K^f, Ishikawa M^b, Takahashi T^m, Shinomiya H^h, Okabe N^b, Nagasawa Kⁿ, Suzuki Y^o, Katayama K^p, Kimura H^q.

Sci Rep., 6, 29400 (2016)

ノロウイルスゲノムグループ II (GII) のキャプシドタンパク質は、宿主感染において重要な役割を果たす。ノロウイルスのいくつかの遺伝子型についてキャプシド遺伝子の進化に関する研究が行われているが、ノロウイルス GI 2 の分子進化は十分に理解されていない。ここでは、様々なパイオインフォマティクス技術を用いて、すべての GI 2 遺伝子型の分子進化解析を実施した。時間スケールの系統樹は、現在の GI 2 株が GIV から 1630CE 付近で高い進化率(約 10⁻³)の置換/部位/年)で分岐し、3 系統を生じることが示した。約 400 年間にわたって、現在の GI 2 株の有効な集団サイズは大きい (> 10⁴)。陽性 (20) および陰性 (450 以上) 選択部位を推定した。さらに、いくつかの線状および高次構造の B 細胞エピトープが、推測された GI 2 キャプシドタンパク質において見出された。これらの結果は、ノロウイルス GI 2 株がヒトへの高い拡散および適応で急速に進化したことを示唆した。

a 国立感染症研究所 ウイルス第 2 部
b 国立感染症研究所 感染症疫学センター
c 北海道立衛生研究所
d 広島県立総合技術研究所保健環境センター
e 山口県環境保健センター
f 愛媛県立衛生環境研究所
g 大阪府立公衆衛生研究所
ヒトロタウイルス C の遺伝子解析 極東アジアにおけるインドーバングラデシュ株の出現

a 群馬県衛生環境研究所 b 川崎市環境安全研究所
c 茨城県衛生研究所 d 大阪府立公衆衛生研究所
e 広島県立総合技術研究所保健環境センター
f 山口県環境保健センター g 熊本県保健環境科学研究所
h 愛媛県立衛生環境研究所 i 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター j 横浜市立大学医学部
k 杏林大学医学部 l 東京家政大学栄養学科 m 岩手県食肉衛生検査所 n 国立感染症研究所感染症疫学センター
o 名古屋市立大学 p 国立感染症研究所ウイルス第二部
ヒトノロウイルス GI 2 のキャプシド領域の進化系統解析

ノロウイルスの流行と遺伝子型 (総説)

左近直美^a、駒野淳^b

日本食品日生物学会誌. 33, 97-106 (2016)

ノロウイルスは 1968 年に発見されたウイルス性下痢症の主要原因であり、世界的に流行している。疫学情報の積み重ねにより、ノロウイルスはヒトの全年齢層に感染すること、再感染があることなど明らかになってきた。そこで、以下の項目についてノロウイルス感染の総説を述べた。

1. ノロウイルス感染：感染、不顕性感染、免疫
2. ノロウイルスの流行と遺伝子型：世界的流行株、長期観察、GIL17 の出現
3. 感染経路：複製サイクル、食中毒、食品衛生管理
4. 社会的インパクトと対策：ワクチン開発、高齢者施設等に於ける対応、食品関係者における対応、迅速診断

2015 年から検出が続いている G 型ムンプスウイルスの分子系統解析—大阪府

K. NAKATA^a, H. NISHIMURA^b, T.

YUMISASHI^a, Y. KUMEDA^c, M. KIDOKORO^d.

病原微生物情報 (IASR) , 37, 189-191 (2016).

大阪府では全国的な傾向と同様に 2015 年の夏季より流行性耳下腺炎の患者数の増加傾向が認められ、2016 年第 30 週まで増加が続いた。流行曲線では 2016 年第 30 週をピークとした 2 年にわたる一つの大きな流行であるように見える。しかし、検出されたムンプスウイルスの分子系統解析を実施した結果、流行時期により検出される遺伝子系統が変化していることが明らかになった。最流行期には検出されたウイルス遺伝子の系統が多様に変化したことが明らかになった。これは、夏季休暇中に旅行等で感染者が移動することで、流行している他地域から異なる系統のウイルスが持ち込まれたためと推察された。大都市圏では人の往来が活発なため、地域へのウイルス流入や流出が起こる確率が高い。流行を監視する観点からもウイルス遺伝子の詳細な分子系統解析が重要であると考えられた。

a 大阪府立公衆衛生研究所

b 名古屋医療センター 統括診療部

The circulatory dynamism of norovirus and impact to immunity

a 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

b 大阪府立公衆衛生研究所総務部企画調整課

c 大阪府立公衆衛生研究所感染症部

d 国立感染症研究所ウイルス第三部第三室

Phylogenetic analysis of the genotype G mumps virus detected in Osaka Prefecture since 2015.

First report of human parechovirus type 3 infection
in a pregnant woman

M. SHINOMOTO ^a, T. KAWASAKI ^a, T.
SUGAHARA ^a, K. NAKATA ^b, T. KOTANI ^a, H.
YOSHITAKE ^a, K. YUASA ^a, M. SAEKI ^a and Y.
FUJIWARA ^a.

Int Jnt J Infect Dis, 59, 22-24 (2017)

ヒトパレコウイルス3型 (HPeV3) は、敗血症および脳炎などの新生児に重篤な状態を引き起こし得るが、成人に関する報告事例は非常に少ない。そこで、HPeV3 感染の妊婦の症例を報告する。妊娠 36 週の 28 歳の女性が、筋肉痛および筋力低下のために入院した。彼女の握力は右手で 6.0kg、左手で 2.5kg であった。患者の症状は筋炎ではなく筋膜炎であると考えられ、保存療法で徐々に改善されたが、入院 3 日後に予想外に生殖器出血が発生した。産科部門と相談の上、帝王切開を行った。HPeV に対する遺伝子検出のためのリアルタイム PCR アッセイは、咽頭スワブ、糞便および血液については陽性であったが、胎盤、臍帯、臍帯血、羊水および母乳については陰性であった。HPeV3 は、VP1 領域の配列決定により遺伝子型決定された。女性は完全に回復し、乳幼児と安定した状態で退院した。

a 松下記念病院

b 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課
妊婦におけるヒトパレコウイルス3型感染事例の初
報告

周産期における麻疹ウイルス胎盤感染が
もたらす胎児への影響に関する研究

倉田貴子 ^a

産科と婦人科, 9(83), 1075-1077 (2016)

麻疹はウイルスによる発熱・発疹である。近年、麻疹を取り巻く状況は大きく変化してきた。麻疹流行国だった我が国は、WHO から麻疹排除認定をうけるまでに麻疹発生をコントロールできるようになり、小児感染症だった麻疹は、いまや輸入感染症と若年成人における感染症に姿を変えつつある。

麻疹に感染する可能性が高い年齢群である 20-30 歳代は、女性であれば妊娠や出産を経験することも多い。従って、今後の麻疹で問題となるのは、周産期における感染と考えられる。以前から妊娠女性の麻疹感染は重篤になりやすいことや、発症後 2 週間程度で流産や早産をおこす事が報告されていたが、妊娠の継続に影響するウイルスの動態、病理学および生理学的な変化に関する報告はあまりなかった。

1991 年および 2001 年に日本国内で報告された周産期の麻疹感染事例では、胎盤の合胞体栄養膜細胞で麻疹ウイルス抗原が検出された。胎盤には壊死やフィブリンの蓄積がみられた一方、炎症像はみられなかった。従って、麻疹によって引き起こされる早産や流産は、麻疹ウイルスの胎盤組織感染が引き起こす胎盤の物理的または機能的障害に起因する可能性が示唆される。これを裏付ける科学的根拠を得るために、我々は胎盤組織由来細胞を用いて、麻疹ウイルスの胎盤感染を再現する *in vitro* モデルの作出を試みている。予備的な知見では、麻疹ウイルス感染が胎盤を物理的に損傷するだけでなく、機能的な障害を与える可能性が示唆されており、今後詳細な検討を行う予定である。

a 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

A study on the effect of measles virus infection of placenta
on fetus during perinatal period

