

ISSN 2433-5819

研 究 年 報

令和元年度

第3号

ANNUAL REPORT
OF
OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.3
(2019)

目 次

報 文

2009 インフルエンザパンデミック前後における大阪の成人のパンデミックウイルスに対する抗体レスポンス 奥野良信, 森川佐依子, 佐々木正大, 鶴飼友彦, 廣井 聡, 中田恵子, 山岸良匡, 今野弘規, 木山昌彦, 磯 博康	1
大阪府におけるエンテロウイルスおよびパレコウイルス A 感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2018 年度) 中田恵子, 本村和嗣	9
大阪府内における 2018/2019 シーズンのインフルエンザ流行状況 森川佐依子, 廣井 聡, 本村和嗣	17
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 (2018 年度) 青山幾子, 佐々木正大, 山崎貴子, 弓指孝博	26
2018 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, 平井佑治, 福田昭, 阿部仁一郎, 久保英幸, 改田厚, 山元誠司, 馬場孝, 平井有紀, 江川和孝, 長谷篤, 秋吉充子, 柴川紗恵子, 山崎一夫, 小笠原準	34
冷凍果実小分け施設における <i>Listeria monocytogenes</i> 汚染状況 中村寛海, 平井佑治, 武藤光伸, 宮木行雄, 小山浩嗣, 山本雅由, 中野有一, 説田景, 奥原潤, 小笠原準	40
LC-MS による飲料中に混入された界面活性剤の分析 柿本 葉, 山口瑞香, 角谷直哉	48
畜産物中のネオニコチノイド系農薬およびフィプロニル一斉分析法の妥当性評価 辻野正樹, 北川陽子, 山口瑞香, 栗津 薫, 野村千枝, 永吉晴奈, 白川育子, 角谷直哉	57
ククルピタシン類分析法の検討 山口瑞香, 辻野正樹, 角谷直哉	64
溶媒抽出-固相精製および液体クロマトグラフによる食品中の保存料 9 種類の一斉分析の検討 山崎朋美, 野村千枝, 栗津 薫, 柿本 葉, 山口瑞香, 藤原拓也, 角谷直哉	69
水質検査における外部精度管理 (2017 年度) - ベンゼン - 小泉義彦	75
水質検査における外部精度管理 (2017 年度) - 鉛及びその化合物 - 吉田 仁, 中島孝江	83

室内空气中 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート及び 2-エチル-1-ヘキサノールの分析法の検討	吉田俊明, 味村真弓, 大嶋智子, 山口進康	89
水質検査における定量精度に影響を及ぼす因子の解明 (2018 年度) —大阪府建築物飲料水水質検査業—	中島孝江, 安達史恵, 小泉義彦	96
「ただし書きの運用」による人槽緩和規定の事後検証調査	安達史恵, 吉田 仁, 高塚 遼, 長尾綾佳, 光田聖庸, 土屋 誠	106
大阪府における環境および食品中放射能調査 (平成 30 年度報告)	肥塚利江, 大山正幸, 山口進康	119
抄 録		
ベトナム・ホーチミンの食品から分離した ESBL 産生大腸菌が保有する <i>mcr-1</i> および-3 について (英文)	山口貴弘, 河原隆二, 原田和生, 照屋志帆乃, 中山達哉, 元岡大祐, 中村昇太, Nguyen Do Phuc, 久米田裕子, Dang Van Chinh, 平田收正, 山本容正	129
高齢者施設における感染症の発生予防と制御に関する最近の動向 (英文)	刈谷直子, 左近直美, 駒野 淳, 朝野和典, 磯 博康	129
日本で発生したノロウイルス GII.P17_GII.17 に汚染した海苔を原因とする食中毒 (英文)	左近直美, 貞升健志, 新開敏行, 濱島洋介, 吉富秀亮, 松島勇紀, 高田理香, 寺杣文男, 中村麻子, 駒野 淳, 長澤耕男, 清水英明, 片山和彦, 木村博一	130
大阪府において注目すべき感染症	左近直美, 倉田貴子, 川畑拓也, 小島洋子, 弓指孝博	130
糞便検体処理作業が簡易化された one-step リアルタイム PCR 法によるノロウイルスゲノム検出キットの性能評価	寺内謙太, 松本弘嵩, 山崎友実, 黒板 敏弘, 曾我部敦, 荒川 琢, 左近直美	131
iPSC 由来腸管上皮細胞を用いたノロウイルスの培養 (英文)	佐藤慎太郎, 久家広大, 黒川志保, 鈴木明男, 左近直美, 内田洋平, 幸 義一, 清野宏	131
小児エンテロウイルスおよびヒトパレコウイルス感染の初期マーカーとしての尿中 $\beta 2$ -ミクログロブリン (英文)	東 純史, 山本威久, 櫻井美帆子, 天羽竜子, 山田知絵子, 橋本香映, 梶田聡実, 山本恭子, 木島衣理, 溝口好美, 中田恵子, 下辻常介, 大藪恵一	132
早期より尿中 $\beta 2$ microglobulin が高値を示したヒトパレコウイルス 3 型感染症の 4 例	山田知絵子, 東 純史, 石見壮史, 新田統昭, 天羽竜子, 櫻井美帆子, 木島衣理, 中田恵子, 溝口好美, 下辻常介, 山本威久	132
大阪府における急性弛緩性麻痺患者の検査状況と EV-D68 が検出された患者の症例報告	中田恵子, 本村和嗣, 生田和良, 小林和夫, 奥野良信	133

インドネシア渡航者から検出された遺伝子型 1E の風疹ウイルス(英文)	
上林大起, 倉田貴子, 西野裕香, 折井 郁, 瀧井雄基, 木下 優, 大原俊剛, 本村和嗣, 弓指孝博	133
成人における風疹 IgM 抗体価の診断的価値について(英文)	
倉田貴子, 内野清子, 堀田千恵美, 小倉 惇, 三好龍也, 田中智之, 小川知子, 弓指孝博, 上林大起, 駒野 淳	134
日本脳炎ワクチン接種者より樹立したヒト型抗ウエストナイルウイルス抗体(英文)	
小澤龍彦, 正木秀幸, 高崎智彦, 青山幾子, 弓指孝博, 山中敦史, 小西英二, 大貫 耀, 村口 篤, 岸 裕幸	134
大阪で捕獲されたアライグマとマダニ媒介感染症	
青山幾子	135
抗菌薬耐性決定基と系統の分布と進化を明らかにするための淋菌ゲノムサーベイランス (英文)	
矢原耕史, 中山周一, 志牟田健, 李 謙一, 森田唱知, 川畑拓也, 黒木俊郎, 渡邊裕子, 大屋日登美, 安田 満, 出口 隆, ディデロット・ザビエル, 大西 真	135
日本人における Geenius HIV 1/2 確認検査法と HIV-1 及び HIV-2 ウェスタンブロット法の 比較評価(英文)	
近藤真規子, 須藤弘二, 佐野貴子, 川畑拓也, 井戸田一朗, 岩室紳也, 吉村幸浩, 立川夏夫, 小島洋子, 森 治代, 藤原 宏, 長谷川直樹, 加藤真吾	136
異性愛者と MSM では循環する梅毒トレポネーマ株が異なっている(英文)	
小島洋子, 古林敬一, 川畑拓也, 森 治代, 駒野 淳	136
RPR 陰性の第 1 期梅毒	
古林敬一, 小島洋子, 川畑拓也	137
農場環境における薬剤耐性維持におけるハエの役割(英文)	
福田昭, 臼井優, 岡村 雅史, 胡東良, 田村豊	137
タイのハエが保有する腸内細菌科細菌におけるセファロスポリン(<i>bla</i>)/コリスチン(<i>mcr</i>)遺伝子 (英文)	
福田昭, 臼井優, 大久保寅彦, 田垣智衣, Chanchai Boonla, 田村豊	138
ドリアン・グレイの肖像: 貝殻の溶出により淡水性および汽水性巻貝は死貝に変装擬態する (英文)	
山崎一夫	138
日本における新しい外来クモバチ <i>Lissocnemis brevipennis</i> の発見(英文)	
松本吏樹郎, 三宅博己, 山崎一夫, 青野孝昭, 清水晃	139
シカ肉の生食による肺吸虫感染の可能性	
松尾加代子, 森部絢嗣, 高島康弘, 粕谷志郎, 吉田彩子, 阿部仁一郎, ウィラチャイ・サイジュンタ, 吾妻健	139
重度の脱水と下痢を呈した 1 か月 齢のオオフロウに由来する新規鳥 寄生クリプトスポリジウ ムの遺伝子型(英文)	
牧野幾子, 犬丸瑞枝, 阿部仁一郎, 佐藤雪太	140

室内外の環境に由来する真菌 <i>Ochroconis</i> 属株間の遺伝的、生物学的相異 (英文)	
浜田信夫, 阿部仁一郎	140
アカアマダイより検出された <i>Philometroides branchiostegi</i> に類似した線虫の寄生部位とその遺伝子解析	
阿部仁一郎, 青野慎太郎, 馬場孝	141
分化した不死化ヒト気管上皮細胞におけるライノウイルス C の増殖 (英文)	
中内美名, 永田典代, 高山郁代, 齊藤慎二, 久保英幸, 改田厚, 大場邦弘, 小田切孝人, 影山努	141
日本国内における結核高罹患地域の結核分子疫学解析 -北京新興型結核菌の伝播リスク因子としての検討-(英文)	
山本香織, 竹内昌平, 瀬戸順次, 下内昭, 小向潤, 長谷篤, 中村寛海, 梅田薫, 平井有紀, 松本健二, 小笠原準, 和田崇之, 山本太郎	142
ヒトチトクローム P450 酵素 CYP1 及び CYP2A によるクロロピレンの酸化的代謝挙動 (英文)	
島田 力, 村山 典恵, 柿本 健作, 竹中 重雄, Y. R. LIM, S. YEOM, D. KIM, 山崎 浩史, F.P. GUENGERICH, 小森 雅之	142
2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) 及び 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB 183) のキラル選択的酸化に寄与するヒトチトクローム P450 の同定 (英文)	
永吉 晴奈, 柿本 健作, 小西 良昌, 梶村 計志, 中野 武	143
GC-MS を用いた分析での共存農薬による対象農薬のピーク増強効果 (英文)	
吉光 真人, 阿久津 和彦, 北川 陽子, 高取 聡, 福井 直樹, 小阪田 正和, 山口 聡子, 並河 幹夫, 伴 創一郎, 大久保 祥嗣, 中島 涼, 丸山 量子, 角谷 直哉, 宮本 伊織, 山下 浩一, 西山 隆之, 神藤 正則, 山本 直美, 高井 靖智, 樋下 勝彦, 梶村 計志, 尾花 裕孝, 渡辺 卓穂	143
アフラトキシン B ₁ , B ₂ , G ₁ , 及び G ₂ と高い反応性を示すモノクローナル抗体を用いた総アフラトキシン測定用 ELISA の開発 (英文)	
山崎朋美, 三宅司郎, 佐藤夏岐, 平川由紀, 岩佐精二, 成田宏史, 渡辺卓穂	144
表面プラズモン共鳴を利用したイムノセンサーによるヒト細胞表面の c-Kit の特異的検出 (英文)	
三宅司郎, 入倉大祐, 山崎朋美	144
表面プラズモン共鳴を利用したイムノセンサーによる c-Kit を発現する肥満細胞の検出とセンサー表面への抗体の固相化法の工夫による高感度化 (英文)	
三宅司郎, 入倉大祐, 山崎朋美	145
マウスに対する自然酸化オリーブ油投与後の IL-18 および IFN-gamma の発現は接触性過敏反応を増強する (英文)	
荻野 泰史, 村野 晃一, 奥野 智史, 坂崎 文俊, 荒川 友博, 上野 仁	145
自然酸化オリーブ油は、エフェクター T 細胞への分化促進や抗原特異的 IFN- γ 産生を増加させ、接触性過敏反応を増悪化する (英文)	
荻野 泰史, 奥野 智史, 村野 晃一, 荒川 友博, 上野 仁	146
アレルギーを指標とした調理器具における残留オレンジ果汁の洗浄方法の評価 (英文)	

清田恭平, 坂田淳子, 村上太郎, 吉光真人, 阿久津和彦, 紀雅美, 橋本博行, 梶村計志, 山野哲夫	146
危険ドラッグ製品中の 4'-methyl- α -pyrrolidinohexanophenone 及び 4-methyl- α - ethylaminopentiphenone の合成不純物としてのピロバレロンの検出 (英文)	
田上貴臣, 土井崇広, 武田章弘, 浅田安紀子, 清田恭平, 沢辺善之	147
軟カプセル状健康食品の外皮から検出された新規ホスホジエステラーゼ阻害剤の構造解析 (英文)	
土井崇広, 高橋和長, 山崎翠, 浅田安紀子, 武田章弘, 清田恭平, 田上貴臣, 沢辺善之, 山野哲夫	147
ビンロウジについて(2) クリーンアナリシスを指向した分析法の検討	
田上貴臣, 有本恵子, 石原理恵, 伊藤美千穂, 居村克弥, 大井逸輝, 岡坂衛, 河端昭子, 酒井英二, 嶋田宏志, 嶋田康男, 高井善孝, 西尾雅世, 野村涼坪, 松田久司, 松本卓也, 守安正恭, 山本豊, 横倉胤夫	148
黄砂飛来が下流域の大気中の細菌群集に与える影響 (英文)	
朴 鐘旭, 李 品芳, 一條知昭, 那須正夫, 山口進康	148
マイクロ流路デバイスを用いた食中毒菌の迅速 on-site 検出および定量 (英文)	
山口進康	149
ラットのベースライン肺抵抗と Muc5ac に対する亜硝酸の影響 (英文)	
大山正幸, 堀江一郎, 磯濱洋一郎, 東 賢一, 安達修一, 峰島知芳, 竹中規訓	149
室内環境測定と保護者・保育士を対象としたアンケート調査による保育所の内装木質化の 評価-大阪府産の無垢ヒノキ材を対象として-	
萬羽郁子, 大山正幸, 中島孝江, 東 賢一	150
母子関係と化学物質過敏状態の背景要因 (英文)	
東 賢一, 大山正幸, 東恵美子, 中島孝江	150
パッシブサンプリングー溶媒抽出法による室内空气中防虫剤成分ナフタレンおよび <i>p</i> -ジクロロベンゼンの同時分析	
吉田俊明, 味村真弓	151
環境水からのレジオネラ属菌検査の現状と課題	
枝川亜希子	151
講座「環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御」[1]はじめに	
枝川亜希子	152
講座「環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御」[5]環境水からのレジオネラ 属菌の検出 培養法と遺伝子検査法	
枝川亜希子	152
高度浄水処理による浄水処理対応困難物質の処理特性	
吉田 仁, 高木総吉, 小泉義彦, 安達史恵, 中島孝江, 松田大輔, 上田航太郎, 古林祐正, 井上裕彦, 林信吾, 山口進康	153

学位論文概要

ウエルシュ菌新型エンテロトキシン BEC の同定と機能解析および遺伝子診断法の開発 余野木伸哉	154
日本国内における結核高罹患地域の結核分子疫学解析 - 北京新興型結核菌の伝播リスク因子としての検討 - 山本香織	157

ANNUAL REPORT OF OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

CONTENTS

Original Articles

Antibody responses against pandemic virus in adults of Osaka before and after 2009 influenza pandemic Y. OKUNO, S. MORIKAWA, T. SASAKI, T. UKAId., S. HIROI, K. NAKATA, K. YAMAGISHI, H. IMANO, M. KIYAMA and H. ISO	1
Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus and human parechovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2018 Report) (in Japanese) K. NAKATA and K. MOTOMURA	9
Influenza activity during the 2018/2019 season in Osaka prefecture (in Japanese) S. MORIKAWA, S. HIROI and K. MOTOMURA	17
Mosquito-Borne Virus Surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2018 Report) (in Japanese) I. AOYAMA, T.SASAKI, T.YAMASAKI and T. YUMISASHI	26
Enteric pathogens detected during investigation of food poisoning outbreaks in Osaka City in 2018 (in Japanese) H. NAKAMURA, K. GOTO, K. UMEDA, K. YAMAMOTO, Y. HIRAI, A. FUKUDA, N. ABE, H. KUBO, A. KAIDA, S. P. YAMAMOTO, T. BABA, Y. HIRAI, K.EGAWA, A. HASE, A. AKIYOSHI, S. SHIBAKAWA, K. YAMAZAKI and J. OGASAWARA	34
<i>Listeria monocytogenes</i> contamination in frozen fruits repackaging plants (in Japanese) H. NAKAMURA, Y. HIRAI, M. MUTOU, Y. MIYAKI, H. KOYAMA, Y. NAKANO, A. SETSUDA, J. OKUHARA, and J. OGASAWARA	40
Analysis of surfactants contaminated in the beverages using LC-MS (in Japanese) Y. KAKIMOTO, M. YAMAGUCHI and N. KAKUTANI	48
Validation study for analytical method of Neonicotinoid Pesticides and Fipronil in livestock products (in Japanese) M. TSUJINO, Y. KITAGAWA, M. YAMAGUCHI, K. AWAZU, C. NOMURA, H. NAGAYOSHI, I. SHIRAKAWA , N. KAKUTANI	57

Examination of cucurbitacins analysis method (in Japanese)	
M. YAMAGUCHI, M. TSUJINO, N. KAKUTANI	64
Simultaneous analysis of nine preservatives in foods by solvent extraction and HPLC (in Japanese)	
T. YAMASAKI, C. NOMURA, K. AWAZU, Y. KAKIMOTO, M. YAMAGUCHI, T. FUJIWARA and N.KAKUTANI	69
Results of external quality control on the analytical measures for benzene in tap water, performed in 2017 in Osaka Prefecture (in Japanese)	
Y. KOIZUMI	75
Results of external quality control on the analytical methods for lead in tap water, performed in 2017 in Osaka Prefecture (in Japanese)	
J. YOSHIDA and T. NAKAJIMA	83
Analytical method for 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediolmonoisobutyrate, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanedioldiisobutyrate and 2-ethyl-1-hexanol in indoor air (in Japanese)	
T. YOSHIDA, M. MIMURA, T. OOSHIMA and N. YAMAGUCHI	89
Results of external quality control on the analytical measures for iron and total residue in drinking water, performed in 2018 in Osaka Prefecture (in Japanese)	
T. NAKAJIMA, F. ADACHI and Y. KOIZUMI	96
Verification survey of Johkasou after implementation of new standards (in Japanese)	
F. ADACHI, J. YOSHIDA, R. TAKATSUKA, A. NAGAO, A. MITSUDA and M. TSUCHIYA	106
Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2018 Report) (in Japanese)	
T. HIZUKA, M. OHYAMA and N. YAMAGUCHI	119

Abstracts

The presence of colistin resistance gene <i>mcr-1</i> and -3 in ESBL producing <i>Escherichia coli</i> isolated from food in Ho Chi Minh City, Vietnam.	
T. YAMAGUCHI, R. KAWAHARA, K. HARADA, S. TERUYA, T. NAKAYAMA, D. MOTOOKA, S. NAKAMURA, P. D. NGUYEN, Y. KUMEDA, C. V. DANG, K. HIRATA and Y. YAMAMOTO	129
Current prevention and control of health care-associated infections in long-term care facilities for the elderly in Japan	
N. KARIYA, N. SAKON, J. KOMANO, K. TOMONO and H. ISO.	129
Foodborne Outbreaks Caused by Human Norovirus GII.P17-GII.17-Contaminated Nori, Japan, 2017	
N. SAKON, K. SADAMASU, T. SHINKAI, Y. HAMAJIMA, H. YOSHITOMI, Y. MATSUSHIMA, R. TAKADA, F. TARASOMA, A. NAKAMURA, J. KOMANO, K. NAGASAWA, H. SHIMIZU, K. KATAYAMA, H. KIMURA	130
Recent topics in public health of infectious diseases in Osaka (in Japanese)	
N.SAKON, T.KURATA, T.KAWAHATA, Y.KOJIMA, T.YUMISASHI	130
Evaluation of One-Step Real-Time PCR Kit Employing Quick Fecal Processing Protocol For Rapid Norovirus Genome Detection (in Japanese)	
K.TERAUCHI, H.MATSUMOTO, T.YAMAZAKI, T.KUROITA, A.SOGABE, T.ARAKAWA, N.SAKON	131

Human norovirus propagation in human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells S.SATO, K.HISAIE, S. KUROKAWA, A. SUZUKI, N.SAKON, Y.UCHIDA, Y.YUKI, and H. KIYONO	131
Urinary β 2-microglobulin as an early marker of infantile enterovirus and human parechovirus infections. J. AZUMA, T. YAMAMOTO, M. SAKURAI, R. AMOU, C. YAMADA, K. HASHIMOTO, S. KAJITA, K. YAMAMOTO, E. KIJIMA, Y. MIZOGUCHI, K. NAKATA, T. SHIMOTSUJI and K. OZONO	132
Four cases of human parechovirus-3 infection: An evidence of highly elevated urinary β 2 microglobulin levels in the early onset periods (in Japanese) C. YAMADA, J. AZUMA, S. ISHIMI, T.NITTA, C. AMOU, M. SAKURAI, R. KIJIMA, K. NAKATA, Y. MIZOGUCHI, T. SHIMOTUJI and T. YAMAMOTO	132
Case reports of acute flaccid paralysis patient detected EV-D68 in Osaka Prefecture (in Japanese) K. NAKATA, K. MOTOMURA, K. IKUTA, K. KOBAYASHI and Y. OKUNO	133
Rubella Virus Genotype 1E in Travelers Returning to Japan from Indonesia, 2017 D. KANBAYASHI, T. KURATA, Y. NISHINO, F. ORII, Y. TAKII, M. KINOSHITA, T. OHARA, K. MOTOMURA and T. YUMISASHI	133
Clinical Value of Enzyme Immunoassay that Detects Rubella-Specific Immunoglobulin M Immediately After Disease Onset T. KURATA, K. UCHINO, C. HOTTA, A. OGURA, T. MIYOSHI, T. TANAKA, T. OGAWA, T. YUMISASHI, D. KANBAYASHI and J. KOMANO	134
Human monoclonal antibodies against West Nile virus from Japanese encephalitis-vaccinated volunteers T. OZAWA, H. MASAKI, T. TAKASAKI, I.AOYAMA, T. YUMISASHI, A. YAMANAKA, E. KONISHI, Y. OHNUKI, A. MURAGUCHI and K. KISHI	134
Raccoon and tick-borne infections in Osaka (in Japanese) I. AOYAMA	135
Genomic surveillance of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> to investigate the distribution and evolution of antimicrobial resistance determinants and lineages K. YAHARA, S. NAKAYAMA, K. SHIMUTA, K. LEE, M. MORITA, T. KAWAHATA, T. KUROKI, Y. WATANABEd, H. OHYA, M. YASUDA, T. DEGUCHI, X. DIDELOT and M. OHNISHI	135
Comparative evaluation of the Geenius TM HIV 1/2 Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2 Western blots in the Japanese population M. KONDO, K. SUDO, T. SANO, T. KAWAHATA, I. ITODA, S. IWAMURO, Y. YOSHIMURA, N. TACHIKAWA, Y. KOJIMA, H. MORI, H. FUJIWARA, N. HASEGAWA and S. KATO	136
Circulation of Distinct <i>Treponema pallidum</i> Strains in Individuals with Heterosexual Orientation and Men Who Have Sex with Men (MSM) Y. KOJIMA, K. FURUBAYASHI, T. KAWAHATA, H. MORI and J. KOMANO	136
RPR negative primary syphilis (in Japanese) K. FURUBAYASHI, Y. KOJIMA and T. KAWAHATA	137
The role of flies in the maintenance of antimicrobial resistance in farm environments A. FUKUDA, M. USUI, M. OKAMURA, D.-L. HU and Y. TAMURA	137

Co-harboring of cephalosporin (<i>bla</i>)/colistin (<i>mcr</i>) resistance genes among Enterobacteriaceae from flies in Thailand	A. FUKUDA, M. USUI, T. OKUBO, C. TAGAKI, N. SUNKPANYATHAM and Y. TAMURA · · · · ·	138
The Picture of Dorian Gray: shell corrosion allows freshwater and brackish-water gastropods to masquerade as empty shells	K. YAMAZAKI · · · · ·	138
Discovery of a new, adventive, spider wasp, <i>Lissocnemis brevipennis</i> , in Japan (Hymenoptera: Pompilidae: Ctenocerinae)	R. MATSUMOTO, H. MIYAKE, K. YAMAZAKI, T. AONO and A. SHIMIZU · · · ·	139
Possibility of paragonimiasis due to consumption of raw deer meat (in Japanese)	K. MATSUO, J. MORIBE, Y. TAKASHIMA, S. KASUYA, A. YOSHIDA, N. ABE, W. SAIJUNTHA and T. AGATSUMA · · · · ·	139
A new avian <i>Cryptosporidium</i> genotype in a 1-month-old caged brown wood owl (<i>Strix leptogrammica</i>) with severe dehydration and diarrhea	I. MAKINO, M. INUMARU, N. ABE and Y. SATO · · · · ·	140
Molecular and biological differences among <i>Ochroconis</i> strains collected from indoor and outdoor environments	N. HAMADA and N. ABE · · · · ·	140
Site of infection and genetic analysis of <i>Philometroides branchiostegi</i> -like nematode found in horsehead tilefish <i>Branchiostegus japonicus</i> (in Japanese)	N. ABE, S. AONO and T. BABA · · · · ·	141
Propagation of rhinovirus C in differentiated immortalized human airway epithelial cells	M. NAKAUCHI, N. NAGATA, I. TAKAYAMA, S. SAITO, H. KUBO, A. KAIDA, K. OBA, T. ODAGIRI and T. KAGEYAMA · · · · ·	141
Longitudinal genotyping surveillance of Mycobacterium tuberculosis in an area with high tuberculosis incidence shows high transmission rate of the modern Beijing subfamily in Japan	K. YAMAMOTO, S. TAKEUCHI, J. SETO, A. SHIMOUCHE, J. KOMUKAI, A. HASE, H. NAKAMURA, K. UMEDA, Y. HIRAI, K. MATSUMOTO, J. OGASAWARA, T. WADA, and T. YAMAMOTO · · · · ·	142
Oxidation of 1-chloropyrene by human CYP1 family and CYP2A subfamily cytochrome P450 enzymes: catalytic roles of two CYP1B1 and five CYP2A13 allelic variants	T. SHIMADA, N. MURAYAMA, K. KAKIMOTO, S. TAKENAKA, Y.R. LIM, S. YEOM, D. KIM, H. YAMAZAKI, F.P. GUENGERICH and M. KOMORI · · · ·	142
Determination of the human cytochrome P450 monooxygenase catalyzing the enantioselective oxidation of 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) and 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (PCB 183)	H. NAGAYOSHI, K. KAKIMOTO, Y. KONISHI, K. KAJIMURA and T. NAKANO	143
Enhancement of Pesticide Peak Response in GC-MS in the Presence of Multiple Co-Existing Reference Pesticides	M. YOSHIMITSU, K. AKUTSU, Y. KITAGAWA, S. TAKATORI, N. FUKUI, M. OSAKADA, S. YAMAGUCHI, M. NAMIKAWA, S. BAN, Y. OKUBO, R. NAKASHIMA, R. MARUYAMA, N. KAKUTANI, I. MIYAMOTO, K. YAMASHITA, T. NISHIYAMA, M. SHINTO, N. YAMAMOTO, Y. TAKAI, K. HINOSHITA, K. KAJIMURA, H. OBANA and T. WATANABE	143

Development of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of total aflatoxins based on monoclonal antibody reactive with aflatoxins B ₁ , B ₂ , G ₁ , and G ₂	
T. YAMASAKI, S. MIYAKE, N. SATO, Y. HIRAKAWA, S. IWASA, H. NARITA and T. WATANABE · · · · ·	144
Specific detection of c-Kit expressed on human cell surface by immunosensor based on surface plasmon resonance	
S. MIYAKE, D. IRIKURA, T. YAMASAKI · · · · ·	144
Detection of mast cells expressing c-Kit using antibody covalently bound to gelatin elongated from surface of immunosensor based on surface plasmon resonance	
S. MIYAKE, D. IRIKURA, T. YAMASAKI · · · · ·	145
IL-18 and IFN-gamma expression enhances contact hypersensitivity after oral administration of naturally oxidized olive oil to mice	
H. OGINO, K. MURANO, T. OKUNO, F. SAKAZAKI, T. ARAKAWA and H. Ueno	145
Naturally oxidized olive oil exacerbates contact hypersensitivity by promoting differentiation into effector T cells and increasing antigen-specific IFN- γ production	
H. OGINO, T. OKUNO, K. MURANO, T. ARAKAWA and H. UENO · · · · ·	146
Evaluation of cleaning methods for residual orange extract on different cookware materials using ELISA with profilin allergen indicator	
K. KIYOTA, J. SAKATA, T. SATSUKI-MURAKAMI, M. YOSHIMITSU, K. AKUTSU, M. KI, H. HASHIMOTO, K. KAJIMURA and T. YAMANO · · · · ·	146
Detection of pyrovalerone as a possible synthetic by-product of 4'-methyl- α -pyrrolidinohexanophenone and 4-methyl- α -ethylaminopentiphenone in illicit drug products	
T. TAGAMI, T. DOI, A. TAKEDA, A. ASADA, K. KIYOTA and Y. SAWABE · · · · ·	147
Characterization of a new illicit phosphodiesterase-type-5 inhibitor identified in the softgel shell of a dietary supplement	
T. DOI, K. TAKAHASHI, M. YAMAZAKI, A. ASADA, A. TAKEDA, K. KIYOTA, T. TAGAMI, Y. SAWABE and T. YAMANO · · · · ·	147
Studies on Arecae Semen (In Jananese)	
T. TAGAMI, K. ARIMOTO, R. ISHIHARA, M. ITO, K. IMURA, I. OI, M. OKASAKA, A. KAWABATA, E. SAKAI, H. SHIMADA, Y. SHIMADA, Y. TAKAI, K. NISHIO, R. NOMURA, H. MATSUDA, T. MATSUMOTO, M. MORIYASU, Y. YAMAMOTO and T. YOKOKURA · · · · ·	148
Effects of Asian dust events on atmospheric bacterial communities at different distances downwind of the source region	
J. PARK, P-F. LI, T. ICHIJO, M. NASU and N. YAMAGUCHI · · · · ·	148
Rapid on-site detection and quantification of food-borne pathogens using microfluidic devices	
N. YAMAGUCHI · · · · ·	149
Effects of nitrous acid exposure on baseline pulmonary resistance and Muc5ac in rats	
M. OHYAMA, I. HORIE, Y. ISOHAMA, K. AZUMA, S. ADACHI, C. MINEJIMA and N. TAKENAKA · · · · ·	149

Evaluation of wooden interior of nurseries based on questionnaire surveys among guardians/childcare workers and indoor environment measurement – Case of solid Japanese cypress (<i>Chamaecyparis obtuse</i>) from Osaka Prefecture – (in Japanese)	
I. BAMBA, M. OHYAMA, T. NAKAJIMA and K. AZUMA	150
Background factors of chemical intolerance and parent-child relationships	
K. AZUMA, M. OHYAMA, E. AZUMA and T. NAKAJIMA	150
Simultaneous determination of moth-repellent, naphthalene and <i>p</i> -dichlorobenzene, in indoor air by passive sampling – solvent extraction (in Japanese)	
T. YOSHIDA and M. MIMURA	151
Current status and issues of examination method of <i>Legionella</i> bacteria in environmental water (in Japanese)	
A. EDAGAWA	151
The detection and control of <i>Legionella</i> host amoeba from environmental water [1] Opening remarks (in Japanese)	
A. EDAGAWA	152
The detection and control of <i>Legionella</i> host amoeba from environmental water [5] The detection of <i>Legionella</i> from environmental water – culture and genetic testing method (in Japanese)	
A. EDAGAWA	152
Advanced water treatment for removal of chemicals difficult to treat by aater purification (in Japanese)	
J. YOSHIDA, S. TAKAGI, Y. KOIZUMI, F. ADACHI, T. NAKAJIMA, D. MATSUDA, K. UEDA, Y. KOBAYASHI, H. INOUE, S. HAYASHI and N. YAMAGUCHI	153
Thesis summary	
Identification and characterization of Binary Enterotoxin of <i>Clostridium perfringens</i> , BEC, and development of clinical detection method for the genes	
S. YONOGI	154
Longitudinal genotyping surveillance of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in an area with high tuberculosis incidence shows high transmission rate of the modern Beijing subfamily in Japan	
K. YAMAMOTO	157

2009 インフルエンザパンデミック前後における大阪の成人のパンデミック ウイルスに対する抗体レスポンス

奥野良信^a、森川佐依子^b、佐々木正大^c、鵜飼友彦^{d,f}、廣井 聡^b、中田恵子^b
山岸良匡^e、今野弘規^f、木山昌彦^g、磯 博康^f

2009年4月～6月と2010年4月～6月に大阪府下の職場検診で採取された241名のペア血清を用い、2009パンデミック前後のインフルエンザA型のH1N1ワクチン株、A/Brisbane/59/2007とA/California/7/2009に対してHI価と中和価を測定した。2009年の血清によるA/Brisbane/59/2007に対する被験者のHI抗体陽性率は62.2%、中和抗体陽性率は49.4%と高かったが、A/California/7/2009に対しては中和抗体陽性率で7.1%と低かった。2010年の血清のA/California/7/2009に対する中和抗体陽性率は22.0%と高くなり、特に1970年以降に出生した被験者はそれ以前に出生した被験者よりも高く、45.7%を示した。この傾向は抗体陽転率にも反映し、若年成人がパンデミックウイルスに感染しやすかったことを裏付けた。

キーワード：2009 インフルエンザパンデミック、パンデミックウイルス、抗体陽転率

2009年4月にメキシコ、北米で発生したブタ由来のA亜型H1N1(H1N1pdm)ウイルスは、トリ、ヒト、ブタのインフルエンザウイルスを起源とする遺伝子再集合ウイルスで、それまで流行していたH1N1ウイルスとの抗原性は大きく変化していた¹⁾。このウイルスによる流行は短期間に世界中に拡大し、2009年5月、WHOは21世紀最初のパンデミックと宣言した²⁾。日本でH1N1pdmウイルスが最初に検出されたのは2009年5月9日で、最終的には日本国中に感染が拡大した³⁾。流行のピークは10月下旬から11月上旬で、2010年初頭には終息した。通常の季節性インフルエンザの流行のピークは1月末から2月上旬に多く、2009年は異例の流行であった。分離されたのはほとんどがH1N1pdmで、2009/2010シーズンはこのウイルス単独による流行であった。

A型インフルエンザウイルスのH1N1ウイルスは、スペインかぜの原因となった1918年からH2N2ウイルスが出現する1957年までヒトの間でインフルエンザの原因ウイルスとなってきた。その後、約20年間の間隔を置いて1977年にH1N1ウイルスがソ連かぜの原因として再出現し、2009年にH1N1pdmウイルスに置き換わるまでH1N1ウイルスとして流行を繰り返していた。したがって、ウイルスの暴露を十分に受けていない幼児・小児を除いて、H1N1pdm出現時にほとんどのヒトが自然感染、あるいはワクチンによりH1N1ウイルスに対して何らかの免疫を有していると考えられる。H1N1pdmウイルスに対してパンデミック前の血清抗体価を調べた米国、フィンランド、イタリア、台湾、イングランドからの報告によると、抗体陽性者の割合は小児、若年成人では低いが、

a 大阪健康安全基盤研究所

b 大阪健康安全基盤研究所ウイルス課

c 大阪大学微生物病研究所(元・大阪健康安全基盤研究所ウイルス課)

d 大阪健康安全基盤研究所健康危機管理課

e 筑波大学医学医療系社会健康医学研究室

f 大阪大学医学系研究科社会医学講座公衆衛生学

g 大阪保健医療財団大阪がん循環器病予防センター

年齢が上がるにしたがって高くなっていた⁴⁻⁸⁾。また、血清抗体価と発症者の相関を調べた香港、ベトナムからの報告では、発症者の割合は小児が圧倒的に高く、年齢が上がるにしたがって低くなっており、抗体陽性者の割合と同じ傾向を示していた^{9, 10)}。それ以外の国を含めた世界全体では、これらの傾向はほぼ同様であった¹¹⁻¹³⁾。日本における H1N1pdm ウイルスに対する抗体レスポンスを調べた研究は東京からの報告だけであり¹⁴⁾、海外との交流が盛んな大阪でも調査が必要と考えた。現時点で小児について調べるのは困難であるが、経年的に採取された成人の血清が保管されており、これを利用することにした。

2009 パンデミックによる大阪の住民の抗体レスポンスを調べるためには、流行前後に採血された同一人からの血清抗体価を測定しなければならない。そこで、大阪府内の職場検診で得られたパンデミック前（2009年4月～6月）とパンデミック後（2010年4月～6月）のペア血清の赤血球凝集阻止抗体価（HI 価）と中和抗体価（中和価）を測定した。チャレンジウイルスとして、パンデミック前のワクチン株である A/Brisbane/59/2007 とパンデミックウイルス株である A/California/7/2009 を用いた。測定結果を解析すれば出生年別の感染率が明らかになり、大阪における 2009 パンデミックの流行状況の一端が明らかにできると考えた。

研究 方 法

1. 被験血清

毎年実施している大阪府下の職場検診で得られた血清から、2009年4月～6月と2010年4月～6月に採取されたペア血清を抽出し、試験に供した。主に5か所の民間の事業所と、1か所の公的機関の職員から採血し、 -80°C で保管されていた血清を用いた。合計241名の検査対象者の最高齢は1926年生まれ、最年少は1983年生まれで、男性141名、女性100名であった。

2. HI 試験

HA 抗原として、2009年のパンデミック以前のワクチン株である A/Brisbane/59/2007 および H1N1pdm である A/California/7/2009 を用いて検討を行った。両株とも、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より分与された。被験者の血清は RDE (II) 「生研」(デンカ生研株式会社) を使用して非特異的インヒビター除去処理を行った後、モルモット血球の添加による赤血球自然凝集素の除去を行い、PBS にて10倍希釈に調整した。2段階希釈を行った血清 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ と8単位/50 μL に調整した HA 抗原 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ を混和し、室温で30分静置後0.7%のモルモット赤血球浮遊液 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ を添加し、室温で45分静置した。HI を示した血清の最大希釈倍数を HI 価とした。

3. 中和試験

RDE 処理した被験者の血清を10倍から2段階希釈した血清希釈液に100 TCID₅₀/50 μL に濃度を調整した A/Brisbane/59/2007 もしくは A/California/7/2009 ウイルス希釈液を等量混合し 34°C で1時間インキュベートを行った。あらかじめ96 well 平底マイクロプレートに培養した MDCK 細胞を100 $\mu\text{L}/\text{well}$ の無血清 DMEM 培地 (SIGMA) で洗浄し、血清-ウイルス反応液 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ を添加し 34°C にて30分インキュベートを行った。その後、上清を吸引し100 $\mu\text{L}/\text{well}$ の acetylated trypsin (SIGMA, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 加 DMEM を添加し、 34°C で72時間培養を行った。培養後、PBS で細胞を洗浄後にエタノールにて固定し、アミドブラック 10B (富士フィルム和光純薬, 0.1%w/v) 溶液を用いて染色を行った。ウイルス増殖を完全に抑制する血清の最大希釈倍数の逆数を中和価とした。

本研究は、大阪健康安全基盤研究所、大阪大学医学系研究科及び大阪保健医療財団大阪がん循環器病予防センターの倫理審査委員会の承認を得て「人を対象とする医学的研究に関する倫理指針」を遵守して実施したものである。

結 果

1. 出生年別抗体価

検査対象者の生年月日を基に、出生年別の HI 価と中和価を A/Brisbane/59/2007 と A/California/7/2009 に対して測定した(表1)。パンデミック前後(2009年と2010年)の A/Brisbane/59/2007 に対する HI 価(表1, a)と中和価(表1, b)、及び A/California/7/2009 に対する

HI 価 (表 1、c) と中和価 (表 1、d) を比較した。HI 価、中和価とも 1:10 以上の値を示せば抗体陽性とした。2009 血清 (2009 年に採取された血清) では、A/Brisbane/59/2007 に対して HI 抗体陽性率は 62.2% (150/241)、中和抗体陽性率は 49.4% (119/241) と高く、検査対象者の多くが出生年に関わらず 2009 パンデミック以前に H1N1 ウイルスの抗原暴露を受けていた。中和抗体陽性率では 2009 血清と 2010 血清 (50.6% (122/241)) との間に大きな差は認められなかったが、HI 抗体陽性率では 2010 血

清 (84.6% (204/241)) の方が 2009 血清よりも高い値を示した。2009 血清の A/California/7/2009 に対する中和抗体陽性率は 7.1% (17/241) と極めて低く、大部分の検査対象者は 2009 年以前にはパンデミックウイルス類似のウイルス抗原には暴露されていなかったと推測された。しかし、2010 血清の中和抗体陽性率は 22.0% (53/241) と上昇し、特に 1970 年以降に出生した被験者では 45.7% (16/35) と高い値を示した。

表 1 出生年別抗体価

(a)

出生年	人数	血清	HI 価(A/Brisbane/59/2007)								
			<10	10	20	40	80	160	320	640	>640
<1940	8	2009	0	5	3	0	0	0	0	0	0
		2010	0	5	1	1	1	0	0	0	0
1940-1944	29	2009	13	10	3	0	0	1	1	0	1
		2010	5	13	5	3	1	1	0	1	0
1945-1949	33	2009	15	7	7	2	2	0	0	0	0
		2010	6	14	7	5	1	0	0	0	0
1950-1954	39	2009	14	16	7	1	1	0	0	0	0
		2010	5	21	6	5	2	0	0	0	0
1955-1959	30	2009	14	12	4	0	0	0	0	0	0
		2010	9	18	2	1	0	0	0	0	0
1960-1964	38	2009	13	15	5	2	2	1	0	0	0
		2010	7	14	8	4	3	1	0	1	0
1965-1970	29	2009	14	9	4	0	2	0	0	0	0
		2010	3	16	6	1	3	0	0	0	0
1970-1979	22	2009	5	10	3	2	2	0	0	0	0
		2010	2	7	7	6	0	0	0	0	0
1979<	13	2009	3	4	0	2	3	1	0	0	0
		2010	0	4	2	3	3	1	0	0	0
総計	241	2009	91	88	36	9	12	3	1	0	1
		2010	37	112	44	29	14	3	0	2	0

(b)

出生年	人数	血清	中和価 (A/Brisbane/59/2007)								
			<10	10	20	40	80	160	320	640	>640
<1940	8	2009	4	1	1	2	0	0	0	0	0
		2010	2	4	1	1	0	0	0	0	0
1940-1944	29	2009	15	2	2	4	2	1	1	0	2
		2010	13	3	2	3	3	3	1	0	1
1945-1949	33	2009	19	5	0	3	3	3	0	0	0
		2010	21	1	3	3	4	0	1	0	0
1950-1954	39	2009	20	5	7	2	1	2	2	0	0
		2010	19	9	4	3	1	3	0	0	0
1955-1959	30	2009	16	3	2	3	4	2	0	0	0
		2010	16	5	1	4	3	0	1	0	0
1960-1964	38	2009	16	5	3	3	2	4	3	1	1
		2010	18	5	4	1	4	1	4	0	1
1965-1970	29	2009	16	1	0	6	3	0	1	2	0
		2010	16	2	3	2	3	2	0	1	0
1970-1979	22	2009	11	3	1	1	3	3	0	0	0
		2010	11	3	1	2	3	2	0	0	0
1979<	13	2009	5	0	0	3	2	0	1	1	1
		2010	3	1	0	4	1	1	2	0	1
総計	241	2009	122	25	16	27	20	15	8	4	4
		2010	119	33	19	23	22	12	9	1	3

(c)

出生年	人数	血清	HI 価 (A/California/7/2009)								
			<10	10	20	40	80	160	320	640	>640
<1940	8	2009	5	3	0	0	0	0	0	0	0
		2010	3	4	0	0	1	0	0	0	0
1940-1944	29	2009	27	2	0	0	0	0	0	0	0
		2010	20	6	2	1	0	0	0	0	0
1945-1949	33	2009	29	4	0	0	0	0	0	0	0
		2010	19	9	3	1	1	0	0	0	0
1950-1954	39	2009	34	5	0	0	0	0	0	0	0
		2010	27	9	2	0	0	0	0	1	0
1955-1959	30	2009	25	3	1	1	0	0	0	0	0
		2010	19	4	4	2	0	0	1	0	0
1960-1964	38	2009	31	6	0	1	0	0	0	0	0
		2010	22	9	3	1	3	0	0	0	0
1965-1970	29	2009	23	5	0	0	1	0	0	0	0
		2010	22	5	0	0	1	1	0	0	0
1970-1979	22	2009	20	1	1	0	0	0	0	0	0
		2010	12	3	3	0	2	1	1	0	0
1979<	13	2009	10	3	0	0	0	0	0	0	0
		2010	6	1	3	1	2	0	0	0	0
総計	241	2009	204	32	2	2	1	0	0	0	0
		2010	150	50	20	6	10	2	2	1	0

(d)

出生年	人数	血清	中和価 (A/California/7/2009)								
			<10	10	20	40	80	160	320	640	>640
<1940	8	2009	8	0	0	0	0	0	0	0	0
		2010	6	1	0	1	0	0	0	0	0
1940-1944	29	2009	29	0	0	0	0	0	0	0	0
		2010	27	0	1	0	1	0	0	0	0
1945-1949	33	2009	32	0	1	0	0	0	0	0	0
		2010	29	2	1	0	1	0	0	0	0
1950-1954	39	2009	38	1	0	0	0	0	0	0	0
		2010	35	3	0	0	0	0	0	1	0
1955-1959	30	2009	27	0	3	0	0	0	0	0	0
		2010	20	4	1	3	2	0	0	0	0
1960-1964	38	2009	33	3	1	1	0	0	0	0	0
		2010	28	4	4	1	1	0	0	0	0
1965-1970	29	2009	25	2	2	0	0	0	0	0	0
		2010	24	1	1	1	1	1	0	0	0
1970-1979	22	2009	20	2	0	0	0	0	0	0	0
		2010	14	2	2	2	1	1	0	0	0
1979<	13	2009	12	1	0	0	0	0	0	0	0
		2010	5	2	2	2	2	0	0	0	0
総計	241	2009	224	9	7	1	0	0	0	0	0
		2010	188	19	12	10	9	2	0	1	0

2. 出生年別抗体陽性率

抗体価が確実に陽性と考えられる 1 : 20 以上を示す対象者について、抗体陽性率を出生年別に示した (図 1)。図 1 の a、b、c、d は表 1 に対応して表した。A/Brisbane/59/2007 に対しては、いずれの出生年でも 2009 血清と 2010 血清の間の抗体陽性率に大きな違いは認められなかった (図 1a、b)。一方、A/California/7/2009 に対する 2009 血清については、HI 価、中和価とも陽性率は極めて低かったが、2010 血清では高くなり、特に 1970 年以降

に出生した対象者は高い値を示した。これは、若年齢層ほど H1N1pdm に感染した割合が高かったと推察された (図 1c、d)。

3. 出生年別抗体陽転率

HI 試験、中和試験とも 2009 血清と 2010 血清の抗体価を比較して、4 倍以上の上昇があれば抗体陽転 (感染) とみなされ、対象者は抗原暴露を受けたとされる。出生年別の抗体陽転率 (感染率) を HI 価、中和価で調べた (表 2)。A/California/7/2009

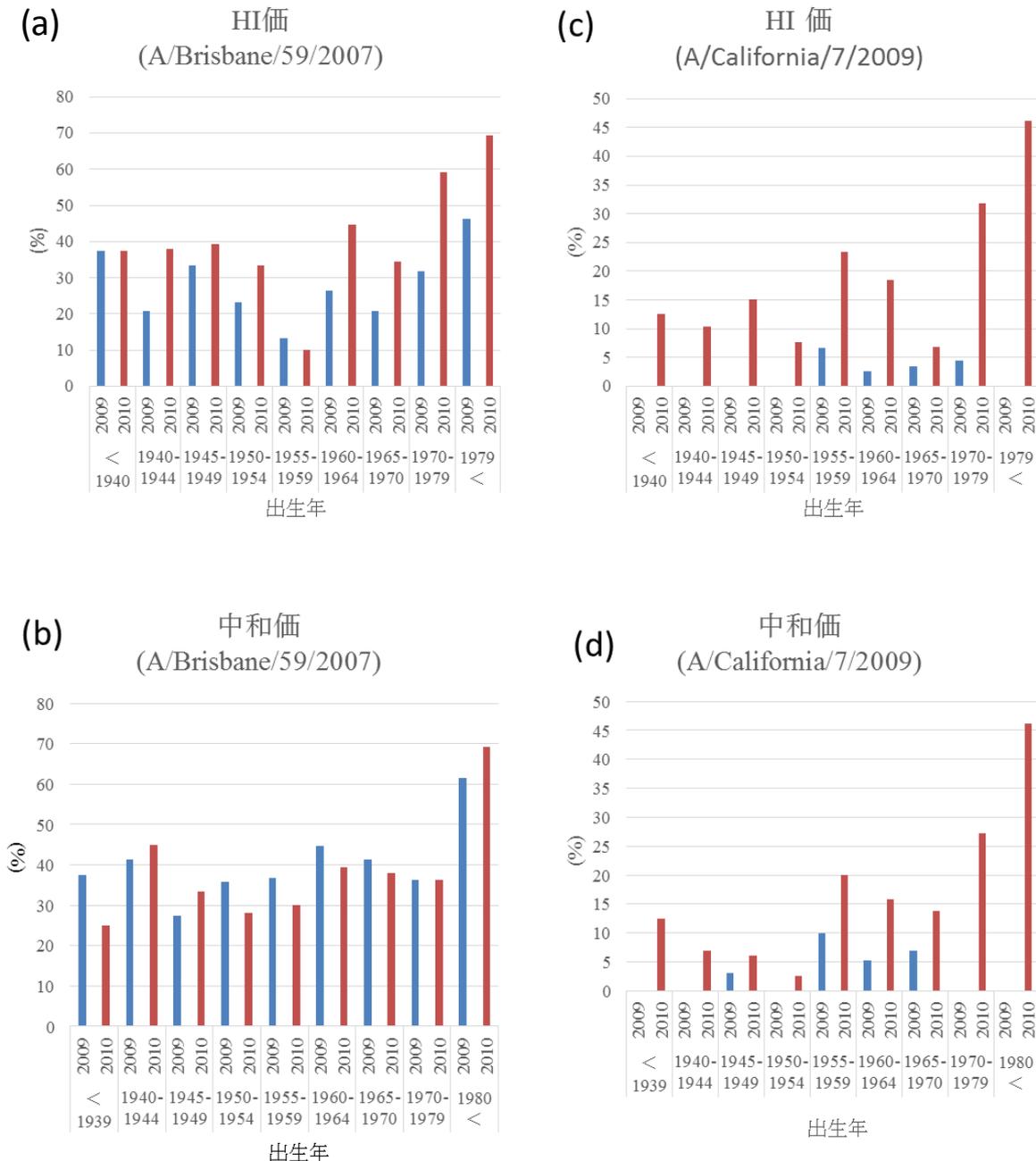


図 1 抗体価 1 : 20 以上を示す血清の割合

表2 出生年別抗体陽転率

HI 価

出生年	人数	A/Brisbane/59/2007		A/California/7/2009	
		抗体陽転数	抗体陽転率 (%)	抗体陽転数	抗体陽転率 (%)
<1940	8	2	25.0	1	12.5
1940-1944	29	2	6.9	3	10.3
1945-1949	33	4	12.1	4	12.1
1950-1954	39	8	20.5	3	7.7
1955-1959	30	1	3.3	5	16.7
1960-1964	38	6	15.8	6	15.8
1965-1969	29	4	13.8	2	6.9
1970-1979	22	5	22.7	6	27.3
1979<	13	3	23.1	6	46.2
総計	241	35	14.5	36	14.9

中和価

出生年	人数	A/Brisbane/59/2007		A/California/7/2009	
		抗体陽転数	抗体陽転率 (%)	抗体陽転数	抗体陽転率 (%)
<1940	8	0	0.0	1	12.5
1940-1944	29	3	10.3	2	6.9
1945-1949	33	1	3.0	2	6.1
1950-1954	39	0	0.0	1	2.6
1955-1959	30	1	3.3	5	16.7
1960-1964	38	2	5.3	4	10.5
1965-1969	29	2	6.9	3	10.3
1970-1979	22	1	4.5	6	27.3
1979<	13	1	7.7	6	46.2
総計	241	11	4.6	30	12.4

に対する抗体陽転率は若年齢層ほど高くなり、特に1970年以降に出生した成人が高かった。これらの成績は、若年齢層ほどH1N1pdmに感染した割合が高かったとする図1の結果を裏付けた。A/Brisbane/59/2007に対しては、どの出生年でもHI抗体陽性率は中和抗体陽性率よりも同一もしくは高い値を示した。

考 察

インフルエンザウイルスの感染防御に最も重要な役割を果たすのは赤血球凝集素(HA)に対する抗体で、その抗体が感染防御に有効であるか否かはHAの抗原性に左右される。HAの抗原性は極めて変化しやすく、自然感染やワクチン接種によって抗HA抗体が産生されてもそれによる感染防御効果は一時的であり、ヒトは何度もインフルエ

ンザに罹患する。A型インフルエンザウイルスの内部には8本のウイルス遺伝子が存在し、その一本のHA遺伝子がHAをコードしている。H1N1pdmのHA遺伝子の起源は1918年のスペインかぜ当時のウイルスと考えられ、1977年以降のH1N1ウイルスとは抗原性が大きく異なっていた¹⁵⁾。2009パンデミックにおいて発症したのは小児が多く、高齢者が少なかったのもこのことを裏付けていた^{9, 10)}。今回の研究では、小児を対象にすることはしなかったが、年齢別の成人の血清について抗体調査することで、2009パンデミックの流行状況の一端を明らかにできると考えた。

インフルエンザの流行による抗体レスポンスを調べるためには、ワクチン接種の影響を避けなければならない。今回の研究に使用した血清は、2009パンデミックが始まる2009年4~6月と終息した2010年4~6月に採取したもので、この間にワクチンを接種された対象者はほとんどなかったと考

えられる。通常のシーズンであれば、インフルエンザワクチンの製造は2月下旬より始まり8月下旬に終了し、9月下旬より順次出荷されて医療機関に届けられ、希望すれば誰でも接種が受けられる。ところが、2009年はパンデミックワクチンである A/California/7/2009 株抗原含有ワクチンの製造が始まったのが7月以降で、年内の供給量は限られていた。そのため政府は優先順位を決め、医療関係者、基礎疾患を有する者、妊娠している女性、幼児から小学生などの順で優先的に接種することにしたため、健康成人の番に回ってくるころには流行は終息していた。成人がこのワクチンを接種できるようになったのは、2010年10月以降である。

今回の血清抗体価の測定には HI 試験と中和試験を用いた。それぞれの検査法で得られた抗体価の意味するところは若干の違いがある。HI 活性のある抗体は中和活性も有するが、HI 活性のない抗体の中にも中和活性を有するものがある¹⁶⁾。すなわち、中和試験は HI 試験よりも幅広く感染防御に関わる抗体が検出できるので、ヒトがインフルエンザウイルスに感染するか否かを直接的に判断できる検査法と言える。そのため、今回は中和試験で実施した成績を主にして考察した。

2009 年パンデミック前後の H1N1 ウイルスの抗原性の違いを反映して、2009 年血清の A/Brisbane/59/2007 と A/California/7/2009 に対する中和価陽性率の間に大きな差を認めた (表 1b、d 及び図 1b、d)。本結果から 2009 年以前はどの年齢層でも高い比率で A/Brisbane/59/2007 と類似の H1N1 ウイルスに暴露されていたが、パンデミックウイルスに対してはほとんどの対象者は暴露経験がないことが示された。2010 年血清の A/California/7/2009 に対する中和価陽性率は高くなり、特に 1970 年以降に出生した対象者で顕著であった (表 1d 及び図 1d)。これは中和価陽転率とも相関し (表 2)、若年成人ほどパンデミックウイルスに感染していたことが示唆された。全成人年齢層の抗体陽転率 (感染率) は 12.4% で、海外からの報告とも大きな違いはなかった¹¹⁾。しかし、1970 年以降に出生した対象者に限ると抗体陽転率は 34.3% (12/35) と高く、海外における感染率の 10% 前後と比較しても高い数値であった。

パンデミック前後の血清抗体価を測定することは流行の実態を把握する上で重要であり、世界各

国から数多くの論文が発表されている。残念ながら日本からの報告はほとんどなく、インフルエンザの血清疫学的研究において日本は世界から遅れていると言わざるを得ない。パンデミックの発生が予測された時点から公衆衛生、ウイルス学、臨床など各分野の専門家が協力して調査体制を構築し、短期間に成果を挙げなければ次の年の流行予測に生かせない。本研究は、大阪という限られた地域の成人だけを対象にした血清学的研究であるが、2009 年パンデミックにおける流行の一端を明らかにできたと考えている。

謝 辞

パンデミック前のインフルエンザワクチン株である A/Brisbane/59/2007 とパンデミックウイルス株の A/California/7/2009 を分与頂いた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の関係者に深謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S, Peiris JSM, Guan Y, Rambaut A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009; **459**: 1122-5.
- 2) Center for Disease Control and Prevention. Update: swine influenza A (H1N1) infections—California and Texas, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; **58**: 435-7.
- 3) Kumagai T, Oshitani H. Epidemiological characteristics and low case fatality rate of pandemic (H1N1)2009 in Japan. *Plos Curr* 2009; **1**: RRN1139.
- 4) Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, Liu F, Dong L, DeVos JR, Gargiullo PM, Brammer TL, Cox NJ, Tumpey TM, Katz JM.

- Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med* 2009; **361**: 1945-52.
- 5) Ikonen N, Strengell M, Kinnunen L, Osterlund P, Pirhonen J, Broman M, Davidkin I, Ziegler T, Julkunen I. High frequency of cross-reacting antibodies against 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus among the elderly in Finland. *Euro Surveill* 2010; **15**: pii=19478.
 - 6) Rizzo C, Rota MC, Bella A, Alfonsi V, Declich S, Caporali MG, Ranghiasi A, Lapini G, Piccirella S, Salmaso S, Montomoli E. Cross-reactive antibody responses to the 2009 A/H1N1v influenza virus in the Italian population in the pre-pandemic period. *Vaccine* 2010; **28**: 3558-62.
 - 7) Chang SC, Chang CM, Huang YC, Chiu CH, Shih SR, Lin TY. Preexisting antibodies against pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus in Taiwan. *Clin Infect Dis* 2010; **51**: 1465-6.
 - 8) Miller E, Hoschler K, Hardelid P, Stanford E, Andrews N, Zambon M. Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study. *Lancet* 2010; **375**: 1100-08.
 - 9) Wu JT, Ma ESK, Lee CK, Chu DKW, Ho PL, Shen AL, Ho A, Hung IFN, Riley S, Ho LM, Lin AK, Tsang T, Lo SV, Lau YL, Leung GM, Cowling BJ, Peiris M. The infection attack rate and severity of 2009 pandemic influenza (H1N1) in Hong Kong. *Clin Infect Dis* 2010; **51**: 1184-91.
 - 10) Horby P, Mai LQ, Fox A, Thai PQ, Yen NTT, Thanh LT, Hang NLK, Duong TN, Thoang DD, Farrar J, Wolbers M, Hien NT. The epidemiology of interpandemic and pandemic influenza in Vietnam, 2007-2010: the Ha Nam Household Cohort Study I. *Am J Epidemiol* 2012; **175**: 1062-74.
 - 11) Kelly H, Peck HA, Laurie KL, Wu P, Nishiura H, Cowling GJ. The age-specific cumulative incidence of infection with pandemic influenza H1N1 2009 was similar in various countries prior to vaccination. *PLoS ONE* 2011; **6**: e21828.
 - 12) Van Kerkhove MD, Hirve S, Koukounari A, Mounts AW. Estimating age-specific cumulative incidence for the 2009 influenza pandemic: a meta-analysis of A(H1N1)pdm09 serological studies from 19 countries. *Influenza Other Respi Viruses* 2013; **7**: 872-86.
 - 13) Wu JT, Leung K, Perera RAPM, et al. Inferring influenza infection attack rate from seroprevalence data. *PLoS Pathog* 2014; **10**: e1004054.
 - 14) Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Tamura D, Kiso M, Kawakami E, Hatakeyama S, Ebihara Y, Koibuchi T, Fujii T, Takahashi K, Shimojima M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Sakabe S, Iwasa A, Takahashi K, Ishii T, Gorai T, Tsuji K, Iwamoto A, Kawaoka Y. Seroprevalence of pandemic 2009(H1N1) influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. *Clin Vaccine Immunol* 2011; **18**: 860-6.
 - 15) Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characterization of the early isolates of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; **325**: 197-01.
 - 16) Okuno Y, Isegawa Y, Sasao F, Ueda S. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinin of influenza A virus H1 and H2 strains. *J Virol* 1993; **67**: 2552-8.

Antibody responses against pandemic virus in adults of Osaka before and after 2009 influenza pandemic

Yoshinobu OKUNO^a, Saeko MORIKAWA^b, Tadahiro SASAKI^c, Tomohiko UKAI^{d,f}, Satoshi HIROI^b,
Keiko NAKATA^b, Kazumasa YAMAGISHI^e, Hiroki IMANO^f, Masahiko KIYAMA^g, Hiroyasu ISO^f

We measured antibody titers against influenza vaccine strains, A/Brisbane/59/2007 and A/California/7/2009 by hemagglutination-inhibition (HI) and neutralization (N) tests in paired sera of 241 subjects taken at workplaces in Osaka between April and June in 2009 (2009 sera) and between April and June in 2010 (2010 sera). HI and N antibody positive rates against A/Brisbane/59/2007 in 2009 sera were high with 62.2% and 49.4%, respectively. In contrast, N antibody positive rate in 2009 sera against A/California/7/2009 was low with 7.1%. However, those in 2010 sera showed higher titer with 22.0%. In particular, the subjects who were born after 1970 showed higher N titers with 45.7% than that were born before 1969. These results well correlated with seroconversion rates suggesting younger adults showed higher susceptibility to pandemic viruses.

