

ISSN 2433-5819

研 究 年 報

令和 2 年度

第 4 号

ANNUAL REPORT
OF
OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.4
(2020)



地方独立行政法人

大阪健康安全基盤研究所

Osaka Institute of Public Health

目 次

報 文

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（2019 年度） 中田恵子，本村和嗣・・・・	1
大阪府内における 2019/2020 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・・・・	9
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（2019 年度） 青山幾子，池森 亮，横田正春，弓指孝博・・・・	18
皮膚爬行疹患者から検出された <i>Spirometra</i> 属裂頭条虫の遺伝子解析 馬場 孝，亀井千紗都，東田理恵，楠谷 尚，阿部仁一郎，寺本 勲， 中川浩一・・・・	26
中国産青ネギからのクロルベンズロンの検出事例 上野 亮，松井啓史，内田耕太郎，阿久津和彦，角谷直哉・・・・	32
LC-MS による加工食品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・・・・	37
GM ダイズ検査におけるリアルタイム PCR 装置の同等性試験の結果 野村千枝，角谷直哉・・・・	43
遺伝子組換えバレイショ検出におけるバレイショ加工品の DNA 抽出法の改良 村上太郎，村野晃一，工藤鮎子，山口之彦，山野哲夫・・・・	54
透析-固相抽出-LC-MS/MS 法による食品中の人工甘味料の一斉分析 新矢将尚，寺谷清香，山口之彦・・・・	61
液体クロマトグラフィー-フォトダイオードアレイ検出器を用いた医薬品成分の一斉分析法の開発 武田章弘，浅田安紀子，清田恭平，土井崇広，田上貴臣・・・・	70
健康食品中に含有される医薬品成分類似化合物ジメチルジチオノルカルボデナフィルの検出 武田章弘，浅田安紀子，清田恭平，土井崇広，田上貴臣・・・・	76
水質検査における外部精度管理（2018 年度）-テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレン- 小泉義彦・・・・	82
水質検査における外部精度管理（2018 年度）-鉄及びその化合物- 吉田 仁，中島孝江・・・・	93
水質検査における定量精度に影響を及ぼす因子の解明（2019 年度）-大阪府建築物飲料水水質検査 業- 中島孝江，高木総吉，小泉義彦・・・・	100
革製品等のアゾ染料由来の特定芳香族アミン等の分析検討 大嶋智子，宮本京子，角谷直哉，山口之彦・・・・	110
大阪府における環境および食品中放射能調査（平成 31 年度報告） 大山正幸，肥塚利江，山口進康・・・・	123

抄 録

TLR2 と Mincle による連続した感知は未熟骨髄系細胞に劇症型溶血性レンサ球菌感染症に対する防

御免疫を誘導させる(英文)	松村隆之, 池辺忠義, 有川浩司, 細川正人, 相子美智雄, 井口 葵, 富樫郁子, 甲斐彩香, 大原咲子, 大原直也, 大西 真, 渡邊治雄, 小林和夫, 竹山春子, 山崎 晶, 高橋宜聖, 阿戸 学	132
マクロファージの解糖系代謝転換は結核菌への宿主防御応答である(英文)	岡真優子, 合田亘人, 財賀大行, 山本雅裕, 竹田 潔, 尾関百合子, 山口雄大, 曾我友義, 立石 雄, 三浦克之, 奥崎大介, 小林和夫, 松本壮吉	132
ウイルス粒子構造は防御能に優れた IgA 抗体応答を誘導する(英文)	小野寺大志, 橋 香奈, Rajni Kant Shukla, 三木元博, 戸高玲子, 藤本 陽, 倉岡雅征, 三好龍也, 小林和夫, 長谷川秀樹, 阿戸 学, Garnett Kelsoe, 片山和彦, 高橋宜聖	133
FTA-NaOH を用いたポリメラーゼ連鎖反応: ウガンダ共和国ムバララ県の乳牛の効率的で安価な <i>Theileria parva</i> の検出方法(英文)	内田玲麻, Joseph Byaruhanga, 岡村郁夫, 三山豪士, 村松康和, Patrick Vudriko, 蒔田浩平	133
新型コロナウイルス感染が診断されない率: 中華人民共和国武漢市から日本へ退避した航空便の乗客を用いた推定(英文)	西浦 博, 小林鉄郎, Yichi Yang, 林 克磨, 三山豪士, 木下 諒, Natalie M. Linton, Sung-Mok Jung, Baoyin Yuan, 鈴木絢子, Andrey R. Akhmetzhanov	134
新型コロナウイルス感染症の死亡リスクについて(英文)	小林鉄郎, Sung-Mok Jung, Natalie M. Linton, 木下 諒, 林 克磨, 三山豪士, 安齋麻美, Yichi Yang, Baoyin Yuan, Andrey R. Akhmetzhanov, 鈴木絢子, 西浦 博	134
移動制限が輸出症例による新型コロナウイルス感染症の流行動態に及ぼす影響(英文)	安齋麻美, 小林鉄郎, Natalie M. Linton, 木下諒, 林 克磨, 鈴木絢子, Yichi Yang, Sung-Mok Jung, 三山豪士, Andrey R. Akhmetzhanov, 西浦 博	135
WQ-3810: キノロン耐性結核菌治療に高い可能性を有する新しいフルオロキノロン(英文)	大内勇樹, 向井徹, 小出健太郎, 山口智之, Jong-Hoon Parka, Hyun Kim, 横山和正, 田丸亜貴, Stephen V. Gordon, 中島千絵, 鈴木定彦	135
マイコバクテリウムトリプレックスによる易感染性宿主の肺感染症; 症例報告と文献レビュー(英文)	白田全弘, 田丸亜貴, 丸毛聡, 福井基成	136
日本の健康なボランティアの浴室、河川、土壌から分離された <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> と異なる地理エリアでの臨床分離株との遺伝学的関連(英文)	有川健太郎, 一條智明, 中島里美, 西内由紀子, 矢野大和, 田丸亜貴, 吉田志緒美, 丸山史人, 太田敦, 那須正夫, Daria A. Starkova, Igor Mokrousov, Olga V. Narvskaya, 岩本朋忠	136
ベトナム健康者の染色体性 <i>mcr-1</i> 保有コリスチン耐性大腸菌の高い保有率について(英文)	山口貴弘, 河原隆二, 浜元宏太, 平井到, Khong Thi Diep, Nguyen Nam Thang, Tran Thi Hoa, 元岡大祐, 中村昇太, 山本容正	137
ウエルシュ菌による食中毒とその予防	余野木伸哉	137

2013 年から 2017 年に検出されたノロウイルス GII.P17-GII.17 の VP1 および RNA 依存性 RNA ポリ メラーゼ領域の進化系統解析 (英文)	138
松島勇紀, 水越文徳, 左近直美, イェン・ハイ・ドアン, 植木 洋, 小川泰卓, 本谷 匠, 塚越博之, 中村範子, 重本直樹, 吉富秀亮, 岡本玲子, 鈴木理恵子, 筒井理香, 寺杣文男, 高橋知子, 貞升健志, 清水英明, 岡部信彦, 長澤耕男, 麻生純平, 石井晴之, 黒田 誠, 梁 明秀, 片山和彦, 木村博一	
新生児集中治療室 (NICU) におけるロタウイルス集団発生	138
左近直美, 本村和嗣, 井石倫弘, 塩見正司, 元岡大祐, 中村昇太	
大阪府におけるロタウイルス検出状況	139
左近直美, 白井達哉, 本村和嗣, 西尾孝之, 田邊雅章, 吉田英樹, 山本 憲	
免疫学的に 2 次性ワクチン不全の患者を初発とする麻疹アウトブレイク (英文)	139
倉田貴子, 上林大起, 江川和孝, 木下 優, 吉田英樹, 宮園将哉, 本村和嗣	
2017 年の大阪市におけるコクサッキーウイルス A6 による手足口病の流行について (英文)	140
上林大起, 改田 厚, 平井有紀, 山元誠司, 藤森良子, 岡田めぐみ, 久保英幸, 入谷展弘	
2018 年から 2019 年の大阪府内における風しんの流行について (英文)	140
上林大起, 倉田貴子, 久保英幸, 改田 厚, 山元誠司, 江川和孝, 平井有紀, 岡田和真, 池森 亮, 弓指孝博, 山本 憲, 吉田英樹, 平山隆則, 生田和良, 本村和嗣	
2015 年に日本で確認されたセフトリアキソン耐性淋菌株 FC428 のクローンの増殖と拡散 (英文)	141
李 謙一, 中山周一, 大澤佳代, 吉田弘之, 荒川創一, 古林敬一, 亀岡 博, 志牟田健, 川畑拓也, マグヌス・ウネモ, 大西 真	
日本の MSM における非性病性トレポネーマ症であるベジエルの流行 (英文)	141
川畑拓也, 小島洋子, 古林敬一, 篠原 浩, 清水恒広, 駒野 淳, 森 治代, 本村和嗣	
最近の HIV 感染の割合から推定した日本における HIV 発生率 (英文)	142
松岡佐織, 長島真美, 貞升健志, 森 治代, 川畑拓也, 財津修一, 中村麻子, マーク・S・ソウザ, 俣野哲郎	
病原体検出マニュアル「後天性免疫不全症候群」改訂の経緯	142
貞升健志, 長島真美, 吉村和久, 川畑拓也, 佐野貴子, 近藤真規子, 松岡佐織, 草川 茂, 立川 愛	
臨床的に梅毒と診断した日本人患者から分子疫学解析によって本邦で初めて検出された bejel の病 原体 <i>Treponema pallidum</i> ssp. <i>endemicum</i>	143
川畑拓也, 阪野文哉, 小島洋子, 森 治代, 本村和嗣, 駒野 淳, 篠原 浩, 古林敬一	
収容されたイヌ・ネコにおけるセファロsporin 耐性腸内細菌科細菌群の分布と遺伝子解析 (英文)	143
梅田 薫, 長谷 篤, 松尾雅史, 堀本知昭, 小笠原準	
収容伴侶動物におけるフルオロキノロン耐性大腸菌の分布と耐性機序の解析 (英文)	144
梅田 薫, 長谷 篤, 福田 昭, 松尾雅史, 堀本知昭, 小笠原準	
血液培養から分離されたカルバペネマーゼ KHM-1 産生 <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i> の耐性プラスミド解析 (英文)	144
梅田 薫, 中村寛海, 福田 昭, 山口貴弘, 松本悠希, 元岡大祐, 中村昇太	

河原隆二	145
クエンチングプライマーを用いたリアルタイム RT-LAMP 法によるインフルエンザウイルスおよび RS ウイルス検出系の開発 (英文)	
高山郁代, 中内美名, 高橋 仁, 大場邦弘, 仙波晶平, 改田 厚, 久保英幸, 齊藤慎二, 永田志保, 小田切孝人, 影山 努	145
リアルタイム RT-LAMP 法を用いたライノウイルス検出系の開発 (英文)	
中内美名, 高山郁代, 高橋 仁, 仙波晶平, 齊藤慎二, 久保英幸, 改田 厚, 大場邦弘, 永田志保, 小田切孝人, 影山 努	145
同一患者臨床検体からの A および B 型インフルエンザウイルスの重複分離例	
久保英幸	146
金管楽器内で生育するカビの金属耐性	
浜田信夫, 阿部仁一郎, 佐久間大輔	146
室内に分布する <i>Ochroconis</i> は石灰岩地帯の <i>Ochroconis</i> に由来する (英文)	147
浜田信夫, 阿部仁一郎	
詳細な問診と遺伝子解析により安全に駆虫し得た、ニュージーランドでの感染が疑われた無鉤条虫症の 1 例	
森田 涼, 白野倫徳, 木俣 勲, 馬場 孝, 阿部仁一郎, 中川裕太, 福岡里紗, 山根和彦, 小西啓司, 麻岡大裕, 中河秀憲, 笠松 悠, 後藤哲志, 黒川克博, 藤川康則, 金子 明	147
ニホンジカより検出された 5 種住肉胞子虫の <i>cox1</i> 遺伝子解析による相異 (英文)	
阿部仁一郎, 松尾加代子, 森部絢嗣, 高島康弘, 馬場 孝, ビヨン・ジョルデ	148
ニホンジカより検出された 3 つの新種を含む 7 種の住肉胞子虫の遺伝学的、形態学的特徴 (英文)	
阿部仁一郎, 松尾加代子, 森部絢嗣, 高島康弘, 入江隆夫, 馬場 孝, ビヨン・ジョルデ	148
風に吹かれて: チョウ目幼虫によるユニークな葉に乗った空中降下 (英文)	
山崎一夫	149
5,6-ジヒドロチミジンを検知指標として牛生レバーの照射線量を推定する (英文)	
藤原拓也, 福井直樹, 北川陽子, 梶村計志, 尾花裕孝, 石川悦子, 古田雅一, 高取 聡	149
殺菌剤メパニピリムとその主要代謝物の分析のための直接競合 ELISA の開発 (英文)	
三宅司郎, 平川由紀, 山崎朋美, 渡辺栄喜, 原田亜矢子, 足立香代, 岩佐精二, 成田宏史	150
親水性農薬ニテンピラムのイムノアッセイ: 農作物を対象とした簡便なスクリーニング法としての評価 (英文)	
渡辺栄喜, 平川由紀, 山崎朋美, 岩佐精二, 三宅司郎	150
表面プラズモン共鳴を利用したイムノセンサによる農薬 6 種類の同時定量 (英文)	
三宅司郎, 平川由紀, 山崎朋美, 渡辺栄喜, 原田亜矢子, 岩佐精二, 成田宏史	151
LC-MS/MS を用いた大豆穀粒および大豆加工品に含まれる大豆アレルゲン Gly m 4 分析法の開発 (英文)	
吉光真人, 清田恭平, 梶村計志, 山野哲夫	151

ボウルの材質 3 種類における小麦アレルギー残留性の比較 橋本博行, 吉光真人, 清田恭平	152
放射線損傷ヌクレオシドであるジヒドロチミジン指標として照射食品を検知する 高取 聡, 福井直樹, 藤原拓也, 北川陽子, 梶村計志, 石川悦子, 古田雅一 . . .	152
地方衛生・環境研究所の沿革と役割 新矢将尚	153
ヘッドスペース-GC/MS による食品用ラミネートフィルム中の残留有機溶剤の分析 尾崎麻子, 岸 映里, 大嶋智子, 角谷直哉, 阿部 裕, 六鹿元雄, 山野哲夫 . . .	153
食品用器具・容器包装の規制をめぐる最新の動向 尾崎麻子	154
大阪湾圏域の干潟におけるマイクロプラスチック汚染 (英文) 中尾賢志, 尾崎麻子, 山崎一夫, 梶元慶子, 仲谷 正, 先山孝則	154
日本近海で漁獲されたベニズワイガニ中の総水銀とメチル水銀濃度 (英文) 柿本幸子, 吉光真人, 阿久津和彦, 清田恭平, 藤原拓也, 渡邊敬浩, 梶村計志, 山野哲夫	155
質量分析計を用いた農産物中残留農薬試験法 宮本伊織	155
アポ A-I N 末フラグメントのアミロイド線維形成機構の解明 (英文) 水口智晴, 中川美穂, 南波憲宏, 坂井美冴, 栗光直子, 鈴木彩音, 藤田かほ, 堀内爽加, 馬場照彦, 扇田隆司, 西辻和親, 斎藤博幸	156
二段階 FRET 法によるアミロイド形成の評価 (英文) Galyna Gorbenko, Valeriya Trusova, Todor Deligeorgiev, Nikolai Gadjev, 水口智晴, 斎藤博幸	156
ホスファチジルエタノールアミンはアポ A-I N 末フラグメントのアミロイド線維形成を促進する (英文) 栗光直子, 水口智晴, 藤田かほ, 田口鈴野, 扇田隆司, 西辻和親, 島内寿徳, 斎藤博幸	157
パイナップル由来酵素処理によるオレンジアレルギー Cit s 2 濃度の減少 (英文) 清田恭平, 吉光真人, 梶村計志, 山野哲夫	157
女貞子について: HPLC によるオレアノール酸及びウルソール酸分析法の検討と市場品及び採取 調製品の分析 西尾雅世, 有本恵子, 石原理恵, 伊藤美千穂, 居村克弥, 岡坂 衛, 河端昭子, 酒井英二, 嶋田康男, 高井善孝, 田上貴臣, 十倉佳代子, 野村涼坪, 松田久司, 松本卓也, 山本 豊, 横倉胤夫, 吉川正人	158
溶液中 FISH (liq-FISH) 法の開発およびマイクロ流路システムによる飲用水中の大腸菌の迅速定量 (英文) 山口進康, 後藤聡子	158
アメーバ共培養-qPCR 法を用いた環境中レジオネラ生息調査 (英文) 枝川亜希子, 木村明生, 宮本比呂志	159
室内亜硝酸と屋外二酸化窒素と喘息発作との関連: 疫学的試行調査結果 (英文)	

大山正幸, 中島孝江, 峰島知芳, 東 賢一, 岡 憲司, 板野泰之, 工藤正一郎, 竹中規訓	159
大阪府内浄水場における農薬代謝物の存在実態および浄水処理による除去効果 安達史恵, 吉田 仁, 高木総吉, 小泉義彦, 中島孝江, 北村雅世, 鳥居将士, 吉田直志, 土屋 誠, 山口進康	160
on-site モニタリングによる生活環境の衛生微生物学的安全の確保 山口進康	160
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」[12] レジオネラ属菌の宿主となる 自由生活性アメーバ 枝川亜希子	161
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」[13] アメーバ共培養法を用いたレ ジオネラ属菌の検出 井上浩章, 枝川亜希子	161

ANNUAL REPORT OF OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

CONTENTS

Original Articles

Epidemic situation and molecular-epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2019 Report) (in Japanese) K. NAKATA and K. MOTOMURA	1
Influenza epidemic situation during the 2019/2020 season in Osaka Prefecture (in Japanese) S. MORIKAWA, S. HIROI and K. MOTOMURA	9
Mosquito-borne virus surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2019 Report) (in Japanese) I. AOYAMA, R. IKEMORI, M. YOKOTA and T. YUMISASHI	18
Molecular identification of <i>Spirometra</i> plerocercoid (Cestoda: Diphyllbothriidae) isolated from a patient with creeping eruption in Osaka Prefecture (in Japanese) T. BABA, C. KAMEI, R. TOHDA, N. KUSUTANI, N. ABE, I. TERAMOTO and K. NAKAGAWA	26
Detection of chlorbenzuron in Welsh onion from China (in Japanese) R. UENO, H. MATSUI, K. UCHIDA, K. AKUTSU and N. KAKUTANI	32
Analysis of surfactants contaminated in the processed foods using LC-MS (in Japanese) Y. KAKIMOTO, M. YAMAGUCHI and N. KAKUTANI	37
Results of equivalency test of real-time PCR devices in detection of genetically modified soybeans (in Japanese) C. NOMURA and N. KAKUTANI	43
Improvement of DNA Extraction for the detection genetically modified potato from processed potato product (in Japanese) T. SATSUKI-MURAKAMI, K. MURANO, A. KUDO, Y. YAMAGUCHI and T. YAMANO	54
Simultaneous analysis of artificial sweeteners in foods by LC-MS/MS after dialysis and solid-phase extraction (in Japanese)	

M. SHINYA, S. TERATANI and Y. YAMAGUCHI	61
The development of simultaneous determination method for medicinal ingredients in dietary supplements with a liquid chromatography-photodiode array detector (in Japanese) A. TAKEDA, A. ASADA, K. KIYOTA, T. DOI and T. TAGAMI	70
The detection of dimetyldithionorcarbodenafil as medical ingredient analogue in a dietary supplement (in Japanese) A. TAKEDA, A. ASADA, K. KIYOTA, T. DOI and T. TAGAMI	76
Results of external quality control on the analytical measures for tetrachloroethylene and trichloroethylene in tap water, performed in 2018 in Osaka Prefecture (in Japanese) Y. KOIZUMI	82
Results of external quality control on the analytical methods for iron in tap water, performed in 2018 in Osaka Prefecture (in Japanese) J. YOSHIDA and T. NAKAJIMA	93
Results of external quality control on the analytical measures for zinc and chlorate in drinking water, performed in 2019 in Osaka Prefecture (in Japanese) T. NAKAJIMA, S. TAKAGI and Y. KOIZUMI	100
Analysis of primary aromatic amines originated from azo dyes in leather products (in Japanese) T. OOSHIMA, K. MIYAMOTO, N. KAKUTANI and Y. YAMAGUCHI	110
Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2019 Report) (in Japanese) M. OHYAMA, T. HIZUKA and N. YAMAGUCHI	123
Abstracts	
Sequential sensing by TLR2 and Mincle directs immature myeloid cells to protect against invasive group A streptococcal infection in mice T. MATSUMURA, T. IKEBE, K. ARIKAWA, M. HOSOKAWA, M. AIKO, A. IGUCHI, I. TOGASHI, S. KAI, S. OHARA, N. OHARA, M. OHNISHI, H. WATANABE, K. KOBAYASHI, H. TAKEYAMA, S. YAMASAKI, Y. TAKAHASHI and M. ATO	132
Metabolic adaptation to glycolysis is basic defense mechanism of macrophages for <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection M. OSADA-OKA, N. GODA, H. SAIGA, M. YAMAMOTO, K. TAKEDA, Y. OZEKI, T. YAMAGUTCHI, T. SOGA, Y. TATEISHI, K. MIURA, D. OKUZAKI, K. KOBAYASHI and S. MATSUMOTO	132
Immune-focusing properties of virus-like particles improve protective IgA responses T. ONODERA, K. HASHI, R. SHUKLA, M. MIKI, R. TODAKA, A. FUJIMOTO, M. KURAOKA, T. MIYOSHI, K. KOBAYASHI, H. HASEGAWA, M. ATO, G. KELSOE, K. KATAYAMA and Y. TAKAHASHI	133
FTA-Sodium hydroxide-based polymerase chain reaction (PCR): An efficient and cheaper option for <i>Theileria parva</i> detection in dairy cattle in Mbarara Uganda L. UCHIDA, J. BYARUHANGA, I. OKAMURA, T. MIYAMA, Y. MURAMATSU, P. VUDRIKO and K. MAKITA	133
The rate of underascertainment of novel coronavirus (2019-nCoV) infection: estimation using Japanese passengers data on evacuation flights H. NISHIURA, T. KOBAYASHI, Y. YANG, K. HAYASHI, T. MIYAMA, R. KINOSHITA, NM. LINTON, SM. JUNG, B. YUAN, A. SUZUKI and AR. AKHMETZHANOV	134
Communicating the risk of death from novel coronavirus disease (COVID-19) T. KOBAYASHI, SM. JUNG, NM. LINTON, R. KINOSHITA, K. HAYASHI,	134

T. MIYAMA, A. ANZAI, Y. YANG, B. YUAN, AR. AKHMETZHANOV, A. SUZUKI and H. NISHIURA	
Assessing the impact of reduced travel on exportation dynamics of novel coronavirus infection (COVID-19) A. ANZAI, T. KOBAYASHI, NM. LINTON, R. KINOSHITA, K. HAYASHI, A. SUZUKI, Y. YANG, SM. JUNG, T. MIYAMA, AR. AKHMETZHANOV and H. NISHIURA	135
WQ-3810: A new fluoroquinolone with a high potential against fluoroquinolone-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Y. OUCHI, T. MUKAI, K. KOIDE, T. YAMAGUCHI, JH. PARKA, H. KIM, K. YOKOYAMA, A. TAMARU, SV. GORDON, C. NAKAJIMA and Y. SUZUKI . . .	135
<i>Mycobacterium triplex</i> pulmonary disease in an immunocompetent host: a case report and literature review M. SHIRATA, A. TAMARU, S. MARUMO and M. FUKUI	136
Genetic relatedness of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> isolates from bathrooms of healthy volunteers, rivers, and soils in Japan with human clinical isolates from different geographical areas K. ARIKAWA, T. ICHIJIRO, S. NAKAJIMA, Y. NISHIUCHI, H. YANO, A. TAMARU, S. YOSHIDA, F. MARUYAMA, A. OTA, M. NASU, DA. STARKOVA, I. MOKROUSOV, OV. NARVSKAYA and T. IWAMOTO	136
High prevalence of colistin-resistant <i>Escherichia coli</i> with chromosomally carried <i>mcr-1</i> in healthy residents in Vietnam T. YAMAGUCHI, R. KAWAHARA, K. HAMAMOTO, I. HIRAI, DT. KHONG, TN. NGUYEN, HT. TRAN, D. MOTOOKA, S. NAKAMURA and Y. YAMAMOTO . .	137
Foodborne outbreaks caused by <i>Clostridium perfringens</i> and its prevention (in Japanese) S. YONOGI	137
Evolutionary analysis of the VP1 and RNA-dependent RNA polymerase regions of human norovirus GII.P17-GII.17 in 2013–2017 Y. MATSUSHIMA, F. MIZUKOSHI, N. SAKON, Y.H. DOAN, Y. UEKI, Y. OGAWA, T. MOTOYA, H. TSUKAGOSHI, N. NAKAMURA, N. SHIGEMOTO, H. YOSHITOMI, R. OKAMOTO-NAKAGAWA, R. SUZUKI, R. TSUTSUI, F. TERASOMA, T. TAKAHASHI, K. SADAMASU, H. SHIMIZU, N. OKABE, K. NAGASAWA, J. ASO, H. ISHII, M. KURODA, A. RYO, K. KATAYAMA and H. KIMURA	138
An outbreak of rotavirus at a neonatal intensive care unit (NICU) in Osaka (in Japanese) N. SAKON, K. MOTOMURA, N. ISEKI, M. SHIOMI, D. MOTOOKA and S. NAKAMURA	138
Description of rotavirus detection in Osaka (in Japanese) N. SAKON, T. SHIRAI, K. MOTOMURA, T. NISHIO, M. TANABE, H. YOSHIDA and A. YAMAMOTO	139
A measles outbreak from an index case with immunologically confirmed secondary vaccine failure T. KURATA, D. KANBAYASHI, K. EGAWA, M. KINOSHITA, H. YOSHIDA, M. MIYAZONO and K. MOTOMURA	139
An epidemic of hand, foot, and mouth disease caused by Coxsackievirus A6 in Osaka city, Japan, in 2017 D. KANBAYASHI, A. KAIDA, Y. HIRAI, SP. YAMAMOTO, R. FUJIMORI, M. OKADA, H. KUBO and N. IRITANI	140
Ongoing rubella epidemic in Osaka, Japan in 2018–2019 D. KANBAYASHI, T. KURATA, H. KUBO, A. KAIDA, SP. YAMAMOTO, K. EGAWA, Y. HIRAI, K. OKADA, R. IKEMORI, T. YUMISASHI, A. YAMAMOTO, H. YOSHIDA, T. HIRAYAMA, K. IKUTA, and K. MOTOMURA	140

Clonal expansion and spread of the ceftriaxone-resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> strain FC428 identified in Japan in 2015 and closely related isolates	
K. LEE, S. NAKAYAMA, K. OSAWA, H. YOSHIDA, S. ARAKAWA, K. FURUBAYASHI, H. KAMEOKA, K. SHIMUTA, T. KAWAHATA, M. UNEMO and M. OHNISHI · · · · ·	141
Bejel, a nonvenereal treponematosi s, among men who have sex with men, Japan	
T. KAWAHATA, Y. KOJIMA, K. FURUBAYASHI, K. SHINOHARA, T. SHIMIZU, J. KOMANO, H. MORI and K. MOTOMURA · · · · ·	141
Estimating HIV-1 incidence in Japan from the proportion of recent infections	
S. MATSUOKA, M. NAGASHIMA, K. SADAMASU, H. MORI, T. KAWAHATA, S. ZAITSU, A. NAKAMURA, M. S. de SOUZA and T. MATANO · · · · ·	142
Revision of the laboratory manual for pathogen detection, “AIDS/HIV infection” (in Japanese)	
K. SADAMASU, M. NAGASHIMA, K. YOSHIMURA, T. KAWAHATA, T. SANO, M. KONDO, S. MATSUOKA, S. KUSAGAWA and A. TACHIKAWA · · · · ·	142
Bejel's pathogen <i>Treponema pallidum</i> ssp. <i>endemicum</i> first detected in Japan by molecular epidemiology analysis from a Japanese patient clinically diagnosed with syphilis (in Japanese)	
T. KAWAHATA, F. Banno, Y. KOJIMA, H. MORI, K. MOTOTMURA, J. KOMANO, K. SHINOHARA and K. FURUBAYASHI · · · · ·	143
Prevalence and genetic characterization of cephalosporin-resistant <i>Enterobacteriaceae</i> among dogs and cats in an animal shelter	
K. UMEDA, A. HASE, M. MATSUO, T. HORIMOTO, J. OGASAWARA · · · · ·	143
Prevalence and mechanisms of fluoroquinolone-resistant <i>Escherichia coli</i> among sheltered companion animals	
K. UMEDA, A. HASE, A. FUKUDA, M. MATSUO, T. HORIMOTO and J. OGASAWARA · · · · ·	144
Molecular characterization of <i>bla</i> _{KHM-1} encoding plasmid in an <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i> isolate from blood culture	
K. UMEDA, H. NAKAMURA, A. FUKUDA, T. YAMAGUCHI, Y. MATSUMOTO, D. MOTOOKA, S. NAKAMURA and R. KAWAHARA · · · · ·	144
Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus	
I. TAKAYAMA, M. NAKAUCHI, H. TAKAHASHI, K. OBA, S. SENBA, A. KAIDA, H. KUBO, S. SAITO, S. NAGATA, T. ODAGIRI and T. KAGEYAMA · · · · ·	145
Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rhinovirus detection	
M. NAKAUCHI, I. TAKAYAMA, H. TAKAHASHI, S. SENBA, S. SAITO, H. KUBO, A. KAIDA, K. OBA, S. NAGATA, T. ODAGIRI and T. KAGEYAMA · · · · ·	145
Co-isolation of influenza type A and B viruses from the same influenza patient specimen (in Japanese)	
H. KUBO · · · · ·	146
Metal tolerance of fungi growing in brass instruments (in Japanese)	
N. HAMADA, N. ABE and D. SAKUMA · · · · ·	146
<i>Ochroconis</i> species isolated from limestone areas as the origin of indoor <i>Ochroconis</i>	
N. HAMADA and N. ABE · · · · ·	147
A case of <i>Taenia saginata</i> infection from New Zealand and safe treatment with careful medical interviewing and gene analysis (in Japanese)	
R. MORITA, M. SHIRANO, I. KIMATA, T. BABA, N. ABE, Y. NAKAGAWA,	147

R. FUKUOKA, K. YAMANE, K. KONISHI, T. ASAOKA, H. NAKAGAWA, Y. KASAMATSU, T. GOTO, K. KUROKAWA, Y. FUJIKAWA and A. KANEKO . . .	
Molecular differentiation of five <i>Sarcocystis</i> species in sika deer (<i>Cervus nippon centralis</i>) in Japan based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (<i>cox1</i>) N. ABE, K. MATSUO, J. MORIBE, Y. TAKASHIMA, T. BABA and B. GJERDE . . .	148
Morphological and molecular characteristics of seven <i>Sarcocystis</i> species from sika deer (<i>Cervus nippon centralis</i>) in Japan, including three new species N. ABE, K. MATSUO, J. MORIBE, Y. TAKASHIMA, T. IRIE, T. BABA and B. GJERDE	148
Blowing in the wind: a unique aerial descent on a leaf in a caterpillar K. YAMAZAKI	149
Estimation of irradiation doses of raw beef liver samples using 5,6-dihydrothymidine as an irradiation marker T. FUJIWARA, N. FUKUI, Y. KITAGAWA, K. KAJIMURA, H. OBANA, E. ISHIKAWA, M. FURUTA and S. TAKATORI	149
Development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of the fungicide mepanipyrin and its metabolite S. MIYAKE, Y. HIRAKAWA, T. YAMASAKI, E. WATANABE, A. HARADA, K. ADACHI, S. IWASA and H. NARITA	150
Immunoassay for highly water-soluble nitenpyram: evaluating the analytical performance of an easy-to-use screening method for agricultural samples E. WATANABE, Y. HIRAKAWA, T. YAMASAKI, S. IWASA and S. MIYAKE	150
Simultaneous detection of six different types of pesticides by an immunosensor based on surface plasmon resonance S. MIYAKE, Y. HIRAKAWA, T. YAMASAKI, E. WATANABE, A. HARADA, S. IWASA and H. NARITA	151
Development of an LC-MS/MS-based analytical method for quantification of soybean allergen Gly m 4 in soybean grains and processed foods M. YOSHIMITSU, K. KİYOTA, K. KAJIMURA and T. YAMANO	151
Comparison of residual wheat allergen in three types of bowl material (in Japanese) H. HASHIMOTO, M. YOSHIMITSU and K. KİYOTA	152
Detection of food irradiation history by measuring of 5,6-dihydro-2'-deoxythymidine (in Japanese) S. TAKATORI, N. FUKUI, T. FUJIWARA, Y. KITAGAWA, K. KAJIMURA, E. ISHIKAWA and M. FURUTA	152
History and roles of the local institutes of public health and environmental studies (in Japanese) M. SHINYA	153
Headspace GC/MS analysis of residual solvents in laminated films used for food packaging (in Japanese) A. OZAKI, E. KISHI, T. OOSHIMA, N. KAKUTANI, Y. ABE, M. MUTSUGA and T. YAMANO	153
Latest trends in the regulation of food equipment, containers and packaging (in Japanese) A. OZAKI	154
Microplastics contamination in tidelands of the Osaka Bay area in western Japan S. NAKAO, A. OZAKI, K. YAMAZAKI, K. MASUMOTO, T. NAKATANI and T. SAKIYAMA	154

Concentrations of total mercury and methylmercury in red snow crabs (<i>Chionoecetes japonicus</i>) caught off the coast of Japan	S. KAKIMOTO, M. YOSHIMITSU, K. AKUTSU, K. KIYOTA, T. FUJIWARA, T. WATANABE, K. KAJIMURA and T. YAMANO	155
Determination of pesticide residue in agricultural products using mass spectrometer (in Japanese)	I. MIYAMOTO	155
Mechanisms of aggregation and fibril formation of the amyloidogenic N-terminal fragment of apolipoprotein A-I	C. MIZUGUCHI, M. NAKAGAWA, N. NAMBA, M. SAKAI, N. KURIMITSU, A. SUZUKI, K. FUJITA, S. HORIUCHI, T. BABA, T. OHGITA, K. NISHITSUJI and H. SAITO	156
Two-step FRET as a tool for probing the amyloid state of proteins	G. GORBENKO, V. TRUSOVA, T. DELIGEORGIEV, N. GADJEV, C. MIZUGUCHI and H. SAITO	156
Phosphatidylethanolamine accelerates aggregation of the amyloidogenic N-terminal fragment of apoA-I	N. KURIMITSU, C. MIZUGUCHI, K. FUJITA, S. TAGUCHI, T. OHGITA, K. NISHITSUJI, T. SHIMANOCHI and H. SAITO	157
Reduction of orange allergen Cit s 2 levels in fresh orange juice with pineapple bromelain enzymatic treatment	K. KIYOTA, M. YOSHIMITSU, K. KAJIMURA and T. YAMANO	157
Studies on LIGUSTRI FRUCTUS (In Jananese)	K. NISHIO, K. ARIMOTO, R. ISHIHARA, M. ITO, K. IMURA, M. OKASAKA, A. KAWABATA, E. SAKAI, Y. SHIMADA, Y. TAKAI, T. TAGAMI, K. TOKURA, R. NOMURA, H. MATSUDA, T. MATSUMOTO, Y. YAMAMOTO, T. YOKOKURA and M. YOSHIKAWA	158
Rapid quantification of <i>Escherichia coli</i> in potable water by fluorescence in situ hybridization performed in liquid (liq-FISH) and a microfluidic system	N. YAMAGUCHI and S. GOTO	158
Investigations on contamination of environmental water samples by <i>Legionella</i> using real-time quantitative PCR combined with amoebic co-culturing	A. EDAGAWA, A. KIMURA and H. MIYAMOTO	159
Association between indoor nitrous acid, outdoor nitrogen dioxide, and asthma attacks: results of a pilot study	M. OHYAMA, T. NAKAJIMA, C. MINEJIMA, K. AZUMA, K. OKA, Y. ITANO, S. KUDO and N. TAKENAKA	159
Occurrence and treatment efficiency of pesticide metabolites in water treatment plants in Osaka (in Japanese)	F. ADACHI, J. YOSHIDA, S. TAKAGI, Y. KOIZUMI, T. NAKAJIMA, M. KITAMURA, M. TORII, N. YOSHIDA, M. TSUCHIYA and N. YAMAGUCHI	160
Ensuring microbiological safety of living environment by on-site monitoring (in Japanese)	N. YAMAGUCHI	160
The detection and control of <i>Legionella</i> host amoeba from environmental water [12] Host free-living amoebae of <i>Legionella</i> (in Japanese)	A. EDAGAWA	161
The detection and control of <i>Legionella</i> host amoeba from environmental water [13] The detection of <i>Legionella</i> using amoebic co-culture (in Japanese)	H. INOUE and A. EDAGAWA	161

大阪府におけるエンテロウイルスの流行状況と分子疫学的解析 (2019 年度)

中田恵子, 本村和嗣

2019 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 Echovirus 30 (E30) が 67%、Coxsackievirus A6 (CV-A6) が 80%、CV-A6 が 50%と最も多かった。Viral Protein (VP) 1 領域が増幅できた E 30、CV-A6、CV-A16 系統樹解析の結果、E 30 は大きく二つのクラスターに分かれた。また、CV-A6 は直近の流行年度である 2017 年度の分離株の一部と同じクラスターを形成した。CV-A16 は、直近の流行年度である 2018 年度分離株よりも 2015 年度の分離株との方が近縁であった。各疾患の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、エンテロウイルス

毎年夏季に小児の患者数が増加するエンテロウイルス (Enterovirus; EV) 感染症の中で、無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において 5 類感染症の定点把握疾患に指定されている。各疾患の原因となるウイルスの遺伝子型は年毎に変動があり、患者から検出されるウイルスは疾患ごとに特徴がある¹⁾。また、ウイルス遺伝子型によっては中枢神経症状を引き起こす等、重症化との関連が疑われる²⁾ことや、流行するウイルス遺伝子型が一定の周期で繰り返す傾向が認められるため³⁾、流行を予測する観点から毎年の流行解析は重要である。本稿では、2019 年 4 月 1 日から 2020 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た患者検体から検出されたウイルスと患者の疫学情報を集約し、EV の流行状況とウイルスの分子疫学的解析を実施したので報告する。

調 査 方 法

1. 検体及び情報収集

2019 年 4 月 1 日から 2020 年 3 月 31 日の期間に、大阪府内の定点医療機関から当所に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギーナと診断された 51 名から採取された 62 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 12 検体、咽頭ぬぐい液が 43 検体、消化器由来検体 (糞便、腸内容物等) が 7 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 RD-A、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

送培地に浸漬した溶液（呼吸器検体溶液）を、髄液は無処理でそれぞれ 100 μ l ずつを各細胞に接種した。消化器由来検体は、緩衝液（LB バッファー）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を陰性と判定した。

3. 哺乳マウスによるウイルス分離

手足口病およびヘルパンギーナの患者由来検体については哺乳マウスを用いたウイルス分離を実施した。生後 72 時間以内の哺乳マウス 3 匹を 1 群とし、ウイルス分離用に上述のように処理した検体を頸部皮下に 5-10 μ l 接種した。その後、1 週間観察し、麻痺を呈した個体から筋肉部分を回収した。麻痺を起こさなかった場合、陰性とした。

「本研究における動物実験は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所動物実験委員会により承認された動物実験計画書に沿って、適切に実施した（承認番号 D-H30-2）。」

4. 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、Magratation®-MagaZorb RNA Common Kit（PSS 社）を用いて、全自動核酸抽出装置 Magratation® 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-PCR⁴⁾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、パレコウイルス A（Parechovirus A; Par-A）に対する RT-realtimePCR⁵⁾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-nestedPCR⁶⁾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。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 EV7) の VP1 領域に対する RT-PCR を実施した。得られた増幅産物に対し、ダイレクトシーケンスを行ない、BLAST 解析により遺伝子型別を行うとともに、近隣結合法を用いた系統樹解析を実施した。

5. 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 13 名で、年齢の中央値は 3 歳（範囲：0 か月-14 歳 1 か月）、性別は男性 9 名（69%）、女性 4 名（31%）であった。手足口病と診断された患者は 34 名で、年齢の中央値が 1 歳 9 か月（4 か月-4 歳 7 か月）、性別は男性 19 名（56%）、女性 15 名（44%）であった。ヘルパンギーナと診断された患者は 4 名で、年齢の中央値は 1 歳 8 か月（9 か月-12 歳 7 か月）、性別は男性 4 名（100%）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 51 名中、40 名（78%）の患者から EV、ライノウイルス（Rhinovirus ; RhV）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、62 検体中 47 検体（76%）であった。培養細胞による分離で陽性であったのは、15 検体（24%）であった。さらに手足口病およびヘルパンギーナ患者由来検体の合計 39 検体中、哺乳マウスによる分離を実施したのは 38 検体（Par-A が検出された 1 検体については実施せず）で、そのうち陽性となったのは 23 検体（61%）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 46%（6/13 名）から EV、または Par-A が検出され、検出された遺伝子型の内訳は、E 30 が 4 名、E18 および Par-A3 が各 1

表 1 無菌性髄膜炎患者由来検体におけるウイルス検出結果

	咽頭ぬぐい液 (n=5)		便(n=6)		髄液(n=12)	
	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養
E18	0	0	0	0	1	0
E30	3	2	4	4	3	2
Par-A3	0	0	1	0	0	0
合計 (%)	3 (60)	2 (40)	5 (83)	4 (67)	4 (33)	2 (17)

表 2 手足口病患者由来検体におけるウイルス検出結果

	咽頭ぬぐい液 (n=4)		
	遺伝子検査	分離培養	哺乳マウス
CV-A6	2	1	2
CV-B5	1	1	0
Par-A3	1	0	実施せず
合計 (%)	4(100)	2(50)	2(67)

表 3 ヘルパンギーナ患者由来検体におけるウイルス検出結果

	咽頭ぬぐい液 (n=34)			腸内容物(n=1)		
	遺伝子検査	分離培養	哺乳マウス	遺伝子検査	分離培養	哺乳マウス
CV-A6	24	2	21	0	0	0
CV-A16	5	3	0	0	0	0
RhV	1	0	0	1	0	0
合計 (%)	30(88.2)	5(14.7)	21(61.8)	1(100)	0	0

名から検出された (図 1)。検体別では、糞便から遺伝子検査でウイルスが検出された割合が 83%と最も多かった (表 1)。手足口病では、91% (31/34 名) の患者から EV または RhV が検出され、その遺伝子型の内訳は CV-A6 が 80% (24/31 名)、次いで CV-A16 が 17% (5/31 名)、RhV が 3% (1/31 名) であった (図 2)。同様に、ヘルパンギーナでは、100% (4/4 名) の患者から EV または Par-A が検出され、内訳は、CV-A6 が 50% (2/4 名)、次いで CV-B5 または Par-A3 が各 25% (1/4 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

無菌性髄膜炎患者からは 5 月に Par-A3 が、7、8、9 および 11 月に E30 が、9 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-A6 は 4 月から 7 月まで検出され、5 月の検出が多かった。それ以降は 8、9、12 月に CV-A16 が検出された (図 5)。ヘルパンギーナ患者では CV-A6 が 4 および 6 月に検出され、7 月には CV-B5、8 月には Par-A3 が検出された (図 6)。

4. E30、CV-A6 および CV-A16 の VP1 領域に対する系統樹解析

ウイルス抗原決定領域である VP1 領域の遺伝子解析が実施可能であった E30 の 8 株について 606 塩基の系統樹解析を実施した。その結果、6 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 年度の流行株と同じクラスターに属した (図 7)。一方で CV-A6 (656

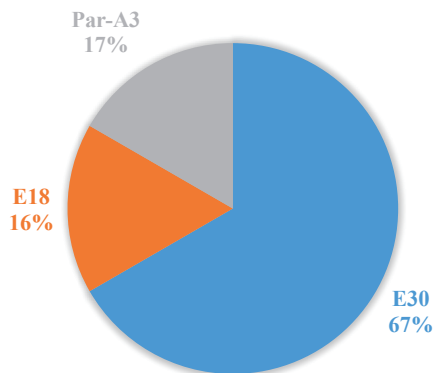


図 1 無菌性髄膜炎患者から検出されたウイルス遺伝子型 (n=6)

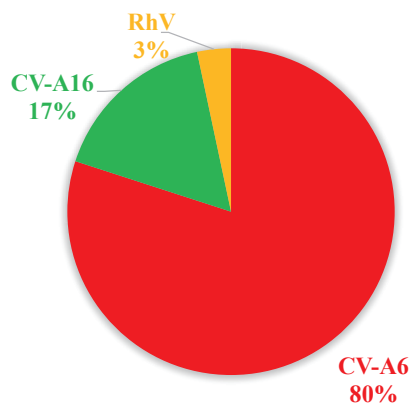


図 2 手足口病患者から検出されたウイルス遺伝子型 (n=31)

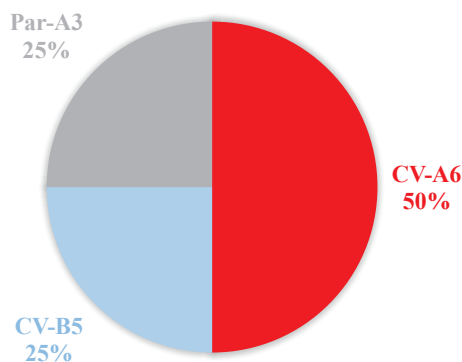


図 3 ヘルパンギーナ患者から検出されたウイルス遺伝子型 (n=4)

塩基)のVP1領域の遺伝子解析の結果、3株(2株は手足口病患者由来、1株はヘルパンギーナ患者由来)は2017年度当センター分離株や2017年、2018年の中国株と全て同じクラスターを形成した(図8)。また、CV-A16(593塩基)3株についてもCV-A6と同様に2019年株が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)。

考 察

国内では、長期間、無菌性髄膜炎の大規模な流行は発生していない。E30による無菌性髄膜炎の流行は、1983年以降複数回繰り返しているが、1998年以降は発生していない⁸⁾。そのため、E30に対する抗体を保有していない感受性者の割合の増加が推測され、大流行を引き起こす可能性がある。2019年度は複数の無菌性髄膜炎患者からE30が検出されたが、流行規模は大きくならなかった。E30の系統樹解析の結果、2019年度の分離株は、それぞれ直近の諸外国の株が含まれるクは、それぞれ直近の諸外国の株が含まれるクラスターと過去の国内株および当所分離株が含まれるクラスターに2つに分かれた。同じシーズン中であっても、異なる系統のE30が循環することが示された。系統によっては感染性や無菌性髄膜炎の発生割合が異なることが推測されるため、このような系統の変化が流行の規模と関係する可能性が考えられた。

無菌性髄膜炎は症候群として診断されることより一定の疫学的パターンをとらない。しかし、原因ウイルスにおけるEVの占める割合が高いため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⁹⁾。上述の流行状況を考慮すると、E30以外のEVに対しても、抗体を保有していない感受性者の割合の増加が推測される。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。

手足口病の患者からCV-A6が主に検出された。2011年度以降、CV-A6による手足口病は1年おきに流行を繰り返している¹⁰⁻¹⁴⁾。2019年度のCV-A6の検出の顕著な特徴としては、検出時期が例年と比較して早かったことが挙げられる。通常6月から7月に検出のピークを迎える

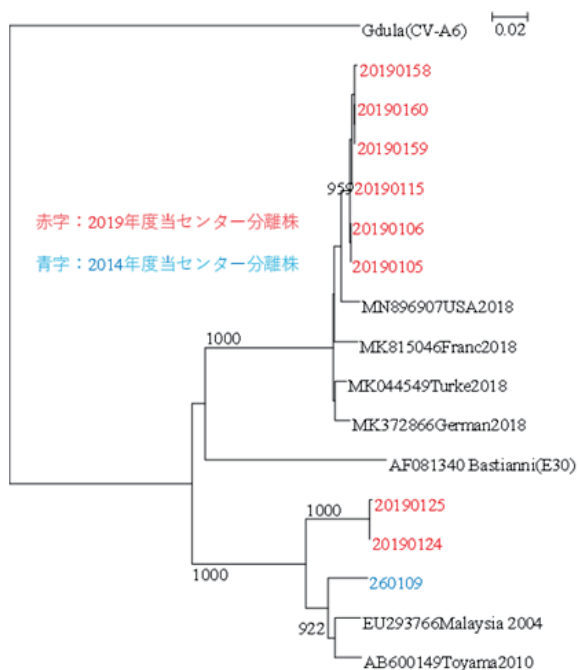


図 7 E30 の系統樹解析 (606nt)

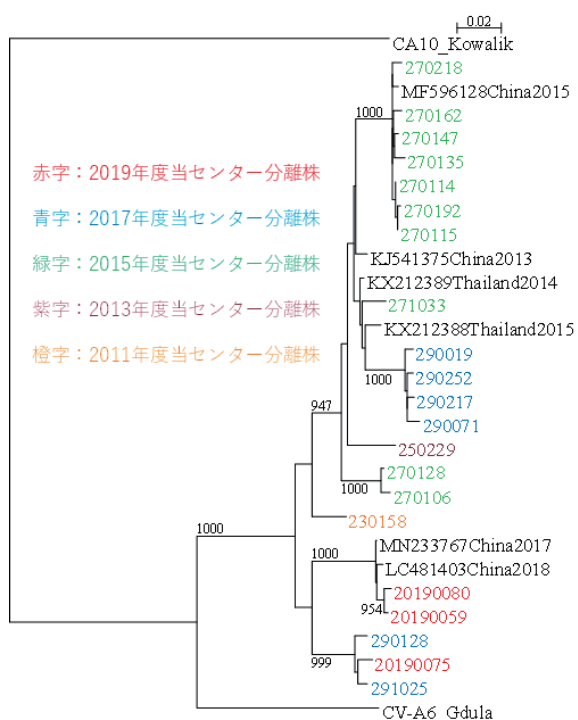


図 8 CV-A6 の系統樹解析 (656nt)

が 2019 年度は 5 月がピークとなり 7 月で検出は終了し、8 月以降は CV-A16 の検出へと変化した。検出時期が早期になった理由は不明ではあるが、系統樹解析では 2019 年度の流行株全てが 2017 年度流行株の一部を含めた一つのクラスター

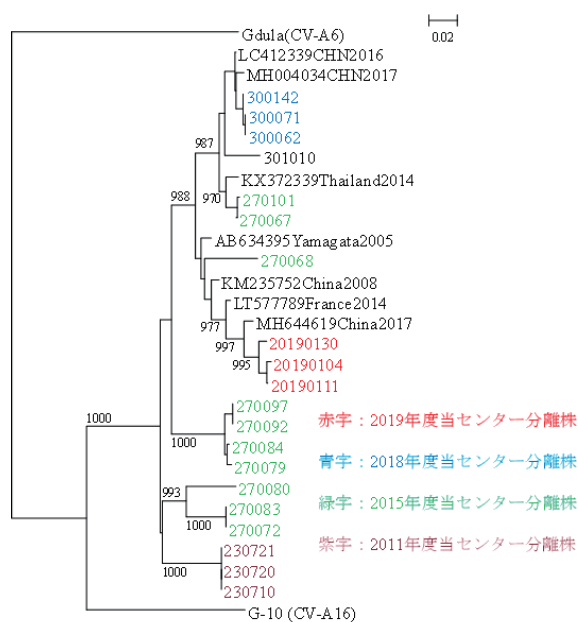


図 9 CV-A16 の系統樹解析 (593nt)

一に分類されたことから、流行毎にウイルス遺伝子に変異が徐々に起こり、感染性や病原性等の新たな特性を獲得している可能性が考えられた。

また、CV-A6 に関しては培養細胞での分離培養の割合が非常に低い一方で、哺乳マウスでの分離効率が 10 倍以上高かった (表 2)。哺乳マウスでのウイルス分離は、動物愛護の観点から、代替法がある場合は他の方法を用いることが望ましい。しかし、分離効率に大きく差がでる種があるため、流行株の保存を目的とした哺乳マウスでの分離を継続する必要があると考えられる。CV-A16 による手足口病についても、1-4 年程度の間隔で流行を繰り返している。系統樹解析でも 2019 年度分離株の全てが一つのクラスターに分類された。しかし、今年度分離された CV-A16 は、当センター分離の 2015 年度の株の一部および 2018 年度分離株が含まれるクラスターに含まれた。このことから、一部の 2015 年度流行株からウイルス遺伝子が徐々に変化して 2019 年度の流行型になったと考えられた。

2019 年度はヘルパンギーナの検体の搬入は 4 検体と非常に少なかったが、半数からは CV-A6 が検出された。CV-A6 による手足口病の流行シーズンでは、2011 年度以降同様にヘルパンギーナにおいても CV-A6 の検出が主であった。CV-A6 の感染によりヘルパンギーナと手足口病

のいずれも引き起こすと考えられる。

EV 感染症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。これまでのデータに加えて 2019 年度の解析結果からも、国内の EV 感染症の流行に海外からの輸入株が寄与していることが示唆された。従って、今後は国内の流行解析に加えて世界的な EV 感染症の動向を注視する必要があると考えられた。

EV 感染症は疾患ごとや年によって主なウイルス遺伝子型や系統樹解析から得られる遺伝子情報の傾向が異なる。EV 感染症は、流行する遺伝子型によって症状や疫学的動向も異なり、さらに、遺伝子型によっては特定の検出法を検討する必要があることから、引き続き複数の検査方法を用いて検査を継続することが重要である。また、流行状況に合わせた検査情報を発信し、流行予測および流行拡大の防止のための啓発に役立て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) Heinz Z, Hans-Peter G. Clinical virology manual third edition-Enteroviruses. *American Society for Microbiology*, Wasington, D. C; 2000. 252-69.
- 2) Jones E, Pillay TD, Liu F, Luo L, Bazo-Alvarez JC, Yuan C, Zhao S, Chen Q, Li Y, Liao Q, Yu H, Rogier van Doorn H, Sabanathan S. Outcomes following severe hand foot and mouth disease: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Paediatr Neurol*, doi: 10.1016/j.ejpn.2018.
- 3) Enterovirus and Parechovirus Surveillance - United States, 2014-2016. Abedi GR, Watson JT, Nix WA, Oberste MS, Gerber SI. Enterovirus and Parechovirus Surveillance - United States, 2014-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018; 67(18): 515-518.
- 4) 石古博昭, 島田康司, 興那覇麻理, 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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>.
- 9) Cherry JD, Shields WD. Aseptic meningitis and viral meningitis. In *Textbook of Pediatric infectious diseases* 4th Ed. Saunders, Philadelphia, 1998; 457-467.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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 (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.