関西国際空港の麻疹事例の検査結果から
得られた知見

倉田貴子^a, 山元誠司^a, 弓指孝博^a, 久米田裕子^a, 本村和嗣^b, 上山賀也子^c, 井戸美恵子^c, 福田直子^c, 宮本妙子^c, 川井奈々^c, 貞方菜月^c, 大西聖子^c, 今川和子^c, 松浦玲子^c, 西野裕香^d, 折井郁^d, 牟田恵美子^d, 木下優^d, 柴田敏之^d

病原微生物検出情報, 38, 49-51 (2017)

大阪府内で発生した関西国際空港事業所を中心とする麻疹の集団発生事例では、8月中旬から患者発生が見られ、9月29日に終息宣言が出された。この間に33名の空港職員が麻疹を発症した。

大阪府立公衆衛生研究所では、8月下旬から9月30日までの期間に麻疹疑い症例として搬入された184例を定量PCR法にて迅速に検査対応した。当所の検査では、空港職員の麻疹陽性患者33名中28名を検出した。

当該期間に定量PCRを行った184症例のうち36例(19.6%)が陽性となった。陽性36例中、空港職員は28例(遺伝子型H1 24例、型別不能4例)、関連事例は2例(遺伝子型H1 2例)、散発事例は5例(遺伝子型H1 3例、D8 2例)、ワクチン接種後の発疹事例(遺伝子型A)1例であった。府内で検出された遺伝子型H1のN遺伝子の配列はすべて同一で単系統群を形成していた。遺伝子型H1の集団発生と同時期に遺伝子型D8のウイルスも検出されており、常に日本国内に海外から麻疹ウイルスが持ち込まれている可能性が示唆され、感染経路や流行の実態を調査する上で、遺伝子型別の役割が非常に重要であった。

a 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課
b 大阪府感染症情報センター
c 大阪府泉佐野保健所
d 大阪府健康医療部 保健医療室 医療対策課
Laboratory findings from the measles outbreak in Kansai International Airport, 2016

Evaluation of sensitivity of TaqMan RT-PCR for
rubella virus detection in clinical specimens

K. OKAMOTO^a, Y. MORI^a, R. KOMAGOME^b, H. NAGANO^b, M. MIYOSHI^b, M. OKANO^b, Y. AOKI^c, A. OGURA^d, C. HOTTA^d, T. OGAWA^d, M. SAIKUSA^e, H. KODAMA^f, Y. YASUI^g, H. MINAGAWA^g, T. KURATA^h, D. KANBAYASHI^h, T. KASE^h, S. MURATAⁱ, K. SHIRABEⁱ, M. HAMASAKI^j, T. KATO^k, N. OTSUKI^a, M. SAKATA^a, K. KOMASE^a and M. TAKEDA^a.

Journal of Clinical Virology, 80, 98-101 (2016)

風疹はワクチンで予防可能な感染症であり、現在、日本国内から風疹排除を目標にサーベイランスの強化が進んでいる。本研究では、風疹の実験室診断に Taqman Real-time RT-PCR (Taqman RT-PCR) 法を導入する為に、13 遺伝子型の風疹ウイルス (RV) 株および臨床検体を用いて検査系の感度と臨床応用について検討した。Taqman RT-PCR 法の検出限界および増幅効率は、代表的な 13 遺伝子型全ての株間で同等であった。また、発症後 5 日間までに採取した咽頭拭い液および尿検体の約 90% から RV ゲノムを検出することができた。Taqman RT-PCR 法の検出感度は、従来法の Nested RT-PCR 法よりも少し低かった。しかし、迅速性とコンタミネーションの危険性を考慮すると、従来法と比較し Taqman RT-PCR 法は、実験室診断法としてより実用的であると考えられた。

a 国立感染症研究所 ウイルス第3部
b 北海道立衛生研究所
c 山形県衛生研究所
d 千葉県衛生研究所
e 横浜市衛生研究所
f 石川県衛生研究所
g 愛知県衛生研究所
h 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課
i 山口県衛生研究所
j 福岡県保健環境研究所
k 沖縄県衛生研究所
TaqMan RT-PCR 法を用いた臨床検体における風疹ウイルス検出感度の評価

New ceftriaxone- and multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain with a novel mosaic *penA* gene isolated in Japan

S. NAKAYAMA ^a, K. SHIMUTA ^a,
K. FURUBAYASHI ^b, T. KAWAHATA ^c,
M. UNEMO ^d and M. OHNISHI ^a

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60, 4339-4341 (2016)

2015年に日本で分離した新しいセフトリアキソン耐性・多剤耐性淋菌株、FC428を解析した。FC428は新しいPBP2をコードした新規penA遺伝子を持っていたが、薬剤抵抗性に関わる3'末端の部位の塩基配列は、既報のセフトリアキソン耐性株とおおむね一致した。このことは、セフトリアキソン耐性株とこの耐性に関わる塩基配列が、今後拡散するかもしれないことを示唆している。

大阪府域における梅毒の発生状況
(2006～2015年)

川畑拓也 ^a、小島洋子 ^a、森 治代 ^a

病原微生物検出情報, 37, 142-144 (2016)

2006年から2015年に大阪市内をのぞく大阪府内で診断され感染症発生動向調査において届出された梅毒症例データの分析を行った。その結果、以下の様なことが明らかとなった。

- ・2010年以降届出数は増加傾向にあるが、男女とも2013年に急増していた。
- ・両性間を含む同性間性的接触を介した感染の届出が2010年以降増加傾向であったが、2014年をピークに2015年には減少した。
- ・異性間性的接触を介した感染の届出は2011年以降増加傾向であった。
- ・調査期間中、母子感染の届出が2例あった。
- ・2015年には10歳代～20歳代の女性の届出が急増していた。
- ・2012年頃から異性間の性的接触による前駆的な小流行が発生していた可能性が示唆された。

a 国立感染症研究所細菌第一部

b そねざき古林診療所

c 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

d 淋病および他のSTIのWHO共同研究センター、エ
レブール大学病院微生物部臨床検査科、スウェーデン
日本で分離された新規モザイクpenA遺伝子を有する新
しいセフトリアキソンおよび多剤耐性淋菌株

a 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課
Report on syphilis in Osaka prefecture (2006-2015)

Size Distribution of Chlorinated Polycyclic
Aromatic
Hydrocarbons in Atmospheric Particles

K. KAKIMOTO ^a, H. NAGAYOSHI ^a,
Y. KONISHI ^a, K. KAJIMURA ^a, T. OHURA ^b,
T. NAKANO ^c, M. HATA ^d, M. FURUUCHI ^d,
N. TANG ^d, K. HAYAKAWA ^d, and A. TORIBA ^d

Arch Environ Contam Toxicol, 72, 58-64 (2017)

大気粉塵(PM)を PM_{>10}/ PM₁₀/ PM_{2.5}/ PM₁/ PM_{0.5}/ PM_{0.1} の6つの粒径別に夏季及び冬季に捕集した粒子状物質中の塩素化多環芳香族炭化水素類 (CIPAHs) についてその存在割合を明らかにした。その結果、CIPAHs の中で比較的濃度の高かった1-クロロピレン (ClPyr) 及び6-クロロベンゾ[a]ピレン (ClBaP) は共に PM_{2.5-1.0}、PM_{1.0-0.5} の画分で高い濃度を示し、特に冬季に上昇傾向が見られた。この粒径濃度分布傾向は対応する PAHs でも同様であった。大気粉塵中 CIPAHs のうちおよそ15%は肺胞への到達確率の高い PM_{0.1} 画分に存在することが明らかとなった。

また6つの粒子径画分抽出物のうち特に PM_{2.5} 以下の画分でいずれにおいても強い芳香族炭化水素受容体 (AhR) 活性を有することから、これら微小粒子の人への影響評価が必要であることが示唆された。

塩素系難燃剤デクロラン類の大気粉塵粒径分布の解明

柿本健作 ^a, 東條俊樹 ^b, 先山孝則 ^b, 永吉晴奈 ^a, 小西良昌 ^a, 梶村計志 ^a, 中野武 ^c, 畑光彦 ^d,
古内正美 ^d, 唐寧 ^d, 早川和一 ^d, 鳥羽陽 ^d