Key words: 2009 influenza pandemic, pandemic viruses, seroconversion rates

a Osaka Institute of Public Health

b Division of Virology, Osaka Institute of Public Health

c Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University (Original workplace: Division of Virology, Osaka Institute of Public Health)

d Emergency Preparedness and Response Section, Osaka Institute of Public Health

e Department of Public Health Medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

f Public Health Graduate School of Medicine Osaka University

g Osaka Center for Cancer and Cardiovascular Disease Prevention

大阪府におけるエンテロウイルスおよびパレコウイルス A 感染症の 流行状況と分子疫学的解析 (2018 年度)

中田恵子, 本村和嗣

2018 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 Parechovirus A 3 (Par-A3) ; 33.3%、Coxsackievirus A16 (CV-A16) ; 34.4%、CV-A2 ; 52.9%が最も多かった。Viral Protein (VP) 1 領域が増幅できた Par-A3、CV-A16 および CV-A2 に対する系統樹解析の結果、Par-A3 は過去に当所で検出した流行株のクラスターとは明確には区別されなかった。一方で、CV-A16 および CV-A2 は過去の流行株とは明確に異なるクラスターを形成した。各疾患の主要な原因ウイルスの遺伝子型およびその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度異なることから、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度毎に変動があり、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⁾。

パレコウイルス A (Parechovirus A; Par-A) は、ウイルス学的性状およびゲノム構造の違いから 1999 年に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。Par-A には、現在 19 遺伝子型が確認されている²⁾。その中で Par-A3 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、Par-A 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、関連性が疑われている。一方、大阪府では 2014、2016 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 Par-A3 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¹⁵⁾ ことから、EV 感染症のみならず Par-A 感染症の発生動向にも注目してきた。本稿では、2018 年 4 月 1 日から 2019 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課に搬入された患者検体からの病原体検出情報を集約した。また、2018 年度シーズンにおける EV および Par-A 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 Par-A 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

2018 年 4 月 1 日から 2019 年 3 月 31 日の期間に、大阪府内の定点医療機関から当課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と診断された 73 名から採取された 95 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 8 検体、咽頭ぬぐい液および鼻汁等の呼吸器由来検体が 73 検体、

消化器由来検体（糞便、腸内容物等）が14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。

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、髄液は無処理のものをそれぞれ100 μ lずつ各細胞に接種した。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（cytopathic effect; CPE）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は陰性と判定した。

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、Par-A 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⁾を行った。得られた増幅産物に対し、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Par-A3については、得られた塩基配列に対し、近隣結合法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Par-A¹⁰⁾のVP1領域に対する RT-nestedPCR 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、近隣結合法を用いた系統樹解析を実施した。

本研究は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て（承認番号1310-05-4）、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を順守して実施したものである。

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19名で、年齢の中央値は1歳3か月（範囲：1か月-54歳4か月）、性別は男性11名（58%）、女性8名（42%）であった。手足口病と診断された患者は35名で、年齢の中央値が1歳6か月（3か月-11歳11か月）、性別は男性21名（60%）、女性14名（40%）であった。ヘルパンギーナと診断された患者は19名で、年齢の中央値は1歳8か月（1か月-38歳）、性別は男性9名（47%）、女性10名（53%）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73名中、45名（62%）の患者からEV、ライノウイルス（Rhinovirus; RhV, A, B, C種あり）またはPar-A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、95検体中54検体（57%）であった。細胞培養による分離で陽性であったのは、30検体（32%）であった（表1, 2, 3）。

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31.6%（6/19名）からEV、RhV またはPar-Aが検出され、その遺伝子型別内訳は、Par-A3が33.3%（2/6名）、Echovirus（E）11、E18、RhVA またはPar-A4が各16.6%（各1/6名）であった（図1）。検体別では、消化器由来検体から遺伝子検査でウイルスが検出された割合が33.3%と最も高かった（表1）。手足口病では、77.1%（27/35名）の患者からEV、RhVまたは

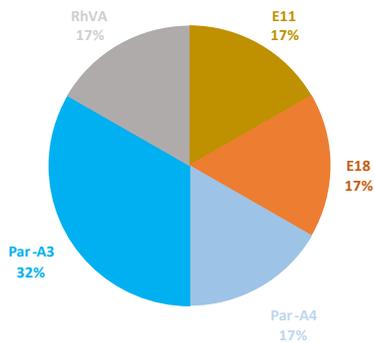


図1 無菌性髄膜炎患者から検出されたウイルス遺伝子型 (N=6) 重複感染あり

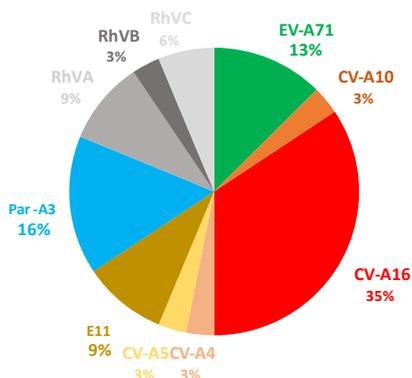


図2 手足口病患者から検出されたウイルス遺伝子型 (N=35)

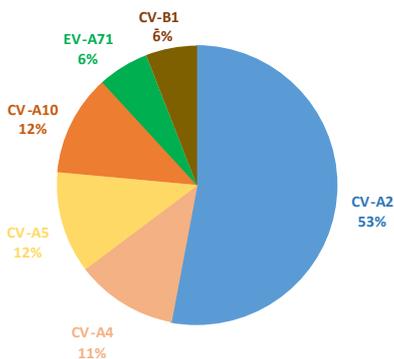


図3 ヘルパンギーナ患者から検出されたウイルス遺伝子 (N=19)

Par-A が検出され、その主な遺伝子型別内訳は CV-A16 が 34.4% (11/32 名：重複感染が認められたため分母を 32 名として計算)、次いで Par-A3 が 15.6% (5/32 名)、EV-A71 が 12.5% (4/32 名) であった (図 2)。手足口病では主に呼吸器由来検体が採取され、そのウイルス遺伝子の検出割合は 74.3% であったのに対し、消化器由来検体は 2 検体のみではあったが検出割合が 100% であった。同様に、ヘルパンギーナでは、89.4% (17/19 名) の患者検体から EV が検出され、その主な遺伝子型別内訳は、CV-A2 が 52.9% (9/17 名)、次いで CV-A4、CV-A5 および CV-A10 が各 11.8% (各 2/17 名) であった (図 3)。

3. 疾患別月別の検出 EV および Par-A の遺伝子型

無菌性髄膜炎患者由来検体からは 7 月に Par-A3 と A4、9 月に E11 と Par-A3、12 月に E18 が検出された (図 4)。手足口病患者で主要な原因ウイルスであった CV-A16 は 5 月から 12 月まで検出され、7 月と 10 月の検出が多かった。また、Par-A3 が 4、6、9、10 月に検出された (図 5)。ヘルパンギーナ患者では CV-A2 が 6 月から検出され始め、12 月まで検出されていたが、検出のピークは 7 月であった (図 6)。

4. Par-A3、CV-A16 および CV-A2 の系統樹解析

分離されたウイルスの中で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 Par-A3 の 4 株、CV-A16 の 4 株、CV-A2 の 5 株についてそれぞれ 558nt の系統樹解析を実施した。その結果、Par-A3 については、2 株は過去の株から独立したクラスターを形成したが、残りの 2 株は 2014 年度と 2016 年度の流行株がそれぞれ形成するクラスターに 1 株ずつ属した (図 7)。一方で CV-A16 は、4 株全て同じクラスターを形成し、2017 年の中国株と最も近縁であった (図 8)。また、CV-A2 も、CV-A16 と同様に 5 株全て同一クラスターを形成し、2017 年の中国株と最も近縁であった (図 9)。

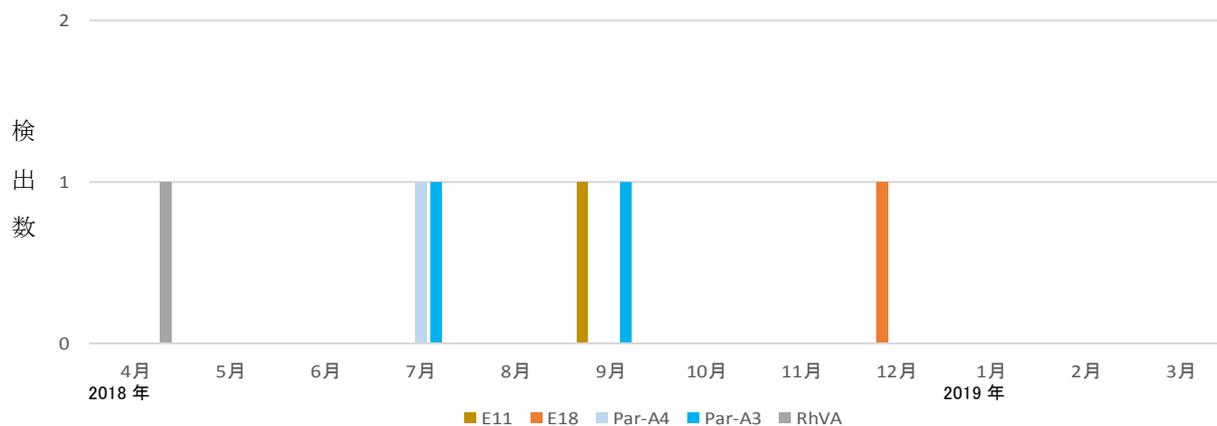


図4 無菌性髄膜炎患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

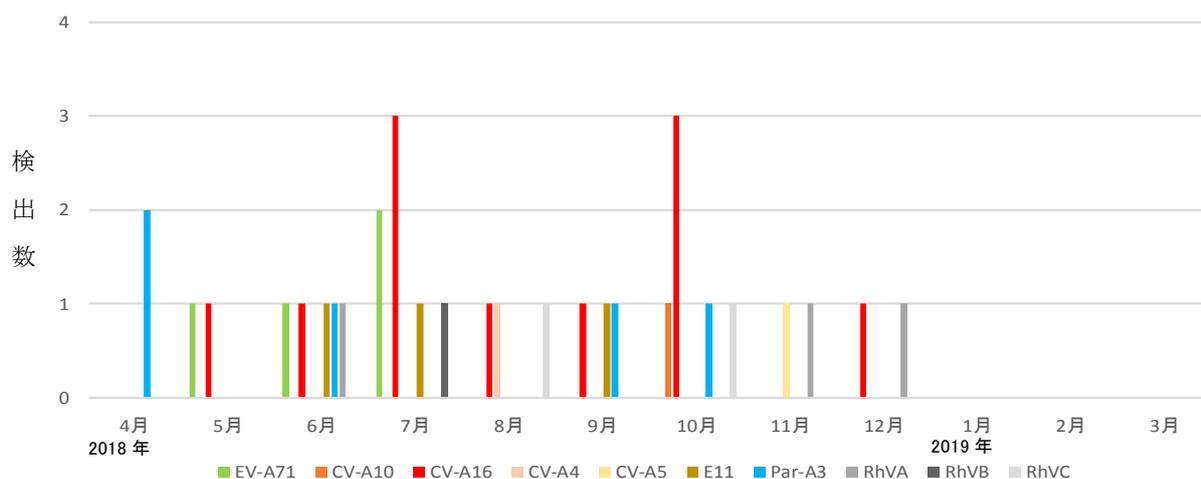


図5 手足口病患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

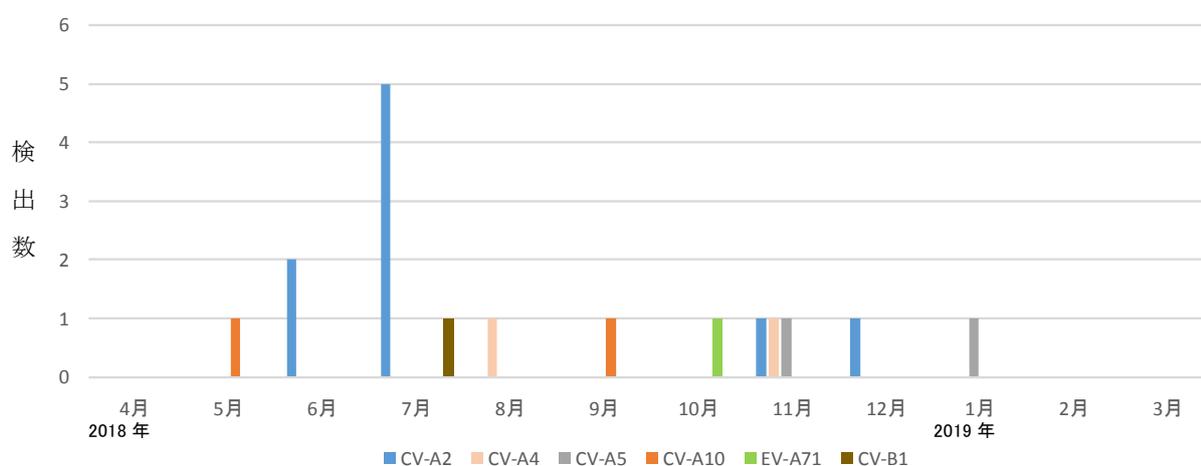


図6 ヘルパンギーナ患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

考 察

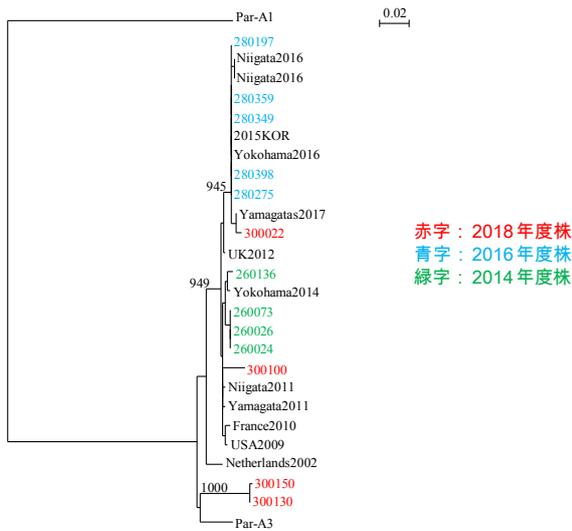


図 7 Par-A3 の系統樹解析 (558nt)

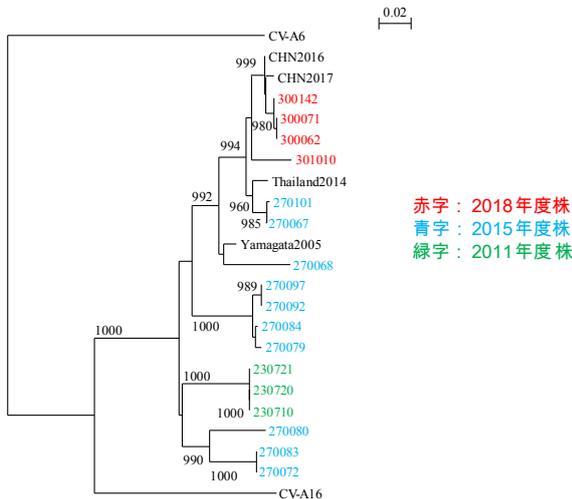


図 8 CV-A16 の系統樹解析 (593nt)

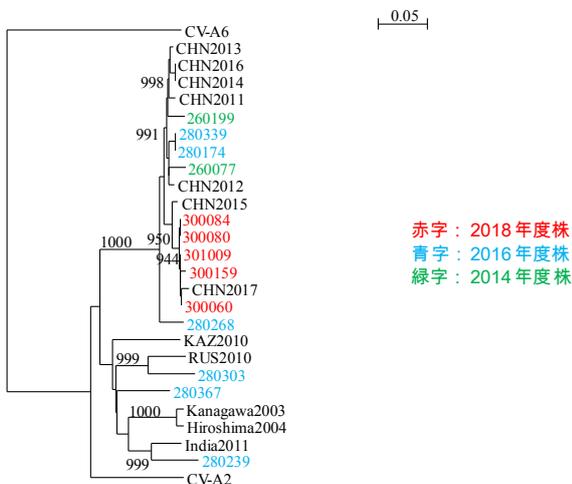


図 9 CV-A2 の系統樹解析 (584nt)

2018 年度シーズン、無菌性髄膜炎疑いの患者 6 名がウイルス陽性となったが、そのうち 2 名からは Par-A3 が検出された。通常、無菌性髄膜炎の患者年齢層は幼児から学童期¹²⁾であるが、2018 年度シーズンは患者全体の年齢中央値でも 1 歳 3 か月と低く、Par-A3 が検出された 2 名はそれぞれ 2 か月齢と 1 か月齢とさらに低かった。これは Par-A3 が無菌性髄膜炎患者から多く検出された 2016 年度と同傾向¹⁵⁾であった。また、Par-A3 の流行年度には生後 3 か月齢未満の患者の重症事例の報告が複数報告されている¹⁷⁾ことから、今後も無菌性髄膜炎患者における Par-A3 の検出動向を注視する必要がある。また、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¹⁸⁾。しかし、大阪府では 2007 年度以降、エ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。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¹²⁾されているが、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割合が全国的に増加していると推測される。このことから、今後、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。

手足口病の患者からは前年度に検出割合が高かった CV-A6 は検出されず、CV-A16 の検出割合が 34.4% と最も高かった。その他、Par-A3 も 15.6%、前年度から検出が続いていた EV-A71 も 12.5% の割合で検出されており(図 2)、複数のウイルス種が混合流行したシーズンとなった。2015 年度シーズンに CV-A6 と CV-A16¹⁴⁾、2017 年度シーズンに CV-A6 と EV-A71¹⁶⁾ の混合流行で流行規模が大きくなったことを考慮すると、他のウイルス種との混合流行により流行規模の拡大に影響するウイルス種は CV-A6 である可能性が示唆された。

1 年おきに流行が認められるヘルパンギーナは 2018 年度シーズンに流行が大きくなることから

推測されていたが、大阪府では流行規模の拡大は認められなかった。患者から検出されたウイルスの半数以上が CV-A2 であったが、これは前年度に少数の患者から検出されていたものであったので、今年度はそれが主流になったと考えられた¹⁶⁾。

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は陰性であったが、CV-A10 が分離された手足口病患者由来検体が含まれた。また、ウイルス遺伝子検査で RhV が検出され、分離培養では EV が分離された検体が 2 事例存在した(データ未掲載)。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。

Par-A3 の系統樹解析では、2018 年度シーズンの 4 株のうち 2 株はそれぞれ 2014 年度の流行株のクラスター、2016 年度の流行株のクラスターに分類され、残りの 2 株は単独のクラスターを形成した(図 7)。しかし、これら 4 株はともに塩基配列の相同性は 95%以上と非常に高かった(データ未掲載)。このことより、Par-A3 は塩基配列の大きな変化を伴うことなく流行していることが示唆された。これは、Par-A3 が検出される患者の中心が抗体を保有しない免疫系の未発達な超低年齢層に分布していることから、Par-A3 が免疫淘汰圧の影響を受けにくいことと関係している可能性が考えられる。一方で、CV-A16 や CV-A2 では、2018 年度シーズンの株が全て一つのクラスターを形成し、最も近縁な株は 2017 年の中国株であった(図 8, 9)。このことから、これらのウイルス種は近隣の諸外国とヒト-ヒト交流の活発化により日本国内へ流入した可能性が示唆された。

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度異なる。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。一方、Par-A 感染症が EV 感染症と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 Par-A の検査も実施している。その結果、国内でサーベイランスシステムのない Pa

r-A がウイルス遺伝子の変化が乏しいにも関わらず各年度で流行する傾向といった EV とは異なるウイルス学的な動向や超低年齢層で無菌性髄膜炎の原因となり得るといった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 Par-A も継続して実施する必要があると考えられた。

謝 辞

感染症発生動向調査事業に基づき、患者検体採取にご協力いただいた医療機関の先生方に深謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

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, Pajkrjt D,

- Spanjerberg L, Kraakman HC, Berkhout B, Zaaier 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、輿那覇麻理、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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 国立感染症研究所ホームページ、無菌性髄膜炎とは
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/520-viral-meningitis.html>.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 中田恵子、弓指孝博、久米田裕子. 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). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (平成 29 年度)*. 2017; 1-8.
- 16) 中田恵子、弓指孝博. 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 (2017 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (平成 30 年度)*. 2018; 1-8.
- 17) 小川英輝、庄司健介、宇田和宏、木下典子、小山 (若井) ちとせ、岩瀬徳康、宮入 烈、金子雅紀、川村典子、安藤寿、石井正浩、豊田祥子、小穴慎二. ヒトパレコウイルス 3 型が検出された新生児・早期乳児の 10 例—関東. *病原微生物検出情報月報 (IASR)*. 2016 ;37 :181-182.
- 18) Cherry JD and Shields WD. Aseptic meningitis and viral meningitis. In *Textbook of Pediatric infectious diseases 4th Ed*. Saunders, Philadelphia, 1998; 457-467.
- 「WEB サイトの内容は 2019 年 6 月 5 日に確認した」

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus and human parechovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2018 Report)

Keiko NAKATA and Kazushi MOTOMURA

During April 2018 to March 2019, the most frequent viral types detected from patient specimens for aseptic meningitis, Hand-foot-and-mouth disease and herpangina were Parechovirus –A (Par-A) (33.3%), Coxsackievirus A16 (34.4%), and Coxsackievirus A2 (52.9%), respectively. The phylogenetic trees constructed by using the partial VP1 region sequences indicated that the Par-A3 strains of 2018 epidemic formed did not clearly different cluster from those of 2014 and 2016 epidemic in Osaka. On the other hand, the 2018 epidemic strains of CV-A16 and CV-A2 formed a single epidemic cluster. 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

大阪府内における 2018/2019 シーズンのインフルエンザ流行状況

森川佐依子, 廣井 聡, 本村和嗣

大阪府ではインフルエンザの流行状況を把握することを目的として、年間を通じインフルエンザウイルス株の検出、分離・型別を行い、さらに流行期には流行株や流行規模の解析を行っている。

2018/2019 シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの流行は、2018 年第 48 週に定点あたり患者数が 1.0 を越え、2019 年第 3、4 週をピークとしてその後漸減した。今シーズンの流行を形成したタイプは、前半は AH1pdm09 亜型であったが、後半は AH3 亜型が主流となった。A 型インフルエンザウイルスの地域流行分離株について HA 遺伝子全長の系統樹解析を行った結果、AH1pdm09 亜型については、全国の解析データと同様なサブクレード内でのアミノ酸置換の多様性が見られた。一方、AH3 亜型については全国の解析株の半数が属した 1 つの群に全ての解析株が属する結果となった。引き続き解析株を増やし、データの比較を行う必要がある。

季節性インフルエンザウイルスが陰性であった検体数は少なく 13 検体であったが、その内の 8 検体からは他の呼吸器ウイルスが検出された。今冬は特に多く検出されたウイルスはなかった。インフルエンザ集団発生事例の 2 検体からインフルエンザウイルスが検出されず、それぞれアデノウイルス、エンテロウイルス・ライノウイルス共通領域が検出された事例があった。

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、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の感染によって引き起こされる急性熱性の呼吸器感染症である。我が国においては沖縄県を除き毎年冬期に流行するため、インフルエンザのシーズンは毎年 36 週（8 月末から 9 月始め）から翌年の第 35 週（8 月末）とされている。

インフルエンザに罹患すると、特に高齢者の冬期超過死亡や、小児での重症化の主要因となるなど、その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衛できないが、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^{1,2)}。インフルエンザ株サーベイランスは世界保健機関（World Health Organization: WHO）の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³⁾。大阪健康安全基盤研究所ウイルス課では、国立感染症研究所との共同研究、「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、インフルエンザの流行状況を把握することを目的とし、毎冬の流行期に流行規模の把握と解析、流行株の分離、型別を行っている。本研究では、2018/2019 シーズン（2018 年第 36 週から 2019 年第 35 週）における、2019 年第 18 週までの大阪府内のインフルエンザ流行状況に加え、A 型インフルエンザウイルス分離株を用いた各亜型別の HA 遺伝子全長部分の分子系統樹解析、および季節性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他の呼吸器ウイルスの検出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

大阪府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、定点あたり患者数を用いた⁴⁾。

2. インフルエンザ病原体サーベイランス

大阪府感染症発生動向調査事業に基づく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にて採取された上気道由来検体を対象とした。2018/2019 シーズンのうち、2018 年第 36 週（9 月 3 日～9 月 9 日）から 2019 年第 18 週（4 月 29 日～5 月 5 日）までに採取され、大阪健康安全基盤研究所 ウイルス課に搬入された 168 検体について病原体の検出および遺伝子検出を行った。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 1 人に付き 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 (Precision System Science) を用い、全自動核酸抽出機 (Precision System Science) 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 法による呼吸器ウイルスの検出を行った⁶⁾。エンテロウイルスおよびライノウイルス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 法を行い、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⁾。

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 (DS ファーマバイオメディカル) 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

AX-4 細胞 (東京大学医科学研究所 河岡教授より分与)⁸⁾ に各ウェル 200 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) 培地に交換し、34 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 存在下で 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。今シーズンは全検体を MDCK 細胞および AX-4 細胞の両者に接種して分離率の比較を行った。

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 法による検出を行い型別した。

また、A 型分離株については、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、2017/2018 シーズンの流行株とともに系統樹解析を行った。解析に供した株は、大阪府内の豊能・三島地区、北河内・中河内地区、南河内・泉州地区の 3 地区から、各亜型共に、流行期において地区別に検体採取日が、約 3 週間の間隔となるよう分離株を選択した。系統樹上のクレード、サブクレード、群の区別については全国データを参考とした¹⁰⁾。

本研究は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て (承認番号 1402-02-2)、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施したものである。

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

今シーズンのインフルエンザの流行時期は、昨シーズンと同じく、定点当たりの患者数が 1.0 を超え流行期入りとなったのは第 48 週 (11 月 26 日～12 月 2 日)であった。定点あたり患者数が 30.0 を超えた警報域の週は 2019 年第 2 週～第 5 週と 4 週連続したが、その後は速やかに患者数が減少した。府内の昨シーズンの流行と比較す

ると、傾向は同程度であったが、ピーク時の患者数は長期間持続することなく、ピーク後は急速に患者数の減少がみられたため、全体の患者数は昨シーズンより減少した。しかしながら、第14週（4月1日～4月7日）に一旦定点当たり患者数が流行目安となる1.0より少なくなったにもかかわらず、翌第15週より再度1.0を上回り漸増した。第16、17週は2.0を上まわったが、ゴールデンウィーク終了間際の第18週（4月29日～5月5日）は、0.9と再び1.0より少なくなった⁴⁾。

感染症サーベイランスに基づく検査による検出ウイルスは、2018年9月1日～2019年第18週までに採取され、当所に搬入された168検体のうちで、AH1pdm09亜型73検体、AH3亜型69検体、B Yamagata系統4検体、B Victoria系統9検体が陽性であり、昨年度と異なりB型は散発的に検出されたのみであった。全国データによると、A型の両亜型の比率はAH1pdm09亜型が1に対しAH3亜型が1.4とAH3亜型が若干多いが、大阪府内は全国集計と異なりAH1pdm09亜型が多く検出された¹¹⁾。

2018/2019シーズンは全検体（n=168）について、MDCK細胞およびAX-4細胞の両者に検体を接種して分離培養を行ない、亜型毎の分離率を比較した。同様なトランスフェクション細胞であるMDCK-SIAT1細胞を用いた2017/2018シーズンのAH3亜型における比較では、65検体中の分離陽性例はMDCK細胞では8株（12.3%）のみであったのに対し、MDCK-SIAT1細胞で56株（86.2%）と大きく差があった¹²⁾が、2018/2019シーズンの分離率はAH3亜型においては、MDCK細胞74.2%、AX-4細胞88.6%と差は小さくなった。AH1pdm09亜型においてはMDCK細胞78.3%、AX-4細胞85.5%であり、B型は検体数が少ないが両方の細胞で分離率は100%であった。AX-4細胞でウイルス分離できず、MDCK細胞のみでウイルス分離できた検体は無かった。

2. 分離株の解析

各亜型共に該当週に検体がない場合があり、解析に用いた各地区の分離株数は必ずしも同数ではなかった。

AH1pdm09亜型については大阪府内の豊能・三

島、南河内・泉州地区の3地区からの分離株17株および、国立感染症研究所で実施された当センターからの今年度の分離株2株を加えた19株のHA全長のシーケンスを、昨シーズンの大阪府内分離株のシーケンスのうち固有のアミノ酸置換をもつ群に属した3シーケンス、GISAIDから得られた昨シーズンからのWHO推奨ワクチン株A/Michigan/45/2015⁴⁾、我が国でのワクチン選定株A/Singapore/GP1908/2015¹³⁾のシーケンスとともに系統樹解析を実施した（図2）。解析に用いた臨床分離株のシーケンスは昨シーズンに引き続き、共通アミノ酸置換S84N, S162N, I216T（図2 緑字）を持つサブクレード6B.1内のS74R, S164T, I295V（同 青字）のアミノ酸置換を持つサブクレード6B.1Aに全て属していた。

国立感染症研究所による全国の2019年5月18日現在最新の公開データ¹⁰⁾によると、サブクレード6B.1Aの中にS183P（同 赤字）を含む複数の群がそれぞれ、183P-1（共通アミノ酸置換：N451T）1%、183P-2（L233I）26%、183P-4（N129D+A141E）7%、183P-5（N260D）37%、183P-6（T120A）2%、183P-7（K302T+I404M）12%の割合で検出され、さらにS183P置換を持たないT120A群（9%）、L161I+I404M群（5%）など複数の集団も認められている。

今回解析した大阪府内の2018/2019シーズン分離株は全てS183P置換を有し、全国的にも検出割合の高かった183P-2、4および5に属した。

AH3亜型ウイルスについては、分離株19株のHA遺伝子全長についてダイレクトシーケンスを実施し、GISAIDから得られた、2012/2013シーズン～2018/2019シーズンのワクチン株、および2017/2018シーズンの主なサブクレードに属した流行株とともに系統樹解析を実施した（図3）。

全国の分離株の遺伝子解析によると、解析株のほとんどが系統樹上のサブクレード3C.2a内の、さらに特徴的なアミノ酸置換を持つサブクレード3C.2a1（N171K+I406V+G484E）（図3 緑字）、3C.2a2（T131K+R142K+R261Q）に属し、1株のみが3C.2a3（N121K+S144K）に属したが、3C.2a4に属する株は2018/2019シーズンは無かった。3C.2a1は3C.2a1a（N121K+G479E+T135K+N122D）と3C.2a1b（N121K+K92R+H311Q）（同赤字）に分かれ、3C.2a1bは3C.2a1b+135K

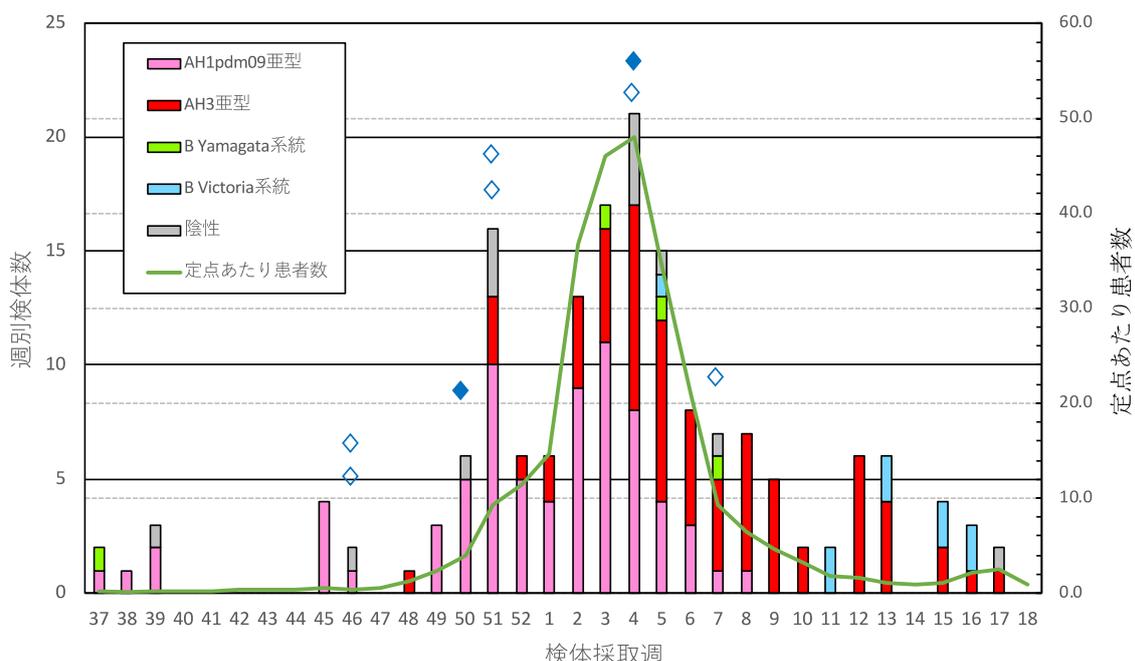


図 1. 2018 年第 37 週～2019 年第 18 週のインフルエンザウイルス検出状況と定点あたり患者数の推移

各週の棒グラフ上のシンボルは、当該週にインフルエンザウイルス（Flu）陰性であった検体 1 検体につき、インフルエンザウイルス以外の呼吸器ウイルスが 1 種（◇）または 2 種重複して（◆）検出されたことを示す。検出ウイルス種については表 1 に掲載。2018 年第 39 週、第 51 週、2019 年第 5 週、第 17 週の各 1 検体、2019 年第 4 週の 2 検体は呼吸器ウイルスの検出も陰性であった。

（E62G+R142G+T135K）および 3C.2a1b + 135N（T135N）が形成されていたが、さらに 3C.2a1b に以下の共通アミノ酸置換を持つ E62G+T131K+V529I 群（同 青字）が認められており、全国データでは 3C.2a1 株は全てサブクレード 3C.2a1b に属し、15%が 3C.2a1b+135K、3%が 3C.2a1b+135N、51%が E62G+T131K+V529I 群に含まれた¹⁰⁾。図 3 の系統樹上では解析株数が少ないため、クレードの分岐を決定するアミノ酸置換が同一の分岐点上に存在せず、1 つ前の分岐点より挿入されている場合があった。

2018/2019 シーズンの当課における流行株の解析では、上述のような全国データとは異なり、解析した株の全てが E62G+T131K+ V529I 群に属する結果となった。解析株数を増やすことで他のサブクレードに含まれる株が存在するのか確認する必要がある。

両亜型とも、地区毎で検出されるウイルスの群に偏りはなかった。

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

迅速診断キットまたは、臨床症状からインフルエンザと診断されたが、上気道由来検体よりインフルエンザウイルスが検出されなかった検体は、2018/2019 シーズン流行期には 13 検体あった（表 1）。

最も多く検出されたのはエンテロウイルス・ライノウイルス共通領域で、3 検体より検出された。1 検体は VP4-2 部位の塩基配列より C 群ライノウイルスに型別されたが、2 検体はウイルス量が少なく型別には至らなかったと考えられた。

アデノウイルス、ヒトコロナウイルス OC43 がそれぞれ 2 検体より検出された。ヒトボカウイルスとエンテロウイルス・ライノウイルス共通領域が同時に検出された症例、C 群ライノウイルスとアデノウイルスが同時に検出された症例が 1 症例ずつ認められた。6 検体は呼吸器ウイルスの検出についても陰性であった。

インフルエンザの集団発生事例の検体は、1 事

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*
2018年 第46週	アデノウイルス
	エンテロウイルス・ライノウイルス共通領域
第50週	ヒトボカウイルス + エンテロウイルス・ライノウイルス共通領域
第51週	ヒトコロナウイルスOC43 パラインフルエンザウイルス2型
2019年 第4週	C群ライノウイルス + アデノウイルス
	RSウイルス
第7週	ヒトコロナウイルスOC43

例 1 検体として集計されている。2018/2019 シーズンの検査事例の内、1 事例で、2 名の検体が搬入されており両検体共にインフルエンザウイルスが検出されなかった事例が存在した。それぞれアデノウイルスとエンテロウイルス・ライノウイルス共通領域が検出された。1 名は検体採取前日に迅速診断キットにて A 型インフルエンザ陽性と診断されていた。

考 察

2018/2019 シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの流行は、昨シーズンと同様に第 48 週に定点あたり患者数が流行目安となる 1.0 を上回り、流行期に入った。患者数はその後急増し、定点あたり患者数が 30.0 を超えた警報域の週は 2019 年第 2 週～第 5 週と 4 週連続したが、昨シーズンと異なり、その後は速やかに患者数が減少した。第 14 週に一旦定点あたり患者数が 1.0 より少なくなったにもかかわらず、翌第 15 週より再度 1.0 を越え、第 16、17 週は 2.0 を上回り、第 18 週以降再び 1.0 より少なくなった。過去にも、2016/2017 シーズンにおいては第 18 週まで患者数が 1.0 を下回らない等、5 月中旬までインフルエンザの流行が長引くことは経験されているが、一旦 1.0 を下回った後、再度数週にわたって増加に転ずることは珍しい。第 15 週は新学年が始まる時期であり、再度新たな学級にウイルスが持ち込まれ感染が広がったためと考えられた。定点あたり患者数が 2.0 を再び越えた第 16、17 週の年齢別患者発生数最大割合値はいずれも 10～14 歳であり学童期での流行が裏付けられた^{14, 15)}。

2018/2019 シーズンはウイルス分離に供する細胞として MDCK 細胞と並行し、AX-4 細胞を使用した。ウイルス分離率は A 型の各亜型ともに AX-4 細胞が優れており、B 型については両者で差がなかった。さらに AX-4 細胞で分離できず、MDCK 細胞のみで分離可能であった検体はなかったことから、今後はインフルエンザウイルスの分離培養には AX-4 細胞のみの使用で良好な成績が得られると考えられた。しかし、ヒトの検体中に含まれるインフルエンザウイルスの遺伝子は、MDCK 細胞、AX-4 細胞で分離培養すると変異が入る可能性があるとの報告がある。分離・培養に使用しても変異が起らないとされるヒト化 MDCK 細胞 (hCK) が作出されたので、今後は hCK を用いてのサーベイランスが必要となってくるかもしれない¹⁶⁾。

感染症サーベイランスに基づく検査による検出ウイルスは、全国データによると、A 型の両亜型の比率は AH1pdm09 亜型が 1 に対し AH3 亜型が 1.4 と AH3 亜型が若干多い結果であったが¹¹⁾、大阪府内は全国集計と異なり AH1pdm09 亜型が多く検出された。これは、昨シーズン流行期に全国の A 型各亜型の検出比率とは異なり、大阪府内では AH3 亜型が多く検出されたことから、AH3 亜型に対する抗体保有率が比較的高かったためではないかと考えられた。少なくとも感染により誘導された抗体は、次シーズンの地域での流行を抑える効果がある事が示唆された。

A 型分離株 HA 遺伝子の系統樹解析の結果、AH1pdm09 亜型については今回解析した大阪府内の 2018/2019 シーズン分離株は全て S183P 置換を有し、全国データの解析株でも検出割合の高

かった 183P-2、4 および 5 に属した。全国データと比較すると、解析株数が少ないことから全ての群に属する株は得られていないが、全国とほぼ同様の流行であったことが推察された。

AH3 亜型については、我々は 2017/2018 シーズンの流行株の系統樹解析結果をもとに、「3C.2a 1b には前シーズンからの流行株も含まれアミノ酸置換も多様であるのに対し、3C.2a 2 は流行期の株のみが属し各株間のアミノ酸配列の差は比較的小さかったため、今後ヒト個体内での選択圧により多様化して来るとともに、新たな流行株が派生する可能性がある。」と考察していた¹²⁾。2018/2019 シーズンの全国データによると、サブクレード 3C.2a 2 および 3C.2a 1b に解析株の多くが含まれており、特に 3C.2a 1b 内の多様性が目立ったことが報告されているが、当課における解析株は、地域に拘わらず全てその内の 1 つの群に含まれる結果となった。解析株数を増やすことで、他群に含まれる株が検出できると考

えているが、大阪府内では全国と異なり、類似の遺伝子配列を持つ株が主として流行していた事が伺えた。また、MDCK 細胞における AH3 亜型インフルエンザウイルスの分離率は、2017/2018 シーズンの 12.3%と比較して 2018/2019 シーズンでは 74.2%と大きく分離率が回復した。各シーズンで使用した MDCK 細胞は同一の細胞ストックから再起培養して使用している。2 シーズンで使用する培養液、培養方法に変更は無かったため、2018/2019 シーズンの分離株が属した 3C.2a 1b の共通アミノ酸置換である E62G、T131K、V529I のいずれか、またはそれらの組み合わせにより、MDCK 細胞上へのレセプター結合性が変化し、分離率の回復につながった事が示唆された。

インフルエンザウイルスが検出されなかった検体は集団発生事例を含め 13 検体であった。

集団発生事例に対しては、インフルエンザウイルスの検出が陰性であった時の事を考慮し、

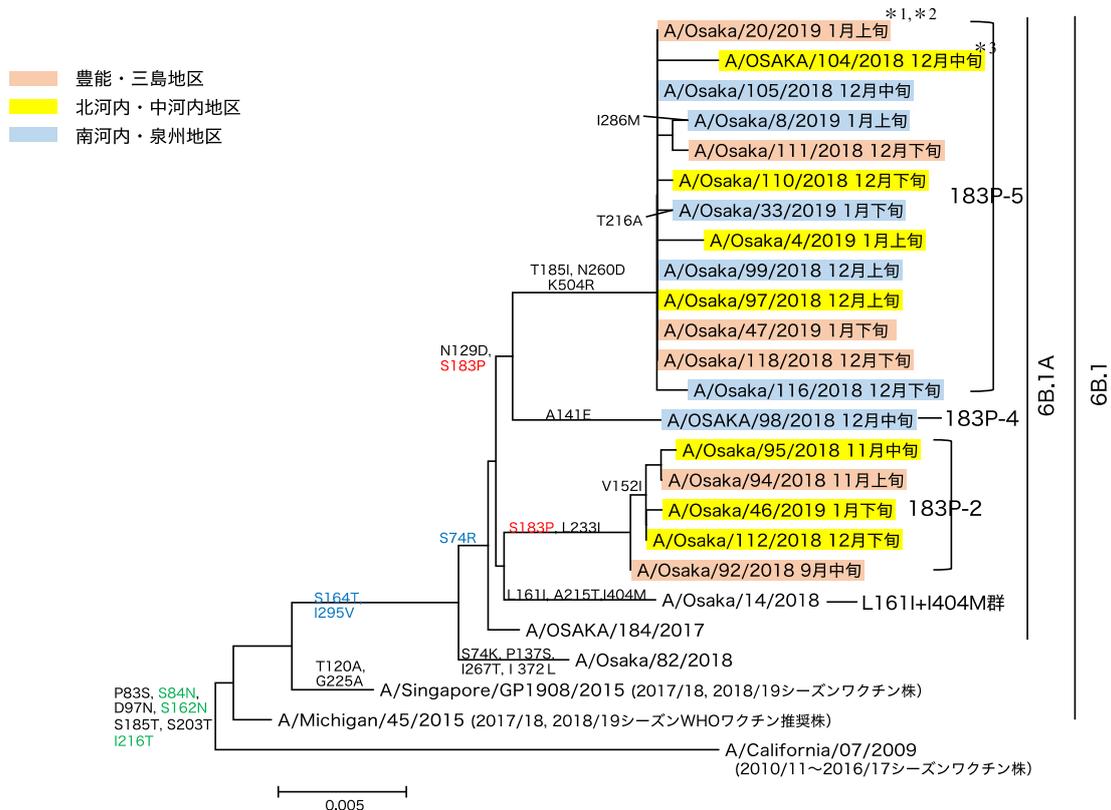


図 2. AH1pdm 亜型 HA 全長の遺伝子系統樹解析

- *1. Osaka 表記は当課でのシーケンスデータ
- *2. 株名の後ろは検体採取時期を示す
- *3. OSAKA 表記は国立感染症研究所でのシーケンスデータ

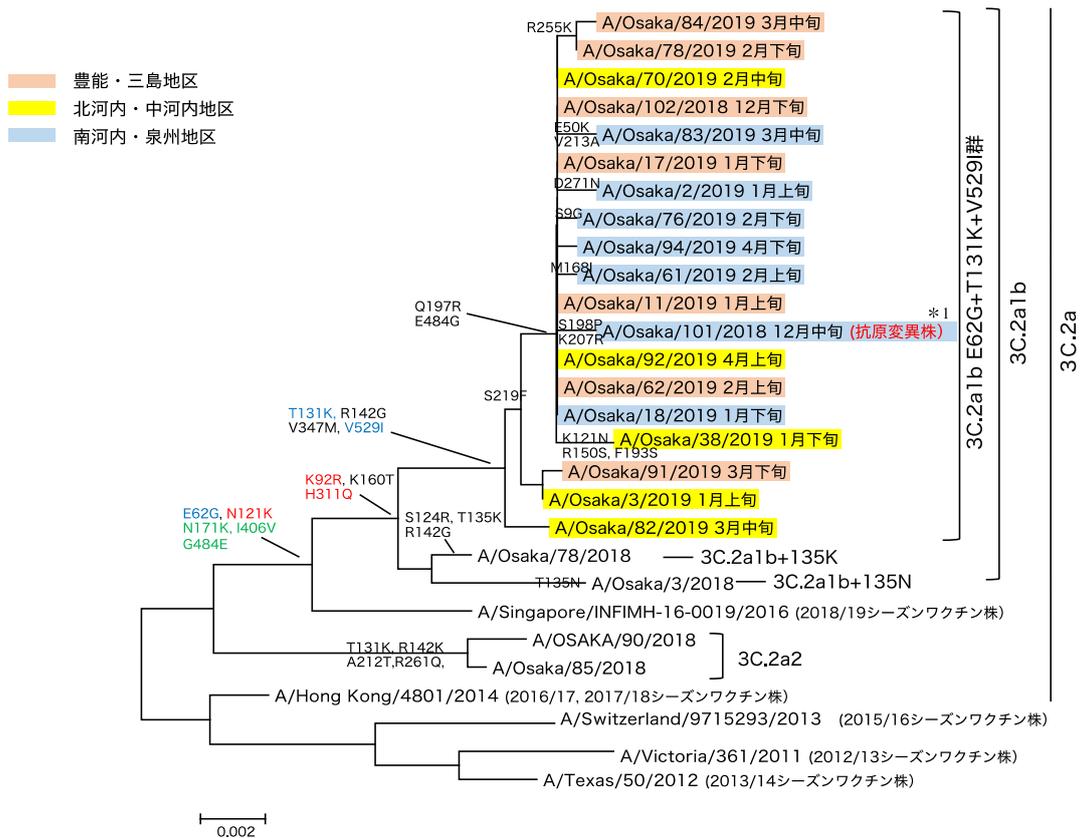


図3 AH3 亜型の HA 全長の遺伝子系統樹解析
表記等は図2.と同様

*1 2018/2019 シーズン分離株のうち、国立感染症研究所実施の詳細な抗原解析の結果抗原変異株と判定された株

複数検体の採取を依頼している。今回は 2 検体が搬入され、1 名は検体採取前日に迅速診断キットが陽性であったにも拘わらず、両検体からインフルエンザウイルスが検出されなかった。両検体からは別々の呼吸器ウイルスが検出され、学級での感染状況も不明であったため、集団発生の原因ウイルスは明らかにはできなかった。また他の検体についても、検出されたウイルスのなかで特に目立ったものはなかった。

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・安全性の臨床評価と VPD の疾病負荷に関する疫学研究」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、全ての皆様に深謝致します。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 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>
- 2) 福島若葉. 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). *IASR* 2016; **37**: 230-231.
- 3) WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019-2020 northern hemisphere influenza season.
https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2019_20_north/en/

- 4) 大阪府感染症情報センター. インフルエンザ関連情報.
<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) リアルタイム RT-PCR(TaqMan Probe 法)による同定. 平成 26 年. 24-28.
- 6) Morikawa S, Hiroi S, Kase T. Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *J Clin Virol* 2015; **64**: 59-63.
- 7) Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* 2002; **185**: 744-754.
- 8) Hatakeyama S, Sakai-Tagawa Y, Kiso M, Goto H, Kawakami C, Mitamura K, Sugaya N, Suzuki Y, Kawaoka Y. Enhanced expression of an α 2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4139 -4146.
- 9) GISAID (The Global Initiative on Sharing All Influeza Data). Epi Flu TM.
<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流行株抗原性解析と遺伝子系統樹 (2019 年 3 月 6 日)」.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-antigen-phylogeny.html>
- 11) 国立感染症研究所. IASR インフルエンザウイルス分離・検出速報 (自動更新 2019 年 5 月 14 日作成)
<https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data2j.pdf>
- 12) 森川佐依子, 廣井聡, 弓指孝博. 大阪府内における 2017/2018 シーズンのインフルエンザ流行状況. *大阪健康安全基盤研究所 研究年報* 2018; **2**: 26-35.
- 13) 国立感染症研究所. 2018/19 シーズン インフルエンザワクチン株.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-m/2066-idsc/related/584-atpcs002.html>
- 14) 大阪府感染症発生動向調査週報 第 16 週 (速報)
<http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/surv19/topics16.pdf>
- 15) 大阪府感染症発生動向調査週報 第 17 週 (速報)
<http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/surv19/topics17.pdf>
- 16) Takada K, Kawakami C, Fan S, Chiba S, Zhong G, Gu C, Shimizu K, Takasaki S, Sakai-Tagawa Y, Lopes TJS, Dutta J, Kniti D, van Bakel H, Yamada S, Watanabe T, Imai M, Kawaoka Y. A humanized MDCK cell line for the efficient isolation and propagation of human influenza viruses. *Nat Microbiol* 2019; Apr 29.
Doi:10.1038/s41564-019-0433-6. Online

WEB サイトの内容は 2019 年 5 月 18 日に確認した。

Influenza activity during the 2018/2019 season in Osaka prefecture

Saeko MORIKAWA, Satoshi HIROI and Kazushi MOTOMURA

The detection of the viral genome and isolation of influenza viruses from clinical specimens are carried out during the year to grasp the of influenza epidemic situation in Osaka prefecture. Furthermore, isolation of influenza viruses, analysis of the antigenic and genetic properties of circulating strains are carried out every winter influenza season.

During the 2018/2019 influenza season in Osaka prefecture, influenza activity increased in the 48th week in 2018, peaked in the 3rd ~ 4th weeks in 2019 and decreased. In this season, influenza AH1pdm09 subtype virus predominated followed by influenza AH3 subtype virus. The HA genes of some influenza A positive isolates were analyzed, AH1pdm09 isolates belonged to the several groups with some characteristic amino acid substitutions. The diversity of each group was the same trend as the sequence analysis of virus strains collected from Japan. On the contrary, all AH3 isolates analyzed in this report belonged to genetic group possessed three amino acid substitutions (E62G + T131K + V529I) in the subclade 3C.2a1b which divided three groups (3C.2a1b + 135K, 3C.2a1b + 135N and E62G + T131K + V529I) as Japanese circulating clades. It is necessary that genetic analysis of subsequent isolates to determine which group the next epidemic strain is derived from. We also tested 13 influenza virus negative specimens for other respiratory viruses. Two of the 8 positive samples contained two viruses.

Key words : influenza virus, infectious agents surveillance, phylogenetic tree analysis, respiratory virus

大阪府における蚊媒介ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2018年度)

青山幾子^a, 佐々木正大^{a,b}, 山崎貴子^a, 弓指孝博^a

大阪府では2003年度より蚊媒介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。

2018年度は6月から10月にかけて府内29カ所で蚊の捕集を行った。捕集された雌の蚊(7種4,939匹、421プール)について、蚊媒介ウイルスの検出を試みたが、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルスは検出されなかった。また、死亡カラス8羽についてウエストナイルウイルスの検出を実施したが、ウイルスは検出されなかった。捕集した蚊の乳剤をC6/36細胞、Vero細胞に接種してウイルス分離を試みた。細胞変性効果が見られた60プールのうち、8プールから *Aedes Flavivirus*、16プールから *Culex Flavivirus* が分離された。

キーワード：蚊媒介感染症、媒介蚊、サーベイランス、*Aedes Flavivirus*、*Culex Flavivirus*

蚊媒介感染症は、病原体を保有する蚊に刺されることによって起こる感染症のことで、主な蚊媒介感染症には、ウイルス性疾患である日本脳炎、デング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症、ウエストナイル熱、黄熱や、原虫感染症であるマラリアなどがある。日本脳炎は従来日本に常在する感染症だが、その他は海外からの輸入感染症として報告されている。しかし、デング熱に関しては2014年夏に東京都内の公園を中心にデング熱の国内流行が起こり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が流行し、わが国でもそれらの輸入症例が報告された²⁾。日本国内にはこれらの病原体を媒介できる蚊の種類が広く分布しているため、これら感染症の国内発生が危惧されている。

大阪府では蚊媒介感染症のうち、ウイルス性感染症の浸淫状況を監視するため、2003年度より蚊のサーベイランス調査を開始した^{3,4,5)}。2004年にはウエストナイル熱対応指針が策定され、

ウエストナイルウイルス(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が整えられた⁶⁾。サーベイランス調査開始当初はウエストナイル熱、デング熱、日本脳炎を対象としていたが、その後海外でのチクングニア熱、ジカウイルス感染症の流行に伴って、これらの病原ウイルスも検出できるよう検査法を改定した⁷⁾。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⁸⁾、死亡原因の不明なカラスの死骸が同定点で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2018年度の調査結果について報告する。

調 査 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、東大阪市内、

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪大学微生物病研究所感染機構研究部門ウイルス感染制御分野

高槻市内、豊中市内、枚方市内、八尾市内に計 29 カ所の定点を設定し、2018 年 6 月第 4 週から 10 月第 1 週（東大阪市及び高槻市は 9 月 3 週）までの期間、隔週の火曜日から水曜日に蚊の捕集調査を実施した。今年度は新たに定点 10、21 が追加された。また、定点 7、8、9、10 は実施日によっていずれかを選択して実施された。

2. 蚊の捕集方法

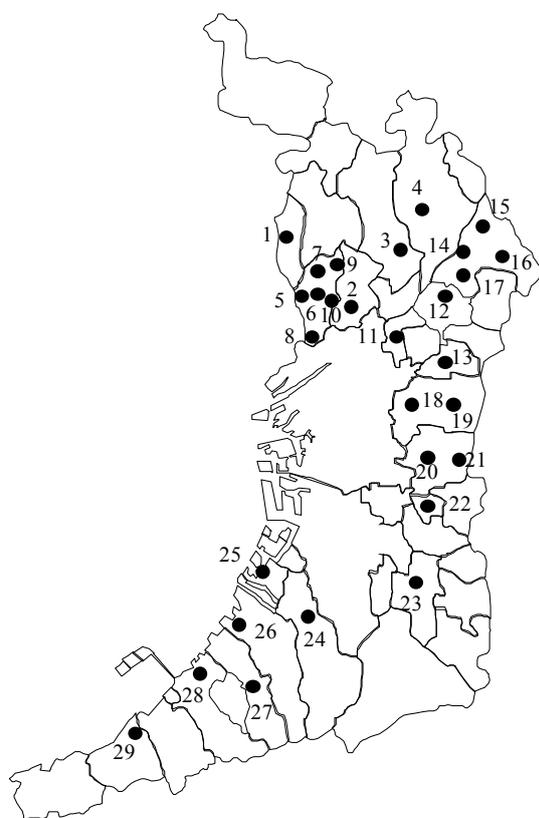
蚊の捕集には CDC ミニライトトラップ (John. W.Hock Company) を使用し、蚊の誘引のためドライアイス (1~2kg) を併用した。トラップは調査実施日の夕刻 16~17 時から翌朝 9~10 時までの約 17 時間設置した。トラップを設置する高さは地上 1.5~2m とした。また枚方市の 4 定点は水曜日の午前中に 8 分間ヒト匣法にて蚊を捕集した。捕集終了時、いずれの方法でも捕集網から蚊が逃げないように注意し、蚊を捕集網ごと約 1 時間冷凍した後に、蚊を取り出して実体顕微鏡下で形態学的に種を同定した^{9,10)}。なお

Culex pipiens pallens (アカイエカ) と *Culex pipiens molestus* (チカイエカ) については形態学的な同定が困難であるため、それらをまとめて *Culex pipiens complex* (アカイエカ群) とした。蚊は調査日、調査地点、蚊の種類ごとにプールし、ウイルスを媒介可能な雌の蚊のみ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、各検体は遺伝子検査時まで冷凍保存した。

3. 蚊からのウイルス検出

蚊のウイルス検査は、蚊媒介ウイルスのうち、フラビウイルス科フラビウイルス属の WNV、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) を対象として実施した。

蚊の破砕は 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



	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	高槻市
	5	豊中市(a)	豊中市
	6	豊中市(b)	
	7	豊中市(c)	
	8	豊中市(d)	
	9	豊中市(e)	
	10	豊中市(f)	
北河内	11	守口市	守口
	12	寝屋川市	寝屋川
	13	大東市	四條畷
	14	枚方市(西)	枚方市
	15	枚方市(北)	
	16	枚方市(東)	
	17	枚方市(南)	
中南河内	18	東大阪市(西)	東大阪市
	19	東大阪市(東)	
	20	八尾市(西)	八尾市
	21	八尾市(東)	
	22	藤井寺市	藤井寺
	23	富田林市	富田林
泉州	24	和泉市	和泉
	25	泉大津市	岸和田
	26	岸和田市	
	27	貝塚市	
	28	泉佐野市	泉佐野
	29	阪南市	

図 1 蚊の捕集地点

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ュヤーを除去し、0.2%BSA 加ハンクス液を 1 プール 30 匹未満の場合は 500 μ L、30 匹～50 匹の場合は 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）または QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）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、全ての蚊の種類を検査対象とし、フラビウイルス共通プライマー（FU1/cFD2）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^{11,12}。フラビウイルス共通プライマー（FU1/ cFD2）は JEV、DENV、ZIKV も検出可能であるため、FU1/ cFD2 のみ陽性の場合には増幅産物のダイレクトシーケンスを行い、BLAST 相同性検索にてウイルスの種類を同定することとした。DENV については検出感度を上げるため、ヒトスジシマカのみ DENV 特異的検出プライマー（Dus/Duc）を使用した¹³。また、CHIKV についてヒトスジシマカのみ 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¹⁴。

4. 蚊からのウイルス分離

蚊乳剤上清 100 μ L を 48 ウェルプレートに増殖させた Vero 細胞、C6/36 細胞に接種し、それぞれ 37 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C で約 2 週間培養し、細胞変性効果（CPE、cytopathic effect）を観察した。CPE が出現した場合は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は陰性と判定した。回収した上清は E.Z.N.A. Viral RNA Kit（OMEGA bio-tek）を使用して RNA 抽出を実施し、すべての蚊のプールについてフラビウイルス共通プライマー（FU1/cFD2、FU2/cFD3）^{13,17}を用いてウイルス遺伝子の検出を実施した。陽性の場合には増幅産物のダイレクトシーケンスを行い、BLAST 相同性検索にてウイルスの種類を同定した。

5. 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、回収時に腐乱やハエのウジの発生がない新鮮な個体であった場合に 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 加ハンクス液を用いて 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 7 種 4,939 匹であった。その構成は *Aedes (Stegomyia) albopictus*（ヒトスジシマカ）3900 匹の捕集数が非常に多く、ヒトスジシマカとアカイエカ群 917 匹の 2 種で全体の 97.5% を占めた（図 2）。次いで *Culex tritaeniorhynchus*（コガタアカイエカ）48 匹、*Anopheles sinensis*（シナハマダラカ）41 匹、*Armigeres subalbatus*（オオクロヤブカ）25 匹、*Culex bitaeniorhynchus*（カラツイエカ）6 匹、*Tripteroides bambusa*（キンパラナガハシカ）2 匹が捕集された。シナハマダラカやオオクロヤブカの捕集数はこれまでの調査より多かった。

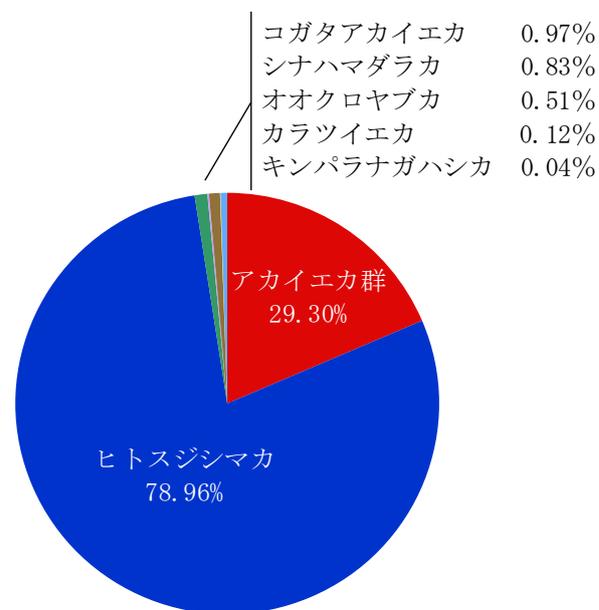


図 2 捕集された蚊の比率

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8月に少し減少するものの大きなピークはなくなだらかに推移した。また、ヒトスジシマカも調査期間中、常に捕集され、今年度は捕集数が常にアカイエカ群を上回った。

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に大きな差がみられたが、ヒトスジシマカはすべての定点で捕集された。ヒトスジシマカは、高槻、豊中（a）、寝屋川、東大阪東、泉大津、和泉で多く捕集され、この傾向は泉大津を除き昨年度と同様であった（豊中（a）定点は昨年度報告における豊中（西）定点と同地点）。今年度泉大津はヒトスジシマカが多く捕集された。ただし、8/8はトラップが転倒して装置が停止しており、蚊は捕集されていなかった。アカイエカ群は多くの定点で捕集され、毎年捕集数の多い豊中（a）や東大阪東では、大きなピークは示さず全体としてなだらかな推移を示したが、阪南のみ10月に大きく増加した。また、枚方（北、東、南）の3定点ではアカイエカが捕集されなかった。コガタアカイエカは11定点（豊中（a）、高槻、寝屋川、東大阪東、八尾、藤井寺、富田林、和泉、岸和田、泉佐野、阪南）で捕集され、シナハマダラカは東大阪東、八尾（東西）、富田林、和泉の5定点、オオクロ

ヤブカは高槻、和泉、貝塚の3定点、キンパラナガハシカは和泉、岸和田の2定点、カラツイエカは吹田、高槻、豊中（a）、八尾（東）、和泉の3定点でそれぞれ捕集された。

2. 蚊のウイルス遺伝子検査結果

各定点で捕集された蚊を種類別に分け421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遺伝子は検出されなかった。またヒトスジシマカの219プールについても、CHIKV遺伝子は検出されなかった。

3. 蚊からのウイルス分離結果

CPEが見られた113プール（Vero細胞29プール、C6/36細胞84プール）についてフラビウイルス共通プライマーを用いて遺伝子検査を実施したところ60プールが陽性となり、そのうち8プールが*Aedes Flavivirus*、16プールが*Culex Flavivirus*と同定された。これらは蚊の保有するフラビウイルスで、ヒトへの病原性は報告されていない¹⁵⁾。残りの36プールは未同定である。

4. 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8羽から、WNVの遺伝子は検出されなかった。

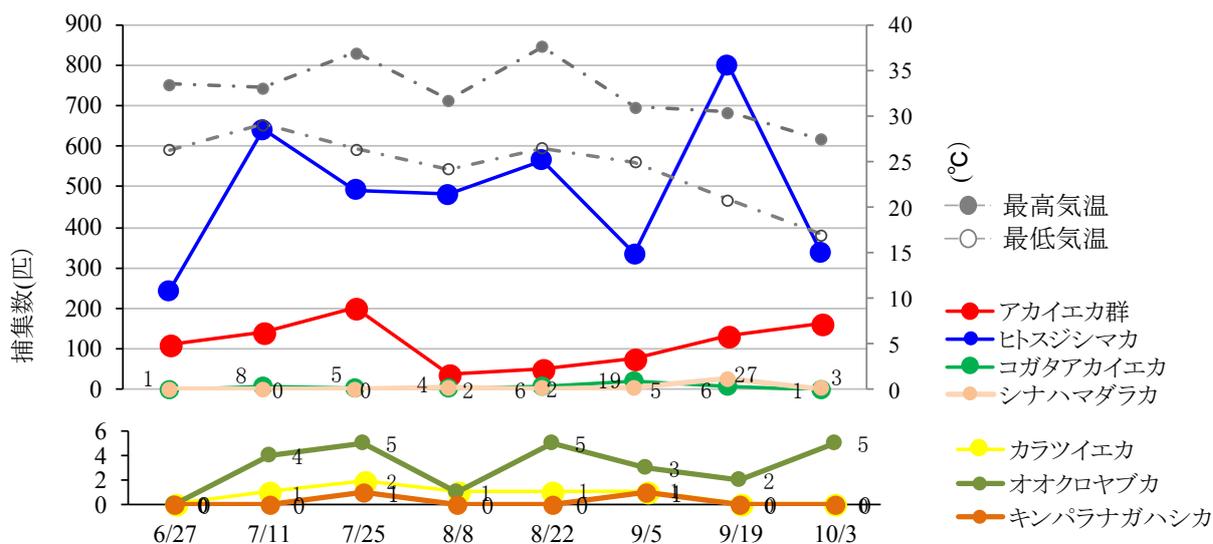


図3 蚊の捕集数の推移

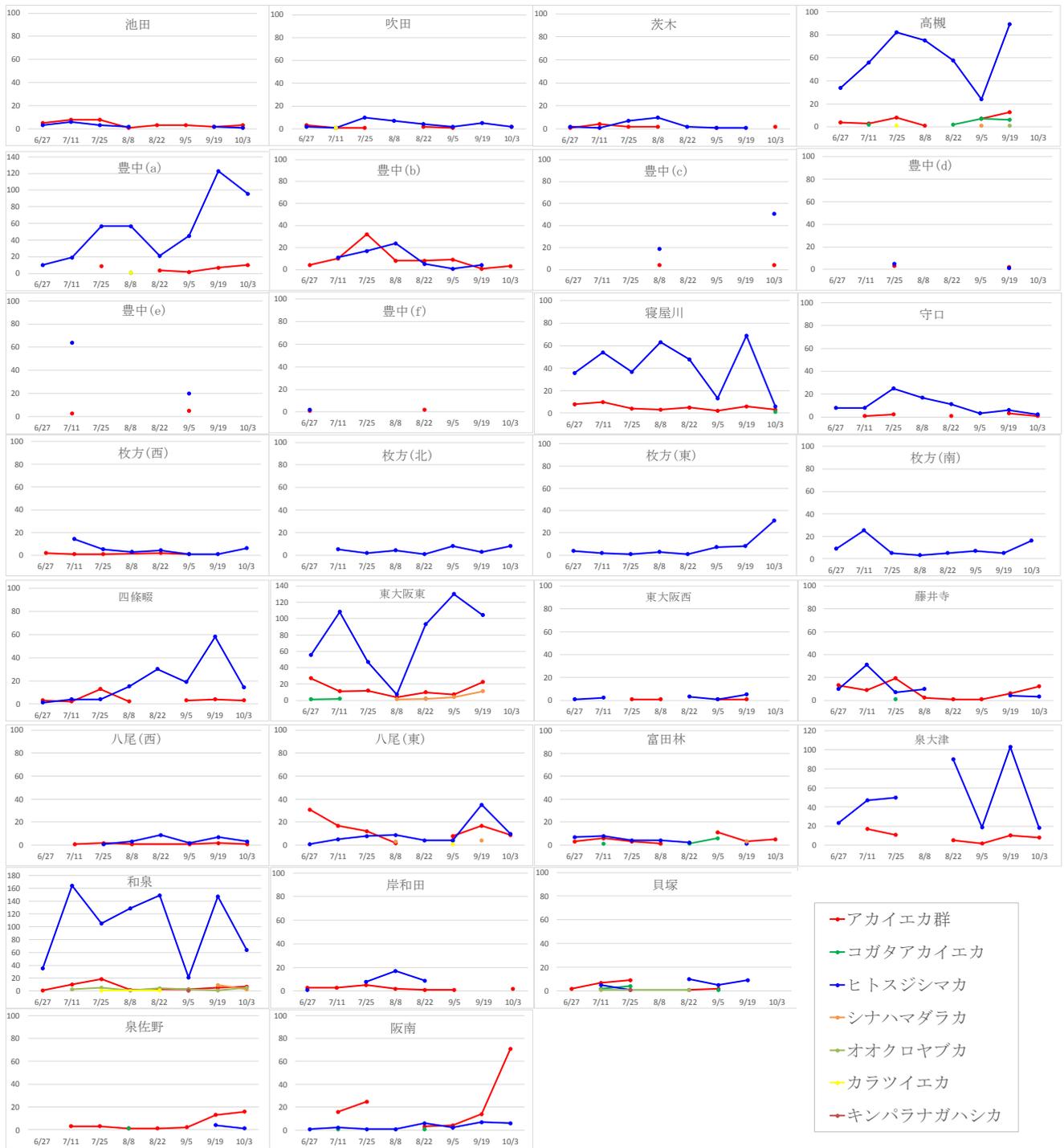


図4 定点別蚊の捕集数の推移

考 察

各調査定点で捕集される蚊の種類には、地点周囲の環境が大きく反映される。調査した定点のうち、八尾（東）、貝塚は5種、高槻は6種、和泉は7種の蚊が捕集された。蚊の種類が多くなった原因として、これらのトラップを設置した定点は、水田や池、竹林などが周囲にあり、それぞれの環境を好む異なった種類の蚊の発生源となったために、種類が多くなったと考えられた。蚊の捕集数は、調査実施前の気候変動や当日の天候、気温、風速、降水量などが大きく影響する。毎年アカイエカ群は調査開始時の6月末から7月初旬に大きなピークを示すが、今年は7月末に小さなピークを示しただけであった。この傾向はどの定点でも等しく、全体として捕集数が少なくなった。トラップ設置場所の周囲の状況が大きく変化した定点はなく、アカイエカの生息環境に大きな変動があったとは考えられなかった。気象庁の資料によると大阪の2018年6月一日平均気温は23.4℃、最高気温の平均は27.9℃、1日平均降水量192.0mmで、2017年6月のそれぞれ22.7℃、27.5℃、167.5mmと大きな差はなかったが、調査日付近における台風や梅雨前線の影響により、蚊の捕集数が減少した可能性は考えられた¹⁶⁾。また、2018年度の本土への台風上陸数は、9月4日に大阪を通過した台風第21号も含めて5個と多く、これらの降雨による蚊の発生源の増加などが、9月以降の蚊の捕集数の増加に関与した可能性があると考えられた。

今年度、大阪府内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結果では、感染症の原因となるウイルスは検出されなかった。しかし、大阪府には関西国際空港や大阪国際空港、大阪港や堺泉北港などの国際空海港があるため、海外から持ち込まれた蚊媒介感染症が大阪府内の蚊に浸淫する可能性は常に考えておかななくてはならない。捕集蚊のうち大多数を占めたヒトスジシマカは輸入症例の多いDENVを始め、ZIKV、CHIKVの主要な媒介蚊の1つであり、またアカイエカと共にWNVの主要な媒介蚊でもある。これらは府内の多くの定点で毎年捕集されており、蚊媒介感染症のアウトブレイクを防止するには、国内未発生時からこれらの

生息密度を低減させておくことが、重要であると考えられた。また、国内に生息する蚊でウイルスが確認された場合、迅速な対応が求められる。府内における蚊の生息状況を把握しておくことは、感染症未発生時における蚊の防除計画に役立つだけでなく、感染症発生時には蚊の駆除の資料となり、防除の対象となる地域を見極め、アウトブレイク対策を講じるために重要と考えられる。緊急時に即時対応するためには、本調査で実施しているような衛生研究所、保健所及び行政間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であると考えられる。

謝 辞

本調査は、大阪健康安全基盤研究所、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、調査に関係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、八尾市保健所の関係者の方々に深くお礼申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Kutsuna S, Kato Y, Moi ML, Kotaki A, Ota M, Shinohara K, Kobayashi T, Yamamoto K, Fujiya Y, Mawatari M, Sato T, Kunimatsu J, Takeshita N, Hyakawa K, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N. Autochthonous dengue fever, Tokyo, Japan, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015; Mar 21(3): 517-520.
- 2) 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査週報. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>
- 3) 弓指孝博, 瀧幾子, 齋藤浩一, 伊藤房子, 石田誠良, 倉持隆, 大竹徹, 奥野良信. 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調査 (平成16年度報告). 大阪

- 府立公衆衛生研究所所報 2004; 42: 57-63.
- 4) 瀧幾子, 弓指孝博, 吉田永祥, 田中智之, 大竹徹, 奥野良信. 大阪府の住宅地域における蚊の分布調査. 大阪府立公衆衛生研究所所報 2004; 42: 65-70.
 - 5) 青山幾子, 山元誠司, 山口敬治, 石川温子, 弓指孝博. 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). 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2017; 1: 29-35.
 - 6) 大阪府健康福祉部. ウエストナイル熱対応指針 2004
 - 7) 青山幾子, 弓指孝博, 中田恵子, 佐藤功, 佐藤良江, 倉持隆, 上澤行成, 加瀬哲男, 高橋和郎. 大阪府におけるウエストナイルウイルスに対するサーベイランス調査 (2008年度). 大阪府立公衆衛生研究所所報 2009; 47: 1-7.
 - 8) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知(2003年12月13日). 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
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb8583&dataType=1&pageNo=1
 - 9) 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 2004; 1-13.
 - 10) 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; 2003.
 - 11) Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the Genus Flavivirus. *J. Virol* 1998; 72(1): 73-83
 - 12) 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.
<https://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/WNVhomepage/WNVLbotest.pdf>
 - 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>
 - 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 Ver1.1.
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/CHIKV.v1.1.pdf>
 - 15) Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology* 2009; 391: 119-129.
 - 16) 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 2019 年 6 月 10 日に確認した。

Mosquito-Borne Virus Surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2018 Report)

Ikuko AOYAMA^a, Tadahiro SASAKI^{a,b}, Takako YAMASAKI^a and Takahiro YUMISASHI^b

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 (DENV) together with domestic Japanese encephalitis virus (JEV). Monitoring of Chikungunya virus (CHIKV) and Zika virus (ZIKV) have also been added as mosquito-based surveillance since 2008 and 2015, respectively.