- 14) 中田恵子, 本村和嗣. 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 感染流行状況と分子疫学的解析 (2018 年度) 大阪健康安全基盤研究所研究年報 (令和元年度). 2019; 9-16.

WEB サイトの内容は 2020 年 6 月 9 日に確認した

**Epidemic Situation and molecular-epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture
(Fiscal 2019 Report)**

Keiko NAKATA and Kazushi MOTOMURA

During April 2019 to March 2020, the most frequent viral types detected from patient specimens for aseptic meningitis, Hand-foot-and-mouth disease and herpangina were Echovirus 30 (E 30) (67%), Coxsackievirus A6 (CV-A6) (80%) and CV-A6 (50%), respectively. The phylogenetic trees constructed by using the partial VP1 region indicated that the Echo 30 strains of 2019 epidemic formed were divided into two clusters. CV-A6 strains were formed the same cluster with a part of 2017 epidemic strains in Osaka. The 2019 epidemic strains of CV-A16 were more closely related to the 2015 epidemic strains than the 2018 epidemic strain in Osaka. 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, Enterovirus

大阪府内における 2019/2020 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

大阪健康安全基盤研究所ウイルス課（以下当課）では、国の感染症発生動向調査事業の一環として、政令市を除いた大阪府内の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。

2019/2020 シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの流行は、2019 年第 47 週に定点あたり患者数が 1.0 を越え、2020 年第 4 週をピークとしてその後は減少した。今シーズンの流行を形成したタイプは、前半は AH1pdm09 亜型であり、後半は B 型の Victoria 系統が主流となった。AH3 亜型インフルエンザウイルスは 2019 年第 49、50、51 週に各 1 株ずつ合計 3 株検出されたのみであり、B 型の Yamagata 系統は検出されなかった。

検体採取医療機関にてインフルエンザと診断され当課へ搬入されたが、当課での検査の結果、季節性インフルエンザウイルスが検出されなかった検体数は少なく 12 検体であったが、その内の 5 検体からは他の呼吸器ウイルスが検出された。アデノウイルスは 4 検体から検出され、流行期が重なった場合の症状のみからの診断の難しさが示された。また、2 検体（1 検体はアデノウイルスとの共感染）からコロナウイルス OC43 が検出された。新型コロナウイルスは検出されなかった。流行期後半は新型コロナウイルスの流行と重なったが、新型コロナウイルス検出陽性はなかった。

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、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、流行時期に合わせ、毎年第 36 週（8 月末から 9 月始め）から翌年の第 35 週（8 月末）までの 1 年間をインフルエンザシーズンと定義されている。

インフルエンザに罹患すると多くは 1 週間程度で回復するが、高齢者においては肺炎、循環器疾患をはじめとする慢性基礎疾患の悪化による死亡者数の増加（超過死亡）の一因となっており、さらに小児科領域では脳症、肺炎など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¹⁾。インフルエンザワクチンは感染や発症そのものを完全に

は防御できないが、重症化や合併症の発生を予防する効果が証明されている²⁾。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解析および、流行株の分離、遺伝子型別を行っている。本研究では、2019/2020

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

シーズン（2019 年第 36 週から 2020 年第 20 週）の大阪府内のインフルエンザ流行状況に加え、分離株の性状解析、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。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

感染症発生動向調査事業に則り、大阪府感染症情報センターから発出される患者情報を用いた⁴⁾。

2. インフルエンザ病原体サーベイランス

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。2019/2020 シーズンのうち、2019 年第 36 週（9 月 2 日～9 月 8 日）から 2020 年第 14 週（3 月 30 日～4 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 145 検体について病原体の検出および遺伝子解析を行った。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 200μL を核酸抽出に供した。核酸抽出は MagDEA Viral DNA/RNA200 (GC) キット（プレシジョン・システムサイエンス社）を用い、全自動核酸抽出機にて行った。抽出した核酸はインフルエンザ診断マニュアル⁵⁾に従いリアルタイム RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出を行った。

インフルエンザウイルスの検出が陰性であった検体については、リアルタイム PCR 法による呼吸器ウイルスの検出を行った⁶⁾。エンテロウイルス (EV) およびライノウイルス (RV) は共通領域を検出するため、陽性となった場合は、核酸を用いて VP4-2 領域に対する semi-nested

RT-PCR を行い、増幅産物のダイレクトシーケンスにて遺伝子配列を決定し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 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 200μL の検体を接種し 34℃、30 分吸着後、分離用培地である 3μg/mL アセチルトリプシン (SIGMA) 添加 DMEM (SIGMA) 培地に交換し、34℃、5%CO₂ 存在下で 1 週間培養し細胞変性効果 cytopathic effect (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 AX-4 細胞に接種した。

CPE が陽性であった培養上清は、3μL を蒸留水にて 50 倍に希釈し、その 5μL を検体として、直接リアルタイム RT-PCR 法による HA 遺伝子の検出を行うことで型別とした。

型別により AH1pdm09 亜型と確認されたものは、ノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤に対する耐性変異の有無を調査するため、国立感染症研究所マニュアル⁹⁾に従い、リアルタイム RT-PCR 法を用いて NA 遺伝子の 275 番目アミノ酸の変異を確認した。同法は、抗インフルエンザウイルス薬であるノイラミニダーゼ阻害剤の薬剤耐性は、NA 遺伝子の 275 番目アミノ酸の変異により獲得されることが明らかとなっている点を利用し、アミノ酸変異部位に相当する 823 番目の塩基変異を検出するリアルタイム PCR 法を用いて検出している。すなわち、感受性または耐性変異を有する場合の 823 番目の塩基と結合するプローブをそれぞれ混和してリアルタイム RT-PCR 法を行う事により、結合したプローブの開裂により発生する蛍光を検出する事で変異の有無を確認することが可能である。分離株の培養上清を 10 倍に希釈したものを検体として用い、同法による耐性変異の検出を実施した。同法で確認不可能だった 4 株については RNA を抽

出後、NA 遺伝子の全長の塩基配列を決定し、アミノ酸変異の有無を解析した。

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は、GISRS の一環として、病原体検出情報システムに登録した全国の分離株情報をもとに、無作為抽出により抽出した株の分与を各地方衛生研究所に依頼し、分与株の詳細な抗原性解析や遺伝子解析を行なっている。これらのデータは WHO および国内のインフルエンザ流行予測、ワクチン株選定の資料となる他、地方衛生研究所へと還元されている。インフルエンザウイルスの HA 遺伝子の系統樹解析データ、抗原性解析データについては、当課の分与株に関して国立感染症研究所より還元された解析結果を用いた。

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 1402-02-2）、「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. インフルエンザ定点サーベイランス、病原体サーベイランスに基づく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

2019/2020 シーズンにおいて、インフルエンザ流行期入りの目安となる「定点あたりの患者数」が 1 を超えたのは、2018/2019 シーズンより 1 週早く第 47 週（11 月 18 日～11 月 24 日）であった。定点あたり患者数が 30 を超えた警報域の週は認められず、2020 年第 4 週にピークの 21.19 となった後は速やかに患者数が減少した（図 1）。府内の 2018/2019 シーズンの流行と比較すると、ピークに達するまでの患者数の急激な増加傾向は同程度であったが、ピーク時の患者数は少なく、ピーク後は急速に患者数の減少がみられたため、全体の患者数も 2018/2019 シーズンより減少した¹²⁾。

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、2019 年第 36 週～2020 年第 14 週までに採取され、当所に搬入された 145 検体のうちで、AH1pdm09 亜型 91 検体、AH3 亜型 3 検体、B 型 Yamagata 系統 0 検体、B 型 Victoria 系統 39 検体が陽性であり、今シーズンの流行は大

きく分けて前半は AH1pdm09 亜型、後半は B 型 Victoria 系統により形成されたことが伺えた。我々は、昨年度の研究年報にて 2018/2019 シーズンの大阪府内でのウイルス検出状況は全国での検出状況の集計と異なり AH1pdm09 亜型が多く検出された¹²⁾ことを報告した。しかしながら、2019/2020 シーズンは全国集計と同様に、検出された A 型インフルエンザウイルスはほとんどが AH1pdm09 亜型であった。

2. 分離株の解析

当課からは AH1pdm 亜型については 2019 年第 37 週に発生した学級閉鎖事例検体からの分離株、第 40 週、第 46 週、第 51 週の散発事例検体からの分離株それぞれ 1 株ずつが国立感染症研究所へ分与されており、当該分与株に関して国立感染症研究所での解析結果が還元されている。国立感染症研究所で実施された HA 全長のシーケンスによる系統樹解析の結果¹¹⁾によると、昨年度の時点ではサブクレード 6B.1A の中に S183P の共通アミノ酸変異を含む複数の群がそれぞれ 183P-1～183P-7 まで形成され、大阪府内の 2018/2019 シーズン分離株も、全国的に検出割合の高かった 183P-2、4 および 5 に属していた¹²⁾が、2019 年 9 月以降の全国分離株は 183P-5 に属し、99%が 183P-5 に加え N129D + T185I 変異を持つ 183P-5A に、1%が 183P-5 に加え K130N + K160M + T216K + E235D + H296N + V520A 変異を持つ 183P-5B に分けられた¹¹⁾。大阪府内の 2019/2020 シーズン分離株 4 株も、全国の 99%を占めた 183P-5A に属した。

AH3 亜型ウイルスについて、全国分離株の遺伝子解析によると、2019/2020 シーズンの国内分離株の HA 遺伝子は、全てサブクレード 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) から派生した 3C.2a1b (N121K+K92R+H311Q) に属している。3C.2a1b は 3C.2a1b+I35K (E62G+R142G+T135K) に 64%、または 3C.2a.1b + I31K 群 (E62G + T131K + V529I) に 36%が属した¹¹⁾。2019/2020 シーズンの当課からの第 49 週、第 51 週分離株 2 株について還元された解析結果によると、どちらも 3C.2a1b+I35K 群に派生した 3C.2a1b+I35K+I37F 群 (T128A+S137F+A138F+F193S) に属していた。

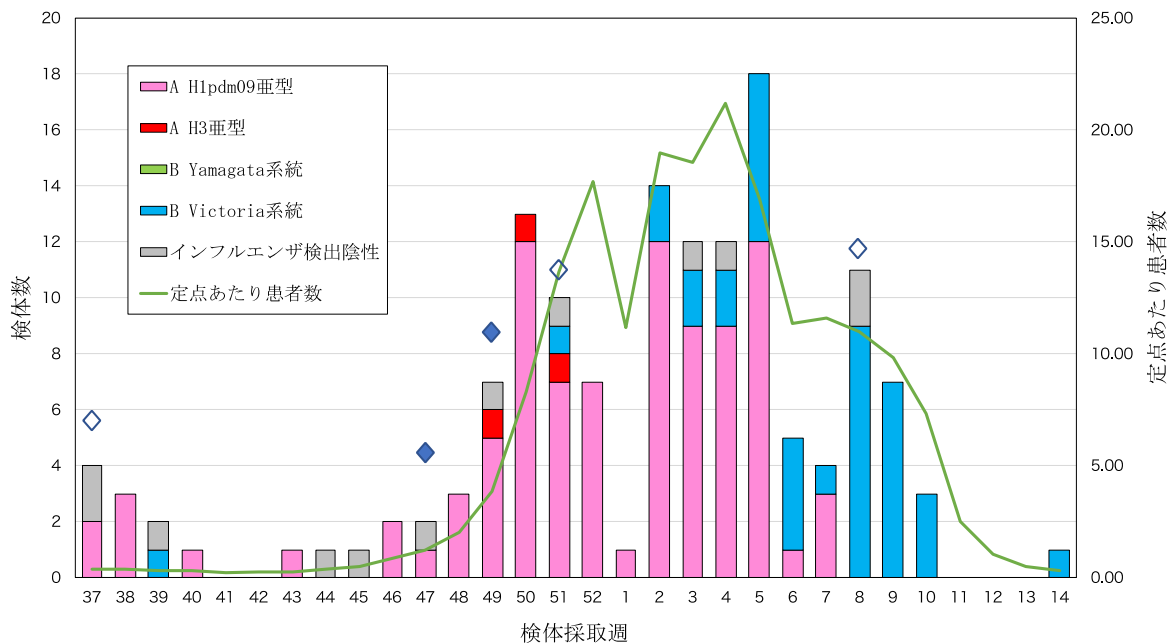


図 1. 2019 年第 37 週～2020 年第 14 週のインフルエンザウイルス検出状況と定点あたり患者数の推移

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 種以上重複して（◆）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。

2019 年 9 月以降の全国の変異株の 56%がこの群に属している。

同時に還元された抗原解析について、「インフルエンザ株サーベイランス抗原性解析」においては、「AH1pdm09 亜型は、HI 試験で A/Brisbane/02/2018 細胞分離株のホモ価から 8 倍以上の反応性の低下を示した株を抗原性が異なる株とみなす。」「AH3 亜型については、マイクロ中和法にて A/Kansas/14/2017 細胞分離株とこれに対する血清との中和抗体価（ホモ価）に比べて、同血清との反応性が 8 倍以上低下した株を抗原性が異なる株とみなす。」と定義されている。AH1pdm09 亜型については当課の分離株 4 株全てが類似株であった。AH3 亜型については、2 株はいずれも抗原変異株と判定された。

NA 遺伝子について、AH1pdm09 亜型ウイルス分離株に対しては、抗インフルエンザウイルス薬である NA 阻害剤の薬剤耐性を、NA 遺伝子の 275 番目アミノ酸の変異、すなわち 823 番目の塩基変異を検出するリアルタイム PCR 法を用いて

検出している（図 2）。

2019/2020 シーズンの AH1pdm09 亜型ウイルス分離株 63 株のうち、59 株はリアルタイム PCR 法にて感受性株と判定されたが、4 株は判定不可能であった。4 株について NA 遺伝子のシーケンスを行い塩基配列を確認したところ、4 株全てで 831 番目の塩基が G から A（相補鎖においては C から T：図 2 参照）に変異していたことが明らかとなった。この部位は検出プローブが結合する 13 塩基部位の 9 番目に相当するため検出プローブが結合できなかったことで判定不能となったと考えられた（図 2）。

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

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、2019/2020 シーズン流行期には 12 検体あった（表 1）。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

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
2019年	第37週	アデノウイルス
	第47週	パラインフルエンザウイルス1型 + B群ライノウイルス83型 + アデノウイルス + C型インフルエンザウイルス
	第49週	ヒトコロナウイルスOC43 + アデノウイルス
	第51週	ヒトコロナウイルスOC43
2020年	第8週	アデノウイルス

いた患者の検体は 12 検体中 5 検体、キット陰性が 6 検体、キット未実施が 1 検体あり、キット陽性例でインフルエンザウイルス以外のウイルスが検出されたのは 1 検体のみであった。

最も多く検出されたのはアデノウイルスで、4 検体より検出された。次いでヒトコロナウイルス OC43 が 2 検体より検出された。1 検体はアデノウイルスとの重複感染であった。1 検体からは、パラインフルエンザウイルス 1 型、B 群ライノウイルス 83 型、アデノウイルス、C 型インフルエンザウイルスが同時に検出された。新型コロナウイルスが検出された検体はなかった。

考 察

2019/2020 シーズンの大阪府内におけるインフルエンザの流行は、昨シーズンより 1 週早く第 47 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。患者数はその後増加したが 2020 年第 4 週に定点あたり患者数が 21.2 となったのを境に減少に転じた。昨シーズンと比較し定点あたり患者数が 30 を超えた警報域の週はなく、2020 年 1 月中旬より中国で発生した新型コロナウイルス感染症の拡大と反比例するように小規模の流行となった。これは、新型コロナウイルスの感染拡大防止策として、一般的な飛沫感染防止策（手洗い実施、マスク着用）が徹底された事や、3 月 2 日（第 10 週）から全国すべての小学校、中学校、高等学校、特別支援学校について臨時休業が行われた事による小児、学童間の伝播機会の減少の影響が大きかつ

たとえられる。さらに、3 月 11 日に厚生労働省より「新型コロナウイルス感染症が疑われる者の診療に関する留意点」が各都道府県に対して発出された事を受け、日本医師会が感染防護具の不足している現状を鑑み、検体採取を行う医師のコロナウイルス感染のリスクを軽減するため、臨床的にインフルエンザと診断した場合「迅速診断なしに治療薬を処方することを検討する」と要請したことでインフルエンザの検体採取が回避されるようになった。そのため、患者数、検体数は第 10 週以降激減している（図 1）。また、2 月以降は医療機関から当課へ「インフルエンザ迅速診断キット陰性だが、発熱、呼吸器症状があるため新型コロナウイルス感染を疑っている。」との連絡も散見された。2019/2020 シーズン以前では「迅速診断キット陰性である患者は他の風邪様疾患」と認識されていたものが、2019/2020 シーズンは「迅速診断キット陰性である患者は新型コロナウイルス感染疑い」との認識に変化した。結果として、実際には新型コロナウイルスの患者数がかなり少なかった 2020 年初頭から、例年のインフルエンザ病原体サーベイランスとは異なる検体採取様式、患者背景となった事が推察された。

ウイルス分離に供する細胞に関して、昨年度までの検討でウイルス分離率は A 型の各亜型ともに AX-4 細胞が優れており、B 型については両方で差がなかったことが明らかとなったため、2019/2020 シーズンは AX-4 細胞のみを使用した。当課に搬入されるインフルエンザ様疾患の検体は、医療機関にて迅速診断の結果陽性であ

ることが明らかなものが多く、迅速診断で陰性と表記されている検体も含めた 145 検体に対する AX-4 細胞を用いた分離率は 91.7%と良好であった。

2019/2020 シーズンの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、全国データでは AH1pdm09 亜型と B 型 Victoria 系統が主となっており、大阪府内も同様であった。全国的に AH3 亜型の検出が少なかったことから、次シ

ーズンは AH3 亜型に対する感染抗体の保有率が低くなることが予想される。加えて、国立感染症研究所から還元された抗原解析結果においても、AH3 亜型は解析したほぼ全ての株において、WHO のワクチン推奨株である A/Kansas/ 14/2017（細胞分離株および鶏卵分離株）に対するフェレット感染血清と反応性の低下が認められたことが報告されており、次シーズンの流行が大きくなることが危惧される。

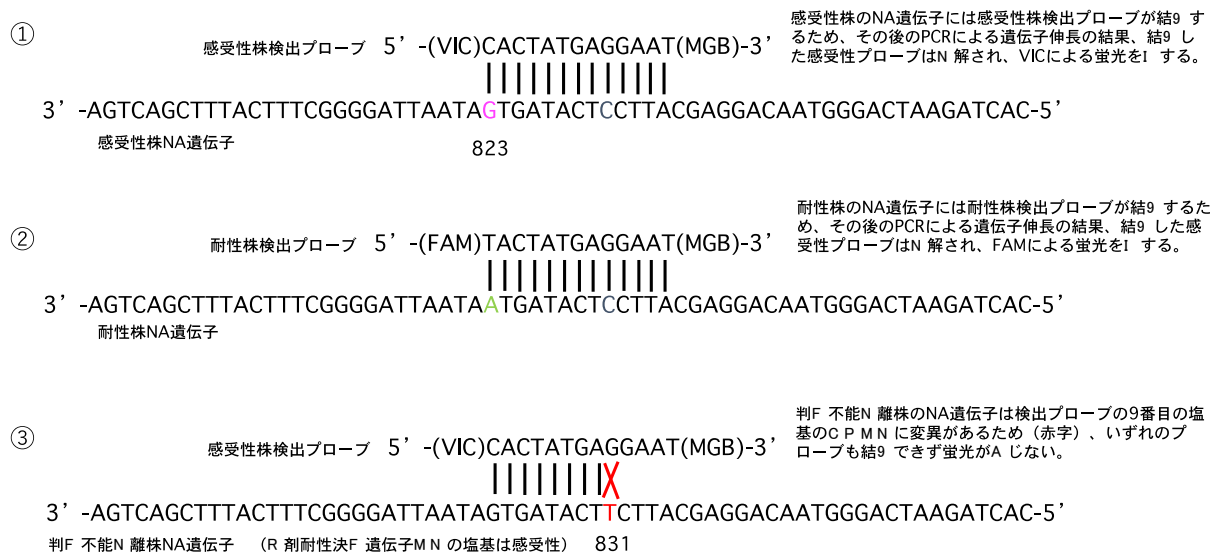


図 2. NA 阻害剤感受性検出用プローブの検出原理と結合位置

2019/2020 シーズンの AH3 亜型のワクチン株は A/Kansas/14/2017 株であり、系統樹解析ではクレード 3C.3a に属している。我が国におけるサーベイランスデータの結果を含めた各国の抗原解析結果を受け、WHO は 2020/2021 シーズンのワクチン株は多くの分離株が占めるクレード 3C.2a1b + 135K + 137F に属する A/Hong Kong/ 2671/2019 を推奨株とした^{13,14)}。次シーズンの流行を大規模なものにしないためにはワクチンによる抗体保有率の引き上げが重要だと考えられた。

今年度は府内分離株を用いた A 型分離株 HA 遺伝子の系統樹解析を実施できなかったが、全国の系統樹解析の還元結果から、AH1pdm 亜型については大阪府内の 2019/2020 シーズン分離株は 4 株全て全国での解析株の 99%が属するクレード 183P-5A に属し、AH3 亜型については、大阪府内の 2 株は 2019 年 9 月以降の全国の分離

株の 56%が属している、クレード 3C.2a1b+135K +137F 群に属していたことがわかった。AH3 亜型ウイルスは 2019/2020 シーズンは 3 検体から検出されているが、分離株は国立感染症研究所へ分与された 2 株が得られたのみであった。府内で他の群に属するウイルスが流行していたかどうかは不明であるが、次シーズンワクチン推奨株も同クレードに属しており、他のクレードから派生した株が流行してくるのか注目されるため、今後も府内分離株の系統樹解析を継続していきたい。

AH1pdm 亜型については、全国分離株のほとんどが 183P-5A に属しており、次シーズンに他のクレードの株が大きく流行する可能性は低いと考えられる。しかしながら、NA 遺伝子について、NA 阻害剤感受性検査のプライマー部位の変異株が少数認められたことから、今後同じ変異を持つウイルスの動向に注意が必要である。

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由来の検体を含め 12 検体であった。インフルエンザウイルス以外の呼吸器ウイルスが検出された検体は例年と異なり、インフルエンザの流行期中に少なく、流行の前後に存在していた。低年齢では 2 つ以上のウイルスが共感染している割合が高いことが知られているが¹⁵⁾、今回 4 歳男児の咽頭拭い検体から 4 種のウイルス（パラインフルエンザウイルス 1 型、B 群ライノウイルス 83 型、アデノウイルス、C 型インフルエンザウイルス）が同時に検出された。検体より遺伝子を検出しているため、検体採取時にどのウイルスが患者体内で増殖しており病因となっているのかは不明である。上記の 12 検体からは新型コロナウイルスは検出されなかった。検体採取時期と COVID-19 の流行のピーク時期がずれていることが大きな要因と考えられた。

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 2020- 2021

northern hemisphere influenza season.
https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2020-21_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) 国立感染症研究所. H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法. 2010 年 9 月 ver.1. コア・サポート地衛研検討用) 3-31.
- 10) 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 2020 年 6 月 5 日作成)
<https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data2j.pdf>.
- 11) 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 (2020 年 2 月 20 日)」. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-antigen-phylogeny.html>
- 12) 森川佐依子, 廣井聡, 本村和嗣. 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. *大阪健康安全基盤研究所 研究年報* 2019; **3**: 17-25.
- 13) 国立感染症研究所. 2019/20 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) 第5回厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会研究開発及び生産・流通部会
季節性インフルエンザワクチンの製造株について検討する小委員会 資料
https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000203023_00005.html
- 15) Morikawa S, Kohdera U, Hosaka T, Ishii K, Akagawa S, Hiroi S, Kase T. Seasonal variations of respiratory viruses and etiology of human rhinovirus infection in children. *J Clin Virol* 2015; **73**: 14-19.

WEB サイトの内容は 2020 年 6 月 8 日に確認した。

Influenza epidemic situation during the 2019/2020 season in Osaka prefecture

Saeko MORIKAWA, Satoshi HIROI and Kazushi MOTOMURA.

The isolation of influenza viruses and detection of the viral genome 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 2019/2020 influenza season in Osaka prefecture, influenza activity increased in the 47th week in 2019, peaked in the 4th week in 2019 and decreased. In this season, influenza AH1pdm09 subtype virus predominated followed by influenza B Victoria lineage virus. Influenza AH3 subtype virus was detected one of each in the 49th week, 50th week, and 51st week of 2019, and influenza B Yamagata lineage virus was not detected.

We also tested 12 influenza virus negative specimens for other respiratory viruses. Respiratory viruses other than influenza virus were detected in 5 samples, 4 of which were positive for adenovirus. This result indicates that it is difficult to distinguish between adenovirus infection and influenza based on clinical symptoms. Human coronavirus OC43 was detected in two specimens, but SARS coronavirus 2 was not detected.

Key words : influenza virus, infectious agents surveillance, 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 (2019 年度)

青山幾子, 池森 亮, 横田正春, 弓指孝博

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対するサーベイランス事業を実施している。

2019 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（9 種 4,648 匹、439 プール）について蚊媒介ウイルスの検出を試みたところ、1 プールで日本脳炎ウイルスが検出された。ウエストナイルウイルス、デングウイルス、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 3 羽についてウエストナイルウイルスの検出を試みたが、ウイルスは検出されなかった。検出された日本脳炎ウイルス（JaOAr-Y349/Japan/2019/Mosquito）は、系統樹解析の結果、近年国内で流行している Genotype I 型に属していた。

キーワード：蚊媒介感染症、媒介蚊、サーベイランス、日本脳炎ウイルス

蚊媒介感染症とは、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、ウエストナイル熱および黄熱や、原虫感染症であるマラリアなどがある。そのうち、日本に常在する感染症は、現在、日本脳炎のみであり、それ以外は海外からの輸入感染症である。2019 年、デング熱が世界的に大流行し、日本での患者報告数は過去最高の 461 人となり、2014 年の国内流行（国内感染者 262 人）を含む患者報告数 341 人をはるかに上回った¹⁾。また、2019 年に海外ではチクングニア熱の流行も起こり²⁾、国内の患者報告数も過去最高の 49 人であった¹⁾。日本国内にはこれらの病原体を媒介可能な種類の蚊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。

大阪府では蚊が媒介するウイルス性感染症の浸淫状況を監視するため、2003 年度に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、蚊のサーベイランス調査や、侵入後の対応を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、デング熱および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い、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、カラスはウエストナイルウイルス（WNV）の感受性が高く、WNV 感染による致死率が高いため、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⁾、死因が不明であるカラスの死骸が同定点で 2 羽以上確認された場合、そのカラスについて WNV 検査を実施している。ここでは 2019 年度の調査結果について報告する。

調 査 方 法

1. 捕集定点および調査実施期間

大阪府管内、東大阪市内、高槻市内、豊中市

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

内、枚方市内、八尾市内並びに寝屋川市内に計 29 カ所の定点を設定し（図 1）、2019 年 6 月第 4 週から 10 月第 1 週（東大阪市および高槻市は 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。定点 7、8、9 および 10 について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 に設定した。また枚方市の 4 定点では水曜日の午前中に 8 分間ヒト図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、ウイルスを媒介する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 匹を超えた場合は、50 匹ごとに複数のプールに分割した。その後、各検体は遺伝子検査時まで -30℃ 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）およびジカウイルス（ZIKV）、並びに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。WNV は多くの蚊の種類が媒介種となるため、捕集された全ての種類の蚊について遺伝子検査を実施し、

	番号	定点名	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	寝屋川市
	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	
	26	岸和田市	岸和田
	27	貝塚市	
	28	泉佐野市	泉佐野
	29	阪南市	

図 1 蚊の捕集地点

CHIKVは媒介種となるヒトスジシマカについて実施した。JEV、DENV、ZIKVはフラビウイルス共通領域を用いてWNV遺伝子検査の際に同時に検出を試みた。

蚊の破碎は、2mLのマイクロチューブに検体と滅菌したステンレス製クラッシャーを入れ、0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）加ハanks液を250 μ L加えた後、多検体細胞破碎装置（シェイクマスターVer1.2システム、バイオメディカルサイエンス）で約1分間振とうして行った。破碎後、マイクロチューブをスピンドアウンしてからクラッシャーを除去し、0.2%BSA加ハanks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℃13,000 $\times$ gで15分間遠心し、その上清を0.22 μ mまたは0.45 μ m Millex フィルター（ミリポア）で濾過したものを蚊乳剤とした。このうち150 μ Lを用いてE.Z.N.A. Viral RNA Kit（OMEGA bio-tek）を使用して50 μ LにRNAを抽出した。

RT-PCRはOne stepで実施し、RNA抽出液2.5 μ LにEmeraldAmp® PCR Master Mix（TaKaRa）12.5 μ L、逆転写酵素（Super Script III、Thermo Fisher）0.15 μ L、Forwardプライマー及びReverseプライマー（25 μ M）各0.2 μ L、リボヌクレアーゼ阻害剤（40U/ μ L、TaKaRa）0.1 μ Lを加え、蒸留水を加えて最終液量25 μ Lに調製した。これをサーマルサイクラー（DICE、TaKaRa）にセットし、53℃ C10分間の逆転写反応後、92℃ C1分、53℃ C1分、72℃ C1分のPCR反応を40回繰り返した。反応産物10 μ Lを1.5%アガロースで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によりバンドを確認した。

プライマーは、フラビウイルス共通プライマー（FU1/cFD2）¹¹⁾、WNV特異的検出プライマー（WNNY 514/904）¹²⁾、DENV特異的検出プライマー（Dus/Duc）¹³⁾、及びCHIKV特異的検出プライマー（chik10294s/ 10573c）¹⁴⁾を用いた。DENVはFU1/cFD2で検出可能であるが、媒介種となるヒトスジシマカについて、検出感度の良いDus/Ducを追加で使用した。また、FU1/cFD2で陽性バンドが検出された場合は、増幅部位であるフラビウイルス共通領域の非構造タンパクNS5領域について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。さらに、同定したウイルス種について特異的なプライマーを用いて確認検査を実施した。今回は、確認検査として、JEV Genotype 共通プライマー（JENS5s269/JENS5p294 / JENS5r330）、JEV Genotype I型検出用プライマー（JE1&3en1052s-1082 / JEen1082pb / JE1en1119c-1082）、JEV Genotype III型検出用プライマー（JE1&3en1052s-1082/ JE3en1082pb / JE3en1119c-1082）の3種のプライマーセットを用いてリアルタイムRT-PCRを実施した¹⁵⁾。また、JEVのエンベロープ（E）領域におけるJEV特異的検出プライマー（JE8K/JEER、nJE8K/nJEER）を用いてRT-nested PCRを行った¹⁶⁾。得られた塩基配列をもとに、最尤法（Kimura 2-parameter model）を用いて系統樹解析を実施した。

4. カラスからのウイルス検出

死因が不明なカラスの死骸が同地点で2羽以上確認され、死骸の回収時に腐乱やハエのウジの発生がなく新鮮な状態であった場合WNV検査を実施した。死亡カラスは、解剖して採脳した後、0.2%BSA加ハanks液を用いてカラスごとに10%脳乳剤を作製し、蚊と同様にRNA抽出並びにRT-PCRを実施し、WNV遺伝子の検出を試みた。

結 果

1. 蚊の捕集結果について

捕集された雌の蚊は9種4,648匹であった。そのうち2匹は破損が大きく種の同定に至らなかった。捕集蚊の構成は*Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus*（ヒトスジシマカ）が3,123匹と捕集数が非常に多かった。ヒトスジシマカとアカイエカ群1,196匹の2種で捕集蚊全体の92.9%を占めた（図2）。次いで*Culex tritaeniorhynchus*（コガタアカイエカ）292匹、*Anopheles sinensis*（シナハマダラカ）20匹、*Armigeres subalbatus*（オオクロヤブカ）9匹、*Tripteroides bambusa*（キンバラナガハシカ）4匹、*Culex bitaeniorhynchus*（カラツイエカ）1匹、並びに*Uranotaenia novobscura*（フタクロホシチビカ）1匹が捕集された。

調査期間を通じた捕集数の推移をみると（図3）、アカイエカ群は、調査期間を通して常に捕集され、捕集数の推移は調査開始時期をピーク

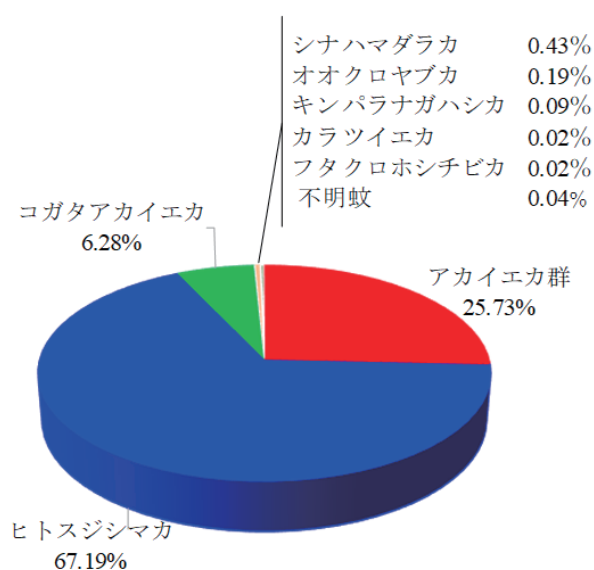


図2 捕集された蚊の比率

としてなだらかに減少した。また、ヒトスジシマカも、調査期間を通して常に捕集され、8月と9月に二峰性のピークを示した。また、コガタアカイエカは、7月末をピークとしてその後減少したが、調査期間中はほぼ毎回捕集された。

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ものの、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、守口、東大阪東、泉大津および和泉において多く捕集され、この傾向は守口を除き、昨年度と同様であった。アカイエカ群は多くの定点で捕集され、捕集数の多かった豊中（b）、東大阪東並びに泉大津では6月と7月に二峰性が見られたが、多くの地点では調査開始の6月をピークとして捕集数はなだらかに減少した。また、枚方（北、南）の2定点では昨年度と同様にアカイエカが捕集されなかった。コガタアカイエカは18定点で捕集され、2003年に開始したサーベイランス調査のなかでは、最も多い捕集定点数であった。シナハマダラカは四條畷、東大阪東、八尾東、貝塚並びに阪南の5定点、オオクロヤブカは富田林、和泉、貝塚の3定点、キンバラナガハシカは和泉、貝塚の2定点、カラツイエカは豊中（f）の1定点、フタクロホシチビカは豊中（e）の1定点において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427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、1プール（プール番号349、以下No.349）においてFU1/cFD2で増幅バ

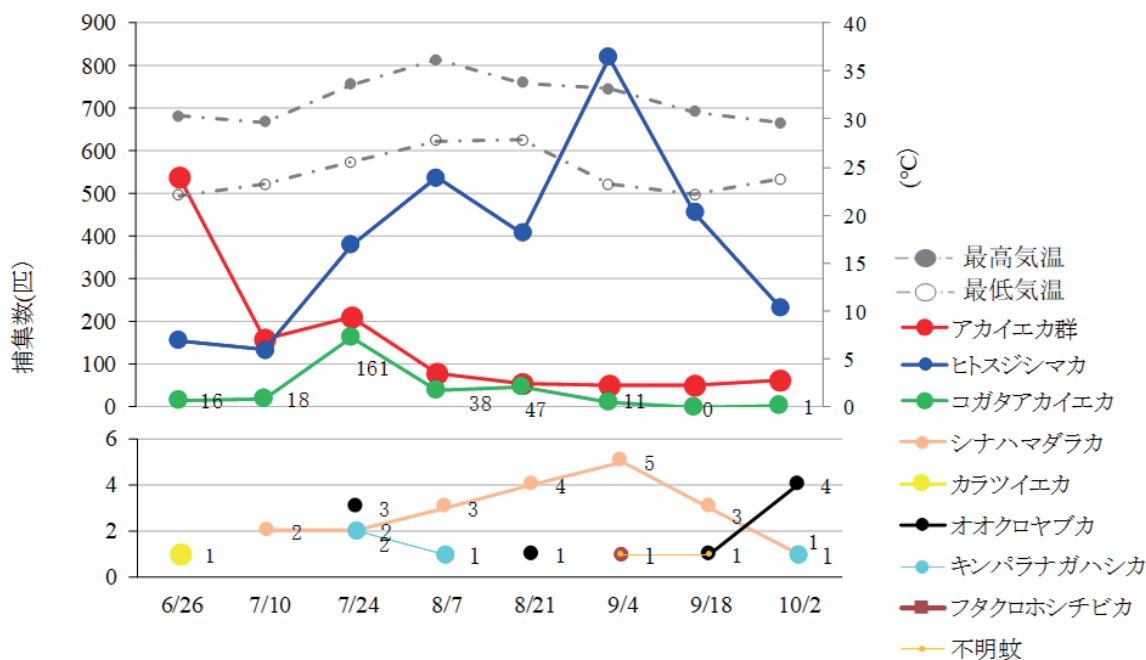


図3 蚊の捕集数の推移

蚊
の
捕
集
数

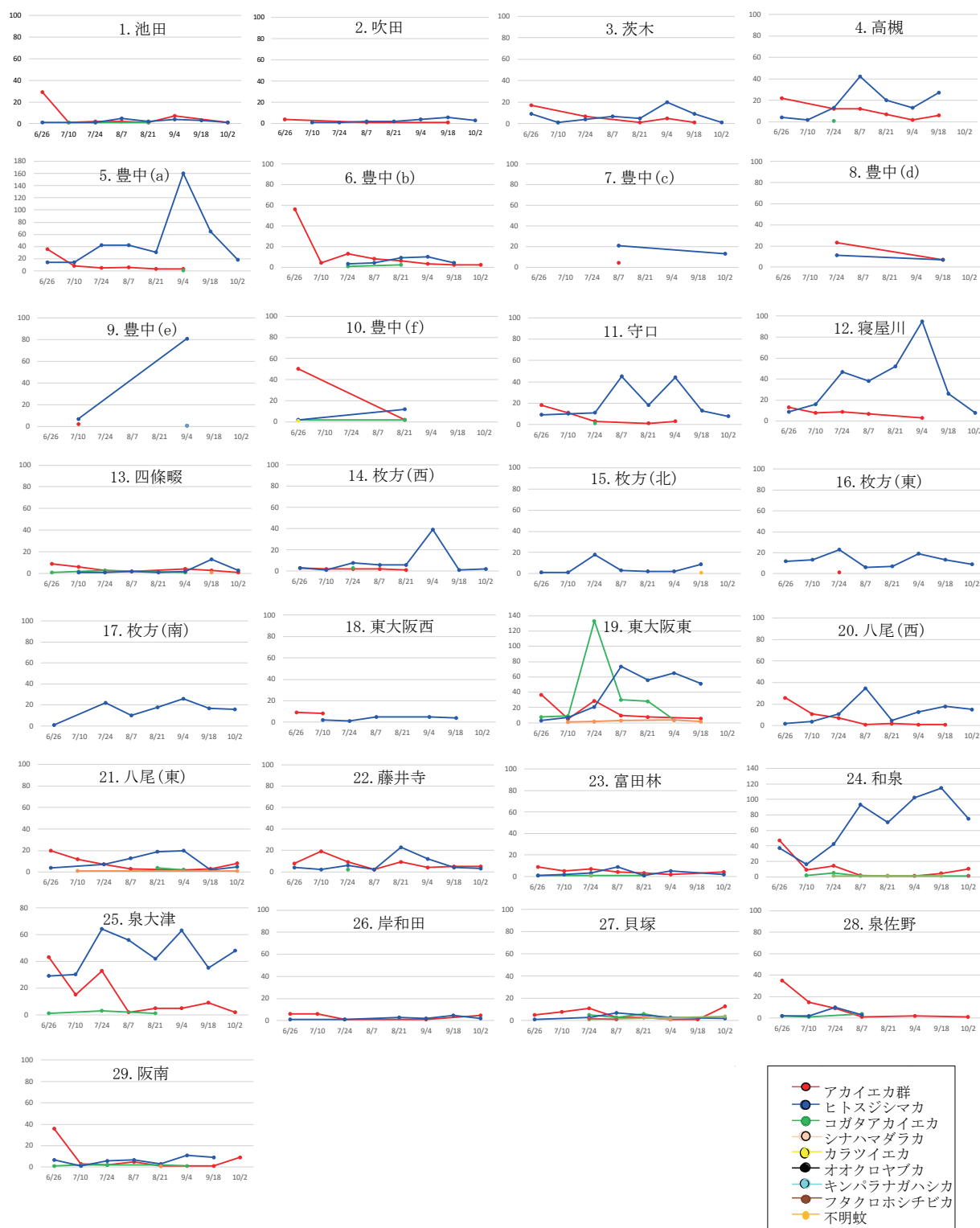


図4 定点別蚊の捕集数の推移

ンドが検出された。No.349 は調査地点番号 21、八尾市（東）地点において 9 月 3 日から 4 日に捕集されたコガタアカイエカ 2 匹からなるプールであった。その他の検体において WNV、JEV、DENV および ZIKV 遺伝子は検出されなかった。またヒトスジシマカ 209 プールについても、CHIKV 遺伝子は検出されなかった。

No.349 については、フラビウイルスで共通する NS5 領域を認識する FU1/cFD2 を用いた増幅産物についてのダイレクトシーケンスを実施し、BLAST 相同性検索より JEV が第一候補となったため、リアルタイム RT-PCR で確認検査を実施したところ、共通プライマー、Genotype I 型プライマーで陽性、Genotype III 型プライマーで陰性となり、本株は JEV Genotype I 型であると考えられた。その後、日本脳炎ウイルスの E 領域を認識する JE8K/JEER、nJE8K/nJEER を用いた RT-nested PCR の増幅産物に対して、ダイレクトシーケンスを実施し、BLAST 解析により遺伝子型別を行い、E 領域（243bp：陽性コントロールとして使用した JEV Beijing-1 では position:2, 208-2,450）および NS5 領域（263bp：JEV Beijing-1 では position:9,035-9,302）の塩基配列を用いて系統樹解析を実施したところ（図 5A、B）、No.349 は近年国内で流行している JEV Genotype I 型に属すると確認できたため、本株名を JEV JaOAr-Y349/ Japan/2019/Mosquito とした。

3. 死亡カラスのウイルス遺伝子検査結果

今年度回収されたカラス 3 羽から、WNV の遺伝子は検出されなかった。

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、貝塚は 6 種、和泉は 5 種、豊中市（a）、東大阪東、富田林および阪南では 4 種の蚊が捕集された。通常、蚊の種類により、好む生育環境は異なる。これら定点の周囲には、水田や池、竹林などが確認されており、これらが多種類の蚊の発生源となり、地点当たりの捕集蚊の種類が多くなったと考えられた。今年度は例年に比べ、コガタアカイエカの捕集数ならびに捕集定点数が増加した。しかし、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、コガタ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。

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において、2003 年の開始以来、ヒトに病原性のあるウイルスが初めて検出された。JEV が検出された蚊を捕集した地点 21 は 8 月 21 日に 4 匹、9 月 4 日に 2 匹と少数のコガタアカイエカが捕集されたが、コガタアカイエカの生息密度が高い地点とは考えられなかった。蚊からの JEV 検出については 2019 年 9 月 12 日に八尾市保健所より報道提供され、蚊媒介感染症および日本脳炎について住民への注意喚起が実施された。さらに、この 9 月はラグビーワールドカップの開催時期であったことから、その後八尾市および東大阪市により 8 地点を対象に計 13 回の追加調査が実施された。しかし、この追加調査で捕集された蚊から WNV、JEV、DENV および ZIKV 遺伝子は検出されなかった。また、今年度大阪府内で日本脳炎の患者発生は確認されなかった。

日本脳炎は国内の常在感染症ではあるが、大阪府において、日本脳炎患者は平成 22 年以降報告されていない。日本脳炎は不顕性感染率の高い感染症であるが、一旦発症すると、突然の高熱、頭痛、嘔吐、意識障害や麻痺等の神経系の障害を引き起こし、後遺症をもたらす場合や死に至る場合がある。近年、デング熱やジカウイルス感染症などの輸入蚊媒介感染症が大きく取り上げられていたが、今回大阪府内において JEV の存在が確認されたことから、今後日本脳炎についても府民への注意喚起を継続して行うことが必要と考えられた。

蚊媒介感染症サーベイランスにおいて、国内に生息する蚊からウイルスが確認された場合、その後迅速な対応が求められる。今回 JEV が確認された際、媒介蚊はコガタアカイエカに絞られたため、各捕集定点でのコガタアカイエカの捕集状況を参考にし、保健所への対応を速やかに行うことができた。このように、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対策資料となる。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も、本サーベイラン

ス事業は重要であると考えられる。また、アウトブレイク発生等の緊急時に即時に対応するためには、本調査で実施しているような衛生研究所、保健所および行政間の連携が不可欠であることから、本サーベイランスは危機管理対策の一つとしても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、寝屋川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) 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>
- 2) Geographical distribution of chikungunya virus disease cases reported worldwide, 2019, European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/geographical-distribution-chikungunya-virus-disease-cases-reported-worldwide-2019>
- 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 大阪府健康福祉部.
- 6) 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.
- 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) Morita K, Nabeshima T, Buerano C.C. Japanese encephalitis. *Rev Sci Tech. Off Int. Epiz* 2015; 34 (2): 441-452.
- 16) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル 日本脳炎. https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/JP_Encephalitis.pdf

WEB サイトの内容は 2020 年 6 月 17 日に確認した。

Mosquito-Borne Virus Surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2019 Report)

Ikuko AOYAMA, Ryo IKEMORI, Masaharu YOKOTA and Takahiro YUMISASHI

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 included in mosquito-based surveillance since 2008 and 2015, respectively.

In 2019, we performed RT-PCR examinations for arboviruses on a total of 439 mosquito pools from 4,648 female mosquitoes (8 species) collected at 29 points in Osaka Prefecture from June to October, and for WNV on 3 dead wild crows. There were no positive case on the mosquito's pools, except for one pool (No.349) on WNV, DENV, JEV, CHIKV, and ZIKV, as well as on the crows on WNV. The result of No.349, consisted of 2 *Culex tritaeniorhynchus* showed JEV positive. No.349 JEV strain (JaOAr-Y349/ Japan/2019/Mosquito) belonged to the same cluster with recent endemic strains Genotype I in Japan.