環境化学, 26, 89-93 (2016)

大気粉塵 (PM) 中デクロラン類の粒径毎濃度分布を明らかにした。分析対象としたデクロラン類 (DP, Dechlorane602, Dechlorane603, Dechlorane604 Component A) のうちデクロラン・プラス (DP) のみが検出された。10月に採取したPMに比べ1月に採取した試料では特に、大気中で長距離移動性を有する2.5~1.0 μm, 1.0~0.5 μm, 0.5~0.1 μm の、粒子においてPM濃度分布の上昇がみられ、DP濃度分布も2.5~1.0 μmにおいて上昇がみられた。<0.1 μmの画分には他の画分に比較し高い濃度ではないもののDPが存在していることが明らかとなった。PM_{0.1}大気サンプラーにて採取したPM中のDPは平均で68%が2.5 μm以下の画分に存在し、13%が0.1 μm以下の画分に存在することが明らかとなった。

a 大阪府立公衆衛生研究所食品化学課

b 名城大学

c 大阪大学

d 金沢大学

大気中塩素化多環芳香族炭化水素の粒径分布

a 大阪府立公衆衛生研究所食品化学課

b 大阪市立環境科学研究センター

c 大阪大学

d 金沢大学

Size Distribution of Dechloranes in Particulate Matter

Determination of irradiation histories of raw beef livers using liquid chromatography–tandem mass spectrometry of 5,6-dihydrothymidine

N. FUKUI ^{a,c}, S. TAKATORI ^a, Y. KITAGAWA ^a, M. OKIHASHI ^b, E. ISHIKAWA ^c, T. FUJIYAMA ^c, K. KAJIMURA ^a, M. FURUTA ^c and H. OBANA ^d

Food Chemistry, 216, 186-193 (2017)

食品への放射線照射は、40ヶ国を超える諸外国で、香辛料、食肉、甲殻類の殺菌などに利用されている。国内では、馬鈴薯の発芽防止を目的とした場合に限定されているが、牛生レバーへの適用が期待されている。現在、牛生レバーの照射履歴を検知できる方法がないことから、放射線照射によってDNA中に形成される損傷ヌクレオシドのひとつである5,6-ジヒドロチミジン(DHdThd)を検知指標として、牛生レバーの放射線照射履歴をLC-MS/MSで判定する方法を開発した。フェノール・クロロホルム法および50%エタノール沈殿を活用し、レバーからDNAを抽出した。DNAはヌクレオシドに酵素分解後、OASIS MCXでカラム精製した。精製後に、チミジン(dThd)およびDHdThdをLC-MS/MSにより分析した。DHdThdは5位に不斉炭素を有するジアステレオマーであり、S、R体の2つのピークが確認され、照射特異的に検出された。dThdに対するDHdThdの濃度(S、R体の合算)比は、実用的な殺菌線量域を含む1.0~11.3 kGyの照射領域で線量依存的に増加した。異なる個体のレバーを用いた場合でも同様の傾向が確認された。さらに、照射後7ヶ月間冷凍保存した場合でも照射履歴を検知可能であった。開発した分析法はDNAが抽出できる食品の照射履歴に有用な方法で今後の発展が期待できる。

a 大阪府立公衆衛生研究所食品化学課

b 大阪府立公衆衛生研究所企画総務部企画調整課

c 公立大学法人大阪府立大学

d 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部

LC-MS/MSによる5,6-ジヒドロチミジンを指標とした牛生レバーの放射線照射履歴検知法の開発

Simple Method for Determination of Fungicides in Citrus Fruits by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Y. KAKIMOTO ^a, S. TAKATORI ^a, M. OKIHASHI ^a, K. KAJIMURA ^a, A. TORIBA ^b and K. HAYAKAWA ^b

Food Analytical Methods, 9(12), 3345-3351 (2016)

4種の防カビ剤(チアベンダゾール、イマザリル、o-フェニルフェノールおよびジフェニル)の簡便な一斉分析法を開発した。これら防カビ剤の安定同位体を添加した後、アセトニトリルで抽出し、無水硫酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムを用いて塩析と脱水を同時に行った。続いてPSAおよびODSで精製した後、ジメチルスルホキシドを添加して濃縮し、移動相に再溶解して試験液とした。大気圧光イオン化法を用いたLC-MS/MSにより測定したところ、添加回収率(1 mg kg⁻¹)は92-114%、相対標準偏差は10%未満であった。10検体の試料調製にかかる時間は約2時間であり、本分析法は簡便な防カビ剤の一斉分析法として適用可能である。

a 大阪府立公衆衛生研究所食品化学課

b 金沢大学

LC/MS/MSを用いた柑橘類中における防カビ剤の一斉分析法の開発

大阪府におけるヒスタミン検査事例について

栗津 薫^a, 高取 聡^a, 柿本 幸子^a,
野村 千枝^a, 昌山 敦^a, 山口 瑞香^a,
柿本 葉^a, 梶村 計志^a

食品衛生学雑誌, 58(1), 43-48 (2017)

ヒスタミンは、食品に含まれるアミノ酸の一種であるヒスチジンが細菌の作用により分解されて生じ、ヒスタミンによる食中毒は魚介類を原因食品として日本国内で年間 10 件程度発生している。平成 27 年度は、食中毒対策のための実態調査を目的とした大阪府食品衛生監視指導計画に基づく市場流通品の検査と、府保健所等からの依頼に基づく有症事例の原因究明や再発防止を目的とした原因食品の検査を実施した。いずれの検査も固相抽出カートリッジカラムを用いた精製後、HPLC-FL による誘導体化ヒスタミンの定量分析を実施した。その結果、市場流通品の一部および有症事例の検体からヒスタミンを検出した。ヒスタミンを検出した検体は、うるめ丸干し、さば、いわしのつみれであり、いずれも厚生労働省が公表する食中毒統計において、ヒスタミンによる食中毒の原因食品の上位に挙げられるものであった。また、いずれの有症事例もヒスタミン食中毒に典型的な症状を呈しており、原因食品から高濃度のヒスタミンが検出された。

Trends of Dioxin, PCB, and Other Persistent Organohalogen Compound Concentrations in Human Breast Milk from 1972 to 2008 in Osaka, Japan

Y. KONISHI^a, K. KAKIMOTO^a

American Chemical Society (ACS Books), 127-155 (2016)

doi: 10.1021/bk-2016-1244.ch006

残留性有機汚染物 (Persistent Organic Pollutants, POPs) はストックホルム条約により使用・製造の禁止または制限が世界的に行われているが、これら POPs による環境汚染は今なお続いている。著者らは長年にわたり、母乳を対象とした POPs モニタリング調査を行ってきた。我が国では PCB や DDT は 1970 年代特定化学物質に指定され、製造・使用が禁止されたが、低濃度ながら未だ母乳汚染は続いている。燃焼等非意図的に生成されたダイオキシン類による母乳汚染は、経年的に減少しているものの、他の食品に比べて高濃度曝露されており、乳児への健康影響が危惧されている。また、近年では臭素系難燃剤ヘキサブロモシクロドデカンによる母乳汚染も問題となっている。

当報告は American Chemical Society (米国化学会) の依頼を受け、著者らの研究成果をまとめたものである。

a 大阪府立公衆衛生研究所食品化学課
Detection of Histamine in Fish and Fishery Products in Osaka Prefecture (Fiscal 2015 Report)

a 大阪府立公衆衛生研究所食品化学課
1972 年から 2008 年までの大阪府における母乳中のダイオキシン、PCB およびその他有機ハロゲン化合物濃度の推移

常温保存下における照射レトルト牛井中
2-アルキルシクロブタノンの安定性について
(2)

北川陽子^a, 起橋雅浩^b, 高取聡^a, 福井直樹^a,
梶村計志^a, 尾花裕孝^c, 古田雅一^d

食品照射, 51, 17-22 (2016)