In 2018, we conducted RT-PCR examinations for arboviruses on a total of 4,939 female mosquitoes (7 species) collected at 29 points in Osaka Prefecture from June to October, and for WNV on 8 dead crows. All mosquitoes' examinations gave negative results for WNV, DENV, JEV, CHIKV, and ZIKV, and all examinations of crows gave negative results for WNV. In contrast, we isolated 24 insect flaviviruses (8 *Aedes Flavivirus*, 16 *Culex Flavivirus*) from 60 mosquito pools that replicated in Vero cells and/or C6/36 cells with mild cytopathic effects.

Key words : mosquito-borne infection, vector mosquitoes, surveillance, *Aedes Flavivirus*, *Culex Flavivirus*

a Osaka Institute of Public Health

b Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

2018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, 平井佑治, 福田昭, 阿部仁一郎, 久保英幸, 改田厚, 山元誠司, 馬場孝, 平井有紀, 江川和孝, 長谷篤, 秋吉充子, 柴川紗恵子, 山崎一夫, 小笠原準

2018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62件(285検体)について下痢原性微生物の検出を行った。下痢原性微生物が検出された45件の内訳は、カンピロバクターが検出されたものが22件、ノロウイルスが19件、下痢原性大腸菌が2件、サルモネラが1件、クドア・セプテンpunkタータが1件であった。カンピロバクターとノロウイルスの検出が多かった。

キーワード：食中毒、下痢原性微生物、食品媒介感染症、疫学

2018年の大阪市の食中毒事件数は30件、患者数205名であり、2017年の32件、354名に比べると事件数は変わらないが、患者数は大幅に減少した。食中毒事件30件のうちカンピロバクターが25件(83.3%)、ノロウイルスが2件(6.7%)、アニサキスが2件(6.7%)、シュウ酸カルシウムが1件であった¹⁾。カンピロバクターによる食中毒事件数は2014年から毎年事件数が20~30件、患者数が120~190名の間で推移しており、減少の兆しは見られない。一方、カンピロバクター以外の病因物質の事件数が減少し、その結果、2018年はカンピロバクターによる食中毒事件が8割を超えている。ノロウイルスの事件数は2017年の6件からさらに減少し、このことが、患者数が約100名程度減少した要因の一つと考えられる。2018年の全国の食中毒統計によると、食中毒事件総数1,014件のうち事件数が最も多かったのはアニサキスの468件で、カンピロバクターによる事件数はこれに次いで多く、319件であった²⁾。

本調査は、大阪市内で食中毒が疑われ当研究所に検体が搬入された事件についてまとめ、その原因病原体と疫学情報を基に感染源を明らかにすることで、本市における食品衛生行政の向上に役立てることを目的としている。なお、赤痢菌、コレラ菌、パラチフスA菌、チフス菌お

よび腸管出血性大腸菌の三類感染症患者検出状況については大阪市感染症発生動向調査事業報告書³⁾に別途まとめた。

材 料 と 方 法

1. 検体

食中毒疑い、または有症苦情で当研究所に搬入された以下の検体について検査を行った。すなわち、有症者便と吐物、食品残品、原因と考えられる施設(患者宅を含む)に保存されていた検食と同施設のふきとり水および、調理従事者の便と手指のふきとり水を調査の対象とした。

2. 下痢原性細菌の検出

対象菌種と使用した培地は、表1に示した。細菌は分離後、常法に従って生化学性状を確認し、菌種を同定した。また、血清型別を必要とする細菌については、各種の型別用免疫血清(デンカ生研)を用いて血清型別試験を行った⁴⁾。

3. 毒素産生性試験および病原遺伝子の検出

下痢原性細菌分離後、必要とされる場合には毒素産生性試験、病原遺伝子の検出を行った。毒素産生性試験は各種毒素産生用培地および市販の毒素検出用キット(デンカ生研)を用いて行

表1 検査対象とした菌種と菌分離に用いた培地

対象菌種	増菌培地	分離培地
<i>Aeromonas</i> spp. (エロモナス)	アルカリペプトン水	BBG ^{*1}
<i>Bacillus cereus</i> (セレウス菌)		NGKG
<i>Campylobacter jejuni/coli</i> (カンピロバクター)	プレストン培地	mCCDA
<i>Clostridium perfringens</i> (ウェルシュ菌)	GAM 半流動培地、 チオグリコール酸塩培地	カナマイシン加 CW, カナマイシン不含有 CW ^{*2}
Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> (下痢原性大腸菌)	mEC 培地	CT-SMAC, DHL クロモアガー-ECC ^{*2} , クロモアガー-STEC ^{*2} , クロモアガー-O157 ^{*2}
<i>Salmonella</i> spp. (サルモネラ)	SBG (糞便等)、BPW (食品等)、 RV (食品等)	SS, DHL, MLCB
<i>Salmonella</i> Typhi (チフス菌)	マンニット加セレナイト	SS, DHL
<i>Salmonella</i> ParatyphiA (パラチフス A 菌)	マンニット加セレナイト	SS, DHL
<i>Shigella</i> spp. (赤痢菌)	BPW ^{*2} 、シゲラブロス ^{*2}	SS, DHL
<i>Staphylococcus aureus</i> (黄色ブドウ球菌)	7.5%食塩加トリプトソイブロス ^{*2}	食塩卵寒天
<i>Vibrio cholerae</i> (コレラ菌)	アルカリペプトン水	TCBS, クロモアガービブリオ ^{*2}
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (腸炎ビブリオ)	アルカリペプトン水 (食品等)、 ポリミキシンプイオン (糞便等)	TCBS

*1 文献 9) 参照 (自家調製)、*2 必要に応じて追加

い、病原遺伝子の検出は遺伝子増幅法 (PCR 法) により行った⁴⁾。

4. 感染性胃腸炎の原因となるウイルスの検出

ウイルス性食中毒が疑われた事件については、リアルタイム RT-PCR 法⁵⁻⁷⁾を用いてノロウイルスまたはサポウイルスの検査を行った。

5. クドア・セプテンpunkタータの検出

厚生労働省の通知による、「ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検査法 (暫定)⁸⁾」にしたがって検査を行った。

結 果 お よ び 考 察

1. 食中毒事例数の内訳

2018 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事例は合計 62 件であった。検体数は、患者および調理人の便および吐物 259 検体、食品、ふき取りなどが 26 検体で、計 285 検体あった。62 件中 45 件 (72.6%) から下痢原性微生物が検出された (表 2)。

2. 検出病原体

下痢原性微生物が検出された 45 件の内訳は、カンピロバクターが検出されたものが 22 件、ノロウイルス 19 件、下痢原性大腸菌 2 件、サルモネラ 1 件、クドア・セプテンpunkタータ 1 件であった。2 件の下痢原性大腸菌のうち 1 件は腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26:H11 (*stx1* 遺伝子保有) が検出されたが、その後の調査により、保育所での EHEC 感染症集団事例であることが判明した。発症者数は 52 名に及んだ¹⁰⁾。大阪市で発生したノロウイルスによる食中毒事件数は昨年の 6 件よりさらに減少し 2 件であったが、近隣の他府県で発生した事例の関連調査での検出事例数が多かったことから、検出された下痢原性微生物としてはカンピロバクターの次に多い 19 件となった。これらのうち、食中毒でなく感染症と判断された事例が疑い例を含めて少なくとも 7 件あった。遺伝子群は Genogroup II (GII) が 19 件のうち 17 件と主流で、Genogroup I (GI) が 2 件であった。カンピロバクターは、*C. jejuni* によるものが 21 件、*C. coli* によるものが 1 件であった。*C. coli* が検出された 1 事例は患者 1 名のみからの検出であり、本事例の発生後に、大阪

表2 検出された下痢原性微生物と食中毒の疑いで調査された事例の概要

事件番号	食中毒番号	発生日	患者数	調査者数	検出微生物	陽性数／被験者数	原因施設 ¹⁾	原因食品 ²⁾	潜伏期間	下痢	腹痛	発熱 ³⁾	嘔吐	その他	備考(調理従事者検査等) ⁴⁾	
1		1月1日	25	不明	Norovirus (G2)	1/1	飲食店 大衆酒場	不明(一品料理)	16.5-53(63)hr	○	○	○	○		調理従事者:NV G2陽性 1/9 (G2.2) 他都市患者よりNV G2 (G2.2)検出	
4		1月21日	108	不明	Norovirus (G2)	12/17	ホテル 宴会場	不明(感染)	26-53hr	○	○	○	○		悪寒 緊急後重	
5		2月1日	24	36	Norovirus (G2)	1/1	飲食店 和食(うどんや)	不明	不明			○	○	○	大阪府事例	
6		2月4日	38	72	Norovirus (G2)	1/1	ホテル 宴会場(結婚式披露 宴)	不明(感染)	14-52h	○	○	○ 39	○	○	緊急後重 沖縄県事例	
7	1	2月16日	5	6	Norovirus (G2)	0/0	飲食店 その他料理	不明(一品料理)	27-29hr	○	○	○	○	○	悪寒 調理従事者:NV G2陽性 1/4 (G2.17) 患者は悪寒	
8		2月18日	50	80	Norovirus (G2)	1/1	他都市内ホテル 宴会場	不明(感染)	不明	○		○	○		京都市事例	
9		3月4日	20	30	Norovirus (G2)	1/1	飲食店 居酒屋	不明	32.5hr	○	○	○ 38.5	○	○	悪寒 京都市事例	
10		3月11日	15	30	Norovirus (G2)	4/4	ホテル 飲食店(夫妻の祝宴)	宴会料理	18.5-27.5hr	○	○	○ 37.7-38.3	○	○		三重県事例
11	3	3月4日	31	64	Norovirus (G1)	6/9	飲食店 韓国料理	白黒キムチ(コース料理または一品料理)	30hr	○	○	○ 37.7	○	○	悪寒	調理従事者:NV G1陽性(3/14), Salmonella Harder陽性(1/14) ふきとり材料:NV陽性(0/10) 牛Δ子:NV陽性(0/4)
12		3月13日	4	4	Norovirus (G2)	1/1	飲食店 カキ小屋	生力カキ	38.5-62hr	○	○	○ 38-39	○	○		他都市患者よりNV G1, G2検出
13	5	3月22日	5	5	C. jejuni	2/4	飲食店 焼鳥屋	不明(コース料理)	27-78hr	○	○	○ 37.5			緊急後重	
14		3月31日	3	4	Norovirus (G1)	1/1	ホテル	不明	不明	○			○	○	沖縄県事例	
16	6	4月1日	4	8	C. jejuni	3/3	飲食店 焼鳥屋	さきみ焼(一品料理)	39-75hr	○	○	○ 38-38.8	○		頭痛	
18		4月10日	2	2	C. jejuni	1/1	飲食店 焼鳥屋	焼鳥(生?)	57.5hr	○		○ 37		○	頭痛	他自治体(東京都)事例
19	8	4月14日	4	4	C. jejuni	1/1	飲食店 焼鳥屋	不明(一品料理)	36.5-47.5hr	○	○	○ 38-39	○	○	頭痛	
20		4月23日	5	7	Norovirus (G2)	2/2	飲食店 焼肉店	生塩タタキ刺身,牛しゃぶ,魚介	31-50hr	○		○ 38.5	○	○		調理従事者:NV陽性(0/4)
22	9	5月1日	5	7	C. jejuni	1/1	飲食店 大衆酒場	さきみカルパッチョ(コース料理)焼肉(鶏肝、サ ザキ),玉ひもレア焼(一品料理)	40-59hr	○	○	○	○		頭痛	
24		5月20日	9	不明	EHEC O26:H11 (stx1遺伝子保有)	2/3	保育園	ヒトヒト感染疑い	不明	○	○	○	○		血便	保育園集団感染事例 調理従事者EHEC O26陽性:0/4
26		5月21日	7	7	Norovirus (G2)	5/5	飲食店 ファミリーレストラン	ヒトヒト感染疑い、パスタ、チキン料理喫食(非加 熱食品無)	36hr	○	○	○ 37.8				調理従事者:NV G2陽性 1/3
27		5月24日	18	29	Norovirus (G2)	11/13	町内会集會	不明(ヒトヒト感染疑い)	31-47hr	○	○	○	○	○	緊急後重	調理従事者:NV G2陽性 3/4
28		5月22日	不明	不明	Norovirus (G2)	2/2	結婚式場	ヒトヒト感染疑い	36-50hr	○	○	○	○	○		他自治体(姫路市)事例
29		5月24日	21	58	Norovirus (G2)	6/16	幼稚園	ヒトヒト感染疑い	52.5-67hr	○	○	○ 39	○	○		
30		5月21日	8	12	C. jejuni	1/1	飲食店 焼鳥店	生鶏料理	92hr	○	○	○ 39	○		関節痛	他自治体(神戸市)事例
31		5月27日	2	2	C. jejuni	1/1	飲食店 焼鳥店	鶏刺し	53.5hr	○	○	○ 38.9	○			検体患者 は発熱無
32		5月28日	3	4	S.Enteritidis	1/1	飲食店 焼鳥店	鶏刺身	17.5-20.5hr	○		○	○	○	悪寒	他自治体からS.Enteritidis 検出1名
33	12	6月4日	6	16	C. jejuni	4/6	飲食店 大衆酒場	鶏炙り焼き、さきみシソ焼き(コース料理)	Ave.65hr	○	○	○			頭痛	
34	14	6月16日	3	3	C. jejuni	2/3	飲食店 大衆酒場	鶏刺身4種盛り(生も)ずり、さきみ、たたき)和 牛たたき(コース料理)	36.5-94.5hr	○	○	○			悪寒 倦怠感 頭痛	
35		6月26日	4	2	C. jejuni	1/2	飲食店 焼鳥屋	一品料理(鶏刺身、生入り、鶏タタキ)	72hr	○	○	○ 39.3		○		
36		7月12日	11	8	C. jejuni	1/2	飲食店 焼鳥屋	一品料理(鶏タタキ)	35.5-113hr	○	○	○ 38-40		△ 数名のみ	△ 数名のみ	
39	18	7月28日	13	32	C. jejuni	7/15	飲食店 焼鳥屋	不明(コース料理)	6h,10hr,60-70hr	○	○	○	○	△ 数名のみ	頭痛	
43		8月24日	4	120	EAST1EC O6:H11M (astA遺伝子保有)	1/1	弁当店	弁当(不明)	5.5hr			○				他都市(横浜市)事例
44		9月2日	10	23	C. coli	1/5	飲食店 焼鳥屋	一品料理	43.5-63.5hr	○	○	○ 37.5-38.3		△ 数名のみ	悪寒 倦怠感	
45	21	9月7日	9	19	C. jejuni	2/4	飲食店 焼鳥屋	一品料理(トリレアステーキ、さきみ焼き)	Ave.45hr	○	○	○ 38.3			頭痛	
46		9月8日	3	4	C. jejuni	1/2	飲食店 焼鳥屋	一品料理	26-84hr	○	○	○			頭痛	
48	22	9月17日	5	5	C. jejuni	1/2	不明	不明	36-111hr	○	○	○		○	頭痛	
49	23	9月28日	9	26	C. jejuni	1/2	飲食店 大衆酒場	さきみ串焼き、地鶏の炙り焼き(コース料理)	34.5-95.5hr	○	○	○				
51	24	9月30日	13	19	C. jejuni	4/6	飲食店 大衆酒場	さきみのお造り(一品料理)	41-106hr	○	○	○ 37-38			頭痛	
53		11月17日	7	12	Klebsiella septempunctata	1/1	飲食店 割烹料理	ヒラメ等のにぎり寿司、カンパチ、マグロを含む刺身 など	4hr				○	○	軽症	他都市(大阪府)施設
55		11月23日	15	不明	Norovirus (G2)	9/12	飲食店 寿司屋	法事会席	24-48hr					○		他都市(大阪府)事例
56		11月27日	8	18	C. jejuni	1/1	飲食店 焼鳥屋	一品料理(トリタタキ、鶏の生肝等)	61hr	○	○	○	○	○	複数回	他都市(尾崎市)事例
58		12月7日	6	12	Norovirus (G2)	1/1	不明	不明	39hr	○	○	○ 37.4	○		悪寒 倦怠感	他府県(滋賀県)事例
59		12月9日	7	7	Norovirus (G2)	3/4	飲食店 ファミリーレストラン	出前弁当	22.5-49hr	○	○	○ 37-38.8			頭痛	府内事例:府検査で1/3名NV陽性、 調理従事者:NV陽性(0/10)
60	27	11月24日	5	11	C. jejuni	1/1	飲食店 焼鳥屋	炙り焼むね肉の黒豆サラダ、炙り焼むね肉のポン 酢漬け、鶏もも肉の炙り焼き(コース料理)	39-98hr	○	○	○				
61	30	12月16日	3	42	C. jejuni	5/6	不明	不明	45-95hr	○	○	○ 38-39			倦怠感	
62		12月28日	4	9	C. jejuni	1/1	飲食店 焼鳥屋	一品料理(トリ刺身)	20hr	○	○	○ 38.5	○	○		

- 1) 検体搬入時に付けられた番号。
- 2) 食中毒と判断され厚生労働省に届出された事件につけられた番号。太字で示す。
- 3) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因施設を示す。
- 4) 食中毒と判断されなかった事例は推定原因食品を示す。
- 5) 患者の平均体温。
- 6) 陽性数／被験調理者数あるいは陽性数／被験食品数

表3 搬入検体から分離された下痢原性微生物数の過去20年間の年次推移^{*1}

下痢原性微生物	発生年																			
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
サルモネラ	41 ^{*2}	15	10	11 ^{*2}	19 ^{*2}	10	7 ^{*2}	7	11	9	6	4	3	5	4	2 ^{*2}	0	3 ^{*2}	5 ^{*2}	1
内 S. Enteritidis	15	15	7	8	10	7	5	5	9	7	4	3	1	3	1	1	0	2	2	1
腸炎ビブリオ	24 ^{*2}	3	8	8 ^{*2}	2	3	1	3	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
内 K6	14	1	5	5	1	3	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ノロウイルス	10	14	29	25	42 ^{*2}	47	51	94	29	38	41 ^{*2}	47	38	47	34 ^{*2}	28 ^{*2}	44	39 ^{*2}	30	19
カンピロバクター	2	3	7	10 ^{*2}	14 ^{*2}	7	10 ^{*2}	12	19	20	10 ^{*2}	14	20 ^{*2}	8 ^{*2}	11 ^{*2}	27 ^{*2}	32 ^{*2}	36 ^{*2}	23 ^{*2}	22
黄色ブドウ球菌	2	2	0	3 ^{*2}	4 ^{*2}	2 ^{*2}	2	1	4	4	3	2 ^{*2}	2	3 ^{*2}	10 ^{*2}	8 ^{*2}	7 ^{*2}	2 ^{*2}	1 ^{*2}	0
クドア	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 ^{*2}	2	4 ^{*2}	7 ^{*2}	3 ^{*2}	0	0	1
下痢原性大腸菌	0	2	1	0	0	0	1 ^{*2}	1 ^{*2}	0	0	2 ^{*2}	3 ^{*2}	1 ^{*2}	2 ^{*2}	2 ^{*2}	2 ^{*2}	3	2	0	2
ウェルシュ菌	1	2	1	4	1	1	4	0	1	2	1	3 ^{*2}	1	0	3 ^{*2}	1	2	1	3	0
セレウス菌	0	0	0	3 ^{*2}	1 ^{*2}	2 ^{*2}	1	3	0	1	0	0	1	1	2 ^{*2}	0	0	0	1	0
エロモナス	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
サボウイルス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	2	0	0	0	0	0
ナグビブリオ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

—：実施せず

*1：感染症としての腸管出血性大腸菌は除く。

*2：件数は同時検出事例を含む。

市内で食中毒事例として処理された施設と同一店を利用しており、喫食したメニューも同じであったが、これらの事例間の関連性は不明であった。

表3に示すように検出される下痢原性微生物としては、2005年以降ノロウイルスとカンピロバクターが主流となっており、両者が占める割合が2017年は61件のうち53件(86.9%)、2018年は45件のうち41件(91.1%)であり、9割を超えた。2018年に全国で事件数が最も多かったアニサキスは、大阪市内で2事例の報告があったが、食中毒原因究明調査としての検体の搬入はなかった。カンピロバクターによる事例が22事例と最も多かったが、これらのうち15事例は鶏の生食あるいは加熱不十分な状態での喫食と関連しており、鶏の生食のリスクについて引き続き周知する必要がある。

結 論

2018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62件(285検体)について下

痢原性微生物の検出を行った。下痢原性微生物が検出された45件の内訳は、カンピロバクターが検出されたものが22件、ノロウイルスが19件、下痢原性大腸菌2件、サルモネラ1件、クドア・セプテンプレクタータ1件であった。カンピロバクターとノロウイルスの検出が多かった。

謝 辞

本調査にあたり疫学情報の収集にご協力いただきました大阪市健康局健康推進部生活衛生課食品衛生グループの皆さま、大阪市保健所食品衛生監視員の方々、大阪市保健所感染症対策課の方々および検査実施に甚大なるご協力をいただきました微生物課・瀧野薫氏に深謝致します。

利 益 相 反

開示すべき利益相反は無い。

文 献

- 1) 大阪市健康局. 平成 30 年度大阪市食品衛生監視指導計画の実施結果の概要.
<https://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfiles/contents/0000439/439567/kekkgaiyou2.pdf>
- 2) 厚生労働省. 食中毒統計資料. 平成 30 年食中毒発生状況.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 3) 大阪市. 大阪市感染症発生動向調査事業報告書(結核を除く)(平成 30 年版) 2018
- 4) 中村寛海, 勢戸祥介, 長谷篤, 西川禎一, 北瀬照代, 他. 1998 年に大阪市内の食中毒原因調査において明らかにされた下痢原性微生物. *大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報* 1999; **61**: 51-57.
- 5) Kageyama, T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1548-1557.
- 6) 入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾治, 久保英幸, 村上 司, 他. リアルタイム PCR 法を用いた Norwalk virus 検出法の評価. *大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報* 2002; **64**: 6-10.
- 7) Oka T, Katayama K, Hansman HS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, et al. Detection of human Sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2006; **78**: 1347-1353.
- 8) 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 0711 第 1 号. *Kudoa septempunctata* の検査法について(暫定版). 2011
- 9) Nishikawa Y, Kishi T. A modification of bile salts brilliant green agar for isolation of motile *Aeromonas* from foods and environmental specimens. *Epidemiol Infect* 1987 ; **98** : 331-336.
- 10) 国立感染症研究所. 腸管出血性大腸菌感染症 2019 年 3 月現在. *病原微生物検出情報* 2019 ; **40**: 71-72.

<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/2019/05/471tt02.gif>

WEB サイトの内容は 2019 年 8 月 28 日に確認した

Enteric pathogens detected during investigation of food poisoning outbreaks in Osaka City in 2018

Hiromi NAKAMURA, Kaoru GOTO, Kaoru UMEDA, Kaori YAMAMOTO, Yuji HIRAI, Akira FUKUDA, ,
Niichiro ABE, Hideyuki KUBO, Atsushi KAIDA, Seiji P YAMAMOTO, Takashi BABA, Yuki HIRAI,
Kazutaka EGAWA, Atsushi HASE, Atsuko AKIYOSHI, Saeko SHIBAKAWA, Kazuo YAMAZAKI
and Jun OGASAWARA

A total of 62 incidents of suspected food-borne infectious diseases or food-hygienic problems were investigated in Osaka city in 2018. Enteropathogenic microorganisms were detected as causative agents in 45 incidents (72.6%), *Campylobacter jejuni /coli* in 22 incidents *Norovirus* in 19 incidents, Diarrheagenic *Escherichia coli* in 2 cases, *Salmonella* Enteritidis in 1 incident, *Kudoa septempunctata* in 1 incident. In recent years, *Campylobacter jejuni / coli* and *Norovirus* were detected as major enteropathogenic microorganisms.

Key words : food poisoning, enteric pathogens, foodborne infection, epidemiology

冷凍果実小分け施設における *Listeria monocytogenes* 汚染状況

中村寛海^a, 平井佑治^a, 武藤光伸^b, 宮木行雄^b, 小山浩嗣^b, 山本雅由^b, 中野有一^b, 説田景^b,
奥原潤^b, 小笠原準^a

大阪市内を流通している冷凍果実の汚染実態を知ることが目的として、冷凍果実の小分け施設から採取したふきとり水および冷凍果実（ブルーベリー）から *Listeria monocytogenes* (LM) の検出を試みた。その結果、1 施設 3 検体から LM が検出された。3 検体は食品が接するラインではなかったものの、分離された 15 株は、全て血清型 1/2a で、2 種類の制限酵素による PFGE パターンも全て一致した。施設から採取した原材料を含む全てのブルーベリーから LM が検出されなかったことから、当該施設の LM 汚染は施設外の環境からの持ち込みの可能性が高く、LM を施設内に定着させないよう、作業区画を明確に区別することが製品の LM 汚染防止に重要であると考えられた。今回調査を実施した 2 施設では、LM 汚染を受けやすいと考えられた最終製品を包装する前に小分けするための大型のウェイトチェッカーは清潔に保たれており、製造ラインのふきとり検体で生菌数、大腸菌群が 100 cfu/ml を超えるものはなかった。大腸菌も全ての検体で陰性であった。冷凍ブルーベリーから LM および大腸菌群、大腸菌は検出されず、生菌数は 80 cfu/g 未満であった。添加回収試験を実施して確認する必要があるものの、ブルーベリーの pH は 3.5~4.6 であり、LM が増殖しにくい食品であると考えられた。

キーワード : *Listeria monocytogenes*、冷凍果実、製造施設、汚染

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 (10⁷cfu 以上) 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、HIV 患者、高齢者など感受性の高いグループには少量菌の摂取で感染して敗血症や髄膜炎、髄膜脳炎などの重篤な症状を呈し、致死率が高い¹⁾。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おり²⁾、Scallan らは、米国ではリステリア症で毎年 1,455 名が入院し、255 名 (15.9%) が死亡すると推計するとともに、その 99% は食品が媒介していると報告している³⁾。日本国内において、食品媒介リステリア症は 2001 年にナチュラルチーズを原因とする 1 事例が発生したのみであるが⁴⁾、国内を流通する食品の

LM 汚染状況はリステリア症の集団事例が毎年のように報告されている欧米諸国と変わらない⁵⁾。また、国内のリステリア症患者は年間平均 200 名と推計されていることから⁶⁾、人口の高齢化が進む日本国内において、今後、食品媒介リステリア症の集団事例の発生が懸念される。リステリア症の原因食品としては、Ready-To-Eat 食品 (RTE 食品) と呼ばれる、そのままで喫食可能な加熱調理済み食品が最も多い。そのため、Codex の基準では、食品媒介リステリア症の原因食品として最もリスクの高い RTE 食品において、LM が増殖可能な食品には「25g あたり LM が検出されないこと」としている⁶⁾。野菜や果物などの生鮮品は RTE 食品に含まれ、近年、健康志向の高まりから需要が増えている。これらは加熱工程を経ないで流通、喫食されることから、食品媒介リステリア

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

症の原因食品となるリスクの高い食品であると考えられ、近年、野菜や果物を原因食品とするリステリア症事例の増加がみられる^{7,8)}。実際に、2015～18年にかけてEU加盟5か国(オーストリア、デンマーク、フィンランド、スウェーデンおよび英国)で冷凍コーンおよびその他の冷凍野菜によるLMアウトブレイクが発生している⁹⁾。また、2011年に米国でカンタループメロン(赤肉のマスクメロン)による患者147名中33名が死亡するという大規模なLMアウトブレイクの発生が見られ、2018年にもオーストラリアで同じくカンタループメロンを原因とする患者20名中7名が死亡する事例が発生している¹⁰⁾。

一方、近年、食品の低温流通機能が発達し、冷凍状態での野菜や果物の広範な流通が可能となり、海外からも数多く輸入されるようになった。その結果、2016年に米国で冷凍野菜(コーン)を原因とするリステリア症事例が発生し、国内に輸入されていたこれらと同ロットの製品が回収されるという事態も起こっている^{11,12)}。野菜や果物は海外からの輸入が多く、特に冷凍果実は、そのままジュース等に加工されたり、アイスクリームやスイーツのトッピング等に利用され、冷凍野菜のように再加熱されることはほとんどなく、喫食される。また、これらは冷凍で流通するが、成分規格が存在するいわゆる冷凍食品でないことが多い。このような食品は、原材料の選別や取扱いが衛生的に取り扱われず、食中毒菌等に汚染されている可能性が高いと考えられる¹³⁾。冷凍食品は長期間保管可能であるため、市場に流通する期間が長く、製品が一度LM汚染を受けるとこれらと接触する機会も多くなる。このため、たとえ汚染が低濃度であっても、病院などで使用され、高齢者や基礎疾患のある患者などが喫食することにより、リステリア症を発症し、死に至る危険性もある。米国では2015年に病院でLMに汚染されたアイスクリームを原因とする事例が発生している^{14,15,16)}。このことから、わが国においても冷凍果実によるリステリア症事例が発生する可能性があり、冷凍果実のLM汚染実態および食品への汚染経路を把握しておく必要がある。リステリア症事例における汚染源の検討結果や食品由来株の解析結果から、本菌は原材料から持ち込まれるというよりはむしろ製造・加工工程で食品を汚染すると考えられている^{2,6,17,18)}。

そこで、本調査研究では、大阪市内を流通している冷凍果実の汚染実態を知ることを目的として、輸入冷凍果実を小分けしている施設から採取したふきとり水および冷凍果実(ブルーベリー)からLMの検出を、また、汚染指標菌として冷凍食品の成分規格である生菌数と大腸菌群、さらには大腸菌の検出を試みたので報告する。

材 料 と 方 法

1. 調査対象施設および供試材料

2018年9～11月の間に大阪市内で輸入冷凍果実を小分けしている施設2施設(施設AおよびB)に2回立入り調査を実施した。施設Aからふきとり水27検体、原材料および最終製品7検体、施設Bからふきとり水28検体と原材料、作業工程中に採取した食品および最終製品5検体、計67検体を採取し、細菌検査に供した。

2. LM検査法

LMの検査法は通知法に準じて実施した¹⁹⁾。すなわち、ふきとり水の採取には、Pro-Media SWAB TEST ST-25BPW(エルメックス)を使用した。スワブの先をよくしごき、緩衝ペプトン水(BPW)中に分散させた後に、5mlをストマッカー袋に量りとり、9倍量のハーフフレーザー培地(Merck)を加えて50gとした。食品はストマッカー袋に25gを量りとり、9倍量のハーフフレーザー培地を加えて250gとし、1分間ストマッカー処理を行った。ハーフフレーザー培地は30±1℃で24±3時間培養した。培養後、一白金耳をALOA寒天平板培地(Merck)に塗抹するとともに0.1mlを10mlのフレーザー培地(Merck)に移植した。ALOA寒天平板培地は37℃で24±3時間、フレーザー培地は37℃で48±3時間培養した。フレーザー培地は培養後の培養液一白金耳をALOA寒天平板培地に塗抹し、37℃で24±3時間培養した。寒天平板上にコロニーの発育が見られないサンプルについてはさらに24時間培養し、判定した。ALOA寒天平板培地上で青色を呈した周囲に混濁帯が見られるコロニーを5つ釣菌して以下のとおりLM確認試験を実施した。すなわち、コロニーをSIM培地(日水製薬)に穿刺し、25℃で48時間以上培養した。SIM培地上でリステリア属に特徴的な運動性(umbrella motility)を示し、

エスクリン加水分解試験陽性でグルコース陽性（ガス非産生）であればリステリア属陽性とした。リステリア属陽性と判定された菌株について、ヒツジ血液寒天培地上での溶血の有無、 β -リジンディスク（Remel 社）を用いた CAMP テスト、ラムノース、キシロース、マンニットの利用能を調べた。その結果、溶血性の確認、CAMP テスト陽性、ラムノース陽性、キシロースおよびマンニット陰性であれば LM と同定した。LM と確定された菌株は、単離した後に DNA を抽出し、PCR により *hlyA* および 16S rRNA 遺伝子の保有²⁰⁾の有無を調べ、いずれの遺伝子も保有していることを確認した。

3. 生菌数、大腸菌群数および大腸菌数の測定

大腸菌群数および大腸菌数の測定は、2. LM 検査法で調製した BPW を、適宜 9 ml の BPW で希釈した後に各 1 ml を 2 枚の滅菌シャーレに無菌的に分注し、あらかじめ溶解後 50°C に保温しておいたクロモアガー ECC 培地（関東化学）で混釈した。原材料および最終製品は BPW のかわりに滅菌リン酸緩衝希釈水で希釈し、冷凍食品の成分規格検査に合わせて生菌数、大腸菌群の測定を行った。大腸菌群の測定は、デソキシコレート寒天培地（日水製薬）だけでなくクロモアガー ECC 培地も使い、混釈および重層して大腸菌の有無についても調べた。生菌数の測定には標準寒天培地（日水製薬）を用いた。固化後、標準寒天培地は 35±1°C で 24±3 時間、デソキシコレート培地は 35±1°C で 20±2 時間、クロモアガー ECC 培地は 37±1°C で 24±3 時間培養した。培養後、標準寒天培地に発育したコロニーをカウントして生菌数とした。デソキシコレート培地に発育した典型的なコロニーおよびクロモアガー ECC 培地上に発育した赤色コロニーを大腸菌群数としてカウントし、クロモアガー ECC 培地上に発育した青色コロニーを大腸菌数とした。

4. 血清型別試験

分離された LM については血清型別試験を行った。血清型別試験にはリステリア型別用免疫血清「生研」（デンカ生研）を用いた。単離したコロニーを 2 ml のブレインハートインフュージョン（BHI）培地（日本 BD）に移植し、25°C で一晚培養後、1 ml をマイクロチューブに移植し、

121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌した加熱菌体について菌体抗原（O 抗原）の型別を実施した。鞭毛抗原（H 抗原）の型別は、残った BHI 培養液 1 ml に等量の 1% ホルマリン加滅菌生理食塩水を加えて鞭毛を固定し、遠心分離後の沈渣についてスライド凝集反応により血清型別を行った。O 抗原と H 抗原の組み合わせにより、血清型を決定した。

5. パルスフィールドゲル電気泳動法

分離された LM 菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による型別を実施した。すなわち、BHI ブイヨンに発育した菌を遠心分離後、滅菌水に懸濁し、等量の 1% の SeaKem Gold agarose と混和してプラグを作製した。その後、0.1 M EDTA（pH8.0）、2 mg/ml デオキシコール酸、1.5 mg/ml リゾチーム、1 mg/ml N-lauroylsarcosine を含む Lysis buffer で 37°C 24 時間処理した後に 0.5 M EDTA（pH8.0）、2 mg/ml proteinaseK、5 mg/ml N-lauroylsarcosine を含む ESP 溶液で 50°C 48 時間処理した。処理後のプラグを 20 U の制限酵素 *AscI*（NEB）および 100 U の制限酵素 *ApaI* で 37°C で 24 時間処理し、CHEF DRIII（BIO-RAD 社）を用いて 1% SeaKem Gold agarose にプラグをセットし、0.5×TBE Buffer により、スイッチングタイム 4.0 から 40 秒、6V、120° で 22 時間電気泳動を実施した。電気泳動後のゲルを 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液で染色し、バンドを可視化した。

6. 冷凍ブルーベリーの pH 測定

施設 A および B から収去し、-20°C で冷凍保管していた冷凍ブルーベリーをストマッカー袋に 25g 量りとり、滅菌蒸留水を 25ml 加えた。袋を 30 回上下に振って洗い出した液および 1 分間ストマッカー処理を行った液を一部プラスチックチューブに移してこれらの液の pH を LAQUApH 計（堀場製作所）により測定した。

結 果

表 1 に施設 A および B の細菌検査結果を示した。施設 B のふきとり 3 検体（原材料選別台下荷物置き、選別台下床面排水口の網、プレハブ冷凍庫内階段）から LM が検出された。各検体あた

表1 冷凍果実小分け施設細菌検査結果

施設	検体採取日	大安研No.	検体の分類	検体名	生菌数	大腸菌群数 ^{*1}	大腸菌群数 ^{*2}	大腸菌数 ^{*2}	Listeria monocytogenes
施設A	2018/9/12	1809S1	原材料	冷凍ブルーベリー1	1.0×10 ⁶ ^{*3}	<10/g	<10/g	<10/g	—
	2018/9/12	1809S2	ふきとり	選別台 (No.1の台) 第2号選別工程	6.0 ^{*4}	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S3	ふきとり	収集用レーキのハンドル	2.5	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S4	ふきとり	選別台の下の棚部分 (No.1の台)	2.5	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S5	ふきとり	選別台下の床	4.4×10 ²	3.7×10 ⁴	2.0×10 ⁴	<1	—
	2018/9/12	1809S6	食品	冷凍ブルーベリー最終製品1	<10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—
	2018/9/12	1809S7	ふきとり	梱包機外袋挿入口付近	5.7×10	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S8	ふきとり	梱包機シーラー付近	2.5	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S9	ふきとり	梱包機ディスプレイ	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S10	ふきとり	梱包機付近床	4.6×10	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S11	ふきとり	梱包機ブルーベリー投入口	2.0	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S12	ふきとり	最終製品の梱包作業用ターンテーブル	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S13	ふきとり	最終製品梱包作業用ターンテーブル上のディスプレイ	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S14	ふきとり	X線装置下床の濡れた部分	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/12	1809S15	食品	シールミス商品由来のブルーベリー	1.5×10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—
	2018/10/11	1810S32	原材料	冷凍ブルーベリー2	2.5×10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—
	2018/10/11	1810S33	ふきとり	清潔区 (選別室) ステップ	6.0×10	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S34	ふきとり	清潔区 (選別室) 手前床	1.5	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S35	原材料	冷凍ブルーベリー3	2.0×10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—
	2018/10/11	1810S36	ふきとり	排水口 (選別台横) の水25ml	6.2×10 ²	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S37	ふきとり	選別台最終出口 (注ぎ口)	2.6×10	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S38	ふきとり	ウェイトチェッカー手前のライン口	1.0	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S39	ふきとり	ウェイトチェッカーライン レーン1、レーン2	4.5	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S40	ふきとり	ウェイトチェッカーホッパー受け部分	1.0	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S41	ふきとり	最終口への注ぎ口	<1	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S42	食品	冷凍ブルーベリー最終製品2	8.0×10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—
	2018/10/11	1810S43	ふきとり	包装機受け口上	2.5	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S44	ふきとり	包装機受け口下	4.0	<1	<1	<1	—
	2018/10/11	1810S45	ふきとり	包装機アーム	<1	<1	<1	<1	—
2018/10/11	1810S46	ふきとり	包装機ステンレス部	<1	<1	<1	<1	—	
2018/10/11	1810S47	ふきとり	包装機回転部 (白色)	<1	<1	<1	<1	—	
2018/10/11	1810S48	ふきとり	包装機中央の支柱	<1	<1	<1	<1	—	
2018/10/11	1810S49	ふきとり	包装機外部突出パーツ	4.5	<1	<1	<1	—	
2018/10/11	1810S50	食品	冷凍ブルーベリー最終製品3	<10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—	
施設B	2018/9/19	1809S16	ふきとり	原材料選別台下荷物置き (ステンレス)	1.8×10 ²	<1	6.5	<1	+ (1/2a)
	2018/9/19	1809S17	ふきとり	選別台下床面	1.3×10 ²	<1	2.1×10	<1	—
	2018/9/19	1809S18	ふきとり	選別台下床面排水口の網	6.6×10 ⁴	8.9×10	1.1×10 ²	<1	+ (1/2a)
	2018/9/19	1809S19	ふきとり	ブレハブ冷凍庫内床面	1.2×10 ²	1.3×10	1.9×10	<1	—
	2018/9/19	1809S20	ふきとり	ブレハブ冷凍庫内機械	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S21	ふきとり	ブレハブ冷凍庫内階段	1.7×10 ³	1.9×10	2.6×10	<1	+ (1/2a)
	2018/9/19	1809S22	ふきとり	ウェイトチェッカー (ホッパー) ステンレス製	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S23	ふきとり	ウェイトチェッカー下の床面 (ステンレス部)	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S24	ふきとり	ウェイトチェッカーホッパー受け部分	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S25	ふきとり	原材料選別台	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S26	ふきとり	原材料選別台後ろベルトコンベア部分	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S27	ふきとり	原材料選別台出口 (ステンレス部)	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S28	ふきとり	作業台	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S29	ふきとり	ベルトコンベア下受け皿 (ステンレスパット) 内	1.1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S30	ふきとり	選別台上ビニールカーテン	<1	<1	<1	<1	—
	2018/9/19	1809S31	原材料	冷凍ブルーベリー1	1.5×10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—
	2018/11/19	1811S51	ふきとり	選別台 (入口台面)	<1	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S52	ふきとり	ちりとり (床面)	<1	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S53	ふきとり	ちりとり (持手)	<1	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S54	ふきとり	選別台 (末端壁面)	4.0	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S55	ふきとり	選別台 (末端台面)	<1	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S56	ふきとり	選別台 (コンベア導入路)	<1	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S57	ふきとり	コンベア	1.0	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S58	ふきとり	コンベア後ブルーベリーだまり斜面	1.0	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S59	ふきとり	コンベア後ブルーベリーだまり末端台面	<1	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S60	ふきとり	リフト内面	<1	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S61	食品	床に落下していたブルーベリー	2.0×10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—
	2018/11/19	1811S62	ふきとり	包装機上部	3.5	<1	<1	<1	—
	2018/11/19	1811S63	ふきとり	ホッパー台面	<1	<1	<1	<1	—
2018/11/19	1811S64	ふきとり	ホッパー台	<1	<1	<1	<1	—	
2018/11/19	1811S65	食品	ホッパー台に散乱していたブルーベリー	4.0×10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—	
2018/11/19	1811S66	原材料	冷凍ブルーベリー2	1.5×10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—	
2018/11/19	1811S67	食品	冷凍ブルーベリー最終製品1	1.5×10/g	<10/g	<10/g	<10/g	—	

*1 デゾキシシロレート培地による

*2 クロモアガーECC培地による

*3 食品および原材料は1gあたりの菌数を示す

*4 ふきとりはふきとり液1mlあたりの菌数を示す

り5株について血清型別およびPFGE法を実施した結果、全ての菌株の血清型は1/2aであり、2種類の制限酵素 (*ApaI* および *AscI*) によるPFGEパターンはいずれの制限酵素を用いた場合でも全ての菌株で一致していた (図1)。施設Aにおいては、施設から採取された34検体全てにおいてLMは検出されなかった。

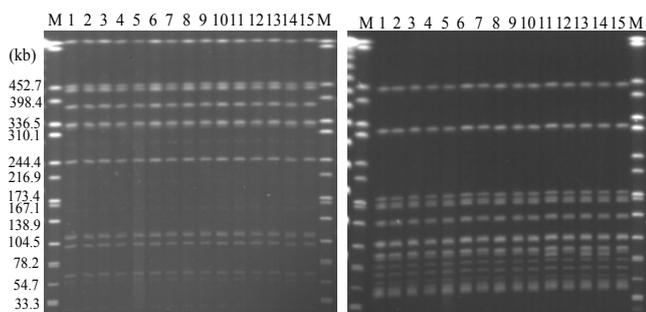


図1 施設Bから検出された *Listeria monocytogenes* のPFGEパターン

制限酵素 *AscI* (左)、*ApaI* (右) による。それぞれ、M: Marker *Salmonella* Braenderup H9812、Lanes 1-5: 原材料選別台下荷物置き (ステンレス) ふきとり水由来 *L. monocytogenes*、Lanes 6-10: 選別台下床面排水口の網ふきとり水由来 *L. monocytogenes*、Lanes 11-15: プレハブ冷凍庫内階段由来 *L. monocytogenes* の切断パターンを示す。

施設AおよびBから採取した全てのふきとり検体から大腸菌は検出されなかった。また、大腸菌群についても、施設Aで選別台下の床から $2.0 \sim 3.7 \times 10$ cfu/ml、施設Bで選別台下の荷物置き、選別台下床面、選別台下排水口の網、プレハブ冷凍庫内床面および階段から $6.5 \sim 1.1 \times 10^2$ cfu/ml 検出されたが、ウェイトチェッカーを含む製造ライン上の生菌数、大腸菌群については100 cfu/mlを超えるものはなかった (表1)。

冷凍ブルーベリーは原材料、最終製品ともに生

菌数は1gあたり10未満から80 cfu、大腸菌群数および大腸菌数は全て1gあたり10未満であった。また、冷凍ブルーベリーのpHは洗い出し液でpH3.7~4.6、ストマッカー処理液でpH3.5~4.5であった (表2)。

考察

冷凍果実のうち、輸入冷凍ブルーベリーの小分けを行っている2施設の小分け作業時に立ち入り、ふきとり調査を実施した。施設内のふきとり材料とともに、原材料、最終製品についても採取し、細菌検査を実施した。施設AおよびBはいずれも1回目の立ち入り調査の際に、小分けをする際に使用する大型の機器 (ウェイトチェッカー) をふきとることができなかった。いずれも2回目の調査時にブルーベリーの小分け作業終了直後にふきとり材料を採取した。ウェイトチェッカーは、連結部や凹凸部が多く洗浄しにくいような構造である上に、すべての原材料 (ブルーベリー) が通過する機械であるため、当初は、本機がLMに汚染され、最終製品のLM汚染源となる可能性が高いと予想された。しかしながら、上部から落とし込まれた原材料の重さを量って一定量にするホッパー部は取り外しが可能であり、分解して洗浄することができるため、いずれの施設においても洗浄、消毒をこまめに実施しており、LMだけでなく大腸菌群も検出されなかった。ウェイトチェッカー以外の製造ラインのふきとり検体については、生菌数、大腸菌群数は100 cfu/mlを超えるものはなかった。

施設Bにおいて、製造ライン上ではなかったものの床面等3ヶ所からLMが検出され、分離さ

表2 冷凍ブルーベリーの細菌数、大腸菌群数およびpH値

検体採取日	大安研No.	採取施設	検体の種類	生菌数 ^{*1} (1gあたり)	大腸菌群数 ^{*1,2} (1gあたり)	洗い出し液	ストマッカー 処理液
2018/9/12	1809S01	A	原材料1	1.0×10	<10	4.294	4.144
2018/9/12	1809S06	A	最終製品1	<10	<10	4.341	4.207
2018/9/19	1809S31	B	原材料1	1.5×10	<10	4.121	4.068
2018/10/11	1810S32	A	原材料2	2.5×10	<10	4.519	4.296
2018/10/11	1810S35	A	原材料3	2.0×10	<10	3.746	3.675
2018/10/11	1810S42	A	最終製品2	8.0×10	<10	4.616	4.519
2018/10/11	1810S50	A	最終製品3	<10	<10	3.724	3.619
2018/11/19	1811S66	B	原材料2	1.5×10	<10	3.931	3.523
2018/11/19	1811S67	B	最終製品1	1.5×10	<10	3.922	3.978

*1 表1の再掲

*2 デゾキシコレート培地およびクロモアガーECC培地による

れた全ての菌株の PFGE パターンが一致していた。Røvik ら²¹⁾ は、スモークサーモン製造施設におけるリステリア汚染の危険因子について検討し、最も重要な危険因子は「作業の割り当て」であるとしている。すなわち、原材料処理、加工、包装の各工程の作業者が作業区画間を移動するのが製品へのリステリア汚染の最も危険な因子であるとしている。今回の調査結果において、施設 A の床面から LM は検出されなかったが、施設 A では、フォークリフトなどが行き来して原材料を取り扱う 4 階のスペースと製品を取り扱う 3 階のスペースとが、作業靴底面を洗浄する装置で交差汚染のないように区画されていた。これに対して施設 B では、原材料を取り扱うスペースと製品を取り扱うスペースに明確な区別がなされていない上に、作業靴底面を洗浄するための設備も設置されていなかった。また、施設内から採取した原材料を含む全てのブルーベリーから LM は検出されず、生菌数、大腸菌群もほとんど検出されなかった。以上より、施設 B 内の LM 汚染は、ブルーベリーでなく施設外の環境からの持ち込みの可能性が高く、作業者が洗浄不十分な作業靴で異なる作業区画間を移動することが一因と考えられた。LM は施設内に定着しやすく、これらが食品の LM 汚染の要因として最も重要であることから²⁾、作業区画の明確な区別および作業靴底面の洗浄が製品の LM 汚染防止対策に有効と考えられる。

冷凍ブルーベリーは原材料、製品ともに生菌数がほとんど検出されず、大腸菌や大腸菌群も検出されなかった。ブルーベリーのような冷凍果実は、カビや酵母のような真菌類が主要な菌叢であると報告されていることから²²⁾、汚染指標菌として生菌数や大腸菌群に加え、真菌数も測定するべきであったかもしれない。LM の増殖可能な pH は 4.4~9.4 とされる⁶⁾。今回、施設から採取した冷凍ブルーベリーの pH を測定した結果、表面の洗い出し液で pH3.7~4.6、果実を潰したストマッカー処理液で pH3.5~4.5 であった。ブルーベリーへの LM の添加試験を実施して検証する必要があるものの、ブルーベリーは LM が増殖しにくい食品であると考えられた。

結 論

2018 年 9~11 月の間に大阪市内の冷凍果実の小分け施設 2 施設（施設 A および B）から採取したふきとり水および冷凍果実（ブルーベリー）から *Listeria monocytogenes* (LM) の検出を試みた。その結果、1 施設（施設 B）3 検体から LM が検出された。3 検体から分離された 15 株は、血清型および PFGE パターンが一致した。施設内から採取した原材料を含む全てのブルーベリーから LM が検出されなかったことから、当該施設の LM 汚染は施設外の環境からの持ち込みの可能性が高く、LM を施設内に定着させないよう、作業区画を明確に区別することが製品の LM 汚染防止に重要であると考えられた。冷凍ブルーベリーから LM および大腸菌群、大腸菌は検出されず、生菌数は 80 cfu/g 未満であった。添加回収試験を実施して確認する必要があるものの、ブルーベリーの pH は 3.5~4.6 であり、LM が増殖しにくい食品であると考えられた。

利 益 相 反

開示すべき利益相反は無い。

文 献

- 1) 光山正雄：8. リステリア症集団事例. 化学療法の領域. **28**: 92-100 (2012)
- 2) 中村寛海：食品媒介リステリア症と食品製造施設のリステリア汚染—リステリアの施設定着株を取り巻く話題—. 日本食品微生物学会雑誌. **32**(1):1-11 (2015)
- 3) Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., et al. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **17**: 7-15 (2011)
- 4) Makino, S. I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., et al. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int J Food Microbiol*, **104**: 189-196 (2005).
- 5) Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., Igimi, S. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *Int J Food Microbiol*,

- 93: 131-140 (2004).
- 6) 食品安全委員会: 微生物・ウイルス評価書 食品中のリステリア・モノサイトゲネス (2013年5月)
 - 7) Datta, A. and Burall, L. Current trends in foodborne listeriosis. *Food Safety*. **6**: 1-6 (2018)
 - 8) 中村寛海. 食品媒介リステリア症の最近の動向とリステリア・モノサイトゲネス検査の意義. *月刊フードケミカル*. **35**: 52-54 (2019)
 - 9) 窪田邦宏、田村 克、天沼 宏. 海外で野菜の喫食に関連して最近発生した食中毒アウトブレイク事例. *食品衛生研究*. **68**(12):21-32 (2018)
 - 10) WHO ホームページ: Listeriosis—Australia <https://www.who.int/csr/don/09-april-2018-listeriosis-australia/en/>
 - 11) CDC ホームページ: Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables (Final Update). <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html>
 - 12) 厚生労働省医薬・生活衛生局 生活衛生・食品安全部監視安全課長. 米国产冷凍野菜等について (依頼) . 平成 28 年 5 月 9 日. 生食監発 0509 第 4 号 (2017)
 - 13) 中村寛海, 長谷 篤, 北瀬照代ら. 大阪市内で販売されているフローゼンチルド食品の細菌汚染実態調査. *日本食品微生物学会雑誌*. **17**: 249-254 (2000)
 - 14) Centers for disease control and prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to Blue Bell creameries products (final update) . <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html>
 - 15) Chen, Y., Allard, E., Wooten, A., Hur, M., Sheth, I., et al. Recovery and growth potential of *Listeria monocytogenes* in temperature abused milkshakes prepared from naturally contaminated ice cream linked to a listeriosis outbreak. *Frontiers in Microbiology* **7**: 764 (2016)
 - 16) Chen, Y., Burall, L. S., Macarasin, D., Pouillot, R., Strain, E., et al. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ice cream linked to a listeriosis outbreak in the United States. *Journal of Food Protection* **2016**; **79**: 1828-1832.
 - 17) Tompkin, R.B.: Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food. Prot.* **65**: 709-725 (2002).
 - 18) Wesley, I.V.: Listeriosis in Animals.: *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E.T. and Marth, E.H. (eds), p. 55-84, CRC Press, Boca Raton (2007).
 - 19) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長. リステリア・モノサイトゲネスの検査について. 平成 26 年 11 月 28 日. 食安発 1128 第 2 号 (2014).
 - 20) Aznar, R., and Alarcon. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers. *System. Appl. Microbiol.* **25**: 109-119 (2002)
 - 21) Røvik, L.M., Skjerve, E., Knudsen, B.R., and Yndestad, M. Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. *Int. J. Food Microbiol.* **37**: 215-219 (1997)
 - 22) Qadri, O.S., Yousuf, B., and Srivastava, A.K.: Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks — A review. *Cogent Food & Agriculture*. **1**: 1121606 (2015)
- WEB サイトの内容は 2019 年 9 月 8 日に確認した

***Listeria monocytogenes* contamination in frozen fruits repackaging plants**

Hiromi NAKAMURA^a, Yuji HIRAI^a, Mitsunobu MUTOU^b, Yukio MIYAKI^b, Hirotsugu KOYAMA^b, Masayoshi YAMAMOTO^b, Yuichi NAKANO^b, Aogu SETSUDA^b, Jun OKUHARA^b, and Jun OGASAWARA^a

Listeriosis is a serious infection usually caused by eating food contaminated with *Listeria monocytogenes* (LM). To evaluate LM prevalence among frozen fruits and their manufacturing process, we investigated LM contamination of the swab and frozen fruits (blueberries) from the two frozen fruits repackaging plants (plant A and B) from September to November in 2018. Consequently, LM has detected from three swab samples in the plant B. The fifteen LM isolates from these 3 swab samples were the same serotype (1/2a) and the indistinguishable PFGE pattern. As LM is not detected from all blueberries including raw materials in the plant, LM might be brought from outside of the plant. Distinct separation of each operation room might be important to prevent LM from persisting in the plant and from LM contamination of the final products.

LM persists and proliferates within the plant B. Coliforms including *Escherichia coli* were not detected from blueberries, and standard plate counts in these fruits are less than 80 cfu/g. LM seems to grow scarcely under low pH conditions between 3.5 and 4.6 in blueberries from these observations, although confirmation by spike and recovery test is needed.