Key words : mosquito-borne infection, vector mosquitoes, surveillance, Japanese Encephalitis Virus.

皮膚爬行疹患者から検出された *Spirometra* 属裂頭条虫の遺伝子解析馬場 孝^a, 亀井千紗都^b, 東田理恵^b, 楠谷 尚^b, 阿部仁一郎^a, 寺本 勲^c, 中川浩一^b

皮膚爬行疹患者から検出された *Spirometra* 属裂頭条虫の遺伝子解析を実施した。患者は、アユ、アマゴ、イワナ、ホタルイカの生食歴と山水の飲水歴がある 67 歳女性。左腰部に 10 cm 以上の蛇行する紅斑が認められた。紅斑の先端部を含めて約 3 cm を切除し病理組織学的に観察したところ、皮下組織に寄生虫様の構造物を認め、その体壁と体内に条虫の特徴である微小毛と石灰小体を認めたことから、虫体は条虫と考えられた。患者血清を用いた抗体検査では、マンソン孤虫の感染が疑われた。パラフィンブロックより摘出した虫体から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA の *cox1* 領域を増幅して塩基配列 393 bp を解読した。相同性検索を行った結果、本条虫はマンソン裂頭条虫 *S. erinaceieuropaei* あるいは *S. decipiens* と同定され、本症例はマンソン孤虫症と診断された。また、本条虫は、近縁種との系統解析から、*S. decipiens* と同一のクレードに位置づけられた。かつて当所で同定したマンソン裂頭条虫も *S. decipiens* であることが明らかとなった。本症例は、大阪府内で発症した *S. decipiens* によるマンソン孤虫症として初めての報告となる。

キーワード：マンソン裂頭条虫、皮膚爬行疹、遺伝子解析、食品媒介寄生虫症

マンソン裂頭条虫 *Spirometra erinaceieuropaei* はイヌ、ネコなどの哺乳類を終宿主とする条虫で腸管内に寄生する¹⁾。本種の生活史は次のように推定されている¹⁾。本種の虫卵が終宿主の体外に排泄されると、やがてコラシジウムとなって水中に脱出する。そして、第一中間宿主のケンミジンコ類に寄生し、その体内で前擬尾虫（プロセルコイド）となる。この前擬尾虫を保有したケンミジンコが第二中間宿主のカエル類・ヘビ類・魚類・哺乳類などに経口摂食されると、前擬尾虫は胃壁や小腸壁に入り、体腔に出て、筋肉や皮下組織に潜入して擬尾虫（プレロセルコイド）となる。この擬尾虫を保有した第二中間宿主を終宿主が捕食すると成虫となる。ヒトは第二中間宿主あるいは待機宿主に相当する。

マンソン孤虫症は、上記のように擬尾虫の感染によって生じる条虫症である。本症は日本で 700 例以上が知られており、近年は年に 6~7 例報告されている²⁾。患者は、全国から報告されており、1881 年から 2000 年までの集計では京都府（51 件）や大阪

府（38 件）で比較的多い¹⁾。また、2000 年から 2009 年の集計においては、大阪府での報告数が 8 件で他県よりやや多かった³⁾。ヒトにおけるマンソン孤虫の寄生部位は、腹部（15.8%）、大腿部（13.7%）、胸部（11.5%）の順に多く報告されている¹⁾。皮下に寄生している場合は一般的には無痛であるが、尿道に寄生した場合は排尿困難、眼部に寄生した場合は失明、頭蓋内に寄生した場合は知覚麻痺や痙攣発作による死亡といった症例が報告されている¹⁾。極めて稀であるが、ヒトの小腸内で成虫に発育することがある。発症前に患者が摂取した食物として、ヘビ類・カエル類・ニワトリ・スッポンなどが挙げられている¹⁾。

近年、マンソン孤虫症を引き起こす種類にはマンソン裂頭条虫と *S. decipiens* の 2 種類存在することがわかってきた^{4,5)}。日本におけるマンソン孤虫症はすべてマンソン裂頭条虫に起因すると考えられてきたためか、分子同定された事例は少ない⁶⁾。*S. erinaceieuropaei* は高知県、*S. decipiens* は北海道、本

^a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課^b 大阪府済生会富田林病院^c 大阪市立大学医学部

州、九州から記録されているが、国内分布の解明が必要とされている⁶⁾。上記のように、大阪府内でマンソン孤虫症は比較的多く報告されているものの、2種を区別した事例は見当たらず、どちらの種類が分布するのか明かではない。そこで、本稿では2019年9月に大阪府で確認された皮膚爬行疹患者から検出された *Spirometora* 属裂頭条虫の分子同定を実施し、過去サンプルを含めて系統解析を行い、*S. decipiens* かどうかを検討した。

材 料 と 方 法

患者は67歳女性。アユ（2016～2017年頃）、アマゴとイワナ（2018年以前）、ホタルイカ（時期不明）の生食歴と山水（2018年秋頃）の飲水歴がある。2019年8月頃に紅斑が生じ、2019年9月7日に大阪府済生会富田林病院を受診、左腰部に10 cm以上の蛇行する紅斑が認められた（図1）。紅斑の先端部を含めて約3 cmが切除され、病理組織学的検査に供された。大阪市立大学医学部で、その標本を観察したところ、条虫に特有の微小毛と石灰小体が認められたため、虫体は条虫である可能性が高いと考えられた。同年10月8日（第32病日）に採血が実施され、宮崎大学医学部に抗体検査を外注した。次にパラフィンブロックより虫体を摘出し、遺伝子レベルでの虫種同定を試みた。



図1 患者の左腰部に出現した爬行疹。以前に右大腿部にも同様の爬行疹が生じ自然消退したことがあった。

DNA抽出は、Blood & Tissue Kit（Qiagen）を用いて行った。ミトコンドリアDNAのチトクロムcオキシダーゼサブユニットI（*cox1*）領域を標的としたプライマー、JB3 5'-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3'とJB4.5 5'-TAA AGA AAG AAC

ATA ATG AAA ATG-3'を用いてPCRを行った⁹⁾。PCR条件は、最初に94℃・5分、次に94℃・30秒と55℃・30秒と72℃・1分を1サイクルとした系を40サイクル、最後に72℃・7分とした。得られたPCR産物約450 bpをPCR Purification Kit（Qiagen）で精製し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて塩基配列を決定した。相同性検索は、National Center for Biotechnology Information（NCBI）が提供するBLAST（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）を用いた。分子系統解析は、Mega Xを用いて最尤法によって系統樹を作成した。

結 果

1. 抗体検査

ニトロセルロース膜に抗原を吸着して行うMultiple-dot ELISAによる抗体検査の結果は、マンソン孤虫を含め、幼虫移行症の原因となる他の蠕虫種でも陰性であった（イヌ糸状虫、イヌ回虫、ブタ回虫、アニサキス、顎口虫、糞線虫、ウエステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫、肝蛭、肝吸虫、有鉤囊虫）。プレートを用いた間接ELISA法では、抗マンソン孤虫IgG抗体（900倍希釈、吸光度）は、患者血清0.882、陽性対照1.157、陰性対照0.062という結果が得られ（カットオフ0.200）、血清学的にマンソン孤虫が疑われた。

2. 遺伝子解析

解読された*cox1*の部分領域（393 bp）の塩基配列に基づきBLAST解析を実施した結果、マンソン裂頭条虫あるいは*S. decipiens*と99.5%以上の相同性を示した。最尤法による分子系統解析の結果、本症例と過去サンプル（AB480297）はともに山崎ら⁶⁾が提唱する*S. decipiens*と同じクレードに位置づけられた（図2）。

考 察

Multiple-dot ELISAによる抗体検査では、陽性が得られない症例や、複数の寄生虫に陽性を示す症例が報告されている¹⁰⁻¹¹⁾。またMultiple-dot ELISAでは陰性でも、マンソン孤虫症が疑われる場合はELISAを併用すべきとされている¹⁰⁾。本研究においても、Multiple-dot ELISAによる抗体スクリーニ

内変異と考えられている。加えて、Jeon and Eom⁸⁾ は分子系統解析の結果、*S. erinaceiueuropaei* として登録された種 (AB374543、AB369250、AB374251) を *S. decipiens* として同定している。一方、*S. decipiens* と *S. erinaceiueuropaei* (図2 破線内・KJ599680) との d 値は 0.099~0.117 と大きく、この値は種間差を示すとされている⁶⁾。Eom ら⁷⁾ の解析においても、*S. erinaceiueuropaei*

(KJ599680) と *S. decipiens* (KJ599679) のミトコンドリアゲノム間に 12.9% の変異があると示されている。以上のことから、爬行疹から検出された虫体は *S. decipiens* と同定された。本症例は大阪府内では初めてとなる *S. decipiens* によるマンソン孤虫症であることが確認された。また、過去のサンプルも *S. decipiens* と同定された。なお、マンソン孤虫症で皮膚爬行疹を示す症例は比較的稀とされ、2012 年までに 8 例¹⁷⁻¹⁸⁾、2016 年に 2 例¹¹⁾、2017 年に 1 例¹⁹⁾ 報告されている。

マンソン孤虫症の感染経路は、(1) 前擬尾虫を保有する第一中間宿主のケンミジンコを含む生水を飲むこと、(2) 擬尾虫が寄生した第二中間宿主のヘビ類、カエル類、ニワトリなどを生食すること、(3) 民間療法で擬尾虫が寄生したカエルなどを傷口に貼り付け、直接感染することが挙げられている¹⁾。本症例の場合、(1) 山水の飲水歴および

(2) 淡水魚の生食歴があるため、これらのどちらかが感染経路の可能性として考えられる。明らかな生食歴がなく、山水の飲水歴があり、マンソン孤虫症を発症した事例は過去に報告されている²⁰⁾。しかし、環境中のケンミジンコから前擬尾虫が確認された事例は見当たらなかった。さらに、淡水魚を生食する習慣がある人からマンソン孤虫が検出された事例も報告されている²¹⁾ が、淡水魚から虫体の検出は示されていない。また、わが国ではアユや淡水魚から *Spirometra* 属の条虫が報告されたことはこれまでにない²²⁻²³⁾。これは、可食部筋肉における虫体の検査が十分実施されてこなかったことが原因の一つと考えられる。一方、淡水魚の消化管内に残存するケンミジンコにマンソン孤虫の前擬尾虫が寄生していた場合、魚に寄生していなくとも、魚を踊り食いあるいは加熱不十分な状態で内臓ごと喫食すれば感染は起こりうると思われる。他にも、調理器具を介して他の食材に付着することで経口的に摂取される可能性も考えられる。マンソン孤虫症の感染経路の約 7 割

は不明であり¹⁾、多くの場合原因推定食材から虫体は検出されていない。本症例においても感染経路の特定には至らなかった。今後の課題として、マンソン裂頭条虫と *S. decipiens* の分布の解明、淡水魚における両種の寄生状況、山水に生息するケンミジンコへの両種の寄生状況の調査が挙げられる。

本研究の一部は、第 475 回日本皮膚科学会大阪地方会および第 119 回日本皮膚科学会総会で発表された。本症例の患者はこれらの発表で報告された患者と同一である。

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 1808-04)、「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。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 影井 昇. 下手物食いはあぶない マンソン孤虫症. *SRL 宝函* 2000; **24**: 115-121.
- 2) 山崎 浩, 森嶋康之, 杉山 広. わが国における条虫症の発生状況. *病原微生物検出情報* 2017; **38**: 74-76.
- 3) 吉川正英, 王寺幸輝, 西尾福真理子, 石坂重昭, 名和行文. 我が国における最近 10 年間のマンソン孤虫症の発生状況について. *Clin Parasitol* 2010; **21**: 33-36.
- 4) Jeon HK, Park H, Lee D, Choe S, Kim H, Huh S, Sohn WM, Chai JY, Eom KS. Human infections with *Spirometra decipiens* plerocercoids identified by morphologic and genetic analyses in Korea. *Korean J Parasitol* 2015; **53**: 299-305.
- 5) Kudo T, Fujioka A, Korenaga M, Yamasaki H, Morishima Y, Sugiyama H, Nakajima H, Sano S. Molecular identification of intramuscular and subcutaneous *Spirometra erinaceiueuropaei* saparganosis in a Japanese patient. *J Dermatol* 2017; **44**: e138-139.
- 6) 山崎 浩, 森嶋康之, 杉山 広, 是永正敬, 巖

- 基善. わが国における孤虫症の原因種について. *Clin Parasitol* 2017; **28**: 99-102.
- 7) Eom KS, Park H, Lee D, Choe S, Kim KH, Jeon HK. Mitochondrial genome sequences of *Spirometra erinaceieuropaei* and *S. decipiens* (Cestoidea: Diphyllbothriidae). *Korean J Parasitol* 2015; **53**: 455-463.
 - 8) Jeon HK, Eom KS. Mitochondrial DNA sequence variability of *Spirometra* species in Asian countries. *Korean J Parasitol* 2019; **57**: 481-487.
 - 9) Year H, Estran C, Delaunay P, Gari-Toussaint M, Doupouy-Camet J, Marty P. Putative *Diphyllbothrium nihonkaiense* acquired from a Pacific salmon (*Onchorhynchus keta*) eaten in France; genomic identification and case report. *Parasitol Int* 2006; **55**: 45-49.
 - 10) 天野優子, 渡部純一, 荒木国興. 寄生虫疾患診断法としての dot-ELISA 法と ELISA 法の比較肺吸虫症 134 例、マンソン孤虫 35 例についての検討. *病体生理* 1998; **31**: 117-123.
 - 11) 園崎 哲, 大久保優子, 大嶺卓也, 宮城拓也, 荻谷嘉之, 山本雄一, 高橋健造, 上里 博. マンソン孤虫症の 3 例 —PCR 法による原因寄生虫種の同定—. *西日皮膚* 2016; **78**: 522-527.
 - 12) 阿部仁一郎, 木俣 勲, 宇仁茂彦. 遺伝子検査による日本海裂頭条虫、マンソン孤虫、無鉤条虫の同定. *生活衛生* 2009; **53**: 169-173.
 - 13) 根本育恵, 松村和子, 藤田靖幸, 高橋秀史, 三好正浩, 八木欣平. マンソン孤虫症の 1 例. *皮膚臨床* 2007; **49**: 1327-1329.
 - 14) 八木欣平, 三好正浩. ミトコンドリア遺伝子解析によるヒト寄生性裂頭条虫の種同定法. *道衛研所報* 2005; **55**: 81-84.
 - 15) Koonmee S, Intapan PM, Yamasaki H, Sugiyama H, Muto M, Kuramochi T, Kularbkeaw J, Kanpittaya J, Maleewong W, Nawa Y. Molecular identification of a causative parasite species using formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues of a complicated human pulmonary sparganosis case without decisive clinical diagnosis. *Parasitol Int* 2011; **60**: 460-464.
 - 16) Faust EC, Campbell HE, Kellogg CR. Morphological and biological studies on the species of *Diphyllbothrium* in China. *Am J Epidemiol* 1929; **9**: 560-583.
 - 17) 仲宗根尚子, 上原絵里子, 是永正敬, 山口さやか, 高橋健造, 上里 博. 皮膚爬行疹を呈したマンソン孤虫症の 1 例 —沖縄県での第 3 例目—. *西日皮膚* 2012; **74**: 31-36.
 - 18) 新保和花子, 村野啓明, 赤尾信明. Creeping Eruption を呈したマンソン孤虫症の 1 例. *皮膚臨床* 2012; **54**: 389-391.
 - 19) 高松紘子, 前村紘美, 木村七絵, 原田佳代, 長安英治, 丸山治彦, 占部和敬. Creeping Eruption を呈したマンソン孤虫症の 1 例. *西日皮膚* 2017; **79**: 600.
 - 20) 森 徹, 三砂範幸, 成澤 寛, 茂木幹義, 長谷川英男, 宮田 彬. 多発したマンソン孤虫症の 1 例. *西日皮膚* 2002; **64**: 55-57.
 - 21) 宮岡由規, 佐川禎昭. マンソン裂頭条虫による皮膚爬行疹の一例. *小松島赤十字病院医学雑誌* 1997; **2**: 53-56.
 - 22) Nagasawa, K, Umino T, Grygier MJ. A checklist of the parasites of ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) (Salmoniformes: Plecoglossidae) in Japan (1912-2007). *J Grad Sch Biosp Sci Hiroshima Univ* 2007; **46**: 59-89.
 - 23) 長澤和也. 日本産淡水魚類に寄生する条虫類目録 (1889-2015 年). *広島大学総合博物館研究報告* 2015; **7**: 89-115.

Molecular identification of *Spirometra* plerocercoid (Cestoda: Diphylobothriidae) isolated from a patient with creeping eruption in Osaka Prefecture

Takashi BABA^a, Chisato KAMEI^b, Rie TOHDA^b, Nao KUSUTANI^b, Niichiro ABE^a, Isao TERAMOTO^c and Koichi NAKAGAWA^b

Molecular identification of *Spirometra* plerocercoid isolated from a 67-years-old Japanese female was conducted. Creeping eruption was observed on the surface of her waist, and a cestode was found in the subcutaneous tissue of the lesion by histopathological examination. She had eaten raw freshwater fishes, sweetfish, char, Amago salmon, firefly squid and also drunk spring water before the symptoms appeared. The present case was serologically suspected to be *Sparganum mansoni* infection. The cestode collected from paraffin embedded sample was identified as *S. erinaceieuropaei* or *S. decipiens* by sequence analysis of the partial mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene (*cox1*) sequence (393 bp), and then the present case was diagnosed with sparganosis mansoni. Moreover, phylogenetic analysis of the *cox1* indicated the present isolate was *S. decipiens*, which is morphologically indistinguishable from *S. erinaceiruopaei*. This is the first report of a case of *S. decipiens* infection in Osaka Prefecture.

Key words: *Spirometra* spp., creeping eruption, molecular identification, foodborne parasitic disease

a Osaka Institute of Public Health

b Osaka Pref. Saiseikai Tondabayashi Hospital

c Osaka City University Medical School

中国産青ネギからのクロルベンズロンの検出事例

上野 亮, 松井啓史, 内田耕太郎, 阿久津和彦, 角谷直哉

令和元年 6 月に実施した残留農薬検査において、中国産の青ネギ検体よりジフルベンズロンに類似する LC-MS/MS 分析結果を示す化合物が検出された。本化合物は標準品との LC-MS/MS 分析結果比較によりクロルベンズロンと同定された。また、当所で行っている残留農薬一斉試験法を用いてネギに対するクロルベンズロンの添加回収試験を行ったところ、回収率 93.5% (RSD=4.3%) であり、残留農薬試験法妥当性評価ガイドラインに適合する結果が得られた。

キーワード：クロルベンズロン、ジフルベンズロン、LC-MS/MS、妥当性評価

殺虫剤や殺菌剤などの農薬は食料生産の効率化や安定化に寄与しているが、一方で農薬には有害性が存在することから、その使用法などが農薬取締法や食品衛生法によって規定されている。食品の消費者に対するリスク管理として、各々の作物に対して農薬ごとに残留基準が設定され、この設定がない農薬に対しては 0.01 µg/g の一律基準が設定されている。

令和元年 6 月に当所で実施した残留農薬検査において、中国産の青ネギ検体から、検査項目の一つであるジフルベンズロンに類似する LC-MS/MS 分析結果を示す化合物が検出された。本化合物が農薬であることが懸念されたため、プロダクトイオンスペクトルの解析により同定を行うとともに、当所の検査法の本化合物に対する妥当性確認試験を実施したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料

対象試料として令和元年 6 月に検査依頼を受けた中国産青ネギを使用した。ブランク試料として LC-MS/MS 分析においてジフルベンズロンおよびクロルベンズロン不検出の青ネギを使用した。

2. 試薬

アセトニトリル(濃縮 5000 および LC/MS 用)、トルエン(濃縮 5000)、アセトン(濃縮 5000)、ヘキサン(濃縮 5000)、メタノール(濃縮 5000)、硫酸マグネシウム(特級)、塩化ナトリウム(残留農薬・PCB 試験用)、クエン酸三ナトリウム二水和物(特級)、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液(高速液体クロマトグラフ用)は富士フィルム和光純薬(株)製を使用した。クロルベンズロン標準品(99.9%)は林純薬工業(株)製を使用した。ジフルベンズロン標準品(PESTANAL、99.8%)およびクエン酸二ナトリウムセスキ水和物(purum p.a.)、GCB/PSA カラム(ENVI-CarbII/PSA (500 mg/500 mg))は Merck KGaA 製を使用した。精製水は Merck KGaA 製の Milli-Q 超純水製造装置を用いて作成した。

3. 測定溶液の調製

測定溶液の調製は既報¹⁾および当所の残留農薬試験法標準作業書に準じて行った(図 1)。

4. 分析

LC-MS/MS による分析は既報¹⁾に準じて行い、MS 条件は対象化合物に合わせて変更を加えた(表 1)。定量は、標準品より 0.25、0.5、1、2、5 ng/mL の溶液を調製し絶対検量線法により行っ

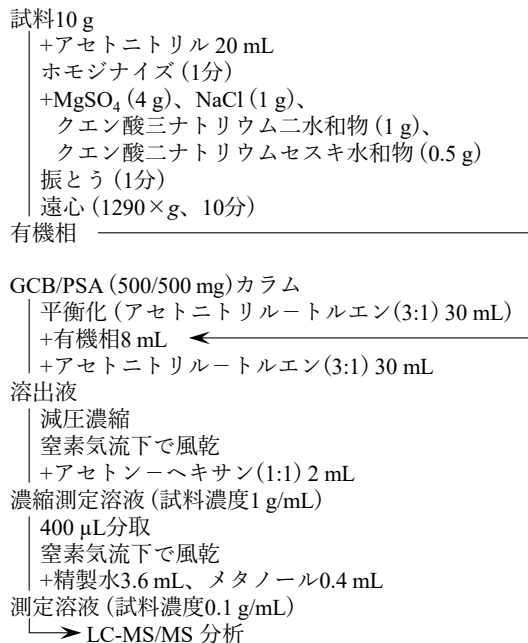


図 1 測定溶液調製法の概要

た。この際にブランク試料の濃縮測定溶液を用いて試料濃度 0.1 g/mL としたマトリックス検量線を使用した。

5. 妥当性評価

妥当性評価ガイドライン²⁾に従い、ブランク試料を用いて添加回収試験を実施者 1 名で 2 併行 5 日間行った。クロルベンズロンに対して残留基準は設定されていないため、添加濃度を一律基準である 0.01 µg/g として評価を行った。また、LC-MS/MS による残留農薬の分析では、マトリックス効果と呼ばれる、試料由来成分による分析成分のイオン化への影響が知られている³⁾。そのため、標準品を精製水およびメタノールで希釈して作成した検量線 (溶媒検量線) による定量をマトリックス検量線による定量に加えて行うとともに、マトリックス効果 (ME) を

$$ME(\%) = \left(\frac{a_m}{a_s} - 1 \right) \times 100$$

より評価した。ただし、 a_m はマトリックス検量線の傾きであり、 a_s は溶媒検量線の傾きである。

結 果

1. 検出化合物の同定

対象試料に対してジフルベンズロンの条件で

表 1 LC-MS/MS 分析条件

装置		
LC部	島津 NEXERA	
MS部	SCIEX 4000 QTRAP	
LC条件		
分析カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm、2.1 × 100 mm)	
プレカラム	ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm、2.1 × 5 mm)	
カラム温度	50 °C	
移動相	(A) 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (B) 0.5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液	
流速	0.2 mL/min	
送液条件(B)	35 ~ 95% (7 min) → 95% (9 min)	
サンプル注入量	5 μL	
MS条件		
	ジフルベンズロン	クロルベンズロン
定量		
測定モード	MRM	
イオン化法	ESI+	
イオンスプレー電圧	+4000 V	
乾燥ガス温度	500 °C	
MRM条件(<i>m/z</i>)	311 → 158	309 → 156
衝突エネルギー	19 eV	23 eV
定性		
測定モード	プロダクトイオンスキャン	
衝突エネルギー	15, 30, 45 eV	
前駆イオン(<i>m/z</i>)	311	309

LC-MS/MS 分析を実施した結果、MRM モードにおいてジフルベンズロン標準品とは異なる保持時間にピークが観測された (図 2)。また、この保持時間のプロダクトイオンスペクトルではジフルベンズロン標準品で観測される $m/z = 158$ 、141 のピークに加え、それらより m/z が 2 小さい $m/z = 156$ 、139 のピークがそれぞれ同程度の強度で観測された。対象試料の測定溶液にジフルベンズロン標準品を添加し測定したところ、対象試料由来のピークとジフルベンズロン由来のピークは分離したため、対象試料にはジフルベンズロンと構造が類似する化合物が含まれていたことが推測された。

プロダクトイオンスペクトルより、対象試料にて観測された化合物は、ジフルベンズロンの類縁体であるクロルベンズロンの同位体分子種のうち、ジフルベンズロンのノミナル質量と質量数が等しい **2a** および **2b** (図 3) と推測された。そこで、ジフルベンズロンの条件に加え、クロルベンズロンの主イオン ($m/z = 309$) を前駆イオンとした条件でクロルベンズロン標準品と対象試料の LC-MS/MS 分析を行ったところ、保持時間およびプロダクトイオンスペクトルが一致したため (図 2、4)、対象試料中の化合物をクロルベンズロンと同定した。

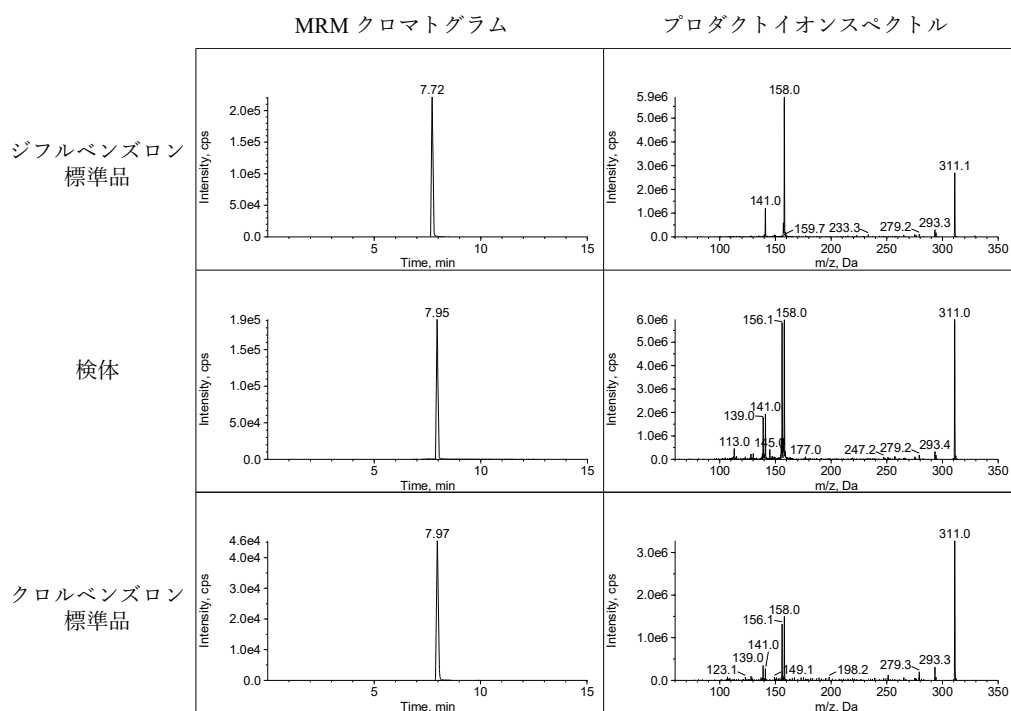


図 2 ジフルベンズロン標準品、検体およびクロルベンズロン標準品の MRM クロマトグラムおよびプロダクトイオンスペクトル。MRM 条件 (m/z) : 311→158。プロダクトイオンスキャン条件：先駆イオン (m/z) = 311、衝突エネルギー = 15 eV。

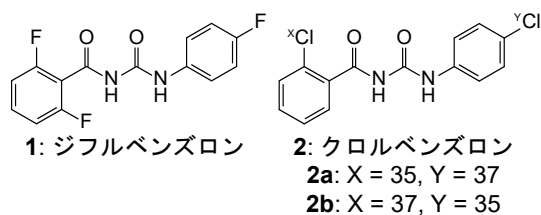


図 3 分析対象化合物の構造式

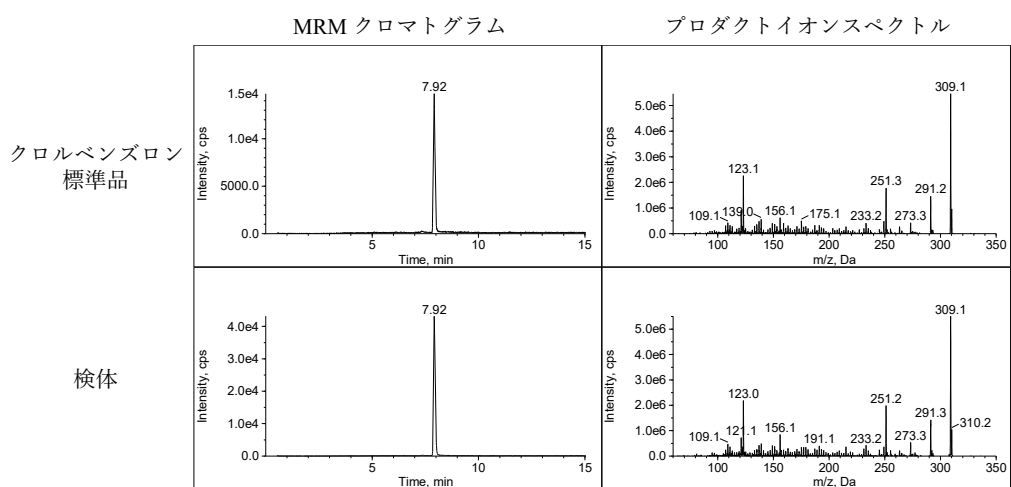


図 4 クロルベンズロン標準品および検体の MRM クロマトグラムおよびプロダクトイオンスペクトル。MRM 条件 (m/z) : 309→156。プロダクトイオンスキャン条件：先駆イオン (m/z) = 309、衝突エネルギー = 15 eV。

クロルベンズロンは中国において殺虫剤として農薬登録があり⁴⁾、許容一日摂取量が 1.25 mg/kg 体重/日に設定されているものの、ネギに対する残留基準は設定されていない⁵⁾。また、クロルベンズロンの使用実態や安全性に関する英語および日本語で記述された報告は確認できなかった。

2. 妥当性評価

クロルベンズロンに対する当所の検査法の妥当性評価を実施した結果、マトリックス検量線および溶媒検量線のいずれを用いた場合でも、回収率、併行精度および室内精度がガイドライン²⁾の目標値に適合することが確認された(表 2)。また、ブランク試料の分析時に定量を妨害するピークが観測されないことも確認された。さらに、1 ng/mL 標準溶液の分析における S/N 比が 10 を超えていたため、定量限界が 0.01 µg/g 未満であることが確認された。また、マトリックス効果は -23.9% ($n = 5$ 、標準偏差 6.1%) であった。

表 2 妥当性評価結果

	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	S/N
マトリックス 検量線	93.5	4.3	4.3	$\geq 387^a$
溶媒検量線	72.1	4.4	4.8	$\geq 501^a$
目標値 ^b	70-120	<25	<30	

^a 1 ng/mL 標準溶液(試料中濃度 0.01 µg/g に対応)における 5 回の測定値の最小値

^b ガイドライン²⁾における添加濃度 0.01 µg/g の値

ま と め

令和元年 6 月に検査依頼を受けた中国産青ネギ検体よりジフルベンズロンに類似する LC-MS/MS 分析結果を示す化合物が検出され、標準品との LC-MS/MS 分析結果の比較から本化合物をクロルベンズロンと同定した。クロルベンズロンに対する当所の試験法の妥当性評価を実施した結果、妥当性評価ガイドラインの目標値に適合する結果が得られた。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 高取聡, 山本遥菜, 福井直樹, 山口聡子, 北川陽子, 柿本葉, 小阪田正和, 起橋雅浩, 梶村計志, 尾花裕孝. LC-MS/MS を用いた迅速な野菜類および果実類中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価. 食品衛生学会誌 2013; **54**(3): 237-249.
- 2) 厚生労働省. 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン. 2010; 食安発第 1224 第 1 号: 別添.
- 3) Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2010; **1217**(25): 3929-3937.
- 4) China Pesticide Information Network. Data center. <http://www.chinapesticide.org.cn/sjzx4ywb/index.jhtml>
- 5) National Health Commission of the People's Republic of China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. National food safety standard—Maximum residue limits for pesticides in food. 2019; GB 2763-2019.

WEB サイトの内容は 2020 年 3 月 26 日に確認した

Detection of chlorbenzuron in Welsh onion from China

Ryo UENO, Hiroshi MATSUI, Kotaro UCHIDA, Kazuhiko AKUTSU and Naoya KAKUTANI

In a Welsh onion sample imported from China, we detected a compound that shows LC-MS/MS analysis results similar to those of diflubenzuron. Comparison among results of LC-MS/MS analysis identified the compound as chlorbenzuron, which is an insecticide allowed to use domestically by the Chinese government. Hence, we have carried out a validation study about chlorbenzuron in Welsh onion matrices with a modified QuEChERS method and LC-MS/MS analysis. The mean recoveries have been 93.5% (relative standard deviation (RSD) = 4.3%) and 72.1% (RSD = 4.8%) by quantification with matrix-matched standards and no-matrix standards, respectively. These results have satisfied the requirements established in the guideline for analysis methods of residual pesticides by the Ministry of Health, Labour and Welfare.

Key words : chlorbenzuron, diflubenzuron, LC-MS/MS, validation study

LC-MS による加工食品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

加工食品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、またドレッシングは脱脂および除タンパク操作を行った後にそれぞれ Oasis PRiME HLB により精製し、LC-MS でスキャン測定した。加工食品 3 種類（豚汁、カレー、きんぴらごぼう）および和風ドレッシングに対して洗剤液を添加した試料および無添加試料の測定結果を、洗剤標準溶液と比較した。その結果、全ての試料について、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た。

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

著者らは、飲料への洗剤混入による食中毒発生時の原因究明へ対応可能な、LC-MS を用いた飲料中の台所用洗剤由来界面活性剤の分析法を検討し報告した¹⁾。厚生労働省がまとめている食中毒発生状況²⁾によると、界面活性剤の混入事例として飲料の他に食品もあり、調理時に油と間違えて使用するケースがみられた。そこで今回は、対象試料を加工食品に拡大して本分析法が適用可能か検討した。

検討対象として、豚汁は塩分および脂質を多く含む食品であるため、きんぴらごぼうは調理時に油と間違えて洗剤を混入させる可能性があるため、カレーは分析上の夾雑物質が多い食品として知られているため、ドレッシングは過去に台所用洗剤の混入事例³⁾があったため選定した。標準品として洗剤製品を用い、加工食品からの抽出および精製過程において炭素数の異なる物質の比率を大きく損ねることなく、洗剤製品と同じ組成とパターンで検出可能か調べることにした。

測定対象物質は、既報¹⁾と同様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)、脂肪酸カリウム (FAT)、アルキ

ルヒドロキシスルホベタイン (HSB)、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS)、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (POE) およびラウリル硫酸ナトリウム (SDS) とした。

調 査 方 法

1. 試料

大阪府内の小売店より購入した加工食品（豚汁、カレー、きんぴらごぼう）および和風ドレッシング（分離タイプ）を試料とした。

2. 試薬および試液

界面活性剤標準品は、LAS のみ富士フイルム和光純薬製水質試験用陰イオン界面活性剤混合標準液（各 1 mg/ml メタノール溶液）を用いた。その他の界面活性剤は、市販洗剤 1 (AA、AES、LAS)、市販洗剤 2 (AES、AG、AO、HSB)、市販洗剤 3 (APB、SDS)、市販洗剤 4 (AES、AO、POE)、市販洗剤 5 (FAT) を標準品として用いた。これら界面活性剤の炭素数の異なる計 46 物質を対象とした（表 1）。

アセトンおよびヘキサンは残留農薬試験用濃縮 5000、アセトニトリルは LC/MS 用、メタノー

表1 測定条件

界面活性剤	炭素数 n	保持時間 (min)	検出イオン (m/z)	Pos/Neg
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

ルおよびエタノールは高速液体クロマトグラフ用を用いた（全て富士フイルム和光純薬製）。酢酸アンモニウムは特級を用いた（富士フイルム和光純薬製）。精製用固相は Waters 社製 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 となるように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 となるように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。

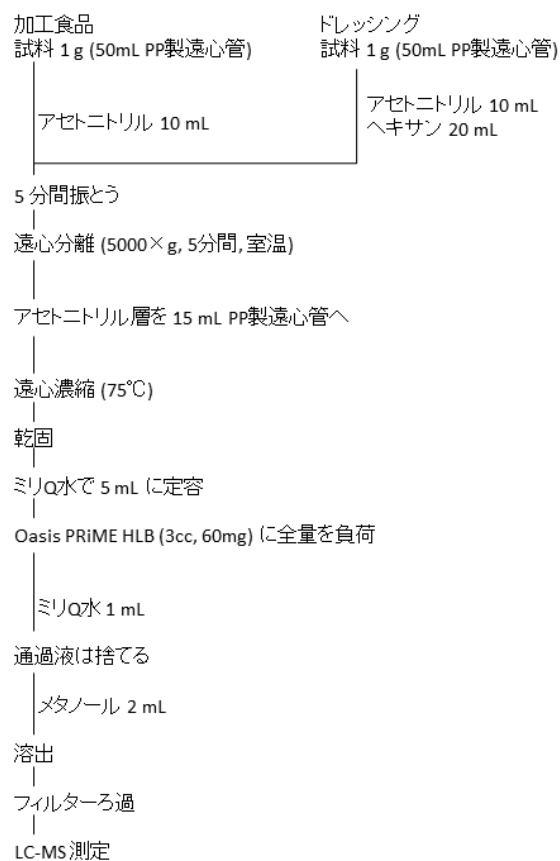


図1 前処理法フローチャート

3. 抽出操作

既報¹⁾に準じ、以下の通り行った。詳細は図1に示した。

3-1. 豚汁等加工食品

試料 1g をポリプロピレン（PP）製遠心管に秤量し、アセトニトリル 10mL 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℃）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. ドレッシング

3-1 の抽出時にヘキサンを追加した。
試料 1g を秤量し、アセトニトリル 10mL およびヘキサン 20mL を加えて 5 分間振とうした。その後の操作は 3-1 と同様に行った。

4. 装置および測定条件

使用装置、測定条件および測定対象物質は、既報¹⁾に準じた。

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℃

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℃

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℃

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、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)。

結 果 お よ び 考 察

1. 抽出溶媒の検討

豚汁およびカレーについて、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 を添加した試料および無添加試料に各溶媒を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プ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、既報¹⁾と同様、アセトニトリルを用いた際に、炭素数の少ない FAT のピークと重なる夾雑ピークが小さかったことから、抽出溶媒としてアセトニトリルが適当であると考えられた。

2. ドレッシング抽出時におけるヘキサン追加の検討

ドレッシングについて 3-1 の方法で前処理を行ったところ、一部物質について回収率のばらつきが大きくなる傾向がみられた。検討に用いたドレッシングが分離タイプであるため、サンプリングごとに油分の割合に差が出たためと考えられる。そこで、脱脂を目的としたヘキサンの追加を検討した。アセトニトリル抽出の操作に、ヘキサンを 10mL または 20mL 加えて振とうし、以下同様に操作した。その結果、ヘキサン 20mL を追加した場合において回収率のばらつきが改善したため、添加するヘキサンの量は 20mL とした。試料からの抽出の際に油分を除去することにより、その後の前処理工程において一部界面活性剤の損失が軽減されたためと考えられる。

3. 添加回収試験

加工食品（豚汁、カレー、きんぴらごぼう）および和風ドレッシングについて、添加回収試験を行った。図 2 にマスプロマトグラムの一例を示す。

表2 回収率まとめ
回収率平均70-120%を外れたもの

	豚汁	カレー	きんぴらごぼう
<70%	FAT6(14.0%) FAT8(37.1%)	AG9(34.3%) APB16*(66.1%) APB16(61.6%) POE13(69.2%) FAT6(16.1%) FAT8(40.4%) FAT10(61.7%) FAT12(64.2%) LAS12(69.4%)	FAT6(23.2%) FAT8(52.7%) FAT10(67.7%)
120%<	AG11(123.7%) FAT14(132.6%) FAT16(237.0%)	FAT16(157.8%)	-

* 一価不飽和脂肪酸
-: 該当なし

表3 和風ドレッシングの脱脂による結果への影響
回収率平均70-120%を外れたもの（下線はRSD20%を超えたもの）
およびRSDが20%を超えた物質数

	和風ドレッシング (脱脂あり)	和風ドレッシング (脱脂なし)
<70%	<u>FAT6 (3.6%)</u> FAT8 (25.0%) FAT10 (44.4%) FAT12 (47.2%) FAT14 (45.7%) FAT16* (39.4%) LAS13(50.0%)	<u>APB8 (67.8%)</u> <u>FAT6 (10.1%)</u> FAT8 (36.5%) FAT10 (62.8%)
120%<	AA6 (122.8%) POE7 (152.9%) POE12 (140.6%) FAT16 (123.0%)	FAT16 (201.6%) LAS13 (210.0%)
RSD>20%	1/46	20/46

* 一価不飽和脂肪酸

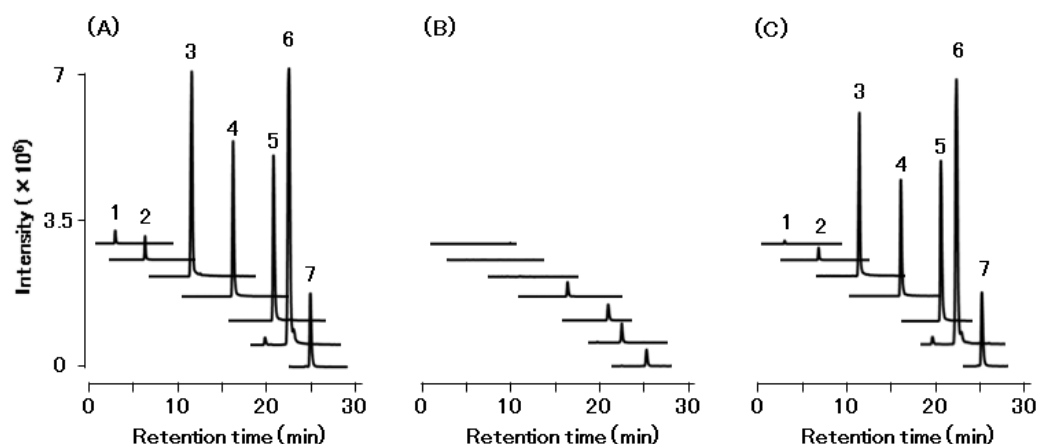


図2 界面活性剤のマスキングクロマトグラムの一例

(A) 洗剤混合溶液A、(B) 無添加きんぴらごぼう、(C) 洗剤混合溶液A 添加きんぴらごぼう
1: FAT6, 2: FAT8, 3: FAT10, 4: FAT12, 5: FAT14, 6: FAT16 monounsaturated, 7: FAT16

表4 無添加試料において添加試料の10%を超えるピークが検出されたもの

豚汁	カレー	きんぴらごぼう	和風ドレッシング
FAT14 (27.2%)	FAT14 (10.1%)	FAT16 (20.5%)	POE7 (10.4%)
FAT16* (19.0%)	FAT16 (69.3%)		FAT16 (28.3%)
FAT16 (102.9%)			

* 一価不飽和脂肪酸

豚汁およびきんぴらごぼうの回収率は 70-120%の範囲に入るものが多かった (表 2)。カレーについては、回収率 70%に満たないものが多かったが、炭素数の異なる同一界面活性剤の中で半数以上は 50%以上を確保できていた。そのため、他の炭素数とのピークパターンを総合的に見ることで食品由来の夾雑物質と界面活性剤の混入を判別でき、界面活性剤の混入の有無の判断が可能であると考ええる。豚汁、カレーおよびきんぴらごぼうについては、RSD が 20%を超えた物質はなかった。和風ドレッシング (表 3) については、アセトニトリルのみを用いた抽出では RSD が 20%を超える物質が 46 物質中 20 と半数近くに見られたが、抽出溶媒にヘキサンを追加することにより 1 物質に減少した。回収率が 70-120%の範囲を外れるものは 6 物質から 11 物質と増加したが、ばらつきが小さくなったことで定性の判定がしやすくなることが期待される。

全ての試料の無添加試料において、試料中の脂

質由来と思われる夾雑ピークが主に FAT の炭素数が多い物質について同じ保持時間に検出された。FAT は生体や食品に含まれている脂肪酸と同じである⁴⁾ ため、今回の検討試料も、既報¹⁾ の脂質を多く含む飲料と同様に実際の識別は困難であると考えられる (表 4)。その他の測定対象物質の保持時間にピークは認められなかったため、洗剤混入の有無を判定することが可能であると考えられる。

ま と め

3 種類の加工食品およびドレッシングについて、台所用洗剤に含まれる代表的な界面活性剤を LC-MS により同定する方法を検討した。その結果、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、飲料だけでなく加工食品についても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) 柿本 葉, 山口瑞香, 角谷直哉. LC-MS による飲料中に混入された界面活性剤の分析. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2019; **3**: 48-56
- 2) 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

- 3) 下井俊子, 田口信夫, 舘 公子, 大石充男. 化学物質及び自然毒による食中毒事件例 (平成 25 年). 東京都健康安全研究センター研究年報 2014; **65**: 167-172
- 4) 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

WEB サイトの内容は 2020 年 6 月 11 日に確認した。

Analysis of surfactants contaminated in the processed foods using LC-MS

Yo KAKIMOTO, Mizuka YAMAGUCHI and Naoya KAKUTANI

In order to assess the contamination of processed foods with kitchen detergents, an analysis method of surfactant using LC-MS was developed. Widely used 10 types of detergents were added to four types of processed foods (miso soup with pork and vegetables, curry, sautéed burdock root, and dressings). Prior to PRiME HLB column extraction and scan measurement by LC-MS, protein precipitation by acetonitrile was performed for protein rich food samples, and lipid removal by hexane in addition to protein precipitation was performed for fat rich dressings. As a result, all surfactants other than fatty acids were identified in the processed foods. The proposed method is practically applicable to analysis of surfactant-contaminated processed foods.