2-アルキルシクロブタノン (ACBs) は, 放射線照射により食品中に含まれる脂肪酸から特異的に生じるため, 食品の照射履歴の検知指標として有用な物質である。我々はこれまでに常温保存下での ACBs の安定性を評価することを目的として, レトルト包装された牛井の具 (レトルト牛井) 中に生成した 2-ドデシルシクロブタノン (DCB) および 2-テトラデシルシクロブタノン (TCB) の濃度を追跡し, 照射後 1 年を経過しても ACBs 濃度に大きな変化がないことを報告した。本研究では, さらに保存期間を 3 年に延長し, 常温保存した照射レトルト牛井中の DCB および TCB 濃度を測定した。また, 照射後 0 か月の試料を 3 年冷凍保存し, 冷凍保存条件での ACBs の安定性についてもあわせて検討した。その結果, 常温保存試料は, 冷凍保存試料と比較して, 脂質の劣化に由来すると考えられる夾雑ピークが多数認められた。しかし, 保存条件に関わらず, 照射後 3 年を経過しても照射レトルト牛井中に生成した ACBs は安定であり, 照射履歴の検知は可能であった。

Monitoring of Antibiotic Residues in Aquatic
Products in Urban and Rural Areas of Vietnam.

K. UCHIDA^{a,b}, Y. KONISHI^a, K. HARADA^{b,c}, M.
OKIHASHI^{a,b}, T. YAMAGUCHI^{a,b}, M. DO^d, L.
BUI^d, T. NGUYEN^d, P. NGUYEN^d, D. KHONG^e,
H. TRAN^e, T. NGUYEN^e, H. LE^e, V. CHAU^f,
K. DAO^f, H. NGUYEN^f, K. KAJIMURA^a, Y.
KUMEDA^a, K. PHAM^g, K. PHAM^e, C. BUI^f, M.
VIEN^f, N. LE^d, C. DANG^d, K. HIRATA^{b,c}, Y.
YAMAMOTO^{a,c}.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64,
6133-6138 (2016)

ベトナムで流通する水産物の抗菌剤残留実態を調査した。2013 年から 2015 年にホーチミン市、タイビン、ニャチャンの市場から合計 511 試料を購入した。分析はホーチミン市で行なった。フードプロセッサーで細切した可食部を 2%ギ酸アセトニトリルで抽出、C18 分散固相で精製し、LC-MS/MS により 32 種類の抗菌剤を測定した。その結果、ホーチミン市の試料の 14.7% (53/360) に抗菌剤の残留が見られた。エンロフロキサシンとその代謝物であるシプロフロキサシンが最も高頻度で検出された (10.8%、5.2%)。一方でタイビンおよびニャチャンの試料からは抗菌剤はほとんど検出されなかった (1/118、1/31)。この違いは、地域の生産・流通システムに起因していると考察された。

本研究によってベトナムの 3 つの地域における水産物の抗菌剤汚染実態が明らかになった。抗菌剤の適正使用を促すために、継続的なモニタリングが必要であると結論付けた。

a 大阪府立公衆衛生研究所食品化学課
b 大阪府立公衆衛生研究所企画総務部企画調整課
c 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部
d 大阪府立大学地域連携研究機構 放射線研究センター
Stability of 2-Alkylcyclobutanone in Irradiated Retort Pouch Gydon Topping During Room Temperature Storage (2)

a 大阪府立公衆衛生研究所
b 大阪大学薬学部
c 大阪大学グローバルコラボレーションセンター
d ホーチミン市公衆衛生院
e タイビン医科薬科大学
f ニャチャンパスツール研究所
g ベトナム保健省
ベトナムの都市部と農村部における水産物の残留抗菌剤モニタリング

Screening of antibiotic residues in pork meat in
Ho Chi Minh City, Vietnam, using a
microbiological test kit and liquid
chromatography/tandem mass spectrometry

M. H. NGOC D.^a, T. YAMAGUCHI^{b,c},
M. OKIHASHI^{b,c,d}, K. HARADA^{c,d},
Y. KONISHI^b, K. UCHIDA^{b,c}, L. T. BUI^a,
T. D. NGUYEN^a, H. B. PHAN^a,
H. D. THIEN B.^a, P. D. NGUYEN^a,
K. KAJIMURA^b, Y. KUMEDA^b, C. V. DANG^a,
K. HIRATA^{c,d} and Y. YAMAMOTO^{b,d}

Food Control, 69, 262-266 (2016)

ベトナムのホーチミン市において、2014～2015年に豚肉中の抗菌剤スクリーニング/モニタリング調査を行った。卸売市場で100検体を検査キットでスクリーニングして18検体について陽性と判定した。その後、全検体をホーチミンの公衆衛生研究所でLC-MS/MSを用いた機器分析で28項目の抗菌剤を測定したところ、23検体からスルファメタジンを検出した(11-1600 µg/kg)。このうち11検体は310～1600 µg/kgと高濃度で、スクリーニングで陽性と判定されていた。他の12検体は200 µg/kg未満の濃度であり、陰性と判定されていた。これらの結果からキットでの検査は一定の効果があることが判明した。

a ホーチミン市公衆衛生院
b 大阪府立公衆衛生研究所
c 大阪大学薬学部
d 大阪大学グローバルコラボレーションセンター
微生物学的キットとLC-MS/MSを用いたベトナム
ホーチミン市における豚肉中残留抗菌剤の検査

Detection of Antibiotics in Chicken Eggs Obtained
from Supermarkets in Ho Chi Minh City, Vietnam

Takahiro Yamaguchi^{a,b}, Masahiro Okihashi^{a,b,d},
Kazuo Harada^{b,d}, Yoshimasa Konishi^a, Kotaro
Uchida^{a,b}, Mai Hoang Ngoc Do^c, Long Thi Bui^c,
Thinh Duc Nguyen^c, Ha Bich Phan^a, Huong Dang
Thien Bui^c, Phuc Do Nguyen^c, Keiji Kajimura^a,
Yuko Kumeda^a, Chinh Van Dang^c, Kazumasa
Hirata^{b,d} and Yoshimasa Yamamoto^{a,d}

Journal of Environmental Science and Health,
Part B, 52, 430-433 (2017)

ベトナムにおける鶏卵中の残留抗菌剤実態調査を行った。調査に用いた鶏卵は2014年から2015年にかけてホーチミン市内スーパーマーケットで購入した。検体総数111検体のうち11検体からエンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、スルファメキサジン、スルファモノメトキシ、チルミコシンおよびトリメトプリムを検出した。エンロフロキサシンは5検体から検出されており、中には1000 µg/kgを超える値がみられた。11社のメーカーからサンプリングしたところ、2社の製品からの検出が高かった(各40、44%)。多くの国では産卵鶏に対する投与は規制されている。しかし、本研究結果より、ベトナムでは産卵鶏への抗菌薬の投与管理は不十分であることが推測された。今後ベトナムにおいて、農家に対する抗菌薬の使用に関する指導や、鶏卵中の抗菌薬モニタリング検査が必要であると示唆された。

a 大阪府立公衆衛生研究所
b 大阪大学薬学部
c ホーチミン市公衆衛生院
d 大阪大学グローバルコラボレーションセンター
ベトナム ホーチミン市で購入した鶏卵中の残留抗菌剤の検出について

Evaluation of matrix-like effects in multiresidue pesticide analysis by GC/MS/MS

K. AKUTSU^a, M. YOSHIMITSU^a,
Y. KITAGAWA^a, S. TAKATORI^a, N. FUKUI^a,
M. OSAKADA^a, S. YAMAGUCHI^b,
K. KAJIMURA^a, H. OBANA^c
and T. WATANABE^d

Journal of Separation Science, 40, 1293–1300
(2017)