Key words : *Listeria monocytogenes*, frozen fruits, repackaging plant, contamination

a Osaka Institute of Public Health

b Food Hygiene Supervision Department, Osaka City Health Center,

LC-MS による飲料中に混入された界面活性剤の分析

柿本 葉、山口瑞香、角谷直哉

飲料中への洗剤の混入による食中毒の発生を想定し、LC-MS を用いた界面活性剤の分析法を検討した。タンパク質含有量の多い試料は除タンパク操作を行った後に Oasis PRiME HLB で、それ以外の試料は水で希釈した後に Oasis HLB により精製し、LC-MS でスキャン測定した。飲料7種類（麦茶、烏龍茶、20%アップルジュース、コーラ、乳酸菌飲料、豆乳、牛乳）に対して洗剤液を添加した試料および無添加試料を、洗剤標準溶液と比較した。その結果、麦茶、烏龍茶、20%アップルジュース、コーラは、検討した全ての界面活性剤について同定することができた、乳酸菌飲料、豆乳および牛乳は、脂肪酸カリウム以外の界面活性剤について識別することが可能であった。本法を用いて、界面活性剤の混入事例に対応可能であると考えられる。

キーワード：界面活性剤、台所用洗剤、飲料への異物混入、高速液体クロマトグラフ質量分析計

食中毒の原因は腐敗アミン（ヒスタミン等）、魚介類やきのこやカビの産生する自然毒や、寄生虫、細菌、ウイルスに起因するもの等、多岐にわたっている¹⁾。洗剤の混入による食中毒は、件数は少ないものの毎年発生し、その原因として過去には、容器の除菌を行う際に消毒剤を入れたまま誤って提供するケース、食用油を別の容器に移し替えて調理に用いる際に誤って洗剤を移し替えたボトルを使用する等のケースがみられた。発生施設は、家庭内よりも大量の食用油や様々な洗剤を使用する、調理場で複数の従業員が携わる外食産業に多い傾向がある。食中毒が発生した場合、被害の拡大防止、被害者の早期治療に向け、原因物質を迅速に解明することが重要である。

これまでに、中毒検体の残品や胃内容物からの分析を目的とした界面活性剤の分析法が報告されており^{2,4)}、それらの中でいくつかの抽出法が検討されているが、試料由来ピークの確認は実施されていなかった。その後、界面活性剤の食品への混入を想定した分析法については、LC-MS/MS を用いた方法⁵⁾、LC-TOFMS を用い

た方法⁶⁾が報告されている。LC-MS/MS 法では、対象とする界面活性剤の種類が少なく、対象物質以外の混入時の対応が困難であることが予想される。LC-TOFMS 法は事例報告にとどまっている。緑茶中への混入事例の報告⁷⁾もあるが、試験対象物質が市販の標準品として入手できるものだけに限られている。LC-MS/MS は選択性の高さ、LC-TOFMS はノンターゲット分析による未知物質の探索が可能であることが強みであり、ともに微量分析が可能であるが、食中毒事例のような高濃度分析においてはより汎用性の高い機器である LC-MS で十分対応可能であると考え、検討することにした。

界面活性剤の混入による食中毒発生を想定した、より現実に即した界面活性剤のパターン解析を行うために、市販の台所用洗剤を標準品として用いた。測定対象物質として、市販洗剤の実態も考慮しつつ網羅している安達らの文献³⁾・⁴⁾を参考に、脂肪酸アルカノールアミド (AA)、アルキルエーテル硫酸ナトリウム (AES)、アルキルグリコシド (AG)、アルキルアミンオキシド (AO)、アルキルプロピルベタイン (APB)、

表 1 測定条件

界面活性剤	炭素数n	保持時間(min)	m/z	
AA	6	4.4	232	+
AA	8	8.6	260	+
AA	10	13.1	288	+
AA	12	17.4	316	+
AA	14	21.4	344	+
AA	16*	22.9	370	+
AA	16	25.3	372	+
AES	11	15.3	353	-
AES	12	16.7	367	-
AES	13	19.0	381	-
AG	9	8.7	338	+
AG	11	12.7	366	+
AG	13	17.6	394	+
AO	11	11.5	230	+
AO	13	16.2	258	+
APB	6	2.8	287	+
APB	8	5.9	315	+
APB	10	9.8	343	+
APB	12	13.6	371	+
APB	14	17.2	399	+
APB	16*	18.6	425	+
APB	16	20.8	427	+
FAT	6	3.0	143	-
FAT	8	6.6	171	-
FAT	10	11.5	199	-
FAT	12	16.2	227	-
FAT	14	20.8	255	-
FAT	16*	22.6	281	-
FAT	16	25.4	283	-
LAS	9	13.2	297	-
LAS	10	15.0	311	-
LAS	11	16.8	325	-
LAS	12	18.6	339	-
LAS	13	20.3	353	-
HSB	9	6.7	324	+
HSB	11	10.7	352	+
HSB	13	16.4	380	+
POE	7	13.3	544	+
POE	8	15.4	558	+
POE	9	17.6	572	+
POE	10	19.6	587	+
POE	11	21.6	601	+
POE	12	23.6	615	+
POE	13	25.5	629	+
POE	14	27.4	643	+
SDS	-	12.5	265	-

* 一価不飽和脂肪酸

および Oasis PRiME HLB (3 cc / 60 mg) を、メンブレンフィルターは ADVANTEC 社製 DISMIC-13HP PTFE (0.2 μm) を使用した。

標準溶液として、市販洗剤 1、市販洗剤 2、市販洗剤 3 をそれぞれ洗剤濃度 1 mg/mL とするよう水で調製した洗剤混合溶液 A (AA、AES、AG、AO、APB、HSB、LAS、SDS を含む)、および市販洗剤 4、市販洗剤 5 をそれぞれ洗剤濃度 1 mg/mL、LAS 標準品を 1 μg/mL とするよう水で調製した洗剤混合溶液 B (AES、AO、FAT、LAS、POE を含む) を用いた。

3. 抽出操作

詳細は図 2 に示した。

3-1. 乳酸菌飲料、豆乳および牛乳 (タンパク質含有量の多い試料)

試料 1 g をポリプロピレン (PP) 製遠心管に秤量し、アセトニトリル 10 mL を加えて 5 分間振とうした。室温下 5000×g、5 分間遠心分離し、上清を新しい PP 製遠心管へ移した。遠心エバポレーター (75°C) で乾固し、水 5 mL に再溶解した。Oasis PRiME HLB に負荷し、水 1 mL で洗浄した後メタノール 2 mL で溶出し、フィルターろ過したものを試験溶液とした。

3-2. 3-1 以外の飲料

3-1 のうち、アセトニトリルによる除タンパク操作を省略した。試料 1 g を秤量し、水で 5 mL に定容した。Oasis HLB に負荷し、水 1 mL で洗浄した後メタノール 2 mL で溶出し、フィルターろ過したものを試験溶液とした。

4. 装置および測定条件

装置 : Shimadzu LC-MS 2020 system

カラム : X Bridge C8 (2.1×100 mm, 3 μm; Waters)

移動相 : (A) 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液

(B) アセトニトリル

流速 : 0.2 mL/min

グラジエント : (B) 30 → 95% (30 min, linear), 95% (5 min, hold)

カラム温度 : 40°C

注入量 : 5 μL

イオン化法 : ESI

測定モード : スキャン

スキャン範囲 : 100-900

DL 温度 : 250°C

ネブライザーガス流量(N₂): : 1.5 L/min

ヒートブロック温度 : 200°C

ドライイングガス(N₂) : 15 L/min インターフェイス電圧 : 4.5 kV および -3.50 kV

測定対象物質 : 表 1 に示す

5. 添加回収試験

試料 1 g に対し、洗剤混合溶液 A (1 mg/mL) または洗剤混合溶液 B (1 mg/mL) を 2 mL 添加した後に本法に従い抽出操作を行い、洗剤混合溶液の測定結果と比較した (n = 5)。

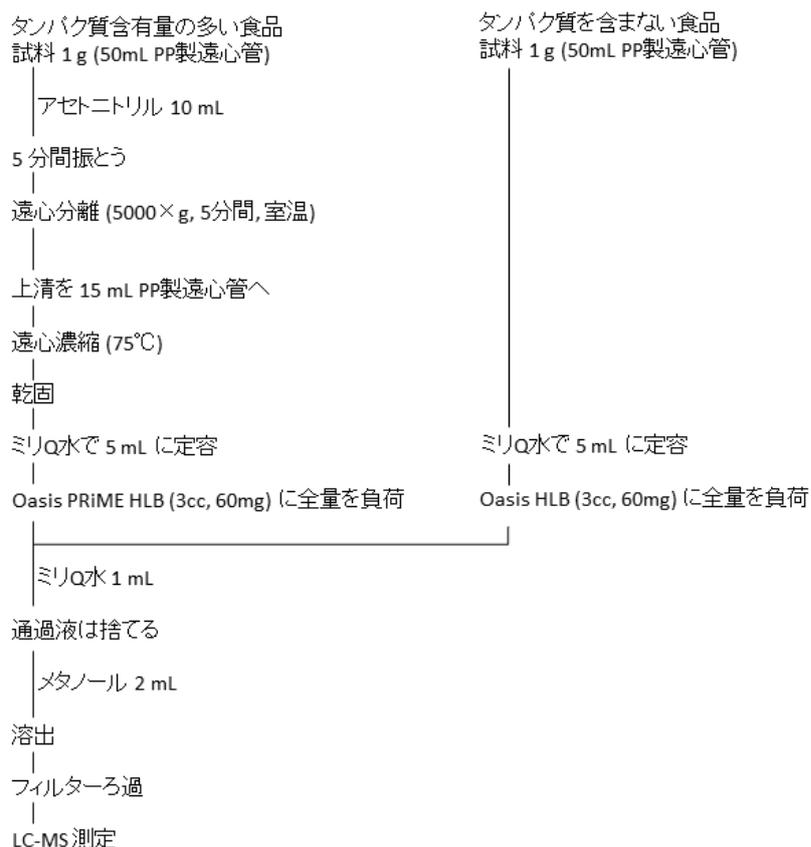


図2 前処理フローチャート

結果および考察

1. 測定条件について

界面活性剤は、構造がもつイオンの性質によって、陰イオン系、陽イオン系、両性イオン系および非イオン系に分類される。このうち、陰イオン系、非イオン系および両性イオン系の界面活性剤が台所用洗剤によく利用されている。MSにおいて、ポジティブモードでイオン化されるもの、ネガティブモードでイオン化されるものがあるため、ポジティブおよびネガティブ同時スキャンを行うことにした。同時スキャンにより感度の低下が懸念されたが、安達らの報告と同じく試料 1 g に 1 mg/mL 洗剤溶液を 2 mL 添加した混入濃度レベルでの測定には影響がなかった。

2. 抽出法の検討

タンパク質を多く含む飲料については、安達らの方法と同様に、固相精製の前の除タンパク

操作を検討した。溶媒は、エタノール、メタノール、アセトンおよびアセトニトリルの 4 種類で検討した。洗剤混合溶液 A または B を添加した牛乳および無添加の牛乳に、各溶媒をそれぞれ加えて前処理操作を行い、それぞれの溶媒間での回収率およびマスクロマトグラムを比較した。回収率が 50~120% の範囲に入る物質数が多かった抽出溶媒はエタノールおよびアセトニトリルであったが、FAT の炭素数が少ないものにおいてブランクピークが小さいアセトニトリルを抽出溶媒に用いることにした。(図 3)

本法で対象とするのは高濃度の界面活性剤であり、繰り返し使用するガラス器具においては使用後の器具の汚染が懸念される。そこで前処理には使用器具を最小限に抑えること、PP 製の使い捨て器具を活用することで器具への汚染を最小限に抑えた。除タンパク操作後の抽出液の乾固に PP 製遠心管を使用した遠心エバポレーター法を採用することにより、複数検体の同時処理、器具汚染の防止および溶媒の環境中への放

出を防ぐことが可能となった。

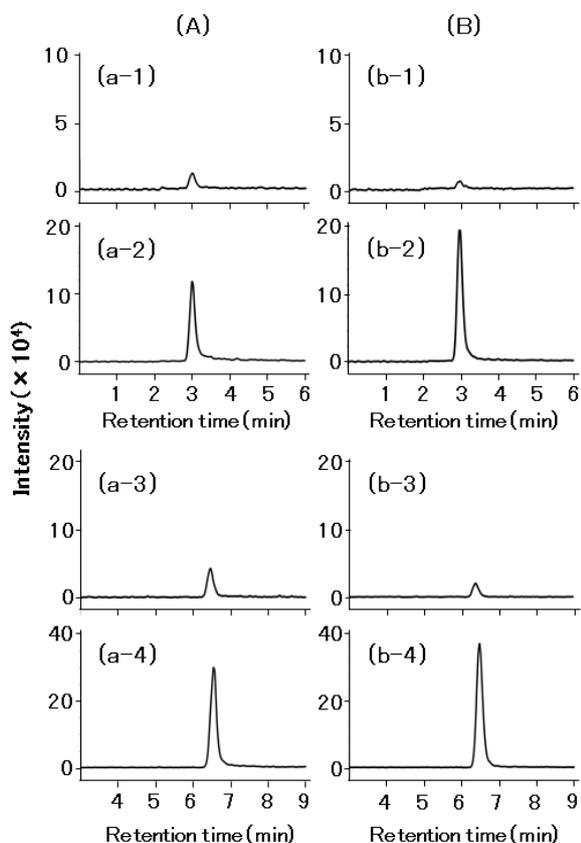


図3 牛乳添加試料におけるエタノール抽出 (A) とアセトニトリル抽出 (B) の比較

(a-1) 洗剤溶液無添加; (a-2) FAT6 添加;
 (a-3) 洗剤溶液無添加; (a-4) FAT8 添加;
 (b-1) 洗剤溶液無添加; (b-2) FAT6 添加;
 (b-3) 洗剤溶液無添加; (b-4) FAT8 添加

3. 固相精製の検討

5種類の界面活性剤 (AA, AES, AO, LAS, POE) を用いて、固相精製を検討した。ポリマー系2種類 (Oasis HLB, SampliQ OPT)、シリカベース2種類 (BondElut C18, Sep-Pak C18) の4種類の固相カラムに対し5種類の界面活性剤を含む洗剤混合溶液を負荷し、水1mLで洗浄後にメタノール2mLで溶出したものをLC-MSで測定した。界面活性剤それぞれについて、炭素数の異なる物質ごとに評価した (AA, 4; AES, 3; AO, 2; LAS, 4; POE, 8; 計21物質)。BondElut C18では、AAで回収率が低いものがあった他、POEにおいて8物質中5物質で回収率が120%を超えていた。Sep-Pak C18は、100%を超える回収率が8物質と、4種類の固相カラムのうち最も多かつ

た。SampliQ OPTは、AESおよびLASについて16-37%と低い回収率であった。以上のことから、全体的に回収率が良好でかつリザーバー等の器具が不要なOasis HLBを用いることとした (表2-1)。

タンパク質含有量の多い飲料 (乳酸菌飲料、豆乳、牛乳) においては、溶媒を用いた除タンパク操作に加えてOasis PRiME HLBによる精製を検討した。牛乳を用いて、Oasis HLBと比較したところ、AA, APBおよびHSBの炭素数が少ないものについて回収率が10-30%改善された (表2-2)。無添加試料における界面活性剤と同一保持時間のピークのパターンは、HLBとPRiME HLBで変化がなかった。

4. 添加回収試験

本法は迅速な定性試験を主目的としているため、定量試験における妥当性評価とは性質が異なる。

飲料7種類 (麦茶、烏龍茶、20%アップルジュース、コーラ、乳酸菌飲料、豆乳、牛乳) に対し、添加回収試験を行った。マスクロマトグラムの一例を図4に示す。

麦茶、烏龍茶、20%アップルジュース、コーラについての回収率は70-120%の範囲に入るものが多かった (表3-1)。乳酸菌飲料、豆乳および牛乳については、回収率70%に満たないものが多かった (表3-2)。回収率が70%に満たなかったものについても、炭素数の異なる同一界面活性剤の中で半数以上は50%以上を確保できており、他の炭素数とのピークパターンを総合的に見ることによって界面活性剤の混入の有無の判断が可能であると考えられる。

また、麦茶、烏龍茶、20%アップルジュース、コーラの無添加試料においては、全ての測定対象物質の保持時間にピークは認められず、洗剤混入の際に陽性試料との識別は容易であると考えられる。一方、乳酸菌飲料、豆乳および牛乳の無添加試料においては、FATの炭素数が多いものについて試料中の脂質由来と思われる夾雑ピークが同じ保持時間にみられた。安達らの指摘にもあるように、FATは生体や食品に含まれている脂肪酸と同じである³⁾ ため、実際の識別は困難であると考えられる (表4)。

表 2-1 4種の固相カラムの検討結果

Recovery (%)	Oasis HLB	SampliQ OPT	BondElut C18	Sep-Pak C18
AA	81-128	67-97	0-132	0-137
AES	55-95	33-37	49-81	99-175
AO	89-95	90-99	100-102	104-109
LAS	50-61	16-33	40-53	98-106
POE	77-91	82-92	118-128	119-129

表 2-2 牛乳添加試料における Oasis HLB および Oasis PRiME HLB の比較
および回収率 70%を下回った物質数

AA	22-83	36-92
AES	52-107	44-107
AG	48-64	62-81
AO	84-94	86-97
APB	15-83	28-103
FAT	37-76	31-73
HSB	59-86	76-94
LAS	47-62	42-74
POE	47-83	43-78
< 70%	28/46	22/46

表 3-1 回収率まとめ (除タンパクなし)

回収率平均 70-120%を外れたもの (下線は RSD20%を超えたもの)

	麦茶	烏龍茶	20%アップルジュース	コーラ
<70%	<u>AG11 (74.9%)</u>	POE14 (49.5%) AG11 (55.7%)	AG11 (61.3%) APB16 (68.7%) LAS13 (56.7%)	AG11 (63.0%) LAS13 (62.9%)
120% <	-	-	AES12 (133.5%)	FAT16 (129.3%)

-: 該当なし

表 3-2 回収率まとめ (除タンパクあり)

回収率平均 70-120%を外れたもの (下線は RSD20%を超えたもの)

	牛乳	無調整豆乳	乳酸菌飲料
<70%	AA16(49.4%) APB12(69.3%) APB14(67.4%) APB16*(61.3%) APB16(49.4%) AES13(68.4%) POE14(64.1%) FAT6(55.4%) FAT10(57.0%) FAT16*(61.2%)	AA14(49.3%) AA16*(39.2%) AA16(11.4%) AO13(51.9%) AG11(59.4%) APB12(53.9%) APB14(42.0%) APB16*(38.1%) APB16(17.8%) AES11(69.7%) AES13(55.8%) POE12(63.3%) POE14(43.4%) FAT6(59.6%) FAT14(59.2%) FAT16*(45.0%) FAT16(49.2%) LAS10(65.1%) LAS11(57.4%) LAS12(57.3%) LAS13(45.1%)	AG13(65.9%) AES13(66.9%) POE12(57.9%) POE13(67.1%) <u>FAT6(0.5%)</u> <u>FAT8(16.6%)</u> FAT10(36.0%) FAT12(60.5%) FAT14(52.7%) FAT16*(51.5%) FAT16(68.2%) LAS9(64.4%) LAS10(61.8%) LAS12(63.4%) LAS13(60.5%)

120% <

* 一価不飽和脂肪酸

-: 該当なし

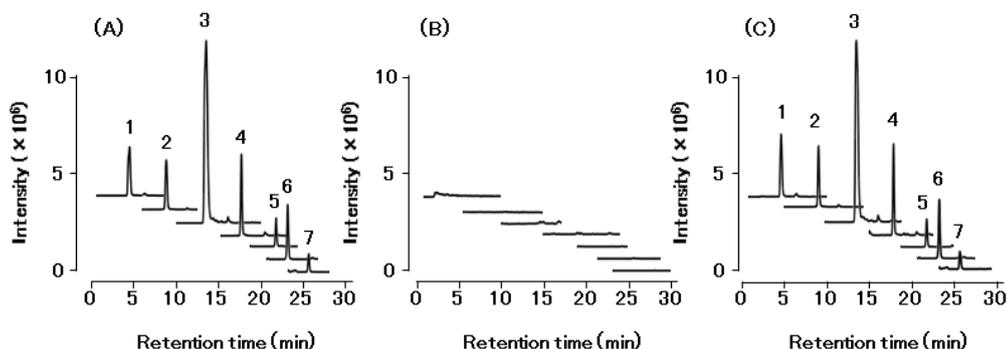


図4 麦茶添加試料のマスクロマトグラムの一例

(A) 洗剤混合溶液 A、(B) 無添加麦茶、(C) 洗剤混合溶液 A 添加麦茶
1: AA6, 2: AA8, 3: AA10, 4: AA12, 5: AA14, 6: AA16 monounsaturated, 7: AA16

表4 無添加試料において添加の10%を超えるピークが検出されたもの

麦茶	烏龍茶	20%アップルジュース	コーラ	牛乳	無調整豆乳	乳酸菌飲料
-	-	-	-	FAT12(16.4%)	FAT12(14.9%)	FAT12(12.1%)
				FAT14(12.0%)	FAT14(12.5%)	FAT16(12.7%)
				FAT16(55.0%)	FAT16(29.0%)	

∴該当なし

まとめ

7種類の飲料について、台所用洗剤に含まれる代表的な界面活性剤をLC-MSを用いて同定する方法を検討した。麦茶、烏龍茶、20%アップルジュース、コーラは、検討した全ての界面活性剤について、乳酸菌飲料、豆乳および牛乳は、FAT以外の界面活性剤について同定することができた。本法を用いて、界面活性剤の混入事例に対応可能であると考えられる。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文献

1) 厚生労働省. 食中毒統計資料.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html

- Nishikawa M, Katagi M, Miki A, Tsuchihashi H. Forensic Toxicological Determination of Surfactant by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Health Sci.* 2003; **49** (2): 138-148
- 安達美和, 高橋知行. 高速液体クロマトグラフィー質量分析による食器用洗剤の異同識別. *法科学技術* 2005; **10** (2): 99-109/
- 安達美和, 高橋知行. 食器用洗剤混入事件のための界面活性剤抽出法. *法科学技術* 2007; **12** (1): 45-51.
- 林(本松)由美, 安井玉樹, 森崎澄江. 台所用洗剤における食品混入時の対応について—LC/MS/MSによる洗剤の識別方法の検討—. *大分県衛生環境研究センター年報* 2010; **38**: 19-26.
- 宮本靖久, 鷺田和人, 宇山敦生, 望月直樹. 高速液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析計を用いた飲料中混入物の同定. *食品衛生学雑誌*. 2014; **55** (6): 261-268.

- 7) 小林浩, 今井秀美, 片岡ふみ, 堀内雅人, 望月
恵美子. 緑茶飲料中に混入した界面活性剤の
LC-MS/MS による測定事例. *山梨衛公研年報*
2005; **40**: 13-17.

WEB サイトの内容は 2019 年 5 月 14 日に確認し
た。

Analysis of surfactants contaminated in the beverages using LC-MS

Yo KAKIMOTO, Mizuka YAMAGUCHI and Naoya KAKUTANI

In order to assess the contamination of beverages with kitchen detergents, an analysis method of surfactant using LC-MS was developed. Widely used 10 types of detergents were added to seven types of beverages (barley tea, oolong tea, 20% apple juice, cola, lactic acid bacteria beverage, soy milk and milk). The sample was diluted with water and then purified on HLB column, and scan measurement was performed by LC-MS. For protein rich beverages such as lactic acid bacteria beverages, soy milk and milk, protein precipitation by acetonitrile prior to PRiME HLB column extraction was performed. As a result, with respect to barley tea, oolong tea, 20% apple juice and cola, all surfactants examined were identified, while in the case of protein rich beverages surfactants other than fatty acid were identified. The proposed method is practically applicable to analysis of surfactant-contaminated beverages.

Key words : Surfactants, Kitchen detergents, Contamination of beverage, LC-MS

畜産物中のネオニコチノイド系農薬およびフィプロニル一斉分析法の 妥当性評価

辻野正樹^a、北川陽子^b、山口瑞香^a、栗津 薫^a、野村千枝^a、永吉晴奈^a、白川育子^a、角谷直哉^a

牛乳、鶏卵、ハチミツ、牛肉中に残留するネオニコチノイド系農薬およびフィプロニルの一斉分析法の妥当性評価をおこなった。抽出・精製には STQ (Solid Phase Extraction Technique with QuEChERS) 法を採用し、測定には液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使用した。試料あたり 10 ng/g、100 ng/g の濃度で添加回収試験を実施した結果、一部の農薬を除き、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。

キーワード：ネオニコチノイド、フィプロニル、STQ、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計、妥当性評価

ネオニコチノイド系農薬はクロロニコチル系殺虫剤の総称であり人体に対する毒性が低いことから有機リン系農薬に代わる効率的な殺虫剤として、農業をはじめスプレー殺虫剤やシロアリ駆除など広汎に使用されている。しかし 1990 年代初めから世界各国でミツバチの大量死が報告され「蜂群崩壊症候群」の主原因の 1 つであると判明したことから欧州では一部のネオニコチノイド系農薬の使用が禁止されている。一方、日本では現在も 7 種のネオニコチノイド系農薬の使用が認められておりそれらの残留基準も大幅に緩和されているのが現状である。ネオニコチノイド系農薬は植物体への浸透移行性を持ち、かつ残効も長いことから、それらの植物を飼料として摂取した場合、畜産物にも残留する可能性が考えられる。

そこで、今回我々は畜産物中からのネオニコチノイド系農薬および同様の浸透性農薬であるフィプロニルの一斉分析法の妥当性評価を実施したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料および試薬等

(1)試料：市販の牛乳、鶏卵、ハチミツ、牛肉を用いた。

(2)標準品：Acetamiprid は関東化学(株)製、Acetamiprid Metabolite IM-2-1、Imidacloprid、6-Chloronicotinic Acid (6-Cl-NA)、Clothianidin、Dinotefuran、Thiacloprid、Thiacloprid-amide、Thiamethoxam、Nitenpyram、CPMA、CPMF、CPF、Flonicamid、TFNA、TFNA-AM、Fipronil、Fipronil Sulfone は富士フィルム和光純薬(株)製を使用した。

(3)試薬等：アセトニトリル (LC/MS 用)、メタノール (LC/MS 用)、ギ酸 (LC/MS 用)、ギ酸アンモニウム (HPLC 用)、アセトン (残留農薬・PCB 試験用) は富士フィルム和光純薬(株)製を使用し、QuEChERS 抽出用試薬には RESTEK 社製 Q-sep QuEChERS Extraction Salt Q110 を、固相抽出カラムには AiSTI SCIENCE 社製 Smart-SPE C18-30 mg、50 mg、PSA-30 mg を使用した。メ

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研究企画課

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) を使用し、精製水は Merckmillipore 社製 Milli-Q® Integral 3 により精製したものをを用いた。

2. 装置および測定条件

(1)装置

高速ホモジナイザーは KINEMATICA 社製ポリトロン PT-MR3100、遠心機は日立工機(株)製 Centrifuge CF7D2、LC-MS/MS は Waters 社製 AQUITY UPLC I-Class-Xevo TQ-S、分析カラムは CORTECS UPLC C18 (1.6 μm、2.1×100 mm) を使用した。

(2)LC-MS/MS 測定条件

移動相：0.1% ぎ酸 5 mmol/L ぎ酸アンモニウム水溶液 (A)、アセトニトリル (B)

移動相条件：B% 5-40% (0-5 min)、40-90% (5-7 min)、90-98% (7-8 min)、5% (8-13 min)

流速：0.2 mL/min

カラム温度：50°C

注入量：1 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

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

物質ごとの測定条件は表 1 に示した。

3. 試験溶液の調製

(1)抽出：試料 10 g (牛乳、鶏卵、牛肉) および 5g (ハチミツ) を 50 ml 容のポリプロピレン (PP) 製遠沈管に秤量しアセトニトリル 10 ml (牛乳、鶏卵、牛肉) および精製水 10 ml + アセトニトリル 10 ml (ハチミツ) を加えてホモジナイザーで均一化後、Q-sep QuEChERS Extraction Salt Q110 を加えて 1 分間、手で激しく振とうした。その後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行い得られたアセトニトリル層を抽出液とした。

(2)精製：アセトニトリル層 1 ml を C18-30 mg+PSA-30 mg に通液しメタノール 1 ml で溶出した。得られた流出液①に精製水 0.5 ml を加え攪拌混合後、全量を C18-50 mg に通液し 80%メタノール 2 ml で溶出した¹⁾。新たに得られた流

出液②を精製水で 10 ml に定容し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。試料の前処理スキームを図 1 に示した。

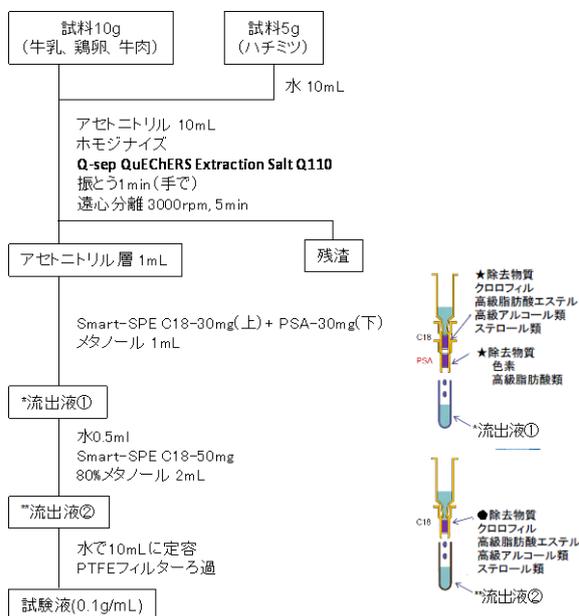


図 1 前処理スキーム

4. 検量線の作成

マトリックス入り標準溶液は試料毎に調製した。添加試料と同様に抽出および精製を行なったブランク溶液に標準溶液を添加し、0.25~20 ng/ml となるように調製した。

結果 および 考察

妥当性評価ガイドライン²⁾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。各試料 (牛乳、鶏卵、ハチミツ、牛肉) に 10 ng/g、100 ng/g となるよう標準溶液を添加し、妥当性評価を実施した。得られた結果を表 2 に、目標値を表 3 に示す。

牛乳に関しては CPMA の真度が 70%未満と低く、ハチミツに関しては CPMA と TFNA、鶏卵、牛肉に関しては CPMA、TFNA、6-Chloronicotinic Acid (6-Cl-NA) で真度が 70%を下回る結果となった。これら 3 種の農薬は官能基として -COOH を有しているため、+に帯電した PSA アミンの陰イオン交換作用によって一部がトラップされ回収率が低くなったと考えられた。一方、上記 3 種以外の農薬 (15 種) ではいずれの添加濃度に

においても真度、併行精度、室内精度ともにガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。

ま と め

LC-MS/MS を用いた畜産物中のネオニコチノイド系農薬およびフィプロニルー斉分析法の添加回収試験結果は、一部の農薬を除き妥当性評価ガイドラインの要求を満たすものであった。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献 等

- 1) 平成 22 年厚生労働省食安発 1224 第 1 号

表 1 各物質ごとの条件

Compound	Ionization mode	Precursor ion (m/z)	Product ion 1 ^{*1)} (m/z)	Product ion 2 ^{*2)} (m/z)	Retention time (min)
Acetamiprid	ESI(+)	223	126	56	4.7
Acetamiprid Metabolite IM-2-1	ESI(+)	209	126	90	4.2
Imidacloprid	ESI(+)	256	209	175	4.4
6-Chloronicotinic Acid (6-Cl-NA)	ESI(+)	158	122	78	3.7
Clothianidin	ESI(+)	250	169	132	4.1
Dinotefuran	ESI(+)	203	129	157	2.6
Thiacloprid	ESI(+)	253	126	90	5.3
Thiacloprid-amide	ESI(+)	271	126	90	4.2
Thiamethoxam	ESI(+)	292	211	132	3.7
Nitenpyram	ESI(+)	271	225	126	3.3
CPMA	ESI(+)	256	126	176	2.8
CPMF	ESI(+)	212	126	90	2.7
CPF	ESI(+)	199	128	126	4.6
Flonicamid	ESI(+)	230	203	98	3.8
TFNA	ESI(+)	192	148	98	2.5
TFNA-AM	ESI(+)	191	148	98	2.8
Fipronil	ESI(-)	435	330	250	7.9
Fipronil Sulfone	ESI(-)	451	415	282	8.1

*1 : 定量イオン、*2 : 定性イオン

表 2 妥当性評価の結果

Compound	牛乳					
	添加濃度：10 ng/g			添加濃度：100 ng/g		
	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
Acetamidrid	93	2.2	2.8	93	3.5	3.7
Acetamidrid Metabolite IM-2-1	91	4.3	6.2	94	4.0	4.6
Imidacloprid	96	9.9	11	94	3.6	3.6
6-Chloronicotinic Acid (6-Cl-NA)	82	13	13	81	5.2	5.2
Clothianidin	104	12	12	94	4.2	5.9
Dinotefuran	85	12	12	90	6.2	6.3
Thiacloprid	93	3.8	4.0	94	3.9	3.9
Thiacloprid-amide	92	5.8	9.2	91	3.5	3.5
Thiamethoxam	94	5.6	6.2	94	4.3	4.3
Nitenpyram	89	11	11	90	5.0	5.0
CPMA	61	4.2	5.5	64	5.5	5.5
CPMF	91	5.3	7.1	92	3.7	4.9
CPF	92	7.1	7.2	95	2.8	3.3
Flonicamid	91	8.4	16	91	6.1	6.1
TFNA	73	10	10	71	4.4	4.9
TFNA-AM	84	9.6	9.6	93	4.6	4.9
Fipronil	87	6.2	6.2	70	4.8	13
Fipronil Sulfone	76	5.7	5.8	78	3.7	5.3

Compound	鶏卵					
	添加濃度：10 ng/g			添加濃度：100 ng/g		
	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
Acetamidrid	98	5.2	6.3	99	4.4	4.9
Acetamidrid Metabolite IM-2-1	96	6.8	8.7	96	3.0	5.8
Imidacloprid	97	6.8	6.8	97	3.1	6.7
6-Chloronicotinic Acid (6-Cl-NA)	50	17	24	50	15	15
Clothianidin	97	4.9	6.6	97	4.2	8.9
Dinotefuran	94	13	13	96	4.1	7.2
Thiacloprid	96	4.8	5.2	99	3.7	5.0
Thiacloprid-amide	89	5.6	8.6	93	5.0	5.0
Thiamethoxam	98	7.9	7.9	100	3.6	5.4
Nitenpyram	86	10	12	93	3.9	6.4
CPMA	54	4.8	18	54	4.3	11
CPMF	89	10	10	87	3.2	5.8
CPF	99	7.6	11	99	4.2	6.0
Flonicamid	96	12	17	99	5.6	8.7
TFNA	50	51	51	40	17	17
TFNA-AM	86	13	18	94	6.5	7.6
Fipronil	84	5.6	6.1	76	2.5	5.8
Fipronil Sulfone	72	13	13	70	6.3	8.4

表2 妥当性評価の結果 (続き)

Compound	ハチミツ					
	添加濃度：10 ng/g			添加濃度：100 ng/g		
	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
Acetamiprid	80	7.3	10	93	3.7	4.0
Acetamiprid Metabolite IM-2-1	84	10	13	90	4.1	9.7
Imidacloprid	85	5.9	17	91	4.1	8.5
6-Chloronicotinic Acid (6-Cl-NA)	81	7.1	15	77	7.1	11
Clothianidin	93	8.2	15	91	9.1	11
Dinotefuran	84	13	13	90	7.8	9.0
Thiacloprid	81	5.0	11	93	3.8	5.8
Thiacloprid-amide	90	4.8	14	93	5.8	7.5
Thiamethoxam	88	3.1	3.9	95	2.6	3.8
Nitenpyram	88	6.6	13	88	6.6	6.6
CPMA	52	7.5	15	54	2.5	6.3
CPMF	77	8.2	14	86	5.9	8.1
CPF	89	13	13	91	4.8	7.1
Flonicamid	96	8.5	13	87	5.2	9.2
TFNA	68	17	26	63	3.0	6.4
TFNA-AM	85	14	18	88	8.1	12
Fipronil	78	7.4	12	70	7.4	7.4
Fipronil Sulfone	76	5.6	9.0	75	3.7	6.6

Compound	牛肉					
	添加濃度：10 ng/g			添加濃度：100 ng/g		
	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
Acetamiprid	102	3.7	6.6	98	5.3	5.3
Acetamiprid Metabolite IM-2-1	96	5.6	6.1	94	4.3	4.3
Imidacloprid	104	8.0	8.0	96	4.6	4.6
6-Chloronicotinic Acid (6-Cl-NA)	45	10	28	46	5.4	13
Clothianidin	95	11	13	95	5.0	7.8
Dinotefuran	92	12	12	93	4.5	5.3
Thiacloprid	101	3.7	4.3	98	4.7	4.7
Thiacloprid-amide	88	6.9	7.9	89	5.7	5.7
Thiamethoxam	95	4.5	5.8	97	4.6	5.6
Nitenpyram	90	9.6	9.6	85	5.6	5.6
CPMA	36	5.4	20	32	15	21
CPMF	82	3.8	7.4	80	7.1	7.3
CPF	101	4.4	5.8	98	5.1	5.1
Flonicamid	107	8.9	12	101	6.8	6.8
TFNA	42	11	20	38	12	12
TFNA-AM	100	7.9	11	93	5.1	6.2
Fipronil	113	5.1	5.1	86	2.8	2.8
Fipronil Sulfone	88	6.3	9.0	87	5.0	5.0

表3 真度および精度の目標値

濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤ 0.001	70 ~ 120	30 >	35 >
0.001 < ~ ≤ 0.01	70 ~ 120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤ 0.1	70 ~ 120	15 >	20 >
0.1 <	70 ~ 120	10 >	15 >

Validation study for analytical method of neonicotinoid pesticides and fipronil in livestock products

Masaki TSUJINO, Yoko KITAGAWA, Mizuka YAMAGUCHI, Kaoru AWAZU, Chie NOMURA,
Haruna NAGAYOSHI, Ikuko SHIRAKAWA, Naoya KAKUTANI

Validity of the simultaneous analysis method of neonicotinoid pesticides and fipronil in milk, hen egg, honey, beef was evaluated. For the extraction and purification, STQ (Solid Phase Extraction Technique with QuEChERS) method was used, and for the measurement, liquid chromatograph – tandem mass spectrometer was used. As a result of the recovery test at the levels of 10ng/g and 100ng/g in each sample, the target values of the adequacy assessment guidelines were fulfilled with a few exceptions.

Key words : neonicotinoid , fipronil , STQ , LC-MS/MS , validation study

ククルビタシン類分析法の検討

山口瑞香, 辻野正樹, 角谷直哉

ウリ科植物中に含まれる苦み成分である Cucurbitacin 類の分析方法について検討を行った。Cucurbitacin B,E, および Cucurbitacin E の配糖体である Elaterinide を対象とし、固相抽出カラムによる精製方法を構築した。添加回収試験では平均回収率が 90~97%、相対標準偏差は 3.5%未満であった。以上より、迅速かつ簡便な方法が確立できた。

キーワード：ズッキーニ、ククルビタシン、高速液体クロマトグラフ/質量分析計

ヒョウタンなどのウリ科植物には、植物性自然毒の一種で苦み成分である Cucurbitacin 類が含まれており、摂取することによって口の痺れ、吐気、嘔吐、腹痛、下痢等の食中毒症状を呈する。

Cucurbitacin 類には多くの種類が存在し、過去の食中毒事例では Cucurbitacin B,D,E およびこれらの配糖体が検出されている^{1)~5)}。大阪府内でも平成 25 年に食中毒事例が発生し、Cucurbitacin B が検出された⁴⁾。

本研究では、食中毒事例に迅速に対応するため、前処理方法を簡便化し、配糖体の同時分析が行えるように検討を行った。

実験方法

1. 試料

Cucurbitacin B の含有が確認された千成ヒョウタン、陰性検体として市販のズッキーニを使用した。

2. 試薬等

2-1 標準品

Cucurbitacin B および E は ChromaDex 社製、Elaterinide は Merck 社製を用いた。

2-2 標準溶液等

Cucurbitacin 類 5 mg をメタノールで溶解して

全量を 5 mL とし標準原液とした(1,000 µg/mL)。Elaterinide は 1 mg をメタノールで溶解して全量を 5 mL とし標準原液とした(200 µg/mL)。標準原液を混合し、アセトニトリルで希釈して 0.5~20 µg/mL の標準溶液を作成した。

2-3 試薬等

アセトニトリルおよびメタノールは和光純薬工業(株)製 LC/MS 用、ギ酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製試薬特級、β-Glucosidase は東京化成工業(株)製を用いた。

固相抽出カラムは、Waters 社製 Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge, 360 mg を使用した。

3. 装置

高速ホモジナイザーはポリトロン PT3100 (KINEMATICA 社製)、遠心分離器機は himac CF7D2 (日立工機(株)製)、高速振とう機は CM-1000 (東京理化工機(株)製)、遠心エバポレーターは CVE-3100 (東京理化工機(株)製)、LC-MS は(株)島津製作所製 Prominence UFLC および LCMS-2020 を使用した。

4. 測定条件

分析カラム：GL Sciences Inertsil ODS-4 (2.1x100 mm, 3 µm)、カラム温度：40°C、流速：0.2 mL/min、注入量：5 µL、移動相：A 液；10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B 液；アセトニトリル

ル、グラジエント条件：B液 35-50%(0-5.5 min), 50-85%(5.5-12 min)。

イオン化モード：ESI(+), 測定モード：SIM, PDA
測定波長：230 nm、物質ごとの条件は Table 1 に示した。

5. 試験溶液の調製

細切した試料 2 g を量りとり、アセトニトリル 4 mL を加えてホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離を行い、上清を採取した。残留物にアセトニトリル 4 mL を加えて振とう後、同様に遠心分離して先の上清と合わせてアセトニトリルで 10 mL に定容した。この液を 3,000 回転で 5 分間遠心分離して抽出液とした。固相カラムにシリンジを付け、アセトニトリル 5 mL でコンディショニングした。シリンジを外してプランジャーを抜き、再びシリンジを付けた固相カラムに抽出液 5 mL を負荷して流出液を得た。固相抽出カラムからアセトニトリル 2 mL で溶出して先の流出液と合わせた。この液を 1 mL に濃縮して試験溶液とした。試験溶液をフィルターでろ過し、LC-MS にて測定した。

6. 試験溶液の加水分解

試験溶液を 15 mL の PP 製容器に採取して濃縮し、水を加えて 1 mL とした。これに β -glucosidase を 20 mg 添加し、 β -glucosidase を添加していない対照溶液と共に 37°C の恒温槽に入れ 24 時間静置した。ここにメタノールを 1.5 mL 加えて混合したものをフィルターでろ過し、加水分解溶液とした。

結果および考察

1. LC-MS 条件の検討

吉岡ら⁵⁾の MS 条件を参考に測定イオンの検討を行った。Cucurbitacin B については以前の報告⁴⁾で最も感度が良かった $576[M+NH_4]^+$ を定量用イオンとし、定性用イオンは $597[M+K]^+$ および $499[M-OCOCH_3]^+$ とした。Cucurbitacin E および Elaterinide についてもアンモニウム付加体である 574 および 736 が最も感度が良く、これを定量用イオンとした。定性用イオンは、Cucurbitacin E は $595[M+K]^+$ および $497[M-OCOCH_3]^+$ 、Elaterinide は $497[M-C_6H_{10}O_5-$

$OCOCH_3]^+$ および $757[M+K]^+$ を選択した。

0.5~20 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製し、絶対検量線を作成した。決定係数(r^2)=0.99 以上の良好な直線性が得られた。

定量下限は 0.5 $\mu\text{g/g}$ とした。

2. 前処理方法の検討

以前の報告⁴⁾では、液液分配や濃縮の工程が多く前処理に時間がかかっていた。食中毒事例では迅速性が求められるため、前処理方法の簡便化の検討を行った。

液液分配に代わる方法として固相抽出カラムでの精製方法を検討した。迅速に前処理を行うためにカラムに保持させて精製する方法ではなく、不要な成分をカラムに吸着させて除去する方法を採用した。C18 カラムに抽出液を負荷し、アセトニトリルで溶出することにより、妨害成分を除去することができた。

吉岡ら⁵⁾は、メタノールを抽出溶媒としていたため、性質の近いメタノールとアセトニトリルを用いて抽出液の検討を行った。Cucurbitacin B 含有のヒョウタンを用い、両溶媒で前処理を行なった。その結果、ほぼ同程度 Cucurbitacin B が抽出された。濃縮効率や PDA での妨害ピークからアセトニトリルを選択した。

3. 添加回収試験

あらかじめ対象の Cucurbitacin 類を含有しないことを確認したズッキーニに 5 $\mu\text{g/g}$ の濃度となるよう Cucurbitacin B,E および Elaterinide を添加して 5 併行で分析を行った(Table 2)。平均回収率および相対標準偏差は、ともに良好な結果が得られた。

4. 加水分解方法の検討

吉岡ら⁵⁾および Kawahara ら⁶⁾の方法を参考に加水分解方法の検討を行った。Elaterinide を水に溶解して上記の方法にて加水分解を行い、対照溶液と比較した。その結果、Elaterinide の濃度は約 1/2 になり、Cucurbitacin E が確認された。次に、陰性検体のズッキーニに Elaterinide を試験溶液中 10 $\mu\text{g/mL}$ となるよう添加し、試験溶液を調製した。試験溶液の一部を加水分解し、対照溶液および試験溶液と比較した。その結果、Elaterinide の濃度は約 1/2 になり、Cucurbitacin E

が検出された(Fig. 1)。また、Cucurbitacin B の含有が確認されたヒョウタンに Cucurbitacin B の配糖体と考えられるピークが確認された。このピークは加水分解によって小さくなった。

このことから、加水分解効率は、様々な要因によって影響を受けると考えられた。しかし、加水分解によって含有が確認できなかった配糖体を確認できることが分かった。

まとめ

Cucurbitacin B,E および Elaterinide の一斉分析法を検討した。その結果、良好な回収率の方法が確立できた。また、Cucurbitacin 類の配糖体を加水分解し、Cucurbitacin 類として分析することができた。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

参考文献

1) 大城直雅, 佐久川さつき. 沖縄県における化学物質と自然毒による食中毒および苦情事例ー平成20 年度ー. 沖縄県衛生環境研究所報

2009; **43**: 181-184

2) 田村行弘, 真木俊夫他. 化学物質及び自然毒による食中毒事件例 (第1報)ー昭和55年ー昭和57年ー. 東京衛研年報 1983; **34**: 171-177

3) 牛山博文, 観公子他. 化学物質及び自然毒による食中毒事件例 (第17報)ー平成11年ー. 東京衛研年報 2000; **51**: 166-169

4) 山口瑞香, 野村千枝, 清田恭平, 梶村計志. ヒョウタンによる食中毒事例について. 大阪府立公衛研所報 2014; **52**: 41-43

5) 吉岡直樹, 野村素行. ブッキーニによる有症苦情事例の原因物質の解明ー苦味成分クルピタシン類の一斉分析法の検討及び定量分析ー. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告 2018; **9**: 11-17

6) Kawahara, N., Kurata, A., Hakamatsuka, T., Sekita, S. and Satake, M. Two new cucurbitacin glucosides, opercurins A and B, from the Brazilian folk medicine “Buchinha”(Luffa operculata). *Chem. Pharm. Bull.* 2004; **52**: 1018-1020

Table 1 SIR condition of cucurbitacins

Analyte	Retention time (min)	Target ion (m/z)	Qualifier ion (m/z)
Cucurbitacin B	9.2	576	597, 499
Cucurbitacin E	10.4	574	595, 497
Elaterinide	4.9	736	497, 757

Table 2 Recoveries of cucurbitacins from spiked zucchini

Analyte	Recovery (%)	RSD (%)
Cucurbitacin B	92	3.1
Cucurbitacin E	90	3.5
Elaterinide	97	3.0

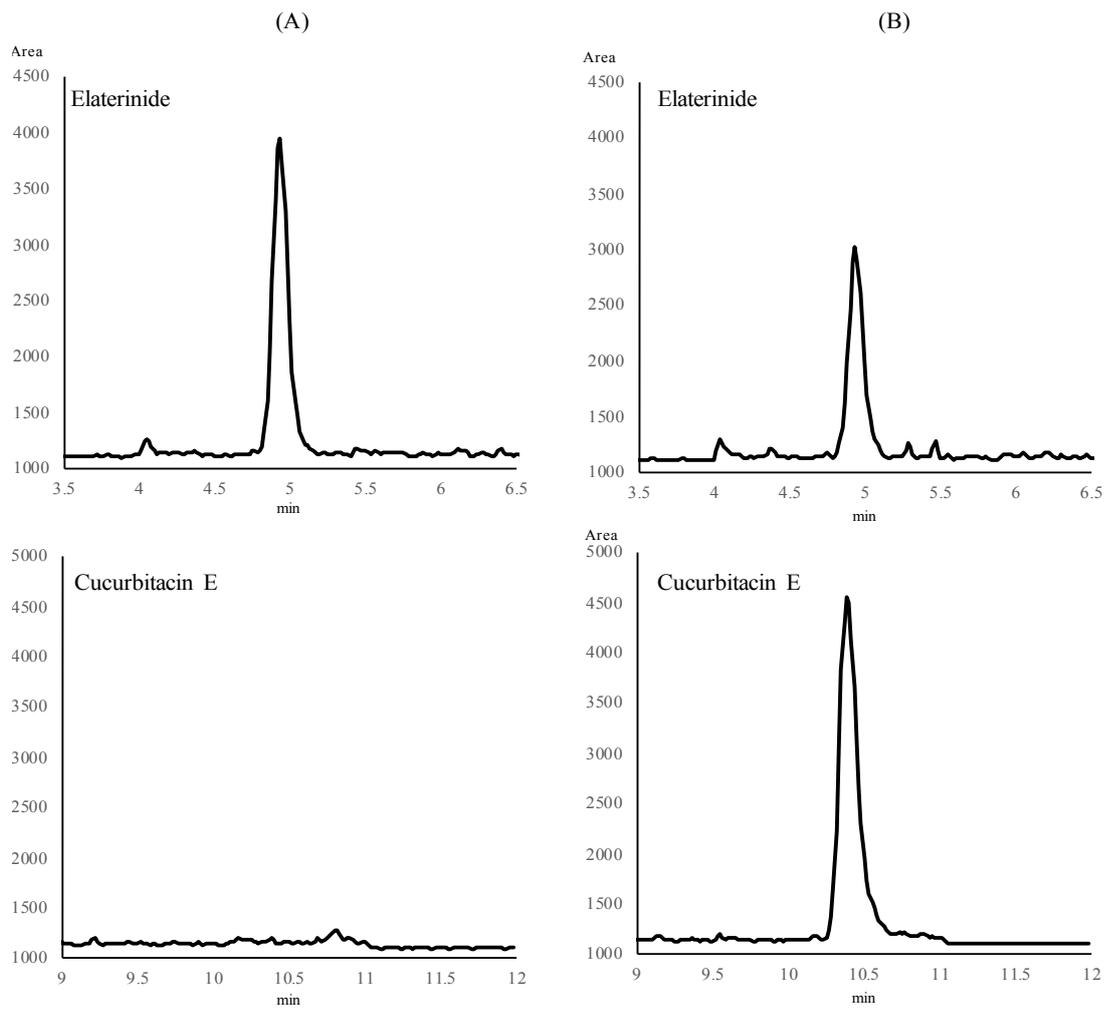


Fig. 1. Chromatograms obtained from zucchini spiked with elaterinide.
(A) Negative control, (B) Incubated with β -glucosidase

Examination of cucurbitacins analysis method

Mizuka YAMAGUCHI, Masaki TSUJINO and Naoya KAKUTANI

We investigated the analysis method of cucurbitacins, which are bitter components contained in cucurbitaceae plants. A method for purification with solid phase extraction column was constructed for Cucurbitacin B, E, and Elaterinide, which is a glycoside of Cucurbitacin E, as targets. The average recoveries and the relative standard deviations were 90 to 97% and less than 3.5% respectively. From the above, a quicker and simpler method has been established.

Key words : zucchini, cucurbitacin, LC-MS

溶媒抽出-固相精製および液体クロマトグラフによる

食品中の保存料 9 種類の一斉分析の検討

山崎朋美, 野村千枝, 栗津 薫, 柿本 葉, 山口瑞香, 藤原拓也, 角谷直哉

溶媒抽出-固相精製および液体クロマトグラフによる 9 種類の保存料（安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類）の一斉分析を検討した。メタノールを用いて抽出を行い、逆相-弱陰イオン交換カラムにより精製した。シロップ、ブルーベリージャム、蒸し鶏、こしあん、大根の漬物を用いた添加回収試験では回収率 80%~108%、相対標準偏差 4.3%以下となり良好な結果が得られた。

キーワード：パラオキシ安息香酸メチル、固相精製、HPLC、保存料

当所の食品中の保存料の検査では、国内で使用が許可されている安息香酸 (BA)、ソルビン酸 (SOA)、デヒドロ酢酸 (DHA)、パラオキシ安息香酸エチル (PHBA-Et)、パラオキシ安息香酸イソプロピル (PHBA-*i*Pr)、パラオキシ安息香酸プロピル (PHBA-*n*Pr)、パラオキシ安息香酸イソブチル (PHBA-*i*Bu)、パラオキシ安息香酸ブチル (PHBA-*n*Bu) の 8 種類の分析を実施している。一方、パラオキシ安息香酸メチル (PHBA-Me) は、日本では指定外添加物であるが世界的には使用されているため輸入食品から検出され食品衛生法違反となる事例が報告されている¹⁾。

当所では、食品中の保存料の分析方法として、水蒸気蒸留による抽出および液体クロマトグラフ (HPLC) による測定を採用しているが²⁾、水蒸気蒸留による抽出では、高タンパク質食品および高脂肪食品の場合、PHBA エステル類、特に PHBA-Me の回収率が低いとの報告がある³⁻⁵⁾。また、当所では水蒸気蒸留を行う際に水道水で冷却を行うため水温上昇時に十分な冷却ができず回収率が低下する、また、一度に多数の検体を処理することができないという問題があった。高タンパク質食品および高脂肪食品の PHBA エステル類の回収率を改善するため、平成 22 年 5 月の厚生労働省通知では溶媒抽出-固相精製法が大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

記載されており⁶⁾、他にも様々な溶媒抽出法が報告されている^{3), 7-9)}。

そこで、多検体の検査への適用を目的に、溶媒抽出-固相精製および HPLC による PHBA-Me を含めた保存料 9 種類の同時分析を検討した。

方 法

1. 試料

大阪市内で購入したシロップ、ブルーベリージャム、蒸し鶏、こしあん、大根の漬物（しょうゆ漬け）を用いた。試料は、9 種類の保存料のいずれかについて使用基準があり、検査検体として搬入される頻度が多い食品から選んだ。各試料の保存料の使用基準を表 1 に示した。

表 1 保存料の使用基準

食品	保存料	基準値 (g/kg)
シロップ	BA	0.60
	SOA	1.0
	PHBA	0.10
ジャム	SOA	1.0
食肉製品	SOA	2.0
あん類	SOA	1.0
しょうゆ漬け	SOA	1.0

2. 標準品

BA、SOA は富士フィルム和光純薬(株)製、DHA、PHBA-Me、PHBA-Et、PHBA-*n*Pr、PHBA-*n*Bu は関東化学(株)製、PHBA-*i*Pr、PHBA-*i*Bu は東京化成工業(株)製を用いた。

3. 標準原液および混合標準溶液

各標準品 500 mg をそれぞれメタノールに溶解して 50 mL としたものを標準原液とした (10,000 µg/mL)。各標準原液 5 mL を採り、水を加えて 50 mL としたものを混合標準溶液とした (各 1,000 µg/mL)。さらに水で希釈し、0.1 µg/mL ~ 100 µg/mL の濃度系列の混合標準溶液を調製した。

4. 試薬等

メタノール (高速液体クロマトグラフ用または LC/MS 用)、ギ酸 (試薬特級)、酢酸アンモニウム (試薬特級)、りん酸一カリウム (試薬特級)、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (容量分析用) は富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。ろ紙 (定量濾紙、No.5A)、親水性 PTFE メンブレンフィルター (DISMIC-13HP、0.45 µm または 0.2 µm) はアドバンテック東洋 (株) 製を用いた。固相カラムは、逆相-弱陰イオン交換カラム (Oasis WAX、150 mg/6 mL、Waters 製) を用いた。

5. 試験溶液の調製

鶴田らの方法⁸⁾を一部改変し、下記の通り行った。

均質化した試料 5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製遠心管に採り、80%メタノール溶液 25 mL を加えてホモジナイズし、遠心分離 (室温、5000 rpm、5 分間) により得た上清をろ紙でろ過した。残渣にさらに 50%メタノール溶液 20 mL を加え、10 分間振とうした後、同様に遠心分離、ろ過を行い先のろ液と合わせ、50%メタノール溶液を加えて 50 mL に定容し抽出液とした。抽出液 2 mL を採り、水 8 mL を加え、あらかじめメタノール 5 mL および水 5 mL でコンディショニングした固相カラムに負荷した。固相カラムを 10%メタノール溶液 10 mL で洗浄し、5%ギ酸-0.1 mol/L 酢酸アンモニウム含有 85%メタノール溶液 10 mL で保存料を溶出させた。溶出液を 5%ギ酸-0.1 mol/L 酢酸アンモニウム含有 85%メタノール溶

液で 10 mL に定容した後、メンブレンフィルターを用いてろ過したものを試験溶液とした。

6. HPLC 条件

装置 : Waters 製 Alliance e2695、カラム : GLサイエンス製 Inertsil ODS-4 (4.6×150 mm、5 µm)、カラム温度 : 40°C、流速 : 1.0 mL/分、注入量 : 20 µL、検出器 : Waters 製 2998 PDA 検出器、測定波長範囲 : 200~600 nm、定量波長 : 235 nm (BA)、255 nm (SOA、PHBA エステル類)、305nm (DHA)、移動相 : A 液 ; 25 mmol/L リン酸緩衝液 (pH6.0)、B 液 ; メタノール、グラジエント条件 : B 液 5%(0 min)→25%(8 min)→60%(16 min)→60%(27 min)→90%(31 min)→90%(32 min)、定量下限値 : 0.01 g/kg (BA、SOA、DHA)、0.005 g/kg (PHBA エステル類)

7. LC-MS 条件

山口らの方法²⁾に PHBA-Me の測定条件を加えて行った。

装置 : (株)島津製作所製 Prominence UFLC および LCMS-2020、カラム : Supelco Ascentis Express C18 (2.1×150 mm、2.7 µm)、カラム温度 : 40°C、流速 : 0.2 mL/分、注入量 : 5 µL、移動相 : A 液 ; 0.05%ギ酸水溶液、B 液 ; メタノール、グラジエント条件 : B 液 30%(0 min)→50%(10 min)→55%(21 min)→90%(23 min)、イオン化法 : ESI、測定モード : SIR、DL 温度 : 250°C、ネブライザーガス流量(N₂) : 1.5 L/min、ヒートブロック温度 : 200°C、ドライイングガス(N₂) : 15 L/min、インターフェイス電圧 : 4.5 kV、定量下限値 : 0.01 g/kg (BA、SOA、DHA)、0.005 g/kg (PHBA エステル類)、各物質の測定条件は表 2 に示した。

表2 LC-MS測定条件

物質名	定量イオン		確認イオン	
	+/-	m/z	+/-	m/z
BA	-	121		
SOA	+	113	+	114
DHA	+	169	+	170
PHBA-Me	-	151	+	153
PHBA-Et	-	165	+	167
PHBA- <i>i</i> Pr	-	179	+	181
PHBA- <i>n</i> Pr	-	179	+	181
PHBA- <i>i</i> Bu	-	193	+	195
PHBA- <i>n</i> Bu	-	193	+	195

8. 添加回収試験

試料あたりの添加濃度が各 0.02 g/kg (BA、SOA、DHA の定量下限値の 2 倍、PHBA エステル類の定量下限値の 4 倍) および各 0.2 g/kg (基準値と定量下限値の中点値程度) となるよう混合標準溶液を添加した。また、BA 標準原液をブルーベリージャムに 1.0 g/kg、SOA 標準原液を蒸し鶏、こしあん、しょうゆ漬けに各々 2.0 g/kg、1.0 g/kg、1.0 g/kg となるよう添加した。添加後十分に混和し、30 分以上室温に静置した。全て $n = 6$ で添加回収試験を行った。

結果 および 考察

1. HPLC 条件の検討

当所で採用している方法²⁾は、PHBA-Me を含まない保存料 8 種類を同時に分析できる。この

条件を用いて保存料 9 種類の混合標準溶液の測定を行ったところ、PHBA-Me のピークが移動相由来のピークと重なり分析できなかつた。そこで、グラジエント条件における B 液 25%→60% の時間を 2 分から 8 分に延長すると、図 1(A)に示すように 2 つのピークが分離され、保存料 9 種類の同時分析が可能となった。

2. 前処理の検討

鶴田らは保存料 9 種類のメタノールによる抽出、固相カラムによる精製および LC-MS/MS による一斉分析法について報告している⁸⁾。HPLC による分析を行うにあたり定量下限値を確保するため、この方法の 2 倍量となる抽出液 2 mL 分を固相カラムに負荷した。また、混合標準溶液を固相カラムに負荷し、基準値濃度の保存料が固相カラムに保持されることを確認した。

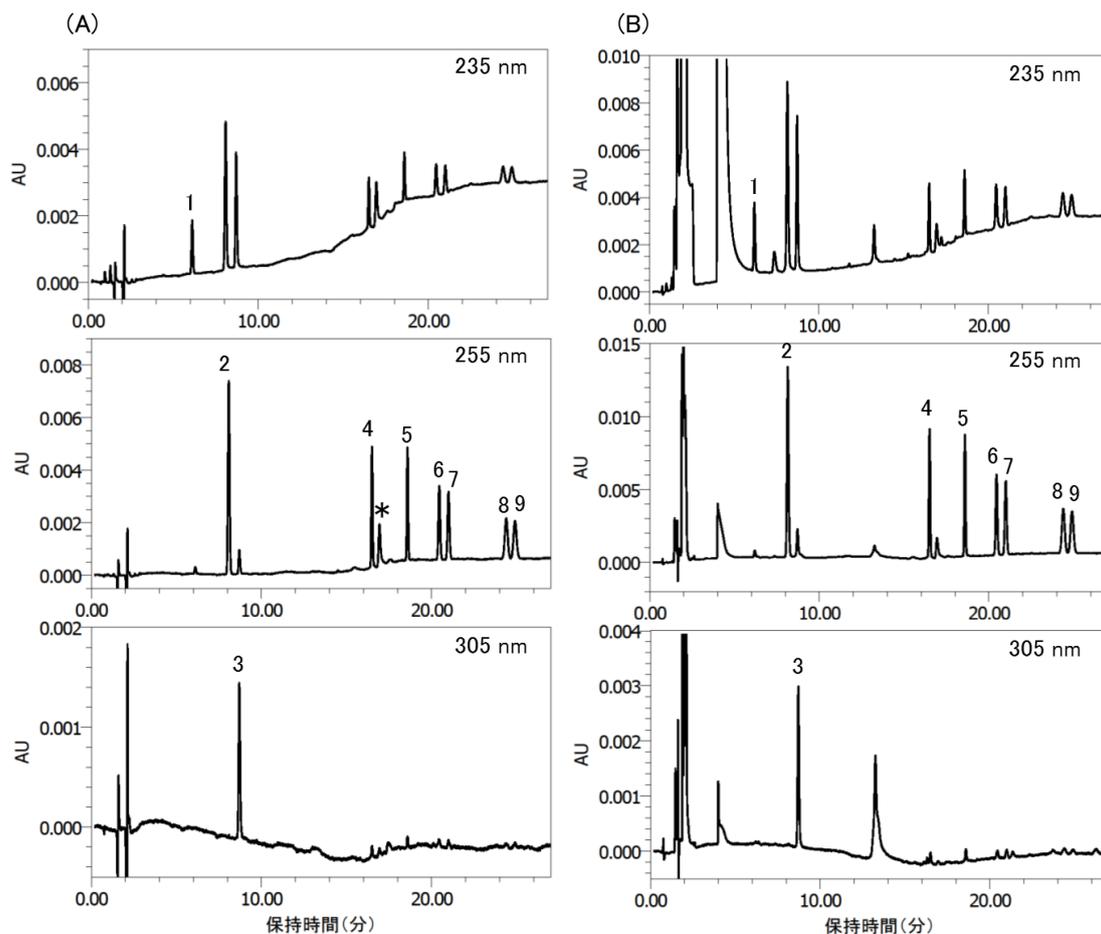


図 1 HPLC クロマトグラム

(A)混合標準溶液 (各 0.02 µg/mL) (B)シロップに各 0.02 g/kg 添加時の試験溶液 (各 0.4 µg/mL)

1: BA、 2: SOA、 3: DHA、 4: PHBA-Me、 5: PHBA-Et、 6: PHBA-*i*Pr、 7: PHBA-*n*Pr、 8: PHBA-*i*Bu、 9: PHBA-*n*Bu、 *: 移動相由来のピーク

3. 添加回収試験

保存料が使用されていない試料を用いて添加回収試験を行った。保存料 9 種類のピークといずれの試料由来の成分のピークは重ならず分析可能であった。例として、シロップの試験溶液の HPLC クロマトグラムを図 1(B)に示した。添加回収試験の結果を表 3 に示した。9 種類の保存料を 0.02 g/kg または 0.2 g/kg となるよう添加した際の回収率は、82%~108%、相対標準偏差 (RSD) は 4.3%以下となり、厚生労働省によるガイドライン¹⁰⁾で規定する回収率 70~120%の範囲内であり、RSD 共に良好であった。また、BA と SOA は、食品により使用基準が高く設定されており、それらに対応する必要がある。そこで、BA の使用基準が高い果実ペースト (1.0 g/kg) の代替品としてブルーベリージャムを、また SOA の使用基準が高い蒸し鶏 (2.0 g/kg)、こしあん (1.0 g/kg)、しょうゆ漬け (1.0 kg/kg) を選び、BA または SOA を基準値濃度となるよう添加した。これらの回収率は、ブルーベリージャムでは 92%、蒸し鶏では 94%、こしあんでは 80%、しょうゆ漬けでは 89%、RSD はそれぞれ 1.1%、2.3%、3.3%、1.5%と同様に良好であった。

4. LC-MS による確認

保存料が使用される食品は多種多様であるため、HPLC 測定時に保存料のピークと試料の成分のピークが重なり分析が難しくなる場合がある。当所では、必要に応じて山口らの条件²⁾で LC-MS によるピークの確認を行っている。そこ

で、同様に添加回収試験で用いた試験溶液を分析した結果、保存料 9 種類を定性的に確認できた。また、添加していない試料を用いて分析を行い、これら試料のマトリックスが妨害にならないことを確認した。

ま と め

9 種類の保存料について、メタノールによる抽出、逆相-弱陰イオン交換カラムによる精製および HPLC による分析を検討した。添加回収試験の結果は良好であり、水蒸気蒸留による抽出において回収率が低い PHBA エステル類にも適用できた。また、当分析法により多検体の同時処理が可能となった。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献 等

- 1) 厚生労働省. 輸入届出における代表的な食品衛生法違反事例. https://www.mhlw.go.jp/www1/topics/ysk_13/t_p0419-1q.html 「WEB サイトの内容は 2019 年 6 月 6 日に確認した」
- 2) 山口瑞香, 梶村計志. LC-MS による食品中の保存料 8 種類の分析. 大阪府立公衆衛生研究所所報 2015; 63: 46-48.