Key words : surfactants, kitchen detergents, contamination, processed foods, LC-MS

GM ダイズ検査におけるリアルタイム PCR 装置の同等性試験の結果

野村千枝, 角谷直哉

リアルタイム PCR 装置 LightCycler96 (LC96) を安全性審査済みの遺伝子組換えダイズ加工食品の検査に導入するために、同等性試験を行った。従来機種 ABI7900HT384well および評価機種 LC96 を用いて、通知法に記載された「検査方法の同等性確認方法」に則り同等性を確認した。LC96 は遺伝子組換えダイズ加工食品の検査に適用可能であった。

キーワード: LightCycler96、安全性審査済み、ダイズ加工食品、検査方法の同等性確認方法

2019 年 3 月 28 日、消費者庁の「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」(以下、「通知法」という)が改正され、ダイズ加工食品に LC96 が使用可能となった¹⁾。従来、当所の遺伝子組換えダイズ検査には、ABI7900HT384well を使用してきたが、今回新たに LC96 を導入した。通知法には LC96 を用いたトウモロコシ穀粒、トウモロコシ加工食品、及びダイズ穀粒の検査法は記載されているが、LC96 を用いたダイズ加工食品の検査法については記載されていない。そこで通知法に記載された「検査方法の同等性確認方法」に則り、従来機種 ABI7900HT384well 及び評価機種 LC96 を用いて装置の性能を比較した。

背景

遺伝子組換え食品の安全性審査は食品衛生上の義務となっている。安全性審査済みの遺伝子組換え作物の食品の混入に関する検査は、「遺伝子組換え食品検査方法」に従って実施される¹⁾。検査に用いられるリアルタイム PCR 装置は、すでに収載されている機種以外にも同等の性能を有する物を用いることができる。同等の性能を有するかどうかは、「(別添)安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」の「検査方法の同等性確認方法」に掲載されている方法に則って実施し、確認することができる。

「(別添)安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」の「検査方法の同等性確認方法」より引用

1. DNA 抽出精製方法について (省略)

2. 定性用リアルタイム PCR 装置について

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」中で用いられている装置のほかにも同等の性能を有する機種を用いることができる。同等の性能の確認は、感度、繰り返し再現性、ウェル間差及び増幅効率(特に定量する場合)などを考慮して行う。例えば、市販陽性対照(例えば、コメ用)を用意し、現行機種(ABI PRISM 7900 等)を用いて検出限界より少し高い濃度(10 回中 10 回全て検出される最低濃度)の希釈溶液を作成する。その溶液を用いて、確認したい機種で同様の試験を行い、また、日を変えて 3 回以上行った結果、全て検出されること。96 ウェル間で差がないことを確認する(Cq 値に最大でも 1 以上の差がない。)

3. マスターミックスについて

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」記載のもの又は同等性が確認されたリアルタイム PCR 装置を用いて、検知対照作物試料(作物試料が入手可能な場合はそれを用い、入手できない場合は加工度が高くない加工製品等でもよい。)を用いて内在性遺伝子検知法試験を繰り返し 3 回以上実施する。その結果、Cq 値や

エンドポイントにおいて「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」記載のものと大きな差がないことを確認する。また、遺伝子組換え検知部分については、市販の陽性プラスミドを希釈せずに用いて、3 回以上測定を行った結果、Cq 値やエンドポイント差が大きな差がないことを確認する (Cq 値に最大でも 1 以上の差がない。)

上記背景を踏まえ、LightCycler96 は消費者庁より通知されている「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」に用いられるリアルタイム PCR 装置の収載機種と定義できる。本試験では、ABI7900HT384well と LightCycler96 の同等性を確認したので報告する。

検査方法の概要

ダイズ加工食品の検査では、定性リアルタイム PCR 法を用いて、遺伝子組換え食品の有無について判定する。1 検体につき DNA を 2 回併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、内在性遺伝子 Le1 を検知するダイズ陽性対照試験ならびに Cauliflower mosaic virus 由来の 35S promoter (P35S) 及び RRS2 を検知する遺伝子組換えダイズ検知試験を行う。RRS 及び LLS は P35 配列を有しているが、RRS2 は P35 配列を含まない。そのため、P35S 及び RRS2 を検知する試験にて、遺伝子組換え食品混入の有無を判定する。

実験方法

1. リアルタイム PCR 装置

ABI7900HT384well (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) 又は LightCycler96 (LC96) (ロシュ社) を用いた。

2. 試薬

(1) 標準プラスミド

GM ダイズ (RRS2) プラスミドセット (ニッポンジーン社製) を用いた。

(2) プライマー対及び標識プローブ

ニッポンジーン社製プライマー対及び標識プローブ (表 1) を用いた。

(3) マスターミックス

TaqMan Universal PCR Master Mix (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) 又は

FastStart Universal Probe Master (Rox) (ロシュ社製) を用いた。

表 1 ニッポンジーン社製プライマー対及び標識プローブ

名称/検出対象	プライマー対	標識プローブ
Le1 検知 /内在性 DNA(Le1)	Le1-n02 Le1n 02-3'	Le1-Taq
P35S 検知 /組換え DNA (RRS 及び LLS)	P35S1-5' P35S1-3'	P35S-Taq
RRS2 検知/組換え DNA (RRS2)	MON89788-F MON89788-R	MON89788-P

3. リアルタイム PCR

PCR に供する溶液は、マスターミックス 10 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ M) 0.4 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ M) 0.4 μ L、滅菌水 6.3 μ L、20 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L (50 ng) 又は標準プラスミド DNA 溶液 2.5 μ L、若しくは 5 ng/ μ L ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液: NTC) 2.5 μ L を加えた後、滅菌水で 20 μ L となるよう調製した。PCR は 50 $^{\circ}$ C 2 分間の条件で保持したあと、95 $^{\circ}$ C 10 分間加温しホットスタート法で反応を開始する。その後、95 $^{\circ}$ C 30 秒間、59 $^{\circ}$ C 60 秒間を 1 サイクルとして 45 サイクルで行った。リアルタイム PCR 結果の解析は、装置付属のソフトウェアで行った。

4. マスターミックスの同等性確認試験

「検査方法の同等性確認方法」¹⁾及び日本ジェネティクス社技術資料²⁾を参考に、希釈しない標準プラスミド(1,500 copy)を、マスターミックス TaqMan Universal PCR Master Mix 及び FastStart Universal Probe Master (Rox)のそれぞれについて ABI7900HT384well 及び LC96 にて、10 ウェル併行で測定した。サイクル数 (装置に付属の解析ソフトで Automated Method を用いて得られる値、Ct 値又は Cq 値) の差 (Δ Ct 値又は Δ Cq 値) の算出、及びエンドポイント蛍光シグナル値 (エンドポイント、EPF) の確認を行った。

5. 検出限界試験

標準プラスミドを希釈して、1~20 copy/well

(1、2、5、10、20 copy/well) になるように反応液に添加し、ABI7900HT384well 及び LC96 にて、各濃度 10 ウェル併行で測定した。10 ウェル併行全てでサイクル数 (Ct 値又は Cq 値) が得られた濃度を検出限界濃度とした。

6. 増幅効率試験

標準プラスミドの希釈系列 20～250,000 copy/well (20、125、1,500、20,000、250,000 copy/well) になるように反応液に添加し、ABI7900HT384well 及び LC96 にて、各濃度 10 ウェル併行で測定した。得られた検量線から増幅効率 $e = 10^{-1/\text{slope}}$ を算出した。

7. 繰り返し再現性試験

繰り返し再現性及びウェル間差の評価として、検出限界濃度 (5 copy/well) の 100 倍濃度 (500 copy/well) の n=96 well/plate を準備し、ABI7900HT384well 及び LC96 にて 1 日 1 回を計 3 日間繰り返し実施した。それぞれの繰り返し再現性 (RSD) 及びサイクル数の値の差 (ΔCt 値又は ΔCq) を算出した。

結 果 及 び 考 察

1. リアルタイム PCR のプライマー対及びプローブ濃度の検討

標準プラスミド 1,500 copy/well を用いて、Le1 プライマー対及びプローブ溶液の濃度を 0.2～0.8 $\mu\text{L}/\text{well}$ (0.2、0.4、0.6、0.8 $\mu\text{L}/\text{well}$) になるように反応液に添加し、LC96 にて、2 ウェル併行で測定した。各条件における Cq 値とエンドポイント蛍光シグナル値 (EPF) を比較した (表 2)。EPF はプライマー対及びプローブ溶液の濃度依存的に増加し、0.6 $\mu\text{L}/\text{well}$ を超えて頭打ちになった。全ての反応でサイクル数の差 (ΔCq) は 0.45 と 1 未満であったことから、差がないと判断した。プライマー対及びプローブ溶液の量は、0.2、0.4、0.6 $\mu\text{L}/\text{well}$ のいずれでも良かったが、通知法のダイズ穀粒 ABI7700 及び 5700 の定量 PCR (p.12) と定性 PCR (p.55) と同組成である 0.4 $\mu\text{L}/\text{well}$ を選択した。サイクル数を 60 サイクルまで延長した結果、指数関数的な増幅が確認されたことから、サイクル数は 45 に決定した

(図 1)。その他リアルタイム PCR の条件は通知法に準じた。

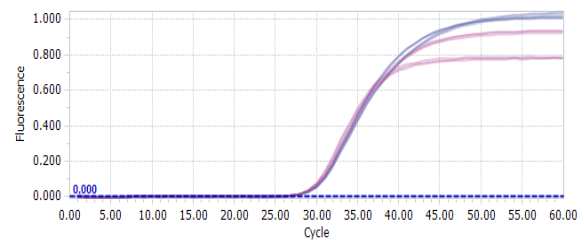


図 1 標準プラスミド (1,500 copy) の LC96 における増幅曲線

Le1 プライマー対及びプローブ溶液濃度：下から順に 0.2、0.4、0.6、0.8 $\mu\text{L}/\text{well}$

表 2 プライマー対及びプローブ溶液濃度による Cq 値および EPF の比較 (LC96, Le1)

コピー数 (copy/well)	プライマー対及び プローブ溶液濃度 ($\mu\text{L}/\text{well}$)	Cq 平均値	Cq 標準偏差	EPF	ΔCq
1,500	0.2	29.47	0.09	0.8	0.45
	0.4	29.63	0.09	0.9	
	0.6	29.73	0.05	1.0	
	0.8	29.80	0.09	1.0	

2. マスターミックスの同等性確認

希釈しない標準プラスミド (1,500 copy/well) を、マスターミックス TaqMan Universal PCR Master Mix 及び FastStart Universal Probe Master (Rox) のそれぞれについて ABI7900HT384well 及び LC96 にて、繰り返し 10 回測定した。サイクル数 (Ct 値又は Cq 値) の差 (ΔCt 値又は ΔCq 値) とエンドポイント差を確認した。全ての反応でサイクル数の差 (ΔCt 値又は ΔCq 値) は 1 未満であり、良好な結果を示した (表 3、4)。エンドポイント差については、ABI7900HT384well では試薬による大きな差はなかった (図 2)。LC96 では試薬により差が見られたが、検出可能であり検査結果に影響しないと判断した (図 3)。以上から、FastStart Universal Probe Master (Rox) は TaqMan Universal PCR Master Mix と同等であるとみなした。

表3 マスターミックスの同等性確認試験 (ABI7900HT384well)

	Le1				P35S				RRS2			
マスターミックス	Ct 平均値	Ct 標準偏差	EPF	ΔCt	Ct 平均値	Ct 標準偏差	EPF	ΔCt	Ct 平均値	Ct 標準偏差	EPF	ΔCt
TaqMan Universal PCR Master Mix	29.87	0.24	***	0.52	29.16	0.09	***	0.73	29.08	0.06	***	0.66
FastStart Universal PCR Master Mix(ROX)	30.19	0.12	***		29.56	0.13	***		28.60	0.07	***	

***装置に付属の解析ソフトで、EPF の値は算出されないが、増幅曲線の最終シグナル強度を目視で確認し、同等とみなした (図2)。

表4 マスターミックスの同等性確認試験 (LC96)

	Le1				P35S				RRS2			
マスターミックス	Cq 平均値	Cq 標準偏差	EPF	ΔCq	Cq 平均値	Cq 標準偏差	EPF	ΔCq	Cq 平均値	Cq 標準偏差	EPF	ΔCq
TaqMan Universal PCR Master Mix	27.99	0.06	1.42	0.84	27.97	0.05	1.29	0.22	28.11	0.10	1.50	0.66
FastStart Universal PCR Master Mix(ROX)	28.62	0.08	0.91		28.00	0.06	0.90		27.73	0.06	1.33	

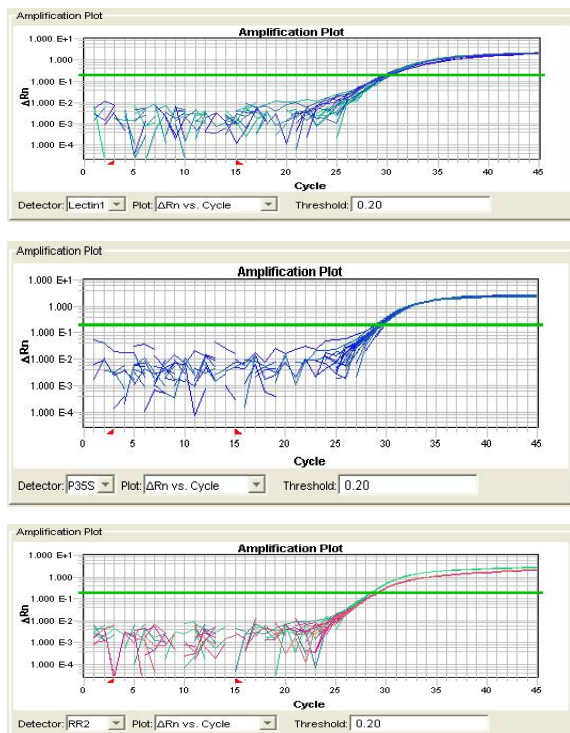


図2 標準プラスミドの ABI7900HT384well における増幅曲線
上段から順に、Le1, P35S, RRS2

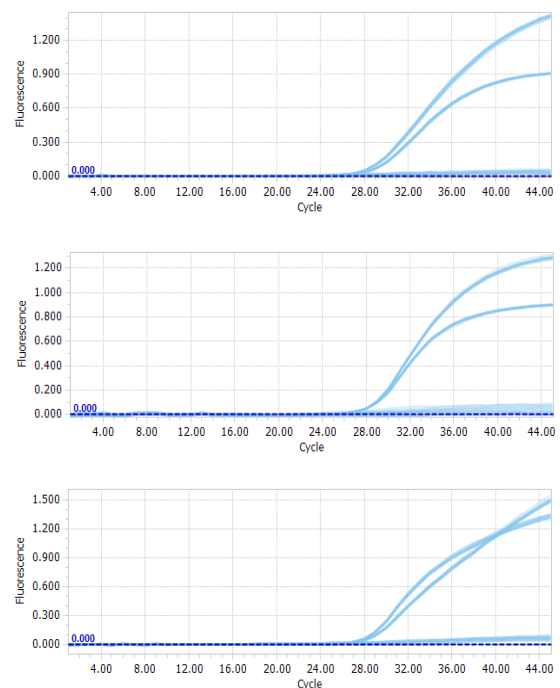


図3 標準プラスミドの LC96 における増幅曲線
上段から順に、Le1, P35S, RRS2、EPF が高い曲線が TaqMan Universal PCR Master Mix

3. 検出限界濃度の算出

感度の評価として、標準プラスミドを 1～20 copy/well (1、2、5、10、20 copy/well) 濃度に調製し、ABI7900HT384well 及び LC96 にてそれぞれの濃度を 10 ウェル併行で測定した。10 ウェル

全てでサイクル数 (Ct 値又は Cq 値) が得られた濃度を検出限界濃度とした。その結果、両機種ともに検出限界 (感度) は 5 copy/well であり、同等であった (表 5、6)。

表 5 ABI7900HT384well による検出限界試験の結果

コピー数	Le1				P35S				RRS2			
	Ct 値	平均値	RSD (%)	ΔCt 値	Ct 値	平均値	RSD (%)	ΔCt 値	Ct 値	平均値	RSD (%)	ΔCt 値
1	Negative	-	-	-	Negative	-	-	-	40.11	-	-	-
	41.86				Negative				38.96			
	40.84				38.09				Negative			
	42.75				39.78				Negative			
	Negative				39.63				Negative			
	Negative				Negative				Negative			
	40.82				Negative				Negative			
	40.56				Negative				42.79			
	40.96				37.85				Negative			
	Negative				Negative				39.19			
2	40.69	-	-	-	37.30	-	-	-	Negative	-	-	-
	40.00				38.67				38.80			
	37.48				39.46				37.90			
	Negative				39.89				40.31			
	38.27				Negative				39.27			
	38.70				39.20				38.92			
	41.62				37.22				37.94			
	38.85				38.85				40.65			
	40.92				38.16				38.59			
	40.61				37.77				37.97			
5	38.13	38.79	1.76	1.85	37.60	37.28	1.26	1.50	37.17	37.55	2.29	3.11
	38.04				36.98				37.04			
	38.24				37.18				37.97			
	39.05				36.84				37.95			
	39.36				36.79				37.32			
	38.96				37.77				37.03			
	39.81				38.29				37.10			
	38.70				37.19				38.03			
	39.66				37.06				39.51			
	37.95				37.10				36.40			
10	37.93	37.64	1.55	1.97	36.40	36.59	1.74	2.12	37.16	36.38	1.62	1.46
	37.34				38.08				36.02			
	38.92				36.05				36.94			
	38.00				36.32				36.92			
	37.14				36.26				36.04			
	36.95				37.23				35.74			
	37.40				36.76				36.45			
	37.85				36.44				37.04			
	37.10				36.40				35.70			
	37.75				35.96				35.78			
20	37.54	36.32	1.43	1.82	35.09	35.24	0.77	0.70	36.08	35.96	1.04	1.11
	36.20				35.27				36.51			

	36.65			35.02			35.54		
	36.30			35.61			36.14		
	36.45			35.00			35.93		
	35.99			35.30			36.38		
	36.04			35.56			36.07		
	35.73			35.04			36.07		
	36.44			35.62			35.48		
	35.84			34.92			35.39		

表 6 LC96 による検出限界試験の結果

コピー数	Le1				P35S				RRS2			
	Cq 値	平均値	RSD (%)	ΔCq 値	Cq 値	平均値	RSD (%)	ΔCq 値	Cq 値	平均値	RSD (%)	ΔCq 値
1	38.84	-	-	-	38.16	-	-	-	Negative	-	-	-
	39.48				Negative				38.56			
	39.79				38.74				Negative			
	Negative				Negative				Negative			
	37.85				37.69				38.66			
	39.30				37.56				Negative			
	40.36				38.78				Negative			
	Negative				38.41				39.07			
	Negative				37.33				Negative			
	Negative				Negative				37.60			
2	37.71	-	-	-	37.60	-	-	-	36.38	-	-	-
	38.42				38.57				38.65			
	38.53				Negative				39.02			
	38.05				37.54				38.40			
	38.24				37.62				36.50			
	38.86				Negative				38.62			
	Negative				Negative				38.51			
	Negative				40.14				36.19			
	37.36				38.79				Negative			
	36.41				37.51				37.85			
5	37.01	37.20	1.98	2.21	36.22	36.39	1.95	2.61	36.04	36.07	1.79	2.48
	37.10				36.32				35.48			
	36.61				35.63				35.16			
	38.28				35.18				36.14			
	36.48				36.79				35.99			
	36.45				36.64				36.04			
	37.22				36.78				36.26			
	37.36				36.49				37.64			
	36.87				37.79				36.15			
	38.66				36.03				35.81			
10	35.16	36.03	1.32	1.77	34.61	35.19	1.45	1.45	34.95	35.20	0.93	1.00
	36.05				35.54				35.62			
	35.83				35.39				35.39			
	36.26				34.95				35.76			
	35.76				34.83				34.82			
	36.05				34.59				35.12			
	36.93				35.31				35.23			
	36.01				34.79				35.08			
	35.78				36.04				35.29			
	36.51				35.81				34.76			

20	35.68	35.00	1.57	1.87	34.73	34.61	1.15	1.37	33.77	34.08	0.79	0.90
	34.58				34.61				34.01			
	34.89				34.36				34.07			
	33.97				34.55				34.06			
	34.60				34.72				34.63			
	34.98				34.34				33.73			
	35.84				35.04				33.88			
	35.33				34.04				34.25			
	34.97				35.41				34.05			
	35.13				34.26				34.31			

4. 増幅効率の算出

増幅効率の評価として、標準プラスミドの希釈系列 20～250,000 copy/well (20、125、1,500、20,000、250,000 copy/well) になるように反応液に添加し、ABI7900HT384well 及び LC96 にて各濃度を 10 ウェル併行で測定し、得られた検量線からそれぞれの装置の増幅効率を算出した。

その結果、増幅効率は、ABI7900HT384well は、Le1: 1.898、P35S: 1.966、RRS2: 1.972 であった。LC96 は Le1: 1.957、P35S: 1.985、RRS2: 1.934 であり、両機種ともに理論値 2 に近く、同等に良好な結果を示した (表 7～12、図 4～5)。

表 7 ABI7900HT384well による増幅効率試験の結果 (Le1)

コピー数	Ct 平均値	Ct 標準偏差	Conc 平均値	Conc 標準偏差	RSD(%)	ΔCt	増幅効率
20	36.77	0.80	23.49	10.37	44.14	2.36	1.898
125	33.79	0.32	141.64	27.96	19.74	1.10	
1,500	29.87	0.24	1660.57	225.47	13.58	0.79	
20,000	25.86	0.04	20634.83	543.80	2.64	0.13	
250,000	22.10	0.06	219811.71	8450.28	3.84	0.21	

表 8 ABI7900HT384well による増幅効率試験の結果 (P35S)

コピー数	Ct 平均値	Ct 標準偏差	Conc 平均値	Conc 標準偏差	RSD(%)	ΔCt	増幅効率
20	35.18	0.60	27.84	8.58	30.80	2.10	1.966
125	32.81	0.24	127.89	21.28	16.64	0.75	
1,500	28.90	0.09	1679.03	97.05	5.78	0.27	
20,000	25.10	0.07	20718.90	994.59	4.80	0.21	
250,000	21.41	0.12	238104.88	21622.67	9.08	0.44	

表 9 ABI7900HT384well による増幅効率試験の結果 (RRS2)

コピー数	Ct 平均値	Ct 標準偏差	Conc 平均値	Conc 標準偏差	RSD(%)	ΔCt	増幅効率
20	35.30	0.40	18.27	5.13	28.07	1.19	1.972
125	32.54	0.21	119.84	17.13	14.30	0.68	
1,500	29.08	0.06	1294.51	56.85	4.39	0.17	
20,000	25.02	0.04	21338.52	646.61	3.03	0.14	
250,000	21.38	0.03	262868.16	5661.98	2.15	0.10	

表 10 LC96 による増幅効率試験の結果 (Le1)

コピー数	Cq 平均値	Cq 標準偏差	Conc 平均値	Conc 標準偏差	RSD(%)	ΔCq	増幅効率
20	35.19	0.36	18.12	4.66	25.71	1.28	1.957
125	32.34	0.21	119.90	17.47	14.57	0.67	
1,500	28.62	0.08	1452.00	74.01	5.10	0.23	
20,000	24.69	0.10	20250.00	1377.00	6.80	0.35	
250,000	20.98	0.10	245200.00	16930.00	6.90	0.38	

表 11 LC96 による増幅効率試験の結果 (P35S)

コピー数	Cq 平均値	Cq 標準偏差	Conc 平均値	Conc 標準偏差	RSD(%)	ΔCq	増幅効率
20	34.37	0.40	18.63	5.08	27.24	1.20	1.985
125	31.63	0.11	118.40	8.62	7.28	0.41	
1,500	28.00	0.06	1424.00	54.61	3.83	0.18	
20,000	24.17	0.06	19720.00	901.30	4.57	0.26	
250,000	20.45	0.07	251900.00	12190.00	0.07	0.27	

表 12 LC96 による増幅効率試験の結果 (RRS2)

コピー数	Cq 平均値	Cq 標準偏差	Conc 平均値	Conc 標準偏差	RSD(%)	ΔCq	増幅効率
20	34.44	0.26	17.57	3.14	17.85	0.82	1.934
125	31.46	0.14	124.00	11.19	9.02	0.51	
1,500	27.73	0.06	1441.00	58.00	4.02	0.22	
20,000	23.80	0.06	19320.00	787.10	4.07	0.23	
250,000	19.90	0.06	252300.00	11040.00	4.38	0.25	

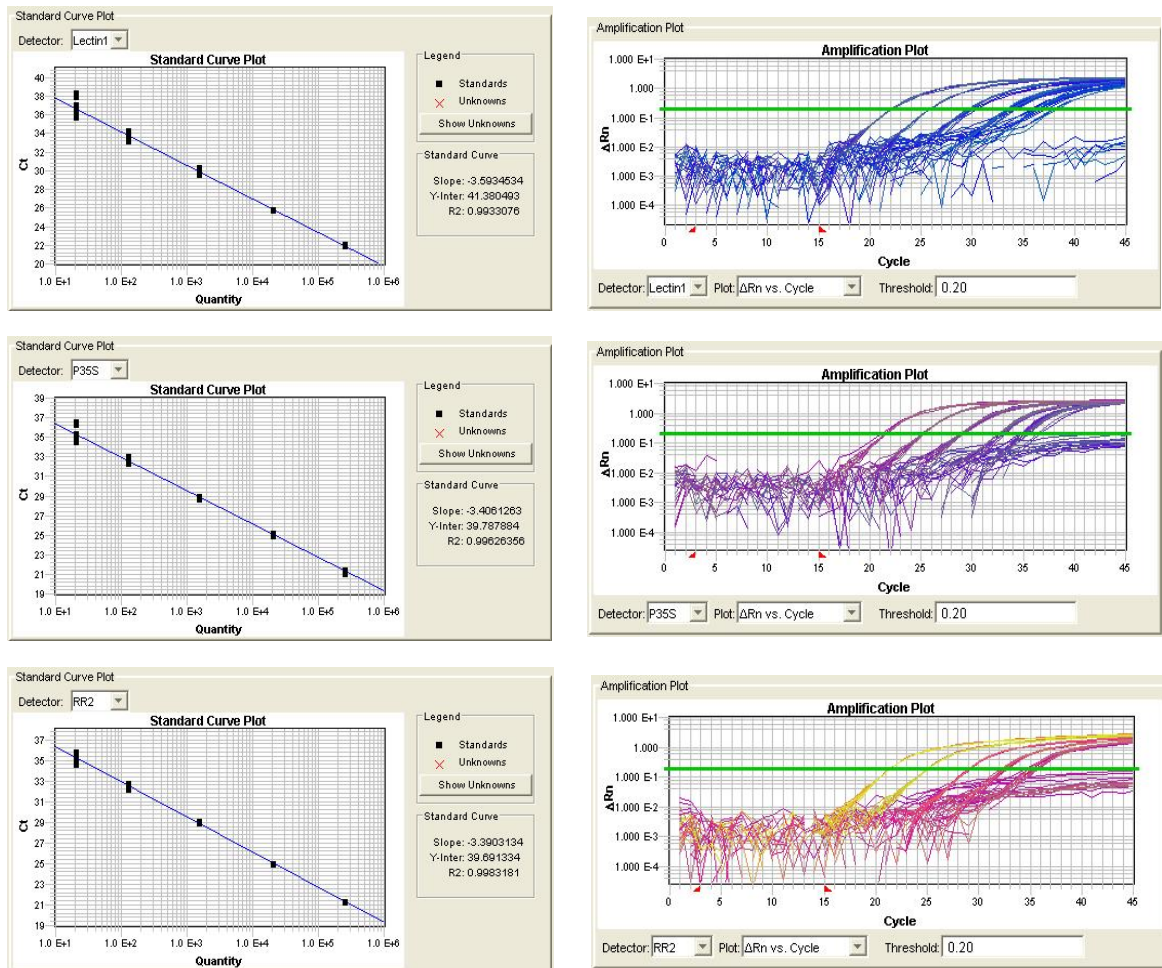


図 4 ABI7900HT384well における検量線及び増幅曲線
上段から順に、Le1, P35S, RRS2

6. 繰り返し再現性及びウェル間差

繰り返し再現性及びウェル間差の評価として、検出限界濃度の 100 倍（500 copy/well）濃度の 96 well/プレートの反応プレートを準備し、それぞれ 1 日 1 回とし、ABI7900HT384well 及び LC96 にて計 3 回繰り返し実施した。それぞれの繰り返し再現性（RSD）及び Ct 又は Cq の最大値と最小値の差（ ΔCt 又は ΔCq ）を検討した。その

結果、ABI7900HT384well は、3 回の Ct 平均値は 30.40～31.43、RSD は 0.40～0.44%、 ΔCt については 0.67～0.70 であった。LC96 は 3 回の Cq 平均値は 30.91～31.01、RSD は 0.39～0.42%、 ΔCq については 0.60～0.68 であった。 ΔCt 又は ΔCq は 1 未満であり、両機種ともに同等の良好な結果を示した（表 13、14、図 6、7）。

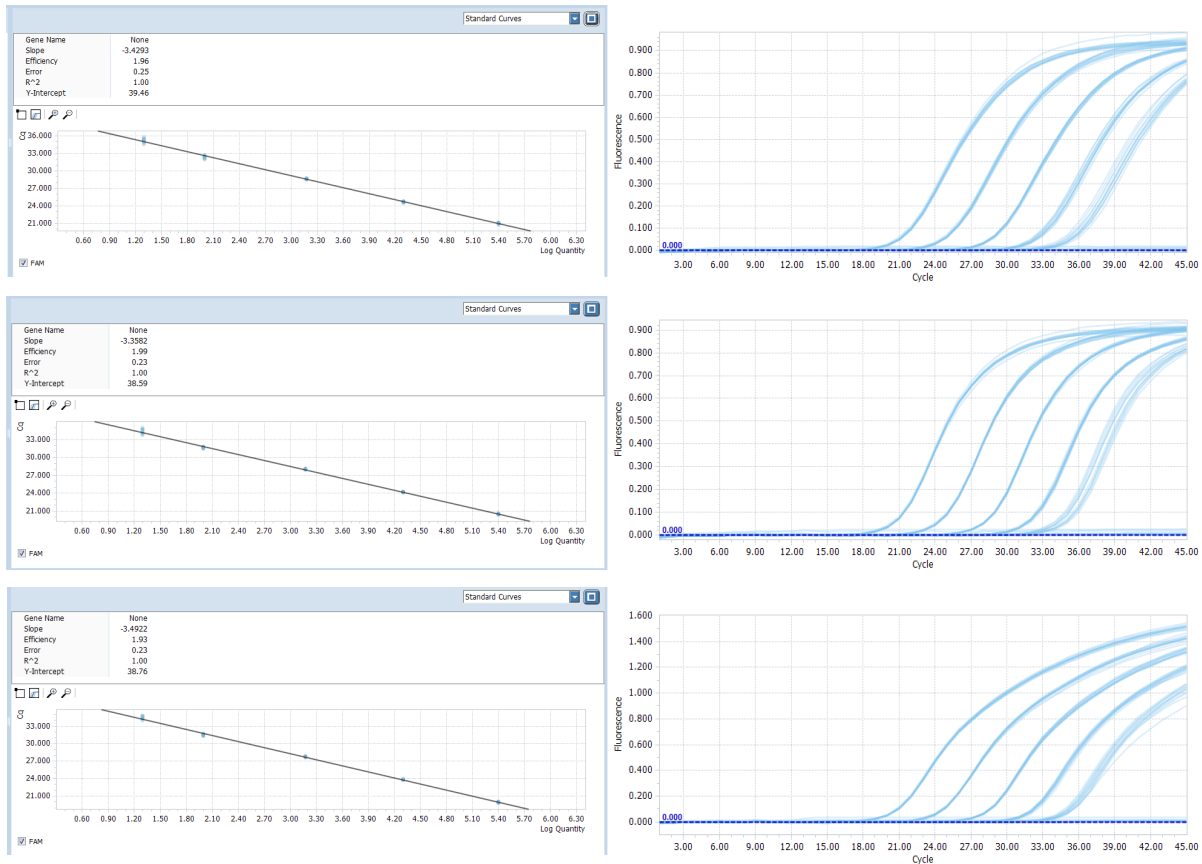


図 5 LC96 における検量線及び増幅曲線
上段から順に、Le1, P35S, RRS2

表 13 繰り返し再現性及びウェル間差の結果
(ABI7900HT384well, Le1)

コピー数 (copy/well)	Ct 平均 値	Ct 標準 偏差	RSD (%)	ΔCt
500	31.03	0.13	0.43	0.67
	31.43	0.13	0.44	0.70
	30.40	0.12	0.40	0.69

表 14 繰り返し再現性及びウェル間差の結果
(LC96, Le1)

コピー数 (copy/well)	Cq 平 均値	Cq 標 準偏差	RSD (%)	ΔCq
500	31.01	0.12	0.39	0.60
	30.92	0.13	0.42	0.63
	30.91	0.13	0.42	0.68

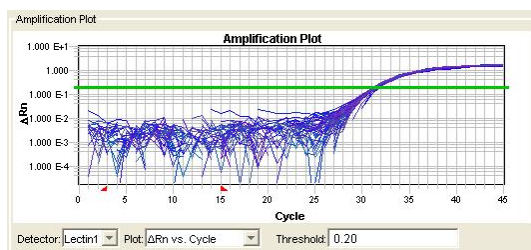
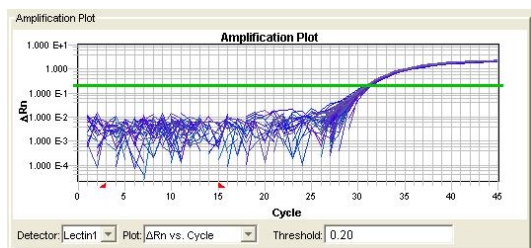
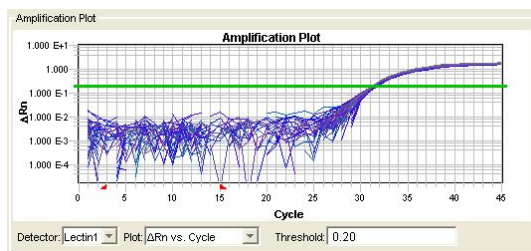


図 6 ABI7900HT384well における繰り返し再現性試験における増幅曲線 (500 copy/well)
上段から順に、1 日目、2 日目、3 日目

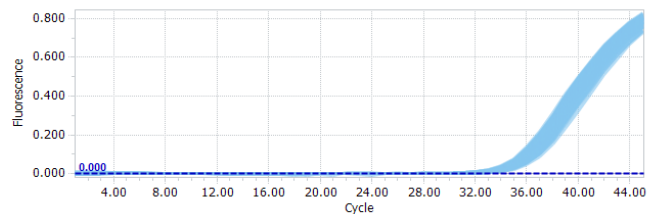
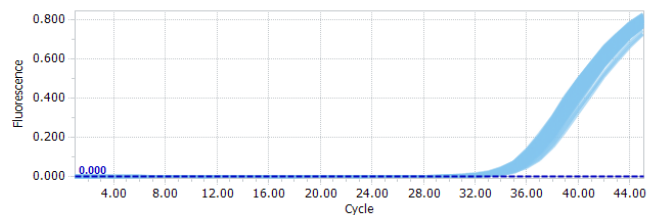
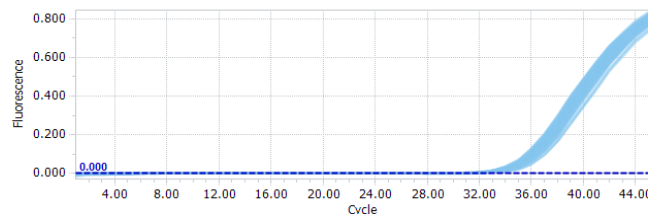


図 7 LC96 における繰り返し再現性試験における増幅曲線 (500 copy/well)
上段から順に、1 日目、2 日目、3 日目

ま と め

リアルタイムPCR装置LightCycler96(LC96)を安全性審査済みの遺伝子組換えダイズ加工食品の検査に導入するため、従来機種ABI7900HT384wellおよび評価機種LC96を用いて、通知法に記載された「検査方法の同等性確認方法」に則り同等性を確認した。LC96は遺伝子組換えダイズ加工食品の検査に適用可能であった。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 食品表示基準について(平成31年3月28日消食表第135号消費者庁通知)の別添「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」(最終改正2019年3月28日)
- 2) 日本ジェネティクス社、厚生労働省より通知されている「遺伝子組換え食品検査方法」に則ったロシュ社製リアルタイムPCR装置の同等性試験の結果および補足資料:
<https://co.n-genetics.com/product/3001>

WEB サイトの内容は2020年6月1日に確認した。

Results of equivalency test of real-time PCR devices in detection of genetically modified soybeans

Chie NOMURA and Naoya KAKUTANI

In order to introduce a new PCR equipment to the inspection of genetically modified soybean processed foods that have been approved for safety, an equivalence test was conducted between LightCycler 96 (LC 96) and ABI7900HT384well, an approved one. The result was satisfactory against criteria of "Method for confirming equivalence of inspection methods" described in the notification. Thus, LC96 is applicable to the examination of genetically modified soybean processed foods.

Keywords : LightCycler96, safety inspected, processed soybean food, method to confirm equivalence of inspection methods

遺伝子組換えばれいしょ検出における ばれいしょ加工品の DNA 抽出法の改良

村上太郎, 村野晃一, 工藤鮎子, 山口之彦, 山野哲夫

ばれいしょ加工品は生鮮ばれいしょに適用される DNA 抽出法では抽出効率が悪く、検査対応が困難であったため、本研究において DNA 抽出法の改良を検討した。酵素処理後の抽出液はマニョホールドによって、吸引を行って処理することにより、最大 20 抽出のサンプルについて効率的に精製することが可能となった。DNA の抽出が困難であった加工食品について検討を行った結果、採取量を生鮮ばれいしょの場合の半量の 4 g に減らすことによりリアルタイム PCR により、ばれいしょの陽性対照遺伝子が検出可能となった。改良した DNA 抽出法を原材料や加工法の異なるばれいしょ加工品に適用した結果、DNA の回収量の増加が確認された。全ての試料でばれいしょ陽性対照試験は陽性と判定され、通知法で示された DNA 抽出法と同等以上の性能を示したため、改良した DNA 抽出法は様々な形態の加工食品を対象として適用可能と考える。

キーワード：ばれいしょ加工品、遺伝子組換えばれいしょ、DNA 抽出、同等性評価

ばれいしょ（じゃがいも）はナス科に属する野菜であり、ポテトチップスや冷凍食品などの加工食品としても広く消費されている。

遺伝子組換えばれいしょは 1995 年に Monsanto 社が害虫に対する抵抗のある NewLeaf™ という品種を開発し、商業栽培が行われた¹⁾。その後、ウイルスにも抵抗性のある品種 NewLeaf Plus™ が開発され、商業栽培が行われていたが、現在はこれらの 2 品種については商業栽培が中止されている。近年、加熱加工の際に生成するアクリルアミドの産生を低減した品種やばれいしょに含まれる有毒物質であるソラニンなどのステロイドグリコアルカロイドの生成を抑制した品種が Simplot 社によって開発され、2015 年から米国で商業栽培されている²⁾。

日本では平成 29 年 7 月 20 日に Simplot 社によって開発された保存時の褐変を抑制し、調理時のアクリルアミドの産生を低減した遺伝子組換えばれいしょ E12 についての安全性審査が終了しており、輸入と流通が認められている³⁾。一方で、安全性審査を終了していない

ばれいしょや、これらを原材料に用いた食品等の製造・輸入・販売は、食品衛生法により禁止されている。

遺伝子組換えばれいしょの検査法は厚生労働省によって「安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」（以下、通知法とする）として示されており、平成 28 年 3 月 30 日付通知法で安全性未審査ばれいしょ 3 品種（E12、F10、J3）の検査法が記載されている³⁾。遺伝子組換えばれいしょ E12 は安全性審査が終了したため、平成 29 年 7 月 20 日に通知法から削除されたが、当研究所では大阪市内に流通する食品やインターネットで販売されている加工食品を対象として遺伝子組換えばれいしょ 3 品種（E12、F10、J3）の検査を実施している。

通知法では、図 1 に示す生鮮ばれいしょ（通常食するばれいしょの塊茎）の DNA 抽出法が例として示されている³⁾。しかしながら、ばれいしょ加工品には多種多様な原材料が含まれており、加工法も製品ごとに異なるため様々な形態の加工食品が検査対象として想定

される。本研究において生鮮ばれいしょに適用される DNA 抽出法では抽出効率が悪く、検査対応が困難であったばれいしょ加工品を対象として検査法の改良に取り組み、若干の知見が得られたため報告する。

方 法

1. 試料

2019 年 11 月から 12 月までに、大阪市内で収去または購入したばれいしょ加工品 20 試料を検査対象とした。食品の内訳は、スナック菓子 12 試料、ポテトニョッキ 2 試料、冷凍ハッシュドポテト 1 試料、チヂミ粉 1 試料、ポテトパンケーキ 1 試料、乾燥ばれいしょ 1 試料、じゃがいも麺 1 試料、葛切り 1 試料であった。試料は 2 包装以上から 120 g 以上採取し、フードプロセッサー等を使用し、均質に粉碎したものを DNA 抽出用の試料として保存した。

2. 試薬

DNA 抽出用試薬： Genomic-tip 100/G、G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液、QF 緩衝液、RNase A (100mg/mL) および Proteinase K (20 mg/mL) は QIAGEN 製を使用した。その他の試薬は以下のとおりである。 α -amylase (ニッポンジン、高純度品)、イソプロパノール (富士フィルム和光純薬、HPLC 用)、エタノール (富士フィルム和光純薬、HPLC 用)、超純水 (超純水製造装置で 18.2 M Ω /cm まで精製したもの)。

リアルタイム PCR 用試薬：FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche Diagnostics)、ばれいしょ陽性対照試験用および遺伝子組換えばれいしょ 3 系統 (E12、F10、J3) 用プライマー、プローブ、標準プラスミド DNA 溶液 (ニッポンジン)。

3. 装置・器具

フードプロセッサー：岩谷産業 ミルサー IFM-800DG

超純水製造装置：メルクミリポア Milli-Q IQ 7003

遠心機：日立 CR21N、Kokusan H-9R

微量遠心機：日立 CF15R、KUBOTA 3520

吸引マニホールド：GL サイエンス 5010-50235

真空ポンプ：KNF N86KT.18

分光光度計：島津製作所 UV1700

リアルタイム PCR：Thermo Fisher Applied Biosystems®7500、Roche Diagnostics LightCycler® 480

プレート用遠心機：アズワン PC-2R

マイクロピペット：Gilson P2、P10、P100、P1000、AXYGEN Axyet 10 mL

高遠心加速度対応ポリプロピレン製 (PP) 製 50 mL 遠心チューブ：日立 Himac 50TC チューブ PP 製 1.5 mL、2.0 mL、15 mL、50 mL 遠心チューブ：Watson

Genomic-tip 100/G 固定用ラック：QIAGEN QIArack

マイクロプレート：Thermo Fisher MicroAmp Optical 96well Reaction Plate、Roche Diagnostics LightCycler®480 Multiwell Plate 96

4. 通知法による DNA 抽出³⁾

図 1 のフローチャートに示す DNA の抽出は通知法に従い、均質化した試料から 8 g を 2 点採取および抽出し、Genomic tip 100/G によって精製後に、イソプロパノール沈殿によって DNA を濃縮した。得られた DNA 溶液は分光光度計で波長 260 nm の吸光度を測定し、濃度を算出し、10 ng/ μ L の濃度になるように希釈した。

5. リアルタイム PCR による遺伝子組換えばれいしょの検出

本研究では通知法に示された遺伝子組換えばれいしょ 3 系統 (E12、F10、J3) を対象としてリアルタイム PCR による遺伝子組換えばれいしょの検知を行った。すなわち、ばれいしょ陽性対照試験は、ばれいしょ由来 Adenine Phosphoribosyl Transferase (APRT) 遺伝子を検知するプライマーとプローブを使用した。また、遺伝子組換えばれいしょ 3 系統の検知には、各系統を特異的に検知するプライマーとプローブを使用した。測定は 2 抽出の DNA 溶液を各 2 well で測定を行った。測定結果は通知法に従って、各 well の Ct (Cq) 値が 45 Cycle 以下に陽性と判定し、Ct (Cq) 値を記載した。合計 4 well が全て陽性と判定された場合に各遺伝子が検出されたと判定した。

6. DNA 抽出法についての改良

生鮮ばれいしょに適用される DNA 抽出法では抽出効率が悪く、検査対応が困難であった加工食品は以下に示す 4 点について検討した (図 1)。

6.1 吸引ろ過についての検討

Genomic-tip 100/G に遠心分離後の上清を負荷した際に、負荷した上清の流速の低下が確認された試料については Genomic-tip 100/G を吸引マニュホールドに接続し、真空ポンプによって下方から吸引して上清を負荷した。また、試料を負荷後に QC 緩衝液で Genomic-tip 100/G を洗浄する際にも、流速の低下が確認された場合には吸引して緩衝液を負荷した。カラムの洗浄後の QF 緩衝液による DNA の溶出は QIArack を使用して、自然滴下により溶出した。

6.2 遠心加速度についての検討

試料の中で遠心分離後の上清の回収量が最も少なかった葛切りを使用し、酵素処理後の遠心加速度によって、上清の回収量が増加するか検討を行った。試料は高遠心加速度に対応可能な himac 50TC チューブに採取して、酵素処理後に 20000×g で 20 分間遠心した。各抽出液の遠心加速度ごとの回収できた上清の容量と抽出した DNA の濃度を確認した。

6.3 試料採取量についての検討

葛切りを試料として、採取量を 2 g、4 g および 8 g とした。各採取量で Genomic tip 100/G によって 2 併行で抽出した。抽出された DNA 溶液は DNA の濃度を算出した。

6.4 改良法の同等性評価

葛切り以外の試料についても 4 g および 8 g の各採取量で抽出を行い、DNA の濃度を比較した。改良法によって抽出された DNA 溶液は必要に応じて希釈後、リアルタイム PCR によってばれいしょ由来の APRT 遺伝子を測定した。通知法による DNA 抽出液との Ct (Cq) 値を比較した。

結 果 お よ び 考 察

1. 吸引ろ過についての検討

スナック菓子などの油脂を多く含む試料では Genomic-tip 100/G に遠心分離後の上清を負荷した際に、負荷した上清の流速が低下する試料が確認された。

通知法ではコメ加工品の抽出法の注釈として、液体の流速が著しく低下する時には、カラムの上方からプランジャーなどによって加圧して流速を回復させる方法が示されている³⁾。しかしながら、プランジャーによる加圧を実施した後に、プランジャーを引き抜く際に Genomic-tip 100/G のイオン交換樹脂を固定するフリットが外れる場合があり、その後の抽出の精度に影響を与える可能性が危惧された。このため、上方からの加圧ではなく、下方からの吸引により流速を回復させる方法を検討した。

吸引方法としては、汎用性も考慮して固相カラムの吸引マニュホールドに Genomic-tip 100/G を接続し、真空ポンプによって吸引を行った。スナック菓子などの油脂を多く含む試料では吸引によって流速の回復が認められ、負荷のために必要な時間が短縮された。プランジャーを

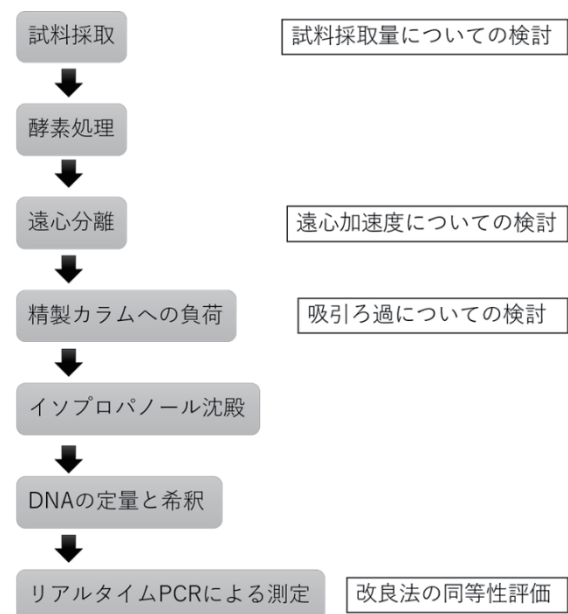


図 1 遺伝子組換えばれいしょの検査法のフローチャートと本研究での改良点

使用した際に確認されたフリットの脱離も確認されなかった。また、吸引マニキュールドにルアーストップバルブを接続することによって、吸引の必要がない試料についても、バルブを閉じることによって併行して操作することができる。従って、最大で 20 抽出の試料について併行して操作することが可能となる。

2. 遠心加速度についての検討

葛切りを通知法に従って DNA の抽出を行ったところ、通常の検査で使用していた遠心加速度 $8000\times g$ による遠心分離では、上清が $500\mu\text{L}$ 以下しか回収されず、抽出した DNA の濃度も 10 ng/mL 以下となった。このため、DNA 抽出液を希釈せずに使用し、リアルタイム PCR によってばれいしょ由来の APRT 遺伝子の検出を試みたが、陽性対照の APRT 遺伝子は 1well のみの増幅が確認された。このため、試料の再抽出について検討を行った。

通知法では DNA の収量が少ない試料では併行する抽出数を増やして抽出を行い、DNA 抽出液をまとめてエタノール沈殿により濃縮することによって DNA の収量を増やす方法が示されている³⁾。このため、抽出数を 1 点から 2 点に増やして DNA を抽出した。また、酵素処理後の試料溶液を遠心分離する際に遠心加速度を上げて遠心分離することによって、上清の回収量の向上を試みた。すなわち、高遠心加速度に対応可能な himac 50TC チューブに葛切りを採取して酵素処理を行い、 $20000\times g$ で遠心を行った。遠心後の上清の容量は、 1 mL 程度に改善された。しかしながら、回収された上清を Genomic-tip 100/G にまとめて負荷し、得られた DNA 抽出液の濃度を確認したところ、濃度は $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ 以下であり、DNA 量の増加は確認されなかった。DNA 抽出液を希釈せず使用して、リアルタイム PCR にてばれいしょ由来の陽性対照の指標となる APRT 遺伝子の検出を試みたが、APRT 遺伝子は 3 well のみが陽性と判定されたものの、通知法の判断樹に従うと再抽出が必要と判定された。さらに試料からの抽出数を 2 点から 3 点に増やして抽出した場合にも DNA の収量は改善されず、APRT 遺伝子も陽性と判定されなかった。

3. 試料採取量についての検討

DNA 抽出の酵素処理の際の遠沈管内の溶液を観察することによって、DNA 抽出用の G2 緩衝液が試料によって吸水され、酵素処理の際に流動性のない状態であることが確認された。このため、DNA の抽出効率が悪いのは試料採取量に対して、G2 緩衝液の液量が十分ではないと考え、試料の採取量について検討を行った。葛切りの採取量を 2 g ないし 4 g に減ずることによって試料に対する G2 緩衝液の量は改善し、流動性の向上も確認された。しかしながら、得られた DNA 抽出液の濃度は $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ 以下であり、DNA 収量の改善は確認されなかった。

一方で、この DNA 抽出液を希釈せずに APRT 遺伝子の検出に用いたところ、採取量が 2 g ないし 4 g で DNA 抽出した場合で 4 well の増幅が確認された。すなわち、試料採取量を減らすことによって、酵素処理時の抽出液の流動性が確保され、DNA の抽出効率が改善したと考えられた。採取量ごとの APRT 遺伝子の Ct(Cq)値を確認したところ、採取量が 2 g よりも 4 g の時の Ct(Cq)値が低く、APRT 遺伝子のコピー数が多いことが確認できたため、試料の採取量には 4 g を採用した。

4. 改良法の同等性評価

改良した検査法に従って、葛切りを除く残りのばれいしょ加工品 19 試料についても試料の採取量を 4 g に変更し、DNA を抽出した。図 2 に示すように、試料 1 g あたりの DNA 量は採取量を 8 g から 4 g に変更することによって 19 試料中 17 試料で増加した。DNA 量の回収量が採取量 8 g の場合と比較して最も低かった乾燥ばれいしょについても 67%以上の DNA が回収され、リアルタイム PCR に供するために十分な濃度の DNA が抽出された (図 2, sample18)。特に、スナック菓子などの油脂を多く含む試料 (図 2, sample1-12) では採取量を 4 g に変更することによって、抽出される DNA 量が増加した。採取量を減らすことによって、酵素処理時の試料溶液の流動性が上がり、遠心分離後の上清の回収量も増加したことが、回収可能な DNA 量の増加をもたらしたと考えられる。

抽出した DNA をリアルタイム PCR によってばれいしょ陽性対照の APRT 遺伝子の検出を行

ったところ、Sample14 のニョッキを除く試料で APRT 遺伝子が全ての well で検出され、陽性と判定された。図 2 の Sample14 に示すように、ニョッキからは十分な DNA が抽出されているにも関わらず、APRT 遺伝子が検出されなかった。このため、リアルタイム PCR で測定する際の DNA 濃度を 10 ng/μL から 20 ng/μL に変更して APRT 遺伝子の検出を行ったところ、全ての well で検出された。このニョッキの原材料表示には小麦が 1 番目に示されており、抽出された DNA の中にばれいしょ由来の遺伝子の比率が低かったと考えられる。このため、リアルタイム PCR で測定する際の DNA 濃度を増やすことによって陽性対照遺伝子が検出されたと推定される。

表 1 に示す 19 試料について、APRT 遺伝子の Ct (Cq) 値を採取量ごとに比較すると、採取量 8 g の Ct (Cq) 値に対する採取量 4 g の Ct (Cq) 値の差は -1.75 から 0.63 となった。通知法には、陽性対照試験の結果を確認して、既存の方法として Ct (Cq) 値が 1 以上大きくならないことが DNA 抽出法の同等性の判断の基準として示されており³⁾、改良した DNA 抽出法は様々な形態の加工食品を対象として適用が可能だと考えられる。

国立医薬品食品衛生研究所では安全性審査済み遺伝子組換え食品の表示制度の改正に合わせて、高度に加工されたトウモロコシ及び大豆加工品からの DNA 抽出法の改良が検討されている⁴⁾ また、ばれいしょ加工食品中から高感度に遺伝子組換えばれいしょを検出するための PCR プライマー設計についても検討が行われている⁵⁾。

今後の検査においても検査対応が困難な加工食品については、必要に応じて DNA 抽出法等の改良を検討し、検査対応を行っていきたいと考える。片栗粉や春雨のように加工度が高く残存する DNA 量が微量と考えられる試料で改良法による DNA の抽出が困難であった場合には、試料採取量を減らさずに緩衝液量を増やして対応を行うなどの方法についても検討する必要がある。

5. 遺伝子組換えばれいしょについての検査

ばれいしょ加工品 20 試料から抽出した DNA

について、遺伝子組換えばれいしょ 3 系統 (E12、F10、J3) をリアルタイム PCR によって検出を行った。全ての試料について、いずれの遺伝子組換えばれいしょも検出されなかった。このため、今回検査を行った試料については適切な流通管理が行われていることが確認された。遺伝子組換えばれいしょについては、今後も新たな品種が開発され、商業栽培が行われる可能性がある¹⁾。今後も大阪府域に流通する加工食品などの検査を通じて、遺伝子組換え食品についての監視体制の強化のために貢献を行っていきたいと考える。

謝 辞

本調査にあたり、大阪市健康局生活衛生課と大阪市保健所監査事務所のご協力を受けたことを記し、深謝申し上げます。

利 益 相 反

本事例の調査にあたって開示すべき利益相反はない。

表 1 採取量ごとのばれいしょ陽性対照 APRT 遺伝子の Cq 値

試験品番号	試験品	採取量		ΔCq ^{*1}
		4 g	8 g	
1	スナック菓子	23.61	23.95	-0.34
2	スナック菓子	24.50	24.87	-0.36
3	スナック菓子	26.76	26.13	0.63
4	スナック菓子	29.16	30.34	-1.18
5	スナック菓子	26.90	27.25	-0.35
6	スナック菓子	27.75	27.78	-0.02
7	スナック菓子	25.38	26.94	-1.56
8	スナック菓子	23.67	24.44	-0.76
9	スナック菓子	23.67	25.28	-1.61
10	スナック菓子	23.26	24.27	-1.02
11	スナック菓子	23.76	24.93	-1.17
12	スナック菓子	23.98	25.02	-1.04
13	ポテトニョッキ	35.45	37.19	-1.75
14	ポテトニョッキ	37.07	38.17	-1.09
15	冷凍ハッシュドポテト	25.35	25.27	0.08
16	チヂミ粉	27.64	28.72	-1.08
17	ポテトパンケーキ	28.10	28.56	-0.46
18	乾燥ばれいしょ	26.44	25.89	0.54
19	じゃがいも麺	35.87	35.86	0.01

*1 採取量 4 g の時の Cq 値－採取量 8 g の時の Cq 値

文 献

- 1) Hameed A, Zaidi SS, Shakir S, Mansoor S.
Applications of new breeding technologies for potato improvement. *Front Plant Sci* 2018; **9**: 1–15.
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課
新開発食品保健対策室. 安全性審査の
手続を経た旨の公表がなされた遺伝子組換え食
品及び添加物一覧（令和2年5月26日）.
<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000633627.pdf>
- 3) 厚生労働省「安全性未審査の組換え DNA 技
術応用食品の検査方法について」
- (食安発第 1116 号第 3 号、平成 28 年 3 月 30
日一部改正 生食発 0330 第 15 号) 別添
- 4) 消費者庁. 安全性審査済の遺伝子組換え食
品の検査法の標準化.
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/information/research/2016/pdf/information_research_170426_0009.pdf
- 5) 中村公亮ら, 加工食品中の遺伝子組換えジャ
ガイモ由来 DNA を高感度に検出するための
PCR プライマー設計について. *日本食品化
学学会誌* 2013; **20**(3): 161-169

WEB サイトの内容は 2020 年 6 月 24 日に確認
した

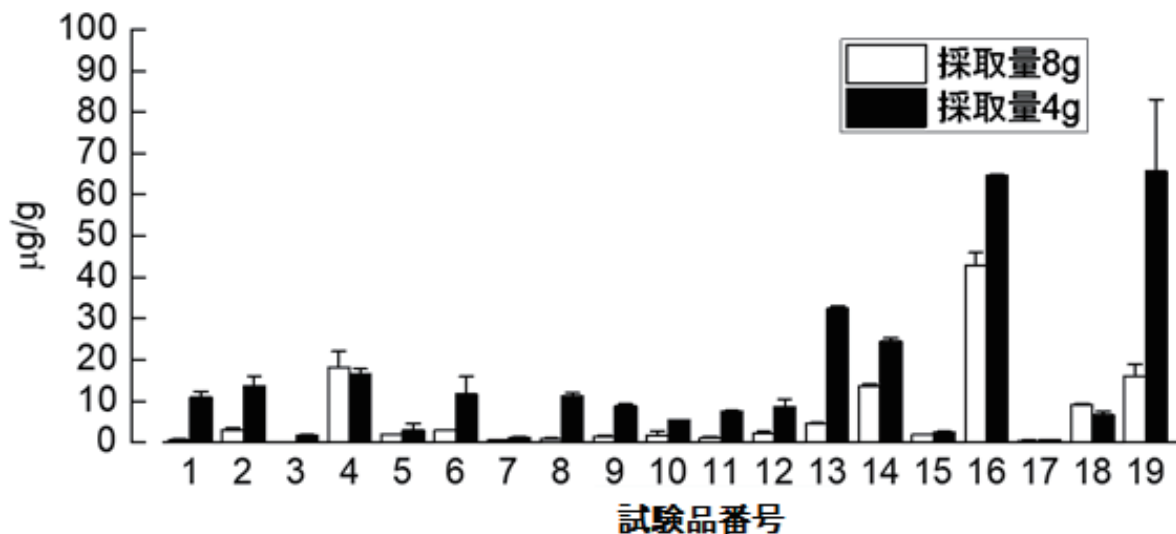


図 2 試料 1g から抽出された DNA 量
2 抽出の平均±標準偏差

**Improvement of DNA Extraction Method for the detection genetically modified potato
from processed potato product**

Taro MURAKAMI, Kouichi MURANO, Ayuko Kudo, Yukihiro YAMAGUCHI
and Tetsuo YAMANO

Existing extraction methods of genomic DNA from raw potato tubers were not suitable for processed potato products. We developed a highly efficient DNA extraction procedure for the detection of genetically modified potato in processed potato products. By reducing sample size by half, DNA yield from processed products was improved. Furthermore, utilization of vacuum manifold made it possible to process up to 20 samples simultaneously in cleanup step. The developed method was evaluated for equivalency to the original method and showed similar performances for real-time PCR amplification. Thus, the method is expected to be applicable to the examination of genetically modified potato in variously processed potato products.