GC-MS(/MS)を用いる食品の残留農薬分析において、測定溶液中の食品成分の影響によるピーク応答の変化（マトリックス効果）は、農薬の定量精度を低下させる主要原因の1つである。食品成分によるマトリックス効果に関する報告は多いが、共存農薬によるピーク応答の変化について言及した報告は少なく不明な点が多い。分析法の信頼性向上を図る上で、当該現象を把握しておくことは有用である。そこで、我々は当該現象を「マトリックス様効果（Matrix-like effect）」と名付け、まず単純な系として、農薬の溶媒標準溶液における単品と混合溶液のピーク応答を比較した。指標とした5種類の農薬（オメトエート、テルブホス、マラチオン、プロシミドン、ペルメトリン）のいずれも、市販の58～166種類の農薬混合標準溶液を添加したものでは、添加農薬数の増加に伴って同濃度の単品溶液よりピーク面積が増大した。すなわち、農薬群によるマトリックス様効果が明確に観測され、当該現象が絶対検量線法・内標準法のいずれにおいても、上記5種農薬の定量誤差を引き起こし得ることが確認された。共存農薬群がGCの注入口やカラム内でアナライトプロテクタント（活性点マスク剤）として機能することがマトリックス様効果の一因と考えられた。

a 大阪府立公衆衛生研究所食品化学課

b 大阪府立公衆衛生研究所食品化学課

c 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部

d 一般財団法人食品薬品安全センター

残留農薬のGC/MS/MS測定におけるマトリックス様効果の検証

Development of monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of orange allergen Cit s 2 in fresh and processed oranges

K. KIYOTA^a, K. KAWATSU^a, J. SAKATA^a,
M. YOSHIMITSU^a, K. AKUTSU^a,
T. SATSUKI-MURAKAMI^a, M. KI^a,
K. KAJIMURA^a and T. YAMANO^a

Food Chemistry, 232, 43-48 (2017)

オレンジには、健康に有益な栄養成分が含まれる一方、食物アレルギーを引き起こす成分（アレルゲン）も含まれる。本研究では、オレンジの生鮮品や加工食品においてオレンジの主要アレルゲン（Cit s 2）を定量するために、サンドイッチ ELISA（酵素結合免疫吸着法）の開発を目的とした。

リコンビナント Cit s 2 に対するモノクローナル抗体を常法に従って作出し、サンドイッチ ELISA を構築した。本 ELISA の定量範囲は 2.5-40 ng/mL であった。生鮮ネーブルオレンジおよびオレンジジュースの各抽出物におけるリコンビナント Cit s 2 の添加回収率は 107-132% であり、プレート内とプレート間の変動係数は、それぞれ 3.1-8.8% および 4.4-11% であった。食品中の Cit s 2 濃度は、生鮮ネーブルオレンジで 1,800 ± 430 ng/g、オレンジ加工品のうち、ジュースで生鮮ネーブルオレンジの 1/10 以下または不検出、ジャムとシロップ漬けで不検出であった。

今回開発した ELISA は良好な真度、精度および感度を示し、Cit s 2 定量法として妥当性が確認された。本 ELISA は、Cit s 2 含有量の低い食品の選別や、Cit s 2 摂取量の制御に有用なため、オレンジアレルギーの発症防止対策に役立つと考えられる。

a 大阪健康安全基盤研究所

オレンジの生鮮品と加工品に含まれるオレンジアレルゲン Cit s 2 定量 ELISA の開発

ポリプロピレン製給食用食器における
きずの解析と卵アレルギー残留性への影響橋本博行^a, 吉光真人^b, 清田恭平^{b,c}

日本家政学会誌, 68(5), 193-205 (2017)

ポリプロピレン製の給食用食器 (PP 食器) は、他の食器と比較してきずつき易いため、食品成分の洗浄不足の原因となり、食物アレルギーが残留することが懸念される。本研究では、PP 食器におけるきずの形状解析、ならびに再現実験を実施し、きずの発生要因を明らかにするとともに、卵アレルギー残留性に対するきずの影響を調査することを目的とした。

経年使用で PP 食器に発生したきずは、直線状で、きず周辺部分を含む幅がスポンジたわしの不織布の繊維の直径と同程度であった。PP 食器の硬度は不織布よりも低く、PP 食器に対し、不織布によるこすり操作を加えることで、経年使用により発生した PP 食器きずが再現された。

PP 食器のきずの発生原因の一つとして、スポンジたわしの不織布によるこすり操作が示唆された。

洗浄時に、やわらかいスポンジ部分を使用することが PP 食器の長期使用のために重要である。また、PP 食器のきずの程度に係わらず、スポンジ部分を使用した洗剤洗浄で PP 食器に残留した卵アレルギーが除去された。

小麦粉ふるい操作後の小麦アレルギーの
飛散動態の解析橋本博行^a, 吉光真人^b, 清田恭平^b

アレルギー, 66(3), 209-221 (2017)

小麦は、食物アレルギーを引き起こす原因食品とされる。製菓調理の際に品質向上の目的で、小麦粉に対してふるい操作を行い、粉の固まりを崩し、空気を含ませて分散させる。ふるい操作を行えば、小麦粉が空中に飛散し、小麦アレルギーが他の食品に混入することが懸念されるが、その詳細はよくわかっていない。本研究では、小麦粉のふるい操作時の飛散特性について調査を行った。

3種類の粉ふるいを用いて、飛散した小麦粉について、軌跡と速度ベクトルおよび小麦アレルギーの飛散距離を測定し、飛散動態を解析した。小麦粉のふるい操作後、粒子径が 30 μm 未満の粒子は空気の流れに乗って周辺に拡散し、小麦アレルギーとして 5 m まで飛散した。一方、粒子径の大きな小麦粉粒子は、飛散後、垂直に落下した。粉ふるいの種類に関わらず、ふるい操作によって飛散した小麦粉は、他の食品に混入し得ることが示唆された。混入防止のためには、独立した調理室内か袋の中で小麦粉を取り扱う必要があると考えられた。

a 大阪国際短期大学部

b 大阪府立公衆衛生研究所

c 大阪市立環境科学研究所

Analysis of Abrasions Generated on Polypropylene Tableware for School Lunch and its Effect on Egg Allergen Residues

a 大阪国際短期大学部

b 大阪健康安全基盤研究所

Analysis of Wheat Allergen Dispersed in Air By the Action of Three Types of Flour Sifter

Simultaneous analysis of highly polar pharmaceutical adulterants in slimming products by hydrophilic interaction liquid chromatography

A. NAKAMURA^a, T. TAGAMI^a, K. KAJIMURA^b
K. YAMASAKI^c, Y. SAWABE^a and H. OBANA^d

J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 39, 691-697
(2016)

痩身効果を暗示する健康食品の中には、薬効を期待する目的で違法に医薬品成分が配合されている製品がある。健康食品中に含有する医薬品成分の検査では、一般的に逆相クロマトグラフィーが用いられるが、高極性成分はカラムへの保持が弱いいため検出や定量が困難になることがある。そこで、高極性化合物の分析に広く利用されている親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を痩身用健康食品の検査に適用できないか試みた。極性の高い医薬品 5 成分 (フェニルプロパノールアミン、サルブタモール、フェンホルミン、ブホルミン、メトホルミン) を対象に分析条件を検討した結果、抽出溶媒にエタノール

(99.5)、HILIC 分析用カラムに XBridge™ Amide column (4.6 × 250 mm, 3.5 μm)、移動相にアセトニトリル/0.1%ギ酸含有 26.5 mM ギ酸アンモニウム溶液混液 (85:15) をそれぞれ用い、測定波長を各成分の極大波長 (208、226、236 nm) とすることで、全て良好に検出・定量することができた。さらに特異性、直線性、真度、精度、頑健性を検証したところ、逆相クロマトグラフィーを用いる既分析法より優れていた。以上のことから、今回開発した HILIC による一斉分析法は、痩身用健康食品の検査において、高極性医薬品の検出・定量に有用であると考えられる。

a 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部薬事指導課

b 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部食品化学課

c いわき明星大学薬学部

d 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部

HILIC を用いた痩身用健康食品中に含まれる高極性医薬品成分の分析

Isomeric discrimination of synthetic cannabinoids by GC-EI-MS: 1-adamantyl and 2-adamantyl isomers of *N*-adamantyl carboxamides