表3 添加回収試験結果

試料	添加濃度 (g/kg)	回収率(%) (相対標準偏差(%)) (n = 6)								
		BA	SOA	DHA	PHBA -Me	PHBA -Et	PHBA -iPr	PHBA -nPr	PHBA -iBu	PHBA -nBu
シロップ	0.02	95 (2.2)	90 (1.8)	94 (2.2)	92 (0.9)	97 (1.0)	96 (1.6)	96 (1.2)	98 (1.1)	98 (0.8)
	0.2	91 (3.0)	83 (3.4)	87 (3.5)	94 (2.6)	95 (2.6)	95 (2.6)	95 (2.7)	95 (2.6)	95 (2.6)
ブルーベリージャム	0.02	86 (3.6)	95 (3.5)	83 (4.3)	108 (3.4)	98 (3.4)	97 (3.4)	98 (3.5)	102 (3.6)	101 (3.7)
	0.2	96 (3.2)	95 (3.4)	92 (3.6)	102 (3.0)	101 (3.0)	101 (3.0)	101 (3.0)	102 (3.1)	103 (2.9)
	1.0	92 (1.1)	-	-	-	-	-	-	-	-
蒸し鶏	0.02	84 (2.4)	90 (2.6)	92 (1.8)	88 (2.2)	92 (2.3)	88 (2.2)	88 (2.6)	89 (1.3)	96 (2.3)
	0.2	91 (2.7)	93 (2.3)	93 (2.3)	92 (2.3)	93 (2.3)	93 (2.4)	92 (2.4)	93 (2.7)	90 (2.1)
	2.0	-	94 (2.3)	-	-	-	-	-	-	-
こしあん	0.02	94 (1.4)	92 (1.7)	93 (2.6)	88 (1.7)	91 (1.4)	92 (1.5)	91 (1.4)	93 (2.5)	92 (1.7)
	0.2	92 (3.0)	92 (3.0)	91 (2.9)	91 (3.0)	92 (3.0)	92 (3.0)	91 (3.0)	92 (3.1)	92 (3.0)
	1.0	-	80 (3.3)	-	-	-	-	-	-	-
しょうゆ漬け	0.02	82 (2.0)	82 (1.4)	88 (2.1)	88 (1.2)	97 (1.4)	90 (1.5)	90 (0.8)	98 (1.4)	96 (1.4)
	0.2	88 (1.9)	90 (1.7)	90 (1.6)	92 (1.6)	95 (1.5)	94 (1.7)	93 (1.6)	95 (1.8)	94 (1.6)
	1.0	-	89 (1.5)	-	-	-	-	-	-	-

- 3) 都田路子, 山田洋子, 天川映子, 安田和男. 直接抽出法による食品中の保存料の分析. *東京都健康安全研究センター研究年報* 2004; **55**: 101-106.
- 4) 日本薬学会. 衛生試験法・注解 2015. 金原出版; 2015. 331.
- 5) 坂牧成恵, 貞升友紀, 松本ひろ子, 前潔, 門間公夫. 透析法を用いた食品中 9 種保存料の LC-PDA 一斉分析および LC-MS/MS 確認試験法. *東京都健康安全研究センター研究年報* 2016; **67**: 171-176.
- 6) 平成 22 年 5 月 28 日付厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知食安基発 0528 第 3 号, 「食品中の食品添加物分析法」の改正について, 別添 2, 2010.
- 7) 岸弘子, 山田利治. HPLC による食品中の 9 種保存料の一斉分析. *食品衛生学雑誌* 2007; **48**(3): 58-63.
- 8) 鶴田小百合, 坂本智徳, 赤木浩一. 固相抽出—LC-MS/MS 法による食品中の甘味料 12 種および保存料 9 種の一斉分析. *食品衛生学雑誌* 2012; **54**(3): 204-212.
- 9) 西名武士, 中原優子, 富永純司, 松本理世, 山口奈穂, 松村光紗. LC/MS/MS による食品中食品添加物の迅速一斉分析法の開発. *熊本県保健環境科学研究所報* 2018; **47**: 33-41.
- 10) 平成 9 年 4 月 1 日付厚生省生活衛生局食品保健課長通知衛食第 117 号, 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, 1997.

Simultaneous analysis of nine preservatives in foods by solvent extraction and HPLC

Tomomi YAMASAKI, Chie NOMURA, Kaoru AWAZU, Yo KAKIMOTO, Mizuka YAMAGUCHI,
Tatsuya FUJIWARA and Naoya KAKUTANI

Simultaneous analysis was examined for nine kinds of preservatives, benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid, methyl *p*-hydroxybenzoate, ethyl *p*-hydroxybenzoate, isopropyl *p*-hydroxybenzoate, propyl *p*-hydroxybenzoate, isobutyl *p*-hydroxybenzoate and butyl *p*-hydroxybenzoate, in foods by solvent extraction and liquid chromatograph. The analytes were extracted using methanol and purified using solid phase extraction based on mixed-mode weak anion exchange/reverse phase retention. The results of spike and recovery examinations using syrup, blueberry jam, steamed chicken, sweet bean paste, and pickled daikon radish showed satisfactory recoveries at a range within 80% to 108%, and their relative standard deviations were 0.8-4.3%.

Key words : methyl *p*-hydroxybenzoate, solid phase extraction, HPLC, LC-MS, preservative

水質検査における外部精度管理 (2017 年度)

- ベンゼン -

小泉義彦

水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、大阪府内水道事業者、保健所、地方衛生研究所（以下、水道事業者等）24 機関を対象に、ベンゼンを対象項目として外部精度管理試験を実施した。その結果、2 機関が「外れ値」となった。外れ値となった機関を対象に行ったフォローアップ調査、および、全機関に対する検証の結果、検査精度を向上するためには、以下の点に留意する必要があることがわかった。

1) 検査結果および結果報告書への記載の確認は、複数人で確実にを行う 2) 操作の各段階において揮発性有機化合物の揮発に注意する 3) 告示法に基づいた SOP を作成する 4) 妥当性試験を実施し、SOP の検査精度を確認する

キーワード：水道水、外部精度管理、ベンゼン

大阪府水道水質検査外部精度管理事業は、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、大阪府内水道事業者、保健所、地方衛生研究所（以下、水道事業者等）を対象に実施している^{1,2)}。2017 年度の対象項目は、有機項目として「ベンゼン」を選定した。ベンゼンは、染料、合成ゴム、合成洗剤、有機顔料、有機ゴム薬品、医薬品、香料、合成繊維（ナイロン）、合成樹脂（ポリスチレン、フェノール、ポリエステル）、食品（コハク酸、ズルチン）、農薬（2,4-D、クロロピクリンなど）、可塑剤、写真薬品、爆薬（ピクリン酸）、防虫剤（パラジクロロベンゼン）、防腐剤、絶縁油、熱媒の合成原料として用いられる。また溶剤級ベンゼンは塗料、農薬、医薬品など一般溶剤、油脂、抽出剤、石油精製などに用いられる。その他アルコール変性用としての用途に用いられる化学物質である³⁾。ヒトに対する麻酔作用があり、急性の高濃度曝露では中枢神経系に作用して頭痛、悪心、けいれんを起し、昏睡に陥り死亡する。また、慢性毒性は造血組織に対する障害作用であり、再生不良性貧血を生じた例がある⁴⁾。

ヒトに対する発がん性は、十分な証拠があることから、IARC によって Group1（ヒトで発がん性

あり）に分類されている⁵⁾。平成 4 年の専門委員会は疫学調査結果を基に白血病の 10^{-5} 発がんリスクに相当する飲料水濃度として 0.01 mg/L 、ラットとマウスの実験結果に線形マルチステージモデルを用い、 10^{-5} 発がんリスクが $0.01 \sim 0.08 \text{ mg/L}$ となったことから、基準値としては、 0.01 mg/L が適切であるとした³⁾。

ベンゼンは、1992 年の水質基準に関する省令の改正（厚生省令第 69 号）により基準項目となり基準値は「 0.01 mg/L 以下であること」と規定された⁶⁾。平成 15 年に開催された水質基準の見直しの検討会においても、統合リスク情報システム (IRIS) による 10^{-5} 発がんリスクに相当する下限値が 0.01 mg/L であることから、水道水質基準は 0.01 mg/L を維持することが適当であるとされ³⁾、平成 15 年以降も 0.01 mg/L 以下と規定されている。

調 査 方 法

1. 参加機関

本調査に参加した水道事業者等は 24 機関であった。

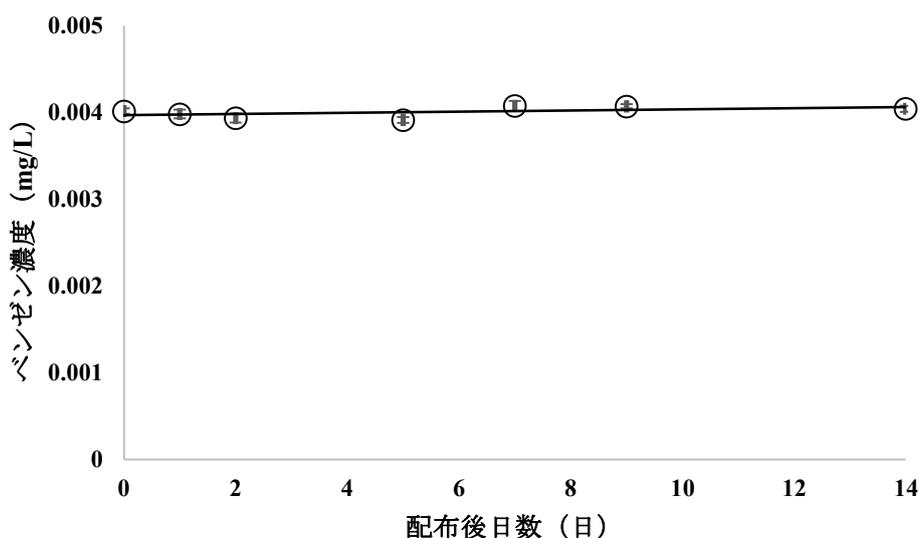


図1 精度管理試料の安定性 (n = 5、平均±標準偏差)

2. 実施方法

(1)精度管理試料の調製方法

2017年9月25日(月)に精製水約60Lをステンレスタンクに採取し、ベンゼン標準液(和光純薬、1mg/mL)0.5mLおよび塩酸(和光純薬、有害金属測定用)30mLを添加し、マグネチックスターラーで5分間攪拌した。タンク下部のコックから、約10Lを捨てた後、500mLガラス瓶60本に満水になるよう分注して冷蔵保管した後、9月27日に(地独)大阪健康安全基盤研究所の上水試験室において各検査実施機関に配付した。

(2)精度管理試料の均一性及び安定性

2017年9月25日に精度管理試料を分注順に等間隔で8本抜き取って測定した。8試料の平均値は0.00397mg/Lであり、試料間の変動係数は2.0%であった。また、配付日、配付1、2、5、7、9、14日後にベンゼンを測定した結果を図1に示す。近似直線の傾きはほぼ0で、精度管理試料の安定性に問題はないことを確認した。

(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」⁷⁾(以下告示法)のページ・トラップ-ガスクロマトグラフ-質量分析計による一斉分析法(以下PT法)およびヘッドスペース-ガスクロマトグラフ-質量分析計による一斉分析法(以下HS法)とした。配付試料については前処理を含めて5回の測定を行い、有効数字を3桁として「外部精度管理結果報告書」に記入することとした。分析条件についても「外

部精度管理結果報告書」に記入を求めた。検量線、測定チャート等についても提出を求めた。「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。

(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⁸⁾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、±20%を許容範囲とした⁹⁾。

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

Zスコアは四分位数法で算出し¹⁰⁾、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20%を超過した機関の検査値は評価対象外とした。

結果 および 考察

1. 分析方法

PT法を用いたのは9機関、HS法は15機関であった。

2. 検査結果の検証

(1)誤差率、Z スコア及び「外れ値」

水道事業体等 24 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 1 に示す。また、検査値の度数分布を図 2 に、Z スコアの度数分布を図 3 に示す。

5つの検査値の変動係数が 20%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。「真値」を算出するため、検査値を有意水準 5%で Grubbs の棄却検定を行った。その結果、1 検査値 (B-24) が棄却され、残りの 23 検査値を平均した 0.00403 mg/L を「真値」とした。なお、「真値」を求める際の数値の丸めは、誤差を最小にするために、1 回とした。したがって、「真値」は、表 1 に示した各機関の 5 つの検査値の平均値 (有効数字 3 桁に丸めて表示している) を平均して有効数字 3 桁に丸めた数値にはなっていない。「真値」に対する誤差率の許容範囲を超えたのは 2 機関 (B-23、B-24) であった。また、24 検査値を用いて算出した Z スコアの範囲は -1.07~10859 となり、Z スコアが許容範囲を超えたのは 2 機関 (B-23、B-24) であった。誤差率と Z スコアとの両方の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」に該当する機関は 2 機関 (B-23、B-24) であった。

外れ値の存在率は、8.33% (2/24) であったため、各機関は概ね精度良く水質検査が実施できていると考えられた。大阪府水道水質検査外部精度管理事業は、水道水質検査精度の向上を図ることを目的に実施しているため、「外れ値」となった 2 機関 (B-23、B-24) に対してフォローアップ調査を行った。

(2)フォローアップ調査

機関 B-23 は、HS 法を用いており、ベンゼンの検査値は 0.00540 mg/L、Z スコアは 4.52、「真値」に対する誤差率は 34.1%であった。提出された資料や電話による聞き取りを行ったが、明確な原因は判明しなかった。告示法では 24 時間以内に分析に着手する必要があるが、この機関は 22 日後に分析を行った。分析に着手するまでの間の保存状況は、周囲からの汚染によって濃度が上昇するような状態ではなかった。また、当所で冷暗所に保存した試料の安定性を調査した結果、22 日目までの経過は追えていないが、配布後 14 日目においてはベンゼンの濃度変化はなかった。機関 B-23

において、保存中に濃度が上昇したとは考えられなかった。

外れ値の原因を検討するため、担当者による原因の検討を依頼した。担当者が熟練者と分析操作を比較したところ、担当者が分析した内部標準の強度が低くなっており、これが原因ではないかとの報告を受けた。しかし、外部精度管理の結果で、検量線と試料間で内部標準の強度に顕著な差がなかったことから、内部標準の低下が外れ値の原因であるとは考えられなかった。担当者の経験年数が 1 年未満であるため、標準溶液の希釈、検量線用標準溶液の調製の段階で、ベンゼンを揮発させ、検量線が下に移動したことで、検査値が高くなったのではないかと推察された。フォローアップとして妥当性試験の実施を提案したが、業務の都合により年度内の実施は困難であり、次年度以降は揮発性有機化合物の検査を中止する予定であったため、これ以上の調査はできなかった。

機関 B-24 は、HS 法を用いており、検査値は 3.25 mg/L、Z スコアは 10859、「真値」に対する誤差率は 80690%であった。提出された資料や電話による聞き取りを行ったところ、単位間違いが外れ値の原因であった。報告書では単位として mg/L での記載を求めたが、この機関は $\mu\text{g/L}$ で記載していた。検査値を 0.00325 mg/L に置き換えた場合、Z スコアは -2.55、「真値」に対する誤差率は -18.5%であり、外れ値にはならなかった。したがって機関 B-24 は技術的な問題はないものの、チェック体制の強化が必要であると考えられた。このため、検査結果および結果報告書の確認は、複数人で確実にを行うように指導した。

(3)全体的な留意点

① 検量線及び空試験

告示法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⁷⁾。すべての機関において検量点を 4 点以上用いて検量線を作成していた。機関 B-2、B-4、B-5、B-7、B-10 および B-16 では、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 を含めることを指導していた。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 を含めた検量線を用い、且つ妥当性試験を行い、信頼性を担保して検査を実施していた。なお、2017 年 4 月に水道 GLP 認定事務局長

より、「検量線は、原則として0を含めず4点以上で作成する」との通知文書が出されている。その

ため、今後、検量線に0を含めないようにすることが必要である。

表1 水道事業者等24機関の測定結果の概要

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	0.00372	1.13	-7.48	-1.07
B-2	0.00373	0.74	-7.39	-1.06
B-3	0.00377	1.08	-6.34	-0.92
B-4	0.00381	1.60	-5.30	-0.78
B-5	0.00382	2.75	-5.20	-0.77
B-6	0.00384	1.54	-4.70	-0.70
B-7	0.00385	7.36	-4.30	-0.65
B-8	0.00388	1.16	-3.71	-0.57
B-9	0.00388	2.16	-3.71	-0.57
B-10	0.00392	1.20	-2.66	-0.42
B-11	0.00393	1.12	-2.27	-0.37
B-12	0.00401	1.03	-0.38	-0.12
B-13	0.00408	1.67	1.36	0.12
B-14	0.00417	3.24	3.50	0.40
B-15	0.00417	1.09	3.60	0.42
B-16	0.00419	1.57	3.99	0.47
B-17	0.00420	10.1	4.34	0.52
B-18	0.00425	0.99	5.53	0.68
B-19	0.00426	1.39	5.88	0.73
B-20	0.00428	3.45	6.38	0.79
B-21	0.00439	1.29	9.11	1.16
B-22	0.00442	1.44	9.76	1.25
B-23 *	0.00540	6.87	34.1	4.52
B-24 *	3.25	1.29	80690	10859
平均値	0.139			
最大値	3.25			
最小値	0.00372			
標準偏差	0.663			
変動係数(%)	475.54			
n	24			

真値：0.00403 mg/L

*真値に対する誤差率が±20%を超え、Zスコアの絶対値が3以上の機関

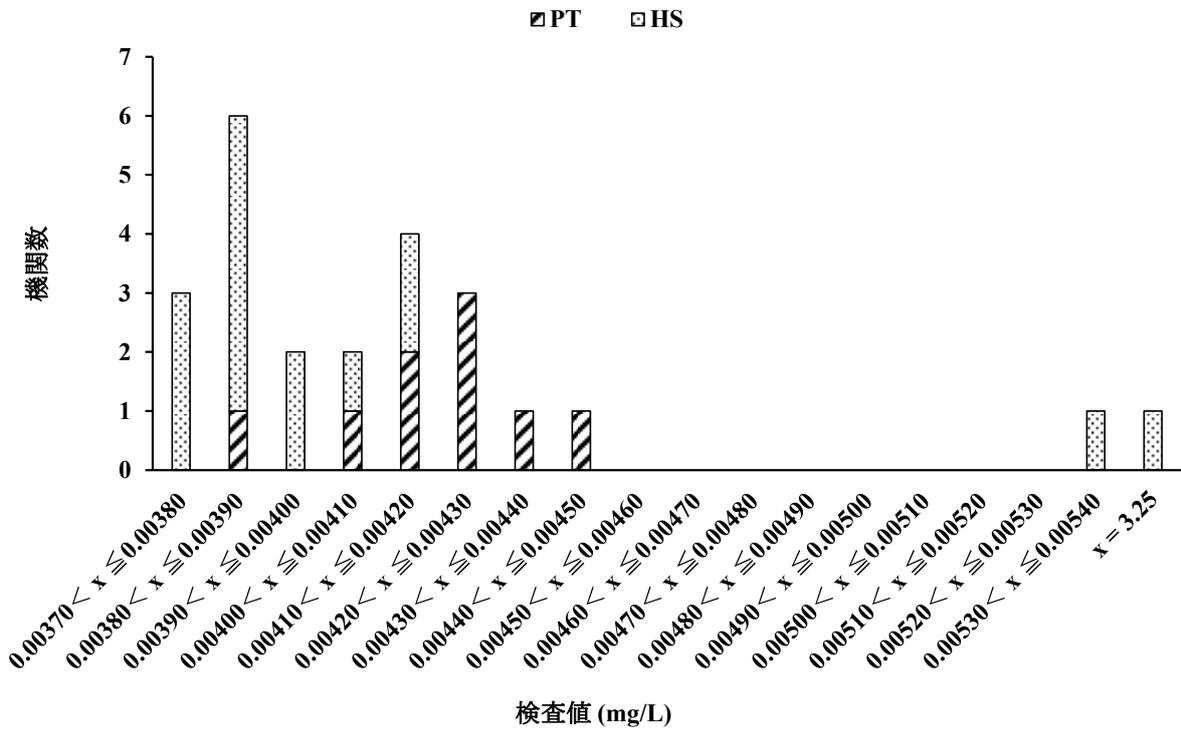


図2 検査値の度数分布

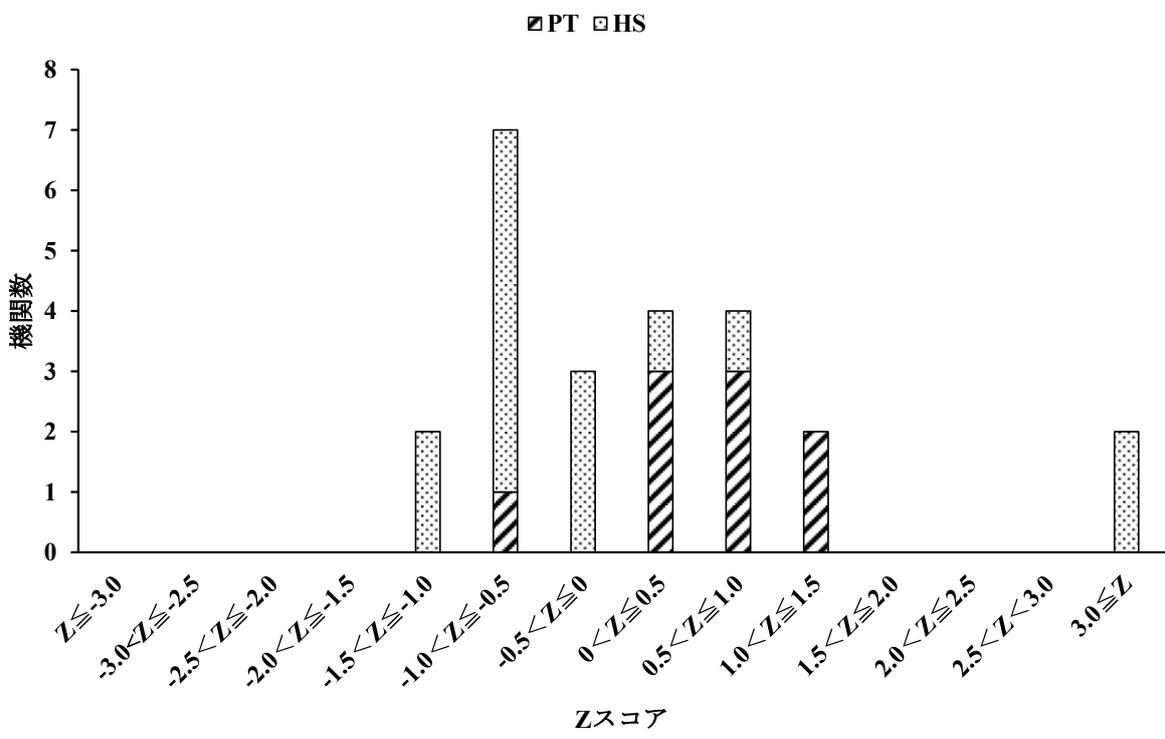


図3 Zスコアの度数分布

PT法およびHS法の告示における濃度範囲の上限は共に0.010 mg/Lであるが、機関B-6およびB-22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った。検量線の次数については、すべての機関が1次式を用いていた。原点強制通過を行った機関はなかった。寄与率(R^2)の範囲は、0.9975~1.0000と概ね良好であった。

空試験はすべての機関で実施された。告示法では、空試験の値が検量線の濃度範囲の下限値を下回ることを確認する必要がある。空試験値が検量線の下限値を上回った機関はなかった。

② 前処理及び標準液

配布から検査を実施するまでの期間は、1機関(B-23)で告示が示す期間を超過し、22日後に実施していた。その理由として収去等業務の影響があったとの記載があった。告示法に従って、24時間以内に検査を行う必要がある。

機関B-20は精度管理試料の配布当日に、試料をバイアル瓶に移すことで前処理を開始した。内部標準液は機器で自動添加されるため、バイアル瓶には入れなかった。検量線作成および機器分析は2日後に行った。機関B-21は配布前日に実施した水質の定期検査試料に引き続き、精度管理試料を追加分析した。検量線用試料7個、空試験1個、定期検査試料20個に続けて、精度管理試料5個をオートサンプラーに追加し測定していた。連続して概ね10以上の検査を行う場合、既知濃度の標準液を分析し、差が調製濃度の±20%の範囲を超えないことを確認する必要がある。電話で確認したところ、定期検査試料20個の中には、SOPにしたがい実施した“内部品質管理用試料(IQC)(0.008mg/L)”を含んでおり、精度を担保していた。このため、外部精度管理試料の定量についても問題ないと考えられた。

標準原液については、「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。」と規定され、別表に示した濃度と同濃度の認証付標準原液の使用が認められている。今回の精度管理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、19機関が認証品を用いていた。市販標準原液を用いる場合は、認証付標準

原液を使用しなければならない。

標準原液から標準液の調製時期について、告示では使用の都度調製することになっている。機関B-6は約2か月前に調製していた。SOPを確認したところ、標準原液をメタノールで500倍希釈したものは、冷凍庫保存で3か月間有効であるとしていた。B-6においては、告示法に従い、使用の都度調製するようにSOPを修正し、SOPに従って標準液の調製を行う必要がある。

③ 妥当性試験

2012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¹¹⁾。本調査では83%(20/24)の機関が実施していた。未実施の機関はガイドラインに従い実施する必要がある。

ま と め

大阪府の水道水質検査外部精度管理事業として、ベンゼンの検査結果を「真値」に対する誤差率±20%とZスコアの絶対値3未満を許容範囲とする方法で評価を行った。報告された24検査値の内、変動係数が20%を超えた機関は存在しなかった。24検査値のうち、「真値」に対する誤差率±20%を超えたのは2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2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2機関であった。「外れ値」の存在率は、8.3%(2/24)であり、参加機関の分析精度は概ね良好であった。そして検証の結果、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) 検査結果および結果報告書の確認は、複数人で確実にを行うこと。
- 2) 操作の各段階において揮発性有機化合物の揮発に注意すること。
- 3) 告示法に基づいたSOPを作成すること。
- 4) 妥当性試験を実施し、SOPの検査精度を確認しておくこと。

謝 辞

本研究は「平成29年度大阪府水道水質検査外部精度管理事業」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の各位に感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文献

- 1) 吉田 仁, 小泉義彦. 水質検査における外部精度管理 (2016 年度) - フェノール類 -. 大阪健康安全基盤研究所研究年報, 2018; 2: 74-82
- 2) 安達史恵, 高木総吉. 水質検査における外部精度管理 (2016 年度) - 亜硝酸態窒素および塩化物イオン -. 大阪健康安全基盤研究所研究年報, 2018; 2: 83-90
- 3) 水質基準の見直しにおける検討概要 整理番号 12041 ベンゼン(PDF)
厚生労働省ホームページ
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k20.pdf>
「WEB サイトの内容は 2019 年 3 月 16 日に確認した」
- 4) 改訂 4 版 水道水質基準ガイドブック. 丸善; 2009: 74-75
- 5) IARC MONOGRAPHS (BENZENE)
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-24.pdf>
「WEB サイトの内容は 2019 年 3 月 16 日に確認した」
- 6) 上水試験方法 解説編. 日本水道協会; 1993: 444-446
- 7) 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 平成 15 年厚生労働省告示第 261 号(一部改正; 平成 29 年 3 月 28 日厚生労働省告示第 87 号)
- 8) 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
- 9) 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(平成 15 年 10 月 10

日健水発第 1010001 号 [最終改正 平成 31 年 3 月 29 日薬生水発 0329 第 3 号])

- 10) 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: 51-56
- 11) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン(平成 24 年 9 月 6 日 健水発 0906 第 1 号) 別添(最終改正; 平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 第 1 号)

Results of external quality control on the analytical measures for benzene in tap water, performed in 2017 in Osaka Prefecture

Yoshihiko KOIZUMI

In Osaka Prefecture, external quality control on 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.). Twenty four water supply corporation etc. participated in the external quality control on analytical measure of benzene in 2017. As a result, two water supply facilities were evaluated as an outlier. After the follow-up survey for the outliers and the verification with all facilities, it was found that the following points are required in order to improve the accuracy of analyses.

- 1) Confirm the results securely by multiple staffs
- 2) Pay attention to the volatilization at each stage of operation
- 3) Create SOP based on the notification methods
- 4) Carry out the validity test and check the SOP accuracy

Key words : drinking water, external quality control, benzene

水質検査における外部精度管理 (2017年度)

- 鉛及びその化合物 -

吉田 仁, 中島孝江

水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、大阪府内水道事業体、保健所および地衛研等(以下、水道事業体等)を対象に、鉛を添加した水質検査用模擬試料を配布し、各機関が水道水質検査法に従って測定した検査結果を回収した。各機関の検査値を解析した結果、26 検査値中 1 検査値が、真値に対する誤差率(以下、誤差率)および Z スコアの許容範囲を超過した。この機関を対象に定量精度に関するフォローアップ調査を行ったところ、前処理操作における鉛の汚染が定量に影響を及ぼした可能性が示唆された。

キーワード：水道水、鉛及びその化合物、水道水質検査、定量精度、外部精度管理

(地独)大阪健康安全基盤研究所では、大阪府健康医療部環境衛生課と協力して、水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、大阪府内水道事業体、保健所および地衛研等(以下、水道事業体等)を対象に外部精度管理事業を実施している¹⁻¹⁰⁾。

2017 年度の対象項目は、無機項目として「鉛及びその化合物」を選定した。鉛は、鉛管・板、蓄電池、電線被覆、顔料、はんだ、印刷用活字の材料として、硝酸鉛は、鉛化合物原料、マッチ、爆薬、防腐剤の原料として利用されている¹¹⁾。鉛は、地質、工場排水、鉱山廃水などに起因することがあるが、水道水中の鉛の主な原因としては鉛給水管からの溶出によることが多いとされている¹¹⁾。鉛のヒトへの発がん性の証拠は研究数が限られているが、鉛塩摂取と腎臓腫瘍の関係が実験的に示されたために、国際がん研究機関 (IARC) で Group 2B とされた¹¹⁾。鉛の急性毒性症状として、嘔吐、腹痛、下痢、血圧降下、昏睡などがあり、慢性毒性としては、疲労、皮膚蒼白、便秘、腹痛、けいれんなどがある¹²⁾。鉛の水質基準について、我が国においては、昭和 33 年に設定された水道水質基準では、「0.1 ppm 以下」とされた。

次いで 1992 年には 0.05 mg/L 以下に強化された後、2003 年以降は 0.01 mg/L 以下となっている。

方 法

1. 参加機関

本調査に参加した水道事業体等は、25 機関であった。なお、1 機関が、2 種類の検査方法による結果を提出したため、解析対象とした検査値数は 26 となった。

2. 実施方法

(1)精度管理試料の調製方法

2017 年 9 月 11 日～15 日にかけて精製水約 100 L をポリタンクに採水した。精製水中の鉛濃度は 0.0002 mg/L 未満であった。9 月 25 日に鉛標準液(和光純薬 : 1003 mg/L 溶液)を 0.4 mL 添加して攪拌した。1L ポリプロピレン瓶に満水になるよう分注して冷暗所保管した後、9 月 27 日に大阪健康安全基盤研究所の上水試験室において各検査実施機関に配付した。

(2)精度管理試料の均一性及び安定性

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

2017年9月25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0.00410 mg/Lであり、試料間の変動係数は1.29%であった。また、配付日、配付1、2、7、13、15日後に鉛を測定した結果を図1に示す。近似直線の傾きはほぼ0で、精度管理試料の安定性に問題はないことを確認した。

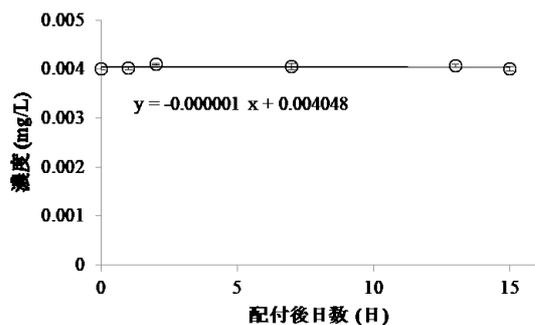


図1 精度管理試料に含まれる鉛の分析値の安定性 (n=5、平均±標準偏差)

(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」のフレームレス原子吸光光度計による一斉分析法(以下FLAA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)およ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¹³⁾。配付試料については前処理を含めて5回の測定を実施し、測定結果を有効数字3桁で「外部精度管理結果報告書」に記入した。そして、5つの測定結果の平均値を検査値とした。また、各検査機関が実施した分析法の分析条件等を「外部精度管理結果報告書」に記入し、検査に使用した測定機器の生データやチャート等と合わせて提出することとした。各検査実施機関から送付された「外部精度管理結果報告書」を取りまとめた後、検査結果および検査方法等に関する評価を実施した。そして、「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。

(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。

誤差率(%)

$$= \frac{([\text{各機関の検査値}] - [\text{真値}])}{[\text{真値}] \times 100}$$

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。誤差率およびCVの許容範囲を10%とした根拠は、水質基準項目の測定精度における鉄及びその化合物の変動係数の目標が10%であるためである¹⁶⁾。

結果 および 考察

1. 分析方法

水道事業者等が用いた試験方法を表1に示す。

表1 各検査機関の試験方法およびデータ数(鉛及びその化合物)

試験方法	データ数
フレームレス 原子吸光光度法(FLAA法)	5
誘導結合プラズマ 発光分光分析法(ICP-AES法)	1
誘導結合プラズマ 質量分析法(ICP-MS法)	20
計	26

本研究においては、鉛の検査にICP-MSを使用する機関がもっとも多く、次いでFLAA法、ICP-AES法の順番となった。

2. 検査結果の検証

(1) 誤差率、Zスコア及び「外れ値」

水道事業者等25機関から報告された26の検査値、変動係数、誤差率およびZスコアを表2に示す。機関内変動係数が10%を超過した検査値は存在しなかったため、すべての検査値を評価対象とした。「真値」を算出するため、検査値を有意水準5%でGrubbsの棄却検定を行った。その結果、1検査値(A-26)が棄却され、残りの25検査値を平均した0.00412 mg/Lを「真値」とした。「真値」に対する誤差率の許容範囲

圏を超えたのは 1 機関(A-26)であった。次に、26 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-2.34~4.24 となり、Z スコアが許容範囲を超えたのは 1 機関(A-26)であった。誤差率と Z スコアとの両方の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」に該当する機関は 1 機関(A-26)であった。外れ値の存在率は、3.8%(1/26)であったため、各機関は概ね精度良く水質検査が実施できていると考えられた。「外れ値」となった機関 A-26 に対してフォローアップ調査を行った。

表 2 外部精度管理における検査値の概要

番号	検査値 (mg/L)	変動係数* (%)	真値に対する 誤差率* (%)	Zスコア*
A 1	0.00371	1.16	-9.82	-2.34
A 2	0.00394	1.16	-4.38	-1.00
A 3	0.00394	1.22	-4.23	-0.97
A 4	0.00396	0.23	-3.89	-0.89
A 5	0.00396	0.37	-3.75	-0.85
A 6	0.00397	2.01	-3.46	-0.78
A 7	0.00399	0.46	-3.16	-0.71
A 8	0.00400	0.33	-2.87	-0.64
A 9	0.00403	0.87	-2.19	-0.47
A 10	0.00407	0.82	-1.07	-0.20
A 11	0.00409	0.66	-0.54	-0.07
A 12	0.00409	0.92	-0.54	-0.07
A 13	0.00410	0.95	-0.44	-0.04
A 14	0.00411	0.32	-0.10	0.04
A 15	0.00418	0.90	1.60	0.46
A 16	0.00419	0.60	1.69	0.48
A 17	0.00419	1.01	1.79	0.51
A 18	0.00419	0.85	1.89	0.53
A 19	0.00421	0.81	2.28	0.62
A 20	0.00422	1.46	2.47	0.67
A 21	0.00425	0.97	3.25	0.86
A 22	0.00427	1.56	3.83	1.00
A 23	0.00428	1.18	3.98	1.04
A 24	0.00448	5.36	8.74	2.20
A 25	0.00448	3.37	8.93	2.25
A 26 **	0.00482	2.75	17.05	4.24
平均値	0.00414			
最大値	0.00482			
最小値	0.00371			
標準偏差	0.00022			
変動係数(%)	5.3			
n	26			

真値：0.00412 mg/L

*検査値(n=5の平均値)を丸めずに算出

**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

(2)フォローアップ調査

機関 A-26 は、ICP-MS 法を用いており、検査値は 0.00482 mg/L、Z スコアは 4.24、「真値」に対する誤差率は 17.05%であった。提出された資料から、作業記録や標準業手順書(SOP)上で留意する点は見られなかった。電話による聞き取りの結果、外部精度管理試験の測定時に分析結果が安定せず、測定した 10 試料中 2 試料

の値が約 0.01 mg/L となっていたことが判明した。機関 A-26 では、告示法に従って一連の測定後に既知濃度の試料を用いた感度チェックを実施していたが、とくに問題は見られなかった。また、検量線の直線性にも問題がみられなかったため、前処理操作で汚染が発生した可能性が示唆された。フォローアップを実施した 2018 年 1 月時点では、外部精度管理試験で見られた現象は発生していないとの報告を受け、精度管理試料の再測定を依頼した。再測定の結果、検査値は 0.00419 mg/L で真値 0.00412 mg/L に対する誤差率が 1.9%と良好な結果となった。その後、機関 A-26 に赴き、前処理に用いる器具について確認したところ、最初に水試料を計量するためのメスシリンダーはガラス製で別の検査と共用で使用し、硝酸による洗浄は行っていなかったことがわかった。そのため、メスシリンダーからの汚染が疑われたため、今後は専用のメスシリンダーを硝酸で洗浄した後に計量するように助言した。

(3)全体的な留意点

① 検量線および空試験

告示法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おり¹³⁾、すべての機関において検量点を 4 点以上用いて検量線を作成していた。

一方、参加機関 57.6%(15/26)は、検量線の点に 0 mg/L を用いていた。告示法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 を含めることを指導していた。そのため、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。しかし、2017 年 4 月に水道 GLP 認定事務局長より、「検量線は、原則として 0 を含めず 4 点以上で作成する」との通知文書が出されたため、今後は告示法に従って 0 を検量点から省くべきである。

告示法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、精度管理実施時における FLAA 法、ICP-AES 法および ICP-MS 法の上限はそれぞれ 0.1、0.1 および 0.02 mg/L であった。最も高い検量点が告示の範囲を超えていた機関は存在しな

った。なお、2018年4月より、告示法では濃度範囲が拡大され、ICP-MS法の上限は0.1mg/Lとなっている¹³⁾。

本研究では1機関(A-1)が空試験を実施していなかった。A-1では鉛の検査に関するSOPが整備されていなかったため、担当者が空試験を実施できなかったと考えられた。したがって、A-1は、早急にSOPを整備する必要がある。告示法では2017年3月における改正で、空試験の判定の際、空試験の濃度が告示法において測定法ごとに定められた濃度範囲の下限値ではなく、各検査機関が作成した検量線の下限値を下回ることを確認することになった¹³⁾。1機関(A-24)で空試験の濃度が検量線の下限値を上回っていたため、是正処置が必要であった。すべての機関は1次式を用いて検量線を算出しており、原点強制通過を行った機関は存在しなかった。また、決定係数(R²)の範囲は、0.9955～1.0000であった。

② 前処理及び標準液

告示法では前処理の際、元素の濃度範囲に収まるように適宜濃縮または希釈を行うように記載されている。本研究では、前処理操作において濃縮を行った機関は存在しなかった。一方、いずれの検査方法でも加熱操作を行うこととされているが、A-1、A-12、A-15、およびA-23において加熱操作は行われていなかったため、SOPの修正が必要である。

分析用試料中および標準液中の硝酸濃度は、ICP-MS法では1%、それ以外の方法では10%と告示法に記載されている。ICP-MS法で測定した機関においては、すべての機関が硝酸濃度1%で調製していた。一方、ICP-AES法もしくはFLAA法で硝酸濃度が10%であった機関は6機関中2機関であった。複数の機関から「10%の硝酸濃度での測定は、分析機器への負担が大きいため硝酸濃度を変更している」と回答があった。そのため、これらの機関については、告示法の内容を理解した上で、機器の不具合等の影響を考慮して硝酸濃度を変更していると考えられた。

③ 妥当性試験

2012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、告示法においても妥当性試験を行うこ

とが求められている¹⁷⁾。本研究では19.2%(5/26)の機関が妥当性試験を実施していなかったため、速やかに実施すべきである。なお、妥当性ガイドラインは2017年10月に改正され、新たに検量線についても妥当性評価を行うことが求められている¹⁶⁾。

ま と め

大阪府の水道水質検査外部精度管理事業として、鉛及びその化合物の検査結果を「真値」に対する誤差率±10%とZスコアの絶対値3未満を許容範囲とする2つの方法で評価を行った。報告された26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。26検査値のうち、「真値」に対する誤差率±10%を超えたのは1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、3.8%(1/26)であり、各検査機関は、概ね精度良く水質検査を実施していると考えられた。そして、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) 同一試料を複数回測定した際、明らかに値がばらつくときは、作業中に汚染を受ける等、分析精度が保たれてない可能性が高いため、原因を特定して改善する。

(2) 金属類の測定では汚染リスクがあるため、可能な限り専用の器具を使用し、硝酸等により洗浄を行う。

謝 辞

本研究は「平成29年度大阪府水道水質検査外部精度管理事業」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健康医療部環境衛生課の各位に感謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 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.
 - 2) 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.
 - 3) 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**: 12-22.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 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-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.
 - 8) 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.
 - 9) 吉田仁, 木村明生. 水質検査における外部精度管理(2015 年)-銅及びその化合物-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2017; **1**: 15-33.
 - 10) 吉田仁, 小泉義彦. 水質検査における外部精度管理(2016 年度)-フェノール類-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2018; **2**: 74-82.
 - 11) 水質基準の見直しにおける検討概要 -鉛-
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k07.pdf>
 - 12) 真柄泰基. 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社; 1994. 12-14.
 - 13) 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 平成 15 年厚生労働省告示第 261 号(最終改正平成 30 年 3 月 28 日厚生労働省告示第 138 号)
 - 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**: 51-56.
 - 16) 厚生労働(2019)省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 (平成 15 年 10 月 10 日健水発第 1010001 号, 平成 15 年 10 月 10 日, 最終改正 平成 31 年 3 月 29 日)
 - 17) 厚生労働省(2017)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, 最終改正 平成 29 年 10 月 18 日)
- 「WEB サイトの内容は 2019 年 6 月 5 日に確認した」

**Results of external quality control on the analytical methods for lead in tap water, performed in 2017
in Osaka Prefecture**

Jin YOSHIDA and Takae NAKAJIMA

In order to improve the accuracy of water quality measurements, we implemented the external quality control on analytical methods for lead in tap waters, with water supply corporations, public health centers and institutes of public health. As a result, one from 26 examination values was evaluated as an outlier. We executed the follow up survey for this facility. From the survey, the examination value was suggested to be influenced by the lead contamination in the process of the preparation step of the measurement.

Key words: tap water, lead, water quality measurements, accuracy, external quality control.

室内空气中 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート、 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート及び 2-エチル-1-ヘキサノールの分析法の検討

吉田俊明, 味村真弓, 大嶋智子, 山口進康

厚生労働省により住宅等室内における空气中濃度指針値の策定が検討されている 3 種の化学物質 (2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート及び 2-エチル-1-ヘキサノール) を対象として、同省の提示するこれら化学物質の捕集および測定方法に準拠して分析した際の検出下限濃度、定量値の正確性および再現性、捕集管に採取した試料の冷蔵保存中の安定性等について検証した。

球状活性炭 200 mg を充填した市販の捕集管を吸引ポンプに接続し、毎分 0.1 L の流速で空气中の化学物質を 24 時間採取した。採取後捕集管から活性炭を取り出し、化学物質を二硫化炭素 2 mL により脱着した後、無水硫酸ナトリウムを添加して脱水した。その上清 1 ml を分取し、内部標準物質としてトルエン-d₈ を加えてガスクロマトグラフィー/質量分析法により定量した。

3 種の化学物質の標準溶液より作成した検量線はいずれも直線性を示さず、2 次曲線として回帰式を算出した。各化学物質の検出下限濃度は 0.07 ~ 0.1 µg/m³、定量値の相対誤差および変動係数はそれぞれ 8% 以下、5% 以下であり定量値の正確性、再現性はともに良好であった。化学物質を採取した捕集管は、分析までの期間冷蔵庫内で約一ヶ月間保存可能であった。本法は、室内空气中のこれら化学物質の分析に十分適用できると考えられた。

キーワード：室内空気汚染、可塑剤、ガスクロマトグラフィー/質量分析、活性炭、二硫化炭素

1990 年代後半より、ホルムアルデヒドやトルエン等揮発性有機化合物 (VOC) による室内空気汚染が主要因とされるシックハウス症候群が社会的な問題となった。その対策として、厚生労働省では、「シックハウス (室内空気汚染) 問題に関する検討会」を設置し、室内においてヒトの健康に影響を及ぼす可能性の高い化学物質を順次選定し、2002 年までに 13 種類の化学物質の室内濃度指針値を策定した¹⁻⁴⁾。また、国土交通省では、2003 年に建築基準法を改正し、シロアリ防除剤の一種であるクロルピリホスの建材への使用を禁止するとともに、ホルムアルデヒドの内装材への使用を制限した。これらの対策により、建材から放散される規制対象化学物質が原因となるシックハウス症候群の発症事例は減少し、大きな成果が得られ

たものと考えられる。しかし一方で、近年住宅等の室内において、規制対象化学物質の代替物質が使用されていること、準揮発性有機化合物 (SVOC) による空気汚染が報告されていること、細菌由来の化学物質が検出されていること、また、室内濃度指針と WHO 空気質ガイドライン等との整合を検討する必要があることなどから、厚生労働省では、長らく開催が中断されていた同検討会を 2012 年以降再開し、化学物質による室内空気汚染の実態を改めて把握するとともに、室内濃度指針値の設定のあり方、見直しの仕方等について検討を進めている。

2017 年に開催された当該検討会⁵⁾において 2-エチル-1-ヘキサノール (CAS No.: 104-76-7、以下 EH)、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノ

イソブチレート (同25265-77-4、以下 TMPMB) および 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート (同6846-50-0、以下 TMPDB) (図1) の室内濃度指針値 (EH: 130 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、TMPMB: 240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、TMPDB: 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) が新たに提案された。しかし、翌年に開催された同検討会において、関係者が対策を講ずるに当たり、科学的知見のさらなる収集が必要であり、また技術的観点から実効性に疑義のある値が提案されている可能性があるとのパブリックコメント等の意見を踏まえ、ヒトへの安全性に係る情報や代替物の情報等を引き続き集積し、国際動向も踏まえながら、指針値について再検討することになった⁶⁾。近い将来にこれら3物質の指針値が設定される可能性が高い。

EH および TMPMB は主に接着剤や塗料に使用される他、いずれも可塑剤の分解生成物としても室内空气中に放散される。TMPDB は主に可塑剤として使用される。厚生労働省は、室内空气中のこれらの採取および測定方法について、いずれも2001年に定めた「室内空气中化学物質の測定マニュアル」および「室内空气中化学物質の採取方法と測定方法 (Ver.2)」³⁾ に基本的に従うよう提示している⁷⁾。すなわち、固相吸着-溶媒抽出-ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 法、固相

吸着-加熱脱着-GC/MS 法または容器採取-GC/MS 法のいずれかにより空气中化学物質を採取し、測定する。これら3種の方法のうち、機器類の整備等経済的側面より、固相吸着-溶媒抽出-GC/MS 法が最も汎用性が高いと考えられる。この方法では、カーボン系吸着剤 (捕集材) を充填した捕集管を吸引ポンプに接続し、吸引捕集した化学物質を、二硫化炭素により吸着剤から脱着した後分析することとされている³⁾。しかし、捕集した EH、TMPMB および TMPDB の保存に対する安定性や検出下限濃度など、当該分析法の適用に際して参考となる詳細なデータは提供されていない。

本研究では、上記厚生労働省の提示する固相吸着-溶媒抽出-GC/MS 法に準じて空气中 EH、TMPMB および TMPDB を分析するにあたり、定量値の正確性および再現性、検出下限濃度、試料の保存に対する安定性等について検証したので報告する。

方法

1. 試薬および材料

標準用試薬 EH (純度: 99.8%)、TMPDB (99.0%) および TMPMB (2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール-1-モノイソブチレート 61.4%、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール-3-モノイソブチレート 38.6%の混合物) は東京化成工業より、内部標準物質トルエン- d_8 (>99.95%、比重 0.943) は Aldrich より入手した。二硫化炭素は富士フィルム和光純薬製の作業環境測定用を、無水硫酸ナトリウムは同社製 PCB・フタル酸エステル試験用を用いた。

空气中化学物質の採取には、活性炭が充填された柴田科学製チャコールチューブ (単層型、椰子殻粒状活性炭 20-40 メッシュ、200 mg) および同社製カーボンビーズアクティブ (単層型、石油合成系球状活性炭 20-40 メッシュ、200 mg) を捕集管として使用した。

2. 保存用混合標準原液および保存用内部標準原液の調製

EH、TMPMB および TMPDB の標準用試薬をそれぞれ別々に二硫化炭素で褐色高気密ビンに溶解し、保存用標準原液 (10 mg/mL) を調製した。さらに各標準原液を別の褐色高気密ビンに等量ずつ

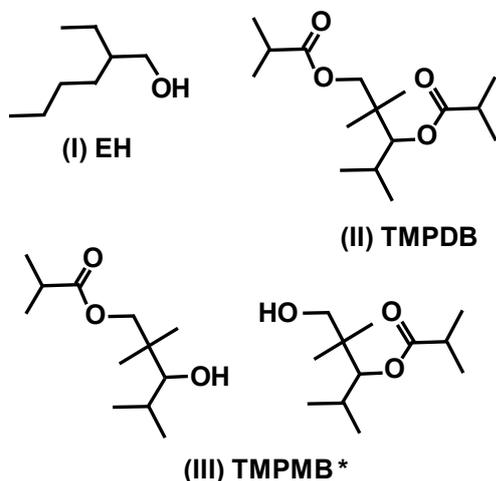


図1. 分析対象とする化学物質の構造式

- I: 2-エチル-1-ヘキサノール (EH)
- II: 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート (TMPDB)
- III: 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート (TMPMB)
- * : 2物質の混合物

混合し、保存用混合標準原液（各化学物質濃度：3.3 mg/mL）とした。

トルエン-d₈ を二硫化炭素に溶かして 0.943 mg/mL の濃度に調製し、保存用内部標準原液とした。

3. 空气中化学物質の捕集

測定する室内の各壁から 1 m 以上離れた位置に設置した三脚に小型吸引ポンプ（柴田科学製 MP-Σ30 ミニポンプ）を固定した。同ポンプに連結した捕集管を床上 1.2 ~ 1.5 m の高さに調整し、流速 0.1 L/min で 24 時間、空气中化学物質を捕集した。捕集終了後、捕集管の両端に付属のキャップを付けて密栓し、アルミホイルで遮光して分析までの期間冷蔵庫に保存した。

4. 試料溶液の調製

捕集管に充填されている活性炭をバイアルビンに取り出し、二硫化炭素 2 mL を加え、ローリングミキサーで 1 時間攪拌したのち、無水硫酸ナトリウム 0.5 g を加えた。その上清 1 mL を分取し、保存用内部標準原液 10 μL を加えて試料溶液とした。

5. 標準溶液の調製

保存用混合標準原液を二硫化炭素で希釈し、各化学物質濃度 0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 および 10 μg/mL の溶液を調製した。各溶液 1 mL を分取し、保存用内部標準原液 10 μL を加えて標準溶液とした。

6. ガスクロマトグラフィー/質量分析

調製された試料溶液および標準溶液を GC/MS により測定した。装置には島津製作所製 AOC-20 型オートサンプラーを装着した GCMS-QP2010 型ガスクロマトグラフ質量分析計を使用し、以下の条件のもと分析を行った。分析カラム：J&W 製 DB-1 (60 m × 0.25 mmΦ, 膜厚 1.0 μm)、注入量：1.0 μL、注入モード：スプリットレス（サンプリング 0.5 分）、キャリアーガス：ヘリウム、全流量：14.6 mL/min、制御モード：圧力（定圧）、キャリアーガス圧力：111.0 kPa、注入口温度：250°C、カラムオープン温度：40°C（5 分保持）-10°C/min-280°C（10 分保持）、インターフェイス温度：250°C、イオン化方式：電子イオン化、イオン源温度：200°C、

イオン化電圧：70eV、分析モード：SIM (Selected Ion Monitoring)、定量用イオン・確認用イオン (*m/z*)：EH (57・41, 43), TMPMB (71・43, 56), TMPDB (71・43, 56), トルエン-d₈ (98・100)。

7. 定量

各標準溶液を分析した際に得られる検量線（[各化学物質濃度 (μg/mL)] (*x*) - [各化学物質ピーク面積/内部標準ピーク面積] (*y*)）(*n* = 8) の回帰式より、試料中の各化学物質質量 (*M*, μg) を求め、次式 (1) に従い、空气中濃度 (*C*, μg/m³) を捕集時間中の平均値として算出した。

$$C = M \times 1000 / (R \times T \times 60) \quad (1)$$

R：吸引ポンプの流速 (L/min)

T：捕集時間 (h)

TMPMB については、標準溶液の測定において異性体混合物として 2 つのピークが検出されるため、2 種の異性体の総量として空气中濃度を算出した。

8. 各種試験

室内空气中の対象化学物質の分析における本法の適用に際し、その適合性について以下のとおり試験した。

(1) 脱着率

活性炭に捕集された各化学物質の二硫化炭素による脱着率について試験した。保存用混合標準原液を二硫化炭素で希釈し、各化学物質濃度 17 μg/mL の溶液を調製した。3 本の未使用の捕集管から活性炭をそれぞれ別々にバイアルビンに取り出した。これらのバイアルビン（サンプル）および活性炭を含まない 3 本の空のバイアルビン（コントロール）に、調製した溶液を 2 mL ずつ分注した（各化学物質の捕集量として 33 μg に相当）。サンプルおよびコントロールを本法に従い分析し、二硫化炭素による各化学物質の活性炭からの脱着率を、各化学物質のサンプル中含量のコントロール中含量に対する割合より算出した。

上記 (1. 試薬および材料) の粒状または球状の 2 種類の活性炭を充填した捕集管について試験し、その結果から分析に適する捕集管を選定した。

(2) 検出下限

室内空气中化学物質を毎分 0.1 L の流速で 24 時

間捕集した際の各化学物質の検出下限濃度を厚生労働省の提示する方法³⁾に従い算出した。すなわち、検量線作成時の最低濃度の標準溶液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$) を 8 回分析し、その標準偏差の 3 倍をそれぞれ各化学物質の検出下限として濃度を算出した。

(3) 破過

各化学物質の採取における捕集管の破過について試験した。室内の 2 ヶ所においてそれぞれ捕集管 2 本を直列に連結して設置し、各上流側の捕集管に、気流 (0.1 L/min) 中にて保存用混合標準原液 30 μL を添加 (空气中濃度に換算して約 700 $\mu\text{g/m}^3$ に相当) し、流速 0.1 L/min で 24 時間室内空気を吸引した。吸引終了後、本法に従い各捕集管を分析し、各上流側捕集管中の各化学物質含量に対する下流側捕集管中の含量の割合を算出した。

(4) 測定値の正確性および再現性

試料の捕集から定量における測定値の正確性と再現性について試験した。室内の 1 ヶ所において 7 本の捕集管を同時に設置し、そのうち 6 本の捕集管に、気流中にて保存用混合標準原液 10 μL を添加 (添加量: 各 33 μg 、空气中濃度: 約 230 $\mu\text{g/m}^3$ 相当) し、流速 0.1 L/min で 24 時間室内空気を吸引した (サンプル)。残りの 1 本の捕集管については、標準原液を添加せずと同様に室内空気を吸引した (ブランク)。サンプルおよびブランクを本法に従い分析し、サンプルの定量値からブランクの定量値を差し引き、その値の平均と標準偏差を算出した ($n=6$)。定量値の正確性は相対誤差により、定量値の再現性は変動係数によりそれぞれ評価した。各化学物質 3.3 μg を添加して調製した試料についても、定量値の正確性および再現性を同様に評価した。

(5) 保存性

捕集管中の各化学物質の冷蔵庫での保存 (4 $^{\circ}\text{C}$ にて遮光) に対する安定性について試験した。未使用の捕集管 10 本に、保存用混合標準原液を二硫化炭素で希釈して調製した溶液 (各化学物質濃度: 1.0 mg/mL) 10 μL を気流中にて添加した (流速 0.1 L/min で 24 時間通気した際の空气中濃度に換算して約 70 $\mu\text{g/m}^3$ に相当) 後、捕集管の両端に付属のキャップを付けて密栓し、アルミホイルで遮光して分析までの期間冷蔵庫に保存した。ただし、2 本の捕集管については、保存せずに直ちに本法に従って分析した。保存した捕集管は、定期的に 2 本ずつ冷蔵庫から取り出し、分析した。

結果および考察

1. 捕集管の選定

粒状活性炭からの各化学物質の脱着率は EH 76%、TMPMB 82%、TMPDB 102% (3 試料の平均) であった。一方、球状活性炭からの脱着率は EH 91%、TMPMB 94%、TMPDB 98%であり、EH および TMPMB の脱着率は粒状活性炭からの脱着率と比較して高かった。この結果より、球状活性炭が充填されたカーボンビーズアクティブを捕集管として選定することにした。なお、本捕集管を使用した際の各化学物質の活性炭からの脱着率を上記の値としてそれぞれの空气中濃度を算出した。

以下、カーボンビーズアクティブを捕集管として用いた際の試験結果を示す。

2. クロマトグラフィー

室内空气中の各化学物質を採取した捕集管から調製された試料溶液および標準溶液 (各化学物質濃度 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、空气中濃度として約 7 $\mu\text{g/m}^3$) を分析した際に得られたクロマトグラムを図 2 に示す。EH は 21.8 分、TMPMB は 28.3 分および 28.4 分、TMPDB は 31.7 分に検出された。TMPMB 標

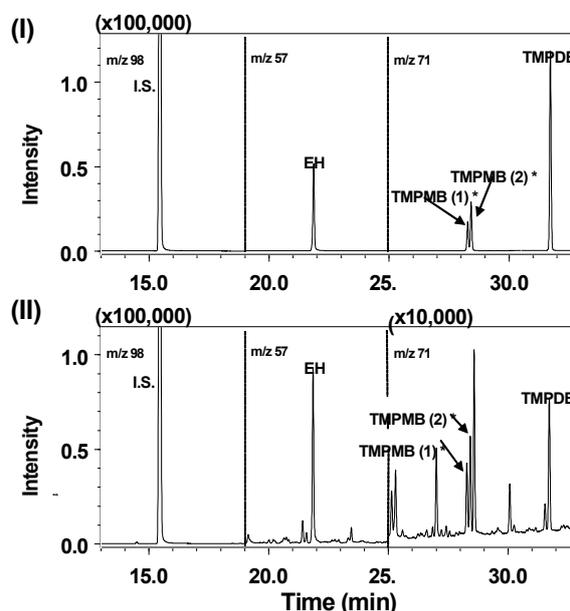


図 2. 標準溶液 (I) および試料溶液 (II) の SIM クロマトグラム

* : 2 物質の混合物

(I) : 各化学物質濃度 0.5 $\mu\text{g/mL}$

(II) : 25 分以降のシグナル強度は 10 倍に拡大して表示

準物質は2種の異性体の混合物であるため、2つのピークが検出された。試料溶液中にはこれら3物質の測定に影響を及ぼす化学物質のピークは検出されなかった。同分析条件において、住宅等室内空気中からの検出頻度が高い防虫剤成分 *p*-ジクロロベンゼンの保持時間はEHとほぼ一致するが、EHの定量イオン (*m/z* 57) と参照イオン (*m/z* 41, 43)、*p*-ジクロロベンゼンの定量イオン (*m/z* 146) と参照イオン (*m/z* 148)⁸⁾ は、いずれも互いの化学物質のフラグメントには存在せず、互いの確認、定量に影響を及ぼさなかった。したがって、試料中の各3物質の分離定量は可能であると考えられた。

3. 検量線

3種の各化学物質の検量線は、いずれも2次曲線的な形状を示した。各化学物質濃度 0 ~ 10 µg/mL (空气中濃度として約 140 µg/m³ 以下) における検量線の回帰式を2次曲線として算出した(表1)。

4. 検出下限濃度

未使用の捕集管から取り出した活性炭を分析した際、3種の化学物質はいずれもほとんど検出されなかった。そのため、濃度 0.1 µg/mL の標準溶液の繰り返し分析 (n = 8) の結果より各化学物質の検出下限濃度を算出した。検出下限濃度は 5 ~ 8 ng/mL であり、空气中濃度に換算すると 0.07 ~ 0.1 µg/m³ であった(表2)。

5. 破過

2本の捕集管を連結し、上流側の捕集管に一定量の化学物質を添加後、室内空気を吸引した試料

表1. 各化学物質の検量線の回帰曲線式

化学物質 ¹⁾	回帰式 $y = a x^2 + b x$		
	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2 ²⁾
EH	0.0018	0.0933	0.9999
TMPMB	0.0023	0.0721	0.9999
TMPDB	0.0042	0.1961	0.9999

¹⁾ 正式名称は図1に示す。

²⁾ 決定係数

を分析したところ、上流側捕集管中の各化学物質含量に対する下流側捕集管中の含量の割合は EH 0%、TMPMB 0%、TMPDB 0.1% (2試料の平均) であり、下流側からは対象化学物質がほとんど検出されなかった。捕集管への各化学物質の添加量は、各化学物質濃度が約 700 µg/m³ (提案された指針値の約3~7倍の濃度) の室内環境における捕集量に相当することから、これら化学物質による空気汚染が顕著な室内での捕集において、捕集管は破過しないと考えられた。

6. 定量値の正確性および再現性

一定量の各化学物質を添加後、室内の定点において空気を24時間捕集した試料 (n = 6) を本法に従い分析し、定量値の相対誤差および変動係数を算出した(表2)。各化学物質の定量値の相対誤差、変動係数はそれぞれ8%以下、5%以下であり、これら化学物質の定量値の正確性、捕集から分析における再現性はともに良好であると考えられた。

7. 捕集管中の化学物質の保存に対する安定性

試験の結果を表3に示す。捕集当日に分析した

表2. 各化学物質の分析における検出下限濃度および定量値の正確性と再現性

化学物質 ¹⁾	検出下限 (µg/m ³)	正確性と再現性 ²⁾			
		捕集管への添加量 3.3 µg		捕集管への添加量 33 µg	
		相対誤差 (%)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)	変動係数 (%)
EH	0.08	1.4	2.5	7.5	2.6
TMPMB	0.1	4.4	4.6	2.2	4.0
TMPDB	0.07	1.4	3.6	0.9	4.7

¹⁾ 正式名称は図1に示す。

²⁾ n = 6

試料中の各化学物質量を 100%とし、一定期間 4°C で保存後の各試料の定量値を相対量で示した。TMPMB および TMPDB は共に 29 日間の保存期間中ほぼ一定の定量値であった。一方、EH は経日に伴って若干減少する傾向が見られたが、保存から 29 日後における定量値は捕集当日の定量値の 90% 以上であった。したがって、空気中のこれら 3 物質を採取した捕集管は、概ね 1 ヶ月間は冷蔵庫内で保存可能であると考えられた。

表 3. 4°C遮光保存下での捕集管中各化学物質の安定性

化学物質 ¹⁾	保存期間(日)			
	5	13	21	29
EH	95 ²⁾	92	93	91
TMPMB	99	98	100	100
TMPDB	96	94	98	95

¹⁾ 正式名称は図 1 に示す。

²⁾ 捕集当日に分析した捕集管中の各化学物質量(添加量:各 10 µg)を 100%とし、一定期間保存後の各捕集管中の各化学物質量を相対量(%)で示す(n=2)。

ま と め

空气中 EH、TMPMB および TMPDB の分析に際し、厚生労働省の提示する室内空气中化学物質の測定方法の一種である固相吸着-溶媒抽出-GC/MS 法の適合性について検証した。

捕集に使用する活性炭からのこれら化学物質の二硫化炭素による脱着率について試験したところ、TMPDB は石油合成系球状活性炭および椰子殻粒状活性炭のいずれからもほぼすべて脱着されたが、EH および TMPMB についてはいずれも粒状活性炭からの脱着率(それぞれ 76%および 82%)が球状活性炭からの脱着率(それぞれ 91%、94%)に比較して低かった。そのため、これら 3 物質の捕集材として球状活性炭を選定した。各化学物質の検量線の回帰式を、いずれも 2 次曲線として算出し、定量に用いた。各化学物質の検出下限は、空气中濃度に換算して、0.07 ~ 0.1 µg/m³であった。本法は、これらの化学物質を正確かつ再現性良く、また、室内において検出頻度の高い他の化学物質と互いに影響を及ぼし合うことなく定量すること

が可能な方法であることが示唆された。さらに、これら化学物質を採取した捕集管は、一ヶ月間冷蔵庫内での保存が可能であると考えられた。

利 益 相 反

本研究に関連して開示すべき利益相反に関する情報は存在しない。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長. 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法について(通知). 生衛発 1093 号. 2000.
- 2) 厚生省生活衛生局長. 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び総揮発性有機化合物の室内濃度暫定目標値等について(通知). 生衛発 1852 号. 2000.
- 3) 厚生労働省医薬局長. 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について(通知). 医薬発 828 号. 2001.
- 4) 厚生労働省医薬局長. 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について(通知). 医薬発 0207002 号. 2002.
- 5) 厚生労働省. 第 21 回シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会(2017/4/19) 配付資料. 室内空気汚染に係るガイドライン案について-室内濃度に関する指針値案-. 2017.
<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-1112100-0-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000166137.pdf>
- 6) 厚生労働省. シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会中間報告書-第 23 回までのまとめ. 2019.
<https://www.mhlw.go.jp/content/000470188.pdf>
- 7) 厚生労働省. 第 21 回シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会(2017/4/19) 配付資料. 採取方法と測定方法について. 2017.
<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-1112100-0-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000166140.pdf>
- 8) 吉田俊明. 室内空气中揮発性有機化合物の分析法の検討. 大阪府立公衛研所報 2002 ; 40 : 141-151.
「WEB サイトの内容は 2019 年 7 月 22 日に確認した」

Analytical method for 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediolmonoisobutyrate, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentaneoldiisobutyrate and 2-ethyl-1-hexanol in indoor air

Toshiaki YOSHIDA, Mayumi MIMURA, Tomoko OOSHIMA and Nobuyasu YAMAGUCHI

Guideline values of the concentrations in indoor air for three compounds, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediolmonoisobutyrate, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentaneoldiisobutyrate and 2-ethyl-1-hexanol, are presently being deliberated by Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan. In this study, the accuracy and repeatability of the quantification values, concentrations of detection limits and storage stabilities of the obtained samples were examined when the compounds were determined according to the standard analytical method advanced by the Ministry.