Key words : genetically modified potato, DNA extraction, processed potato product, sample size

透析-固相抽出-LC-MS/MS 法による食品中の人工甘味料の一斉分析

新矢将尚, 寺谷清香, 山口之彦

食品中の人工甘味料 10 成分を透析-固相抽出-LC-MS/MS 法により高感度で一斉分析する方法を開発した。透析時の塩酸濃度、温度、振とう条件について検討した結果、塩酸濃度 0.01mol/L で室温にて常時振とう撹拌することで、24 時間以内に全成分の抽出が可能であった。対象とした 10 成分を濃縮・精製するために、3 種類の固相カートリッジを用いて保持および溶出特性について検討した結果、HLB が最も有効であり、溶出液に 85%メタノールを用いると全成分がほぼ全量回収された。市販の 6 種類の食品へ添加回収試験を行った結果、各成分の平均回収率は 71~112%、変動係数は 0.6~9.4%であった。本法における定量下限は、スクラロースが 0.0005 g/kg、それ以外の 9 成分で 0.00005 g/kg であった。

キーワード : LC-MS/MS、人工甘味料、透析、固相抽出

化学的に合成された人工甘味料は砂糖の数百~数万倍の甘味を呈し、わずかな量で甘味をつけることができる上、ほぼノンカロリーで微生物によって発酵されないことから、糖尿病や肥満、う蝕（虫歯）の予防のためにも、近年多くの食品で使用されている。日本で現在使用が許可されている人工甘味料は、サッカリンおよびそのナトリウム塩とカルシウム塩（SA）、アスパルテム（APM）、スクラロース（SU）、アセスルファムカリウム（AK）、ネオテム（NEM）、アドバンテム（ADM）である。かつてはズルチン（DU）とサイクラミン酸およびそのナトリウム塩とカルシウム塩（CY）も使用が許可されていたが、安全性の問題から現在は禁止されている。ただし、サイクラミン酸類は EU や中国などでは使用されており、日本で使用が許可されていないアリテム（AL）はオーストラリアやニュージーランドなどでは許可されている。表 1 にこれら人工甘味料の日本での認可状況を示す。

人工甘味料の分析法は、厚生労働省（当時は厚生省）が作成した「第 2 版 食品中の食品添加物分析法¹⁾」のほか、厚生労働省通知により定

められている。これらに定められていない物質については、衛生試験法²⁾に掲載されている方法が一般的に使用される。しかし、これらの分析法では物質ごとに条件が異なっており、複数の甘味料を同時に分析することは担保されていない。甘味料分析の効率化を図るためには、簡便な一斉分析法の開発が求められており、近年は LC-MS や LC-MS/MS を使用した甘味料の一斉分析法が開発されている³⁻⁵⁾。また、近年指定された NEM や ADM は超高甘味度甘味料であり、使用量がわずかで済むため高感度分析が要求され、前処理時に濃縮と精製を兼ねた固相抽出法が検討されている^{6,7)}。

食品中の人工甘味料を抽出する場合、透析法よりも溶媒抽出法の方が迅速性に優れるが、透析法の方が操作は簡便であり、夾雑成分もある程度分離することが可能である。そこで、前処理に透析および固相抽出法を用い、LC-MS/MS で測定する人工甘味料の一斉分析法について検討したので報告する。なお、分析対象は上記のほかアスパルテムの分解物であるジケトピペラジン（DKP）も含めた 10 成分とした（表 1）。

表1 分析対象とした人工甘味料と日本での認可状況

名称	サッカリン およびその ナトリウム 塩とカルシ ウム塩	アスパル テーム	スクラ ロース	アセスル ファム カリウム	ネオテーム	アドバン テーム	ズルチン	サイクラミ ン酸および そのナトリ ウム塩とカ ルシウム塩	アリテーム	ジケトピペ ラジン (5-ベンジル -3,6-ジオキ ソ-2-ピペラ ジン酢酸)
略称	SA	APM	SU	AK	NEM	ADM	DU	CY	AL	DKP
食品添加物 指定年	1948	1983	1999	2000	2007	2014	指定外	指定外	指定外	-
使用基準の 設定	あり	なし	あり	あり	なし	なし	-	-	-	-
備考	一時的な使 用規制の強 化(1973年)	-	-	-	-	-	1948年指 定, 1968年 指定削除	1956年指 定, 1969年 指定削除	-	アスパル テーム 分解物

実 験 方 法

1. 試料

大阪市内で市販された清涼飲料水、乳飲料、ウスターソース、魚介加工品、キャンデー、焼菓子および漬物（酢漬）を使用した。

2. 試薬・器材

塩酸（特級）、塩化ナトリウム（特級）、メタノール（LC/MS用）、ギ酸（LC/MS用）、サッカリンナトリウム標準品（二水和物、特級）、アスパルテーム標準品（食品添加物試験用）、アセスルファムカリウム標準品（生化学用）、アドバンテーム標準品（食品分析用）、ズルチン標準品（食品分析用）およびジケトピペラジン標準品（5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸、食品添加物試験用）は富士フィルム和光純薬(株)製を使用した。スクラロース標準品（特級）は東京化成工業(株)製、ネオテーム標準品（>98%）はシグマアルドリッチ社製、サイクラミン酸標準品（シクロヘキシルスルファミン酸ナトリウム、特級）は関東化学(株)製、アリテーム標準品（95%）はAstaTech社製を使用した。透析用セルロースチューブは日本メデカルサイエンス社製 36/32（直径 28.6mm、分画分子量 12000～14000）を使用した。検討に用いた固相抽出カートリッジは、ジーエルサイエンス（株）製 InertSep HLB FF（500mg / 6mL、以後 HLB と称す）、アジレントテクノロジー社製 Bond Elut ENV（500mg / 6mL、以後 ENV と称す）、ジーエルサイエンス（株）製 InertSep C18（500mg / 6mL、以後 C18 と称す）の3種である。精製水にはメルク社製 Milli-Q IQ7003 で製造した水、蒸留水にはヤマト科学(株)製 WG221S で製造し

た水を用いた。

各標準品は 1000 µg/mL になるよう精製水で調製し、適宜混合・希釈して用いた。透析内液には塩化ナトリウムが 2.5%および塩酸が 0.01 mol/L になるよう蒸留水で溶解・希釈し、透析外液には塩酸が 0.01 mol/L になるよう蒸留水で希釈した。

3. 装置および測定条件

分析に使用した装置および測定条件を表2に示す。ここに記していない条件については自動最適化を行った。その他、旋回振とう用の振とう機はタイテック(株)製 NR-80、恒温乾燥機は三洋電機(株)製 MOV-112(U)を使用した。

4. 試験操作

まず、粉碎して均一化した食品試料 10g を秤り取り、透析内液 50mL とともに 30cm の長さに切った透析膜内へ封入したものを、メスシリンダーに入れ透析外液で全量が 200mL になるよう定容した。メスシリンダーの上端をシリコン栓等で蓋をし、振り混ぜながら 24 時間透析した。

次に、透析終了後の外液 10mL を、予めメタノール 5mL と精製水 5mL でコンディショニングした固相カートリッジに負荷させ、精製水 5mL で洗浄ののち、85%メタノール（メタノール：精製水＝85：15 の比率で混合したもの）5mL で溶出した。溶出液を 0.45µm メンブレンフィルタでろ過したのち、分析に供した。

以上の概要を図1に示す。なお、本法では透析内液の塩化ナトリウム濃度を 2.5%、液量を 50mL としているのは、都田らの検討結果⁸⁾を採用するとともに、LC-MS/MS への塩分の影響を極力低下させるためである。

表2 LC-MS/MS 測定条件

装置			
LC部	AB SCIEX Exion LC AD		
MS/MS部	AB SCIEX TQ4500		
LC条件			
カラム	Mightysil RP-18 GP 150-2.0 (5mm)		
移動相	A: 0.1%ギ酸 / B: メタノール A/B: 85/15(0min) → 15/85(10-15min) → 85/15(15-20min)		
カラム温度	40℃		
流速	0.2 mL/min		
注入量	2μL		
MS/MS条件			
測定モード	MRM		
インターフェイス電圧	4.5 kV		
ネブライザガス	N ₂ (50 psi)		
脱溶媒ガス	N ₂ (80 psi, 300℃)		
成分	イオン化 モード	定量用	測定イオン 参照用
AK	ESI (-)	162 > 82	162 > 78
SA	ESI (-)	182 > 42	182 > 106
SU	ESI (-)	395 > 359	395 > 143
APM	ESI (-)	293 > 261	293 > 200
NEM	ESI (-)	377 > 200	377 > 345
ADM	ESI (-)	457 > 200	457 > 425
CY	ESI (-)	178 > 80	178 > 96
AL	ESI (-)	330 > 312	330 > 295
DU	ESI (+)	181 > 108	181 > 136
DKP	ESI (-)	261 > 146	261 > 217

試料 10g

透析 (室温, 24h)

内液: 2.5%NaCl in 0.01mol/L HCl (50mL)

外液: 0.01mol/L HCl で 200mL に定容

透析外液 10mL を HLB 固相カラムへ負荷

洗浄 精製水 5mL

溶出 85% MeOH 5mL

LC-MS/MS 測定

図1 分析方法の概要

5. 添加回収試験

清涼飲料水、ウスターソース、魚介加工品、キャンデー、焼菓子および酢漬の6食品に、SU については 0.001g/kg および 0.01g/kg になるように、SU 以外の9成分については 0.0001g/kg および 0.01g/kg になるように添加し、図1に示した方法で試料ごとに5回試験して回収率を求めた。

結果および考察

1. 定量下限と検量線

LC-MS/MS 測定において、SUを除いた9成分では 0.005 μg/mL 以上の濃度で標準液の応答値の変動係数は 10%未満であったが、SUは他の成分に比べて感度が悪く、変動係数が 10%未満となったのは 0.05 μg/mL 以上であった。そこで、定量下限は SU 以外で 0.005 μg/mL、SU で 0.05 μg/mL とした。検量線は SU を除いて 0.005 ~ 1 μg/mL、SU は 0.05 ~ 1 μg/mL の範囲で相関係数 0.999 以上の良好な直線性が得られた。

2. 透析時の塩酸濃度および温度の検討

透析時の塩酸濃度は、内液、外液とも 0.01mol/L に調製するのが一般的だが、APM は

強酸性やアルカリ性では不安定であり、NEM、ADM を含めてジペプチド型甘味料の標準液は pH3 (0.001mol/L 塩酸) で調製される²⁾。また、SA、AK、CY は解離性物質であり逆相系の固相抽出を行う場合には酸性の強い方が保持されやすいと考えられる。そこで、1 μg/mL の混合標準液を塩酸濃度が 0.001mol/L、0.01mol/L、0.1mol/L になるよう調製し、それぞれ 4℃、20℃、40℃で5日間静置して経時的に分析した。温度の調整は 4℃が冷蔵庫、20℃および 40℃は恒温乾燥機で行った。

AK、NEM および CY についての結果を図2に示すが、4℃ではいずれの塩酸濃度においても、全ての甘味料は安定していた。20℃では塩酸濃度が 0.1mol/L の場合は、NEM で2日目以降に減少した。40℃では塩酸濃度が 0.1mol/L の場合は、AK で2日目以降に減少し、NEM で1日目から著しく減少した。NEM と同様の挙動を示したのは ADM であり、AK と同様の挙動を示したのは SA、SU、APM、DKP であった。一方、CY はどの温度、どの塩酸濃度でも安定しており、AL と DU も同様の挙動を示した。透析時間を24時間とすれば、塩酸濃度が 0.01mol/L もしくは 0.001mol/L (pH が 2~3) であれば、室温以下の温度でいずれの成分も安定して存在す

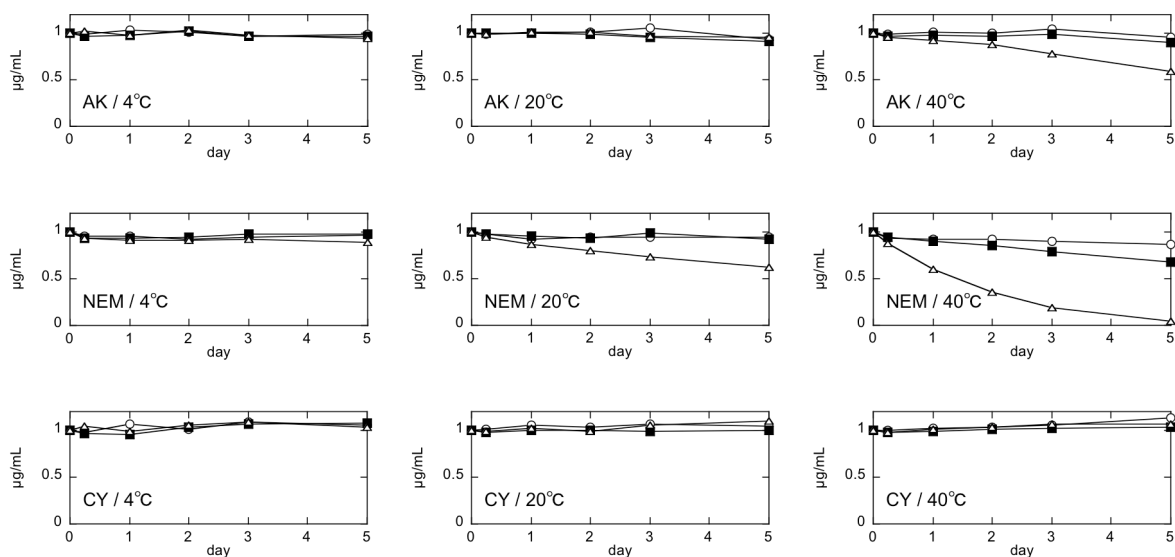


図2 異なる塩酸濃度における甘味料標準液の温度安定性(○: 0.001mol/L, ■: 0.01mol/L, △: 0.1mol/L)

ると考えられた。

3. 透析時の振とう条件の検討

クラッカーなどデンプン質の多い食品は、透析膜内で膨潤して流動性に乏しく、平衡に達するまで時間がかかるため、48時間の透析が推奨されている⁹⁾。公定法における透析操作は手動で時々振り混ぜるだけだが、振とう撹拌を促進させるため、マグネチックスターラーと旋回振とう機を用いて透析効率を比較した。透析中は振とう撹拌に用いた機器を常時稼働させ、マグネチックスターラーではメスシリンダー内で吊

した試料入りの浸透膜がゆらゆら動く程度に撹拌した。旋回振とう時には上下撹拌が起こるようにメスシリンダーを斜めに置いて固定し、180r/minの速度で振とうした(図3)。また、脂肪分を含む食品は透析効率が低いと想定し、乳飲料、魚介加工品および焼菓子に各成分を0.01g/kgになるよう添加し、48時間の透析中に経時的に透析外液の濃度を測定して回収率を算出した。

焼菓子で回収率が最も低かったADMの結果を図4に示す。乳飲料および魚介加工品において、旋回振とうが最も早く平衡に達していたが、マグネチックスターラー撹拌も手動振り混ぜも12時間以降ではほとんど差がなかった。焼菓子においては、手動振り混ぜでは24時間後の回収率が70%に満たず48時間を要したが、旋回振とうおよびマグネチックスターラー撹拌では24時間でほぼ平衡に達していた。

したがって、24時間で透析を終了させるには、膨潤しやすい食品については旋回振とうまたはマグネチックスターラー撹拌が常時必要だが、透析膜内で流動性のある食品については、手動振り混ぜでも十分可能であると考えられた。



図3 旋回振とうの実施状態

4. 固相抽出条件の検討

(1) 固相カートリッジの比較

無極性相互作用により一般的に使用されるオ

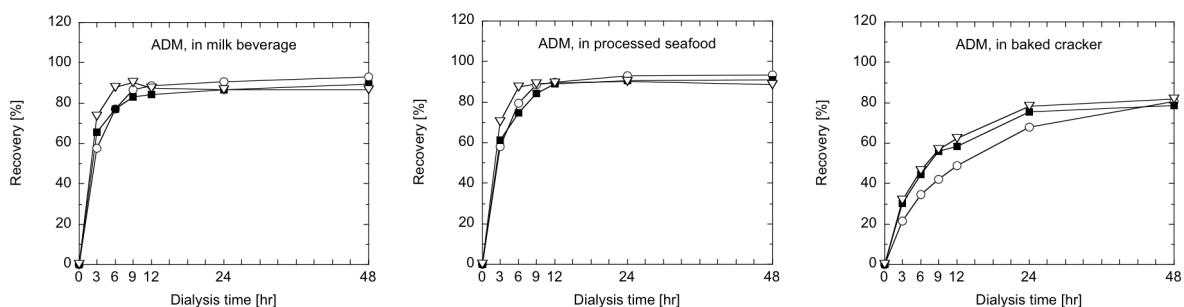


図4 透析時の異なる振とう条件における食品へ添加したアドバンテーム回収率の経時変化
(○: 手で時々振り混ぜ, ■: マグネチックスターラーによる常時攪拌,
▽: 斜めに置いて常時旋回振とう)

クタデシル基 (C18) を結合させた固相、スクラロースの分析に使用される²⁾ポリマー基材の固相 (ENV)、サイクラミン酸の分析に使用される¹⁰⁾親水性-親油性バランスコポリマー (HLB) を用いた固相3種において、甘味料10成分の保持および溶出特性を比較した。10成分各 0.5 µg/mL、塩酸濃度 0.01mol/L になるよう調製した混合標準液 10mL を3種の固相カートリッジに負荷し、精製水 5mL で洗浄後、メタノールと精製水の比が 50:50~100:0 で異なる7段階の溶出液 5mL でそれぞれ溶出した液を測定して回収率を算出した。また、通過液および洗浄液についても測定し、保持や脱離の状況を確認した。

結果を表3に示す。HLB においては、全ての成分が通過液から確認されなかったため、全量保持されたと考えられた。メタノール比率が 80~90% で全ての成分がほぼ 100% 回収されたが、AK については 3~5% が負荷後の洗浄で脱離していた。ENV においても、通過液からは確認されず全成分が保持されたと考えられたが、AK、SA、CY の大半は洗浄液から確認され、これらの保持は弱いことが判明した。ただし、負荷後に洗浄せず溶出させれば、メタノール比率が 80~90% で全ての成分がほぼ 100% 回収されることが確認された。C18 においては、解離性物質である AK、SA、CY の保持は不安定であり、通過液からも確認された。これら以外の7成分については、メタノール比率が 60% 以上でほぼ全量が回収された。

以上の結果から、固相抽出には HLB を用い、溶出液のメタノール比率は 85% が最適であると

判断した。なお、HLB 固相カートリッジはメーカーや充填容量が異なると性能が異なる場合があるので、注意が必要である。

(2) 負荷時の塩酸濃度

甘味料 10 成分が各 0.5 µg/mL になるよう 0.001mol/L、0.01mol/L、0.1mol/L の塩酸で調製した混合標準液を、それぞれ 10mL を HLB カートリッジに負荷したのち、85%メタノール (メタノール:精製水=85:15) 5mL で溶出して回収率を算出した。結果を表4に示すが、いずれの塩酸濃度においても全ての成分はほぼ全量回収された。したがって、透析中に食品に起因して透析液の pH が若干変動 (pH2±1 の範囲) しても、固相抽出には影響しないと考えられた。

(3) 固相カラムによる濃縮倍率

甘味料 10 成分が各 0.5 µg/mL になるよう 0.01mol/L 塩酸で調製した混合標準液を、HLB カートリッジに 10mL、25mL、50mL、100mL 負荷したのち、それぞれ 85%メタノール 5mL で溶出して回収率を算出した。溶出液はそれぞれの濃縮倍率で希釈して測定した。結果を表5に示す。AK について、濃縮倍率が 10 倍以上 (50mL 以上の負荷) で回収率がやや低下していたが、これは他の成分に比べて保持が弱いためであると考えられた。AK 以外では 20 倍濃縮 (100mL 負荷) しても良好な回収率が得られたが、実際の透析液では食品中のマトリックスにより破過する可能性もあるため、濃縮倍率を高くする場合には実試料で確認する必要がある。

5. 添加回収試験

本法では 10g の食品試料について、全量が

表3 固相抽出カートリッジ3種における溶出液中メタノール比率を変化させたときの甘味料の回収率（括弧内は負荷後に洗浄せず溶出した場合の回収率）

SPE cartridge	Sweetener	Recovery (%)						
		Eluent composition (MeOH:H ₂ O)						
		50:50	60:40	70:30	80:20	85:15	90:10	100:0
HLB	AK	96 (100)	97 (100)	96 (99)	97 (101)	99 (102)	97 (101)	95 (100)
	SA	97 (97)	98 (98)	100 (100)	95 (95)	99 (99)	94 (94)	89 (89)
	SU	71 (72)	98 (99)	104 (105)	106 (107)	106 (107)	101 (102)	103 (103)
	APM	98 (98)	99 (99)	103 (103)	103 (103)	107 (107)	106 (106)	104 (104)
	NEM	0 (0)	4 (4)	76 (76)	104 (104)	103 (103)	107 (107)	104 (104)
	ADM	0 (0)	4 (4)	72 (72)	103 (103)	104 (104)	107 (107)	103 (103)
	CY	99 (100)	100 (101)	101 (102)	101 (101)	102 (103)	95 (96)	64 (65)
	AL	92 (92)	103 (103)	101 (101)	104 (104)	106 (106)	102 (102)	102 (102)
	DU	0 (0)	17 (17)	71 (71)	100 (100)	104 (104)	104 (104)	103 (103)
	DKP	91 (91)	103 (103)	105 (105)	106 (106)	109 (109)	109 (109)	108 (108)
ENV	AK	14 (96)	14 (95)	14 (96)	14 (94)	15 (96)	15 (96)	14 (95)
	SA	39 (102)	41 (103)	41 (104)	42 (104)	38 (101)	38 (100)	36 (98)
	SU	101 (102)	104 (104)	108 (108)	110 (111)	107 (108)	109 (109)	105 (106)
	APM	57 (57)	93 (93)	101 (101)	104 (104)	102 (102)	101 (101)	76 (76)
	NEM	0 (0)	0 (0)	2 (2)	87 (87)	96 (96)	104 (104)	99 (99)
	ADM	0 (0)	0 (0)	12 (12)	97 (97)	98 (98)	106 (106)	98 (98)
	CY	9 (95)	7 (93)	8 (95)	8 (94)	10 (97)	11 (97)	7 (93)
	AL	30 (30)	74 (74)	91 (91)	97 (97)	94 (94)	92 (92)	71 (71)
	DU	0 (0)	34 (34)	95 (95)	107 (107)	106 (106)	106 (106)	106 (106)
	DKP	109 (109)	110 (110)	109 (109)	111 (111)	110 (110)	110 (110)	109 (109)
C18	AK	25 (38)	28 (40)	28 (41)	28 (40)	34 (46)	26 (39)	21 (34)
	SA	64 (67)	79 (81)	75 (78)	73 (75)	88 (90)	57 (60)	41 (44)
	SU	108 (109)	108 (109)	110 (110)	102 (102)	101 (102)	104 (105)	110 (111)
	APM	91 (91)	100 (100)	104 (104)	107 (107)	104 (104)	107 (107)	110 (110)
	NEM	0 (0)	98 (98)	103 (103)	103 (103)	105 (105)	105 (105)	108 (108)
	ADM	92 (92)	102 (102)	103 (103)	103 (103)	103 (103)	104 (104)	110 (110)
	CY	18 (27)	25 (33)	28 (37)	29 (38)	43 (52)	20 (29)	16 (24)
	AL	103 (103)	103 (103)	106 (106)	104 (104)	105 (105)	105 (105)	110 (110)
	DU	102 (102)	100 (100)	103 (103)	103 (103)	105 (105)	106 (106)	108 (108)
	DKP	108 (109)	105 (105)	105 (106)	106 (106)	108 (108)	109 (109)	112 (112)

表4 HLB カートリッジに異なる塩酸濃度の甘味料溶液を負荷した際の回収率

Sweetener	Recovery (%)		
	HCl conc. of loading solution		
	0.001mol/L	0.01mol/L	0.1mol/L
AK	100	99	103
SA	99	99	96
SU	102	106	104
APM	99	107	106
NEM	100	103	106
ADM	106	104	104
CY	101	102	102
AL	104	106	106
DU	104	104	106
DKP	106	109	110

表5 HLB カートリッジに対する異なる濃縮倍率での甘味料回収率

Sweetener	Recovery (%)			
	Concentration rate (Loading volume)			
	×2 (10mL)	×5 (25mL)	×10 (50mL)	×20 (100mL)
AK	99	100	93	78
SA	99	103	103	106
SU	106	103	106	107
APM	107	108	107	107
NEM	103	105	106	105
ADM	104	102	107	104
CY	102	103	100	92
AL	106	104	104	104
DU	104	107	104	106
DKP	109	109	110	109

表6 本法による食品への甘味料添加回収試験結果

Sweetener	Spiked level (g/kg)	Recovery (%)					
		Softdrink	Worcester sauce	Processed seafood	Candy	Baked cracker	Pickles
AK	0.0001	101 ± 8.3	102 ± 2.3	101 ± 3.3	95 ± 4.1	103 ± 3.4	98 ± 3.5
	0.01	103 ± 2.1	110 ± 1.1	99 ± 1.6	102 ± 2.9	91 ± 1.4	102 ± 2.2
SA	0.0001	94 ± 3.2	93 ± 5.8	83 ± 4.5	94 ± 3.3	94 ± 3.8	92 ± 3.0
	0.01	85 ± 4.3	100 ± 0.9	88 ± 3.1	90 ± 6.2	81 ± 2.1	93 ± 1.5
SU	0.001	101 ± 7.2	92 ± 5.2	105 ± 9.9	112 ± 5.3	103 ± 5.0	100 ± 7.2
	0.01	107 ± 7.2	101 ± 3.9	105 ± 9.5	108 ± 9.3	83 ± 3.1	101 ± 7.2
APM	0.0001	103 ± 5.7	79 ± 5.0	99 ± 2.8	103 ± 6.0	90 ± 6.4	101 ± 3.4
	0.01	102 ± 3.1	99 ± 2.5	95 ± 2.2	96 ± 3.1	85 ± 2.6	99 ± 2.5
NEM	0.0001	112 ± 2.7	107 ± 3.4	73 ± 4.1	111 ± 2.0	98 ± 3.6	100 ± 4.0
	0.01	95 ± 2.2	103 ± 0.8	82 ± 3.7	95 ± 1.8	80 ± 1.9	95 ± 1.2
ADM	0.0001	99 ± 3.7	89 ± 4.7	71 ± 2.8	97 ± 3.1	82 ± 4.1	106 ± 3.2
	0.01	95 ± 3.4	101 ± 1.6	74 ± 6.1	92 ± 1.8	72 ± 1.6	92 ± 0.6
CY	0.0001	108 ± 2.5	98 ± 1.1	91 ± 0.7	104 ± 2.2	103 ± 3.5	94 ± 3.7
	0.01	106 ± 2.3	103 ± 1.6	102 ± 1.9	106 ± 1.8	92 ± 2.6	104 ± 2.1
AL	0.0001	76 ± 2.5	80 ± 1.7	102 ± 2.7	86 ± 2.1	79 ± 2.5	98 ± 3.6
	0.01	101 ± 1.8	96 ± 1.2	103 ± 1.6	103 ± 2.4	83 ± 2.5	98 ± 1.4
DU	0.0001	95 ± 3.0	84 ± 3.7	86 ± 3.1	77 ± 3.8	73 ± 3.0	110 ± 3.2
	0.01	108 ± 3.1	96 ± 2.2	85 ± 4.2	101 ± 1.5	78 ± 2.3	102 ± 2.5
DKP	0.0001	98 ± 3.6	84 ± 2.8	100 ± 4.0	98 ± 2.8	93 ± 3.1	110 ± 4.8
	0.01	109 ± 4.1	100 ± 2.9	101 ± 3.0	105 ± 3.4	85 ± 3.7	106 ± 2.6

Mean ± S.D. (n=5)

200mL になるように透析した透析外液を、固相抽出により 2 倍濃縮・精製した溶出液を LC-MS/MS で分析する。したがって、不検出基準である定量下限値の 2 倍濃度は、SU で 0.001g/kg、SU 以外で 0.0001g/kg である。また、検量線の上限である 1 µg/mL に相当する濃度は、0.01g/kg である。これら二段階の濃度で添加回収試験を行った。透析時には 24 時間継続して旋回振とうを行った。

結果を表 6 に示す。いずれの成分も、全ての食品において、二段階とも回収率は 70～120% の間にあり、ばらつきも小さかった（変動係数 <10%）ため、本法の有効性が示された。本法により食品中の人工甘味料の高感度一斉分析が可能であるが、AK、SA、SU、APM の陽性試料では一般に高濃度で含まれるため、その場合は固相抽出を用いずに透析外液を希釈することで、一斉分析が可能であると考ええる。

ま と め

食品中の人工甘味料 10 成分を透析-固相抽出-LC-MS/MS 法により高感度で一斉分析する方法を開発した。透析に用いる塩酸濃度は 0.01mol/L で、室温にて 24 時間常時振とうすることで、良好な回収率が得られた。固相抽出には HLB カートリッジを用い、85%メタノールで溶出させることで、全成分がほぼ全量回収された。市販の 6 種類の食品への添加回収試験の結果は、10 成分いずれも平均回収率が 70～120% の範囲内にあり、変動係数は 10%未満であった。本法における定量下限は、食品として SU が 0.0005 g/kg、AK、SA、APM、NEM、ADM、CY、AL、DU および DKP が 0.00005 g/kg であった。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課. 第2版 食品中の食品添加物分析法 2000. 社団法人日本食品衛生協会; 2000. 141-158.
- 2) 日本薬学会編. 衛生試験法・注解 2020. 金原出版; 2020. 383-403.
- 3) 小山政道, 吉田和郎, 内堀伸健, 和田伊知朗, 秋山和幸, 佐々木珠美. LC/MSによる食品中の9種甘味料の一斉分析法. 食品衛生学雑誌 2005; **46**: 72-78.
- 4) 松本ひろ子, 平田恵子, 坂牧成恵, 萩野賀世, 牛山博文. サイクラミン酸、ズルチンのHPLCによる定量及びLC/MS/MSによる確認と8種甘味料の系統的分析. 化学物質総合管理 2010; **6** (1): 25-35.
- 5) 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 2013; **54**: 204-212.
- 6) 北野文理, 富岡華代, 北田善三. HPLC およびLC/MSによる食品中のジペプチド型甘味料の同時分析. 日本食品化学学会誌 2014; **21**: 115-120.
- 7) 小林美紀, 寺田久屋, 中島正博. HPLC およびLC-MS/MSによる加工食品中の超高甘味度甘味料アドバンテーム定量法. 食品衛生学雑誌 2015; **56**: 14-18.
- 8) 都田路子, 青柳陽子, 佐藤寛, 高田千恵子, 山田洋子, 萩原勉, 天川映子, 安田和男. ジャム及びマーマレード中のサッカリン及びズルチンのHPLC分析. 東京都立衛生研究所研究年報 2001; **52**: 57-61.
- 9) 松本ひろ子, 平田恵子, 坂牧成恵, 萩野賀世, 牛山博文. HPLCによる食品中のネオテーム, アリテームおよびアスパルテームの同時分析法. 食品衛生学雑誌 2008; **49**: 31-36.
- 10) 山口之彦, 吉田秋比古, 清水充. LC/MS/MSを用いた食品中のサイクラミン酸分析. 大阪市立環境科学研究所報告 2010; **72**: 13-18.

**Simultaneous analysis of artificial sweeteners in foods by LC-MS/MS
after dialysis and solid-phase extraction**

Masanao SHINYA, Sayaka TERATANI and Yukihiro YAMAGUCHI

A simple and sensitive method for the simultaneous determination of ten artificial sweeteners (acesulfame K, AK; saccharin Na, SA; sucralose, SU; aspartame, APM; neotame, NEM; advantame, ADM; Na cyclamate, CY; alitame, AL; dulcin, DU; diketopiperazine, DKP) in various foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed. Dialyzing in 0.01 mol/L hydrochloric acid at a room temperature, with continuous shaking or stirring, enabled to extract all components within 24 hours. As a result of comparing the retention and elution characteristics of three kinds of solid-phase extraction cartridges (i.e., InertSep HLB FF (HLB), Bond Elut ENV and InertSep C18), HLB was excellent in cleanup when 85% methanol was used as an eluent. The mean recoveries from six kinds of foods fortified at the levels of 0.0001 (except for SU, 0.001 for SU) and 0.01 g/kg were 71-112%, and their relative standard deviations were 0.6-9.4%. The quantification limit of SU was 0.0005 g/kg, and the limits of AK, SA, APM, NEM, ADM, CY, AL, DU and DKP were 0.00005 g/kg.

Key words: LC-MS/MS, artificial sweetener, dialysis, solid-phase extraction

液体クロマトグラフィー-フォトダイオードアレイ検出器を用いた 医薬品成分の一斉分析法の開発

武田章弘, 浅田安紀子, 清田恭平, 土井崇広, 田上貴臣

いわゆる健康食品として流通している製品の中には違法に医薬品成分を含有している製品が存在し、摂取による健康被害が報告されている。近年では健康食品中からホスホジエステラーゼ-5 阻害薬の化学構造の一部を改変した類似体の検出が多数報告されており、健康食品中に含有される恐れのある医薬品成分の種類は増えている。

このような健康食品による健康被害を未然に防止することを目的に、当所では 2002（平成 14）年度から、いわゆる健康食品の医薬品成分の有無を確認する買い上げ調査を実施している。2018 年度に全国の検出傾向などを基に検査項目を見直し、検査対象の医薬品成分として 40 種類の医薬品成分を選定した。本研究では検査を効率的に実施することを目的として、検査対象成分 40 化合物を効率的に検出可能な液体クロマトグラフィー-フォトダイオードアレイ検出器による多成分一斉分析法の開発を行った。

検討の結果、検査対象成分 40 化合物を 8 化合物ずつに分け 5 系列の混合標準溶液を用いることで、対象とする 40 化合物全てを検出することが可能であった。さらに健康食品中に含有される医薬品成分の推定量に対して、検出下限値は十分に下回っており、健康食品中の検査対象成分を検出可能であった。

キーワード：健康食品、医薬品成分、スクリーニング分析

ヒトが経口的に摂取するものは、医薬品と食品に大別され、健康食品は広く健康の保持増進に資する食品として販売・利用されるもの全般を指す。また、法令上で保健機能食品として取り扱われるものを除き、健康食品に法令上の定義はなく、行政上「いわゆる健康食品」といわれる¹⁾。いわゆる健康食品は食品に分類されることから、医薬品成分を含有してはならず、医薬品のような身体の構造や機能に影響する旨を表示することが認められていない。

しかしながら、いわゆる健康食品として流通している製品の中には違法に医薬品成分を含有する製品が存在し、このような製品は無承認無許可医薬品として取り締まりの対象となる²⁾。医薬品成分の含有が疑われる健康食品には強壮効果又

は痩身効果を標榜したものがあり、検出される医薬品成分も強壮効果を目的とした勃起不全治療薬であるホスホジエステラーゼ-5（PDE-5）阻害薬や痩身効果を目的とした血糖降下薬、利尿薬、食欲抑制薬、肥満治療薬、下剤、選択的セロトニン再取り込み阻害薬などがあげられる。このような医薬品成分は日本では未承認の成分も多く、承認されているものでも用量を超えた量が健康食品中に含有されている場合がある³⁾。このような医薬品成分を含有する健康食品を摂取したことによる健康被害も報告されており⁴⁾、大阪府でも 2008 年にインターネットより購入したカプセル状の健康食品による健康被害が発生した⁵⁾。我々の調査の結果、1 カプセル当たり PDE-5 阻害薬であるシルデナフィルが約 7.7 mg 及び血糖降下薬

であるグリベンクラミドが約 122.7 mg 含まれていた⁶⁾。日本でのグリベンクラミドの用法及び用量は「1 日 1.25～2.5 mg で 1 日最高投与量は 10 mg まで。1 日 1 回または 2 回投与」とされ、副作用として過量投与による低血糖が知られている⁷⁾。この健康食品には「用時 30 分前に 1 粒 (カプセル) 服用」と記載されていることから、グリベンクラミドの 1 日最大投与量と比較しても 1 回の服用で約 10 倍の量を摂取することになる。実際、健康被害を受けた患者は低血糖の症状を訴えていたことから、過量のグリベンクラミドを含有する当該健康食品との因果関係が疑われた。さらに近年、強壮効果を標榜した健康食品からシルデナフィ、タダラフィル、バルデナフィルなどの既存の PDE-5 阻害薬の化学構造の一部を改変した類似体が検出され、その種類は増加傾向にある^{3,8)}。既知の医薬品成分とは異なり、そのような類似体の人体に対する作用及び用量に関する情報は極めて少ないため、予想外の健康被害の発生が懸念される。事実、このような類似体を含有する健康食品による健康被害が、類似体との因果関係は不明であるが、国内でも報告されており⁹⁾、海外では死亡事例が報告されている¹⁰⁾。

このような健康食品による健康被害を未然に防止することを目的に、当所ではいわゆる健康食品の医薬品成分の有無を確認する買い上げ調査を 2002 (平成 14) 年度から実施している。検査の第一段階として、事前に複数種類の医薬品成分を検査対象成分として選択し、それらの定性スクリーニング検査を行っている。前述の通り、近年健康食品中に含有される PDE-5 阻害薬の類似体の種類が増え、現在の検査対象成分は 40 化合物にのぼる。そこで本研究では、検査を効率的に実施することを目的として、健康食品中に含有される恐れのある医薬品成分の一斉分析法の開発を行った。

実験方法

1. 標準品

アセチルアシッド、カルボデナフィル、クロロプレタダラフィル、チオアイルデナフィル、ヒドロキシチオホモシルデナフィル、ホモシルデナフィル、ホモタダラフィル、ホモチオデナフィル、メチソシルデナフィルは TLC Pharmaceutical

Standards Ltd. から、アセトヘキサミド、シブトラミン塩酸塩一水和物、ビスコジル、マジンドールはシグマアルドリッチ社から購入した。アミノタダラフィルは Cayman Chemical 社から、イミダゾサグトリアジノン、ゲンデナフィル、タダラフィル、チオデナフィル、バルデナフィル、ヒドロキシホモシルデナフィル、プソイドバルデナフィル、ホンデナフィルは Santa Cruz Biotechnology, Inc. から購入した。ウデナフィル、(R)-キサントアントラフィル、ノルホンデナフィル、フルオキセチン塩酸塩は Toronto Research Chemicals 社から、シルデナフィルクエン酸塩、N-ニトロソフェンフルラミン、イカリイン、グリクラジド、グリベンクラミド、クロルプロパミド、スピロノラクトン、トラザミド、トルブタミド、ヒドロクロロチアジド、フェノールフタレイン、フェンフルラミン塩酸塩、ヨヒンビン塩酸塩は富士フィルム和光純薬工業株式会社から、フロセミドは東京化成工業株式会社から購入した。

2. 試薬

アセトニトリル、ギ酸、メタノールは富士フィルム和光純薬工業株式会社製の LC/MS 用を、水は Merck Millipore 社製の Elix Advantage-10 で調製した精製水を用いた。

3. 装置

HPLC-PDA は島津製作所社製 Nexera-i LC2040C-3D を用いた。

4. 混合標準溶液の調製

医薬品成分の各標準品をメタノールに溶かし標準原液 (0.1 mg/mL) を調製した。混合標準溶液 (系列 1-3) については強壮効果を標榜する健康食品に含有される医薬品成分 (以下、強壮系医薬品成分) 24 化合物のうち 8 化合物を選択し各標準原液 20 μ L をとり、メタノール 840 μ L を加えて混合標準溶液 (2 μ g/mL) を調製した。混合標準溶液 (系列 4-5) については痩身効果を標榜する健康食品に含有される医薬品成分 (以下、痩身系医薬品成分) 16 化合物のうち 8 化合物を選択し各標準原液 50 μ L をとり、メタノール 600 μ L を加えて混合標準溶液 (5 μ g/mL) を調製した。

5. 測定条件

移動相 A; 0.1%ギ酸水溶液、移動相 B; 0.1%ギ

系列1

医薬品成分名	保持時間(分)
ヨヒンビン	10.28
ノルホンデナフィル	14.87
シルデナフィル	19.04
メチソシルデナフィル	20.88
ヒドロキシチオホモシルデナフィル	29.83
ホモチオデナフィル	31.56
チオアイルデナフィル	32.44
ゲンデナフィル	41.15

系列2

医薬品成分名	保持時間(分)
カルボデナフィル	13.56
ホンデナフィル	15.76
ホモシルデナフィル	19.86
ウデナフィル	22.34
チオデナフィル	30.53
アセチルアシッド	32.09
ホモタダラフィル	35.30
クロロプレタダラフィル	47.28

系列3

医薬品成分名	保持時間(分)
バルデナフィル	14.08
ヒドロキシホモシルデナフィル	18.68
イカリイン	21.22
アミノタダラフィル	26.24
イミダゾサガトリアジノン	30.78
タダラフィル	31.20
キサントアントラフィル	32.55
ブソイドバルデナフィル	39.80

系列4

医薬品成分名	保持時間(分)
ヒドロクロロチアジド	7.47
フェンフルラミン	14.45
フルオキセチン	26.41
フェノールフタレイン	28.38
ピサコジル	30.86
トルブタミド	32.56
グリクラジド	39.28
グリベンクラミド	48.11

系列5

医薬品成分名	保持時間(分)
マジンドール	12.63
フロセミド	24.44
シブトラミン	27.28
クロルプロバミド	28.81
アセトヘキサミド	32.47
トラザミド	34.42
スピロノラクトン	43.26
N-ニトロソフェンフルラミン	48.90

表 1 検査対象成分の分析結果

酸アセトニトリル溶液、カラム; COSMOSIL 3C18-EB (ナカライテスク、250 mm×3.0 mmI.D.、5 μm)、カラム温度; 40℃、検出波長; 200-400 nm、流量; 0.8 mL/min、グラジエント条件; A: B = 80: 20 → 40: 60 (50-55 min) → 80: 20 (56-91 min)、注入量; 50 μL

結 果

既報¹¹⁾を参考に測定に COSMOSIL 3C18-EB カラムを用い、水系移動相の混合組成比率が 80%から 40%となるグラジエント条件の測定条件を設定し、個々の医薬品成分の保持時間を測定した。

強壮系医薬品成分 24 化合物と痩身系医薬品成分 16 化合物とに分類し、保持時間が近接しないようにそれぞれの医薬品成分を混合標準溶液の系列に割り振った。

結果、強壮系医薬品成分 24 化合物は 8 化合物ずつ 3 系列 (系列 1-3) に痩身系医薬品成分 16 化合物は 8 化合物 2 系列 (系列 4-5) に割り振られた (表 1)。混合標準溶液 (系列 1-5) を分析したところ、各系列の混合標準溶液中の医薬品成分に由来するピークは良好に分離し、対象とする医薬品成分 40 化合物全てを検出することが可能であった。

考 察

今回対象とし、かつ日本国内で医療用又は一般用医薬品として配合されている成分はシルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ヨヒンビン、アセトヘキサミド、グリクラジド、グリベンクラミド、クロルプロパミド、スピロノラクトン、ビサコジル、ヒドロクロロチアジド、マジンドールである。このうち、1回の服用量が最も少ない化合物は強壮系医薬品成分でヨヒンビンの5 mg¹²⁾、痩身系医薬品成分でマジンドールの0.5 mg¹³⁾である。混合標準溶液の各医薬品成分の濃度は、強壮系医薬品成分が2 µg/mL（系列1-3）、痩身系医薬品成分が5 µg/mL（系列4-5）である。仮に錠剤の形状をした健康食品の検体を分析する際に、10 mLの抽出溶媒を用いて検体1錠から含有する医薬品成分を抽出し、この抽出溶液を5倍希釈して今回設定した測定条件で測定した場合、1錠あたりの検出下限値は強壮系医薬品成分が0.1 mg、痩身系医薬品成分が0.25 mgとなり、健康食品中に含有される医薬品成分を検出するのに十分な値であると考えられる。

近年、既存のPDE-5阻害薬の化学構造の一部を改変した新規の類似体を含有する健康食品の流通が確認されている。新規の類似体の含有が疑われた場合は構造解析により同定する必要がある¹⁴⁾。このような類似体は1回の用量が検討されておらず、健康食品中に含有される量は定かではない。しかし、既存のPDE-5阻害薬の中で一回の服用量が最も少ない化合物はタダラフィル及びバルデナフィルの10 mg（ただし高齢者や肝障害又は腎障害のある患者に対する開始用量は5 mg）であり^{15, 16)}、新規の類似体の用量がこの値を大きく下回することは考え難い。したがって今回の検査対象成分に含まれないPDE-5阻害薬の新規の類似体であっても、十分に検出可能であると推察される。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

- 1) 厚生労働省. 「健康食品」のホームページ. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/hokenkinou/index.html
- 2) 厚生労働省. 無承認無許可医薬品の指導取締りについて. <https://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/dl/torishimari.pdf>
- 3) 武田 章弘, 浅田 安紀子, 田上 貴臣, 土井 崇広, 梶月 由香, 梶村 計志, 沢辺 善之. 「いわゆる健康食品」に含まれる勃起不全治療効果を示す医薬品成分の分析. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2012; 50: 19-23.
- 4) 守安貴子, 岸本清子, 中嶋順一, 重岡捨身, 蓑輪佳子, 上村尚, 安田一郎. 健康被害を起こした中国製ダイエット健康食品における検査結果. 東京都健康安全研究センター研究年報 2003; 54: 70.
- 5) 「健康食品」の安全性・有効性情報. 厚生労働省と大阪府が医薬品成分（グリベンクラミドとシルデナフィル）を含む製品摂取との因果関係が疑われる健康被害を公表. <https://hfnet.nibiohn.go.jp/contents/detail1047.html>
- 6) 土井 崇広, 梶村 計志, 高取 聡. グリベンクラミドとシルデナフィルが検出された健康食品について. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2008(46): 55-60.
- 7) サノフィ株式会社. ダオニール錠添付文書. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/780069_3961003F1087_1_14#WARNINGS
- 8) Kee C-L, Ge X, Gilard V, Malet-Martino M, Low M-Y. A review of synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found as adulterants in dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal* 2018; 147: 250-77.
- 9) 厚生労働省. シルデナフィル類似物質（ヒドロキシホモシルデナフィル）を含有するいわゆる健康食品（無承認無許可

- 医薬品)の発見について .
<https://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/02/h0213-3.html>
- 10) Bakota EL, Kelly AT, Walterscheid JP, Phatak DR. A Case Report of Fatal Desmethyl Carbodenafil Toxicity. *J Anal Toxicol* 2017; **41**(3): 250–5.
 - 11) Tagami T, Aoyama A, Takeda A, Asada A, Doi T, Kajimura K, Sawabe Y. Simultaneous identification of 18 illegal adulterants in dietary supplements by using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Hyg Saf Sci* 2014; **55**(1): 34–40.
 - 12) 大東製薬工業株式会社. ガラナポン添付文書 .
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/otcDetail/400077_J0601003772_05_02
 - 13) 富士フイルム富山化学株式会社. サノレックス錠添付文書 .
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/400022_1190008F1020_4_02#WARNINGS
 - 14) Doi T, Takahashi K, Yamazaki M, Asada A, Takeda A, Kiyota K, Tagami T, Sawabe Y, Yamano T. Characterization of a new illicit phosphodiesterase-type-5 inhibitor identified in the softgel shell of a dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* 2018; **161**: 61-5.
 - 15) バイエル薬品株式会社. レビトラ錠添付文書 .
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/630004_259000BF1029_1_26#WARNINGS
 - 16) 日本新薬株式会社. シアリス錠添付文書.
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/530263_259000CF1023_2_02#HDR_Warnings

WEB サイトの内容は 2020 年 4 月 23 日に確認した

**The development of simultaneous determination method for medicinal ingredients
in dietary supplements with a liquid chromatography-photodiode array detector**

Akihiro TAKEDA, Akiko ASADA, Kyohei KIYOTA, Takahiro DOI, Takaomi TAGAMI

There are dietary supplement products which contain medical ingredients as illegal adulterants, and many cases of health hazard by ingesting the products have been reported. It has been reported that analogues which differed in terms of the parts of the chemical structure from existing type 5 phosphodiesterase inhibitors were detected in dietary supplements with increasing the kind of the analogues.