A. ASADA^a, T. DOI^a, T. TAGAMI^a,
A. TAKEDA^a and Y. SAWABE^a

Drug Testing and Analysis, 9(3), 378-388 (2017)

日本国内ですでに規制されている薬物である APINACA, APICA, 5F-APINACA, 5F-APICA はいずれも 1-アダマンチルアミンを原料とする合成カンナビノイドである。近年、海外で 2-アダマンチルアミンを原料とする新規薬物が検出されたとの報告があり、アダマンチルアミンの結合部位が異なる合成カンナビノイドの異性体について、明確に区別することが重要であると考えられた。

そこで海外で流通が確認された合成カンナビノイドおよびその異性体、合計 4 化合物について合成を行った。また市販されている指定薬物標準品 4 種類の位置異性体についても同様に合成を達成した。合成品 8 化合物および市販品 4 化合物の計 12 化合物についてガスクロマトグラフ - 質量分析計による分析を行ったところ、それぞれの異性体が結合部位の違いにより特徴的なスペクトルパターンを示すことを明らかにした。また、そのパターンは結合部位の違いだけでなく、合成カンナビノイドの含窒素骨格の種類によっても異なることを確認した。

a 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部薬事指導課

N-アダマンチルカルボキサミド型合成カンナビノイドの GC-EI-MS による異性体分析について

Regioisomeric Separation of Ring-Substituted Cathinones by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with a Naphthylethyl Column

A. TAKEDA^a, T. TAGAMI^a, A. ASADA^a, T. DOI^a,
M. KAWAGUCHI^a, Y. SATSUKI^a and Y.
SAWABE^a

Forensic Toxicology, 35(2), 399-407(2017)

合成カチノン「危険ドラッグ」から最も検出される化合物群の一つである。その化学構造にベンゼン環を含むことから、化学構造を変化させるためにベンゼン環に置換基が導入された場合、3種類の位置異性体が合成される可能性がある。このようなベンゼン環の置換基に由来する位置異性体それぞれの分析結果はよく似ており、通常用いられる液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)やガスクロマトグラフィー-質量分析計による保持時間やマススペクトルからは位置異性体を区別することが出来ず、NMRなどの高価な分析機器を用いるか、誘導体化といった煩雑な操作が必要である。

ベンゼン環の置換基に由来する位置異性体はその置換基の置換位置の違いにより芳香族性も異なると考えられることから、芳香族性を有するナフチルエチルカラムを用いることで、 π - π 相互作用による分離が期待される。

この研究では、4種類の合成カチノン(エチルメトカチノン、フルオロメトカチノン、エチルエトカチノン、フルオロエトカチノン)を対象に、ナフチルエチルカラムを用いたLC-MSによる位置異性体の分離を検討した。

その結果、移動相の有機溶媒にメタノールを用いることで、対象とした4種類の合成カチノンの位置異性体を全て良好に分離することができた。今回の分析法は合成カチノンの位置異性体の簡便な分離に有用であると考えられる。

Enantioseparation of the carboxamide-type synthetic cannabinoids *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide and methyl [1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indazole-3-carbonyl]-valinate in illicit herbal products

T. DOI^a, A. ASADA^a, A. TAKEDA^a, T.
TAGAMI^a, M. KATAGI^b, H. KAMATA^b, Y.
SAWABE^a

Journal of Chromatography A, 1473, 83-89 (2016)

合成カンナビノイドは、危険ドラッグ中に高頻度で含まれる化合物群であり、大麻の代替薬物として乱用されている。5F-AB-PINACA、5F-AMBはいずれも合成カンナビノイドの1種であり、2014年にハーブ製品から検出されている。これらの化合物は1-(5-フルオロペンチル)-1*H*-インダゾール-3-カルボン酸と、バリンアミドまたはバリンメチルエステルから形成されるカルボン酸アミドであり、アミノ酸部分の光学活性に由来する光学異性体が存在している。これまでの検出事例では、光学活性については触れられておらず、製品中にいずれの光学異性体が存在しているかはこれまでに調べられていない。

本研究では、5F-AB-PINACA、5F-AMBの光学異性体をそれぞれ合成し、LC-MSによる分離方法について検討した。十分に各光学異性体を分離・識別できる条件で製品の分析を行ったところ、調べたハーブ製品11検体の全てで(S)体が検出されたが、(R)体は2検体から検出されたのみであった。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課
ナフチルエチルカラムを用いた液体クロマトグラフィー-質量分析計による合成カチノンの位置異性体分離

a 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部薬事指導課
b 大阪府警科学捜査研究所
ハーブ製品に含まれる合成カンナビノイド 5F-AB-PINACA および 5F-AMB の光学分離について

誘導体化-ガスクロマトグラフ-質量分析法を用いた水道原水および水道水中ジチオカルバメート系農薬の定量

高木総吉^a, 吉田 仁^a, 小泉義彦^a, 安達史恵^a, 中島孝江^a, 田中榮次^a, 足立伸一^a

環境化学, 26(3), 141-147 (2016)

水道水中ジチオカルバメート系農薬（ジネブ、ジラム、チウラム、プロピネブ、ポリカーバメート、マンゼブ（マンコゼブ）およびマンネブ）の分析法としてヨウ化メチルでメチル化し、誘導体化物を GC/MS を用いて測定する方法を検討した。前処理条件を検討した結果、誘導体化率が 15%未満の化合物もあり、標準溶液も試料と同様に誘導体化する必要があることがわかった。分析法の精度を確認するために水道水と河川水を用いて妥当性評価を実施した。目標値の 1/10 添加濃度において、真度の目標（70～120%）と、併行精度の目標（<25%）を満たした。また、プロピネブは、目標値の 1/100 添加濃度において、真度の目標（70～120%）と、併行精度の目標（<30%）を満たした。完成した分析法を用いて大阪府内の水道水源および浄水場の実態調査を行ったところ、すべての試料において定量下限値未満であった。

誘導体化—高速液体クロマトグラフ—蛍光検出法による水中グルホシネート、グリホサート、アミノメチルホスホン酸の同時分析

中島孝江^a, 安達史恵^a, 吉田 仁^a, 高木総吉^a, 小泉義彦^a, 田中榮次^a, 足立伸一^a

水道協会雑誌, 85(8), 2-7 (2016)

従来、グリホサートとその代謝物のアミノメチルホスホン酸（AMPA）の同時分析に使用していた誘導体化—高速液体クロマトグラフ—蛍光検出法の感度を増加し、グルホシネートをグリホサートとその代謝物の AMPA と同時に分析し、水道水に求められている検出感度である 0.0002mg/L（目標値の 1/100）が得られた。水道水と河川水で行った妥当性評価の結果も良好であった。この方法を用いて大阪府内 18 地点の河川水の分析を行った結果、水道水における目標値の 1/100 以上のグルホシネート、グリホサート、AMPA は検出されなかった。

a 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部生活環境課
Determination of dithiocarbamate fungicides in raw and tap water using by derivatization-gas chromatography-mass spectrometry

a 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部生活環境課
Analysis of Glufosinate, Glyphosate and Its Metabolite, Amino- methylphosphonic Acid, in water sample by HPLC with a Fluorescence Detector

大阪府における精度管理基礎研修の実施

安達史恵^a, 吉田 仁^a, 高木総吉^a,
小泉義彦^a, 中島孝江^a, 田中榮次^a,
山本友梨子^b, 廣瀬正晃^b, 島野元伸^b,
土屋 誠^b, 足立伸一^a

水道協会雑誌, 85(11), 10-16 (2016)

大阪府では、大阪府水道水質管理計画に基づき、府内の水道水質検査の分析技術の向上を図り、水質検査の信頼性をより一層高めることを目的に、平成 5 年度より大阪府水道水質検査外部精度管理を実施している。平成 19 年度から 25 年度までの大阪府水道水質検査外部精度管理の過去 7 年分の結果を整理したところ、外れ値の原因として機器の不整備等の物的要因以外に、検査担当者の分析に関する知識不足および検査結果報告書の確認ミス等の人的要因によるものが多くみられた。そこで大阪府では、府内の水質検査担当者を対象に分析技術の再確認および向上を目指し、大阪府水道水質検査精度管理基礎研修を平成 26 年 12 月～平成 27 年 3 月にかけて実施した。