The compounds in indoor air were collected for 24 hours by using a commercial sampler packing 200 mg of spherical activated charcoal and a suction pump (0.1 L/min). The collected target compounds were extracted from the charcoal with 2 ml of carbon disulfide, and anhydrous sodium sulfate was added to the extracts for dehydration. The supernatant, 1 ml, was decanted into another vial, and then the solution following addition of internal standard, toluene- d_8 , was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry.

The regression equations of the calibration curves for determination of the compounds were calculated as quadratic functions because the curves were not linear. The detection limits of the compounds were 0.07 to 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ as airborne concentrations. The relative errors and coefficients of variation of the quantitative values for the compounds on replicate assays were <8% and <5%, respectively, which indicate good accuracy and repeatability. These compounds collected in samplers were stable for up to 1 month at 4°C in the dark. This analytical method was considered to be applicable for determination of these three compounds in indoor air.

Key words : indoor air pollution, plasticizer, gas chromatography/mass spectrometry, activated charcoal, carbon disulfide

水質検査における定量精度に影響を及ぼす因子の解明 (2018 年度)

- 大阪府建築物飲料水水質検査業 -

中島孝江, 安達史恵, 小泉義彦

当所では 2015 年度より (一社) 大阪ビルメンテナンス協会からの受託研究により、大阪府において建築物飲料水水質検査業の登録を受けている事業所を対象に、検査における定量精度に影響する因子を抽出し、分析法改良の提案を行うことを目的に外部精度管理を実施している。2018 年度の対象項目は「鉄およびその化合物」と「蒸発残留物」を選定した。それぞれ 20 機関および 21 機関の参加を得て実施した結果、それぞれ 2 及び 1 機関が「外れ値」となった。「外れ値」となった機関についてフォローアップ調査を行い、鉄では測定機器の整備不良や定量計算時の希釈率の間違いが、蒸発残留物では乾燥後の蒸発皿の放冷時間が不適切であったことが原因だと判った。

キーワード：水道水、外部精度管理、鉄、蒸発残留物、建築物飲料水水質検査業

当所では 2015 年度より「建築物における衛生的環境の確保に関する法律」第 12 条の 2 第 1 項に規定の「建築物飲料水水質検査業」の大阪府知事登録を受けている事業所を対象に、検査における定量精度に影響する因子を抽出し、分析法改良の提案を行うことを目的として、(一社) 大阪ビルメンテナンス協会からの受託研究により、外部精度管理を実施している^{1,2)}。2018 年度の対象項目は「鉄およびその化合物」と「蒸発残留物」を選定した。

鉄は、地殻中に多量に存在する元素で、河川水中に含まれる鉄は、岩石や鉱物からの溶解、鉱山廃水、埋め立て地浸出水、鉄関連産業の排水に起因する^{3,4,5)}。地下水中に無色の第一鉄イオンの形で溶解していることがあり、汲み上げられた場合、酸化され黄褐色の水酸化第二鉄となって沈殿する^{3,4)}。水道水中には原水に由来するものと鉄管からの溶出によるものがあり、0.3 mg/L 以上で洗濯物や便器にしみが付き、臭気や苦味を与える^{3,5)}。ヒトの健康影響について WHO (1996) では、鉄はヒトの栄養に必要な要素で最低 1 日必要量は概ね 10~50mg と評

価している⁵⁾。暫定最大耐用 1 日摂取量は 0.8mg/kg/day (WHO、1983) としており⁵⁾、飲料水への寄与率を 10% とすると、健康に危険のない濃度は 2mg/L となる⁵⁾。

このような背景から水質基準は主として味覚及び外観的变化を与えざる限度に重点を置いて定められ、1958 年の水質基準に関する省令 (厚生省令第 23 号) で基準値は 0.3 mg/L 以下とされ今日に至っている³⁾。今回、鉄及びその化合物はこれまでの外部精度管理の対象項目となっていなかったことから対象項目とした。

一方、水道水の蒸発残留物の主な成分はナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等の塩類であり、基準値を超えても健康への影響はほとんどない。しかし、蒸発残留物は水の味に影響することから、水質管理目標設定項目の目標値が 30~200 mg/L に、水質基準項目の基準値が 500 mg/L に設定されている⁶⁾。ランゲリア指数を算出する要素の 1 つであり、配水設備の腐食やスケールに関係する項目である。また、クロスコネクション等の汚染があると増加する可能性があり、水道水

の維持管理をする上で重要な項目である。また、蒸発残留物の検査方法は重量法で実施することになっているが、蒸発乾固に用いる皿については、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⁷⁾(告示法)では「蒸発皿」とのみ記され、具体的な材質については示されていない。2009年度に蒸発残留物の外部精度管理を実施したところ、アルミカップを使用した場合、他種の皿を利用した場合より値が高くなることが明らかとなった⁸⁾。そのため、アルミカップの使用は避けるべきであると周知した。そこで、再度、確認を行うため、今年度の対象項目として蒸発残留物を選定した。

調査方法

1. 実施項目

「鉄およびその化合物」(鉄)と「蒸発残留物」を選定した。

2. 参加機関

参加した登録水質検査業者は、鉄が20機関、蒸発残留物が21機関であった。

3. 精度管理試料の調製方法

(1) 鉄

2018年9月10日から9月21日にかけて精製水約100Lをポリタンクに採水した後、硝酸濃度が1%になるように硝酸(和光純薬、超微量金属測定用)を添加した。9月25日に鉄標準液(富士フィルム和光純薬:1001mg/L)を20mL添加した後に攪拌し、1Lのポリエチレン瓶

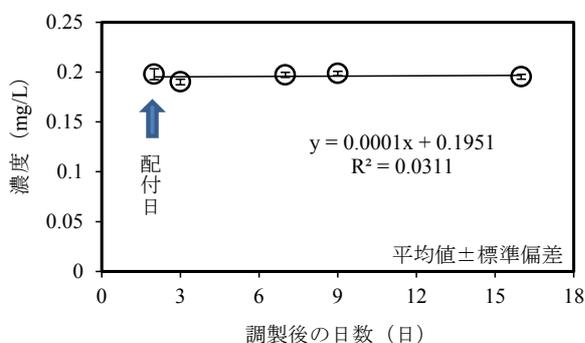


図1 精度管理試料の経時変化(鉄)

に分注した。なお、標準液添加前の精製水中の鉄は定量下限値の0.03 mg/L未満であり、試料調製用の精製水として問題はなかった。

(2) 蒸発残留物

2018年9月25日(火)に水道水約30Lをポリタンクに採水し、攪拌後、1Lのポリエチレン瓶に分注した。

4. 精度管理試料の均一性及び安定性

精度管理試料のばらつきを把握するため、以下の検討を行った。なお、各項目の分析は、告示法に従い、鉄は誘導結合プラズマ質量分析装置による一斉分析法(ICP-MS法)、蒸発残留物は重量法で行った。

(1) 均一性

精度管理試料を分注順に等間隔で5本抜き取り、試料1本につき、2回測定を行い、得られた測定結果を元に一元配置分散分析を行った。鉄(p=0.96)、蒸発残留物(p=0.177)、共に試料間の変動は有意とならず、均一性に問題がないことが確認された。

(2) 安定性

告示法では試料を速やかに試験できない場合、冷暗所に保存し、鉄、蒸発残留物共に2週間以内に試験することとしている。そこで、冷暗所に保存していた試料を、鉄は調製後2、3、7、9、16日目に、蒸発残留物は調製後1、3、7、16日目に、1本抜き取り、毎回5回測定し、平均値の変動係数と平均値の近似直線を求めた。平均値の変動係数は鉄が1.75%、蒸発残留物が2.17%で、安定性に問題がないことが確認された(図1, 2)。また、近似直線の傾きは、鉄が0.0311、蒸発残留物が0.0941となり、いずれも

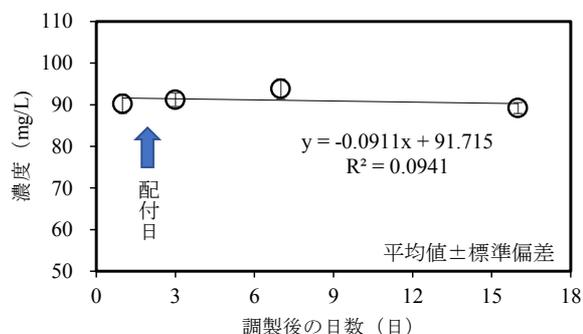


図2 精度管理試料の経時変化(蒸発残留物)

ほぼ0で、この方法でも安定性に問題がないことが確認された。

5. 実施方法

(1) 配付方法

2018年9月27日に大阪健康安全基盤研究所 上水試験室において参加機関に配付した。

(2) 分析方法

鉄は告示法のフレームレス原子吸光光度計による一斉分析法 (FLAA 法) (告示法別表第3)、フレーム原子吸光光度計による一斉分析法 (AAS 法) (告示法別表第4)、誘導結合プラズマ発光分光分析装置による一斉分析法 (ICP-AES 法) (告示法別表第5) および ICP-MS 法 (告示法別表第6)、蒸発残留物は重量法 (告示法別表第23) とした。

配付試料については前処理を含めて5回の測定を行うこととした。

(3) 報告書等の提出

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、標準作業手順書 (SOP)、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。

(4) 評価の検証方法

報告された検査値 (n=5) の変動係数は鉄、蒸発残留物共に10%を許容範囲⁹⁾とし、許容範囲を超えたものについては外部精度管理の評価の対象外とした。

検査結果は「真値」に対する誤差率とZスコアの2つの方法で評価し、両方法で許容範囲を超えた検査値を「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¹⁰⁾を行い、棄却された検査値を除いた検査値の平均を求め、これを「真値」とした。

誤差率は、以下の式から算出し、鉄、蒸発残留物共に±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¹¹⁾で算出し、Zスコアの絶対値3未満を許容範囲とした。

(5) フォローアップ調査

「外れ値」の原因の把握と分析精度の改善を目的に、該当した機関に対してフォローアップ調査を実施した。調査は、「外部精度管理に係る外れ値等に関する報告書」の提出後、すでに提出された「外部精度管理検査結果報告書」やその他の資料を精査し、電話あるいはメールによる聞き取り等によって行った。

結果 および 考察

1. 検査結果の検証

(1) 鉄

① 誤差率、Zスコア及び「外れ値」

各検査機関の検査値、変動係数、「真値」に対する誤差率及びZスコアを表1に示す。また、分析法別の検査値の度数分布を図3に示す。

表1 検査機関の測定結果 (鉄)

機関番号	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する誤差率 (%)	Zスコア
A-1*	0.157	1.32	-25.82	-2.85
A-2	0.198	1.15	-6.12	-0.50
A-3	0.199	0.82	-5.65	-0.45
A-4	0.201	0.74	-4.89	-0.36
A-5	0.201	4.32	-4.79	-0.34
A-6	0.202	2.75	-4.41	-0.30
A-7	0.202	0.90	-4.13	-0.27
A-8	0.205	1.67	-2.99	-0.13
A-9	0.207	0.94	-2.14	-0.03
A-10	0.207	5.04	-2.14	-0.03
A-11	0.208	1.00	-1.67	0.03
A-12	0.211	0.78	-0.15	0.21
A-13	0.212	1.02	0.51	0.29
A-14	0.213	1.86	0.80	0.32
A-15	0.224	0.40	5.91	0.93
A-16	0.231	1.03	9.51	1.36
A-17*	0.235	0.49	11.12	1.55
A-18*	0.235	0.76	11.22	1.56
A-19**	0.314	4.43	48.83	6.05
A-20**	0.369	1.13	74.78	9.14
平均値	0.221			
最大値	0.369			
最小値	0.157			
標準偏差	0.0452			
変動係数 (%)	20.42			
n	20			

真値: 0.211 mg/L

*: Grubbs棄却検定で棄却された機関

*: 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、かつZスコアの絶対値が3以上の機関 (外れ値)

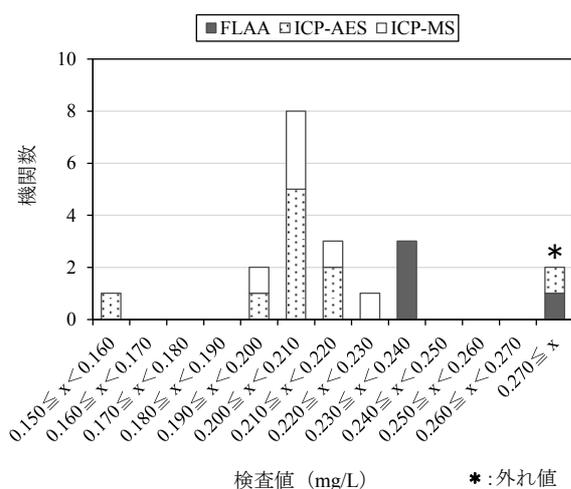


図3 検査値の度数分布図 (鉄)

5つの検査値の変動係数が10%を超えた機関は存在しなかったため、20検査値を用いて評価を行った。検査値を有意水準5%でGrubbsの棄却検定を行った結果、3機関(A-1、A-19、A-20)が棄却されたため、これらを除いた17検査値を平均した0.211 mg/Lを「真値」とした。「真値」に対する誤差率の範囲は-25.82~74.78%となり、許容範囲を超えたのは5機関(A-1、A-17、A-18、A-19、A-20)であった。一方、Zスコアの範囲は-2.85~9.14となり、Zスコアが許容範囲を超えたのは2機関(A-19、A-20)であった。

以上の結果、誤差率及びZスコアの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に該当する機関は2機関で、全体の10%となった。「外れ値」となった2機関(A-19、A-20)に対してフォローアップ調査を行った。

② フォローアップ調査

機関 A-19

機関 A-19 は、FLAA 法を用いており、検査値は 0.314 mg/L、「真値」に対する誤差率は 48.83%、Z スコアは 6.05 であった。外れ値等に関する報告書によると、原因としてキュベット、又はコンタクトコーンの劣化が推測されることであった。そこで、コンタクトコーンとキュベットを新品に交換し、再度精度管理試料の測定を行ったところ、検査値は 0.223 mg/L となり、真値に対する誤差率は 5.72%、Z スコアは 0.91 で外れ値とはならなかった。このことより、外れ値の原因はキュベット、又

はコンタクトコーンの劣化であったと考えられた。

この機関は、日頃の機器の点検、整備、保守が十分ではなかった可能性が考えられた。測定機器の不調は見つけ次第対処し、常に測定可能な状態に整備しておく必要があるが、それには、実効性のある機器の点検簿の整備が必要である。

機関 A-20

機関 A-20 は、ICP-AES 法を用いており、検査値は 0.369 mg/L、「真値」に対する誤差率は 74.78%、Z スコアは 9.14 であった。外れ値等に関する報告書によると、実際には試料を2倍濃縮して測定したが、濃縮なしと勘違いして定量計算したことが原因であるとのことであった。再計算した検査値は 0.185 mg/L となり、真値に対する誤差率は -12.56%、Z スコアは -1.27 で外れ値とはならなかった。

今回の原因となった勘違い、記憶間違いなどのミスを防ぐには作業記録表を整備し、検査手順の確認作業の強化を図ることが有効であると助言後、当該機関では作業記録表の整備が行われた。

また、この機関では検量点が2点と少なく、内部標準物質を使用していなかったため、検量点を4点にし、内部標準物質を使用して再分析を行った結果、検査値は 0.192 mg/L となった。この検査値の真値に対する誤差率は -8.96%、Z スコアは -0.84 となり、外れ値とはならず、分析方法を改善することができた。

(2) 蒸発残留物

① 誤差率、Zスコア及び「外れ値」

各検査機関の検査値、変動係数、「真値」に対する誤差率及びZスコアを表2に示す。また、検査値の度数分布を図4に示す。

21の検査値のうち、変動係数が10%を超えた機関は存在しなかったため、検査値を有意水準5%でGrubbsの棄却検定を行った。その結果、1機関(B-1)が棄却されたため、これを除いた20検査値を平均した93 mg/Lを「真値」とした。「真値」に対する誤差率は-32.78%~18.88%であり、許容範囲を超えた機関は6機関(B-1、B-2、B-3、B-19、B-20、B-21)であった。また、Zスコアを求めた結果、Zスコアの範囲は-4.20~2.97となり、許容範囲を超えた機関は1機関(B-1)であった。

表 2 検査機関の測定結果（蒸発残留物）

機関番号	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する誤差率(%)	Zスコア
B-1 ⁺ **	62	4.00	-32.78	-4.20
B-2*	79	2.37	-14.62	-1.68
B-3*	80	4.47	-13.76	-1.56
B-4	83	3.01	-9.87	-1.02
B-5	87	3.09	-6.19	-0.51
B-6	88	1.53	-5.33	-0.39
B-7	88	1.29	-4.46	-0.27
B-8	89	0.94	-4.03	-0.21
B-9	89	1.85	-4.03	-0.21
B-10	89	2.56	-3.60	-0.15
B-11	90	2.13	-2.52	0.00
B-12	90	1.68	-2.30	0.03
B-13	92	1.54	-0.57	0.27
B-14	95	0.58	2.24	0.66
B-15	95	1.05	2.67	0.72
B-16	97	1.57	4.40	0.96
B-17	99	0.90	7.42	1.38
B-18	102	2.84	9.80	1.71
B-19*	104	5.13	11.96	2.01
B-20*	105	2.89	13.91	2.28
B-21*	110	6.80	18.88	2.97
平均値	91			
最大値	110			
最小値	62			
標準偏差	10			
変動係数(%)	11.5			
n	21			

真値：93 mg/L

⁺：Grubbs棄却検定で棄却された機関

*：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、かつZスコアの絶対値が3以上の機関（外れ値）

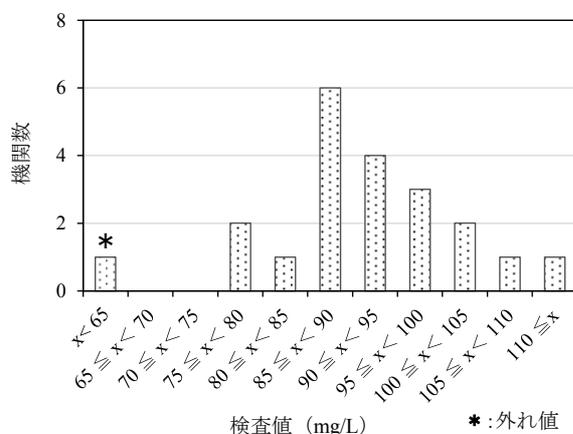


図 4 検査値の度数分布図（蒸発残留物）

以上の結果、検証方法で示した誤差率および Z スコアの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に該当したのは 1 機関で、全体の 5%となり、各機関は概ね精度良く水質検査が実施できていると考えられた。「外れ値」となった機関 B-1 に対して、フォローアップ調査を行った。

② フォローアップ調査

機関 B-1

機関 B-1 の検査値は 62 mg/L で、真値 (93 mg/L) と比較すると誤差率 -32.78%、Z スコア -4.20 と低値であった。蒸発皿は磁皿であった。外れ値等に関する報告書によると、蒸発皿の事前乾燥後および蒸発乾固後のデシケータによる放冷時間を正確に測定していなかったため、誤差が生じたと推測していた。当該機関では、蒸発皿のデシケータ放冷時間が測定に与える影響を検証するため、蒸発皿を 2 時間乾燥後、デシケータに入れ、0.5、1、1.5、2.5 時間後までの重さを測定した。その結果、放冷時間が長くなると、蒸発皿が重くなるが、その変化は 0.5～1 時間後までが大きく、その後、1.5 時間後からは増加量は減少していた (図 5)。

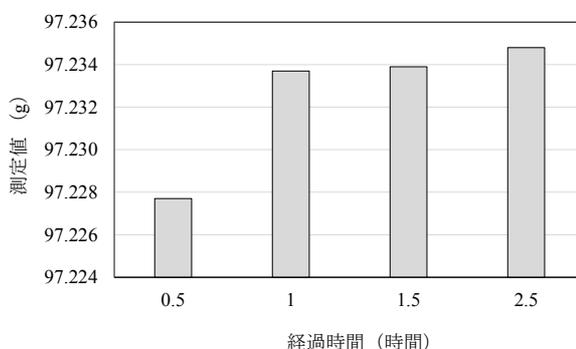


図 5 デシケータ放冷中の蒸発皿の重さ (機関 B-1)

上記事象を検証するために、当所において、磁皿を 2 時間乾燥後、デシケータに入れ、1 から 16 時間後までの重さを測定した。デシケータ中放冷時間が 1～3 時間までは、蒸発皿の重量は増加したが、4 時間から安定化し、その後 16 時間後までほとんど変化がなかった (図 6)。したがって、デシケータ内で蒸発皿が平衡化するにはある程度時間を要し、その時間はデシケータの大きさやシリカゲル等による差があると

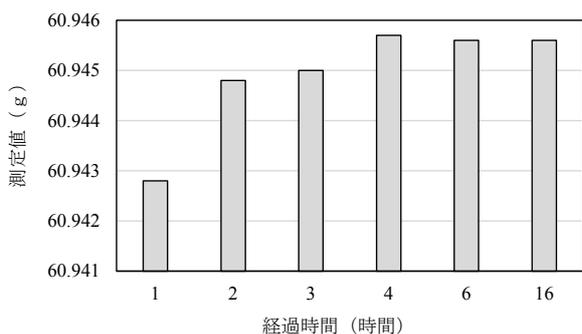


図 6 デシケータ放冷中の蒸発皿の重さ
(大安研)

考えられた。

そこで、当該機関に対しデシケータの放冷時間を長めにとるよう助言し、試料を再配布し、再調査を実施した。試料は塩化ナトリウムを 100 mg/L となるよう調製したが、イオンクロマトグラフによりナトリウムおよび塩化物イオンを測定したところ、その濃度は 95 mg/L であった。当該機関の結果は、94 mg/L となり、誤差は 1.06 % と良好な結果であった。以上のことから、外れ値の原因は、蒸発乾固の前後において、蒸発皿が恒量となる前に測定してしまったことによる測定ミスと考えられた。

今回の結果から、蒸発残留物の測定においては、デシケータでの乾燥時間について SOP に明記することにより、精度の高い結果が得られると考えられた。

2. 全体的な留意点

(1) 鉄

① 検査方法による比較

検査法別の検査値のヒストグラムを図 3 に示した。外れ値となった ICP-AES 法の機関は計算間違いで実際には 0.185 であるため、今回の 20 機関では FLAA 法を用いていた機関の検査値が高値になる傾向がみられた。

② SOP

フロー図のみ等で SOP の体をなしておらず、未整備と分類した機関が 7 機関あった。また、必要な記載（使用器具や試薬の規格等）が欠けていて整備不十分と分類した機関が 9 機関あった。SOP は試験実施のために必ず必要なものであり、SOP に従えば検査担当者全員が検査可能であるものを整備しなければならない。

③ 検査開始までの時間

告示法では検査開始までの時間は 2 週間以内と定められているが、7 機関が 2 週間以内に検査を開始していなかった。最も遅い機関で配付から約 1 ヶ月後の 10 月 23 日に開始していた。速やかに検査できない場合、告示法に従い、冷暗所に保管し 2 週間以内に前処理しなければならない。また、SOP にも検査開始までの時間を明記し、それによって検査する必要がある。

④ 前処理

告示法では前処理操作で加熱を行うこととされているが、4 機関では加熱操作を行っていなかったため、改善が必要である。

また、試料中および標準液中の硝酸濃度は、ICP-MS 法では 1%、それ以外の方法では 10% と告示法に記載されている。ICP-MS 法で分析した機関においては、1 機関が 4% で調製しており、ICP-AES 法では 1% と 1.5% と 2% が各 1 機関あり、FLAA 法では 3 機関が 1% で調製しており、改善が必要である。

⑤ 検量線の検証

告示法では別表に記載された検水の濃度範囲内で 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。濃度範囲は検査方法によって異なり、FLAA 法では 0.01~1 mg/L、AAS 法では 0.01~0.1 mg/L (10 倍濃縮が必要)、ICP-AES 法と ICP-MS 法では 0.001~2 mg/L である。

今回、原点を強制的に通過させていた機関はなかったが、0 mg/L を検量点としていた機関は 10 機関、0 mg/L を除いた検量点数が 4 点未満だった機関が 3 機関あり改善が必要である。

また、鉄の基準値は 0.3 mg/L であり、1/10 の 0.03 mg/L まで定量する必要がある。しかし、最小検量点濃度が 0.03 mg/L より高く、基準値の 1/10 が定量できない機関が 2 機関あり、改善が必要である。

また、ICP-AES 法では発光強度比を用いて検量線を作成することになっているが、内部標準物質を使用していなかった機関が 2 機関、内部標準物質は使用しているが発光強度比を用いていなかった機関が 2 機関あり改善が必要である。

⑥ 標準液

告示法では、標準原液、標準液または混合標準液は原体から自己調製したもの、もしくは計量法（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、告示法の標準原液と同濃度のもの又は告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものの使用が認められている。なお、告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものは開封後速やかに使用することとし、開封後保存したものを使用してはならない。ただし、ICP-AES 法および ICP-MS 法では当該保存方法によれば、開封後保存したものについても使用できる。

本調査では鉄標準液はすべての機関で市販の標準原液を使用していたが、証明書がついていない市販の標準液を使用していた機関が 3 機関あり、これらの機関は改善が必要である。

標準原液の保証期限は、1 機関において未記入であったが、他の機関は 2018 年 11 月～2020 年 9 月ですべて保証期限内であった。

また、標準系列の調製日は、12 機関は用時調製であったが、1 週間未満が 2 機関、1 ヶ月未満が 3 機関、3 ヶ月未満が 1 機関で 2 機関は未記入であった。標準系列は、用時調製が望ましい。

⑦ 空試験

告示法では、精製水を検水と同様に前処理し、空試験を実施することになっており、検量線の濃度範囲の下限値（基準値の 1/10 以下）を下回ることを確認する必要がある。しかし、報告された検量線の最小濃度が検量線の濃度範囲の下限値より高く、空試験の判定ができない機関が 2 機関あった。これらの機関は空試験の判定を考慮した検量線の濃度範囲を設定する必要がある。

⑧ 妥当性試験

水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン¹²⁾に基づく妥当性評価は自社の検査法が正しく水道水質基準に基づく判定値をだせるかを評価するものである。しかし、妥当性評価を実施していた機関は 7 機関であり、参加機関の 1/3 であった。

(2) 蒸発残留物

① SOP

SOP が未提出の機関はなかったが、機器の操作手順書、あるいはフロー図のみといった SOP の体をなしておらず、未整備と分類したのが 9 機関、また、必要な記載（検水の採取器

具や採取量等）が欠けているなど、整備不十分と分類したのが 11 機関であった。さらに、告示をそのまま SOP としている機関が 1 機関あった。なお、1 機関においては適切な SOP が整備されていた。

② 検査開始までの時間

告示法では、検査開始までの時間が 2 週間以内と定められているが、参加機関の約半数である 7 機関において、2 週間以内に検査を開始していなかった。最も遅い機関で配布から約 1 ヶ月後の 10 月 25 日に検査を実施していた。速やかに検査できない場合は、告示法に従い、冷暗所に保管し 2 週間以内に検査しなければならない。また、SOP にも検査開始までの時間を明記し、それに従って検査する必要がある。

③ 測定方法

告示法において、蒸発残留物の測定は「105~110°C で乾燥させてデシケーター中で放冷後、秤量した蒸発皿に、検水を 100~500 mL 採り、水浴上で蒸発乾固する。次に、これを 105~110°C で 2~3 時間乾燥させ、デシケーター中で放冷後、秤量し、蒸発皿の前後の重量差 a mg を求め、次式により検水中の蒸発残留物の濃度を算定する。」と記載されている。蒸発乾固前の蒸発皿の乾燥の温度が 130°C であった機関が 1 機関あり、当該機関は、蒸発後の乾燥は 105°C で実施していた。蒸発乾固の前後で乾燥温度を変えると、蒸発皿の恒量となるまでの時間に誤差が出て、正確に測定できない可能性があるため、乾燥温度は一致させる必要がある。

次に、検水量が 50 mL と告示法より少ない機関が 1 機関あった。一般的に蒸発残留物等の測定においては、乾燥後の質量が 5 mg 以上となるように、検水量が設定されている。残留物の質量が少ない場合において、検水量が少ないと測定に誤差が生じる恐れがあるため、当該機関は検水量を、告示法に従い変更する必要がある。

また、蒸発乾固方法が水浴でなく、ホットプレート¹³⁾の機関が 2 機関、乾燥機の機関が 2 機関、乾燥時間が 2~3 時間でない機関が 4 機関あった。いずれにおいても告示法通りに変更する必要がある。

④ 蒸発皿

蒸発乾固に用いる皿については、告示法では

「蒸発皿」とのみ記され、具体的な材質については示されていない。上水試験方法には、白金皿、ガラス皿、磁皿、ステンレススチール皿またはニッケル皿が示され、さらにアルミカップも使用可能とされている¹³⁾。しかし、平成 21 年度に蒸発残留物の外部精度管理を実施したところ、アルミカップを使用した場合、試料中の炭酸水素イオンによって、アルミニウムが溶出し、水酸化アルミニウム等が生成され、他種の皿を利用した場合より、高くなることが明らかとなった^{8,14)}。

本調査において用いられた蒸発皿は、磁皿が 15 機関、ガラス皿およびアルミカップがそれぞれ 3 機関であり、皿別の検査結果概要を表 3 に示した。平均値をみると、磁皿が 90 mg/L、ガラス皿が 91 mg/L、アルミカップが 96 mg/L となり、差はみられず、また真値の 93 mg/L に近い値であった。したがって、本調査では、アルミカップによる影響はなかったと考えられた。その要因として、試料に含まれる炭酸水素イオンが少なく、蒸発残留物の測定に影響を与えるほどのアルミニウムの溶出がなかったためと推察された。なお、平成 21 年度の調査でアルミカップを使用した 6 機関（3 機関は本調査不参加）のうち、2 機関において、違う材質の蒸発皿に変更していた。

表 3 皿別の検査結果概要

	磁皿	ガラス皿	アルミカップ
検査機関数	15	3	3
最大値 (mg/L)	110	104	105
最小値 (mg/L)	62	79	87
平均値 (mg/L)	90	91	96
標準偏差 (mg/L)	11	12	9

ま と め

2018 年度建築物飲料水水質検査業外部精度管理に鉄および蒸発残留物を選定し、検査結果を「真値」に対する誤差率と Z スコアの 2 つの方法で評価した。

鉄では、報告された 20 検査値のうち、変動係数が 10% を超えた機関は存在せず全てを評価対象とした。Grubbs の棄却検定で棄却されたのは 3 機関で、これらを除いた 17 検査値を

平均した 0.211 mg/L を「真値」とした。「真値」に対する誤差率が±10%を超えたのは 5 機関、Z スコアの絶対値が 3 以上であったのは 2 機関であった。両方法で許容範囲を超えた「外れ値」に該当したのは 2 機関であった。

なお、「外れ値」等の原因および添付資料を検証した結果、検査精度を維持、向上する上で、次の留意点が考えられた。

- 1) 日頃から測定機器の点検、整備、保守を十分に行う。
- 2) 作業記録表を整備する。
- 3) 検査結果の複数人による確認作業を確実にする。
- 4) 告示法に準拠した SOP を整備する。
- 5) 分析は、SOP から逸脱しないようにする。
- 6) 前処理方法は、告示法を遵守して行う。
- 7) 検量点数は 4 点以上、告示法に準拠した検量線濃度範囲など適切な検量線を作成する。
- 8) 標準原液、混合標準液について、証明書、濃度、保証期限等を確認する。

蒸発残留物では検査が実施された 21 機関のうち変動係数が 10% を超えた機関はなかった。Grubbs の棄却検定で棄却された機関は 1 機関であった。「真値」に対する誤差率が許容範囲を超えた機関は 6 機関、Z スコアが許容範囲を超えた機関は 1 機関であった。以上のことから、誤差率と Z スコアとの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に該当する機関は 1 機関であった。

なお、「外れ値」等の原因および添付資料を検証した結果、検査精度を維持、向上する上で、次の留意点が考えられた。

- 1) 蒸発皿が恒量となる時間に留意する。
- 2) 告示法に準拠した SOP を整備する。
- 3) SOP から逸脱しないようにする。

謝 辞

本研究は「建築物飲料水水質検査における定量精度に影響を及ぼす因子の解明ならびに改良分析法の提案に関する研究」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。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文献

- 1) 吉田仁, 木村明生. 水質検査における外部精度管理(2015年度)ー銅及びその化合物ー. *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2017; **1**: 15- 33.
- 2) 中島孝江, 安達史恵, 小泉義彦. 水質検査における外部精度管理(2017年度)ー大阪府建築物飲料水水質検査業ー. *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2018; **2**: 91- 99.
- 3) 上水試験方法解説編 2001 年版. 日本水道協会; 2001. 389-393
- 4) 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社; 1994. 52-53.
- 5) 厚生労働省 HP、水質基準の見直しにおける検討概要、
<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k35.pdf>
- 6) 上水試験方法解説編 2001 年版. 日本水道協会; 2001. 199-201
- 7) 厚生労働省. 「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」(平成 15 年 7 月 22 日付け厚生労働省告示第 261 号 [最終改正 平成 30 年 3 月 28 日付け厚生労働省告示第 138 号])
- 8) 田中榮次, 安達史恵, 足立伸一. 平成 21 年度大阪府建築物飲料水水質検査業外部精度管理結果ー蒸発残留物ー. *大阪府立公衆衛生研究所所報* 2011; **49**: 45-52.
- 9) 厚生労働省. 「水質基準項目の測定精度」(平成 15 年 10 月 10 日健水発第 1010001 号厚生労働省健康局水道課長通知別添 5)
- 10) 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. 7-27.
- 11) 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.
- 12) 厚生労働省. 「水質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 日付け健水発 0906 第 1~4 号 [最終改正 平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 第 1 号])

- 13) 上水試験方法理化学編 2011 年度版. 日本水道協会; 2011. 140
- 14) 田中榮次, 安達史恵, 小川有里, 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ー蒸発残留物 (平成 21 年度) ー. *水道協会雑誌* 2011; **80**: 12- 22.

「WEB サイトの内容は 2019 年 1 月 15 日に確認した」

Results of external quality control on the analytical measures for iron and total residue in drinking water, performed in 2018 in Osaka Prefecture

Takae NAKAJIMA, Fumie ADACHI and Yoshihiko KOIZUMI

From 2015, by request of Osaka Building Maintenance Association, we started to implement the quality control program for building inspection contractors. In 2018, 20 building inspection contractors participated in the external quality control on analytical measure of iron and its compound and 21 contractors participated in that of total residue. As a result, each two and one building inspection contractors were evaluated as outliers. We executed the follow up survey for these three facilities and retesting was performed. Finally, all facilities obtained the accurate results in retesting after unfolding and correcting the causes.

Key words : drinking water, external quality, iron, total residue, building inspection contractors.

「ただし書きの運用」による人槽緩和規定の事後検証調査

安達史恵^a, 吉田仁^a, 高塚遼^b, 長尾綾佳^b, 光田聖庸^c, 土屋誠^d

わが国においては、少子高齢化と核家族化が進み、人口は減少の一途をたどると予想されている。浄化槽は汚水未処理人口が多く、家屋が分散している地域で、効率的・経済的かつ柔軟に汚水を処理することが可能な処理施設である。しかし、汲み取りやみなし浄化槽（単独処理浄化槽）から浄化槽（合併処理浄化槽）への転換は十分に進んでいない。このような状況下において、大阪府では、戸建ての既存住宅に設置する浄化槽に対し、処理対象人員算定基準（JIS A3302）のただし書の適用基準を定め、平成 27 年 4 月 1 日から運用が開始された。平成 27～29 年度において、大阪府内では、この基準により 18 基が設置された。そこで、人槽緩和適用基準の妥当性について検討することを目的に、人槽緩和基準により設置された浄化槽について、運用後の浄化槽の使用状況や放流水質に関する調査を実施するとともに、府域に設置されている浄化槽の法定検査結果との比較を行った。さらに、大阪府と適用条件の異なる 2 市（茨木市および高槻市）との比較も行った。

キーワード：人槽緩和、浄化槽、人口減少、BOD

わが国においては、少子高齢化と核家族化が進み、人口減少と世帯規模の減少により、平成 29 年度には平均世帯人員は 2.47 人となり¹⁾、今後も減少の一途をたどると予想されている。浄化槽は汚水未処理人口が多く、家屋が分散している地域で、効率的・経済的かつ柔軟に汚水を処理することが可能な処理施設である。しかし、汲み取りやし尿のみを処理する、いわゆるみなし浄化槽（単独処理浄化槽）からすべての生活排水を処理する浄化槽（合併処理浄化槽）への転換は十分に進んでいない。

そこで、大阪府では、適正な人員算定により設置者の過度の負担を抑え、浄化槽への転換を進めるため、戸建ての既存住宅に設置する浄化槽に対し、処理対象人員算定基準（JIS A3302）のただし書の適用基準を定め、平成 27 年 4 月 1 日から運用が開始された²⁾。表 1 に適用条件を示す。これらの一定の条件を満たせば、JIS 基準で定められている延べ床面積 130 m²を超える

一戸建て住宅に設置する浄化槽に対し、7 人槽を 5 人槽に低減できる。平成 27～29 年度において、大阪府内では、この基準により 18 基が設置された。そこで、人槽緩和適用基準の妥当性について検討することを目的に、人槽緩和基準により設置された浄化槽について、運用後の浄化槽の使用状況や放流水質に関する調査を実施するとともに、大阪府域に設置された浄化槽の法定検査結果との比較を行った。さらに、大阪府と適用条件の異なる 2 市（茨木市および高槻市）との比較も行った。

調 査 方 法

1. 調査対象

府域において、平成 27～29 年度に人槽緩和基準により設置された市町村型浄化槽を対象とし平成 29、30 年度に連続しての調査が 7 基、平成 29 年度のみ調査が 1 基、平成 30 年度のみ

a 大阪健康安全基盤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

c 大阪府環境農林水産部環境管理室事業指導課

d 枚方市保健所

表 1. 処理対象人員算定基準のただし書の運用基準における適用条件

項 目	
1	一戸建ての既存住宅であること（台所及び浴室が2以上ある住宅は不可）
2	実居住人員及び予定居住人員が3人以下の世帯であること
3	予測水道使用量が1 m ³ /日以下であることを確認できること

* 予測水道使用量 (m³/日) = 年間最大水道使用実績 (m³/日) / 実居住人員 × 予定居住人員
 (ただし従前が汲み取りの場合は 上式×200/150)

表 2-1. 浄化槽の概要 1

型式	処理方式	処理性能(mg/L)
XE	固液分離型流量調整付 担体流動循環方式	BOD=20, COD=30, T-N=20, SS=20
XC	嫌気ろ床担体流動循環方式	BOD=10, COD=20, T-N=10, SS=10
CEN	接触ろ床方式	BOD=10, T-N=10, SS=10

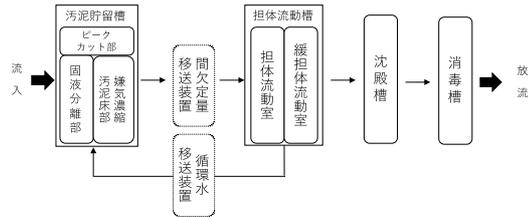


図 1-1 フローシート (XE 型)

表 2-2. 浄化槽の概要 2

型式	XE	XC	CEN
嫌気ろ床第1室 ^{*1}	1.071	0.775	1.048
嫌気ろ床第2室 ^{*2}	-	0.739	1.052
担体流動槽 ^{*3}	0.389	0.457	0.482
沈殿槽 ^{*4}	0.145	0.352	0.237
消毒槽	0.021	0.023	0.015
総容量	1.626	2.346	2.834

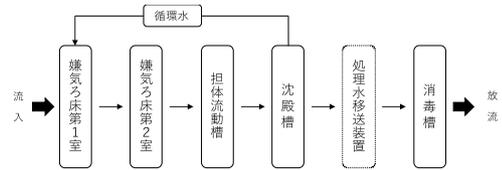


図 1-2 フローシート (XC 型)

- *1 汚泥貯留槽 (XE)、夾雑物除去槽 (CEN)
- *2 嫌気ろ床槽 (CEN)
- *3 接触ろ床槽 (CEN)
- *4 処理水槽 (CEN)

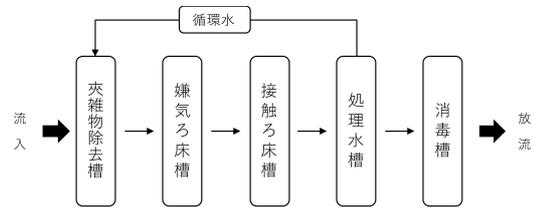


図 1-3 フローシート (CEN 型)

調査が3基の計11基の調査を行った。これらの浄化槽の維持管理は業者委託されており、保守点検を年4回、清掃を年1回実施している。調査した浄化槽の概要を表2-1,2-2に、型式によるフローを図1-1~1-3に、認可時および調査時の使用条件を表3に示した。

2. 方法

調査は浄化槽の運転状況の把握のための現地調査、および処理状況を確認するための水質調査を行った。また、使用条件等の把握のため、同時期に設置者アンケートを実施した。

(1) 調査時期

平成29年9月～平成31年2月

(2) 調査場所

現地調査は各浄化槽の嫌気槽部、好気槽部、循環部、処理水槽あるいは沈殿槽、および消毒槽で実施し、採水は嫌気槽部出口、処理水槽あるいは沈殿槽からそれぞれ1次処理水、2次処

理水を採取した。

(3) 調査項目

水質調査は現地にて水温、溶存酸素 (DO)、pH、透視度、循環水量を、実験室にて浮遊物質 (SS)、化学的酸素要求量 (COD)、生物学的酸素要求量 (BOD)、各態窒素 (アンモニア態窒素 (NH₄-N)、亜硝酸態窒素 (NO₂-N)、硝酸態窒素 (NO₃-N)、総窒素 (T-N)) および総リン (T-P) を測定した。いずれの項目も下水試験方法、工場排水試験方法 (JIS K 0102:2013) あるいは上水試験方法に従い検査を行った。BODについては、硝化を抑制した ATU-BOD も測定した。またアンケートによる調査項目は、浄化槽の使用開始時期、清掃および保守点検頻度、使用人数、水道使用量とした。

結果および考察

1 浄化槽調査結果

(1) 使用状況

平成 29 年度は対象 8 基において、調査時の居住人員は 1～3 名（昼間人員は 0～2 名）、水道使用量は 0.14～0.74 m³/日（6 ヶ月平均）で、人槽緩和基準である居住人員 3 人以下及び水道使用量 1 m³/日以下を十分に満たしていた。平成 30 年度は対象 10 基において、調査時の居住人員は 1～3 名（昼間人員は 0～2 名）、水道使用量は 0.34～0.68 m³/日（6 ヶ月平均）で、人槽緩和基準を満たしていた。さらに、水道使用量は過半数で 0.5 m³/日以下であり、低負荷の浄化槽が多かった。

(2) 運転状況

各浄化槽の水質調査日の運転状況を表 4 に示した。担体流動室（XE および XC）、接触ろ床槽（CEN）における DO は浄化槽の管理基準である「1.0 mg/L 以上」を満たしていた。また 2 次処理水の pH は概ね中性であった。

平成 29 年度において NO.1, 2 では、固液分離部において水位が高く、スカムが循環水送水管および送水管出口付近まで肥厚していたため、循環水量が測定できなかった。循環比（流入水量に対する循環水量の割合）が設定されている型式において、推奨値を満たしていたものは 6 基中 0 基（2 基は測定不能）であった。NO.4 では、沈殿槽に粘性のスカムが見られた。NO.8 では、全体的に水が白濁していた。

平成 30 年度において NO.2, 4, 10, 11 では、固液分離部において水位が高く、スカムが循環水送水管および送水管出口付近まで肥厚していたため、循環水量が測定できなかった。循環比が設定されている型式において、推奨値を満たしていたものは 6 基中 1 基（4 基は測定不能）であった。NO.2 では、担体流動室へのバルブが閉まり、散気が停止していた。

循環比の推奨値の最大値に対する比は、1.3～11.6（平成 29 年度）で、3 基（NO.3, 6, 8）において 5 倍以上の大きな差があった。しかしこのうち平成 30 年度に使用を停止した 1 基を除いた 2 基では、平成 30 年度にはそれぞれ 1.2 および 3.7 と改善されていた。また平成 30 年度全体においても 1.1～3.7 と、大きく外れている浄化槽

はなく、適正に管理されていた。循環比は浄化槽を管理する上で、重要な項目であり、保守点検においても点検項目となっている。循環比が各浄化槽に設定された推奨値に概ね近づくように、適正に保守管理する必要があると考えられた。

(3) 2 次処理水の水質検査結果

2 次処理水の水質結果を表 5 に示した。平成 29, 30 年度における BOD の濃度範囲は 4.1～28 mg/L および 2.9～25 mg/L であり、放流水の水質の技術上の基準である 20 mg/L を超過しているのが 1 基ずつ（NO.4 および NO.9）あったが、その値は 28, 25 mg/L であり、概ね適正であると考えられた。

平成 29 年度に BOD の基準を超過していた NO.4 は、設置されてから約 9 ヶ月が経過し、循環比の推奨値の最大値に対する比は 2 倍とやや高かった。他の検査値も、SS が 23 mg/L および COD が 34 mg/L で、XE 型の処理性能値をやや上回り、また透視度も 16 度と低い値であった。さらに担体流動室の DO が 4.7 mg/L にもかかわらず、T-N が 14.4 mg/L に対してアンモニア態窒素が 9.82 mg/L とやや高く、硝化が進んでおらず、処理機能が低下している状態であった。一方、平成 30 年度においては、BOD は 6.4 mg/L、他の検査項目においても XE 型の処理性能値を超過しておらず、適正であった。スカム肥厚のため循環水量の測定が不可能であったため、循環比の比較はできないが、1 次処理水と 2 次処理水との比較（表 6）において、平成 29 年度と比較すると平成 30 年度はすべての項目で 2 次処理水で水質が大幅に改善されているため、十分に機能を発揮していると考えられた。

平成 30 年度に BOD の基準を超過していた NO.9 は、調査が年 1 回の清掃後 1 カ月以内であったことから、水質の安定性にやや欠けていたと考えられた。

平成 29 年度と比較して水質がやや悪化していた浄化槽は、7 基のうち 2 基（NO.1, 2）であった。NO.1 では BOD が 18 mg/L、COD が 23.5 mg/L と放流基準および XE の処理性能値は超過していなかったが、2 次処理水の SS が 17 mg/L と高かったため、その影響によるものと考えられる。NO.2 では担体流動室へのバルブが閉まり、散気が停止していた。BOD は 15 mg/L で放流基

準を満たしていたが、COD が 30.7 mg/L、T-N が 39.6 mg/L と処理性能値を超過し、NH₄-N が 34.6 mg/L であった。緩担体流動室は曝気されており、DO は 5.7 mg/L であったが、担体流動室が曝気されていなかったことから、特に硝化に問題があったと考えられた。

その他の浄化槽においては、両年度ともに COD、T-N および SS のいずれの項目においても、処理性能値をわずかに超過している程度であった。したがって、水質検査結果および運転状況から判断して、処理水質は概ね問題ないと考えられた。

(4) 1 次処理水および 2 次処理水の比較

平成 29 年度において、1 次、2 次処理水の検査値が多く項目でほぼ同じ値であった浄化槽が 3 基 (NO.3, 6, 8) あった。これらの浄化槽では、循環比が推奨値の最大値に対して 5 倍以上となっており、循環水量が流入水量に対して極端に多く、その結果、同様の水質になっていると考えられた。しかし流入水量が少ないため、処理水質に問題が生じていないと考えられた。一方、平成 30 年度において、検査結果がほぼ同じ値の浄化槽が 1 基 (NO.6) あった。循環比は 22.2 となり、循環水量が流入水量に対し多く、嫌気状態であるべき固液分離部の DO が 2.7 mg/L と他の浄化槽 (0.3~0.5 mg/L) と比較してもかなり高くなっていた。したがって、1 次と 2 次処理水が同様の水質になっていると考えられた。この施設では平成 29 年度においても、循環比が推奨値の最大値に対して 8.8 倍と高かったが、平成 30 年度においては 3.7 とやや改善がみられていたものの、BOD の水質結果からみると、さらなる調整が必要と考えられる。

2. 法定検査結果との比較

本調査の検査結果を、大阪府域に設置されている全 3767 基の浄化槽の法定検査 (浄化槽法第 11 条³⁾) 結果の BOD の値を用いて比較検討した。大阪府域に設置されている浄化槽の平成 28 年度における法定検査結果の概要を表 7 に示す。またその分布を図 2-1~2-3 に示す。ここでは、家庭用小型合併浄化槽を対象とし、事業所に設置されているものは除いた。また XC 型は 1 基しか設置されていなかったため値のみを記載している。

解析の結果、すべての型式の法定検査結果の BOD 値の第 3 四分位数 (以下 75% 値とする) は 18 mg/L となった。一方、XE 型の中央値および 75% 値は、全体のそれぞれの値と比較すると 1.9 倍、1.5 倍と高い値となっており、分布も図 2-1、2-2 から明らかなように右側にシフトし、安定性に欠く結果であった。

本調査の結果において、法定検査結果の 75% 値である 18 mg/L を超過しているのは、NO.4 の 28 mg/L (平成 29 年度) と NO.9 の 25 mg/L (平成 30 年度) の XE 型であった。法定検査結果および本調査から、XE 型は処理水質の安定性にやや問題があると推察された。

表 7. 平成 28 年度法定検査結果概要

n	すべての型式			
	基	3767	XEおよびFCE ^{*1}	CEN XC
平均値	mg/L	15	23	9 6.4
最小値	mg/L	<1	1.8	1
最大値	mg/L	630	150	30
中央値	mg/L	9.6	18	7.1
第3四分位数 (75%値)	mg/L	18	27	15

*1 FCE: 固液分離型流量調整付担体流動循環方式でXEと同型

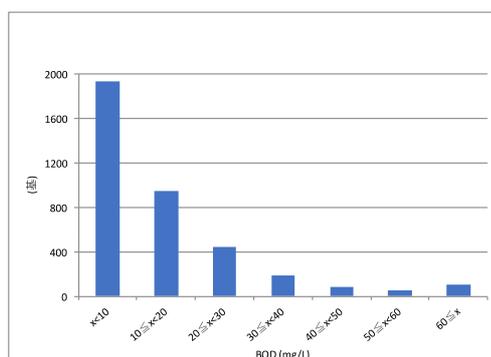


図 2-1. 平成 28 年度 法定検査結果 BOD 分布図

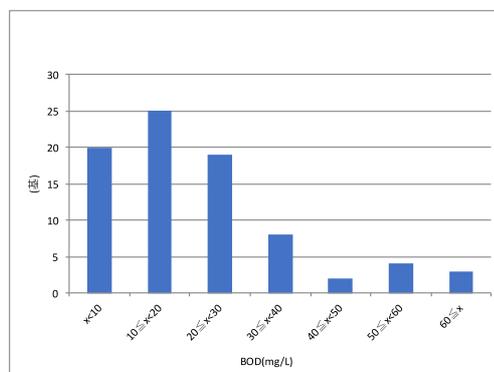


図 2-2. 平成 28 年度 法定検査結果 BOD 分布図 (XE および FCE)

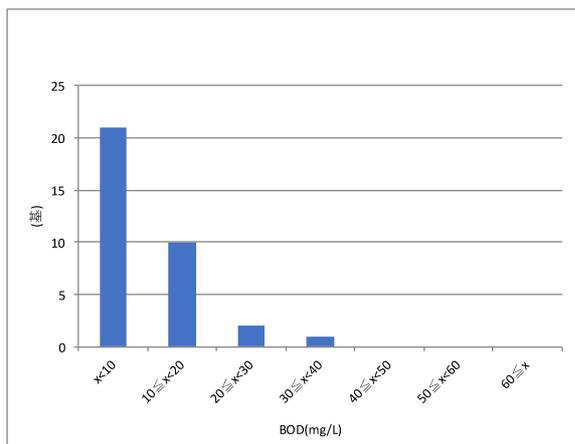


図 2-3. 平成 28 年度 法定検査結果 BOD 分布図(CEN)

3. 市町村との比較

大阪府における人槽緩和適用基準の妥当性について検証するために、大阪府と適用条件の異なる 2 市（茨木市および高槻市）との比較を行った。表 8 に大阪府および 2 市の適用基準を示した。大阪府と 2 市が異なる点は、大阪府は「実居住人員及び予定居住人員が 3 人以下の世帯であること」かつ「予測水道使用量が $1 \text{ m}^3/\text{日}$ 以下であることを確認できること」に対し、茨木市では「将来にわたって、1 日当たりの最大水道使用量が 1000 リットルを超えることとなる人員が居住することがないこと」、高槻市では「実居住人員及び予定居住人員が 5 人以下の世帯であること」かつ「予測水道使用量が $1 \text{ m}^3/\text{日}$ 以下であること（3 人以下の世帯は除く）」となっている点である。つまり大阪府においては居住人員が 3 人以下の世帯であることが絶対条件であり、他に 2 市と比較し厳しくなっている。

(1) 市町村の概要

2 市町村において人槽緩和基準により設置された浄化槽の法定検査結果概要を表 9 に、その分布を図 3-1、3-2 に示した。解析の結果、茨木市および高槻市の 75% 値はともに 12 mg/L であり、すべての型式の法定検査結果（表 7）の BOD 値の 75% 値の 18 mg/L より低い値であった。茨木市では放流水の水質の技術上の基準である 20 mg/L を超過している浄化槽が 2 基、高槻市では 6 基あったが、その値は高槻市の 1 基（ 51 mg/L ）を除いてやや上回っている程度であった。したがって、両市においては人槽緩和により放流水質に影響はでていないと考えられる。ただ

し、1 つの浄化槽では平均水道使用量が $1.08 \text{ m}^3/\text{日}$ と 1 m^3 を超えており、適用基準を満たしていなかった。この浄化槽の BOD は 24 mg/L と基準をやや上回っていた。

(2) 大阪府調査との比較

①実使用人数

茨木市、高槻市および大阪府の調査（平成 29 および 30 年度）における実使用人数を図 4 に示した。各市町村および府の調査において実使用人数がもっとも多いのは 2 人で、その割合は 55% を超えていた。また、茨木市、高槻市においては実使用人数のみに関する条件がないが、大阪府における条件である 3 人より多い人数で使用されていたのは、茨木市の 4 人の 2 基のみであった。

②水道使用量

茨木市、高槻市および大阪府の調査（平成 29 および 30 年度）における 1 日あたりの平均水道使用量の分布を図 5 および 6 に示した。平均値はそれぞれ 0.42 、 0.47 、 0.48 、 $0.52 \text{ m}^3/\text{日}$ となり、分布にも大きな違いは見られなかった。東京都水道局⁴⁾によると、世帯人員別の 1 ヶ月あたりの平均使用水量は、2 人で $0.53 \text{ m}^3/\text{日}$ となる。したがって、2 市および大阪府の調査においては、実使用人数の大半が 2 人であることから、東京都の調査と同様の値となったと考えられる。

BOD の基準である 20 mg/L を超える浄化槽（図 5 中オレンジ部分）においては、水道使用量が 0.5 m^3 を超える傾向が見られたが、平成 30 年度の大阪府の調査で、 20 mg/L を超えた施設の水道使用量は 0.34 m^3 と低負荷の施設であり、清掃直後で水質が安定していなかったことが原因と考えられた。

③水質結果

大阪府における条件である「実居住人員及び予定居住人員が 3 人以下の世帯であること」より多い人数で使用されていたのは、茨木市の 4 人の 2 基であった。それらの法定検査結果（BOD 値）は、それぞれ 2.5 および 5.7 mg/L で、府域の法定検査結果の 75% 値である 18 mg/L および放流水の水質の技術上の基準である 20 mg/L を大幅に下回っていた。ただし、上記の 2 基のうち 1 基では、平均水道使用量が $0.01 \text{ m}^3/\text{日}$ であり、実際にはほとんど使用していないと考えられた。

表 8. 大阪府、茨木市および高槻市における適用基準

項 目	
大阪府	1 一戸建ての既存住宅であること（台所及び浴室が2以上ある住宅は不可）
	2 実居住人員及び予定居住人員が3人以下の世帯であること
	3 予測水道使用量が1 m ³ /日以下であることを確認できること
茨木市	1 JIS A 3302：2000 表の類似用途別番号2（イ）の住宅（一戸建ての住宅で延べ面積が130m ² を超える住宅に限る。）であること。
	2 将来にわたって、1日当たりの最大水道使用量が1000リットルを超えることとなる人員が居住することがないこと
高槻市	1 一戸建ての既存住宅であること。（台所及び浴室が2以上ある住宅は不可）
	2 実居住人員及び予定居住人員が5人以下の世帯であること。
	3 予測水道使用量が1 m ³ /日以下であること。（3人以下の世帯は除く）
	4 上記条件に満たない場合は、再設置も含め適切な対応が可能であること。

表 9. 茨木市および高槻市における法定検査結果

茨木市		
n		18
平均値	mg/L	8.2
最小値	mg/L	<1
最大値	mg/L	25
中央値	mg/L	5.5
第1四分位数(25%値)	mg/L	3.4
第3四分位数(75%値)	mg/L	12

高槻市		
n		40
平均値	mg/L	9.2
最小値	mg/L	<1
最大値	mg/L	51
中央値	mg/L	6.5
第1四分位数(25%値)	mg/L	2.6
第3四分位数(75%値)	mg/L	12

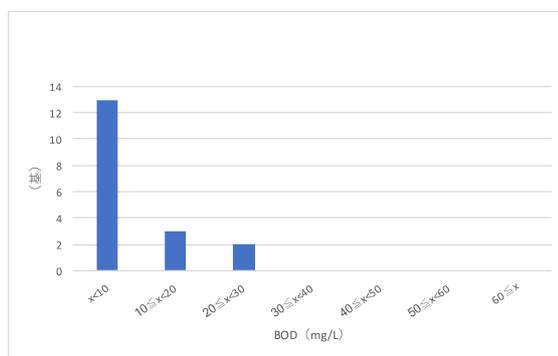


図 3-1. 茨木市の法定検査結果 BOD 分布図

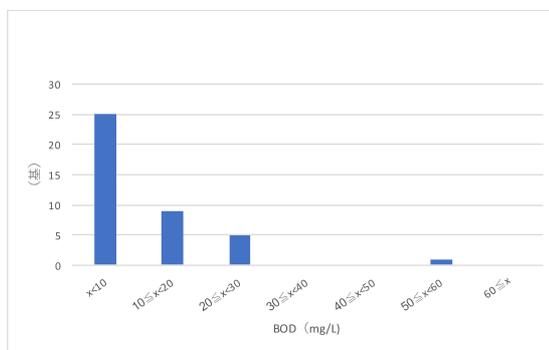


図 3-2. 高槻市の法定検査結果 BOD 分布図

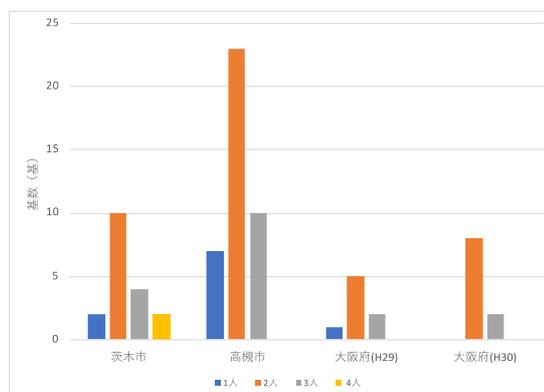


図 4. 茨木市、高槻市および大阪府における実使用人数

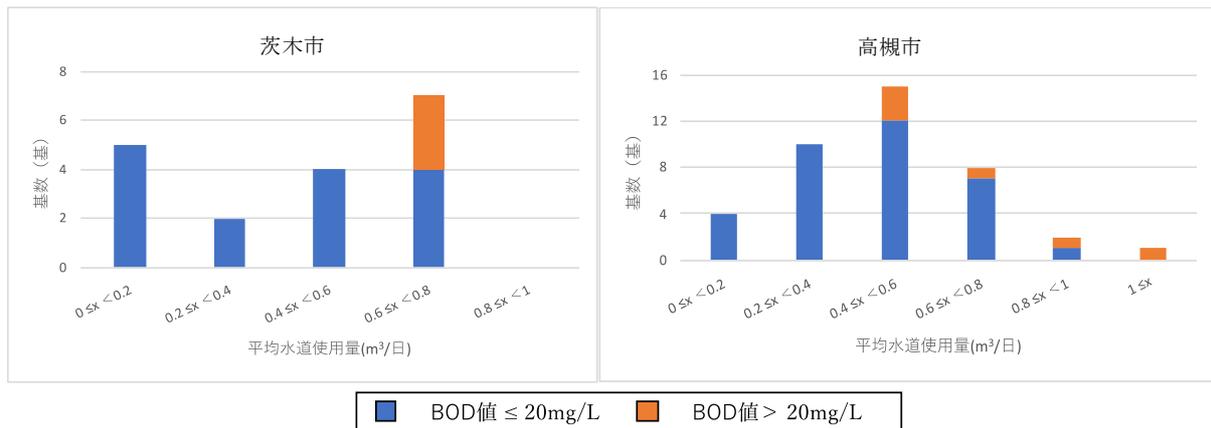


図5. 茨木市および高槻市の水道使用量分布 (左図 茨木市 右図 高槻市)