Preventing health hazard by the dietary supplements, we examine dietary supplements purchased by the local governments in Osaka from 2002. For the first screening test, we examine whether 40 medical ingredients are contained in the dietary supplements. In this study, we developed the simultaneous determination method for detecting these ingredients efficiently.

The method enabled to detect the all ingredients in dietary supplements by using 5 standard solutions containing 8 ingredients out of 40, because the detection limit was lower than the presumed content of the ingredients in dietary supplements.

Key words : dietary supplement, medicinal ingredient, screening

健康食品中に含有される医薬品成分類似化合物

ジメチルジチオノルカルボデナフィルの検出

武田章弘, 浅田安紀子, 清田恭平, 土井崇広, 田上貴臣

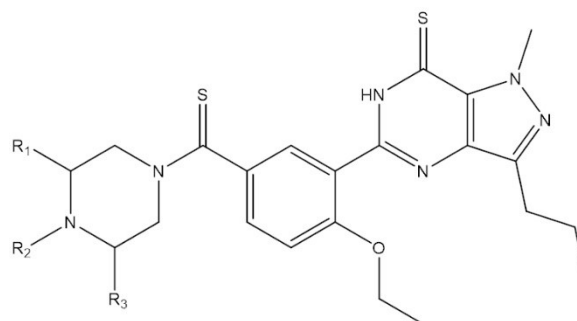
違法に医薬品成分を含有する健康食品が流通し、その製品の服用に起因した健康被害が問題となっている。近年、強壮効果を標榜した健康食品から既存の **phosphodiesterase 5** 阻害薬の化学構造の一部を改変した類似体が検出され、その種類は増加傾向にある。

このような健康食品による健康被害を未然に防止することを目的に、当所では大阪府及び大阪市が買い上げた、いわゆる健康食品中に含有される医薬品成分の有無を確認する調査を実施している。2018 年度に実施した大阪府の健康食品の買い上げ調査において、製品の 1 つからシルデナフィルの類似体が検出された。液体クロマトグラフィーフォトダイオードアレイ検出器、液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析装置による分析の結果から、当該類似体は国内で報告事例のないジメチルジチオノルカルボデナフィルであることが判明した。

キーワード：健康食品、医薬品成分、ジメチルジチオノルカルボデナフィル

健康食品として流通している製品の中には違法に医薬品成分を含有している製品が存在しており、このような健康食品を摂取したことによる健康被害も報告されている¹⁾。さらに近年、強壮効果を標榜した健康食品から既存の **phosphodiesterase 5** (PDE-5) 阻害薬であるシルデナフィル、タダラフィル及びバルデナフィルの化学構造の一部を改変した類似体が検出され、その種類は増加傾向にある^{2,3)}。そのような類似体の人体に対する作用及び用量に関する情報は極めて少ないため、予想外の健康被害の発生が懸念される。事実、類似体との因果関係は不明であるが、このような類似体を含有する健康食品による健康被害は国内でも報告されており⁴⁾、海外では死亡事例が報告されている⁵⁾。

このような健康食品による健康被害を未然に防止することを目的に、大阪府では、いわゆる健康食品の医薬品成分の有無を確認する買い上げ調査を 2002 年度から実施しており、当所では大阪府からの依頼を受け、健康食品中の医薬品成分



化合物名	R ₁	R ₂	R ₃
ジメチルジチオデナフィル	-CH ₃	-H	-CH ₃
ジメチルジチオノルカルボデナフィル	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
ジチオプロピルカルボデナフィル	-H	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-H

図 1 シルデナフィル類似体の化学構造

について分析を行っている。今回、2018 年度に実施した大阪府の健康食品の買い上げ調査において、国内では報告事例のない新規のシルデナフィル類似体であるジメチルジチオノルカルボデナフィルが検出されたので報告する。

実験方法

1. 標準品

Sildenafil Impurity 12 及び Sildenafil Impurity 18 は TLC Pharmaceutical Standards Ltd. から入手し、それぞれジメチルジチオノルカルボデナフィル及びジチオプロピルカルボデナフィルの標準品とした。各化合物の化学構造を図 1 に示す。

2. 試薬

アセトニトリル、ギ酸、メタノールは富士フィルム和光純薬工業株式会社製の LC/MS 用を、酢酸エチル、ジエチルエーテルは富士フィルム和光純薬工業株式会社製のそれぞれ試薬特級、残留農薬・PCB 試験用を用いた。水は Merck Millipore 社製の Elix Advantage-10 で調製した精製水を用いた。

3. 試料

2018 年度に大阪府で実施した健康食品の買い上げ調査において、インターネットで試買した製品で、食品表示には、原材料名に「インスタントコーヒー等」、内容量に「65 g」とそれぞれ記載されていた。製品 1 箱あたり 5 包のアルミパックが入っており、1 包当たり約 13 g のインスタントコーヒー様の粉末が詰められていた。

4. 装置

液体クロマトグラフーフォトダイオードアレイ検出器 (LC-PDA) は Waters 社製 Alliance e2695 を用いた。液体クロマトグラフー飛行時間型質量分析装置 (LC-QTOF MS) は LC に Agilent Technologies 社製 1290VL を QTOF MS に Agilent Technologies 社製 6530B Accurate-Mass Q-TOF MS を用いた。

5. 標準溶液の調製

医薬品成分の各標準品をメタノールに溶かし標準原液 (0.1 mg/mL) を調製した。この標準原液を LC-PDA の移動相初期組成である 0.1%ギ酸水溶液 / 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (80: 20) (以下、LC-PDA 用移動相初期組成溶液) で 10 倍に希釈し、LC-PDA による分析のための標準溶液を調製した (10 µg/mL)。さらに、0.1%ギ酸水溶液で 100 倍に希釈し、LC-QTOF MS による分析

のための標準溶液を調製した (0.1 µg/mL)。

6. 試料溶液の調製

試料約 0.5 g をとり、メタノール 2 mL を加え攪拌した後、1,700 × g で 5 分間遠心分離し、上清を孔径 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過した。ろ液を窒素気流下で溶媒を留去し、残渣を LC-PDA 用移動相初期組成溶液 2 mL に溶かし、孔径 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過した液を試料原液とした。ジメチルジチオノルカルボデナフィルの濃度が 10 µg/mL となるように、この試料原液を LC-PDA 用移動相初期組成溶液で希釈し、LC-PDA による分析のための試料溶液を調製した。さらに、0.1%ギ酸水溶液で希釈し、濃度が 0.1 µg/mL となるように、LC-QTOF MS による分析のための試料溶液とした。

7. 試料中医薬品成分の抽出

試料約 1.3 g をコニカルビーカーにとり、ジエチルエーテルを加えて抽出した。ジエチルエーテルで洗い込みながらろ紙を用いてろ過し、ろ液を抽出溶液 (ジエチルエーテル画分) とした。さらに、ろ紙上の残渣を酢酸エチルで洗い込みながらコニカルビーカーに戻して抽出した。酢酸エチルで洗い込みながらろ紙を用いてろ過したろ液を抽出溶液 (酢酸エチル画分) とした。さらに、ろ紙上の残渣をメタノールで洗い込みながらコニカルビーカーに戻して抽出した。メタノールで洗い込みながらろ紙を用いてろ過したろ液を抽出溶液 (メタノール画分) とした。

各画分はエバポレーションで溶媒を留去し、残渣をメタノール 2 mL に溶かした。この溶液を 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過した後、LC-PDA による分析のために、LC-PDA 用移動相初期組成溶液で 2.5 倍に希釈した。さらにこの液を LC-QTOF MS による分析のために、0.1%ギ酸水溶液を用いて、ジエチルエーテル画分及び酢酸エチル画分は 10 倍希釈、メタノール画分は 100 倍希釈した。

8. 測定条件

(1) LC-PDA

移動相 A; 0.1%ギ酸水溶液、移動相 B; 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液、カラム; COSMOSIL 3C18-EB (ナカライテスク、250 mm × 3.0 mm I.D.)、

5 μ m)、カラム温度; 40℃、検出波長; 190-400 nm、流量; 0.8 mL/min、グラジエント条件; A: B = 80: 20 $\rightarrow$ 40: 60 (50-55 min) $\rightarrow$ 80: 20 (56-91 min)、注入量; 50 μ L

(2) LC-QTOF MS

移動相 A; 0.1%ギ酸水溶液、移動相 B; 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液、カラム; AQUITY UPLC HSS T3 (Waters、100 mm $\times$ 2.1 mm I.D.、1.8 μ m)、カラム温度; 40℃、流量; 0.3 mL/min、グラジエント条件; A: B = 65: 35 (0-4min) $\rightarrow$ 25: 75 (16 min) $\rightarrow$ 10: 90 (17-22 min) $\rightarrow$ 65: 35 (22.1-32 min)、注入量; 1 μ L

イオン化モード; ESI(+), ネブライザー; 50 psi、キャピラリー電圧; 3.0 kV、フラグメンター電圧; 150 V; 乾燥ガス流量; 10 L/min、乾燥ガス温度; 350℃、質量スペクトル範囲; m/z 100-1000、質量校正試薬; prine (m/z 121.0509 [M+H]⁺)、hexakis (1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine (m/z 922.0098 [M+H]⁺)

結 果 お よ び 考 察

試料を LC-PDA を用いてスクリーニング分析したところ保持時間約 33 分にピークを検出した。このピークの吸収スペクトルは極大波長 249、283、356 nm を持ち、過去の文献を調査したところジメチルジチオデナフィルの吸収スペクトルと類似していた⁶⁾。

試料中の医薬品成分をジエチルエーテル、酢酸エチル、メタノールで抽出して得られた抽出溶液 (ジエチルエーテル画分、酢酸エチル画分、メタノール画分) を LC-QTOF MS で分析したところ、酢酸エチル画分及びメタノール画分から保持時間約 8 分に [M+H]⁺ のピーク (m/z 499.23) を検出した。精密質量を基に組成式 C₂₅H₃₄N₆OS₂ が推定された。ジメチルジチオデナフィルの分子式は C₂₄H₃₂N₆OS₂ であることから、当該未知化合物はジメチルジチオデナフィルよりもメチレン基 (-CH₂-) 1 つ分大きいことが推察された。

ジメチルジチオデナフィルの化学構造に類似し、分子式がメチレン基 1 つ分大きい C₂₅H₃₄N₆OS₂ であるシルデナフィル類似体としてジメチルジチオノルカルボデナフィル⁷⁾及びジチオプロピルカルボデナフィル⁸⁾を想定し、それらの標準品を LC-PDA 及び LC-QTOF MS を用い

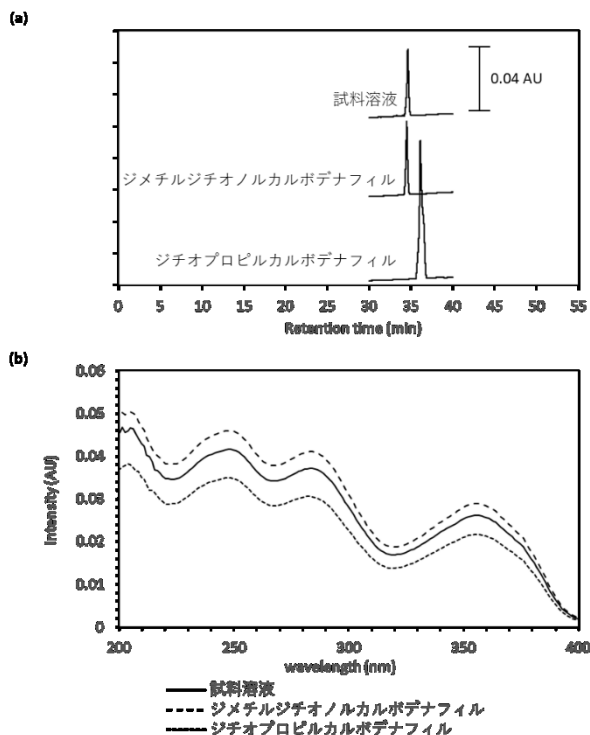


図 2 (a)標準溶液 (ジメチルジチオノルカルボデナフィル、ジチオプロピルカルボデナフィル) と試料溶液のクロマトグラム (測定波長 248.6 nm); (b)各ピークにおける吸収スペクトル; 標準溶液の濃度はそれぞれ 10 μ g/mL とし、試料溶液はジメチルジチオノルカルボデナフィルの濃度が 10 μ g/mL となるように希釈した。

て分析した。結果、試料中の医薬品成分はジメチルジチオノルカルボデナフィルと、LC-PDA による分析において保持時間 (図 2a) 及び吸収スペクトル (図 2b) が一致し、LC-QTOF MS による分析において保持時間 (図 3a) 及び質量スペクトル (図 3b) が一致した。したがって、当該試料中に含有される医薬品成分類似体はジメチルジチオノルカルボデナフィルと同定された。さらに LC-PDA を用いて含有量を推定したところ、試料 1 包 (約 13 g) 中にジメチルジチオノルカルボデナフィルは約 6 mg 含まれていた。

ま と め

厚生労働省は健康食品中に含有される恐れのある医薬品成分を「食薬区分における成分本質 (原材料) の取り扱いの例示」(令和 2 年 3 月 31 日 薬生監麻発 0331 第 9 号) の別添 1「専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料) リスト」

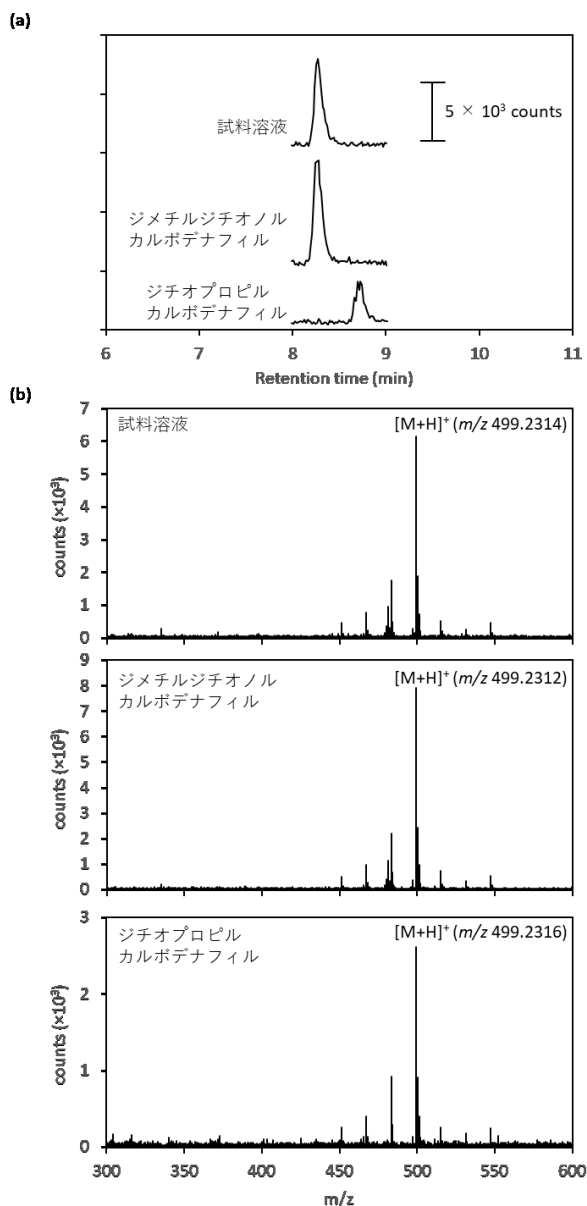


図3 (a)標準溶液（ジメチルジチオノルカルボデナフィル、ジチオプロピルカルボデナフィル）と試料溶液のマスクロマトグラム (m/z 499.23) ; (b)各ピークにおけるマススペクトル (m/z 300–600) ; 標準溶液の濃度はそれぞれ 0.1 $\mu\text{g/mL}$ とし、試料溶液はジメチルジチオノルカルボデナフィルの濃度が 0.1 $\mu\text{g/mL}$ となるように希釈した。

（以下、成分本質リスト）に例示として掲げている。成分本質リストに収載されている医薬品成分を含め、違法に医薬品成分を含有する製品は取り締まりの対象となる。

ジメチルジチオノルカルボデナフィルの健康食品中からの検出事例は、国外での報告はあった

が⁹⁾、国内では本報告が初めてとなった¹⁰⁻¹²⁾。すなわち検出当時、成分本質リストに収載されておらず医薬品成分と判断できないことから、当該化合物を含有する健康食品を取り締まることはできなかった。そこで、厚生労働省に当該化合物が医薬品成分に該当するか照会をかけたところ、2019年12月9日に当該化合物は医薬品成分に該当すると判断され¹³⁾、2020年7月9日に成分本質リストに追加された¹⁴⁾。このことによりジメチルジチオノルカルボデナフィルを含有する当該健康食品は取り締まりの対象となった。

近年、健康食品中から検出される PDE-5 阻害薬の構造類似体の数は 2017 年までに 80 種類に上っている³⁾。今後も新たな構造類似体が出現する恐れがあることから、未知化合物の化学構造を確定する技術並びに情報収集の能力を向上させることが重要である。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文献

- 1) 守安貴子, 岸本清子, 中嶋順一, 重岡捨身, 蓑輪佳子, 上村尚, 安田一郎. 健康被害を起こした中国製ダイエット健康食品における検査結果. *東京都健康安全研究センター研究年報* 2003; **54**: 69-73.
- 2) 武田 章弘, 浅田 安紀子, 田上 貴臣, 土井 崇広, 梶月 由香, 梶村 計志, 沢辺 善之. 「いわゆる健康食品」に含まれる勃起不全治療効果を示す医薬品成分の分析. *大阪府立公衆衛生研究所研究報告* 2012; **50**: 19-23.
- 3) Kee C-L, Ge X, Gilard V, Malet-Martino M, Low M-Y. A review of synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found as adulterants in dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal* 2018; **147**: 250-77.
- 4) 厚生労働省. シルデナフィル類似物質（ヒドロキシホモシルデナフィル）を含有するいわゆる健康食品（無承認無許可医薬品）の発見について. <https://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/02/h0>

- 213-3.html
- 5) Bakota EL, Kelly AT, Walterscheid JP, Phatak DR. A Case Report of Fatal Desmethyl Carbodenafil Toxicity. *J Anal Toxicol* 2016; **41**(3): 250-5.
 - 6) Sakamoto M, Suzuki J, Saito Y, Shimizu S, Kobayashi K, Nagashima M, Moriyasu T, Fukaya H, Saito K. Structural characterization of dimethyldithiodenafil and dimethylthiocarbodenafil, analogs of sildenafil. *J Pharm Biomed Anal* 2018; **148**: 136-41.
 - 7) Kee CL, Low MY, Ge X. Isolation and characterization of a novel dithiocarbodenafil analogue from a health supplement. *J Pharm Biomed Anal* 2017; **137**: 132-8.
 - 8) Yun J, Shin KJ, Choi J, Kwon K, Jo CH. Identification and structural elucidation of a new sildenafil analogue, dithiopropylcarbodenafil, from a premixed powder intended as a dietary supplement. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2018; **1072**: 273-81.
 - 9) Kee C-L, Low M-Y, Ge X. Isolation and characterization of a novel dithiocarbodenafil analogue from a health supplement. *J Pharm Biomed Anal* 2017; **137**: 132-8.
 - 10) 大阪府. 平成30年度健康食品買い上げ検査（医薬品成分が検出された健康食品）について（製品名：恋するコーヒー）. <http://www.pref.osaka.lg.jp/yakumu/kenkou-shokuhin/kenh30kaiage3.html>
 - 11) 厚生労働省. 医薬品成分を含有する製品の発見について. https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_07233.html
 - 12) 「健康食品」の安全性・有効性情報. 厚生労働省と大阪府が医薬品成分（ジメチルジチオノルカルボデナフィル）を含有する健康食品に注意喚起. <https://hfnet.nibiohn.go.jp/contents/detail4078.html>
 - 13) 厚生労働省. 2019年12月9日 令和元年度第3回医薬品の成分本質に関するワーキンググループ議事概要. https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_10750.html
 - 14) 厚生労働省医薬・生活衛生局監視指導・麻薬対策課長. 食薬区分における成分本質（原材料）の取扱いの例示の一部改正について. 令和2年7月9日. 薬生監麻発0709第33号.
- WEB サイトの内容は 2020 年 7 月 31 日に確認した

The detection of dimetyldithionorcarbodenafil as medical ingredient analogue in a dietary supplement

Akihiro TAKEDA, Akiko ASADA, Kyohei KIYOTA, Takahiro DOI and Takaomi TAGAMI

The dietary supplements containing medical ingredients illegally have been sold, and caused health hazard. In recent years, the analogues which differed in terms of the parts of the chemical structure from existing type 5 phosphodiesterase inhibitors were detected in dietary supplements with increasing the kind of the analogues. Preventing health hazard by the dietary supplements, we examine dietary supplements purchased by local governments in Osaka. In 2018, we detected a sildenafil analogue in the dietary supplement. The analogue was identified as dimethyldithionorcarbodenafil, which has not been reported in Japan, by using liquid chromatograph-photodiode array detector and liquid chromatograph-time of flight mass spectrometry.

Key words : dietary supplement, medicinal ingredient, dimethyldithionorcarbodenafil

水質検査における外部精度管理（2018 年度）

—テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレン—

小泉義彦

水道水質検査精度の向上を図ることを目的に、大阪府内水道事業体、保健所、地方衛生研究所（以下、水道事業体等）21 機関を対象に、テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレ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、テトラクロロエチレンでは「外れ値」に該当する機関はなかったが、トリクロロエチレンで 1 機関が「外れ値」となった。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、内部標準物質である 4-ブロモフルオロベンゼンの強度低下が定量値に影響を及ぼしたことが示唆された。

キーワード：水道水、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、定量精度、外部精度管理

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 年度より水道事業体等を対象に実施している^{1,2)}。2018 年度の対象項目は、有機項目として「テトラクロロエチレン」および「トリクロロエチレン」を選定した。

テトラクロロエチレンは、ドライクリーニング溶剤、金属部品の脱脂剤、フロンガス製造、溶剤（医薬品、香料、メッキ、ゴム、塗料）、セルロースエステルおよびエーテルの混合物溶剤等に用いられる化学物質である³⁾。ヒトに対する急性毒性は主として中枢神経系抑制作用であり、不快感、酩酊感、めまい、高濃度では意識を失う。また、作業中に曝露を受けた人に、肝臓、腎臓への影響が見られることが報告されている⁴⁾。発がん性は交雑系マウス（B6C3-F1）で肝がんを形成することが示されているが、ラットでは認められない。ヒトに対する発がん性は、国際がん研究機関（IARC）によって Group2A（ヒトに対しておそらく発がん性がある）に分類されている⁵⁾。1992 年の生活環境審議会ではマウスの発がん性に基づいてマルチステージモデルを用いた発がんリスクから算出した評価値 0.01 mg/L を答申し、同年基準値として

適用された³⁾。テトラクロロエチレンの基準値は、その後も 0.01 mg/L に維持されている。

トリクロロエチレンは、金属機械部品などの脱油脂洗浄、フロンガス製造、溶剤、殺虫剤、羊毛の脱脂洗浄、皮革・膠着剤の洗剤、繊維工業、抽出剤（香料）等の用途に用いられる化学物質である⁶⁾。ヒトに対する急性毒性は中枢神経抑制作用である。経口曝露では嘔吐、腹痛、一時的な意識不明を生じる⁷⁾。発がん性については、IARC によって Group1（ヒトに対して発がん性がある）に分類されている⁸⁾。1992 年の生活環境審議会ではマウスの肝発がん性に基づいてマルチステージモデルを用いた発がんリスクから算出した評価値 0.03 mg/L を答申し、同年基準値として適用されたが⁶⁾、食品安全委員会の評価結果をもとに、2011 年 4 月より、0.01 mg/L に強化された⁹⁾。

方 法

1. 参加機関

本調査に参加した水道事業体等は、21 機関であった。その内訳は水道事業者 19 機関、保健所 1 機関および地方衛生研究所 1 機関であった。

2. 実施方法

(1) 精度管理試料の調製方法

2018年9月25日(月)に精製水約60Lをステンレスタンクに採水した。精製水中のテトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレン濃度は0.0001 mg/L未満であった。9月25日(月)にテトラクロロエチレン標準液(関東化学:1 mg/mL)を600 µLおよびトリクロロエチレン標準液(関東化学:1 mg/mL)を500 µL添加し、さらに、塩酸(富士フイルム和光純薬、有害金属測定用)を30 mL添加して攪拌した。500 mLガラス瓶に満水になるよう分注して冷蔵保管した後、9月27日(水)に当所において各検査実施機関に配付した(設定濃度 テトラクロロエチレン:0.0100 mg/L、トリクロロエチレン:0.00833 mg/L)。

(2) 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」¹⁰⁾(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、その平均値を検査値として「外部精度管理結果報告書」で報告することとした。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測定データやチャートも提出することとした。

(3) 評価の検証方法

はじめに、各検査機関内で測定された精度管理試料の5つの測定値の変動係数が20%を超過した機関は評価対象外とした。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¹¹⁾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%以内を許容範囲とした¹²⁾。

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¹³⁾、Zスコアの絶対値3未満を許容範囲とした。なお、誤差率および変動係数の許容範囲を20%以内とした根拠は、水質基準項目の基準値の1/10におけるテトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレンの測定精度の目標が、変動係数で20%以内であるためである¹⁰⁾。

(4) フォローアップ調査の実施

「外れ値」に該当する機関に対しては、分析条件、測定データおよびチャートの精査、分析担当者からの聞き取りを経て改善策を提案した。その後、新たに調製した精度管理試料を配付し、検査結果の確認を行った。

結 果 お よ び 考 察

1. 精度管理試料の均一性および安定性

外部精度管理用配付資料の均一性を確認するために、2018年9月25日に精度管理試料を分注順に等間隔で5本抜き取り、試料1本につき、2回測定した。そして、得られた測定結果を基に一元配置分散分析を行った。その結果、試料間の変動は有意とならなかった(テトラクロロエチレン: $p=0.096$ 、トリクロロエチレン: $p=0.31$)ため、均一性に問題がないことを確認した。また、試料の配付日、配付後1、4、7、12および14日目に試料を測定した結果を図1に示す。平均値の変動係数は、テトラクロロエチレンが0.9%、トリクロロエチレンが1.1%であり、バラツキは小さかった。また、テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレンの近似曲線の傾きは、いずれもほぼ0で、外部精度管理配付試料の安定性に問題はないと判断した。

2. 分析方法

参加機関が用いた試験方法を表1に示す。本研究においては、HS法で検査を実施する機関が11機関で、PT法が10機関とほぼ同数であった。

3. 検査結果の検証

(1) テトラクロロエチレン

① 誤差率、Zスコア及び「外れ値」

水道事業者等21機関から報告された検査値、変動係数、誤差率及びZスコアを表2に、検査値のヒストグラムを図2に示す。機関内変動係数

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、棄却された機関はなかった。このためすべての検査値を平均した 0.00821 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を超えたのは 1 機関 (A-21)であり、誤差率は 22.3%であった。次に、21 検査値を用いて Z スコアを求めた結果、その範囲は -1.69~2.79 となり、許容範囲を超えた機関はなかった。したがって、誤差率と Z スコアの両方が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」に該当する機関はなかった。

(2)トリクロロエチレン

①誤差率、Z スコア及び「外れ値」

水道事業者等 21 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 3 に示す。そして、検査値のヒストグラムを図 3 に示す。機

関内変動係数が 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 (A-21) が棄却され、残りの 20 検査値を平均した 0.00693 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を超えたのは 1 機関 (A-21)であり、誤差率は 21.0%であった。次に、21 検査値を用いて Z スコアを求めた結果、その範囲は -2.88~5.06 となり、許容範囲を超えたのは 1 機関 (A-21)であり、Z スコアは 5.06 であった。

誤差率と Z スコアの両方が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-21) であった。外れ値の存在率は 4.8% (1/21) であったため、各機関は概ね精度よく水質検査が実施できていると考えられた。

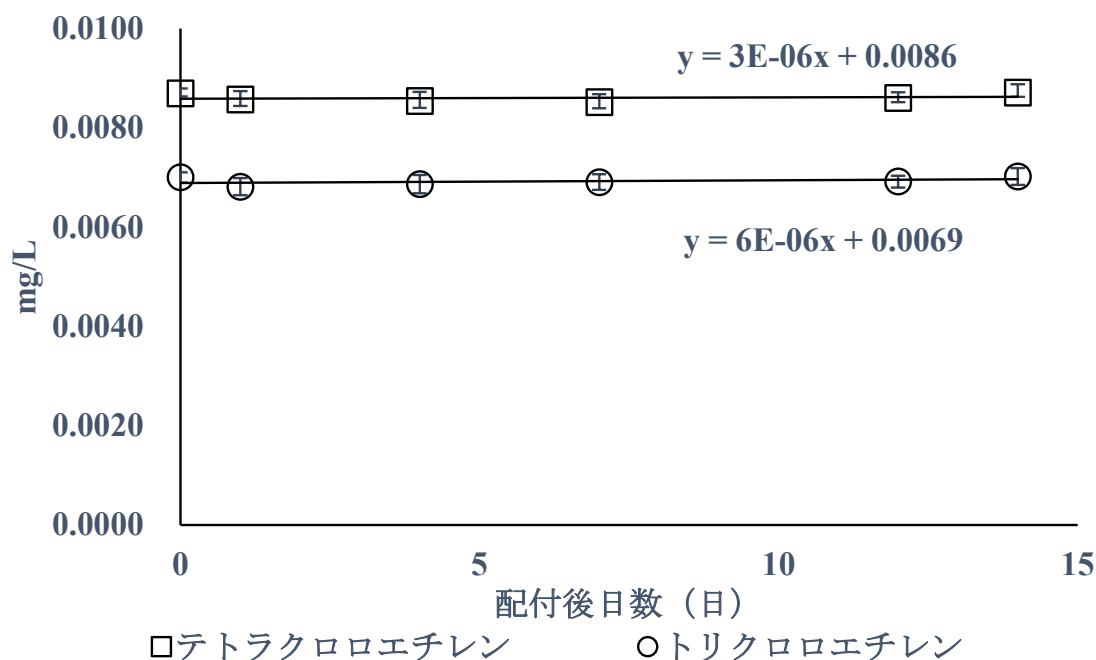


図 1 精度管理試料の安定性 (n=5、平均±標準偏差)

表 1 参加機関の試験方法およびデータ数

試験方法	機関数
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 (PT法)	10
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 (HS法)	11
計	21

表 2 外部精度管理試験における検査値の概要（テトラクロロエチレン）

機関番号	検査方法	検査値 (平均値) (mg/L)	変動係数* (%)	真値に対する 誤差率* (%)	Zスコア*
A-1	HS	0.00707	8.70	-13.9	-1.69
A-2	HS	0.00711	5.57	-13.5	-1.64
A-3	HS	0.00716	3.15	-12.8	-1.55
A-4	HS	0.00731	1.12	-11.1	-1.34
A-5	PT	0.00766	1.54	-6.75	-0.80
A-6	HS	0.00780	2.20	-5.02	-0.59
A-7	HS	0.00780	3.68	-5.02	-0.59
A-8	HS	0.00793	2.76	-3.46	-0.40
A-9	PT	0.00794	0.66	-3.29	-0.37
A-10	HS	0.00806	1.86	-1.85	-0.20
A-11	PT	0.00819	1.43	-0.27	0.00
A-12	HS	0.00838	1.63	2.02	0.28
A-13	PT	0.00853	2.18	3.79	0.50
A-14	PT	0.00855	1.50	4.09	0.54
A-15	PT	0.00859	2.74	4.60	0.60
A-16	PT	0.00870	2.66	5.86	0.76
A-17	PT	0.00877	1.79	6.79	0.88
A-18	HS	0.00886	0.68	7.81	1.00
A-19	PT	0.00902	8.85	9.78	1.25
A-20	HS	0.00903	3.49	9.91	1.26
A-21	PT	0.0100	2.04	22.3	2.79
平均値		0.00821			
最大値		0.0100			
最小値		0.00707			
標準偏差		0.00075			
変動係数(%)		9.14			
n		21			

真値 : 0.00821 mg/L

*検査値 (n=5の平均値) を丸めずに算出

表3 外部精度管理試験における検査値の概要（トリクロロエチレン）

機関番号	検査方法	検査値 (平均値) (mg/L)	変動係数* (%)	真値に対する 誤差率* (%)	Zスコア*
A-1	HS	0.00637	7.32	-8.03	-2.08
A-2	HS	0.00624	3.19	-9.93	-2.55
A-3	HS	0.00615	1.88	-11.3	-2.88
A-4	HS	0.00678	1.73	-2.20	-0.65
A-5	PT	0.00670	1.29	-3.32	-0.92
A-6	HS	0.00690	1.40	-0.43	-0.21
A-7	HS	0.00704	3.22	1.56	0.28
A-8	HS	0.00688	2.62	-0.67	-0.27
A-9	PT	0.00696	0.47	0.43	0.00
A-10	HS	0.00670	0.67	-3.26	-0.91
A-11	PT	0.00693	1.69	0.00	-0.11
A-12	HS	0.00716	0.43	3.29	0.70
A-13	PT	0.00719	1.42	3.78	0.82
A-14	PT	0.00691	1.45	-0.23	-0.16
A-15	PT	0.00705	2.59	1.79	0.33
A-16	PT	0.00717	2.08	3.46	0.75
A-17	PT	0.00715	2.42	3.23	0.69
A-18	HS	0.00711	0.87	2.63	0.54
A-19	PT	0.00753	7.86	8.72	2.04
A-20	HS	0.00765	3.53	10.5	2.47
A-21 **	PT	0.00838	2.00	21.0	5.06
平均値		0.00700			
最大値		0.00838			
最小値		0.00615			
標準偏差		0.00049			
変動係数(%)		6.94			
n		21			

真値 : 0.00693 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±20%を超え、Zスコアの絶対値が3以上の機関

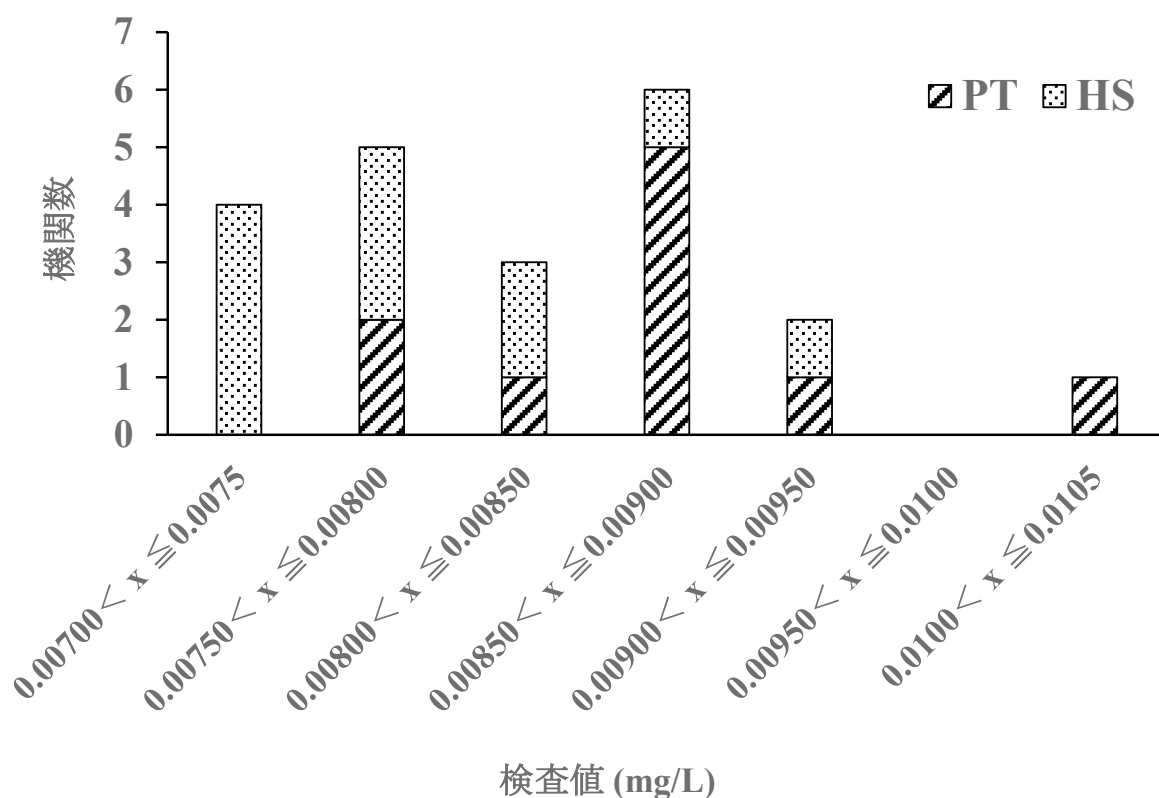


図2 検査方法別の検査値のヒストグラム (テトラクロロエチレン)

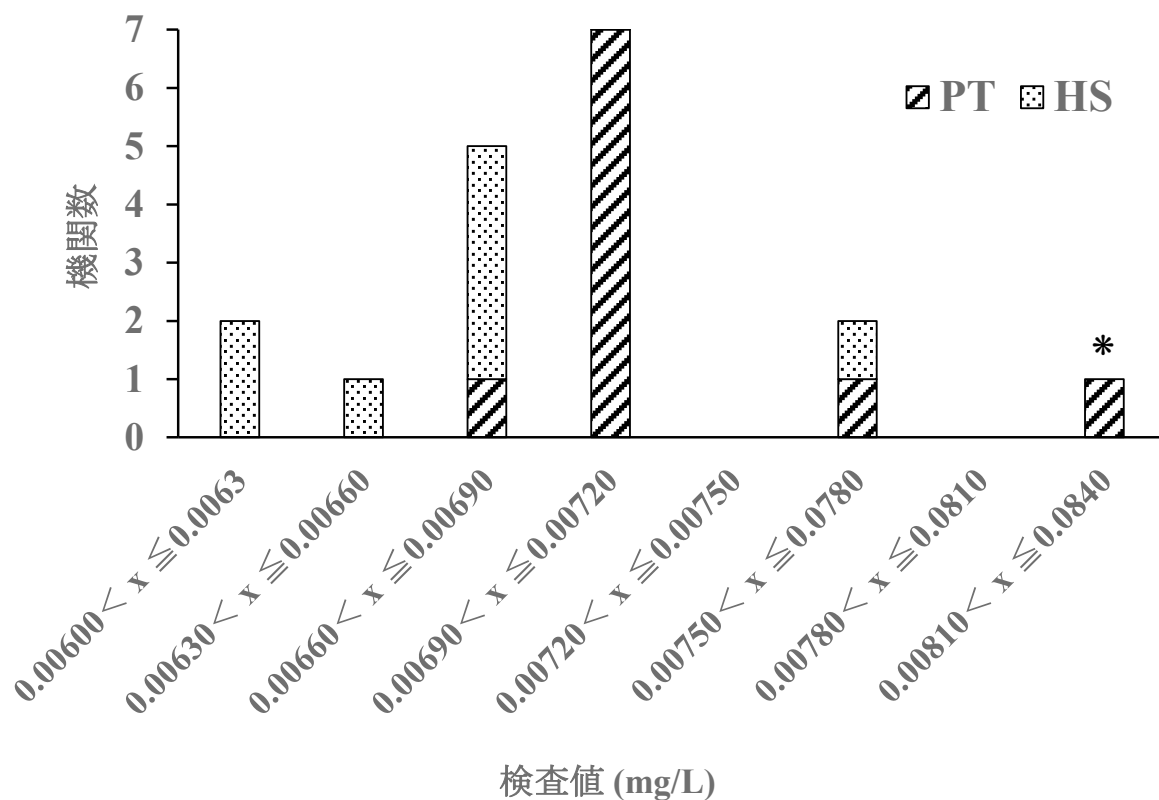


図3 検査方法別の検査値のヒストグラム (トリクロロエチレン) (*: 外れ値)

(2)フォローアップ調査

トリクロロエチレンにおいて「外れ値」に該当した機関 A-21 に対して、原因追求のためにフォローアップ調査を行った。機関 A-21 は PT 法を用いており、検査値は 0.00838 mg/L、Z スコアは 5.06、誤差率は 21.0 %であった。提出された資料から、精度管理試料に比べて、検量線作成用の標準液における内部標準物質の 4-ブロモフルオロベンゼンのピーク面積値が高い傾向を認めた。また、この傾向は濃度が高い検量点ほど顕著であった（図 4）。ページ・トラップ濃縮導入装置あるいはガスクロマトグラフ装置内のガスの流路には、活性点と呼ばれる箇所が存在し、測定対象物質が活性点に吸着し、ピーク強度を減少させることがある¹⁴⁻¹⁵⁾。4-ブロモフルオロベンゼンはフルオロベンゼンに比べて活性点の影響を受けやすく、また、標準物質として一緒に添加する他の成分によって、濃度が高い検量点ほど 4-ブロモフルオロベンゼンの吸着が抑えられたものと考えられた。そこで、内部標準法を用いずに、当所において絶対検量線法による再解析を行ったところ、トリクロロエチレンは 0.00752 mg/L となり、誤差率は 8.0%、Z スコアは 1.98 となり、外れ値に該当する数値ではなくな

った。

上記の理由より、機関 A-21 に 3 つの対策案をとることを提案した。1 つ目は、内部標準物質の添加濃度を高くし、2 つ目は、注入口温度を上げて注入口部分の汚れを減らすこととした。また、ピーク面積の減少は、もう 1 つの内部標準物質であるフルオロベンゼンにおいても認められたが、4-ブロモフルオロベンゼンのピーク面積の減少率が 17% であるのに対し、フルオロベンゼンでは 4.7% と小さかったため、3 つ目の対策として、定量計算に用いる内部標準物質にはフルオロベンゼンを用いることにした。

2019 年 3 月 26 日に新たに調製した精度管理試料を機関 A-21 に配付し、機関 A-21 は再測定を実施した。その結果を表 4 に示す。テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレンとも、5 つの測定値の変動係数は 20%以内であった。当所の測定値を真値として、誤差率で評価したところ、テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレンの誤差率は、それぞれ、-2.3% および 1.5%であった。誤差率の許容範囲を±20%以内としたところ、テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレンとも許容範囲内に収まり、良好な結果となった。

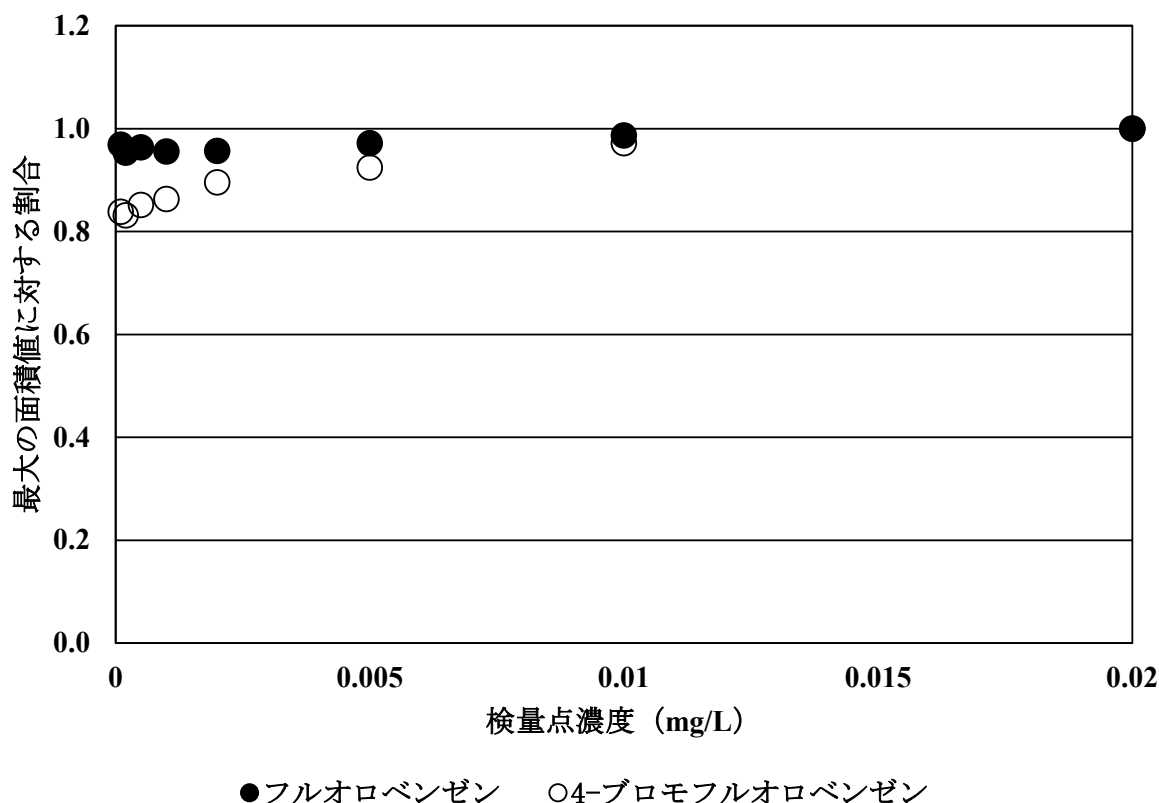


図 4 検量点における内部標準物質の面積比

表 4. 新たに調製した精度管理試料の検査結果（機関 A-21）

項目	テトラクロロエチレン	トリクロロエチレン
測定値 1	0.00676	0.00756
測定値 2	0.00669	0.00754
測定値 3	0.00681	0.00761
測定値 4	0.00677	0.00768
測定値 5	0.00669	0.00771
平均値（mg/L）	0.00674	0.00762
変動係数（%）	0.782	0.969
設定値（mg/L）	0.00700	0.00800
真値（mg/L）※	0.00690	0.00751
誤差率（%）	-2.3	1.5

※同日測定した当所の平均値（n=5）を真値とした

(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。

全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。1 機関で検量線の点に 0 mg/L を用いていた。告示法および妥当性ガイドライン¹⁶⁾においては原則、検量線の点に 0 mg/L を用いないこととなっているため、検量線の点に 0 mg/L を用いないようにする必要がある。

② 前処理及び標準液

配付から検査を実施するまでの期間は、3 機関で告示法が示す期間（24 時間以内）を超過し、最も遅かったのは 6 日後であった。今回の試料の安定性は 14 日目まで安定であることを確認しているが、告示法に従って、24 時間以内に検査を行う必要がある。

標準原液については、すべての機関で市販の標準液を使用していた。このうち 20 機関が認証品を用いていた。また、使用している標準原液の濃度が、告示法に記載された 50000 mg/L であった機関はなかった。現在、この濃度で濃度証明された標準液は市販されていないが、値付け証明書が添付され、かつ、告示法に記載された標準原液の濃度を超えない標準液については、「調製可能標準液」として使用することができる。したがって、市販

標準原液を用いる場合は、調製可能標準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、告示法では使用の都度調製することになっている。1 機関が 16 日前に調製していた。検査実施標準作業書（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。この機関においては、告示法に合わせ使用の都度調製するように SOP を修正し、それ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、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¹⁶⁾。妥当性試験とは、水道水質検査を行う検査機関が自らの SOP に示す検査方法の妥当性を評価するための手段で、ガイドラインには、検量線の評価と添加試料の評価が示されている。検量線の評価では、最高濃度の標準試料の測定したブランク試料中の濃度が検量線の下限値を下回ることを確認するキャリーオーバーの評価、標準試料を繰り返し測定し、定量した濃度の平均値がいずれの濃度点においても定められた目標内に収まることを確認する真度の評価および標準試料を繰り返し測定した際の併行精度が目標内に収まることを確認する併行精度の評価を実施する。

添加試料の評価では、定量を妨害するピークがないことを確認する選択性の評価、添加試料を複数回測定し、得られた回収率の平均値が目標以内であることを確認する真度の評価および回収率の併行精度が目標内に収まることを確認する併行精度の評価を実施する。今回の外部精度管理では、95.2% (20/21) の機関が、キャリーオーバーの評価、検量線の真度および精度の評価、ならびに添加試料の選択性、真度および精度の評価を実施していた。

ま と め

大阪府の水道水質検査外部精度管理として、テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレンの検査結果を誤差率 $\pm 20\%$ と Z スコアの絶対 3 未満を許容範囲とする 2 つの方法で評価を行った。テトラクロロエチレンでは、報告された 21 機関のうち、5 つの測定値の変動係数が 20% を超えた機関は存在しなかった。誤差率で許容範囲 $\pm 20\%$ を超えた機関は存在しなかった。Z スコアの絶対値が 3 以上となり、許容範囲を超えた機関は存在しなかった。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、「外れ値」に該当する機関はなかった。

トリクロロエチレンでは、報告された 21 機関のうち、5 つの測定値の変動係数が 20% を超えた機関は存在しなかった。21 機関のうち誤差率で許容範囲を超えたのは 1 機関であった。Z スコアで許容範囲を超えた機関は 1 機関であった。両方法で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。

外れ値の存在率は、テトラクロロエチレンで 0% 、トリクロロエチレン $4.8\% (1/21)$ であり、各機関は概ね精度良く水質検査を実施していた。検証の結果、検査精度を向上するには、以下の留意点が考えられた。

- (1) 内部標準物質である 4-ブロモフルオロベンゼンの強度低下に注意する。機器の点検をしていても強度低下が生じ、改善が難しいときは、内部標準物質をフルオロベンゼンに変更するとともに、添加濃度の見直しを行う。
- (2) 告示法に基づいた SOP を作成する。
- (3) 妥当性試験を実施し、検査精度を確認する。

謝 辞

本研究は「平成 30 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) 小泉義彦. 水質検査における外部精度管理 (2017 年度) - ベンゼン - . 大阪健康安全基盤研究所研究年報, 2019; 3: 75-82
- 2) 吉田 仁, 中島孝江. 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 - . 大阪健康安全基盤研究所研究年報, 2019; 3: 83-88
- 3) 水質基準の見直しにおける検討概要 整理番号 12028 テトラクロロエチレン(PDF) 厚生労働省ホームページ <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k18.pdf>
- 4) 改訂 4 版 水道水質基準ガイドブック、pp70-71、丸善(2009)
- 5) IARA MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, VOLUME 106, Trichloroethylene, Tetrachloroethylene, and Some Other Chlorinated Agents, 219-329 <https://publications.iarc.fr/130>
- 6) 水質基準の見直しにおける検討概要 整理番号 12031 トリクロロエチレン(PDF) 厚生労働省ホームページ <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k19.pdf>
- 7) 改訂 4 版 水道水質基準ガイドブック、pp72-73、丸善(2009)
- 8) IARA MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, VOLUME 106, Trichloroethylene, Tetrachloroethylene, and Some Other Chlorinated Agents, 35-217

- <https://publications.iarc.fr/130>
- 9) 平成 23 年 4 月 1 日施行：水質基準省令の改正等について 厚生労働省ホームページ
<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/suishitsu23.html>
 - 10) 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)
 - 11) 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
 - 12) 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〕)
 - 13) 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
 - 14) Gas Chromatography Problem Solving and Troubleshooting, Journal of Chromatographic Science, Vol. 36, November 1998
 - 15) PURGE-AND-TRAP FOR AQUEOUS SAMPLES, US EPA METHOD 5030C, p14
<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-5030c.pdf>
 - 16) 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)

WEB サイトの内容は 2020 年 6 月 1 日に確認した

Results of external quality control on the analytical measures for tetrachloroethylene and trichloroethylene in tap water, performed in 2018 in Osaka Prefecture

Yoshihiko KOIZUMI

In Osaka Prefecture, external quality control on analytical measures for drinking 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-one water supply corporation etc. participated in the external quality control on analytical measure of tetrachloroethylene and trichloroethylene in 2018. As a result, one facility was evaluated as an outlier. After the follow-up survey for the facility and the verification with all facilities, it was found that the following points are required in order to improve the accuracy of analyses : 1) Pay attention to the decrease of 4-bromofluorobenzene as the internal standard substance. 2) Create SOP based on the notification methods. 3) Carry out the validity test and check the SOP accuracy.