アメーバ共培養－LAMP 法を用いた水景施設におけるレジオネラ属菌生息調査

枝川亜希子^a, 木村明生^a, 足立伸一^b,
松島加代^c, 宮本比呂志^d,

防菌防黴, 44(11), 585-589, (2016)

近年、諸外国において水景施設を感染源とするレジオネラ症が報告されている。水景施設とは、人工的に造られた噴水などの水環境で、エアロゾルを発生しやすい演出形態の施設は、レジオネラ症の感染源となる恐れがある。

レジオネラ症の原因菌であるレジオネラの検出は、主に培養法により行われているが、生きていて培養できない状態 (VBNC: viable but non-culturable) になる菌であり、また、一部の菌種は人工培地で培養できない。そのため、培養法のみでは汚染状況の把握は十分ではない。本研究では、レジオネラがアメーバ内で増殖することを利用したアメーバ共培養法の手法を用いて、水景施設を対象としたレジオネラ生息調査を行った。水景水 31 試料について、培養法は 3 試料 (9.7%)、LAMP 法は 16 試料 (51.6%)、PCR 法は 6 試料 (19.4%) が陽性であった。アメーバ共培養法を行った水景水は、LAMP 法は 13 試料 (41.9%)、PCR 法は 11 試料 (35.5%) が陽性であった。アメーバ共培養法で陽性の試料は、アメーバ内増殖能を有するレジオネラ生菌を示しており、より正確な水景水のレジオネラ汚染度を示すものと考えられる。

a 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪府健康医療部環境衛生課

Report of Trainings on Analytical Quality Control

a 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部生活環境課

b 公財) 日本建築衛生管理教育センター

c 大阪府健康医療部環境衛生課

d 佐賀大学医学部

Investigation of *Legionella* Contamination in Amenity Water Samples Using Amoebic Co-culture with LAMP Methods

大阪府内水道原水におけるクリプトスポリジウムとジアルジアの存在状況とその遺伝子型

肥塚利江^a, 木村明生^a, 足立伸一^a

水道協会雑誌, 85(12), 14-22 (2016)

大阪府内の水道原水において、クリプトスポリジウムおよびジアルジアの存在状況とその遺伝子型の調査を2003年4月から2013年3月までの10年間（ジアルジアについては2005年4月からの8年間）にわたって行った。その結果、検鏡法でクリプトスポリジウムについては、71地点702試料中22地点48試料、ジアルジアについては、62地点518試料中7地点17試料で陽性となった。また、陽性となった地点の試料でNested-PCR、シーケンスを行い、遺伝子型を調査したところ、クリプトスポリジウムについては、14地点44試料で12の遺伝子型が、ジアルジアについては、3地点8試料で3つの遺伝子型が確認された。

Investigation of Bacterial Effects of Asian Dust Events through Comparison with Seasonal Variability in Outdoor Airborne Bacterial Community

J. PARK^a, T. ICHIJO^a, M. NASU^a and N. YAMAGUCHI^{a,b}

Scientific Reports, 6, Article number 35706 (2016)

風送ダストの一つである黄砂については、発生源から約3000~5000 km離れた日本にも、年間約400万トンが飛来していると推定されている。黄砂が微生物を運んでいることが明らかとなり、黄砂とともに移動する微生物が環境や健康に与える影響の解明が重要となっている。しかしながら、これまでの研究は黄砂発生時期に採取した試料のみについて行われたものがほとんどであり、黄砂非発生時も含めた連続的な解析がされていなかった。そこで、生活環境中の大気を定期的に採取し、黄砂発生にともなう細菌群集の変化を黄砂非発生時における変動をふまえて解析した。細菌現存量は定量的PCR法で測定し、細菌群集構造はamplicon sequence法により解析した。その結果、黄砂非発生時の細菌現存量は大きく変化し（平均 $2\pm 3 \times 10^3$ cells/m³）、季節や降雨の影響は見られなかった。黄砂発生時には細菌現存量が非発生時の約5倍に増加したが、非発生時であっても発生時と同等の細菌現存量（ 10^4 cells/m³）の日もあった。細菌群集構造には黄砂の飛来にともなう大きな変化は見られず、自然環境中に広く分布する*Acidobacteria* や *Actinobacteria* が優占種であった。これらの結果から、黄砂発生源から数千 km 離れた地点においては、生活環境の大気中の細菌群集は、黄砂飛来にともなう影響を大きくは受けないものと考えられた。

a 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部生活環境課
Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes in drinking water sources in Osaka Prefecture.

a 大阪大学大学院薬学研究科衛生・微生物学分野
b 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部生活環境課
黄砂の飛来が下流域の生活環境の大気中の細菌群集に与える影響

2016–2017 シーズンに大阪市で認められた
ノロウイルス流行

入谷展弘^a、上林大起^b、改田 厚^a、
阿部仁一郎^a、山元誠司^a、久保英幸^a、
平井有紀^a、野田 衛^c、小笠原 準^a

大阪市立環科研報告
平成 28 年度 第 79 集, 1-4 (2017)

2016 年 9 月から 2017 年 7 月の期間 (2016–2017 シーズン) に集団胃腸炎 125 事例からノロウイルスが検出された。最も多く検出された遺伝子型は GII.2 (87 事例、69.6%) であり、次いで GII.17 (13 事例、10.4%)、GII.4 (9 事例、7.2%) であった。GII.2 事例は 2016 年 11 月および 12 月の 2 か月間に集中して発生していた。推定原因別では、76 事例 (87.4%) の GII.2 事例がヒト–ヒト感染疑い事例であり、うち 74 事例が保育所および小学校における発生であった。これは大阪市で 2016–2017 シーズンにノロウイルス GII.2 が低年齢層で主に流行していたことを示している。ノロウイルス GII.2 は日本の他の地域や海外でも流行の報告があり、同時期に広く流行していたことが示唆された。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
c 国立医薬品食品衛生研究所
Epidemic of noroviruses in Osaka City, Japan during
2016–2017 season

アイスクリーム製造施設の
Listeria monocytogenes 汚染状況

中村寛海^a、西 康之^b、清水順子^b、
山本雅由^b、宮木行雄^b、黒岡伸夫^b、
小笠原 準^a

大阪市立環科研報告
平成 28 年度 第 79 集, 5-10 (2017)

Listeria monocytogenes (LM) は、食品を介してヒトにリステリア症を引き起こす。リステリア症は日和見感染症であり、健康な成人には生菌を大量に摂取した場合に胃腸炎症状を呈する程度であるが、妊婦、新生児、免疫抑制者、高齢者など感受性の高いグループには少量の菌摂取で感染し、敗血症や髄膜炎、髄膜脳炎などの重篤な症状を呈することから、致死率が高い。リステリア症は、主に先進国において集団事例が毎年のように発生している。2015 年には米国でアイスクリームによるリステリア症事例が発生し、患者 10 名のうち 3 名が死亡した。本調査研究では、大阪市内のアイスクリーム製造施設 3 施設から採取した 89 検体および市販のアイスクリーム類 17 検体、計 106 検体について LM 汚染状況を調べた。その結果、全ての検体から LM を含むリステリア属菌は検出されなかった。アイスクリーム類は乳等省令および食品衛生法で成分規格が定められていることから、製造者の衛生管理意識が高い食品であると考えられた。しかしながら、LM 添加回収試験の結果、アイスクリーム類のうちでも特に乳脂肪分および乳固形分を含むアイスクリーム、アイスミルク、ラクトアイスについては 6 週間後も LM 菌数は低下しなかった。また、アイスクリームは賞味期限の表示を省略することができるため、市場での流通期間の長い食品であることを考えると、たとえ汚染菌数が少なくても、高齢者や基礎疾患を有する患者が喫食した場合、死に至る可能性もあり、その製造環境の衛生管理には細心の注意が必要である。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
b 大阪市保健所食品衛生監視課