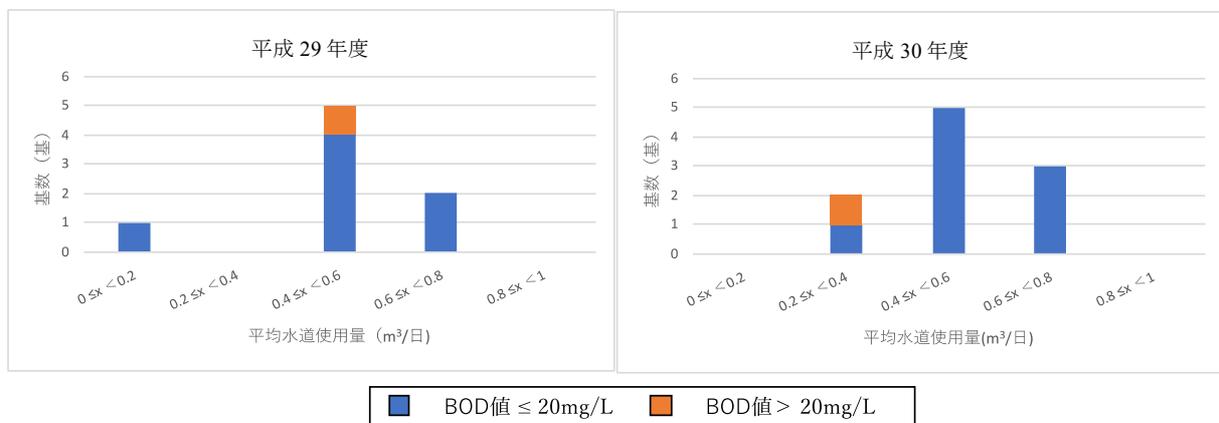


図6. 大阪府調査の水道使用量分布 (左図 平成29年度 右図 平成30年度)

BODの超過割合は茨木市では17% (3/18)、高槻市は15% (6/30) となり、大阪府における割合 (平成29年度: 12.5%、平成30年度: 10%) と比較するとやや高いが、BOD値は高槻市の1施設 (BOD: 51 mg/L) を除き、問題ない程度であった。

まとめ

大阪府において人槽緩和基準により設置された浄化槽について、平成29および30年に計11基の使用状況や処理水質に関する実態調査を実施した。対象浄化槽において、調査時の人員および水道使用量は、緩和基準を十分に満たしており、処理水質も概ね適正值であった。さらに水道使用量については、緩和基準1 m³/日以下を大きく下回る0.5 m³/日以下であった浄化槽が過半数であった。運転状況については、循環比の推奨値の最大値に対する割合が、平成29年度

調査時は、1.3~11.6と大きくずれている浄化槽が多く、保守点検において調整が必要と考えられた。一方、平成30年度調査時では1.1~3.7とかなり改善され、推奨値をやや上回っている程度で、適切に維持管理されていた。

法定検査との比較においては、本調査のBOD値は府域の家庭用小型合併浄化槽のBODの75%値(18 mg/L)に2基 (平成29年度1基、平成30年度1基) を除いて収まっていた。またその2基の値は放流水の水質の技術上の基準である20 mg/Lをやや上回っている程度であり、問題ないと評価した。

大阪府と適用条件の異なる茨木市および高槻市の2市と大阪府の比較を、法定検査結果、実使用人数および水道使用量を用いて行った。法定検査結果から、2市においても大阪府と同様、人槽緩和により放流水質に影響はでていないと考えられた。

また2市においては、大阪府における適用条

件である「実居住人員及び予定居住人員が3人以下の世帯であること」がないが、実使用人数および水道使用量については、大阪府の調査と大きな違いは見られなかった。

今回の調査はごく一部の型式に限られており、数も計11基と少ないことから詳細な統計処理はできないが、現在のところ、人槽緩和により放流水質に影響はでていないと考えられた。また適用条件の異なる2市との比較により、大阪府における人槽緩和適用基準に大きな問題点は認められなかった。

謝 辞

本研究は「ただし書の運用による人槽緩和規定の事後検証調査」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一般社団法人大阪府環境水質指導協会、柏原市上下水道部下水道工務課、和泉市上下水道部下水道整備課、大阪府藤井寺保健所、大阪府八尾保健所（現八尾市保健所）、大阪府和泉保健所、茨木市建設部下水道施設課および高槻市都市創造部下水道河川企画課の関係者各位に感謝いたします。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない

文 献

- 1) 平成29年国民生活基礎調査の概況
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa17/dl/10.pdf>
- 2) 大阪府浄化槽行政連絡協議会
http://www.pref.osaka.lg.jp/kenshi_shinsa/setsu_bi_pssa/jourenkyo.html
- 3) 浄化槽法(昭和58年5月18日法律第43号[最終改正 平成26年6月13日法律第69号])
- 4) 東京都水道局「くらしと水道」
<https://www.waterworks.metro.tokyo.jp/kurashi/shiyou/jouzu.html>

「WEB サイトの内容は2019年4月9日に確認した」

表 3. 認可時および調査時の使用条件

NO.	1	2	3	4	5	6	7	8* ²	9* ³	10* ³	11* ³	
型式	XE	XE	XC	XE	CEN	CEN	CEN	CEN	XE	XE	XC	
使用開始日	H28.2	H28.2	H28.3	H29.1	H27.11	H28.3	H28.3	H28.3	H29.9	H30.1	H30.1	
認可時	予定人員(人)	2	3	2	3	3	2	2	1	1	2	2
	予測水道使用量 (m ³ /日)	0.49	0.60	0.72	0.92	0.67	0.45	0.82	0.17	0.72	0.70	0.64
調査時 (H29)	調査日	10/18	10/18	10/18	10/18	10/6	10/6	10/6	10/6			
	保守点検日	9/5	9/5	9/5	9/9	10/3	7/21	7/21	7/13	—	—	—
	人員* ¹ (人)	2(1)	2(0)	2(2)	3(1)	3(2)	2(0)	2(2)	1(1)	—	—	—
	調査時水道使用量 (6ヶ月平均) (m ³ /日)	0.46	0.39	0.61	0.54	0.39	0.44	0.74	0.14	—	—	—
調査時 (H30)	調査日	10/17	10/17	10/17	10/17	10/26	10/26	10/26		10/17	10/17	10/17
	保守点検日	9/12	9/12	9/12	9/17	7/31	10/18	10/18	—	10/4	10/15	8/2
	人員* ¹ (人)	2(1)	2(0)	2(2)	3(1)	3(2)	2(1)	2(2)	—	2(1)	2(0)	2(2)
	調査時水道使用量 (6ヶ月平均) (m ³ /日)	0.53	0.38	0.58	0.56	0.43	0.43	0.67	—	0.34	0.68	0.56

*1 () 内は日中在宅人数

*2 引っ越しのため H30 年度は実施せず

*3 H29 年度に設置

表 4. 運転状況

	NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	型式	XE	XE	XC	XE	CEN	CEN	CEN	CEN	XE	XE	XC
H29	使用開始あるいは清掃からの経過月数	9	9	8	9	11	5	5	5	—	—	—
	水温(°C)	22.7	22.4	21.8	19.6	24.2	23.2	23.8	—	—	—	
	DO(mg/L)*1	5.8	5.8	6.3	4.7	6.8	6.8	4.8	8.3	—	—	—
	pH	7.2	6.9	7.1	7.4	7.4	7.7	7.3	—	—	—	
	水道使用量(m ³ /day)	0.46	0.39	0.61	0.54	0.39	0.44	0.74	0.14	—	—	—
	循環水量(L/min)	—*2	—*2	11.0	2.8	2.1	16.2	5.4	6.8	—	—	—
	循環比*5	—*3	—*3	26.0	7.4	7.9	52.9	10.5	69.6	—	—	—
	循環比の推奨値の最大値に対する比	—*4	—*4	5.2	1.9	1.3	8.8	1.8	11.6			
H30	使用開始あるいは清掃からの経過月数	10	10	8	8	11	5	5	—	1	10	3
	水温(°C)	23.1	23.5	23.1	21.6	23.3	22.2	21.4	—	23.3	21.4	22.2
	DO(mg/L)*1	5.1	5.7	7.5	6.0	6.0	8.0	6.0	—	7.6	6.8	5.8
	pH	7.4	7.5	7.4	6.9	7.2	7.6	7.3	—	6.9	6.8	6.8
	水道使用量(m ³ /day)	0.53	0.38	0.58	0.56	0.43	0.43	0.67	—	0.34	0.68	0.56
	循環水量(L/min)	1.6	—*2	1.9	—*2	4.6	6.6	5.0	—	1.4	—*2	—*2
	循環比*5	4.2	—*3	4.6	—*3	15.4	22.2	10.8	—	5.8	—*3	—*3
	循環比の推奨値の最大値に対する比	1.1	—*4	1.2	—*4	2.6	3.7	1.8	—	1.5	—*4	—*4

*1 担体流動室(XE, XC)、接触ろ床槽(CEN)

*2,3,4 測定不能および計算不能

*5 循環比＝循環水量/流入水量

循環比推奨値：3～4(XE)、4～5(XC)、4～6(CEN)

表 5. 2次処理水の水質検査結果

	NO.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	型式		XE	XE	XC	XE	CEN	CEN	CEN	CEN	XE	XE	XC
H29	透視度	度	42.5	30.0	13.5	16.0	32.5	27.5	> 50	31.0			
	SS	mg/L	6	9	28	23	7	11	3	10			
	COD	mg/L	16.2	21.2	24.8	33.9	16.4	26.0	10.2	15.6			
	BOD	mg/L	6.5	12	5.7	28	8.2	18	4.1	12			
	ATU-BOD	mg/L	5.5	9.2	4.5	22	5.7	12	3.9	7.4			
	BOD/COD		0.40	0.57	0.23	0.83	0.50	0.69	0.40	0.77			
	NH ₄ -N	mg/L	1.9	2.4	0.2	9.8	0.4	1.5	< 0.1	0.6			
	NO ₂ -N	mg/L	0.27	0.56	0.10	0.28	0.11	0.96	0.07	0.45			
	NO ₃ -N	mg/L	0.94	3.98	1.89	0.48	3.50	0.65	5.21	10.1			
	T-N	mg/L	3.70	9.42	5.28	14.4	6.18	6.65	7.03	14.6			
	T-P	mg/L	1.99	3.57	3.33	1.53	3.87	1.61	2.38	1.32			
	遊離残留塩素 ^{*1}	mg/L	> 2.0	1.6	< 0.05	0.4	> 2.0	1.6	< 0.05	< 0.05			
	総残留塩素 ^{*1}	mg/L	> 2.0	> 2.0	0.3	> 2.0	> 2.0	> 2.0	< 0.05	0.1			
H30	透視度	度	18.0	17.0	> 50	> 50	40.5	23.5	> 50		11.5	38.0	39.0
	SS	mg/L	17	16	6	6	5	12	<1		23	7	2
	COD	mg/L	23.5	30.7	5.3	18.6	20.2	25.1	8.3		41.3	8.7	10.1
	BOD	mg/L	18	15	3.7	6.4	5.3	15	2.9		25	6.9	8.1
	ATU-BOD	mg/L	15	13	3.4	4.8	5.0	12	2.7		25	5.2	2.9
	BOD/COD		0.77	0.49	0.70	0.34	0.26	0.8	0.35		0.61	0.79	0.80
	NH ₄ -N	mg/L	1.2	34.6	<0.1	3.2	0.5	0.4	0.2		0.3	1.4	2.6
	NO ₂ -N	mg/L	0.25	0.19	0.06	0.34	0.08	0.10	0.03		<0.04	0.13	0.23
	NO ₃ -N	mg/L	2.08	0.11	6.01	8.23	1.38	0.39	3.26		0.53	3.78	5.16
	T-N	mg/L	5.25	39.6	7.43	14.6	4.25	4.15	4.53		6.20	7.33	9.98
	T-P	mg/L	1.57	5.46	3.15	3.19	3.91	1.22	3.20		1.70	1.72	3.25
	遊離残留塩素 ^{*1}	mg/L	0.3	0.6	<0.05	> 2.0	> 2.0	0.1	1.8		0.4	0.6	<0.05
	総残留塩素 ^{*1}	mg/L	> 2.0	1.3	0.6	> 2.0	> 2.0	0.5	> 2.0		> 2.0	> 2.0	0.05

*1 放流水

表 6. 1次および2次処理水水質検査結果比較

	NO.		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	処理水		1次	2次																				
H29	透視度	度	21	43	21	30	14	14	13	16	25	33	27	28	>50	>50	31	31	—	—	—	—	—	—
	SS	mg/L	16	6	13	9	29	28	29	23	10	7	11	11	5	3	11	10	—	—	—	—	—	—
	COD	mg/L	27.0	16.2	27.3	21.2	25.2	24.8	40.8	33.9	19.2	16.4	25.8	26.0	16.4	10.2	15.2	15.6	—	—	—	—	—	—
	BOD	mg/L	25	6.5	19	12	6.7	5.7	31	28	24	8.2	13	18	15	4.1	12	12	—	—	—	—	—	—
	T-N	mg/L	9.23	3.70	14.4	9.42	5.18	5.28	14.3	14.4	7.79	6.18	6.46	6.65	7.51	7.03	14.0	14.6	—	—	—	—	—	—
H30	透視度	度	10	18	15	17	>50	>50	16	>50	20	41	23	24	>50	>50	—	—	9	12	22	38	25	39
	SS	mg/L	30	17	25	16	3	6	16	6	11	5	13	12	3	<1	—	—	30	23	9	7	9	2
	COD	mg/L	32.9	23.5	32.2	30.7	7.1	5.3	27.9	18.6	26.6	20.2	25.9	25.1	12.0	8.3	—	—	51.3	41.3	12.5	8.7	13.6	10.1
	BOD ¹	mg/L	—	18	—	15	—	3.7	—	6.4	—	5.3	—	15	—	2.9	—	—	—	25	—	6.9	—	8.1
	T-N	mg/L	7.43	5.25	40.7	39.6	6.29	7.43	18.3	14.6	9.22	4.25	4.06	4.15	4.53	4.53	—	—	6.76	6.20	8.09	7.33	10.6	9.98

*1 平成30年度は2次処理水のみ測定

Verification survey of Johkasou after implementation of new standards

Fumie ADACHI^a, Jin YOSHIDA^a, Ryo TAKATSUKA^b, Ayaka NAGAO^b, Akinori MITSUDA^c
and Makoto TSUCHIYA^d

Japan is facing with a declining population. Johkasou, a household wastewater treatment tank, is the system which can purify wastewater in the areas where sewage system is undeveloped. However, conversion of the treatment system located in individual houses from pit toilet or old-type deemed Johkasou, which treat only toilet wastewater is not in progress as expected. Osaka prefectural government decided to ease the requirements for Johkasou to admit installation of a smaller Johkasou for a smaller family. To verify influence by the modification of standards for Johkasou, 18 Johkasou, which were installed according to modified standards in Osaka, were investigated for their usage conditions and quality of discharging water.

Key words: Johkasou, Waste water treatment, BOD

a Osaka Institute of Public Health, Division of Hygienic Chemistry, Environmental Health Section

b Osaka Prefectural Government, Department of Public Health and Medical Affairs

c Osaka Prefectural Government, Department of Environment, Agriculture, Forestry and Fisheries

d Hirakata city Public Health Center

大阪府における環境および食品中放射能調査（平成 30 年度報告）

肥塚利江, 大山正幸, 山口進康

平成 30 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。

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（旧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 (^{134}Cs)、セシウム 137 (^{137}Cs)、ヨウ素 131 (^{131}I)、カリウム 40 (^{40}K) 等] を行った。

また、モニタリングポストに関しては、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平成 24 年度より増設された 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、平成 31 年 2 月まで毎月第 2 週の水曜日にサーベイメータによる地上 1 m の高さにおける空間放射線量率調査を行った。

本報告では、平成 30 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。

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 30 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。なお、定時降水、大気浮遊じん、降下物の採取用具およびモニタリングポスト（大阪市）に関しては、平成 30 年 6 月 18 日に起こった大阪府北部地震の影響で当所観測室の使用が困難となったため、それぞれ表 1 に示す場所に移設を行っている。

1. 全ベータ放射能測定

(1) 降水（雨水）試料

当所（大阪市東成区）屋上（10 月まで：観測室屋上・地上約 20 m、11 月以降：本館南側屋上・地上約 15 m）に設置したデポジットゲージ

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 当所観測室屋上(～10月) 当所本館南側屋上(11月～)	降雨毎	77
ガンマ線核種分析	大気浮遊じん		大阪市東成区 当所観測室屋上(～10月) 当所本館北側駐車場(11月～)	3ヶ月毎	4
	降下物	雨水・ちり	大阪市東成区 当所観測室屋上(～10月) 当所本館南側屋上(11月～)	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30年7月) 年1回(平成30年6月)	1 1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(平成30年7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(平成30年7月)	1
	土壌	0～5cm 5～20cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成30年7月)	1
			大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成30年7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30年6月)	1
		キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成30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	年1回(平成30年8月)	1	
		(公財) 日本分析センターで調製	年1回(平成30年8月)	1	
		(公財) 日本分析センターで調製	年1回(平成30年8月)	5	
空間線量率	モニタリングポスト	大阪市東成区 当所観測室屋上(～10月) 当所本館北側駐車場(11月～)	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(～平成31年2月)	11

(表面積 1000 cm²) で雨水を集めた。毎朝 9 時 30 分に採取し、100 mL (1 mm) 以上の降水があった場合には 100 mL を測定試料とした。

(2) 測定方法

蒸発皿に試料 100 mL とヨウ素担体 (1 mg I/mL) 1 mL、0.1 mol/L 硝酸銀 1 mL および 10%硝酸 1 mL を加えて加熱濃縮させた。濃縮物を直径 25 mm 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 (日立製作所製 LBC450) 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、35.3 dps) 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

(1) 測定試料

① 大気浮遊じん: 当所観測室屋上 (10 月まで: 地上約 20 m) および当所本館北側駐車場 (11 月以降) 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 10000 m³) をカッターで円形 (直径 50 mm) 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): 当所屋上 (10 月まで: 観測室屋上・地上約 20 m、11 月以降: 本館南側屋上・地上約 15 m) に設置した水盤 (表面積 5000 cm²) 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) は大阪広域水道企業団 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 100 L 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: 野菜類 (タマネギおよびキャベツ) の食用部約 4 kg を 65°C 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uffle炉 (ADVANTEC 社製、FUW263PA) で 450℃、24 時間灰化した。それぞれの灰試料は 0.35 mm 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：海水は 2L をマリネリピーカー (2 L 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、2 mm メッシュのふるいを通して得られた乾燥細土約 100 g 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) をマリネリピーカー (2 L 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) 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、当所に設置したモニタリングポスト (10 月 22 日まで：地上約 20 m、10 月 23 日以降：地上 1 m) および茨木市、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 1 m) 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 1 m 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 30 nGy/h は、加えていない。なお、当所屋上に設置されていたモニタリングポストが地上 1 m に移設されたため、サーベイメータによる測定値の原子力規制庁への報告の義務がなくなったため平成 31 年 2 月をもって本測定は終了した。

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、77 試料中 23 例から検出されたが、異常値は検出されなかった。

2. 核種分析

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

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	月間降水量 MBq/km ²
平成30年 4月	134	4 (1)	ND~0.31	4.5
平成30年 5月	207	8 (2)	ND~0.30	12.6
平成30年 6月	170	10 (4)	ND~0.45	6.4
平成30年 7月	329	7 (2)	ND~1.63	2.1
平成30年 8月	38	3 (1)	ND~0.65	0.6
平成30年 9月	259	11 (1)	ND~0.27	0.6
平成30年 10月	107	6 (1)	ND~0.31	2.2
平成30年 11月	27	5 (2)	ND~0.79	2.5
平成30年 12月	73	5 (1)	ND~0.32	7.1
平成31年 1月	7	3 (3)	0.43~0.79	3.7
平成31年 2月	54	7 (2)	ND~0.46	2.9
平成31年 3月	73	8 (3)	ND~1.50	11.7
平成30年度	1478	77 (23)	ND~1.63	56.9
過去3年間の値				
平成27年度 ¹⁾	1584	95 (8)	ND~1.27	10.3
平成28年度 ²⁾	1257	83 (22)	ND~0.75	67.9
平成29年度 ³⁾	1380	75 (33)	ND~1.46	147.5

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1月7日~14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9月10日~16日まで休止。

3):北朝鮮核実験に伴うモニタリング強化のため、平成29年9月3日~12日まで休止。

(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、上水蛇口水試料から微量 (0.66 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、蛇口水が平成2年度から検出されており、そのレベルも過去の値 (ND~1.4 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ると推定される。

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 : 300 Bq/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ことが認められた。

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。

表4-1 に示す大阪市の空間放射線量率値の1時間平均値に基づく一日の変動は、昨年度までと同じ位置 (地上20 m) に設置されていた10月22日までは40~65 nGy/h の範囲で、過去3年間の結果と同程度であった。また、地上1 mに移設した10月23日以降は、72~99 nGy/h の範囲であったが、当所中庭 (地上1 m) で測定したサーベイメータによる空間線量率の値 (表5) および過去に同地点で測定していた値 (平成8年度~20年度 : 77~108 nGy/h) と同程度であった。

また、表4-2 から表4-6 に示したその他の地上1 m に設置されている5ヶ所のモニタリングポストにおいても、それぞれ過去3年間の値の範囲内であった。しかし、1時間平均値に現れない範囲であるが、5ヶ所中1ヶ所のモニタリングポストにおいて7月23日、25日、26日、27日に瞬間的に高警報設定値 (150 nGy/h) を超える空間放射線量率の上昇を観測した。図1に7月23日における瞬時上昇観測時の空間放射線量率 (nGy/h) の1分値の変化を示す。

7月23日は、8時24分、12時55分、18時26分の3回、200 nGy/h を超える高値を観測した後、すみやかに平常値に戻っていた。他の3日間においても8時30分前後、18時前~18時30分に1回ずつ、12時30分~13時前に0~2回、7月23日と同様に1~2分のみの高値を観測した後、すみやかに平常値に戻る現象が起きていた。また、警報設定値は超えないが100 nGy/h を超える値を1分のみ観測する現象が7月30日から8月3日および8月6日の同様な時間帯に散見された。

空間放射線量率の上昇の原因となるものとしては、降雨によるラドン娘核種の降下 ⁷⁾等の自然現象の他、非破壊検査によるX線 ⁸⁾、胃の集団検診等によるレントゲン車からのX線 ⁹⁾、また、放射性医薬品投与患者からの放射線 ^{10,11)}などが知られている。今回の場合、線量率上昇時に降雨がなかったこと ¹²⁾、上昇が瞬間的 (1~2分) である事、同様な時間帯に数日間にわたって同様な瞬間的上昇が観測されることから、この空間放射線量率の瞬間的上昇は、何らかの放射性医薬品を投与された患者がモニタリングポストの近傍を通り過ぎることに起因するので

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30年 4月～6月	H30.4.3 ～H30.6.22	mBq/m ³	ND	ND	ND	0.13±0.035
7月～9月	H30.7.3 ～H30.9.19	〃	ND	ND	ND	ND
10月～12月	H30.10.2 ～H30.12.19	〃	ND	ND	ND	0.11±0.033
平成31年 1月～3月	H31.1.7 ～H31.3.19	〃	ND	ND	ND	0.14±0.036
平成30年度		mBq/m ³	ND	ND	ND	ND～0.14
過去3年間の値		mBq/m ³	ND	ND	ND	ND～0.21
降下物						
平成30年 4月	H30.3.29 ～H30.4.27	MBq/km ²	ND	ND	ND	1.1±0.21
5月	H30.4.27 ～H30.6.1	〃	ND	ND	ND	0.63±0.18
6月	H30.6.1 ～H30.7.2	〃	ND	ND	ND	0.76±0.18
7月	H30.7.2 ～H30.7.31	〃	ND	ND	ND	0.70±0.19
8月	H30.7.31 ～H30.8.31	〃	ND	ND	ND	0.81±0.18
9月	H30.8.31 ～H30.9.28	〃	ND	ND	ND	ND
10月	H30.9.28 ～H30.11.2	〃	ND	ND	ND	ND
11月	H30.11.5 ～H30.11.30	〃	ND	ND	ND	ND
12月	H30.11.30 ～H31.1.4	〃	ND	ND	ND	ND
平成31年 1月	H31.1.4 ～H31.2.1	〃	ND	ND	ND	0.72±0.18
2月	H31.2.1 ～H31.3.1	〃	ND	ND	ND	0.61±0.19
3月	H31.3.1 ～H31.3.29	〃	ND	ND	ND	ND
平成30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	H30.7.17	mBq/L	ND	ND	ND	62±2.3
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	0.65～3.4	64～83
上水・蛇口水	H30.6.7	mBq/L	ND	ND	0.66±0.093	80±2.6
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND～1.4	78～90
海水	H30.7.17	Bq/L	ND	ND	ND	3.9±0.34
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	2.9～6.0
海底土	H30.7.17	Bq/kg dry	ND	1.8±0.23	ND	620±11
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	2.0～2.6	ND	640～670
土壌	H30.7.30	Bq/kg dry	ND	1.3±0.23	ND	660±10
0～5cm層		(MBq/km ²)	(ND)	(73±13)	(ND)	(38000±600)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	1.9～2.0	ND	660～700
		(MBq/km ²)	(ND)	(90～110)	(ND)	(33000～37000)
土壌	H30.7.30	Bq/kg dry	ND	0.8±0.19	ND	710±11
5～20cm層		(MBq/km ²)	(ND)	(120±28)	(ND)	(110000±1600)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	2.8～3.4	ND	680～680
		(MBq/km ²)	(ND)	(380～500)	(ND)	(91000～110000)
農産物 タマネギ	H30.6.15	Bq/kg生	ND	ND	ND	44±0.33
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	46～51
農産物 キャベツ	H30.12.17	Bq/kg生	ND	ND	ND	64±0.45
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	58～70

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 大阪健康安全基盤研究所:地上20 m(～10/22)
地上1 m(10/26～))

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30年	4月	30	65	40	42
	5月	31	61	40	42
	6月	30	53	40	42
	7月	31	62	40	42
	8月	31	46	40	41
	9月	30	53	40	42
	10月(移設前)	22	45	41	42
	10月(移設後)	9	86	75	77
	11月	30	86	73	76
	12月	31	95	75	76
平成31年	1月	31	99	75	76
	2月	28	89	72	76
	3月	31	93	74	76
平成30年度	移設前(地上20m)	205	65	40	42
	移設後(地上1m)	160	99	72	76
過去3年間の値					
	平成27年度	366	65	40	42
	平成28年度	365	82	39	42
	平成29年度	365	67	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1 m)

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30年	4月	30	81	54	56	
	5月	31	86	53	57	
	6月	30	72	53	56	
	7月	31	81	52	56	
	8月	31	61	54	57	
	9月	30	73	53	55	
	10月	31	67	54	57	
	11月	30	67	56	58	
	12月	31	76	55	57	
	平成31年	1月	31	73	55	57
		2月	28	69	54	56
		3月	31	74	54	56
平成30年度		365	86	52	57	
過去3年間の値						
	平成27年度	366	91	51	56	
	平成28年度	365	92	52	56	
	平成29年度	365	85	52	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1 m)

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30年	4月	30	98	69	71	
	5月	31	95	69	71	
	6月	30	84	69	71	
	7月	31	92	68	71	
	8月	31	75	69	71	
	9月	30	81	69	71	
	10月	31	78	69	71	
	11月	30	81	69	71	
	12月	31	92	69	71	
	平成31年	1月	31	91	69	71
		2月	28	83	68	70
		3月	31	89	68	70
平成30年度		365	98	68	71	
過去3年間の値						
	平成27年度	366	111	70	72	
	平成28年度	365	117	69	72	
	平成29年度	365	95	69	71	

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1 m)

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30年	4月	30	108	75	78	
	5月	31	102	75	78	
	6月	30	91	74	77	
	7月	31	104	72	76	
	8月	31	89	74	77	
	9月	30	88	72	75	
	10月	31	85	73	76	
	11月	30	89	74	77	
	12月	31	103	74	77	
	平成31年	1月	31	104	75	78
		2月	28	92	75	77
		3月	31	89	74	77
平成30年度		365	108	72	77	
過去3年間の値						
	平成27年度	366	113	74	78	
	平成28年度	365	124	74	78	
	平成29年度	365	103	75	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1 m)

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30年	4月	30	87	61	62	
	5月	31	79	61	63	
	6月	30	74	61	62	
	7月	31	80	60	62	
	8月	31	64	61	62	
	9月	30	71	60	62	
	10月	31	67	61	62	
	11月	30	71	61	62	
	12月	31	76	61	62	
	平成31年	1月	31	90	61	63
		2月	28	79	61	62
		3月	31	84	61	62
平成30年度		365	90	60	62	
過去3年間の値						
	平成27年度	366	86	60	63	
	平成28年度	365	97	61	63	
	平成29年度	365	82	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1 m)

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30年	4月	30	91	49	51	
	5月	31	75	49	52	
	6月	30	78	49	51	
	7月	31	72	48	51	
	8月	31	56	49	51	
	9月	30	64	48	51	
	10月	31	77	49	51	
	11月	30	65	50	52	
	12月	31	76	50	52	
	平成31年	1月	31	87	50	52
		2月	28	77	49	51
		3月	31	72	49	51
平成30年度		365	91	48	51	
過去3年間の値						
	平成27年度	366	85	48	51	
	平成28年度	365	133	48	51	
	平成29年度	365	90	49	52	

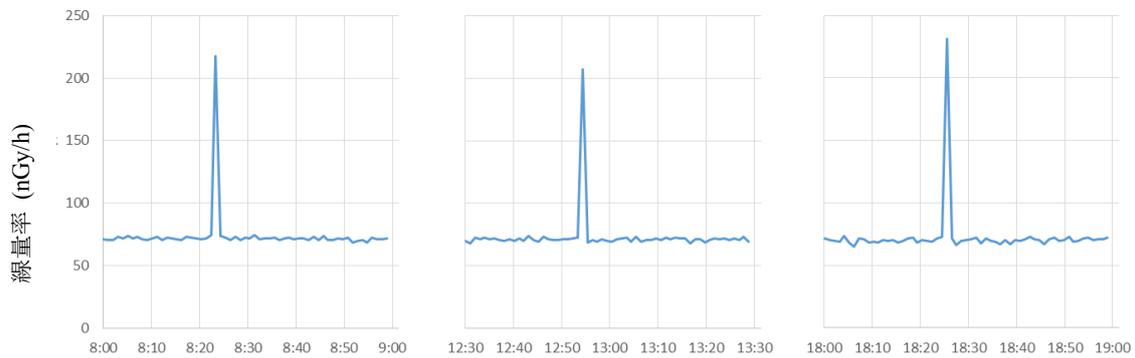


図1 高値観測時の空間線量率（1分値）の変化（2018年7月23日）

はないかと考え、検討を行った。

図2に7月23日の瞬間的高値を観測した8時24分を含む線量率上昇時の10分間（8:20～8:30）および平常時の10分間（8:00～8:10）の γ 線スペクトルを示す。線量率上昇時の γ 線スペクトルでは、平常時に比べて370 keV付近に明らかなピークが認められ、それより低いエネルギーにコンプトン散乱とみられる上昇がみられたが、それ以外のエネルギー領域では、平常時と同様なエネルギー分布を示した。他の全ての線量上昇時の γ 線スペクトルにおいても同様な結果であった。

さらに今回、7月23日から8月3日までの長期間、瞬間的な線量率の上昇が観測されたので、これらの値から半減期の算出を行った。図3に7月23日から8月3日のピーク観測時の計数率（ s^{-1} ）の平常値からの上昇割合（ピーク時の値からピーク時の10～6分前と6～10分後の10分間の計数率の平均値を引き去った値の7/23 8:24の上昇分を1とした時の割合）の経時変化を示す。計数率の上昇割合は、 $y=1.08e^{-0.101x}$ に従って減衰しており、この式から半減期は、約6.8日と計算できた。

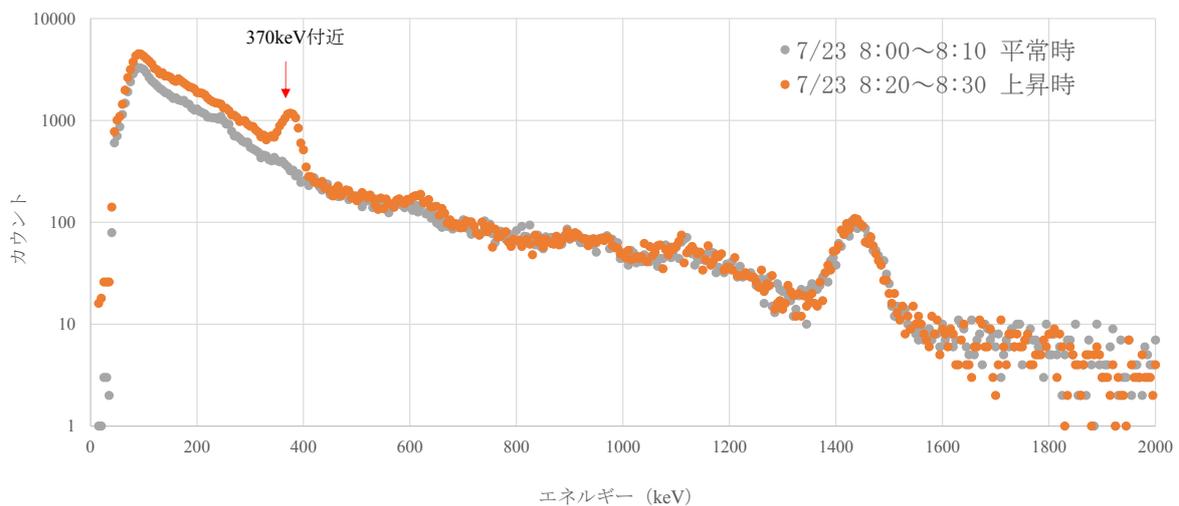


図2 7月23日の線量上昇時(8:20～8:30)および平常時(8:00～8:10)の γ 線スペクトル

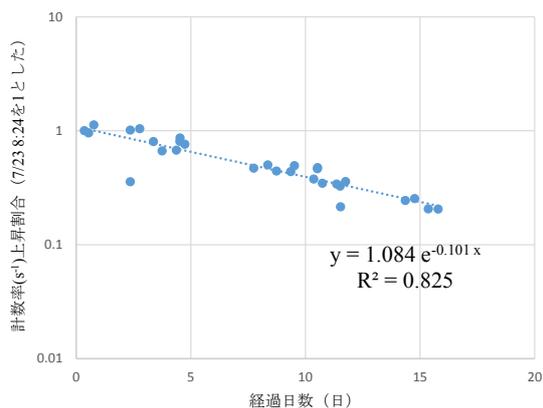


図3 ピーク観測時の計数率上昇割合の経時変化

370 keV 付近にピークが認められる核種としては、364 keV に主要ピーク（放出比：約 81%）を持つ ^{131}I が考えられる。 ^{131}I は、主に甲状腺疾患の治療に用いられており、物理的半減期は約 8 日であるが、体内に取り込まれたときの代謝や排泄を加味した実効半減期は約 7 日とされている¹³⁾。このことから、今回観測された瞬間的空間線量率の上昇は、 ^{131}I を含む放射性医薬品によるものと推定された。なお、 ^{131}I 等放射性医薬品を投与された患者の退出基準（放射線治療病室等からの退出・帰宅が認められる基準）は、公衆については 1 年間につき 1 ミリシーベルトとなるよう定められており¹⁴⁾、問題となるレベルではない。

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

表5 サーベイメータによる空間放射線量率
(地上 1 m、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30年	4月	1	75	
	5月	1	77	
	6月	1	83	
	7月	1	78	
	8月	1	76	
	9月	1	74	
	10月	1	73	
	11月	1	73	
	12月	1	73	
	平成31年	1月	1	72
		2月	1	79
		3月	0	—
平成30年度	11	72～83(平均:76)		
過去3年間の値				
平成27年度	12	63～81(平均:74)		
平成28年度	12	71～83(平均:76)		
平成29年度	12	72～83(平均:77)		

当所中庭で行ったサーベイメータによる空間放射線量率の測定結果を表 5 に示す。

当所中庭での値は、測定期間中 72～83 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。

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（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。なお、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、空間放射線量率では、地上 1 m に設置されたモニタリングポスト 1 か所において ^{131}I を含む放射性医薬品が原因と考えられる空間放射線量率の瞬間的上昇が数日にわたって観測されたが、その他は、平常値の範囲内であった。

福島第 1 原子力発電所事故によるモニタリング強化で実施されたサーベイメータによる空間放射線量率調査結果は、過去 3 年間の値の範囲内であった。

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は謝意を表します。

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、大阪健康安全基盤研究所が実施した平成 30 年度「環境放射能水準調査」の成果である。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

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 30 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>
- 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 —平成元年 4 月～平成 2 年 3 月—. *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 7 年 8 月 26 日改正, 平成 28 年 3 月 1 日部分改正)
- 7) 肥塚利江, 大山正幸, 木村明生. 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). *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2017; **1**: 101-110.
- 8) 肥塚利江, 渡辺功. 当所で観測された非破壊検査による空間放射線量率の異常値について. *大阪府立公衛研所報* 2003; **41**: 83-86.
- 9) 榊田武史, 小森正樹. 空間放射線の変動について. 平成 14 年放射能分析確認調査技術検討会資料. 2003; 195-199.
- 10) 藤波直人, 渡辺哲也, 筒井剛毅, 前田知穂. 環境放射能モニタによる放射性医薬品投与患者の検出. 平成 14 年放射能分析確認調査技術検討会資料. 2003; 203-206.
- 11) 富士栄聡子, 小西浩之, 鈴木俊也, 保坂三継. 放射性医薬品が原因と考えられる空間放射線量率の上昇事例. *東京健安研七年报* 2016; **67**: 269-276.
- 12) 気象庁. 過去の気象データ検索.
<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
- 13) 環境省. 放射線による健康影響等に関する統一的な基礎資料 (平成 30 年度版)
- 14) 厚生労働省医政局指導課長. 放射性医薬

品を投与された患者の退出基準について (医政指発第 1108 第 2 号、平成 22 年 11 月 8 日)
「WEB サイトの内容は 2019 年 6 月 7 日に確認した」

Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2018 Report)

Toshie HIZUKA, Masayuki OHYAMA and Nobuyasu YAMAGUCHI

We investigated the radioactivity of environment and foods in Osaka Prefecture by commission from Nuclear Regulatory Agency in 2018 program year. The gross beta radioactivity in precipitation and the gamma ray radiation nuclide in various food and environmental samples such as fallout, airborne dust, tap water, sea water, soil and sea sediment, were measured. In addition, 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.

Key words: environmental radioactivity, gross beta activity, radionuclide analysis, environmental gamma activity

The presence of colistin resistance gene *mcr-1* and -3 in ESBL producing *Escherichia coli* isolated from food in Ho Chi Minh City, Vietnam.

T. YAMAGUCHI^{a,b}, R. KAWAHARA^a,
K. HARADA^{b,c}, S. TERUYA^d, T. NAKAYAMA^e,
D. MOTOOKA^f, S. NAKAMURA^f, P. D.
NGUYEN^g, Y. KUMEDA^h, C. V. DANG^g,
K. HIRATA^b and Y. YAMAMOTO^b

FEMS Microbiology Letters, 365, 11, doi:

10.1093/femsle/fny100

(2018)

ベトナム・ホーチミンで 330 検体の食肉から ESBL 産生大腸菌を 342 株分離し、それらを用いてコリスチン感受性試験及びコリスチン耐性遺伝子 (*mcr*) のスクリーニングを実施した。その結果、およそ 24% (83/342) の ESBL 産生大腸菌がコリスチン耐性を有していた。そのうち、96% (80/83) のコリスチン耐性菌株は *mcr-1* を、4% (3/83) は *mcr-3* を保有していた。また *mcr-1* 保有株は鶏肉からの分離が多く、*mcr-3* 保有株は全て豚肉から分離された。*mcr-3* 保有大腸菌について、プラスミド解析を行った結果、既報と比較すると *mcr-3* を有するプラスミドのレプリコンタイプとは異なるが、*mcr-3* の近傍遺伝子配列については、中国で初めて報告された *mcr-3* 遺伝子配列と類似性が高いことが判明した。その一方で既報にはないインサーションシーケンス (IS) も見られ、*mcr-1* と同様に *mcr-3* は IS によって他の細菌種に挿入され拡散している可能性が考えられた。

Current prevention and control of health care-associated infections in long-term care facilities for the elderly in Japan.

N. KARIYA^a, N. SAKON^b, J. KOMANO^c,
K. TOMONO^d and H. ISO^a

J Infect Chemother, 24(5), 347-352 (2018)

doi: 10.1016/j.jiac.2017.12.004.

高齢者のための長期介護施設の入居者は、医療関連感染症に対して脆弱である。しかしながら、医療機関と比較して、高齢者のための長期介護施設は、感染制御および予防対策に遅れを取っている。わが国の高齢者介護施設における感染管理の現状を明らかにするために疫学的研究を行った。感染予防と管理の側面に関するアンケート調査は、SHEA / APIC ガイドラインに従って作成し、2016 年 11 月から 2017 年 1 月に大阪府の 617 の介護施設に配布した。回答率は 16.9%であった。医療関連感染症の集団発生率は 100 施設年あたり 23.4、医療関連感染症を有する入居者は 1000 居住日あたり 0.18 であった。インフルエンザと急性胃腸炎が最も頻繁に発生していた。複数の薬剤耐性菌保菌に対する積極的なサーベイランスは一般的ではなかった。すべての施設に感染管理マニュアルが用意され、感染管理専門家がいた。これらのデータは、SHEA / APIC ガイドラインの遵守率の向上と長期にわたる感染防止対策の推進に医師と看護師が積極的に貢献していたことを示唆する。高齢者介護施設における感染管理を改善するためには、特に経済的および社会的構造の観点から議論される必要がある。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 大阪大学大学院薬学研究科

c 大阪大学グローバルイニシアティブ・センター

d 大阪大学微生物研究所 分子細菌学分野

e 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

f 大阪大学微生物研究所附属遺伝情報実験センター

g 国立ホーチミン市衛生研究所

h 大阪府立大学微生物制御研究センター

ベトナム・ホーチミンの食品から分離した ESBL 産生大腸菌が保有する *mcr-1* および *-3* について

a 大阪大学医学系研究科公衆衛生学教室

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

c 名古屋医療センター統合診療部

d 大阪大学医学系研究科感染制御医学

高齢者施設における感染症の発生予防と制御に関する最近の動向

Foodborne Outbreaks Caused by Human Norovirus
GII.P17-GII.17-Contaminated Nori, Japan, 2017.

N.SAKON^a, K.SADAMASU^b, T.SHINKAI^b,
Y.HAMAJIMA^c, H.YOSHITOMI^d,
Y.MATSUSHIMA^e, R.TAKADA^a, F.TERASOMA^c,
A.NAKAMURA^d, J.KOMANO^f, K.NAGASAWA^g,
H.SHIMIZU^e, K.KATAYAMA^h and H. KIMURAⁱ

Emerg Infect Dis, 24(5), 920-923 (2018)
doi: 10.3201/eid2405.171733.

ノロウイルス GII.P17-GII.17 に起因する食中毒
7 事件が 2017 年に日本で発生した。患者は最終的
に 2,094 人となった。刻み海苔がすべての事例に
関与しており、刻み海苔からノロウイルスが検出
された。乾燥食品におけるノロウイルスの長期感
染性保持が示された。

大阪府において注目すべき感染症

左近直美^a, 倉田貴子^a, 川畑拓也^a, 小島洋子^a,
弓指孝博^a

バムサジャーナル, 30(3), 89-94, (2018)

大阪において注目される疾患は多々あげられ
るが、今回その中から 5 疾患（麻しん、風しん、
梅毒、E 型肝炎、ノロウイルス）について状況を
まとめた。

地方衛生研究所では感染症サーベイランスを
実施し、長期にわたる調査実施が行なわれてい
る。また、保健所と連携し、集団発生や輸入感
染症等の危機管理体制が構築されている。大阪府
では本稿で取り上げた以外に結核や耐性菌など多
くの感染症が問題となっている。私たちの業務は
長期データを活用した疫学解析およびその発信
や、迅速な検査体制による危機管理である。これ
らを通じて科学的根拠に基づく適切な情報発信
を心がけたい。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 東京都健康安全研究センター微生物部

c 和歌山県環境衛生研究センター

d 福岡県保健環境研究所

e 川崎市健康安全研究所

f 名古屋医療センター

g 千葉大学大学院医学研究院・医学部 小児科

h 北里大学北里研究所

i 群馬パース大学、国立感染症研究所感染症疫学セン
ター

日本で発生したノロウイルス GII.P17_GII.17 に汚染し
た海苔を原因とする食中毒

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

Recent topics in public health of infectious diseases in
Osaka.

糞便検体処理作業が簡易化された one-step
リアルタイム PCR 法による
ノロウイルスゲノム検出キットの性能評価

寺内謙太^a, 松本弘嵩^a, 山崎友実^a, 黒板敏弘^a,
曾我部敦^a, 荒川 琢^a, 左近直美^b

日本食品微生物学会誌, 35(4), 193-198(2018)
<https://doi.org/10.5803/jsfm.35.193>

ノロウイルスは急性胃腸炎を引き起こし、食中毒は世界的に深刻な問題となっている。ノロウイルスによる食品の汚染は、感染した食品取扱者が原因であることが多い。したがって、胃腸症状を呈する食品取扱者の管理は非常に慎重に取り扱わなければならない。ノロウイルス感染はしばしば無症候性であるので、食品を汚染するリスクを減らすために、すべての食品取扱者が感染について高感度な方法を用いて検査されることが強く勧められる。これまで、熱処理した糞便試料をテンプレートとしたワンステップリアルタイム PCR をベースとしたノロウイルスゲノム用核酸増幅検査キット（熱処理キット）が使用されてきた。本研究では、便検体に熱処理を必要としない新しいキットを評価した。熱処理法と同等の感度を得ることができた。評価した方法は熱処理が不要のため、迅速化および交差汚染のリスクが低くなる。これらの利点を考慮すると、新しいキットは、ノロウイルスを検出するためのより迅速で信頼性のあるノロウイルス検査法である。

a 東洋紡ライフサイエンス事業部

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

Evaluation of one-step real-time PCR kit employing
a quick fecal processing protocol for rapid detecting
the norovirus genome.

Human norovirus propagation in human induced
pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial
cells

S.SATO^a, K.HISAIE^b, S. KUROKAWA^c,
A. SUZUKI^d, N.SAKON^e, Y.UCHIDA^c, Y.YUKI^c,
and H. KIYONO^f

Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 7(3), 686-688
(2019)

doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.11.001.

ノロウイルスは世界中で感染性胃腸炎を引き起こし、小児や高齢者の罹患、死亡につながっている。適切な予防または治療戦略の欠如の最大の理由の1つは、ノロウイルスの培養方法が確立されていないことであったが、ヒト初代腸管上皮細胞（IEC）におけるノロウイルス複製システムが開発され、ノロウイルスワクチン開発のための新しい戦略を切り開いた。しかし、現在この技術はヒト組織細胞および胆汁補給を必要とする。胆汁には未確認の含有物質が含まれている。今回、ヒト人工多能性幹細胞（iPSC）から小腸型の腸上皮細胞を樹立することに成功し、よく分極した単層の腸管上皮細胞が確立された。この iPSC 由来腸管上皮細胞を用いたノロウイルスの培養を試み、胆汁非存在下でノロウイルス GII.3、GII.4、GII.6、GII.17 の培養に成功した。iPSC 由来の細胞を利用できることは、ヒト生検あるいは外科組織に比べ倫理的配慮が少なく済み、ワクチン候補の評価や臨床試験で産業上の応用に役立つツールとなる。

a 大阪大学微生物病研究所・BIKEN 粘膜免疫プロジェクト、東京大学医科学研究所

b 大阪大学微生物病研究所・BIKEN 粘膜免疫プロジェクト

c 東京大学医科学研究所国際粘膜免疫ワクチン開発研究センター

d 大阪大学微生物病研究所・BIKEN 粘膜免疫プロジェクト

e 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

f 東京大学医科学研究所国際粘膜免疫ワクチン開発研究センター、UC-サンディエゴ医科大学粘膜免疫・アレルギー・ワクチンセンター

iPSC 由来腸管上皮細胞を用いたノロウイルスの培養

Urinary β 2-microglobulin as an early marker of
infantile enterovirus and human parechovirus
infections.

J. AZUMA^a, T. YAMAMOTO^a, M. SAKURAI^a,
R. AMOU^a, C. YAMADA^a, K. HASHIMOTO^b,
S. KAJITA^c, K. YAMAMOTO^d, E. KIJIMA^a,
Y. MIZOGUCHI^a, K. NAKATA^e, T. SHIMOTSUJI^a
and K. OZONO^b.

Medicine (Baltimore), 97(43),

<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012930>,
2018

エンテロウイルス (EV) とヒトパレコウイルス (HPeV) は RNA ウイルスで、ピコルナウイルス科に属し頻りに小児に感染を引き起こす。これらの感染症は軽症から重症まで臨床症状が多岐にわたる。しかし、疾患の重症度の診断および予測のための初期の臨床マーカーは知られていない。本研究の目的は、乳児 EV と HPeV 感染症の早期発見と予後に対する尿中 β 2 - ミクログロブリン (β 2 MG) の臨床的有用性を検討することである。EV または HPeV-3 (EV/HPeV-3) の 15 人、RS ウイルス (RSV) の 22 人、および細菌感染の 24 人を含む、60 日齢未満の 108 人の満期産児を対象とした。EV/HPeV-3 を有する 15 人の患者のうち、6 人は重症であったため、静脈内免疫グロブリンで治療された。クレアチニンに対する尿中 β 2 MG 比 (β 2 MG / Cr) は、細菌感染群および RSV 感染群と比較して、EV/HPeV-3 群において有意に高かった (双方とも $P < 0.001$)。EV/HPeV-3 群では、1 日目または 2 日目に尿中 β 2 MG / Cr の平均値がピークとなった。初期感染における β 2 MG / Cr は、乳児エンテロウイルスおよび HPeV 感染の重症度の検出および予測のための有用な臨床マーカーであり得る。

a 箕面市立病院小児科

b 大阪大学大学院医学系研究科小児科

c 市立吹田市民病院小児科

d 星丘医療センター小児科

e 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

小児エンテロウイルスおよびヒトパレコウイルス感染の初期マーカーとしての尿中 β 2 - ミクログロブリン

早期より尿中 β 2 microglobulin が高値を示した
ヒトパレコウイルス 3 型感染症の 4 例

山田知絵子^a, 東 純史^a, 石見壮史^a,
新田統昭^a, 天羽竜子^a, 櫻井美帆子^a,
木島衣理^a, 中田恵子^b, 溝口好美^a, 下辻常介^a,
山本威久^a

小児感染免疫, 30(3) : 223-229(2018)

ヒトパレコウイルス 3 型 (human parechovirus -3 : HPeV3) 感染症は新生児あるいは早期乳児においてウイルス血症および中枢神経感染症により重症化し、致命的となりうる。そのため、早期診断および有効な治療法の確立が必要と考えられる。当院において経験した HPeV3 感染症の 4 例は日齢 6～日齢 43 の新生児、乳児であった。4 例のうち 3 例に免疫グロブリン大量療法 (IVIG) を施行し、残り 1 例には IVIG に加えてメチルプレドニゾロン静注パルス療法 (IVMP) を施行した。全例で良好な経過が得られ、後遺症なく退院した。また、発症早期から尿中 β 2MG 値が高値を示し、続いて血中フェリチン値が上昇する傾向を認めた。入院時の一般的な炎症マーカー (白血球数、CRP 値) および逸脱酵素 (AST、ALT、LDH、CK 値) は、正常範囲内であったことから、尿中 β 2MG 値の上昇が HPeV3 感染の早期臨床診断、および重症化予測の指標として有用である可能性が示唆された。

a 箕面市立病院小児科

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

Four cases of human parechovirus-3 infection: An evidence of highly elevated urinary β 2 microglobulin levels in the early onset periods

大阪府における急性弛緩性麻痺患者の検査状況と EV-D68 が検出された患者の症例報告

中田恵子^a, 本村和嗣^a, 生田和良^a, 小林和夫^a,
奥野良信^a

病原微生物検出情報 (IASR) , 40, 31-32(2019)

EV-D68 は下気道炎をはじめとする呼吸器症状の原因ウイルスとして知られているが、近年、急性弛緩性麻痺との関連が疑われている。検査を実施した3名のうち2名については届出対象年齢外であり、届出がなされていない。今回、我々は、大阪府保健所管内の医療機関で発生した3名の患者の情報とそのうち2名より検出された EV-D68 の近隣結合法による近縁系統樹解析を実施したので報告する。

近縁系統樹解析の結果、2名から得られた2株は、解析に用いた369塩基の配列が100%一致していた。また、2015年の国内流行株と同様に Clade B に分類されたが、bootstrap value が 974/1,000 の単系統群を形成し、過去の流行株とは異なる遺伝系統であることが示唆された。これは、2018年の株は、2015年とは異なる新たな遺伝的変異を獲得したものと考えられる。

EV-D68 と急性弛緩性麻痺の関係は現状ではまだ明確にはなっていないが、2015年に実施された全国調査により、関連性が疑われている。急性弛緩性麻痺が全数把握疾患に指定されたが、原因病原体の検索としては患者便からのポリオウイルス (PV) 分離を実施し、陰性であることを証明するのみである。この方法では、EV-D68 による急性弛緩性麻痺の発生頻度や流行を十分に把握することは困難である。また、検査についても大阪府で実施しているように、届出対象外となっても (i) 臨床症状や流行状況から判断して調査対象とすることや (または届出対象年齢を広げる)、さらに (ii) PV 分離同定のみならず様々な検査手法を用いて EV 検出を広く実施することが重要であると考えられた。PV 感染症が国内で存在しないわが国では、急性弛緩性麻痺の原因と特定のウイルス感染症との関連を証明するために、科学的知見の集積が必要であると考えられる。

a 大阪健康安全基盤研究所

Case reports of acute flaccid paralysis patient detected
EV-D68 in Osaka Prefecture

Rubella Virus Genotype 1E in Travelers Returning to
Japan from Indonesia, 2017

D. KANBAYASHI^a, T. KURATA^a, Y. NISHINO^b,
F. ORII^b, Y. TAKII^b, M. KINOSHITA^b,
T. OHARA^c, K. MOTOMURA^a
and T. YUMISASHI^a

Emerg Infect Dis, 24(9), 1763-65 (2018)
<https://doi.org/10.3201/eid2409.180621>

インドネシアは世界で風疹が流行している国の一つであり、近隣諸国の風疹流行や排除状態の維持に大きな影響を与えている。流行株についての情報の収集は世界各国が風疹排除を進める上で重要であるが、インドネシアではサーベイランス体制が十分構築されていない為、これまで殆ど明らかにされてこなかった。今回、風疹の輸入症例から検出された風疹ウイルスの遺伝子型を調査し、インドネシアでの流行株の特徴を解析した。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪府健康医療部保健医療室医療対策課

c 大阪府健康医療部池田保健所

インドネシア渡航者から検出された遺伝子型 1E の風疹ウイルス

Clinical Value of Enzyme Immunoassay that Detects Rubella-Specific Immunoglobulin M Immediately After Disease Onset

T. KURATA^a, K. UCHINO^b, C. HOTTA^c,
A. OGURA^c, T. MIYOSHI^b, T. TANAKA^b,
T. OGAWA^c, T. YUMISASHI^a, D. KANBAYASHI^a
and J. KOMANO^d

Microbiol Immunol, 63(1), 32-35 (2019)
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12664>

World Health Organization (WHO) の報告では、風疹特異的 IgM 抗体は発疹出現後 4~28 日の患者血清で陽性になるとされている。しかし、日本で 2012~2013 年におきた成人を中心とする風疹流行では、発疹出現後 4 日でも IgM 抗体の上昇が認められない事例が相次ぎ、臨床現場を混乱させた。過去の報告は風疹診断が核酸検査に基づいておらず、患者集団も小児が中心で、IgM 抗体の診断的意義については検討の余地がある。本研究では核酸検査で風疹と確定した成人症例の風疹 IgM 抗体の診断的価値に与える因子を解析した。発疹出現日を発症日とした場合、風疹特異的 IgM 抗体価は経時的に増加し、IgM 陽性症例の割合は発症当日~2 日目は 22.1~33.3%で推移したが、3 日目には 61.5%と有意に上昇し ($p<0.01$)、5 日目以降は 80.0%に達した。判定保留症例は発症後 2 日目に 15.7%で最大となった。風疹特異的 IgM 抗体検査の陽性率は発疹出現後 2 日間が最も難しく、核酸検査との併用が特に望ましいと考える。診断的価値が高まるのは発疹出現後 3 日目以降で、より確実に診断根拠とするためには 5 日目以降の検査が望ましい。従って、WHO の報告で IgM 抗体で風疹の診断が可能とされた発疹出現後 4 日目は、必ずしも IgM 抗体の上昇が見られない可能性があると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 堺市衛生研究所 c 千葉県衛生研究所

d 名古屋医療センター

成人における風疹 IgM 抗体価の診断的価値について

Human monoclonal antibodies against West Nile virus from Japanese encephalitis-vaccinated volunteers

T. OZAWA^a, H. MASAKI^b, T. TAKASAKI^c,
I.AOYAMA^d, T. YUMISASHI^d,
A. YAMANAKA^e, E. KONISHI^e,
Y. OHNUKI^a, A. MURAGUCHI^a and K. KISHI^a

Antiviral Research, 158, 58-65 (2018)
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.011>

フラビウイルス科フラビウイルス属日本脳炎ウイルス (JEV) 血清型群に属するウエストナイルウイルス (WNV) は、時に致死性の脳炎・髄膜炎を引き起こすヒト感染性ウイルスである。WNV 感染症に対するヒトを対象とした実用可能な治療薬やワクチンは未だ存在していないが近年、WNV 中和抗体投与による治療の可能性が示されるようになった。以前我々は、不活化 JEV ワクチン被接種者の一部に、WNV 交差反応性中和抗体が誘導されることを報告した。そこで我が国における WNV に対する抗体医薬開発を目指し、細胞チップ上で特異抗体産生細胞を迅速かつ網羅的にスクリーニング出来る ISAAC (ImmunoSpot Array Assay on a Chip) 法を用いることにより、JEV ワクチン被接種者かつ WNV 中和抗体陽性者の末梢単核球 (PBL) より WNV 特異抗体産生細胞を単離した。それらの抗体遺伝子を基として遺伝子組換え技術の手法により、WNV を中和する 3 種類の完全ヒト型モノクローナル抗体を日本で初めて樹立した。

a 富山大学大学院医学薬学研究部免疫学講座

b 近畿大学生物理工学部医工工学科

c 神奈川県衛生研究所

d 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

e 大阪大学微生物病研究所

日本脳炎ワクチン接種者より樹立したヒト型抗ウエストナイルウイルス抗体

大阪で捕獲されたアライグマと
マダニ媒介感染症

青山幾子

ペストコントロール,184,10-12(2018)

大阪府内におけるマダニ媒介性感染症の浸淫状況を調べるため、2011年から2017年に大阪府内で捕獲されたアライグマにおいて、日本紅斑熱リケッチアとSFTSウイルスに対する抗体保有調査を実施した。アライグマの抗体陽性率はそれぞれ6.9%と5.1%であった。大阪府を4ブロックに分け、ブロック別にみると日本紅斑熱リケッチアの抗体を保有しているアライグマは全てのブロックで見られたが、SFTSウイルス抗体保有アライグマは大阪府南部でのみ見られた。今回、大阪府内においても既に動物にはSFTSウイルスが浸淫している可能性が示唆されたことから、今後のSFTSに対するモニタリングの重要性が示唆された。

Genomic surveillance of *Neisseria gonorrhoeae* to investigate the distribution and evolution of antimicrobial resistance determinants and lineages

K. YAHARA^a, S. NAKAYAMA^b, K. SHIMUTA^b,
K. LEE^b, M. MORITA^b, T. KAWAHATA^c,
T. KUROKI^d, Y. WATANABE^d, H. OHYA^d,
M. YASUDA^e, T. DEGUCHI^e, X. DIDELOT^f and
M. OHNISHI^{a,b}

Microbial Genomics, 4(8) (2018)
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000205>

セフトリアキソンに対して高度耐性を有する最初の広範な薬剤耐性淋菌株が2009年に日本で同定されて以降、同様の耐性株は他に報告されていない。しかし、これまでのサーベイランスはゲノム配列決定によらなかった為、ゲノムレベルでの局所集団の構造や耐性決定基および系統の分布や進化についてはほとんど分っていない。そこで、最初にXDRセフトリアキソン耐性淋菌が分離された地域にて採取した204株に他の地域から追加した67株を加えた合計271株の全ゲノム配列データおよび抗菌薬感受性試験の結果を分析した。

その結果、新たなセフトリアキソン耐性株は見つからなかったが、セフトリアキソンとセフイキシムに感受性のあるシーケンスタイプ(ST)7363亜系統を発見するなど、我々の研究は耐性決定基の分布の詳細な図を提供し、世界中に広がる2つの主要な系統の進化を解き明かした。

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
Raccoon and tick-borne infections in Osaka

a 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター
b 国立感染症研究所細菌第一部
c 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
d 神奈川県衛生研究所微生物部
e 岐阜大学大学院医学系研究科泌尿器科学
f インペリアル・カレッジ・ロンドン
抗菌薬耐性決定基と系統の分布と進化を明らかにするための淋菌ゲノムサーベイランス

Comparative evaluation of the Geenius™ HIV 1/2
Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2
Western blots in the Japanese population

M. KONDO^a, K. SUDO^b, T. SANO^a,
T. KAWAHATA^c, I. ITODA^d, S. IWAMURO^e,
Y. YOSHIMURA^f, N. TACHIKAWA^f,
Y. KOJIMA^c, H. MORI^c, H. FUJIWARA^g,
N. HASEGAWA^g and S. KATO^b

PLoS ONE 13(10) (2018)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198924>

HIV 感染の早期の正確な診断は、治療と予防に不可欠である。現在、日本での HIV 感染の確認検査にはウェスタンブロット (WB) 法が用いられているが、感度の低さと HIV-1 抗体と HIV-2 抗体の交差反応性などの問題がある。これらの問題に対処するため、米国疾病対策予防センター (CDC) は、HIV 感染診断ガイドラインを改訂し、Geenius HIV-1/2 確認検査法のような HIV-1 および HIV-2 の抗体分類試験法を推奨した。そこで、我々は Geenius と HIV-1 と HIV-2 の WB 法の性能を比較し、日本の HIV 検査アルゴリズムにおいて Geenius が WB の適切な代替品であるかどうかを調べた。

その結果、HIV-1 および HIV-2 感染の確認および分類において、Geenius は魅力的な WB 法の代替法であることが明らかとなった。

-
- a 神奈川県衛生研究所微生物部
 - b 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室
 - c 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
 - d しらかば診療所
 - e 厚木市立病院
 - f 横浜市立市民病院感染科
 - g 慶應義塾大学病院感染制御部

日本人における Geenius HIV 1/2 確認検査法と HIV-1 及び HIV-2 ウェスタンブロット法の比較評価

Circulation of Distinct *Treponema pallidum* Strains
in Individuals with Heterosexual Orientation and
Men Who Have Sex with Men (MSM)

Y. KOJIMA^a, K. FURUBAYASHI^b,
T. KAWAHATA^a, H. MORI^a and J. KOMANO^c

Journal of Clinical Microbiology 57(1) (2019)

<https://doi.org/10.1128/JCM.01148-18>

梅毒の流行状況を調査する目的で、2013 年 9 月より 2017 年 8 月まで大阪府内の梅毒疑い症例患者から採取した病変部の滲出液から DNA を抽出し、梅毒トレポネーマ (TP) の遺伝子解析を行った。解析方法には、世界的に用いられている梅毒遺伝子の *arp*、*tprEGJ*、*tp0548* を指標に用いた Enhanced CDC -typing (ECDCT) 法と、*tp0136*、*tp0548*、23S rRNA の塩基配列を指標とした Sequencing-based Molecular Typing (SBMT) 法の両方を実施した。

その結果、SS14 系統は 31 例 (86.1%)、Nichols 系統は 1 例 (2.8%) と中国やアメリカでの報告と同様の比率であった。また、ECDCT 法では 25 例が遺伝子型 14d/f (男性 14 例、女性 11 例)、SBMT 法では遺伝子型 SSR8 が 26 例 (男性 16 例、女性 10 例) とそれぞれ最多であった。近年、世界的にマクロライド系抗生物質の耐性変異といわれている 23S rRNA の A2058G 変異が見つかっているが、今回 SS14 系統の 90.3% にこの変異が見つかった。Nichols 系統は症例が 1 例であるが耐性変異はなかった。