Key words : drinking water, external quality control, tetrachloroethylene, trichloroethylene

水質検査における外部精度管理（2018 年度）

—鉄及びその化合物—

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、水質検査を実施している大阪府内水道事業者、保健所および公的研究機関を対象に、鉄を添加した水質検査用模擬試料を配付し、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、27 検査値中 1 検査値が、真値に対する誤差率および 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鉄の汚染が定量値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、鉄及びその化合物、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、大阪府健康医療部生活衛生室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、水質検査を実施している大阪府内水道事業者、保健所および公的研究機関（水道事業者等）を対象に外部精度管理を実施している¹⁻¹⁰⁾。

2018 年度の対象項目は、無機項目として「鉄及びその化合物」を選定した。鉄は、様々な形態をとっており自然水に多く含まれている。水道水における鉄は、鉱山廃水、工場排水などの混入、あるいは鉄管に由来することがある¹¹⁾。鉱山廃水や工場排水が原因の場合は、前塩素を使用した鉄の酸化処理による除去、鉄管が原因の場合は、洗管により対応可能である¹¹⁾。

鉄はヒトに対する必須元素ではあるが¹²⁾、利水障害の観点では、鉄濃度が 0.05～0.1 mg/L 以上では配水管中で濁度や色度が高くなることがあり、鉄濃度が 0.3 mg/L 以上では洗濯物等にしみが付くとされている¹¹⁾。また、鉄濃度が高くなることにより金属味、金属臭、収れん味、苦味等を与えることがあり、お茶、コーヒー、紅茶も変色し味が悪くなる¹²⁾。鉄の水質基準については、昭和 33 年の水質基準に関する省令（厚生大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

労働省令第 23 号）により鉄の基準は「0.3 ppm をこえてはならない」と定められた。そして、平成 4 年以降、新たに追加すべき知見がないことから平成 4 年の専門委員会の評価値 0.3 mg/L が味覚および洗濯物の着色の観点から現在も維持されている¹¹⁾。

方 法

1. 参加機関

本研究に参加した水道事業者等は、27 機関であった。その内訳は水道事業者 22 機関、保健所 1 機関および公的研究機関 4 機関であった。

2. 実施方法

(1) 精度管理試料の調製方法

2018 年 9 月 10 日～21 日にかけて精製水約 100 L をポリタンクに採水した。精製水中の鉄濃度は 0.03 mg/L 未満であった。9 月 25 日に鉄標準液（富士フイルム和光純薬：1001 mg/L 溶液）を 20 mL 添加して攪拌した（調製設定濃度：0.2 mg/L）。1 L ポリエチ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（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) 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」(告示法)のフレイムレスー原子吸光光度計による一斉分析法 (FLAA 法)、フレイムー原子吸光光度計による一斉分析法 (AAS 法)、誘導結合プラズマ発光分光分析装置による一斉分析法 (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 (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、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、検査に使用した機器の測定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。

(3) 評価の検証方法

はじめに、各機関内で測定された精度管理試料の 5 つの測定値の変動係数が 10%を超過した機関は評価対象外とした。

検査結果は、「真値」に対する誤差率 (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、(1)の式から算出し、±10%以内を許容範囲とした。

$$\text{誤差率 (\%)} = \frac{[\text{各機関の検査値}] - [\text{真値}]}{[\text{真値}] \times 100} \quad \cdots (1)$$

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。誤差率および変動係数の許容範囲を 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⁾。

なお、変動係数、誤差率および Z スコアについては、検査値を計算過程で丸めずに算出した。

結 果 お よ び 考 察

1. 精度管理試料の均一性および安定性

外部精度管理用配付試料の均一性を確認するために、2018 年 9 月 25 日に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 回測定した。そして、得られた測定結果を基に一元配置分散分析を行った。その結果、試料間の変動は有意とならなかったため ($p=0.96$)、均一性に問題がないことを確認した。また、配付日、配付 1、5、7 および 14 日後に試料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、外部精度管理配付用試料の安定性に問題はないと判断した。

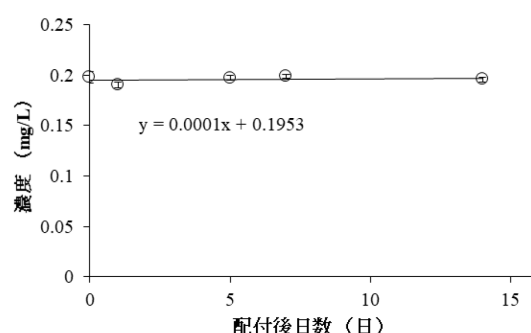


図 1 精度管理試料に含まれる鉄の分析値の安定性 ($n=5$ 、平均±標準偏差)

2. 分析方法

参加機関が用いた試験方法を表 1 に示す。

表 1. 参加機関の試験方法およびデータ数

検査方法	機関数
フレイムレスー原子吸光光度計による一斉分析法 (FLAA法)	3
フレイムー原子吸光光度計による一斉分析法 (AAS法)	3
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)	1
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)	20
計	27

本研究においては、ICP-MS 法で鉄の検査を実施する機関がもっとも多く、次いで FLAA 法および AAS 法と続き、最も少ない検査法は ICP-AES 法という結果となった。

3. 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 27 機関から報告された 27 の検査値、変動係数、誤差率および Z スコアを表 2 に示す。そして、各機関の検査値のヒストグラムを図 2 に示す。

表 2. 外部精度管理試験における検査値の概要

機関番号	検査方法	検査値 (平均値) (mg/L)	変動係数* (%)	真値に対する 誤差率* (%)	Zスコア*
A-1	ICP-MS	0.193	1.00	-6.06	-3.25
A-2	ICP-MS	0.193	0.87	-5.76	-3.11
A-3	ICP-MS	0.197	1.36	-4.11	-2.33
A-4	ICP-MS	0.197	1.31	-3.91	-2.24
A-5	ICP-MS	0.201	2.55	-1.87	-1.28
A-6	AAS	0.202	1.55	-1.38	-1.05
A-7	FLAA	0.203	0.64	-0.99	-0.87
A-8	ICP-MS	0.203	3.06	-0.89	-0.82
A-9	ICP-MS	0.204	2.84	-0.60	-0.69
A-10	ICP-MS	0.204	0.54	-0.50	-0.64
A-11	ICP-AES	0.205	0.80	-0.21	-0.50
A-12	ICP-MS	0.205	0.53	-0.01	-0.41
A-13	ICP-MS	0.206	0.55	0.18	-0.32
A-14	ICP-MS	0.207	0.97	0.86	0.00
A-15	ICP-MS	0.207	0.40	0.96	0.05
A-16	ICP-MS	0.207	0.55	1.06	0.09
A-17	ICP-MS	0.207	1.11	1.06	0.09
A-18	ICP-MS	0.208	1.11	1.15	0.14
A-19	FLAA	0.209	2.38	1.74	0.41
A-20	ICP-MS	0.209	1.24	1.93	0.50
A-21	AAS	0.209	1.95	1.93	0.50
A-22	AAS	0.210	6.33	2.13	0.59
A-23	ICP-MS	0.210	1.23	2.23	0.64
A-24	ICP-MS	0.210	0.71	2.42	0.73
A-25	ICP-MS	0.213	0.81	3.79	1.37
A-26	ICP-MS	0.215	0.61	4.86	1.87
A-27**	FLAA	0.263	7.96	28.0	12.7
平均値		0.207			
最大値		0.263			
最小値		0.193			
標準偏差		0.0123			
変動係数(%)		5.9			
n		27			

真値：0.205 mg/L

*検査値(n=5の平均値)を丸めず計算

**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

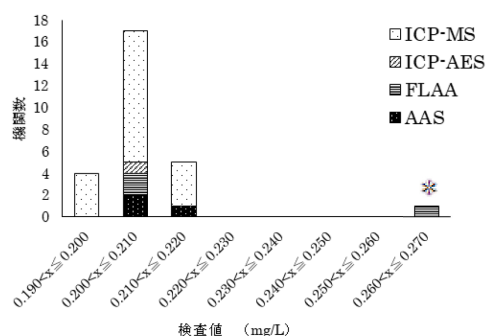


図 2. 検査法別の検査値のヒストグラム
(*: 外れ値)

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-27) が棄却され、残りの 26 検査値を平均した 0.205 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を超えたのは 1 機関 (A-27) であり、誤差率は 28.0%であった。

次に、27 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-3.25～12.7 となり、Zスコアが許容範囲を超えたのは 3 機関 (A-1、A-2 および A-27) であり、Z スコアはそれぞれ、-3.25、-3.11 および 12.7 となった。

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-27) であった。外れ値の存在率は、3.7% (1/27) 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-27 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-27 は、FLAA 法を用いており、検査値は 0.263 mg/L、Z スコアは 12.7 および誤差率は 28.0%であった。提出された資料から、前処理において加熱操作を実施していなかったことがわかった。また、通常検査時には検量線作成用の標準系列を 0.01、0.02、0.025、0.03 mg/L としていたが、本研究では精度管理試料の濃度が通常検査で測定している濃度範囲より高かったため、標準系列に 0.05 mg/L を新たに追加していたことが判明した。なお、機関 A-27 では、精度管理試料を前処理の際、10 倍に希釈して測定を実施していた。通常検査時の標準系列の範囲で再計算したところ、検量線の直線性 (相関係数) は 0.9998 となり、本研究時の相関係数 0.9985 に比べて高かった。したがって機関 A-27 では、標準系列を新たに追加したことが検量線の直線性が低下した要因の 1 つになったと考えられた。水道水質検査に用いる検査法は、妥当性試験を行うことが求められている。妥当性試験の中で、SOP に定めた標準系列の濃度および点数で作成した検量線の妥当性を評価し、検量線の真度および精度に問題がないことを確認する必要がある¹⁷⁾。そのため、今回の事例の様に、検査ごとに標準系列の点数を増加させたことは妥当性評価されてない検量線を定量に用いたことになり、不適切であったと考えられた。

2018 年 12 月、機関 A-27 の検査担当者に対して当所にて FLAA 法に関する実務研修を実施した。著者らの指導の下、当所の SOP に従って FLAA 法による前処理および測定を行った。その際、機関 A-27 では、鉄標準液を希釈するために使用するホールピペットを硝酸および精製水で洗浄していないことが判明した。水質検査においては、器具や試薬等からの汚染は留意する必要がある。特に、鉄のように一般環境中に存在する物質については、雰囲気からの汚染に対する細心の注意が必要となる。また、ガラス器具等繰り返し使用する器具においては、標準液等を使用した際に付着した物質が完全に取り除かれなかった場合、汚染の原因となる。未洗浄のホールピペットの使用が外れ値の原因か否か明らかにするため、当所が保有するマイクロピペットおよび使い捨てチップを貸与し、機関 A-27 にて、貸与したマイクロピペットと機関 A-27 の SOP を用いて外部精度管理試料の再測定を実施した。その際、機関 A-27 の SOP に従い標準系列に 0.05 mg/L は使用しなかった。再測定の結果、検査値は 0.221 mg/L となり真値 0.205 mg/L に対する誤差率が 7.6%と良好な値を得ることができた。このことから、機関 A-27 の外れ値の原因は、使用した器具による汚染および SOP に記載された標準系列を用いなかったことによるものと考えられた。機関 A-27 には SOP の遵守と使用する器具の洗浄方法や試薬などの汚染について留意することについて記載することを助言した。

(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濃度 0 mg/L を含めない 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¹⁸⁾。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、A-5、A-6 および A-25 では、検量線の点に 0 mg/L を用いていた。告示法および妥当性ガイドラインにおいては原則、検量線の点に 0 mg/L を用いないこととなっている^{13,17)}ため、SOP の修正が必要であった。

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されている¹³⁾。FLAA 法、AAS 法、ICP-AES 法および ICP-MS 法の上限はそれぞれ 1.0、1.0、2.0 および 2.0 mg/L となっている。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かった。

本外部精度管理ではすべての機関が空試験を実施していた。なお、告示法では空試験の判定の際、空試験の濃度が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となっている¹³⁾。すべての機関で空試験の濃度が検量線の下限値を下回ることを確認していた。

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¹³⁾。本研究では、前処理操作において 13 機関が 2~20 倍の範囲で希釈操作を実施していた。一方、3 機関が 2~2.5 倍の範囲で濃縮操作を行っていた。

告示法では、いずれの方法でも加熱操作を行うこととされている¹³⁾。酸を添加し、加熱操作を実施することで、金属類の総量を定量することができる¹⁹⁾。本研究では、A-5 および A-27 において加熱操作は行われていなかったため、告示法通りに SOP の修正が必要であった。

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¹³⁾。ICP-MS 法で測定した機関においては、A-2 を除くすべての機関が硝酸濃度 1%で調製していた。一方、FLAA 法、AAS 法もしくは ICP-AES 法で硝酸濃度が 10%であった機関は 7 機関中 3 機関であり、残りの 4 機関の硝酸濃度は 1 もしくは 2%であった。以前の研究において、複数の機関から「10%の硝酸濃度で測定すると、機器への負担が大きいため硝酸濃度を変更している」という報告があった⁸⁾。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。しかし、告示法に従って検査を実施することが水道法で定められているため、現時点では硝酸濃度が 10%になるように SOP の修正が必要であった。

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¹³⁾。また、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¹³⁾。ただし、ICP-AES法およびICP-MS法では、告示に定められた方法に従えば開封後保存したものについても使用できる¹³⁾。本研究においては、すべての機関で認証付きの市販の標準原液もしくは混合標準液を使用していた。標準原液もしくは混合標準液の開封時期については、すべての機関が1年未満であり、検量線作成用標準液は用時調製していた。したがって、標準原液等の取り扱いについて留意点はみられなかった。

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⁾。妥当性試験とは、水道水質検査を行う検査機関が自らのSOPに示す検査方法の妥当性を評価するための手段である。妥当性ガイドラインは、検量線の評価と添加試料の評価が示されている。検量線の評価では、最高濃度の標準試料を測定した直後のブランク試料中の濃度が検量線の下限値を下回ることを確認するキャリーオーバーの評価、標準試料を繰り返し測定し、定量した濃度の平均値がいずれの濃度点においても定められた目標内に収まることを確認する真度の評価および標準試料を繰り返し測定した際の精度が目標内に収まることを確認する精度の評価を実施する。添加試料の評価では、定量を妨害するピークがないことを確認する選択性の評価、添加試料を複数回測定し、得られた回収率の平均値が目標以内であることを確認する真度の評価および回収率の併行精度が目標内に収まることを確認する併行精度の評価を実施する。今研究では、すべての機関がキャリーオーバーの評価を実施しており、検量線の真度および精度の評価を92.6% (25/27)の機関が実施していた。添加試料の選択性、真度および精度の評価については、96.3% (26/27)の機関が実施していた。多くの機関では妥当性試験の重要性を認識し実施していたが、一部未実施の機関がみられたため、これらの機関は早急に妥当性試験を実施することが望ましい。

ま と め

大阪府の水道水質検査外部精度管理事業として、鉄及びその化合物の検査結果を誤差率±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27機関の内、5つの測定値の変動係数が10%を超えた機関は存在しなかった。27機関の内、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3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、3.7% (1/27)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) SOPに定められた検量線作成手順を遵守する。
- (2) 金属類の測定ではコンタミネーションの可能性があるため、可能な限り専用の器具を用いて前処理を行う。
- (3) ホールピペットについては、硝酸および精製水で洗浄したものを使用する。洗浄が困難な場合は、マイクロピペットの使用を検討する。チップについては、共洗いをを行う。

謝 辞

本研究は「平成30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生活衛生室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) 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.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 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-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.
- 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-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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 吉田仁, 中島孝江. 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-. *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2019; **3**: 83-88.
- 11) 厚生労働省 HP、水質基準の見直しにおける検討概要 -鉄-
<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k35.pdf>
- 12) 真柄泰基. 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社; 1994. 52-53.
- 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 号最終改正令和 2 年 3 月 25 日厚生労働省告示第 95 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 令和 2 年 3 月 30 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)
- 18) 厚生労働省(2012)水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法の一部を改正する件、資機材等の材質に関する試験の一部を改正する件並びに給水装置の構造及び材質の基準に係る試験の一部を改正する件等について、健水発 0228 第 1 号(平成 24 年 2 月 28 日)
- 19) 日本薬学会. 衛生試験法・注解 2015. 金原出版株式会社; 2015; 778-779.

WEB サイトの内容は 2020 年 5 月 21 日に確認した

**Results of external quality control on the analytical methods for iron in tap water, performed in 2018
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 iron in tap waters, with water supply corporations, public health centers and public research institutes in Osaka Prefecture. As a result, one from 27 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 iron contamination in the process of the preparation step of the measurement.

Key words: tap water, iron, water quality measurements, accuracy, external quality control

水質検査における定量精度に影響を及ぼす因子の解明（2019 年度）

—大阪府建築物飲料水水質検査業—

中島孝江, 高木総吉, 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。2019 年度の対象項目は「亜鉛及びその化合物（亜鉛）」と「塩素酸」を選定した。それぞれ 17 機関および 12 機関の参加を得て実施した結果、亜鉛で 2 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、測定機器の整備不良や器具の洗浄不足が不適切であったことが原因と判った。

キーワード：水道水、外部精度管理、亜鉛、塩素酸、建築物飲料水水質検査業

当所では 2015 年度から（一社）大阪ビルメンテナンス協会からの受託研究として、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する外部精度管理を、「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実施している¹⁾³⁾。2019 年度の対象項目は「亜鉛及びその化合物（亜鉛）」と「塩素酸」を選定した。

健康影響について、亜鉛はヒトの生体機能にとって必須元素であり、欠乏すると、食欲不振、成長阻害、性器発育不全、角化症、脱毛等の症状が現れる。150 mg を超えると銅や鉄の代謝に影響を及ぼす⁴⁾が、1 日当たりの摂取量は成人で約 15 mg で、WHO では現在のところ健康に基づくガイドライン値を導く必要はないと判断され設定されていない⁵⁾。一方で亜鉛は、地殻中に多量に存在する元素で、河川水中に含まれる亜鉛は、鉱山廃水、工場排水に起因し⁴⁾⁶⁾、水道水中には原水に由来するものと亜鉛めっき鋼管からの溶出によるものがあり、健康影響が

表れる摂取量（150 mg）よりも少ない 1 mg/L（人の 1 日飲水量を 2 L とすると飲水由来の 1 日摂取量は 2 mg となる）以上で白濁し、お茶の味等に影響することがある⁴⁾⁶⁾。

このような背景から水質基準は白濁して不快感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 1 mg/L 以下とされ今日に至っている⁴⁾。

塩素酸は分子量 84.46 の無機化合物であり、カリウム塩やナトリウム塩としても存在している。塩素酸ナトリウムと塩素酸カリウムは農薬や酸化剤、爆薬など様々な用途に使用されている⁷⁾が、水道では消毒に用いられている次亜塩素酸ナトリウム溶液中の不純物として問題になっている⁸⁾。

平成 18 年 8 月 4 日厚生科学審議会生活環境水道部会において、塩素酸が浄水において評価値（0.6 mg/L 以下）の 1/10 を超えて検出されていることから、食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 1 項第 7 号の規定に基づき、水質基準として塩素酸を追加する

ことについて、食品安全委員会の意見を求めることとなり⁹⁾、厚生労働省は平成 18 年 8 月 31 日に食品安全委員会に対し、塩素酸の水質基準の設定に係る食品健康影響評価について諮問を行った。平成 19 年 3 月 15 日に同委員会は「塩素酸の耐容一日摂取量を 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日と設定する。」との通知を行い¹⁰⁾、これを受けて、平成 20 年 4 月 1 日に水質基準に関する省令の水質基準に塩素酸が追加され、その基準値は「0.6 mg/L 以下」とされた¹¹⁾。

調 査 方 法

1. 実施項目

「亜鉛」と「塩素酸」を選定した。

2. 参加機関

参加した登録水質検査業者は、亜鉛が 17 機関、塩素酸が 12 機関であった。

3. 精度管理試料の調製方法

(1) 亜鉛

2019 年 9 月 13 日から 9 月 20 日にかけて精製水約 60 L 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（富士フイルム和光純薬、超微量金属測定用）を添加した。9 月 24 日に亜鉛標準液（富士フイルム和光純薬：1001 mg/L）を 10.2 mL 添加した後に攪拌し、1 L のポリエチレン瓶に分注した。なお、標準液添加前の精製水中の亜鉛は定量下限値の 0.1 mg/L 未満であった。上記により、外部精度管理試料中の亜鉛濃度は 0.17 mg/L と推定された。

(2) 塩素酸

2019 年 9 月 24 日に精製水約 12 L をポリタンクに入れ、次に塩素酸イオン標準液（富士フイルム和光純薬株式会社：1003 mg/L）を 1.5 mL 添加し、精製水を加えて 15 L にして十分に攪拌した。最後に 50 mg/mL のエチレンジアミン溶液を 15 mL 添加し、十分に攪拌後、250 mL ポリエチレン瓶に分注して外部精度管理試料とした。上記により、外部精度管理試料中の塩素酸イオン濃度は 0.10 mg/L と推定された。

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、亜鉛はフレイムー原子吸光光度計による一斉分析法（AAS 法）、塩素酸はイオンクロマトグラフ法で行った。

(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。亜鉛と塩素酸の P 値はそれぞれ 0.194 と 0.524 で、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、亜鉛、塩素酸共に 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、亜鉛は調製後 2、3、7、10、13、16、23 日目に、塩素酸は調製後 2、3、6、9、16、23 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亜鉛が 1.07%、塩素酸が 2.75% 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、亜鉛が 0.0002、塩素酸が -0.0002 となり、いずれもほぼ 0 で、この評価方法から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

2019 年 9 月 26 日に大阪健康安全基盤研究所講堂において参加機関に配付した。

(2) 分析方法

告示法¹²⁾に基づいて、亜鉛はフレイムレスー原子吸光光度計による一斉分析法（FLAA 法）（告示法別表第 3）、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）（告示法別表第 6）、塩素酸はイオンクロマトグラフ法（告示法別表第 16 の 2）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、

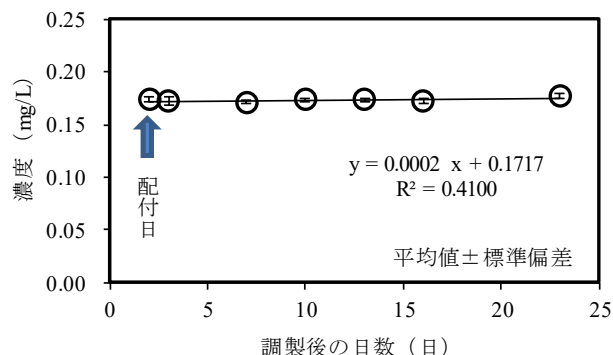


図1 精度管理試料の経時変化（亜鉛）

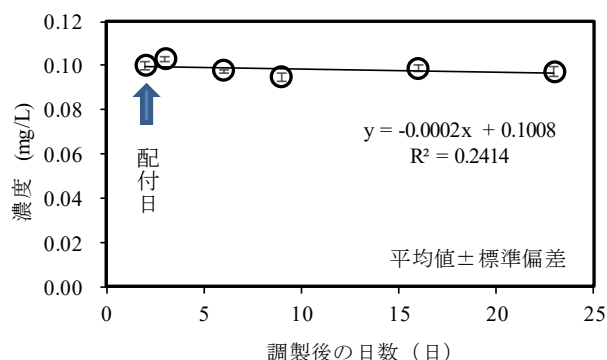


図2 精度管理試料の経時変化（塩素酸）

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ものとした。

(4) 評価の検証方法

報告された検査値（n=5）の変動係数は亜鉛、塩素酸共に 10%を許容範囲¹³⁾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¹⁴⁾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、亜鉛、塩素酸共に±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¹⁵⁾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」を出した機関を対象に、「外れ値」の原因の把握と分析精度の改善を目的とするフォローアップ調査を実施した。調査は、該当機関からの「外部精度管理に係る外れ値等に関する報告書」の提出後、「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) 亜鉛

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。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、17 機関の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、2 機関（A-16、A-17）が棄却されたため、これらを除いた 15 検査値を平均した 0.174 mg/L を「真値」とした。「真値」に対する誤差率の範囲は -8.17～29.7%となり、許容範囲を超えたのは 3 機関（A-15、A-16、A-17）であった。一方、17 検査値を用いて求めた Z スコアの範囲は -1.60～6.80 となり、Z スコアが許容範囲を超えたのは 2 機関（A-16、A-17）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（A-16、A-17）で、全体の 12%であった。「外れ値」となった機関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-16

機関 A-16 は、FLAA 法を用いており、検査値は 0.206 mg/L、「真値」に対する誤差率は 18.3%、Z スコアは 4.28 であった。外れ値等に関する報告書によると、原因としてオートサンプラーのノズル先端の汚れが推測されるとのこ

表1 検査機関の測定結果（亜鉛）

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	0.160	1.49	-8.17	-1.60
A-2	0.169	0.90	-3.36	-0.53
A-3	0.169	1.28	-3.24	-0.51
A-4	0.169	1.07	-2.90	-0.43
A-5	0.170	0.26	-2.67	-0.38
A-6	0.171	0.52	-1.75	-0.18
A-7	0.171	0.32	-1.75	-0.18
A-8	0.172	1.09	-1.41	-0.10
A-9	0.173	1.80	-0.95	0.00
A-10	0.174	1.79	-0.37	0.13
A-11	0.177	0.93	1.57	0.56
A-12	0.177	0.85	1.69	0.59
A-13	0.180	1.33	3.41	0.97
A-14	0.192	0.95	9.83	2.39
A-15*	0.192	1.52	10.1	2.44
A-16***	0.206	1.44	18.3	4.28
A-17***	0.226	7.49	29.7	6.80
平均値	0.179			
最大値	0.226			
最小値	0.160			
標準偏差	0.0164			
変動係数 (%)	9.12			
n	17			

真値：0.174mg/L（Grubbs棄却検定で棄却された機関を除いた平均）

+：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）

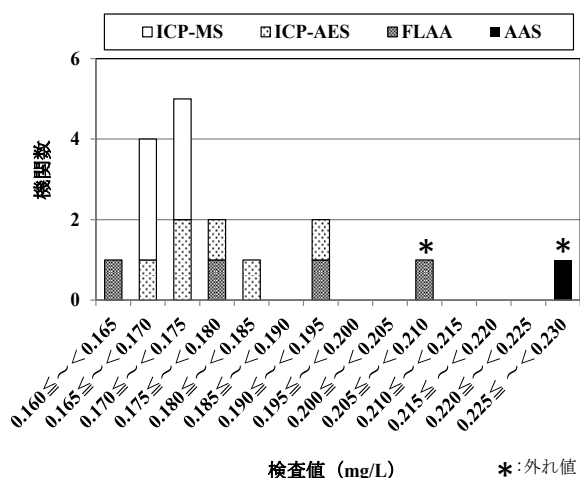


図3 検査値の度数分布図（亜鉛）

とであった。オートサンプラーのノズルを新品に交換し、さらに検量線を改善（検量点を3点から4点にし、濃度 0 mg/L を検量点に使用しない）し、定量計算で空試験値を差し引かないようにして再度精度管理試料の測定を行ったところ、検査値は 0.180 mg/L、真値に対する誤差率は 2.95%、Z スコアは 0.87 で外れ値とはならなかった。ノズル先端の汚れは、試料と標準系列の両方に影響を及ぼすと考えられるので、外れ値の原因であると断定できないが、測定結果に影響を及ぼした可能性が考えられた。

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-17

機関 A-17 は、AAS 法を用いており、検査値は 0.226 mg/L、「真値」に対する誤差率は 29.7%、Z スコアは 6.80 であった。

外れ値等に関する報告書によると、試料の採取に使用していたホールピペットを酸洗浄していなかったことが原因として推測されることであった。酸洗浄したホールピペットを用いて再度精度管理試料の測定を行ったところ、検査値は 0.170 mg/L、真値に対する誤差率は-2.78%、Z スコアは-0.41 で外れ値とはならず、外れ値の原因はホールピペットの汚れであったと考えられた。

高感度の金属の分析方法では、器具の汚染が測定値に大幅な誤差を生む原因となるので、使用する器具類の洗浄は慎重かつ丁寧に行う必要がある。具体的な例としては、器具を精製水で洗浄後硝酸（1.5 mol/L）又は塩酸（1.5 mol/L）に1日以上浸し、水道水又は精製水で中間すすぎを行い再び精製水で洗浄する。配管が金属管（鉄管、鉛管、亜鉛めっき鋼管）使用で汚れのある場合は、酸浸漬から取り出した後の中間すすぎに使用する水道水からの汚染の可能性があるため、すべて精製水で洗浄する必要がある¹⁶⁾。

(2) 塩素酸

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。

12 機関の検査値のうち、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、棄却された機関はなかったため、12 の検査値を平均した 0.0947 mg/L を「真値」とした。「真値」に対する誤差率は -11.5%～8.29%であり、許容範囲を超えた機関は 1 機関 (B-1) であった。また、Z スコアを求めた結果、Z スコアの範囲は -2.39～1.82 となり、すべての機関が許容範囲内であった。

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」に該当した機関はなかった。

2. 全体的な留意点

(1) 亜鉛

①検査方法による比較

亜鉛及びその化合物の検査には、FLAA 法、AAS 法、ICP-AES 法および ICP-MS 法の 4 つの検査方法が認められている。検査法別の検査値のヒストグラムを図 3 に示した。検査法別の検査値の平均値と変動係数は、FLAA 法が 0.184 mg/L と 10%、ICP-MS 法が 0.171 mg/L と 1.2%、ICP-AES 法が 0.177 mg/L と 4.7%で、FLAA 法は機関差が大きい傾向、ICP-MS 法は機関差が小さい傾向が認められた。

② SOP

適切な SOP を整備していたのは 3 機関、不適切であったのは 14 機関、そのうち必要な記載（試薬の具体的な規格、試料の希釈方法、連続試験を実施する際の措置等）のないものが 9 機関、残る 5 機関はフロー図のみ等で SOP の体をなしていなかった。SOP は試験実施のために必要なものであり、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¹²⁾が、4 機関が 2 週間以内に検査を開始していなかった。精度管理試料の配付日が決められていたため、通常業務の都合により、2 週間以内に開始できなかった機関もあった可能性が考えられるが、通常の検査の場合は、速やかに分析できない場合は告示法に従い、冷暗所に保管し 2 週間以内に前処理しなければ

表 2 検査機関の測定結果（塩素酸）

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	0.0839	1.12	-11.5	-2.39
B-2	0.0886	0.59	-6.44	-1.32
B-3	0.0918	1.28	-3.15	-0.62
B-4	0.0922	1.38	-2.67	-0.52
B-5	0.0923	0.90	-2.56	-0.49
B-6	0.0939	2.21	-0.85	-0.13
B-7	0.0951	1.66	0.37	0.13
B-8	0.0964	1.56	1.70	0.41
B-9	0.0970	0.95	2.42	0.57
B-10	0.101	2.79	6.94	1.53
B-11	0.102	2.06	7.40	1.63
B-12	0.103	2.63	8.29	1.82
平均値	0.0947			
最大値	0.103			
最小値	0.0839			
標準偏差	0.00555			
変動係数 (%)	5.86			
n	12			

真値：0.0947 mg/L

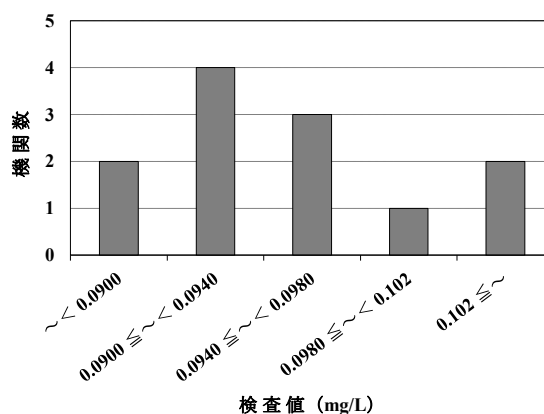


図 4 検査値の度数分布図（塩素酸）

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

告示法では前処理の際、別表に記載された検水の濃度範囲内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¹²⁾。本調査では、7 機関は精度管理試料をそのまま用い、希釈（倍率 2～40 倍）を行ったのは 10 機関で、

いずれの機関も検量線の濃度範囲になるように適切に調製されていた。

また、いずれの方法を用いた際も、前処理操作で加熱を行うこととされている¹²⁾が、2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。

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¹²⁾。硝酸濃度10%が適用されるICP-AES法で測定した機関においては、1%と2%が各1機関、同じく10%のFLAA法では0.05%と1%が各1機関あり、改善が必要である。

⑤ 検量線

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¹²⁾。濃度範囲は検査方法によって異なり、FLAA法では0.001～0.1 mg/L、AAS法では0.02～0.2 mg/L、ICP-AES法とICP-MS法では0.001～2 mg/Lである¹²⁾。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6機関、このうち0 mg/mLを含めて検量点を4点としたため有効な検量点が4に満たなかった機関が1機関あり改善が必要である。

また、亜鉛の基準値は1 mg/Lであり、1/10の0.1 mg/Lまで定量する必要がある。今回はいずれの機関も最小検量点濃度を0.1 mg/Lより低く設定しており、基準値の1/10の定量が可能であった。

さらに、ICP-MS法とICP-AES法では内部標準物質との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¹²⁾が、今回はいずれの機関も内部標準物質を使用していた。

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（値付け証明書）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（同濃度標準液）の使用が認められている。

本調査ではすべての機関で市販の標準原液、又は標準液、又は混合標準液を使用していたが、

値付け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1機関あり、この機関は改善が必要である。標準原液の保証期限は、2019年11月～2021年2月ですべて保証期限内であった。

また、同濃度標準液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、告示に定められた方法に従えば開封後保存したものについても使用できる¹²⁾。

本調査では標準系列の調製日は、11機関は用時調製であったが、1週間未満が2機関、1ヵ月未満が4機関であった。標準系列は、用時調製しなければならない。

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值（基準値の1/10以下）を下回ることを確認する必要がある¹²⁾。今回はいずれの機関も空試験を実施しており、空試験の判定も問題なかった。

⑧ 妥当性評価

水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン¹⁷⁾に基づき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必要がある。しかし、妥当性評価を実施していた機関は5機関であり、参加機関の1/3以下であった。

(2) 塩素酸

① SOP

適切なSOPを整備していたのは3機関、不適切（試薬の具体的な規格、試料の希釈方法、連続試験を実施する際の措置等）であったのは9機関であった。SOPは試験実施のために必要なものであり、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。

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¹²⁾。1機関において、配付後15日目に検査を開始しており、検査開始までの時間が不適切であった。外部精度管理事業では試料搬入の時期が調整できないため、通常業務の事情により検査開始が遅れた可能性が考えられる。しかし、通常の検査時には告示法に従い、速やかに検査できない場合は冷暗所に保

管し、2 週間以内に検査しなければならない。
また、この機関は提出された SOP には検査開始までの時間が明記されていなかったため、それを SOP に明記して遵守する必要がある。

③ 前処理

告示法では、塩素酸の前処理として「検水（検水に含まれる塩素酸の濃度が 1.2 mg/L を超える場合には、0.06～1.2 mg/L となるように精製水を加えて調製したもの）をメンブランフィルターろ過装置でろ過し、初めのろ液約 10 ml は捨て、次のろ液を試験溶液とする。」と記載されている¹²⁾。また使用するメンブランフィルターの孔径は約 0.2 μm と規定されている¹²⁾。

本調査ではメンブランフィルターでろ過していない機関が 2 機関存在した。ろ過していたものの、メンブランフィルターの孔径が 0.45 μm のものを使用していた機関が 2 機関あり、そのうち 1 機関は SOP にメンブランフィルターの孔径を 0.45 μm としているため、告示法に合わせて SOP の改訂が必要である。また、残りの 1 機関は、SOP においてメンブランフィルターの孔径を 0.2 μm としているが、実際の操作では守られていなかった。検査に使用する器具、試薬などは SOP に定められた規格のものを使用しなければならない。

また、告示法では初めのろ液 10 mL を廃棄すると記載されているが、今回、廃棄量 10 mL 未満の機関が 9 機関で、ほとんど守られていない状態であった。この初めのろ液約 10 mL を廃棄する操作は、フィルターからの溶出物がイオンクロマトグラフでの測定に影響を与えるのを防ぐことが目的である。そのため、告示法に従い、必ず初めのろ液約 10 mL を廃棄する必要がある。

④ 検量線

告示法における検量線の作成方法では「塩素酸標準液を段階的にメスフラスコ 4 個以上に採り、それぞれに精製水を加えて 100 ml とする。」となっており、4 点以上の検量点が必要である¹²⁾。また、濃度 0 mg/L は検量点としては数えない¹⁷⁾。

本調査では、検量点が 4 点未満の機関が 1 機関存在し、この機関の検量点は 2 点であった。SOP には検量点は 4 点以上と明記されており、それに従い 4 点の標準液を測定していた。しか

し、試料の濃度計算には 2 点検量線を作成し、定量していた。SOP に具体的な検量点の濃度、調製方法、検量線の作成方法および定量方法を明記し、それに従う必要がある。また、検量点は 4 点以上であるものの、原点通過させている機関が 2 機関あった。検量線の作成方法として強制的な原点通過は不適切であるため、改善が必要である。

また、検量線用の標準液を調製した溶媒（塩素酸の場合は精製水）中に、検査対象物質が含まれていないことを確認するために濃度 0 mg/L をブランクとして測定する必要がある。今回、ブランクを測定していない機関が 4 機関、提出された資料からは不明であった機関が 1 機関であった。濃度 0 mg/L は検量点には使用しないものの、標準溶液調製時のコンタミネーションを確認するためにも必ず測定し、使用した標準溶液に問題がないことを明らかにしておくべきである。

⑤ 標準液

告示法では塩素酸ナトリウムから標準原液を自己調製し、これを希釈して標準液の調製を行うことになっている¹²⁾。また、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（値付け証明書）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を用いることができる¹²⁾。

今回 1 機関が自己調製しており、それ以外の 11 機関は値付け証明書等が添付された市販標準液を標準原液として使用していた。また標準溶液は使用の都度調製する必要があるが¹²⁾、調製日はすべての機関で問題なかった。

⑥ 空試験

告示法では空試験として精製水を一定量採り、試料と同様に操作して、試験溶液中の塩素酸濃度が検量線の濃度範囲の下限値を下回ることを確認しなければならない¹²⁾。今回、すべての機関で空試験は実施されており、問題はなかった。

⑦ 妥当性評価

妥当性評価は 7 機関が実施していたが、5 機関は未実施であった。妥当性評価の結果は、自社のデータの品質保証の客観的な証拠となるた

め、未実施の機関においては、妥当性評価を実施することが検査結果への信頼性につながると考えられる。

ま と め

2019 年度建築物飲料水水質検査業外部精度管理に亜鉛および塩素酸を選定し、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。

亜鉛は、報告された 17 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 2 機関で、これらを除いた 15 検査値を平均した 0.174 mg/L を「真値」とした。「真値」に対する誤差率が $\pm 10\%$ を超えたのは 3 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) 器具類は酸洗浄を行い、慎重かつ丁寧に洗浄する。
- 3) 告示法に準拠した SOP を整備する。
- 4) 空試験、前処理、標準液調製などは、SOP を遵守して行い、逸脱しないようにする。
- 5) 適切な濃度範囲、検量点数の検量線を作成する。
- 6) 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。
- 7) 妥当性評価を実施し、データの品質保証を行う。

塩素酸では検査を実施した 12 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存在しなかった。「真値」に対する誤差率が許容範囲を超えた機関は 1 機関、Z スコアが許容範囲を超えた機関は存在しなかった。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 0 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) 告示法に準拠した SOP を整備する。
- 2) 空試験、前処理、標準液調製などは、SOP を遵守して行い、逸脱しないようにする。
- 3) 適切な濃度範囲、検量点数の検量線を作成する。
- 4) 妥当性評価を実施し、データの品質保証を行う。

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) —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.
- 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) —大阪府建築物飲料水水質検査業—. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2018; 2: 91-99.
- 3) 中島孝江, 安達史恵, 小泉義彦. 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—. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2019; 3: 96-105.
- 4) 上水試験方法解説編 2001 年版. 日本水道協会; 2001. 401-404.
- 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/k31.pdf>
- 6) 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社;

1994. 50-51.

WEB サイトの内容は 2020 年 3 月 6 日に確認
した

- 7) 環境省環境リスク評価室、化学物質の環境
リスク評価 第 11 巻（平成 25 年 3 月）
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h24-02/pdf/chpt1/1-2-3-03.pdf>
- 8) 社団法人日本水道協会、水道用次亜塩素酸
ナトリウムの取扱い等の手引き（Q&A）
（平成 20 年 3 月）
- 9) 第 5 回厚生科学審議会生活環境水道部会、
水質基準の見直し等について（案）（資料
5）（平成 18 年 8 月 4 日）
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/08/dl/s0804-4a5.pdf>
- 10) 第 6 回厚生科学審議会生活環境水道部会、
塩素酸に係る水質基準の設定等について
（資料 2-1）（平成 19 年 10 月 26 日）
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/10/dl/s1026-15b.pdf>
- 11) 厚生労働大臣、水質基準に関する省令の一
部を改正する省令（平成 19 年 11 月 14 日厚
生労働省令第 135 号）
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/ensotsuika-a.pdf>
- 12) 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〕）
- 13) 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）
- 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. 7-27.
- 15) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試
験（1）. 環境と測定技術 2000; 27(2): 51-56.
- 16) 上水試験方法金属類編 2011 年版. 日本水道
協会; 2011. 142-147.
- 17) 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〕）

**Results of external quality control on the analytical measures for zinc and chlorate in drinking water,
performed in 2019 in Osaka Prefecture**

Takae NAKAJIMA, Sokichi TAKAGI 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 2019, 17 building inspection contractors participated in the external quality control on analytical measure of zinc and its compound and 12 contractors participated in that of chlorate. As a result, each two and zero building inspection contractors were evaluated as outliers. We executed the follow up survey for these two 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, zinc, chlorate, building inspection contractors

革製品等のアゾ染料由来の特定芳香族アミン等の分析検討

大嶋智子^a, 宮本京子^b, 角谷直哉^c, 山口之彦^b

繊維製品および革製品等に使用されるアゾ染料由来の「アゾ化合物」(化学的変化により容易に 24 種類の芳香族アミン(特定芳香族アミン)を生成するものに限る)が、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」で新たに有害物質に指定され、2016 年 4 月より施行された。基準値は「アゾ化合物」の特定芳香族アミンとしてそれぞれ 30 µg/g 以下が適用された。そこで、革製品等について分析検討を行った。検量線は、いずれの化合物も 0.05 あるいは 0.1-1.0 µg/mL の範囲で良好な直線性が得られた。定量下限値は 0.25 あるいは 0.5 µg/g となった。低濃度分析が可能なことから、回収率試験では規定添加量各 30 µg の 1/20 量の各 1.5 µg を添加した。その結果、ほとんどの化合物で JIS L 1940 の回収率基準をクリアしたが、一部で回収率の低下がみられた。還元反応を速やかに止めることで良好な回収率が得られたことから、その方法により、大阪市内で購入した毛皮を含む革製品等 8 試料についてスクリーニング調査を行った。その結果、いずれも規格に適合していた。また、アゾ染料に関する試験は、素材ごとに試験法が異なり、ミックス素材からなる製品では時間を要するため、検査対応に注意する必要がある。

キーワード：アゾ染料、革製品、家庭用品、GC/MS

アゾ染料は、種類が豊富で安価なことから、世界中で使用されている染料の一つであり、繊維製品、革製品等の染色に用いられている。このようなアゾ染料の一部は、皮膚表面や腸内の細菌によって還元的に分解され、発がん性又はそのおそれ指摘されている芳香族第一アミン類(Primary Aromatic Amines : PAAs)を生成する可能性があることが指摘されている^{1,3)}。「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律(家庭用品規制法)」⁴⁾において、これら発がん性を有する PAAs の 24 物質を特定芳香族アミン(特定 PAAs)とし⁵⁾、特定 PAAs を容易に生成するアゾ化合物が有害物質に新たに指定され、アゾ染料の家庭用繊維製品等への規制が 2016 年 4 月 1 日より始まった⁶⁾。対象となる家庭用品は、乳幼児繊維製品、下着、寝衣、手袋、中衣、外衣、寝具、床敷物、子供が口にとっていく可能性の高いタオルの他、バスマット、テーブル掛け、革製品(毛皮含む)等まで

多岐にわたり、これら家庭用品中のアゾ化合物の特定 PAAs としての含有量はいずれも「30 µg/g 以下」と定められた⁷⁾。その分析法は、天然繊維を含め分散染料が使用されていない繊維製品の試験法、分散染料が使用されている合成繊維等の繊維製品の試験法、革製品の試験法で異なる方法が適用された⁷⁾。試験により、アニリン、または、1,4-フェニレンジアミンが 5 µg/g 以上で検出された場合には、追加試験により特定芳香族アミンのパラ-フェニルアゾアニリンを再測定する必要がある。さらに、JIS L 1940(繊維製品-アゾ色素由来の特定芳香族アミンの定量方法-)を参考にして、あらかじめ回収率試験を実施し、規定の回収率基準を満たしている等、試験操作手順を確認することとされた⁸⁾。規制から 3 年が経過した 2019 年 3 月に、JIS L 1940 が改定となり^{9,10)}、そこでは分散染料の抽出溶剤はクロロベンゼンから安全性の高いキシレンに変更された。また、

^a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課^b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課^c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

4-アミノアゾベンゼン（家庭用品規制法ではパラ-フェニルアゾアニリンと呼ぶ）以外の特定 PAAs の回収率確認は還元反応せずに求めることになり、いずれも ISO 14362-1¹¹⁾および ISO14362-3¹²⁾に沿ったものとなった。

一方、革製品等のアゾ色素由来の特定 PAAs の分析法⁷⁾は、繊維製品の分析法と異なるが、すでに ISO 17234-1¹³⁾および ISO 17234-2¹⁴⁾とほとんど合致し、還元反応を行って回収率を求めている。2015 年の ISO 17234-1 の改定では、日本や中国で規制される特定 PAAs の 2,4-ジメチルアニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンの回収率基準 50%が盛り込まれ¹³⁾、国際基準化が進んでいる状況にある。本調査研究では、家庭用品規制法による革製品等のアゾ色素由来の特定芳香族アミンの分析対応について検討した。その際、大阪市内で販売される革製品等 8 試料についてアゾ染料由来の PAAs についてスクリーニング検査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

革製品（毛皮を含む）等 8 点を市内量販店および小売店にて購入し、試料とした（Table 1）。

2. 試薬

特定芳香族アミン類 21 種混合標準液、アニリン/1,4-フェニレンジアミン混合標準液（環境分析用）、2-ナフチルアミン、4-アミノジフェニルおよびベンジジン、いずれも関東化学製の各 100 mg/L アセトニトリル溶液を用いた。塩化ナトリウム、メチル-*tert*-ブチルエーテル（MTBE）は関東化学製の試薬特級を用いた。メタノールおよび蒸留水は高速液体クロマトグラフ用を用いた（メーカー問わず）。*n*-ヘキサンは和光純薬製の残留農薬試験用を用いた。内部標準には関東化学製のフェナトレン-*d*₁₀ 標準品の環境分析用を用いた。水酸化ナトリウム、クエン酸一水和物および亜ジチオン酸ナトリウムは和光純薬製の試薬特級を用いた。クロロベンゼンは米山薬品工業製、*n*-ペンタンはキシダ化学製のいずれも試薬特級を用いた。ケイソウ土カラムはアジレント製の Chem Elut 20 mL を用いた。

3. GC/MS 分析装置および測定条件

装置:GC 部 Agilent 製 HP6890 に MS 部 Agilent 製 5973 を装着したものを使用。測定条件^{7, 15)}: GC/MS 用キャピラリーカラムは、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm の 35%フェニルメチル

Table 1 Concentrations of Related Compounds of Primary Aromatic Amines detected in Dyed Leather Products

No	Sample	Color	Regulated by Japanese law	Country of origin	Material	Concentration (μg/g) ^{*1}	
						Aniline ^{*2}	1,4-phenylenediamine ^{*2}
1	Gloves	Dark Brown	○	China	Pig leather acryl	76	93
2	Stoles	Brown	○	China	Fox fur Polyester 100%(lining)	22	ND
3	Stoles	Blue	○	China	Rabbit fur (as border decoration) Acryl 100%	210	ND
4	Headwear	Red	○	China	Rabbit fur Nylon 94%, Polyester 6%	2.8	ND
5	Belt	Brown	×	Japan	Caw leather (smooth type)	490	7.7
6	Belt	Dark Brown	×	China	Caw leather (mesh type)	5.3	ND
7	Watch Belt	Black	×	unknown	Sheep leather (front), paper (core) Suede leather (back, brown)	520	11
8	Watch Belt	Red	×	unknown	Horse leather (front) (back part, gray)	1.1	ND

○: regulated, ×: not regulated ND: not detected, less than quantitation limit (each of 0.25 μg/g)

*1: Analyzed without separating the leather and textile parts.