Listeria monocytogenes contamination in ice cream
processing plants

2016/17 シーズンの季節性インフルエンザ
ウイルス分離状況ー大阪市

久保英幸^a, 改田 厚^a, 上林大起^b,
平井有紀^a, 入谷展弘^a, 山元誠司^a,
小笠原準^a

大阪市立環科研報告
平成 28 年度 第 79 集, 11-16 (2017)

2016/17 シーズンの大阪市内におけるインフルエンザは、流行開始時期は 2016 年 11 月上・中旬、流行ピークは 2017 年 1 月下旬となった。この状況は、全国においても同様に認められた。本シーズン中にインフルエンザ・サーベイランスとして採取された検体数は 227 となり、そのうちの 140 検体から季節性インフルエンザウイルス (FluV) が分離された。分離された FluV の内訳は、AH3 が 127 株、AH1pdm が 8 株、B/Yamagata 系統が 1 株、および B/Victoria 系統が 4 株となった。AH3 はシーズン全般を通して分離され、また、AH3 が主流となったのは、2014/15 シーズン以来 2 年ぶりのことであり、これは全国においても同様であった。過去 4 シーズンの FluV 流行状況は、AH3 主流および各型・亜型の混合流行が交互に認められている。この交互流行の出現が今後も継続して認められるのか否か、引き続き注意が必要である。

LC-MS/MS による植物毒の
迅速一斉分析法の検討

村上太郎^a, 紀 雅美^a, 山口之彦^a,
昌山 敦^a, 山野哲夫^b

大阪市立環科研報告
平成 28 年度 第 79 集, 17-22 (2017)

本研究では液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS/MS) による植物毒の迅速一斉分析法の検討を行い、本分析法が尿と加工食品 (カレー) 中の植物毒の分析に適応できるかを確認した。分離条件の最適化によって、13 種の植物毒を 1 測定 10 分間での迅速なスクリーニングが可能となった。最適化を行った迅速分析法は尿とカレー中の 13 種の植物毒で目標とした 50-200% の回収率を満たしていた。検討を行った植物毒の迅速一斉分析法は試料の前処理から測定まで 1 時間程度で分析が可能であり、食中毒事例の際には、迅速な対応が可能である。本分析法は大阪市内で発生した野草茶中のスコポラミンとアトロピンによる食中毒事例でも応用が可能であった。今後は本分析法で分析可能な植物毒と対象となる加工食品の範囲を確認することによって、植物毒による食中毒発生の際には迅速な対応が可能となると考える。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
Seasonal influenza viruses isolated in Osaka City,
2016/17 influenza season

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課
b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部
Simultaneous analysis of phytotoxins by liquid
chromatography tandem mass spectrometry

水蒸気蒸留—固相抽出—HPLC 法による
加工食品中の保存料の含有量調査

新矢将尚^a, 油谷藍子^a, 工藤鮎子^a,
山口之彦^a, 山野哲夫^b

大阪市立環科研報告
平成 28 年度 第 79 集, 23-28 (2017)

水蒸気蒸留—固相抽出—HPLC 法による保存料 4 成分 (安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、プロピオン酸) の一斉分析法を、14 種類 92 検体の加工食品に適用した。いずれの保存料についても、本法は加工食品の種類を問わず良好な回収率が得られ、精度良く分析できることが示された。安息香酸はいずれも使用表示はなかったが、洋菓子、ナチュラルチーズ、ジャム、漬物 (キムチ)、食肉製品、魚介加工品から微量検出された。特にチーズにおいて検出頻度が高く、天然由来と考えられたが、その摂取量を見積もると一日摂取許容量の 1/10,000 に過ぎず、食品の安全性や健康に対する懸念はないと考えられた。ソルビン酸とプロピオン酸は、使用表示のあった検体から検出された。デヒドロ酢酸は、いずれの検体からも検出されなかった。ソルビン酸の使用表示のあった検体について、本法と通知法の分析結果を比較したところ、きわめて良好な相関関係が認められたことから、本法は通知法と同等に有効であることが示された。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

Survey of preservatives content in processed foods by HPLC after steam distillation and solid-phase extraction

大阪市内河川における人工甘味料の分布状況

山口之彦^a, 山本敦史^b, 角谷直哉^a

大阪市立環科研報告
平成 28 年度 第 79 集, 29-34 (2017)

大阪市内河川において人工甘味料 (アセシルファム, ACE、サッカリン, SAC、サイクラミン酸, CYC、アスパルテーム, APM、スクラロース, SUC) の河川水中濃度を測定し、その分布状況を明らかにした。また、これらの起源が下水処理場であるとする報告もあることから、大阪市内の下水処理場との地理的關係を考察した。分析方法は、これまでの方法に若干の検討を行い、改良した。検討は、①固相カートリッジ、②溶出溶媒のメタノール比率、③LC/MS/MS 条件の 3 点である。①は、HLB、C₁₈、PS-2 で行ったが、HLB が全体的に良好であった。②は、溶出溶媒としてメタノールの割合を 10%から 100%まで 10%刻みで割合を変えたところ、メタノールの割合が 50%以上で対象とした人工甘味料の溶出率が 100%以上であることから、溶出溶媒は 60%メタノール水を用いた。③は、SUC の定量下限が他の人工甘味料と比較して 10 倍以上高いことから、LC/MS/MS の条件を再検討した。SUC のイオン化モードをネガティブからポジティブに変えることで、定量下限が 1/10 となった。APM も同様の結果が得られた。大阪市内河川において ACE、SAC、SUC の 3 種類が検出され、それぞれ、0.10-5.6、<0.01-1.1、0.13-3.9 μ g/L であった。これらのおお阪市内河川における分布は、濃度が高い採取地点の上流には大阪市および大阪府の下水処理場が位置しており、下水処理場の放流水が河川水の濃度に影響していることは十分考えられる。これらのことから検出された人工甘味料の起源は下水処理場であると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品 2 課

b 公立鳥取環境大学環境学部

Distribution of artificial sweeteners in rivers throughout Osaka City

2016年に大阪市内の食中毒原因調査で
検出された下痢原性微生物

中村寛海^a, 後藤 薫^a, 梅田 薫^a,
山本香織^a, 入谷展弘^a, 阿部仁一郎^a,
久保英幸^a, 改田 厚^a, 上林大起^b,
山元誠司^a, 平山照雄^a, 平井有紀^a,
山崎一夫^a, 長谷 篤^a, 小笠原 準^a

大阪市立環科研報告
平成 28 年度 第 79 集, 49-54 (2017)

2016年に食中毒、有症苦情などで当研究所に検体が搬入された106件(578検体)について下痢原性微生物の検出を行った。検査数は、患者および調理人の便および吐物507検体、食品、ふき取りなどが71検体で、計578検体あった。106件中81件(76.4%)から下痢原性微生物が検出された。81件の内訳は、ノロウイルスが検出されたものが38件、カンピロバクター36件(うち、ノロウイルス、サルモネラのいずれかが同時に検出された事例が2件)、サルモネラ2件、腸管出血性大腸菌O157が2件、ウェルシュ菌1件、黄色ブドウ球菌1件、ウェルシュ菌と黄色ブドウ球菌が同時に検出された事例が1件であった。全国的な傾向と同様、ノロウイルスとカンピロバクターの検出が多かった。大阪市内においては、カンピロバクター検出事例数の割合に増加傾向が認められることから、カンピロバクター食中毒を予防するための対策が望まれる。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

Enteric pathogens detected during investigation of
food poisoning outbreaks in Osaka City in 2016

編集委員

岡村 俊男
坂田 淳子
○ 沢辺 善之
高田 利香
田口 真澄
肥塚 利江
宮本 伊織
山崎 一夫
吉光 真人
(○ 編集委員長)

査読委員

大島 智子
起橋 雅浩
川津 健太郎
高木 総吉
田上 貴臣
西村 公志
福井 直樹
吉田 俊明
吉光 真人
依田 知子

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

研究年報 第1号 平成29年度

ISSN 2433-5819

(無断転載禁止)

平成30年2月

編集・発行 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

大阪市東成区中道1丁目3番69号

電話 06-6972-1321