ECDCT 法と SBMT 法を合わせて解析した結果では、感染経路が異性間性的接触の検体では、14d/f-SSR8 の遺伝子型の TPA が 78.6% と多くを占めており、特に女性の検体の 90.9% がこの遺伝子型であった。一方、同性間性的接触の検体ではこの遺伝子型の TPA は 1 例も認められず、それ以外の多様な遺伝子型が検出された。

採取地域や検体数が限られた解析ではあるが、今回の結果では、先に同性間性的接触で流行した梅毒トレポネーマと、後から異性愛者の男女で流行した梅毒トレポネーマは、遺伝子型が異なることが観察され、この事は同性間で流行した梅毒トレポネーマが異性愛者の男女へ感染拡大した訳では無いことを示唆している。

-
- a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
 - b そねざき古林診療所
 - c 国立病院機構名古屋医療センター
- 異性愛者と MSM では循環する梅毒トレポネーマ株が異なっている

RPR 陰性の第 1 期梅毒

古林敬一^a, 小島洋子^b, 川畑拓也^b

日本性感染症学会誌 29(1), 141-142 (2018)

<https://doi.org/10.24775/jjsti.29.1.141>

性器の非典型的症状を来し、かつ、RPR が陰性だった第 1 期梅毒症例を 2 例経験したので報告する。

2017 年に来院した第 1 期梅毒 22 例のうち、RPR 陰性 (1.0RU 未満) だった症例は 8 例 (36%) あり、このような事例は以前に比べて増えつつある。さらに 8 例のうち 3 例は TPLA も陰性レベル (1.9TU, 9.9TU, 9.9TU) であり、定性検査のみを実施していたら「RPR 陰性・TP 抗体陰性だから非梅毒」と誤解してしまいそうな事例であった。保健所等で実施されている梅毒スクリーニング検査では、検査結果が本報告症例のような「RPR 陰性・TP 抗体陽性」の組み合わせのときには「陳旧性梅毒で心配ない」と指導されてしまう懸念がある。

検査結果が RPR 陰性・TP 抗体陽性の組み合わせでも活動性梅毒がありうることを保健指導従事者に周知する必要がある。

The role of flies in the maintenance of antimicrobial resistance in farm environments

A. FUKUDA^a, M. USUI^a, M. OKAMURA^b, D-L. HU^b and Y. TAMURA^a

Microb Drug Resist, 25(1), 127-132(2019)

ハエは薬剤耐性菌の伝播において重要な役割を果たすベクターであり、畜舎内外の間で薬剤耐性菌を運んでいることが考えられる。畜舎環境中における薬剤耐性菌の維持における役割を明らかにすることを目的とした。プラスミド性の薬剤耐性遺伝子を保有する薬剤耐性大腸菌をハエに投与したところ、薬剤耐性大腸菌は成虫のイエバエから次世代まで発育環を通し維持され、薬剤耐性遺伝子もハエの腸内細菌叢内で一定量維持され続けた。その後、薬剤耐性大腸菌を保有したウジを 30 日齢の鶏へ経口投与したところ、46 日齢 (出荷日齢付近) まで 10^4 CFU/g の投与菌が鶏腸管内に維持され続けた。これらの結果はハエが発育環を通し薬剤耐性・耐性遺伝子のレゼルボアとなり、農場環境において薬剤耐性菌の維持に関与していることを示した。

a そねざき古林診療所

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
RPR negative primary syphilis

a 酪農学園大学獣医学群食品衛生学

b 北里大学獣医学部人獣共通感染症学
農場環境における薬剤耐性維持におけるハエの役割

Co-harboring of cephalosporin (*bla*)/colistin (*mcr*)
resistance genes among Enterobacteriaceae from
flies in Thailand

A. FUKUDA^{a†}, M. USUI^a, T. OKUBO^b,
C. TAGAKI^a, N. SUNKPANYATHAM^c
and Y. TAMURA^a

FEMS Microbiol Lett, 365(16), fny178(2018)

薬剤耐性腸内細菌科細菌の拡散は公衆衛生上、大きな問題である。特に、セファロスポリン耐性遺伝子(*bla*)とコリスチン耐性遺伝子(*mcr*)を同時に保有する細菌は、使用する抗菌薬が著しく制限され、医療上の影響が懸念される。ハエは薬剤耐性菌をヒトの住環境や農場において移動させる役割がある。今回、特に *bla* と *mcr* の拡散・維持におけるハエの役割を明らかにするため、温暖でハエの活動が活発なタイにおいて薬剤耐性菌/耐性遺伝子の保有実態を調べた。2013-2015年にタイの27か所(市中18か所、豚農場5か所、鶏農場4か所)において235匹のハエを捕獲した。これらのハエから腸内細菌科細菌を分離し、性状解析を実施した。セフォタキシム耐性腸内細菌科細菌(CtxRE)は29.8%、*bla*陽性 CtxREは20.4%のハエから分離され、複数の種類の *bla* 遺伝子が同定された。加えて、これら *bla* 陽性 CtxREの中には *mcr-1* または *mcr-3* を保有する株も認められ、同時に接合伝達性を示す株も存在した。以上の結果より、タイにおけるハエは比較的高率にセファロスポリン耐性腸内細菌科細菌を保有し(約30%)、その中には同時にコリスチンに対しても耐性を示す株も存在していることが示された。セファロスポリン耐性かつコリスチン耐性細菌をハエが維持し、ハエからヒトへ伝播した際のリスクは高く、ハエの制御が求められる。

a 酪農学園大学獣医学群食品衛生学

b 北海道大学医学部保健学科病態解析学

c Quality Vet Product Co., LTD

†現所属 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
タイのハエが保有する腸内細菌科細菌におけるセファロスポリン(*bla*)/コリスチン(*mcr*)遺伝子

The Picture of Dorian Gray: shell corrosion allows
freshwater and brackish-water gastropods to
masquerade as empty shells

K. YAMAZAKI^a

Journal of Natural History, 52(35/36), 2331–2338
(2018)

カワニナ、タニシ、イシマキガイなどの淡水性および汽水性の巻貝には、生存しているのに貝殻が溶出してみずぼらしい姿になるものがある。国内産の巻貝のかかなりの種にこの傾向がある。これらはまるで死んだ空の貝殻に似た外観を呈する。カルシウム濃度の低い水域で貝殻が溶出するのは不可避な現象ともいえるが、貝類が貝殻の石灰化への投資を調節している可能性がある。巻貝の生息場所には、通常古い空の貝殻が散乱しており、これらに紛れることにより、視覚や触覚を用いる捕食者に対する防御になっているかもしれない。このように同種の古い棲家に変装擬態するニッチ構築現象は、葉巻を作る昆虫や石灰岩地帯の陸貝などにも見出される。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

ドリアン・グレイの肖像：貝殻の溶出により淡水性および汽水性巻貝は死貝に変装擬態する

Discovery of a new, adventive, spider wasp,
Lissocnemis brevipennis, in Japan
(Hymenoptera: Pompilidae: Ctenocerinae)

R. MATSUMOTO^a, H. MIYAKE^b, K. YAMAZAKI^c,
T. AONO^d, A. SHIMIZU^e

Japanese Journal of Systematic Entomology, 24 (1),
95–98 (2018)

近年、日本国内への外来昆虫の侵入が増加しつつある。2016年から2017年に、中国地方を中心に、比較的大型で顕著なオレンジ色の斑紋をもつクモバチ（ベッコウバチ）が発見・採集された。これらの標本を精査すると、インド原産の *Lissocnemis brevipennis* と同定された。本種はナンキンハゼに訪花したり、獲物となるクモを探索しているところを目撃されている。2年継続して発見されたことから、すでに日本に定着している可能性が高く、今後、分布を拡大したり、個体数を増加させるかもしれない。

a 大阪市立自然史博物館

b 岡山理科大学生物地球学部

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

d 倉敷市

e 首都大学東京 理学部

日本における新しい外来クモバチ *Lissocnemis brevipennis* の発見

シカ肉の生食による肺吸虫感染の可能性

松尾加代子^{a,b}, 森部絢嗣^a, 高島康弘^a,
粕谷志郎^c, 吉田彩子^d, 阿部仁一郎^e,
ウィラチャイ・サイジュンタ^f, 吾妻健^g

日本獣医師会雑誌, 71(8), 449-453 (2018)

肺吸虫症はヒトの寄生虫症例が激減している現在の日本においても、いまだ年間数十例が本症と診断される食品由来寄生虫症の一つである。原因食品としては感染サワガニやモクズガニ、あるいは待機宿主としてのイノシシの肉が知られている。県内では、これまでシカ肉が原因と疑われるヒトの肺吸虫症例が報告されてきたが、実際にシカ肉が感染源となる可能性については、草食であるシカがサワガニを捕食するのといった観点から疑問視されていた。そこで、これまで想定されてこなかったシカが肺吸虫の待機宿主になり得るのか調査を行った。岐阜県内3地域（A～C）で捕獲されたホンシュウジカ *Cervus nippon centralis* 148頭中2地域（B、C）の計4頭から抗肺吸虫抗体が確認された。B、C地域ではシカ肉が原因と疑われるヒトの肺吸虫症が報告されている。また、B地域のサワガニ *Geothelphusa dehaani* からウェステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani*（2倍体）のメタセルカリアが検出された。シカの第一胃内容を食物アレルギー物質スクリーニングキット（甲殻類用）で検査したところ、B地域のシカ1頭で陽性を示した。この胃内容物から発見された甲殻類の脚様異物から抽出したDNAはサワガニと一致した。このことから、シカがサワガニを食しウェステルマン肺吸虫の中間宿主になり得ることが示唆された。

a 岐阜県飛騨家畜保健衛生所

b 岐阜大学応用生物科学部

c 華陽診療所

d 宮崎大学農学部

e 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

f Maharakham University

g 高知大学医学部

Possibility of paragonimiasis due to consumption of raw deer meat

A new avian *Cryptosporidium* genotype in a 1-month-old caged brown wood owl (*Strix leptogrammica*) with severe dehydration and diarrhea

I. MAKINO ^{a,b}, M. INUMARU ^a, N. ABE ^c and Y. SATO ^a

Parasitology Research, 117(9), 3003-3008 (2018)

クリプトスポリジウム属原虫は鳥類を含む様々な脊椎動物の主に腸管に寄生する人獣共通寄生虫であり、日本では寄生種によって特定病原体に指定されている。これまで著者らは国内のペットショップや家庭飼育下の愛玩鳥類における同原虫の感染状況を調査し、それらには人獣共通寄生種、鳥類特異種または鳥種特異種や遺伝子型が分布するとともに、一部の寄生種と遺伝子型は宿主を衰弱させること等を報告してきた。今回、ペットショップから購入後、家庭で飼育され重度の下痢と脱水で衰弱していた生後 1 か月例のオオフクロウよりクリプトスポリジウムが検出された。遺伝子解析により、分離株は人獣共通寄生種ではなかったが、多遺伝子座の解析により新種と考えられた。輸液等の治療によりオオフクロウの症状は改善し、治療後の経時的検査によりクリプトスポリジウムの駆虫が確認された。本症例は新たなクリプトスポリジウム原虫を発見するとともに、治療が困難とされる同症に有効な治療法を示した内容で、寄生虫学、獣医学領域において貴重な症例である。

Molecular and biological differences among *Ochroconis* strains collected from indoor and outdoor environments

N. HAMADA ^a and N. ABE ^b

Biocontrol Science, 23(4), 187-198 (2018)

屋内のバスルームや洗濯機等から検出される黒カビの一種 *Ochroconis humicola* のルーツを求めて、屋内外の環境由来 *Ochroconis* 55 株の遺伝学的、形態学および生理学的特性を調べた。日本と同様に、アジア、ヨーロッパのバスルームからも *O. humicola* が検出された。*Ochroconis* は山、森林、農業地帯の土壌から見つけることはできなかったが、都市公園の土壌から比較的高頻度に検出された。しかし、これら分離株のほとんどは、栄養源としての洗剤要求性が *O. humicola* より劣っていた。一方、沖縄と中国の都市公園の土壌から分離された株は、遺伝学的、形態学的に *O. humicola* と同定され、両株の生理学的特性も屋内由来 *O. humicola* と類似していた。屋内で検出される *O. humicola* および他の *Ochroconis* spp. の由来は、都市公園の土壌の可能性がある。

a 日本大学生物資源科学部

b ふじさわアビアン・クリニック

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
重度の脱水と下痢を呈した 1 か月齢の家庭内飼育オオフクロウより検出されたクリプトスポリジウムの新規遺伝子型

a 大阪市立自然史博物館

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
室内外の環境に由来する真菌 *Ochroconis* 属株間の遺伝的、生物学的相異

アカアマダイより検出された *Philometroides branchiostegi* に類似した線虫の寄生部位とその遺伝子解析

阿部仁一郎^a, 青野慎太郎^b, 馬場孝^a

日本水産学会誌, 85(1), 64-66 (2019)

糸線虫科の線虫は世界各地の淡水、汽水および海水域の硬骨魚類に寄生する線虫であり、これまでに 150 近い種類が報告されている。それらは全て宿主の消化管以外の場所で成熟し、体側筋肉、体腔、鰭、皮下組織等に寄生する。*Philometroides branchiostegi* は 2009 年に日本産アカアマダイより検出され新種として報告された。しかし、本種は魚体頭部の洗浄液中に発見され、それ以降本種に関する報告がないことから、その寄生部位は不明であった。今回著者らは、大阪府下で流通するアカアマダイから、形態学的に *P. branchiostegi* と推測される線虫を検出した。18S rDNA の部分塩基配列 (1700 bp) は全虫体で一致し地域差を認めなかった。他の糸線虫科線虫との間に 97%以上 (97.7-98.5) の相同性が認められた。虫体は全て鰓蓋、下唇等頭部の皮下に血腫様の結節として観察された。今回の調査の発端は、市場内業者からのアカアマダイに付着した線虫様異物の同定依頼であった。本寄生虫は店頭販売の個体からも検出されており、今後、消費者からの異物苦情の原因となる可能性もある。本報告で示したその寄生状況の写真は、そうした事例において、消費者へ迅速な回答を提示するための有効な資料となる。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪市食品衛生検査所

Site of infection and genetic analysis of *Philometroides branchiostegi*-like nematode found in horsehead tilefish *Branchiostegus japonicus*

Propagation of rhinovirus C in differentiated immortalized human airway epithelial cells

M. Nakauchi^a, N. Nagata^a, I. Takayama^a, S. Saito^a,
H. Kubo^b, A. Kaida^b, K. Oba^c, T. Odagiri^a,
and T. Kageyama^a

Viruses 2019, 11(3), 216

ライノウイルス(RV)は、RV-A、-B および-C に分類されているが、このうちの RV-C については、分離・増殖が可能な標準的な培養細胞系は確立されていない。臨床検体からの RV-C 分離を可能とし、また、それらの生物学的性状および病原性のさらなる解析を行うために、不死化ヒト気管上皮細胞である HBEC3-KT および HSAEC1-KT を用いた air-liquid interface (ALI) 培養系を今回確立した。ALI 培養系におけるこれらの細胞は、形態学的に繊毛および杯細胞を有する偽重層上皮に類似していた。塩基配列全長を解読済の臨床分離 RV-C 株である RV-C9 および-C53 を HBEC3-ALI 培養系で増殖させたところ、コピー数が $1.71 \log 10 \sim 7.06 \log 10$ の範囲でウイルス RNA の増加が認められた。一方、HSAEC1-ALI 培養系においては、同様の増加は認められなかった。HBEC3-ALI 培養系を用いて 23 の臨床検体から計 11 株の RV-C を分離し、そのうちの 9 株についてはさらに継代を行い、再増殖可能の確認を行った。また、上記臨床分離 11 株の VP1 配列を解析したところ、これらは RV-C2、-C6、-C9、-C12、-C18、-C23、-C40、および-C53 タイプであることが明らかとなった。今回確立した HBEC3-ALI 培養系は、異なるタイプの RV-C の臨床検体からの分離・増殖を可能とする初めての培養細胞モデルである。以上、RV-C の分離・解析を可能とする HBEC3-ALI 培養系は、その経済性および利便性において、既存の同細胞モデルの代償となり得ると考える。

a 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

c 公立昭和病院

分化した不死化ヒト気管上皮細胞におけるライノウイルス C の増殖

Longitudinal genotyping surveillance of Mycobacterium tuberculosis in an area with high tuberculosis incidence shows high transmission rate of the modern Beijing subfamily in Japan

K. Yamamoto^{a,b}, S. Takeuchi^c, J. Seto^d, A. Shimouchi^e, J. Komukai^f, A. Hase^b, H. Nakamura^b, K. Umeda^b, Y. Hirai^b, K. Matsumoto^f, J. Ogasawara^b, T. Wada^{g,h}, and T. Yamamoto^{a,g}

Infection, Genetics and Evolution 72 (2019) 25-30

結核菌の1系統である北京型の亜系統として知られる北京新興型は、これまでの疫学研究および基礎研究により、高い病原性と伝播力があるとされているが、細菌学的特徴付けは不十分な状況である。本研究では、結核高罹患率地域である大阪市あいりん地域において2006-2016年に結核患者として登録された患者から分離された結核菌の遺伝子型(VNTR型)と患者疫学情報を用いた分子疫学により、地域内の結核感染伝播状況ならびに、北京新興型の伝播性について検討した。1年間に分離された菌株のうち、由来患者の登録月から2年前までに分離された菌株とVNTRパターン的一致がある株(最近のクラスター)の割合は2008年から2016年にかけて有意に低下しており、あいりん地域内での最近の感染による結核の伝播は減少傾向が認められた。最近のクラスター形成に関わる要因分析の結果、あいりん地域においては感染した結核菌の遺伝系統が北京新興型であることが、北京祖先型よりリスク要因であることが明らかとなった。本地域の結核対策として早期発見、早期治療をさらに強化する必要があると考える。結核菌分子疫学により地域の結核の状況を監視することは、結核対策の必要な要素を見出すために、今後より重要性を増すと考えられる。

a 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

c 長崎県立大学看護栄養学部

d 山形県衛生研究所微生物部

e 大阪市西成区役所

f 大阪市保健所

g 長崎大学熱帯医学研究所

h 長崎大学熱帯医学・グローバルヘルス研究科

日本国内における結核高罹患地域の結核菌分子疫学解析：北京新興型結核菌の伝播リスク因子としての検討

Oxidation of 1-chloropyrene by human CYP1 family and CYP2A subfamily cytochrome P450 enzymes: catalytic roles of two CYP1B1 and five CYP2A13 allelic variants.

T. SHIMADA^a, N. MURAYAMA^b, K. KAKIMOTO^c, S. TAKENAKA^a, Y.R. LIM^d, S. YEOM^d, D. KIM^d, H. YAMAZAKI^b, F.P. GUENGERICH^e, and M. KOMORI^a

Xenobiotica, 48 (6), 565-575 (2018)

多環芳香族炭化水素であるピレン骨格の1位に塩素が付加した化合物であるクロロピレンは環境中で検出される塩素化多環芳香族炭化水素において主な物質の一つである。我々はこれまでにクロロピレンがヒト代謝酵素の作用により主に3種の酸化的代謝産物が生成すること、またその代謝産物もクロロピレン同様アリルヒドロカーボン受容体(AhR)を活性化する能力を有することを明らかにしてきた。今回我々は、クロロピレンの詳細な酸化的代謝挙動を明らかにし、毒性の評価を行うため、様々なチトクロームP450酵素、特にクロロピレンを効率よく酸化する、CYP1ファミリー2Aサブファミリーに着目し、その挙動を明らかにした。具体的にはCYP1A1、1A2、1B1、2A6、2A13、2B6、2C9、2D6、2E1、3A4、3A5によるクロロピレンの代謝挙動を調べた。その結果、1A1は6位と8位を酸化する一方、1B1は6位特異的な酸化を行うことが明らかになった。また、2A6は2A13に比較しクロロピレン代謝能がより高いことがわかったが、1A1や1B1よりは低いことが明らかとなった。これらCYP1ファミリーと2Aの代謝活性の違いはクロロピレンと代謝酵素のドッキングモデル解析の結果から両者の活性点の違いが影響していることが示唆された。

a 大阪府立大学 b 昭和薬科大学

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

d Konkuk University e Vanderbilt University

ヒトチトクロームP450酵素CYP1及びCYP2Aによるクロロピレンの酸化的代謝挙動

Determination of the human cytochrome P450 monooxygenase catalyzing the enantioselective oxidation of 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) and 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (PCB 183)

H. NAGAYOSHI^a, K. KAKIMOTO^a, Y. KONISHI^a, K. KAJIMURA^a and T. NAKANO^b

Environmental Science and Pollution Research, 25(17), 16420-16426 (2018)

我々は、以前キラル性を持つ 19 種の PCB のうち、PCB183 が主要な曝露源である魚介類ではラセミを維持しているのに対し、人体試料である母乳ではキラル選択的な残留性を示すことを報告した。また神経毒性を持つとされ、同じくキラル性を有する PCB95 についても、ヒト母乳中でエナンチオ選択的な残留を示す報告がみられる。われわれは、この現象はヒト体内における生物学的作用が関与していると考えた。そこで生体異物の代謝・排泄の第一選択であるヒト Cytochrome P450

(CYPs) による酸化的代謝に着目し、キラル選択的な酸化に寄与する分子種の同定を試みた。13 種類の CYPs とラセミ体の PCB95 と PCB183 をそれぞれ反応させ、反応前後のエナンチオマー比を算出したところ、ヒト CYP2A6 が PCB 95 の aS 体を優先的に代謝することを見出した。

Enhancement of Pesticide Peak Response in GC-MS in the Presence of Multiple Co-Existing Reference Pesticides

M. YOSHIMITSU^a, K. AKUTSU^b, Y. KITAGAWA^a, S. TAKATORI^a, N. FUKUI^a, M. OSAKADA^a, S. YAMAGUCHI^b, M. NAMIKAWA^c, S. BAN^c, Y. OKUBO^d, R. NAKASHIMA^d, R. MARUYAMA^d, N. KAKUTANI^a, I. MIYAMOTO^a, K. YAMASHITA^e, T. NISHIYAMA^e, M. SHINTO^f, N. YAMAMOTO^f, Y. TAKAI^g, K. HINOSHITA^h, K. KAJIMURA^a, H. OBANAⁱ and T. WATANABE^j

Food Hygiene and Safety Science, 59(3), 146-150 (2018)

共存農薬による測定対象農薬へのピーク増強効果の普遍性を確認するため、我々は共同研究を実施した。まず、溶媒中で共存農薬数によるピーク増強の確認を行った。次に、希釈枝豆マトリックス存在下で、測定対象農薬 3 種類のみ、および共存農薬 166 種類を含む、2 種類の検量線を用いて測定対象農薬を定量した。どちらにおいても、すべての機関で共存農薬によるピーク増強効果を確認した。それらは、枝豆マトリックスの添加により軽減された。以上から、GC-MS を用いて食品中の残留農薬を正確に定量するには、試験液や検量線に含まれる、測定対象農薬以外の共存農薬からの影響に注意する必要がある、またその影響は、食品マトリックス添加により軽減される可能性があると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

b 大阪大学

2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95)及び 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (PCB 183)のキラル選択的な酸化に寄与するヒトシクロム P450 の同定

a 大阪健康安全基盤研究所 b 大阪府藤井寺保健所

c 京都市衛生環境研究所 d 神戸市環境保健研究所

e 奈良県保健研究センター f 堺市衛生研究所 g

和歌山県環境衛生研究センター h 和歌山県新宮保

健所串本支所 i 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 j

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

GC-MS を用いた分析での共存農薬による対象農薬のピーク増強効果

Development of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of total aflatoxins based on monoclonal antibody reactive with aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂

T. YAMASAKI^{a,b,c}, S. MIYAKE^{b,d,e}, N. SATO^f,
Y. HIRAKAWA^{a,b}, S. IWASA^g, H. NARITA^a
and T. WATANABE^f

Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin
Eiseigaku Zasshi), 59(5), 200-205 (2018)

アフラトキシン B₁、B₂、G₁、G₂ (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)汚染の総量を測定するための直接競合 ELISA を開発した。開発に当たっては、これらの各 AF に同等に近い反応性を示すマウスモノクローナル抗体を用いた。開発した直接競合 ELISA の測定範囲は、AFB₁ が 50~230 pg/mL、AFB₂ が 50~270 pg/mL、AFG₁ が 60~390 pg/mL、AFG₂ が 65~700 pg/mL だった。ローストピーナッツを用いて行った総 AF 添加回収試験の結果、直接競合 ELISA は 98%の回収率を示した。さらに AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ の全ての AF が汚染している 4 種類の実試料を用いて測定を試みた結果、その認証値と高い相関関係が示唆された。開発した直接競合 ELISA は、日本の規制値周辺の総 AF 濃度を測定するために好適と考えられた。

Specific detection of c-Kit expressed on human cell surface by immunosensor based on surface plasmon resonance

S. MIYAKE^a, D. IRIKURA^b, T. YAMASAKI^c

Analytical Sciences, 35(2), 223-225 (2019)

表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance) を利用したイムノセンサー (SPR イムノセンサー) は、抗体の標識を必要とせずに抗原抗体反応を直接測定できる。c-Kit は腫瘍マーカーであり、蛍光標識抗体を用いて検出されるが、免疫染色に時間がかかり、一度に検出できる腫瘍マーカーの種類は蛍光標識物の種類に制限される。そこで、SPR イムノセンサーを用いて細胞表面の c-Kit を検出する方法を開発した。抗 c-Kit 抗体をゼラチン溶液と混合した後、センサーチップ表面に固相し、さらにゼラチン溶液でブロッキングを行うことで非特異的反応を劇的に減少させた。この条件は、c-Kit のような細胞表面マーカーに対する抗体を利用した様々な細胞の検出に有用であると考えられる。

-
- a 京都女子大学
 - b 京都高度技術研究所
 - c 大阪健康安全基盤研究所 (現所属)
 - d 堀場製作所
 - e 麻布大学 (現所属)
 - f 食品薬品安全センター秦野研究所
 - g 豊橋技術科学大学

アフラトキシン B₁、B₂、G₁、及び G₂ と高い反応性を示すモノクローナル抗体を用いた総アフラトキシン測定用 ELISA の開発

-
- a 麻布大学
 - b 堀場製作所
 - c 大阪健康安全基盤研究所
- 表面プラズモン共鳴を利用したイムノセンサーによるヒト細胞表面の c-Kit の特異的検出

Detection of mast cells expressing c-Kit using antibody covalently bound to gelatin elongated from surface of immunosensor based on surface plasmon resonance

S. MIYAKE^a, D. IRIKURA^b, T. YAMASAKI^c

Analytical Sciences, 35(7), 811-813 (2019)

表面プラズモン共鳴を利用したイムノセンサーにより、c-Kit を発現する肥満細胞を検出した。センサーチップ表面にゼラチンを共有結合させ、タンパク質架橋剤のビス(スルホスクシンイミジル)スベラートにより抗 c-Kit 抗体を架橋させることにより、検出感度が 100 倍程度増加し 10⁴ cells/mL の肥満細胞の検出に成功した。

IL-18 and IFN-gamma expression enhances contact hypersensitivity after oral administration of naturally oxidized olive oil to mice

H. OGINO^a, K. MURANO^{a,c}, T. OKUNO^a,
F. SAKAZAKI^b, T. ARAKAWA^a and H. UENO^a

Food and Agricultural Immunology, 29 (1), 886-897 (2018)

酸化した調理油の摂取による各種アレルギー疾患の悪化が示唆されている。本研究は、接触性過敏反応(CHS)マウスモデルの感作および惹起を行った後の炎症性サイトカイン発現に対する自然酸化油の影響について検討した。その結果、耳介における IL-12、IL-18 および IFN- γ の mRNA 発現量は感作後 7 日目で増加した。惹起後の IL-18 および IFN- γ mRNA 発現量は酸化オリーブ油の投与によって有意に増加し、惹起後の耳介腫脹や単核球浸潤についても酸化オリーブ油の投与により増強された。酸化油を投与したマウスの耳介中 IL-18 発現量は惹起前が最も多く、惹起後に減少する一方で、IFN- γ 発現量は惹起後に増加した。以上より、CHS マウスモデルに対する自然酸化オリーブ油の投与による免疫反応の促進は、感作後の耳介中 IL-18 の発現増加と、それに続く惹起後の IFN- γ 発現量の顕著な増加に起因することが明らかとなった。

a 麻布大学

b 堀場製作所

c 大阪健康安全基盤研究所

表面プラズモン共鳴を利用したイムノセンサーによる c-Kit を発現する肥満細胞の検出とセンサー表面への抗体の固相化法の工夫による高感度化

a 摂南大学薬学部

b 大阪大谷大学薬学部

c 現大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

マウスに対する自然酸化オリーブ油投与後の IL-18 および IFN-gamma の発現は接触性過敏反応を増強する

Naturally oxidized olive oil exacerbates contact hypersensitivity by promoting differentiation into effector T cells and increasing antigen-specific IFN- γ production

H. OGINO ^a, T. OKUNO ^a, K. MURANO ^b,
T. ARAKAWA ^a and H. UENO ^a

Food and Agricultural Immunology, 30 (1), 74-86
(2019)

自然酸化油による接触性過敏反応(CHS)増悪化の機序を明らかにするために、抗原刺激によるヘルパーTおよびキラーT細胞への分化やサイトカイン分泌の役割について検討した。マウスは感作後、自然酸化油を隔日で一週間経口投与し、耳介中 IL-18 発現量や、脾臓細胞中 AP-1 および caspase-1 活性を測定した。さらに脾臓中 T 細胞亜集団分布を解析するとともに、それぞれの T 細胞集団中 IL-4 および IFN- γ 産生量を測定した。その結果、IL-18 発現量や AP-1 および caspase-1 活性は、酸化オリーブ油投与マウスで増加した。OXA 感作マウスの脾臓細胞中 CD3+CD4+ および CD3+CD8+細胞は、酸化オリーブ油を投与することにより増加し、さらに Th1 サイトカインである IFN- γ 産生量も抗原刺激した CD3+CD4+細胞において増加した。以上のことより、酸化油の過剰な摂取は抗原特異的な T 細胞の分化促進や炎症性サイトカインの産生増大を引き起こし、アレルギー反応を増悪化することが示唆された。

a 摂南大学薬学部

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

自然酸化オリーブ油は、エフェクターT細胞への分化促進や抗原特異的 IFN- γ 産生を増加させ、接触性過敏反応を増悪化する

Evaluation of cleaning methods for residual orange extract on different cookware materials using ELISA with profilin allergen indicator

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

Journal of Food Process Engineering, 41(2), e12652
(2018)

調理器具に食物アレルギーが残留した場合、食物アレルギー患者が調理器具を介して食物アレルギーを誤食し得るため、その洗浄には注意が必要である。本研究では、食物アレルギーの原因食物としてオレンジに着目した。オレンジアレルギーの一つであるプロフィリン (Cit s 2) を指標として、調理器具に付着したオレンジ果汁の残留性を明らかにすることを目的とした。

Cit s 2 に対するウサギ抗体を常法に従って作製した。この抗体を用いた ELISA (酵素免疫測定法) により、オレンジ果汁の残留性を調査した。調理器具に付着したオレンジ果汁の洗浄操作を行い、残留物を拭き取って ELISA に供した。

残留オレンジ果汁の完全な除去のためには、調理器具の種類に関わらず洗剤による洗浄が必要であった。また、水洗のみによる残留オレンジ果汁の洗浄効率は、ガラスやステンレスでは 95%以上で、木やポリプロピレンよりも約 2 倍高い洗浄効果が得られた。そのため、ステンレス製やガラス製の調理器具の利用により、果物の調理現場や食品工場等におけるオレンジアレルギー管理の負担軽減化が期待される。

a 大阪健康安全基盤研究所

b 三重短期大学生生活科学科

アレルギーを指標とした調理器具における残留オレンジ果汁の洗浄方法の評価

Detection of pyrovalerone as a possible synthetic by-product of 4'-methyl- α -pyrrolidinohexanophenone and 4-methyl- α -ethylaminopentiophenone in illicit drug products

T. TAGAMI, T. DOI, A. TAKEDA, A. ASADA, K. KIYOTA and Y. SAWABE

Forensic Toxicology, 36(2), 506-513 (2018)

不純物プロファイルは重要な知見を収集したツールであり、薬物のバッチを関連付けることなどに使用し得る。

我々は危険ドラッグの分析において、カチノン系化合物である

4'-methyl- α -pyrrolidinohexanophenone 及び

4-methyl- α -ethylaminopentiophenone を含む 4 製品から微量のピロバレロン（向精神薬）を検出した。いずれのケースにおいてもピロバレロン含量は他の化合物よりも大幅に少なかったことから、ピロバレロンは非意図的に生成したと考えられた。構造的にピロバレロンは

4'-methyl- α -pyrrolidinohexanophenone とはアルキル鎖の長さが異なり、

4-methyl- α -ethylaminopentiophenone とは α 位のアミンが異なる。ピロバレロンが非意図的に生成した原因について検討したところ、ピロバレロンは 4'-methyl- α -pyrrolidinohexanophenone 合成に使用した合成原料中の不純物及び

4-methyl- α -ethylaminopentiophenone 合成時のアミノ化における汚染に由来する合成不純物であると考えられた。本研究のような不純物分析は、カチノン系化合物の不純物プロファイル充実の一助となる。

Characterization of a new illicit phosphodiesterase-type-5 inhibitor identified in the softgel shell of a dietary supplement

T. DOI^a, K. TAKAHASHI^b, M. YAMAZAKI^b, A. ASADA^a, A. TAKEDA^a, K. KIYOTA^a, T. TAGAMI^a, Y. SAWABE^a and T. YAMANO^a

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 161, 61-65 (2018)

近年、承認を受けた医薬品成分の化学構造の一部を改変した類似化合物が健康食品より検出される事例が多数発生している。特に勃起不全改善薬であるホスホジエステラーゼ-5 阻害剤でその傾向は顕著であり、これまでに 80 種以上の類似化合物が報告されている。本研究では、医薬品医療機器等法の規制対象とすることを目的とし、2017 年度の買い上げ健康食品から検出された新規化合物の構造解析を行った。

カプセル全体を用いた試料溶液からは、ノルアセチルデナフィルおよび推定組成 $C_{25}H_{34}N_6O_3$ の未知化合物が検出された。構造解析の結果を元に合成した標準品を用い、当該物質はプロポキシフェニルノルアセチルデナフィルであることを確認した。また、カプセル内容物と外皮を分離して調製した試料溶液を分析したところ、検出された両化合物はともに、外皮に含まれていることが明らかになった。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課
危険ドラッグ製品中の

4'-methyl- α -pyrrolidinohexanophenone 及び
4-methyl- α -ethylaminopentiophenone の合成不純物としてのピロバレロンの検出

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

b 千葉県衛生研究所

軟カプセル状健康食品の外皮から検出された新規ホスホジエステラーゼ阻害剤の構造解析

ビンロウジについて(2)
クリーンアナリシスを指向した分析法の検討

田上貴臣^{ab}, 有本恵子^b, 石原理恵^b,
伊藤美千穂^b, 居村克弥^b, 大井逸輝^b,
岡坂衛^b, 河端昭子^b, 酒井英二^b,
嶋田宏志^b, 嶋田康男^b, 高井善孝^b,
西尾雅世^b, 野村涼坪^b, 松田久司^b,
松本卓也^b, 守安正恭^b, 山本 豊^b,
横倉胤夫^b

生薬学雑誌, 72(1), 21-27 (2018)

ビンロウジは第十七改正日本薬局方に記載され、基原は *Areca catechu* Linné (*Palmae*) の種子と規定されている。日本では主に漢方処方用薬として、九味檳榔湯、女神散などに配合されている。我々は、既にビンロウジ中のグバシン、アレカイジン及びアレコリンの分析法と市場品の分析結果を報告している。しかし、当該分析法では、移動相にラウリル硫酸ナトリウムを含む。移動相にラウリル硫酸ナトリウムを用いると「カラムの平衡化や洗浄に長時間を要する」、「カラムの劣化が早くなる場合がある」、「泡立ちなどにより移動相の調製が複雑となる」などの欠点がある。本研究では、ビンロウジ中のアルカロイドのうち標準品が市販されているグバシン、アレカイジン及びアレコリンを対象とし、移動相にラウリル硫酸ナトリウムを使用しない分析法について検討した。

検討の結果、ビンロウジ中のアレカイジン、グバシン及びアレコリン含量について、移動相にラウリル硫酸ナトリウムを使用せず、かつ有機溶媒を使用しない定量法を確立した。

Effects of Asian dust events on atmospheric bacterial communities at different distances downwind of the source region

J. PARK^a, P.-F. LI^b, T. ICHIJO^a, M. NASU^a and
N. YAMAGUCHI^c

Journal of Environmental Science, 72, 133-139
(2018)

黄砂をはじめとする風送ダストによって長距離を移動する微生物が下流域の大気中の微生物群集構造に与える影響の理解については、微生物の越境移動がヒトや生態系に与える影響の観点から、その重要性が認識されながらも、手法的な制約から研究が進んでいない。特に、この影響は風送ダストの発生源からの距離によって大きく変化すると考えられる。そこで、黄砂発生源に近い北京と発生源から離れた大阪において、黄砂発生時期（4月～6月）の大気中の細菌現存量を定量的PCRにより継続して測定するとともに、ハイスループット・シーケンサーを用いて細菌群集構造を解析し、結果を比較した。細菌現存量について、北京は大阪の4倍以上であり、北京では大規模な黄砂発生時には黄砂非発生時の1,000倍以上に増加することが分かった。黄砂発生時の大気中の細菌群集構造の優占種は、乾燥地や自然環境に広く分布する *Actinobacteria* や *Bacilli*, *Acidobacteria* であったが、それらの割合は北京と大阪で異なっていた。また、黄砂の飛来による細菌群集構造の変化の度合いは大阪よりも北京で大きかった。これらの結果から、風送ダストの発生源に近い地域では、発生源から離れた地域に比べて、風送ダストによって飛来する細菌の影響をより強く受けると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

b 生薬品質集談会

Studies on *Arecae* Semen

a 大阪大学大学院薬学研究科衛生・微生物学分野

b 中国農業大学資源環境学部

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課
黄砂飛来が下流域の大気中の細菌群集に与える影響

Rapid on-site detection and quantification of food-borne pathogens using microfluidic devices

N. YAMAGUCHI

Foodborne Bacterial Pathogens (Ed. Arnaud Bridet), 57-66 (2019)

食中毒の発生は途上国のみならず、先進国においても依然として大きな社会問題であり、飲食品の微生物汚染の検知ならびに食中毒の発生源の特定には、飲食品の微生物検査が重要である。そのために、一般的に培養法が用いられているが、結果を得るまでに1日以上を要する。そこで、より迅速・高精度かつ簡便な方法が必要とされている。

蛍光染色法を用いることにより数分から数十分以内に細菌数を測定でき、特定種の細菌の検出には蛍光抗体の利用が有効である。蛍光染色した試料の観察には一般的に蛍光顕微鏡が用いられているが、多数の試料を観察する場合、プレパラートの作製や蛍光顕微鏡の操作に手間を要する。

蛍光染色の操作を自動化し、より簡便に検出・定量するには、マイクロ流路デバイスの利用が有望である。また、マイクロ流路デバイスを用いることにより、バイオハザードのリスクを低減することが可能となる。そこで、本稿ではマイクロ流路デバイスを用いて飲食品中の微生物を検出・定量するためのプロトコルをまとめた。

Effects of nitrous acid exposure on baseline pulmonary resistance and Muc5ac in rats

M. Ohyama^a, I. Horie^b, Y. Isohama^b, K. Azuma^c, S. Adachi^d, C. Minejima^e and N. Takenaka^f

Inhalation Toxicology, 30(4-5), 149-158 (2018)

亜硝酸が喘息に影響するのか検討するため、ラットに 5.8、4.1、0.0 ppm の亜硝酸を 6 週間連続曝露し、動物実験における喘息への影響の指標である肺抵抗や TNF- α 、Muc5ac を測定した。その結果、亜硝酸曝露によりベースライン肺抵抗や Muc5ac や肺気腫様変化の計測値である Lm が有意に増加したが、肺の柔らかさを示す動肺コンプライアンスや炎症の指標である TNF- α の増加は認められなかった。組織学的検索では、亜硝酸曝露による炎症性の変化や肺の線維化は観察されなかったが、気管支平滑筋の肥厚が観察された。ラットで肺抵抗を増加させる大気汚染物質には亜硫酸ガスしか報告されていなかったが、亜硫酸ガスの曝露実験では平滑筋収縮薬の併用が肺抵抗亢進に必要であり、肺抵抗亢進が起きる前に肺の線維化による動肺コンプライアンスの増加が起きることが知られている。また、喘息患者では肺気腫が起きるが線維化を伴わないことが多い。今回の実験結果は、亜硝酸が気管支平滑筋に作用し喘息に影響すること、及び、亜硫酸ガスや二酸化窒素より亜硝酸の方が呼吸機能に与える影響が強いことを示唆する。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課
マイクロ流路デバイスを用いた食中毒菌の迅速
on-site 検出および定量

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課
b 東京理科大学 c 近畿大学 d 相模女子大
e 国際基督教大学 f 大阪府立大学

ラットのベースライン肺抵抗と Muc5ac に対する亜硝酸の影響

室内環境測定と保護者・保育士を対象とした
アンケート調査による保育所の
内装木質化の評価

–大阪府産の無垢ヒノキ材を対象として–

萬羽郁子^a, 大山正幸^b, 中島孝江^b, 東 賢一^c

人間と生活環境, 25(2), 93-105 (2018)

大阪府内の保育所4施設を対象とし、大阪府産の無垢のヒノキ材によって内装木質化した工事室と隣接する対照室において、内装木質化工事の前後の室内環境（温湿度、アルデヒド類、VOC、オゾン、二酸化窒素、亜硝酸）の違いを調べ、かつ、木質化前後で利用する乳児の変化などを保育士と保護者を対象にしたアンケート調査で調べることで、室内の木質化による身体や精神に与える影響を検討した。室内環境測定の結果では、アルデヒド類が工事後基準値以下の範囲で一時的に濃度上昇し、 α -ピネンの濃度が上昇した。一方、温湿度、オゾン、二酸化窒素、亜硝酸には工事による影響は認められなかった。アンケート調査の結果では、工事後に保育室がより温かみのある雰囲気であり、落ち着き、集中できる空間であると評価され、内装木質化工事によって保育室内の雰囲気が改善された。これらの効果は、腰壁を設置した施設でも僅かにみられたが、床面を工事した施設の方が効果はきかった。

本研究は平成25年度大阪府環境農林水産部みどり推進課が行った一園一室木のぬくもり推進モデル事業の一環として、かつ、みどり推進課からの受託研究として実施した。

Background factors of chemical intolerance and
parent-child relationships

K. Azuma^a, M. Ohyama^b, E. Azuma^c and
T. Nakajima^b

Environmental Health and Preventive Medicine,
23, 52 (2018)

化学物質過敏症は、低濃度の化学物質への曝露による症状が特徴である。いくつかの研究で成人の化学物質過敏症に関連する要因が報告されているが、家族間での影響は報告されていない。本研究では、母子間での化学物質過敏状態や関連する背景要因を調べた。2006年1月から2007年12月に大阪府岸和田市の3歳6か月健診受診者の母親4325人に母子の症状などに関する自己記入式アンケート調査を実施した。その結果、3歳児における化学物質過敏状態の有病率は、母親の有病率のほぼ18分の1だった。多重ロジスティック回帰分析では、寒冷感受性[オッズ比 (OR), 1.89; 95%信頼区間 (CI), 1.04-3.44]、過去の気管支喘息 (OR, 2.84; 95%CI, 1.46-5.53)、過去のアレルギー (OR, 2.21, 95%CI, 1.36-3.60) が母親の化学物質過敏状態と有意に関連した。小児期の猫の飼育 (OR, 1.99; 95%CI, 1.08-3.69) は、母親の化学物質過敏状態と有意に関連したが、寒冷過敏症、過去の喘息、アレルギーと比較して関連性は弱かった。母親の現在の化学物質過敏状態は、3歳児のアレルギー性鼻炎 (OR, 2.32; 95%CI, 1.19-4.53)、気管支喘息 (OR, 3.66; 95%CI, 2.00-6.69)、慢性気管支炎 (OR, 3.69; 95%CI, 1.04-13.03) と有意に関連していた。これらの結果は、固有の体質と幼年期の住宅環境が化学物質過敏状態を獲得するリスクと関連していることを示唆する。母親が化学物質過敏状態の子供は、呼吸器過敏症または炎症の危険性がある。

a 東京学芸大学 b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課 c 近畿大学

Evaluation of wooden interior of nurseries based on questionnaire surveys among guardians / childcare workers and indoor environment measurement –Case of solid Japanese cypress (*Chamaecyparis obtuse*) from Osaka Prefecture–

a 近畿大学

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課
母子関係と化学物質過敏状態の背景要因

パッシブサンプリングー溶媒抽出法による
室内空气中防虫剤成分ナフタレンおよび
p-ジクロロベンゼンの同時分析

吉田俊明, 味村真弓

室内環境, 21, 199-207 (2018)

住居内において主に防虫剤として使用されるナフタレン (naphthalene、以下 NP と記す) はヒトへの発がんの可能性が指摘されており、住人への長期曝露による健康影響が懸念される。一般に空气中 NP は吸引ポンプを使用したアクティブサンプリング法により分析される。本研究において、室内空气中 NP を、吸引ポンプを使用せず、利便性の高いパッシブサンプリング法により捕集し、同じ防虫剤として広く使用される *p*-ジクロロベンゼン (*p*-dichlorobenzene、以下 DCB と記す) と同時に定量する方法を開発した。

活性炭 200 mg を充填した市販のパッシブサンプラーを用い、空气中 NP および DCB を 24 時間採取した。捕集後サンプラーから活性炭を取り出し、これらの化学物質をトルエン 1 ml および内部標準として各物質のサロゲートを添加して抽出した後、ガスクロマトグラフィー/質量分析により定量した。

NP および DCB の標準溶液から作成した検量線は、それぞれ約 400 および 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下の空气中濃度において良好な直線性を示し、定量下限値はそれぞれ 0.09 および 0.04 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。再現性試験におけるこれら化学物質の定量値の変動係数は、ともに 7% 以下であり良好であった。捕集したサンプラー中の NP および DCB は、いずれも 4°C 遮光保存で 2 ヶ月間は安定であった。

本法は、室内空气中 NP の簡易で再現性の良い分析法であるとともに、DCB を同時に定量することが可能な方法であると考えられた。

環境水からのレジオネラ属菌検査の
現状と課題

枝川亜希子

クリーンテクノロジー, 4, 5-8 (2018)

レジオネラは、浴槽水、冷却塔水、河川、土壌など、環境中に広く生息する細菌である。本菌を原因とするレジオネラ症の患者報告数は、2017 年には過去最多の 1600 例を超え、年々増加傾向にある。しかしながら、これらの感染源の多くは特定されていない。レジオネラ感染は、環境中のエアロゾルや土埃などに含まれる菌を肺に取り込むことにより発症する。ヒトからヒトへの感染はない。そのため、レジオネラ症を防止するためには、感染源となる環境中の生息状況を正確に把握し、患者発生時には感染源を迅速に特定することが公衆衛生上重要である。本稿では、環境水からのレジオネラ検査として主に用いられている培養法や遺伝子検査法などについて解説し、それぞれの現状と課題について述べる。また、レジオネラのアメーバ内増殖能に着目した検出方法である「アメーバ共培養法」についても紹介した。

大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部 生活環境課
Simultaneous determination of moth-repellent, naphthalene and *p*-dichlorobenzene, in indoor air by passive sampling – solvent extraction

大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部 生活環境課
Current status and issues of examination method of *Legionella* bacteria in environmental water

講座「環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ
検出とその制御」[1] はじめに

枝川亜希子

防菌防黴, 46, 177-178 (2018)

レジオネラ症の患者数は、年々増加傾向にある。近年は散発事例が続いていたが、2017年に広島県の入浴施設において日本国内で2番目に大きい集団感染が発生した。レジオネラ症は、ヒトからヒトへの感染は報告されていない。そのため、レジオネラ症を防止するためには、感染源となる環境中の生息状況を正確に把握し、それぞれの水環境に適した衛生対策を講じることが公衆衛生上重要である。

そこで、「環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御」と題した講座を開講し(全13回)、第1回目は、[1] はじめに、と題して開講の辞を述べると共に、レジオネラ属菌の概要について解説した。

講座「環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ
検出とその制御」

[5] 環境水からのレジオネラ属菌の検出
培養法と遺伝子検査法

枝川亜希子

防菌防黴, 46, 513-519 (2018)

レジオネラ検査の水質基準は、公衆浴場の浴槽水などにおいて培養法で「不検出(10cfu未満/100ml)」と定められている。培養法により検出された生菌コロニーは、種々の生化学的性状試験が行われ、そこから得られる情報は非常に多い。一方、レジオネラは増殖速度が遅いため、培養法では検査結果を得るまでに1週間~10日を要する。長時間を要する検査手法は、感染症対策の遅れを招くことになり、感染の拡大も懸念される。特に公衆浴場においては、営業再開の遅れは経済的な損失も大きい。そのため、近年は迅速な検査方法として、半日~1日程度で検査結果を得ることができる遺伝子検査法が活用されている。本稿では、環境水試料からのレジオネラ検出法である「培養法」と「遺伝子検査法」について解説した。

高度浄水処理による浄水処理対応困難物質の
処理特性

吉田 仁^a, 高木総吉^a, 小泉義彦^a, 安達史恵^a,
中島孝江^a, 松田大輔^b, 上田航太郎^b,
古林祐 正^c, 井上裕彦^b, 林 信吾^b, 山口進康^a

水環境学会誌, 42(3), 91-103 (2019)

浄水処理対応困難物質のうち、ホルムアルデヒド(FA)前駆物質 7 種およびクロロホルム(CF)前駆物質 6 種の高度浄水処理による処理性を調べた。CF 前駆物質については、CF 生成量と合わせてハロ酢酸類(HAA)生成量についても評価した。その結果、凝集沈殿処理ではアセトンジカルボン酸(ADC)は最大 50%程度除去できたが、それ以外の 12 物質は除去できないことがわかった。しかし、オゾンおよび粒状活性炭(GAC)処理により、FA 前駆物質および CF 前駆物質を除去し、FA 生成量、CF 生成量および HAA 生成量を低減できることが明らかになった。一方、CF 前駆物質の HAA 生成量を測定した結果、ADC および 1,3,5-トリヒドロキシベンゼンは、ジクロロ酢酸もしくはトリクロロ酢酸の生成率が高かったため、これらの物質は CF 前駆物質および HAA 前駆物質として留意すべき物質であることが明らかになった。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪広域水道企業団事業管理部水質管理センター

c 阪神水道企業団技術部工務課

Advanced water treatment for removal of chemicals
difficult to treat by water purification

ウエルシュ菌新型エンテロトキシン BEC の同定と 機能解析および遺伝子診断法の開発

余野木伸哉

Identification and characterization of Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*, BEC, and development of clinical detection method for the genes

Shinya Yonogi

I 概要

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は人や動物の腸管のほかに、土壌、河川、海泥や食品中など広く環境中にも存在する、グラム陽性の芽胞を形成する桿菌である。このうち一部はウエルシュ菌エンテロトキシン (CPE: *Clostridium perfringens* Enterotoxin) を産生して食中毒の原因菌となることが知られている。我々はウエルシュ菌による食中毒が強く疑われるにも関わらず、分離菌が CPE を産生しない食中毒事件を 2 事例経験した。

本論文において、我々はこれら事例の分離菌が新規のエンテロトキシンを産生することを疑い、毒素の精製とゲノム解析等を進めて、Binary Enterotoxin of *C. perfringens* (BEC) を同定した。また、BEC の構成成分である BECa と BECb について組換え毒素を作製して、その機能を解析した。さらに、衛生研究所等で簡便に使用できる BEC 遺伝子に対する検出系を構築して、行政検査に応用した。

II 新型エンテロトキシン BEC の同定

CPE を産生しない食中毒事例から分離された原因菌をダンカン・ストロング培地で培養して、培養上清ろ液を作製した。ろ液は硫酸アンモニウム沈殿法で濃縮後、3 種類のカラムを使用して精製し、サックリングマウス試験によって液体貯留活性を示す単一なタンパクを得た。精製タンパク

の N 末端アミノ酸配列を解析し、12 残基のアミノ酸配列を決定した。一方で、菌株から DNA を抽出して、次世代シーケンサーで解析した。得られた塩基配列中の ORF に、12 残基のアミノ酸配列を検索すると、1 つの ORF が該当した。事例由来の菌株についてこの ORF がコードしている候補タンパクを欠損させ、その培養上清ろ液をサックリングマウスに供試すると、液体貯留活性が消失した。また、候補タンパクの組換え毒素を作製し、サックリングマウスに供試すると、液体貯留活性が確認された。以上のことから、本タンパクが新規エンテロトキシンであることが明らかとなった。

新規エンテロトキシンのアミノ酸配列を blastP で検索すると、ウエルシュ菌イオタ毒素などが分類される ADP リボシル化 2 成分毒素の b 成分と類似性を有していた。ADP リボシル化 2 成分毒素は a 成分 (酵素活性成分) と b 成分 (膜結合成分) で構成される。新規エンテロトキシンの ORF の周辺を再検索すると、すぐ上流に a 成分に該当する ORF を確認した。以上と以下に示す組換え毒素を用いた解析結果から、我々は本毒素を BEC と命名した (各成分は BECa と BECb とした)。なお、ADP リボシル化 2 成分毒素の b 成分は一般的に単独で生物活性を示さない。b 成分は細胞膜に結合してオリゴマーを形成後、a 成分と結合して、a 成分を細胞内へ運搬する働きを有している。a 成分は細胞質内で NAD を基質として認識し、これを分解する際にアクチンを ADP リボシル化して細胞を円形化すると報告されている。

III BEC の機能解析

BECa および BECb の組換え毒素を作製して、その機能を解析した。

BEC を Vero 細胞に接種すると、それぞれの成分を単独で接種した場合に細胞の形態的变化は観察されなかったが、両成分を同時に接種すると細胞が円形化した。また、BECa は *in vitro* で非筋肉系のアクチンを ADP リボシル化した。

BECa の結晶構造を解析すると、その全体構造はイオタ毒素 a 成分 (Ia) の全体構造と非常に類似していた。また、BECa の分子表面のアミノ酸配列は NAD の認識とアクチンの結合に関与する領域をよく保存していた。さらに、BECa と NADP との複合体の構造を解析し、これとこれまでに報告されている Ia-NAD-アクチンの 3 元複合体の構造と重ね合わせ、アクチンの結合様式を比較した。結果、BECa と Ia は非常に似た様式でアクチンと結合していた。

BEC をサックリングマウスに供試すると BECa は単独では液体貯留活性を示さなかったが、BECb の存在下で、その液体貯留活性を高めた。

以上のことから、BECa は従来の ADP リボシル化 2 成分毒素 a 成分と類似した機能を保有し、一方で、BECb はファミリーの中でも特徴的な性質を有していることが明らかとなった。

IV BEC 遺伝子に対する検出系の構築と行政検査への応用

BECa/b 遺伝子と CPE 遺伝子に全てのウエルシュ菌が保有している PLC 遺伝子をコントロールとして加えたマルチプレックス PCR 法を構築した。この系は各遺伝子に対して検査に応用できる十分な感度と特異性を有していた。人の糞便 439 検体から分離されたウエルシュ菌 129 株について、エンテロトキシン遺伝子の保有をこの系を使用して確認した。129 株のうち 10 株は CPE 遺伝子が陽性となった。別の 1 株で BECa/b 遺伝子が陽性となり、BECa/b 遺伝子保有ウエルシュ菌の割合は 1%未満であった。また、この系を食中毒の日常検査に応用して、これまでに 25 をこえる地方衛生研究所等に技術を提供した。

V まとめ

我々はウエルシュ菌が産生する CPE と異なる新型のエンテロトキシン BEC を同定した。BEC は BECa と BECb で構成され、ADP リボシル化 2 成分毒素に分類された。BECa は類似毒素の a 成分が有する基本的な機能を共有していた。一方で、BECb はファミリーの中でも特徴的な性質を有していた。BECa/b 遺伝子と CPE 遺伝子を同時に検出する系を構築して、行政検査へ応用した。

謝 辞

本研究についてご指導を賜りました大阪大学微生物病研究所 飯田哲也教授、児玉年央准教授、松田重輝助教に感謝申し上げます。本研究にご協力をいただきました大阪大学微生物病研究所 堀口安彦教授、中村昇太准教授、大阪大学大学院薬学研究科 河原一樹助教、徳島文理大学薬学部 永浜政博教授に感謝申し上げます。本研究や業務についてご指導、ご協力とご理解をいただきました大阪健康安全基盤研究所細菌課の皆様にご感謝申し上げます。

(本稿は、著者が大阪大学大学院医学系研究科において平成 31 年 3 月 25 日に博士 (医学) の学位を授与された際の論文の概要であり、その詳細は以下に掲載されている。)

- 1) Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T, arada T, Kumeda Y, Gotoh K, Hiyoshi H, Nakamura S, Kodama T, Iida T. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect Immun*. 2014; **82**:2390-2399.
- 2) Yonogi S, Kanki M, Ohnishi T, Shiono M, Iida T, Kumeda Y. Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the *Clostridium perfringens* enterotoxin-encoding genes *cpe* and *becAB*. *J Microbiol Methods*. 2016; **127**:172-175.
- 3) Kawahara K, Yonogi S, Munetomo R, Oki H, Yoshida T, Kumeda Y, Matsuda S, Kodama T, Ohkubo T, Iida T, Nakamura S. Crystal structure of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;

480:261-267

- 4) 大阪健康安全基盤研究所ホームページ. ウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子 (*cpe*, *becA*, *becB*) マルチプレックス PCR.
<https://www.iph.osaka.jp/s008/030/010/050/010/20180107044000.html>

日本国内における結核高罹患地域の結核菌分子疫学解析 ：北京新興型結核菌の伝播リスク因子としての検討

山本香織

Longitudinal genotyping surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* in an area with high tuberculosis incidence shows high transmission rate of the modern Beijing subfamily in Japan

Kaori YAMAMOTO

I 緒言

2016 年全世界の結核患者数は 1,040 万人であり、結核罹患率（人口 10 万人対新登録患者数）は 140 と推定されている。WHO は、2035 年には全世界の結核罹患率を 10 以下の低蔓延状態にする方針を示しており、各国の状況に応じて結核対策の推進が必要である。日本は 2016 年の結核罹患率が 13.9 であり、最も結核罹患率が高い都市が大阪市（32.8）となっている。その一因として 2016 年推定結核罹患率が 395 と突出して高い大阪市西成区にあるあいりん地域の存在が考えられる。このような高罹患率地域の結核罹患率を低下させることは、日本、ひいては世界の結核罹患率の低下につながっていくと考えられる。

地域の結核対策において、地域内での感染伝播の状況とその要因について理解することが重要である。結核菌は遺伝的に大きく 4 つの系統に分類される。北京新興型は、北京型の亜系統として知られ、中国北部を起源として現在世界中に広まっており、日本国内でもその検出広がりが危惧されている系統である。これまでの疫学研究および基礎研究により、北京新興型は高い病原性と伝播力を有するとされているが、未だ細菌学的特徴付けは不十分な状況である。

本研究では、結核高罹患率地域である大阪市あいりん地域において分離された結核菌の遺伝子型別情報と患者疫学情報を用いて長期的に調査し、地域内の感染伝播状況ならびに北京新興型の伝播性について結核分子疫学的に検討した。

II 対象と方法

1. 対象

2006-2016 年に大阪市西成区あいりん地域の結

核患者として登録され、結核菌培養陽性であった 810 名のうち、596 名由来の結核菌 596 株 (73.6%) および由来患者の疫学情報を用いた。

2. 方法

対象菌株について、結核菌の遺伝子型別は 24 領域の Variable number of tandem repeats (VNTR) 型別を実施した。各菌株の VNTR パターンから、遺伝系統（非北京型、北京祖先型、北京新興型）の推定を行い、あいりん地域内で分離された結核菌の遺伝系統の集団構造および、地域内での感染伝播状況について検討した。地域内における感染伝播の指標として、24 領域の VNTR パターンが全て一致した菌株群をクラスターと定義した。地域内感染伝播状況の変化については、最近の感染による伝播状況の指標として、分離された菌株のうち患者登録月から 2 年前までの菌株とクラスターを形成する株数の割合を経年的に算出し（最近のクラスター率）、コクラン・アーミテージ検定を行った。また、最近の感染伝播に関わるリスク因子を検討するために、目的変数を最近のクラスターの形成、説明変数を菌株の遺伝系統および患者疫学情報として、多重ロジスティック回帰分析を行った。

III 結果と考察

結核菌 596 株の遺伝系統は非北京型 117 株 (19.6%)、北京祖先型 251 株 (42.1%)、北京新興型 228 株 (38.3%) であった。北京新興型の検出割合に年齢階級による差はなかった。2008 年から 2016 年にかけて、最近のクラスター率は有意に低下し、あいりん地域において最近の感染による結核の伝播は減少傾向であった。あいりん地域では、2012 年からの居住者を対象とした服薬支援と、

患者の早期発見を目的とした胸部 X 線健診の実施、無償診療や療養支援事業を行ってきた。これらの対策により、結核患者の治療成功率は上がり、健診による結核患者の発見率が 2013 年から 2016 年で 17.7% から 24.7% に増加した。健診による感染性を有する患者の早期発見が増えたことで、感染伝播の防止に繋がったと考える。一方で、本地域は居住者の流入が多く、地域内での感染伝播については、患者の居住歴を含めた解析など、より詳細な検討が必要である。最近のクラスター形成に関わる要因分析の結果、あいりん地域内では、北京祖先型に比べ北京新興型で最近の感染伝播のリスクが高いことが明らかとなった。また、あいりん地域内では、2002-2004 年における同地域の調査結果（和田ら、2009）および 2004-2013 年の日本国内の検出傾向（瀬戸&和田ら、2015）と比較して北京新興型の検出割合が有意に高かった。このことは、不特定多数の人が集まる人口密集地域であるあいりん地域において、北京新興型の高い伝播力が有利だった結果と考えられる。このような憂慮すべき系統の存在に鑑み、あいりん地域における結核患者の早期発見、早期治療をさらに強化する必要があると考える。

IV 結 論

結核分子疫学により、あいりん地域の患者由来株を継続的に調査したことで、地域内の高まん延状況は続いているが、結核対策の強化が地域内の結核感染伝播の減少に繋がったことが評価できた。また、あいりん地域においては北京新興型が地域内の最近の感染伝播のリスク要因であった。結核分子疫学を用いて地域の結核の状況を監視することは、その地域の結核対策において必要な要素を見出すために、今後より重要性を増すと考えられる。

謝 辞

本論文作成にあたり、ご指導いただきました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科国際保健学部 分野 山本太郎教授、和田崇之准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご協力いただきました共著研究者の長崎県立大学 竹内昌平講師、山形県衛生研究所 瀬戸順次主任専門研究員、大阪市保健所 松本健二南部保健医療監、小向潤医務主幹、大阪市西成区役所 下内昭結核対策特別顧問、大阪健康安全基盤研究所微生物部 小笠原準課長、中村寛海主任研究員、梅田薫主任研究員、平井有紀研究員、元大阪市立環境科学研究所微生物保健課長 長谷篤氏に深く感謝いたします。

最後に、日常の業務の中でご指導・ご協力いただきました、大阪健康安全基盤研究所微生物部の諸氏に感謝いたします。

（本稿は、著者が長崎大学において平成 31 年 3 月に博士（医学）の学位を授与された際の論文の概要であり、その詳細は以下に掲載されている。）

文 献

Infection, Genetics and Evolution 72 (2019) 25-30

編集委員

青山 幾子

浅田 安紀子

池森 亮

大山 正幸

○ 角谷 直哉

根岸 直矢

宮本 伊織

山崎 一夫

吉光 真人

若林 友騎

(○ 編集委員長)

査読委員

生田 和良

入谷 展弘

柿本 幸子

川津 健太郎

紀 雅美

久保 英幸

新矢 将尚

仲谷 正

西尾 孝之

昌山 敦

村上 太郎

吉光 真人

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

研究年報 第3号 令和元年度

ISSN 2433-5819

(無断転載禁止)

令和2年1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