By law for the "Act on the control of household products containing harmful substances" in Japan^{4,7)} and ISO 17234-1:2015¹³⁾.

*2: Measurement targets as reduction product of p-phenylazobenzene. If they are detected at 5 μg/g or more, analyze by liquid-liquid extraction method.

ポリシロキサンを液相とするもの（J&W 社製の DB35-MS）を使用した。カラム温度：55℃で5分間保持し、その後毎分15℃で230℃まで昇温した後、290℃まで毎分5℃で昇温し、さらに310℃まで毎分20℃で昇温させ、310℃に到達後5分間保

持した。注入口温度：250℃、キャリアーガス：高純度ヘリウムを使用。流量を毎分1.0 mL 定流量とした。注入方法：スプリットレスモードを用い、1 µL を注入した。選択イオンモニター (SIM)

Table2 Retention Time, analytical ion (m/z), LOQ and Calibration Range of PAAs and the Relation Compounds by GC/MS Analysis

No. *1	Target Compound	CAS number	Retention Time (min)	Quantifying ion (m/z)	Qualifying ion (m/z)	LOQ *2 (µg/g)	Calibration range (µg/mL)
1	4-aminodiphenyl	92-67-1	17.79	169	152	0.25	0.05-1.0
2	o-anisidine	90-04-0	12.1	123	108	0.25	0.05-1.0
3	o-toluidine	95-53-4	10.74	106	107	0.25	0.05-1.0
4	4-chloro-2-methylaniline	95-69-2	13.47	141	143	0.25	0.05-1.0
5	2,4-diaminoanisole	615-05-4	15.51	123	138	0.25	0.05-1.0
6	4,4'-diaminodiphenyl ether	101-80-4	22.35	200	171	0.25	0.05-1.0
7	4,4'-diaminodiphenyl sulfide	139-65-1	26.49	216	184	0.25	0.05-1.0
8	4,4'-diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane	838-88-0	24.6	226	211	0.25	0.05-1.0
9	2,4-diaminotoluene	95-80-7	14.65	121	122	0.25	0.05-1.0
10	3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane	101-14-4	27.08	266	268	0.5	0.1-1.0
11	3,3'-dichlorobenzidine	91-94-1	27.09	252	254	0.5	0.1-1.0
12	2,4-dimethylaniline	95-68-1	11.8	121	120	0.25	0.05-1.0
13	2,6-dimethylaniline	87-62-7	11.85	121	120	0.25	0.05-1.0
14	3,3'-dimethylbenzidine	119-93-7	25.01	212	196	0.25	0.05-1.0
15	3,3'-dimethoxybenzidine	119-90-4	27.25	244	201	0.5	0.1-1.0
16	2,4,5-trimethylaniline	137-17-7	13.12	120	135	0.25	0.05-1.0
17	2-naphthylamine	91-59-8	16.16	143	115	0.25	0.05-1.0
18	p-chloroaniline	106-47-8	12.48	127	129	0.25	0.05-1.0
19	p-phenylazoaniline *4	60-09-3	21.54	197	120	0.25	0.05-1.0
20	benzidine	92-87-5	22.59	184	167	0.25	0.05-1.0
21	2-methyl-4- (2-tolylazo) aniline	97-56-3	23.6	225	106	0.25	0.05-1.0
22	2-methyl-5-nitroaniline	99-55-8	16.65	152	106	0.25	0.05-1.0
23	4,4'-methylenedianiline	101-77-9	22.48	198	197	0.25	0.05-1.0
24	2-methoxy-5-methylaniline	120-71-8	13.06	137	122	0.25	0.05-1.0
	aniline *3	62-53-3	9.42	93	66	0.25	0.05-1.0
	1,4-phenylenediamine *3	106-50-3	13.43	108	80	0.25	0.05-1.0
	phenanthrene-d ₁₀ *4	1517-22-2	17.94	188	—	—	—

*1 : Order of compound names according to the “Act on the Control of Household Products Containing Harmful Substances” in Japan^{4, 6)}.

*2 : Limit of Quantification

*3 : p-Phenylazoaniline (no.19) is reduced in the official test to aniline and 1,4-phenylenediamine.

*4 : Internal standard

は、Table 2 の通りとした。

4. 標準溶液

特定 PAAs の 21 種混合標準液、2-ナフチルアミン、4-アミノジフェニル、ベンジジンおよびアニリン/1,4-フェニレンジアミン混合標準液(パラフェニルアゾアニリンの還元分解物)は、アセトニトリルで各々 20 µg/mL の標準溶液を調製した。分析する毎に、20 µg/mL の 21 種混合標準溶液、2-ナフチルアミン、4-アミノジフェニルおよびベンジジンをそれぞれ MTBE で混合希釈し、24 化合物の 3 µg/mL 混合標準溶液を調製し、これを添加回収用混合標準溶液とした。別に、特定 PAAs の 24 化合物にアニリン/1,4-フェニレンジアミン混合標準液を合わせた測定対象 26 化合物を、先と同様に MTBE で希釈して 3 µg/mL 混合標準溶液を調製し、MTBE で段階的に希釈して検量線用混合標準溶液を調製した。

内部標準溶液には、フェナントレン- d_{10} を用い¹⁶⁾、アセトンで 1000 µg/mL に調製してから MTBE で希釈して 6 µg/mL となるよう調製したものを用いた。検量線用混合標準溶液 (0.05、0.1、0.3、0.5、1.0 µg/mL) をそれぞれ 1 mL 採り、内部標準溶液 50 µL を加えて GC/MS 用標準溶液を調製した。

5. 試薬⁷⁾

(1) 10%水酸化ナトリウム水溶液

水酸化ナトリウム 10 g を精製水 90 mL に溶解させたものを用いた。

(2) 2%水酸化ナトリウム水溶液

水酸化ナトリウム 2 g を精製水 98 mL に溶解させたものを用いた。

(3) クエン酸緩衝液

クエン酸一水和物及び水酸化ナトリウムを 12.526 g 及び 6.320 g 採り精製水に溶かし 1000 mL とした。(この緩衝液はクエン酸として 0.06 mol/L、pH6.0 である。)

(4) 亜ジチオン酸ナトリウム水溶液

亜ジチオン酸ナトリウム 20 g を精製水に溶かし、100 mL としたものを用い、用時調製した。

(5) 水酸化ナトリウム・メタノール溶液

水酸化ナトリウム 20 g をメタノール 100 mL に溶解したものを用いた。

6. 革製品の試験溶液の調製⁷⁾

(1) 接着剤等の除去

革製品に接着剤等が使用されている場合にはやすりで機械的に取り除いた。その後、試料を約 1 mm 平方以下に細切した。この試料 1.0 g を正確に量り採り、反応容器に入れ、*n*-ヘキサン 20 mL を加え、40℃で 20 分間超音波処理した後、*n*-ヘキサンを除去した。この操作をさらに 1 回繰り返し、次に、反応容器の口を開け、局所排気装置内で一晩放置し、残留 *n*-ヘキサンを完全に除去した。

(2) 試験溶液の調製 (本試験)

(1) で接着剤を除去した試料の入った反応容器に、予め 70℃に加温したクエン酸緩衝液 17 mL を入れ、密栓し、手で振とうした後、70±2℃で 25 分間加温した。次に、亜ジチオン酸ナトリウム水溶液 1.5 mL を加え、70±2℃で 10 分加温した。更に、亜ジチオン酸ナトリウム水溶液 1.5 mL を加え、70±2℃で 10 分加温した。その後、反応容器を 2 分以内に 20～25℃まで冷却した。次に、この液をケイソウ土カラムに流し込み、15 分間放置した。また、MTBE 5mL 及び水酸化ナトリウム・メタノール溶液 1 mL を反応容器に入れ激しく振り混ぜた後、ケイソウ土カラムに負荷した。更に、MTBE 15 mL を反応容器に入れ、反応容器と残留物を洗い、洗液をケイソウ土カラムに流し込み、溶出液をナス型フラスコに採った。更に、MTBE 20 mL を反応溶液に入れ同様に洗った後、その洗液をケイソウ土カラムに負荷し、溶出液を当該ナス型フラスコに採った。次に MTBE 40 mL をケイソウ土カラムに流し、溶出液を当該ナス型フラスコに採った。この溶出液について、ロータリーエバポレーターを用いて 50℃以下で乾固しないように約 1 mL まで濃縮した。これを MTBE で 5 mL に定容したものを試験溶液とした。GC/MS 分析用には、そのうちの 1 mL を採り、内部標準溶液 50 µL を加えて調製した。

(3) 改良法

(2) で示した方法の還元反応後に、反応容器を 2 分以内に 20～25℃まで冷却する際に、速やかに 10%水酸化ナトリウム 0.5 mL を入れ激しく振りまぜる工程を追加した。それ以降のカラム精製処理からは、(2) の方法を継続した。

(4) 試験溶液の調製 (追加試験：液一液抽出)

本試験により、アニリン又は 1,4-フェニレンジアミンの量が 5 µg/g 以上検出された場合に、革製

品試料では実験方法 6. (1) に従い接着剤等を除去した後に、以下の追加試験を実施した。2%水酸化ナトリウム水溶液 9 mL 及び亜ジチオン酸ナトリウム水溶液 1 mL を加え、激しく振とうした後、密栓し、40±2℃で 30 分間加温した。その後、試料の入った反応容器を 1 分以内に 20～25℃まで冷却した。次に、反応容器に MTBE を正確に 5 mL および塩化ナトリウム 7 g を加え、振とう機で 1 秒間に約 5 回の速度で 45 分間水平振とうを行った。なお、冷却後から振とう開始までの時間は 5 分を超えないようにした。その後、MTBE 層を分取して得られた試験溶液を 1 mL 採り、内部標準溶液 50 μL を加えて GC/MS 用試験溶液を調製し、パラ-フェニルアゾアニリンの量を測定した。GC/MS 分析により、試料 1 g 中のパラ-フェニルアゾアニリンの量は 30 μg 以下でなければならない。

(5) 添加回収試験

添加回収試験は、特定 PAAs の 24 化合物各 3 μg/mL の混合標準溶液 0.5 mL を反応容器に加え、実験方法 6. (2) の本試験に従い処理した。内部標準にフェナントレン-d₁₀ を使用して、GC/MS 分析を行い、回収率を求めた。アニリン又は 1,4-フェニレンジアミンの量が 5 μg/g 以上検出された場合に行うパラ-フェニルアゾアニリンの添加回収試験は、混合標準溶液 3 μg/mL を 0.5 mL 反応容器に添加して、(4) の追加試験を実施した。

7. 分散染料を使用しない繊維製品の追加試験⁷⁾

革製品とのミックス素材として含まれるファー等の分散染料を使用しない繊維製品について、細切試料 1g を反応容器に入れた後に、実験方法 6. (4) の追加試験を実施した。

8. 確認試験⁷⁾

本試験及び追加試験により、試料中の特定 PAAs の 24 化合物のそれぞれの量が一成分でも 30 μg/g を超えて検出された場合には、GC/MS による物質同定を行った。確認試験では、GC 部は本試験と同じ分析条件を用い、MS 部は質量範囲 (*m/z*) 60～300 のスキャンモード分析を行った。ここで検出されたピークの保持時間 (RT) およびマススペクトルが特定 PAAs と一致するかどうか確認した。

結 果 お よ び 考 察

1. 革製品等試験法の改正政省令通知⁷⁾による分類

家庭用品規制法の改正政省令留意通知⁸⁾より、家庭用品規制法の適用を受ける革製品は、下着、中衣、外衣、帽子、床敷物とされた。そこでは、総務省が策定している日本標準商品分類（平成 2 年 5 月改定（第 5 回改定））に示される分類番号が示されており、ストール等も該当することから、今回の調査対象とした。また、ベルトおよび時計ベルトは通知⁸⁾では試験対象として分類されていないが、皮膚に接触する可能性があることから調査対象とした。8 試料のうち 5 試料は中国製で、日本製は No.5（茶色、ベルト）のみで、2 試料（時計ベルト）は表示が見られなかった。

これら革製品等のアゾ染料試験法については、通知⁸⁾により、革製品の一部に、繊維部分又は革部分を含むもの（繊維部分及び革部分の両方を含むものを含む）については、繊維部分は繊維製品の試験法に、革部分は革製品の試験法を用いることが示された。天然の毛皮を試料とする場合、革部分は革製品の試験法、ファー部分は繊維製品の試験法を用いることが示された。

したがって、試料 No.1 手袋は、手の甲部分に革を使用し、マチや手首のニット部分にアクリルを使用していることから、革製品の試験法及び分散染料を使用した繊維製品の試験法の適用となる。No.2 の毛皮のストール、No.4 の毛皮の帽子は、ファー部分と革部分を分けて、ファー部分は分散染料を使用しない繊維製品の試験法、革部分は革製品の試験法の適用となる。No.3 のファー付きストールは、ファー部分のラビットの毛は分散染料を使用しない繊維製品の試験法を、革部分は革製品の試験法を、ストール本体のニット部分のアクリルは No.1 と同様の分散染料を使用した繊維製品の試験法の適用となる。また、No.5、7、8 の革製品 3 点については、6. (1) に従い、芯を除き、接着剤やポリウレタンの使用が疑われる部分を機械的に「やすり」を使って削り除去してから試験に供した。

2. GC/MS 定量分析

特定 PAAs の 24 物質およびパラ-フェニルアゾアニリンが還元された分解生成 2 物質（アニリ

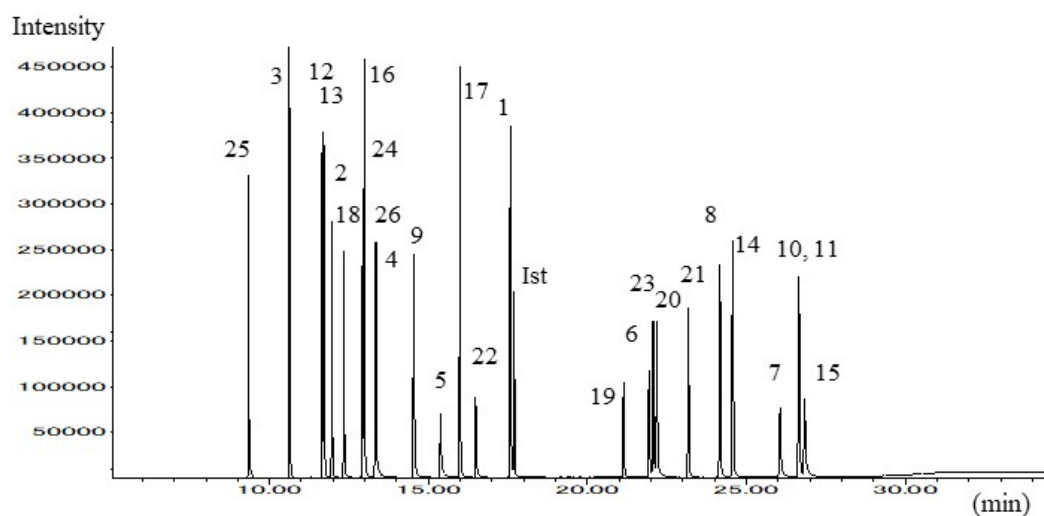


Fig. 1 GC/MS Chromatogram of PAAs and the related compounds (SIM)

1 : 4-aminodiphenyl, 2 : o-anisidine, 3 : o-toluidine, 4 : 4-chloro-2-methylaniline, 5 : 2,4-diaminoanisole, 6 : 4,4'-diaminodiphenyl ether, 7 : 4,4'-diaminodiphenyl sulfide, 8 : 4,4'-diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane, 9 : 2,4-diaminotoluene, 10 : 3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane, 11 : 3,3'-dichlorobenzidine, 12 : 2,4-dimethylaniline, 13 : 2,6-dimethylaniline, 14 : 3,3'-dimethylbenzidine, 15 : 3,3'-dimethoxybenzidine, 16 : 2,4,5-trimethylaniline, 17 : 2-naphthylamine, 18 : p-chloroaniline, 19 : p-phenylazoaniline, 20 : benzidine, 21 : 2-methyl-4-(2-tolylazo) aniline, 22 : 2-methyl-5-nitroaniline, 23 : 4,4'-methylenedianiline, 24 : 2-methoxy-5-methylaniline, 25 : aniline, 26 : 1,4-pnenylenediamine, Ist : phenanthrene-d₁₀

ン、1,4-フェニレンジアミン)を含む測定対象26物質のGC/MS分析では、ヘリウムガス流量を毎分1.0 mL 定流量とすることで、厚労省令第124号⁷⁾及び河上らの報告¹⁵⁾とほぼ一致するRTに分離良好なピークとして検出された(Fig. 1, Table 2)。測定対象物質のほとんどで0.05–1.0 µg/mLの範囲で、重みづけなしあるいは濃度の逆数で重みづけした検量線により、検量線作成点と検量線との乖離度が±20%以内の直線性のある検量線が得られたので、その範囲で定量した。定量下限は0.25 µg/g あるいは0.5 µg/g となり、基準値30 µg/g のおよそ1/100の定量が可能であった。

3. 添加回収試験

革製品の試験溶液の調製では、還元反応の停止が緩やかに行われることから、回収率の低下が予想された。そこで、添加回収試験は家庭用品規制法どおりのものと、還元反応後に速やかに10%水酸化ナトリウム溶液を0.5 mLを加え振とうして反応を停止させる改良法についても検討を加えた。その結果、表3に示すように、革製品の試験法どおり試験した場合には、5物質(2,4-ジアミノトルエン、2,4-ジアミノアニソール、4,4'-ジア

ミノジフェニルエーテル、4,4'-メチレンジアニン、ベンジジン)で回収率の低下がみられた。この結果は、繊維製品等で検討を行った安田らの報告¹⁷⁾に2,4-ジアミノトルエンを追加したものであった。本来、30 µgの添加による回収率を確認するが、安田らはその1/6の5 µg、我々は1/20の1.5 µgの少ない添加量であったため、ケイソウ土カラムへの吸着等により回収率低下を引き起こした¹⁷⁾と考えられるが、回収率低下を起こす物質が安田ら¹⁷⁾と一致あるいは類似していることから、これらの物質は本試験法では回収率低下を起こしやすい傾向にあると考えられた。還元反応を伴う場合の回収試験における添加量は、大泉ら¹⁸⁾や狩野ら¹⁹⁾が示すように10 µg以上添加するのが良好な回収結果につながるものと思われる。一方、6.(3)の改良法に示すように、速やかに還元反応を停止してから革製品のカラム処理を継続した場合では、2,4-ジアミノトルエンでわずか2%回収率基準をクリアできなかったが、そのほかではJISの回収率基準を確保することができた。定量下限が極めて低いことを考慮すると、検出を見逃すことがないため、革製品等の実態調査には改良法を用いることにした。

Table 3 Results of recovery test of PAAs and the Related Compounds to be measured for leather products

No.	Taeget Compound	Recovery (%)			Required Recovery (%)
		Method		Liquid-Liquid Extraction ^{*3}	JIS L1940-1
		Official ^{*1}	Modified ^{*2}		
1	4-aminodiphenyl	79	90	103	70
2	o-anisidine	87	95	96	70
3	o-toluidine	63	68	109	50
4	4-chloro-2-methylaniline	66	70	63	70
5	2,4-diaminoanisole	0	29	61	20
6	4,4'-diaminodiphenyl ether	35	73	106	70
7	4,4'-diaminodiphenyl sulfide	73	90	107	70
8	4,4'-diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane	80	94	99	70
9	2,4-diamonotoluene	5	48	63	50
10	3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane	84	88	102	70
11	3,3'-dichlorobenzidine	84	89	102	70
12	2,4-dimethylaniline	81	90	99	— (50) ^{*4}
13	2,6-dimethylaniline	80	84	96	— (50) ^{*4}
14	3,3'-dimethylbenzidine	80	89	96	70
15	3,3'-dimethoxybenzidine	78	92	111	70
16	2,4,5-trimethylaniline	84	93	100	70
17	2-naphthylamine	75	68	101	70
18	p-chloroaniline	82	92	95	70
19	p-phenylazoaniline ^{*5}	0	0	79	60 ^{*6}
20	benzidine	54	77	96	70
21	2-methyl-4- (2-tolylazo) aniline ^{*7}	0	0	72	—
22	2-methyl-5-nitroaniline ^{*8}	0	0	0	—
23	4,4'-methylenedianiline	47	76	100	70
24	2-methoxy-5-methylaniline	89	97	95	70
	aniline ^{*5}	77	75	98	70
	1,4-pnenylenediamine ^{*5}	0	0	0	—

Internal Standard : phenanthrene-d₁₀, Added amount : each of 1.5 µg, n=2, — : not setting

For substances that increase due to reductive decomposition, the theoretical amount was added to the addition amount and the recovery rate was calculated.

*1 : Official method follows the law for the control of household products containing harmful substances in Japan^{4,7)} and ISO 17234-1:2015¹³⁾.

*2 : In modified method, 0.5 mL of 10% NaOH was added to quickly stop the redaction reaction of official method.

*3 : Official method follows the law for the "Act on the control of household products containing harmful substances" in Japan^{4,7)} and ISO 17234-2:2011¹⁴⁾.

*4 : Set in ISO 17234-1:2015¹³⁾

*5 : p-phenylazoaniline (no.19) is reduced in the official test to aniline and 1,4-phenylenediamine.

*6 : By liquid - liquid extraction.

*7 : 2-methyl-4- (2-tolylazo) aniline (no.21) is reduced in the official test to o-toluidine (no.3).

*8 : 2-methyl-5-nitroaniline (no.22) is reduced in the official test to 2,4-diamonotoluene (no.9).

また、液-液抽出による追加試験は、アニリン及び1,4-フェニレンジアミンの量が5 µg/g以上検出された場合に、穏やかな還元を行うことでパラ-フェニルアゾアニリンをアニリンまで還元させずにそのまま測定する方法である。そのため、パラ-フェニルアゾアニリンのみの回収率確認となっているが、混合標準溶液についても回収率確認を行い、結果をTable 3に合わせて示した。1,4-フェニレンジアミンは回収されず、2-メチル-5-ニトロアニリンは2,4-ジアミノトルエンに還元されたため、この2物質は回収されなかった。また、2,4-ジアミノトルエンの回収率は、2-メチル-

5-ニトロアニリンからの還元生成理論量を添加量に加えた総和より計算して求めた。本法により、パラ-フェニルアゾアニリンだけでなく、2-メチル-4- (2-トリルアゾ) アニリンも還元されずにそのまま回収できた。さらに、そのほかの測定対象物質についてもすべてJIS L1940に示す回収率基準を上回る回収率が得られること、その結果は河上らの報告²⁰⁾と同様であることを確認した。

革製品に関して、中国や日本で規制されている特定PAAsの2,4-ジメチルアニリンおよび2,6-ジメチルアニリンについて、ISO 17234-1 (2015改定)¹³⁾では回収率基準50%が設定された。今回、

これら 2 物質について 80-99%の良好な回収率が得られることを確認した。

4. 革製品中の特定 PAAs の分析結果

(1) 革製品等の本試験

革製品の本試験に際して、本来素材別に試験すべきであるが、検査全体を把握するため、製品ごとに素材をミックスしたスクリーニング試験を実施した。その結果、Table 1 に示すように、法の適用製品であるかどうかにかかわらず、本試験において、8 試料すべてから測定対象物質のアニリンが 1.1 (No.8 時計ベルト (赤、馬革)) ~ 520 (No.7 時計ベルト (黒、羊革)) $\mu\text{g/g}$ 検出された。1, 4-フェニレンジアミンが 5 $\mu\text{g/g}$ を超えて検出されたのは、No.1 手袋 (濃茶、豚革) 93 $\mu\text{g/g}$ 、No.5 ベルト (茶、牛革) 7.7 $\mu\text{g/g}$ 、No.7 から 11 $\mu\text{g/g}$ の 3 試料であった。規制される特定 PAAs はどの試料からも検出されなかった。アニリンまたは 1, 4-フェニレンジアミンが 5 $\mu\text{g/g}$ 以上検出された場合には追加試験を行い、特定 PAAs のパラ-フェニルアゾアニリンの含有を確認する必要がある。したがって、No.4 の帽子および No.8 時計ベルトはこれ以上の試験をする必要がないが、No.4 はファー部分と革部分のどちらか一方にアニリンが含まれていたと考えると、5 $\mu\text{g/g}$ 以上になる恐れがあることから、No.4 については素材ごとに分けて追加試験を実施することにした。

(2) 革製品等の追加試験

追加試験は No.1 ~ 6 について、素材ごとに分けて実施した。No.7 の時計ベルトは、アニリンが 520 $\mu\text{g/g}$ 検出されたが、時計ベルトが革製品の試験対象になっていないこと⁸⁾、残存する試料量が少なく、芯を除き、ウレタンの使用が疑われる部分や接着剤部分をやすりで削り、革部分だけを採取することが難しいことから、追加試験の対象外とした。この 6 試料の革部分について追加試験を行ったところ、どの試料からもパラ-フェニルアゾアニリンは検出されず (Table 4)、製品には含有されないことがわかった。したがって、本試験で検出されたアニリンは、革製品に使用される規制対象外のアニリン染料で使用されたものであり、その色止めの染料助剤に 1, 4-フェニレンジアミン (規制対象外) が使用された²¹⁾と推測された。追加試験において、1, 4-フェニレンジアミンの含有量は No.5 で 16 $\mu\text{g/g}$ となり、本試験の 2 倍の

値であったが、No.1 は 8.8 $\mu\text{g/g}$ で本試験の 1/6 の値となった。本試験では、パラ-フェニルアゾアニリン以外の規制対象とされていないアゾ化合物が還元されて 1, 4-フェニレンジアミンを生成したことにより、No.1 では 93 $\mu\text{g/g}$ と高い値が検出されたと考えられた。これら試料の試験溶液について、GC/MS の SCAN 分析により確認試験を行ったところ、保持時間もマススペクトルも 1, 4-フェニレンジアミンに一致したことから、革製品中に含有されることを確認した。

(3) 毛皮およびミックス素材の分析

No.1 の手袋、No.3 のストールはいずれもアクリルをニット部分に用いたミックス素材であった。そのうちで含有量の多い No.3 と No.2 の毛皮ストール、No.4 の帽子 (ラビットファーと下地革) の 3 試料について、ファー部分を実験方法 7 に従い、分散染料を使用しない繊維製品の追加試験を実施した。その結果、Table 4 に示すように、アニリンは 3 試料すべてから検出され、含有量は 17 (No.4) ~ 570 (No.3) $\mu\text{g/g}$ と革製品の追加試験に比べて 4 ~ 20 倍高くなった。一方、特定 PAAs のパラ-フェニルアゾアニリンはいずれの試料からも検出は認められなかった。ファー部分のサンプリングに際し、特に No.2 のストールでは、フォックスを素材とするため、軽くて密集したファー 1 g の採取は 50 mL の反応容器にいっぱいとなった。ファーの吸水や撥水により、試験に必要な溶液量では、試料が充分浸らない状態もみられた。追加試験ではさらに試験溶液量が少ないことから、加温時にこまめに試験溶液を振とうすることで、ファーに十分な液が浸るようにした。その結果、いずれも本試験に比べてアニリンの含有量が多くなったと考えられた。また、No.4 のファー素材から 2-ナフチルアミンが 0.81 $\mu\text{g/g}$ 検出されたが、基準値内であった。

また、No.1 および No.3 のアクリル素材については、厚生労働省令 124 号⁷⁾に従い、合成繊維アクリルに使用される分散染料中のアゾ化合物の試験を実施したところ、アニリンが検出されないことを確認した。これについては、不検出であり、JIS L1940 の改定前の方法によるため、Table 4 には示していないが、4-クロロ-2-メチルアニリン、4,4'-ジアミノジフェニルエーテル、2,4-ジアミノトルエンの 3 物質でわずか 1-4%回収率基準にとどかなかった。それ以外はすべて基準をクリアし

Table 4 Concentrations of PAAs and the Related Compounds detected in Dyed Leather Products by Liquid-Liquid Extraction Method^{*1, 2}

No	Sample	Color	Concentration (μg/g)						
			Leather Parts ^{*1}			Fur Parts ^{*2}			
			Aniline ^{*3}	1,4-phenylenediamine ^{*3}	p-phenylazoaniline	Aniline ^{*3}	1,4-phenylenediamine ^{*3}	2-naphthylamine	p-phenylazoaniline
1	Gloves	Dark Brown	89	8.8	ND	—	—	—	—
2	Stoles	Brown	22	ND	ND	240	ND	ND	ND
3	Stoles	Blue	170	ND	ND	570	ND	ND	ND
4	Headwear	Red	2.9	ND	ND	17	ND	0.81	ND
5	Belt	Brown	500	16	ND	—	—	—	—
6	Belt	Dark Brown	0.91	ND	ND	—	—	—	—
7	Watch Belt	Black	—	—	ND	—	—	—	—
8	Watch Belt	Red	—	—	ND	—	—	—	—
Regulatory Limit			not setting	not setting	30 μg/g	not setting	not setting	30 μg/g	30 μg/g

*1: Lether part including fur ground leather. By law for the control of household products containing harmful substances in Japan^{4,7)} and ISO 17234-2:2011¹⁴⁾.

*2: By law for the "Act on the control of household products containing harmful substances" in Japan^{4,7)}, JIS L1940-3:2019¹⁰⁾ and ISO 14362-3:2017¹²⁾.

*3: Mesurement targets as reduction product of p-phenylazoaniline.

ND : not detected, less than quantitation limit (each of 0.25 μg/g)

— : not determined

た。今回、分析検討した試料は、いずれも家庭用品規制法に適合していることを確認した。

5. 分析の現状

革製品等について革製品の試験法に従い分析検討を行ったところ、ファーを含む革製品の本試験において、ほとんどの試料からアニリンが 5 μg/g 以上検出され、中には 500 μg/g を超えて検出されるものもあった。革製品では、アニリン染料が多く用いられることにより、アニリン含有量が多くなるため、本試験に加え、液-液抽出を用いた穏やかな還元反応による追加試験を実施した。

また、No.3 のストールは単色のファー付きのミックス素材（革、毛、アクリル）では、最初の本試験をスクリーニング検査として、素材をミックスして 1 分析としたことで、追加試験を革とファーについて行い、アクリルについて本試験を行ったため、合計 4 回の異なる前処理を実施した。そのいずれにおいても GC/MS-SCAN 分析を行うため、計 8 回の測定となった (Fig.2)。Fig.2 は、試験溶液の SIM および SCAN 分析ともにトータルイオンモニターを示し、いずれもアニリンの検出が多いことを示した。そのマススペクトルは、混合標準溶液中のアニリンのマススペクトル (Fig.2 の右下) と同じマススペクトルが得られることを確認した (図示せず)。薬生化発 0620 第 10 号⁸⁾では、3 色までを同一試料に含め試験しても差し支えない。ただし、その結果、いずれかの

特定芳香族アミンについて 5～30 μg/g の範囲にある場合には、単色の分析結果が 30 μg/g を超えるかどうかを確認するため、それぞれの色について別途試験を実施することが必要であることとされている。GC/MS で確認できなければ、さらに HPLC による確認試験が発生する。したがって、複数素材、複数色から構成される製品に対して、試買試験にかかる日数はほかの試験に比べて長期にわたり、違反に係る行政指導は検査後となる。このように、ミックス素材について試験対応する場合には、事前に、試験依頼者と試験者との打ち合わせが必要なことがわかった。

家庭用品規制法の革製品等のアゾ色素由来の特定 PAAs の分析法⁷⁾は、ISO 17234-1¹³⁾および ISO 17234-2¹⁴⁾と同様、回収率は還元反応を行い求めている。さらに、ISO 17234-1 の 2015 年の改定では、日本で規制される特定 PAAs の 2, 4-ジメチルアニリンと 2, 6-ジメチルアニリンの回収率基準も収載され、国際基準化が進んでいる状況にある。今回、革製品の回収率水準が 5 物質で基準を満たさなかったことから、現状における試験の導入には、規定添加量を加えて改善をはかるなど、さらに検討が必要と考えられた。

ま と め

革製品等についてアゾ染料由来の特定 PAAs 等の調査研究を行った結果、次のことが明らかになった。

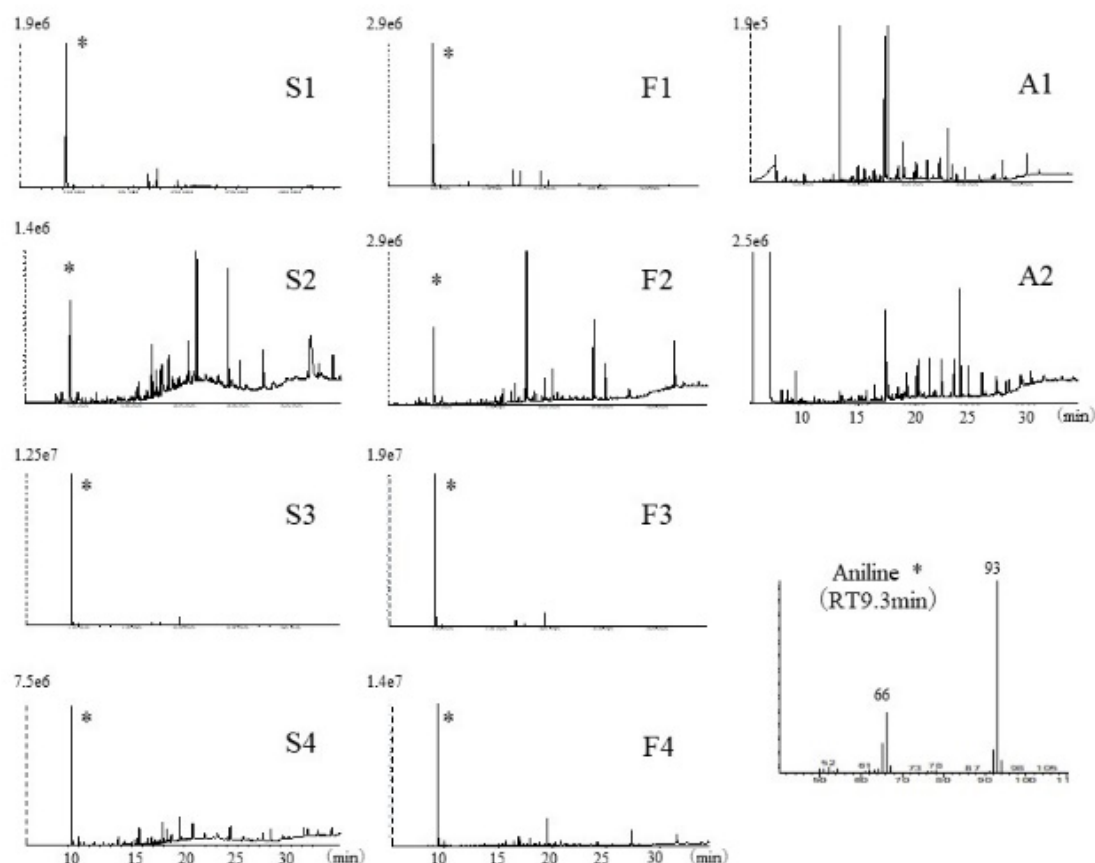


Fig. 2 GC/MS Chromatogram of Stoles (No.3) and Mass Spectra of aniline

(Left column) Lether parts	(Center column) Fur parts	(Right column) Acryl parts
S1 : Lether official test (SIM)	F1 : Textile official test (SIM)	A1 : Despase dye official test (SIM)
S2 : Lether official test (SCAN)	F2 : Textile official test (SCAN)	A2 : Despase dye official test (SCAN)
S3 : Liquid-Liquid extract test (SIM)	F3 : Liquid-Liquid extract test (SIM)	Mass Spectra : Aniline (SCAN)
S4 : Liquid-Liquid extract test (SCAN)	F4 : Liquid-Liquid extract test (SCAN)	

1. 革製品の本試験では、還元反応の停止が穏やかに行われるため、5物質でJISの回収率水準を満たさなかった。これは、添加量を基準の1/20量で実施したことが原因の一つに考えられた。改善策として、家庭用品規制法に従っていないが、還元反応を速やかに停止させることで、JISの回収率水準をクリアできることがわかった。

2. 革製品のスクリーニング試験として、素材を分別せずに実施した本試験において、8試料すべてからアニリン (1.1~520 µg/g) が、3試料から1,4-フェニレンジアミン (7.7~93 µg/g) が検出された。追加試験により、特定PAAsのパラ-フェニルアゾアニリンはいずれの試料からも検出されず、実態調査試料からの違反はみられなかった。また、1試料から2-ナフチルアミンが基準値以下の0.81 µg/g検出された。

3. 革製品には、アニリン染料が多く用いられていることが明らかになり、ほとんどの試料で追加試験を必要とすることがわかった。

4. 穏やかな還元反応による追加試験の追加回収試験結果は、パラ-フェニルアゾアニリン以外の物質についても良好な結果が得られた。

5. ファー付きストールのようにミックス素材からなる製品では、単色であっても、ファー部分、下地の革部分、ストール本体の繊維部分に分類され、分析法の異なる3試験が必要となる。複数色からなる場合は、さらに試験数が増加し、試験結果の判定に多くの時間を要することが明らかである。ミックス素材の試料の試験については、試験依頼者との事前打ち合わせが必要と考えられた。

謝 辞

本調査研究の家庭用品規制法の範疇に関する
ことの一部は、革製品の試買試験の導入を検討す
るため、平成 29 年度大阪市健康局特別調査研究
として実施したものである。ここに記して、深謝
いたします。

(この調査研究の要旨は、第 55 回全国衛生化学
技術協議会年会 (2018、神奈川県) において発表
した。)

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Manning B. W., Cerniglia C. E., Federle T. W.
Metabolism of the benzidine-based azo dye Direct
Black 38 by human intestinal microbiota, *Appl.
Environ. Microbiol.*, (1985) **50**, 10-15.
- 2) Hildenbrand S, et.al. Azo dyes and carcinogenic
aromatic amines in cell cultures. *Int. Arch. Occup.
Environ. Health*, (1999) **72**(supple 3), M52-56
- 3) Platzek T., Lang C., Grohmann G., Gi U.S., Baltes
W. Formation of a carcinogenic aromatic amine
from an azo dye by human skin bacteria in vitro.
Hum. Exp. Toxicol., (1999) **18**, 552-559.
- 4) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関す
る法律：昭和 48 年法律第 112 号
- 5) 厚生労働省医薬食品局長通知：有害物質を
含有する家庭用品の規制に関する法律施行規
則の一部を改正する省令の制定について、平
成 27 年 7 月 9 日付け薬食発 0709 第 1 号
- 6) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関す
る法律第 2 条第 2 項の物質を定める政令の一
部を改正する政令 (平成 27 年政令第 175 号)
- 7) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関す
る法律施行規則の一部を改正する省令、平
成 27 年厚生労働省令第 124 号
- 8) 化学物質安全対策室長通知：化学的变化によ
り容易に特定芳香族アミンを生成するアゾ
化合物を含有する家庭用繊維製品等につい
て、平成 28 年 2 月 22 日付け薬生化発 0222

第 1 号、改正：平成 28 年 6 月 20 日付け薬生
化発 0620 第 10 号

- 9) JIS ハンドブック 2019、31 繊維、JIS L1940-
1、繊維製品ーアゾ色素由来の特定芳香族ア
ミンの定量方法ー第 1 部：繊維の抽出及び非
抽出による特定アゾ色素の使用の検出、
p1892-1921、(一財) 日本規格協会編 2019、東
京
- 10) JIS ハンドブック 2019、31 繊維、JIS L1940-
3、繊維製品ーアゾ色素由来の特定芳香族ア
ミンの定量方法ー第 3 部：4-アミノアゾベン
ゼンを放出するアゾ色素の使用の検出、
p1921-1936、(一財) 日本規格協会編 2019、東
京
- 11) ISO 14362-1: 2017-02 “Textiles – Methods for
determination of certain aromatic amines derived
from azo colorants – Part 1: Detection of the use
of certain azo colorants accessible with and
without extracting the fibres”
- 12) ISO 14362-3: 2017-02” Textiles – Methods for
determination of certain aromatic amines derived
from azo colorants – Part 3: Detection of the use
of certain azo colorants, which may release 4-
aminoazobenzene”
- 13) ISO 17234-1: 2015-04-01”Leather – Chemical
tests for the determination of certain azo colorants
in dyed leathers – Part 1: Determination of
certain aromatic amines derived from azo
colorants”
- 14) ISO 17234-2: 2011-03-15”Leather – Chemical
tests for the determination of certain azo colorants
in dyed leathers – Part 2: Determination of 4-
aminoazobenzene”
- 15) Kawakami T., Isama K., Nakashima H., Tsuchiya
T., Analysis of primary aromatic amines
originated from azo dyes in commercial textile
products in Japan. *Journal of Environmental
Science and Health Part A* (2010) **45**, 1281-1295
- 16) 菅谷なえ子、佐藤芳樹、高橋美津子、桜井克
己、河上強志、繊維製品に含まれるアゾ色素
由来の特定芳香族アミンの分析及びその原
因色素の探索、*薬学雑誌* (2017)**137**, 95-109
- 17) 安田匡志、佐藤徳子、大久保祥嗣、八木正博、
特定芳香族アミンを生成するアゾ化合物を

含有する家庭用品の試験法に係る検討、*神戸市環境保健研究所報告* (2017) 41-43

- 18) 大泉詩織、千葉真弘、アゾ染料に由来する特定芳香族アミン試験法の検討—天然繊維について—、*北海道立衛生研究所報告* (2018) **68**, 17-22
- 19) 狩野真由子、東海敬一、毛利淳子、佐藤修一、特定芳香族アミンを生成するアゾ化合物検査方法の検討、*仙台市衛生研究所報告* (2016) **46**, 96-100
- 20) Kawakami T., Isama K., Nishimura T., Survey of Primary Aromatic Amines Originating from Azo Dyes in Commercial Textile Products in Direct Contact with Skin and in Commercial Leather Products in Japan. *Journal of Environmental Chemistry* (2012), **22**(4), 197-204
- 21) 髪の毛の染色と脱色の仕組みは? : <http://www.kiriya-chem.co.jp/q&a/q24.html>

WEB サイトの内容は 2020 年 6 月 29 日に確認した

Analysis of Primary Aromatic Amines Originated from Azo Dyes in Leather Products

Tomoko OOSHIMA, Kyoko MIYAMOTO, Naoya KAKUTANI and Yukihiro YAMAGUCHI

Twenty-four types of primary aromatic amines derived from azo dyes used in textile products and leather products were regulated by the law “Act on the Control of Household Products Containing Harmful Substances” by Japan Ministry of Health, Labor and Welfare in April 2016, and the regulation limit are all set to 30 µg/g or less of the final products. We examined the concentrations of primary aromatic amines in leather products. Regarding the calibration curves, good linearity was obtained in the ranges of 0.05 or 0.1-1.0 µg/mL for all compounds, and the lower limit of quantification were equivalent to 0.25 or 0.5 µg/g. Since the linearity at low concentrations is closely, the specified addition amount in the recovery rate test was set to 1.5 µg which is 1/20 of the standard values (30 µg). Our results suggest that our analytical method meet the JIS L 1940 recovery standard for most compounds. Although the recovery rate decreased for some compounds, good recovery rate was obtained by stopping the reduction reaction promptly. As a result of conducting a screening survey by our method on 8 samples of leather products including fur purchased in Osaka city, all of them conformed to the standard. However, because the analytical method for azo dyes differs depending on the material containing the azo dye, care must be taken when testing mixed materials.

Key words: azo dyes, leather, household products, GC/MS

大阪府における環境および食品中放射能調査（平成 31 年度報告）

大山正幸, 肥塚利江, 山口進康

平成 31 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。人工放射性核種については、 ^{131}I は例年と同様に上水（原水）に極低レベルで検出され、例年土壌や海底土から検出される ^{137}Cs は、土壌の 5~20 cm 層や海底土からは低レベルで検出されたが、土壌の 0~5 cm 層では検出されなかった。平成 31 年度の環境および各種食品中の放射能濃度および空間放射線量率は、昨年度と同レベルであり、人工放射性物質の新たな環境への放出はないことが示唆された。

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

大阪健康安全基盤研究所（当所）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、原子力規制庁の委託によるものである。

降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〕を行い、空間放射線量率についてはモニタリングポストによる監視を行った。

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。

本報告では、平成 31 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。なお、定時降水、大気浮遊じん、降下物の採取用具および大阪市モニタリングポストの設備は、平成 30 年 10 月に当所の本館観測室屋

上（地上約 20 m）から表 1 の場所に移設された。

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 31 年度）」¹⁾に基づいて行った。表 1 に調査項目および試料等を示す。

1. 全ベータ放射能測定

(1) 降水試料

当所（大阪市東成区）本館南側屋上（地上約 15 m）に設置したデポジットゲージ（表面積 1000 cm^2 ）で降水を集めた。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）

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	降水	大阪市東成区 当所本館南側屋上	降水毎	78
ガンマ線核種分析	大気浮遊じん		大阪市東成区 当所本館北側駐車場	3ヶ月毎	4
	降下物	降水・ちり	大阪市東成区 当所本館南側屋上	毎月	12
	上水	原水 蛇口水	守口市大庭町 大阪府庭窪浄水場 大阪市東成区 当所本館1F	年1回(令和元年 6月) 年1回(令和元年 6月)	1 1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(令和元年 7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(令和元年 7月)	1
	土壌	0～5cm 5～20cm	大阪市中央区 大阪城公園内 大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(令和元年 8月) 年1回(令和元年 8月)	1 1
	野菜	タマネギ(生産地) キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町 大阪府泉南郡熊取町	年1回(令和元年 6月) 年1回(令和元年12月)	1 1
	相互比較分析試料 (標準試料)	模擬牛乳	(公財) 日本分析センターで調製	年1回(令和元年 7月)	1
		模擬土壌	(公財) 日本分析センターで調製	年1回(令和元年 9月)	1
		寒天	(公財) 日本分析センターで調製	年1回(令和元年 9月)	5
空間放射線量率	モニタリングポスト		大阪市東成区 当所本館北側駐車場	毎日/年間	366
			茨木市大住町 茨木保健所	毎日/年間	366
			寝屋川市八坂町 寝屋川保健所	毎日/年間	366
			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	366
			泉佐野市羽倉崎 市立佐野中学校	毎日/年間	366

で行った。比較試料は、酸化ウラン (U_3O_8 : 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：当所本館北側駐車場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（吸引量：約 10000 m^3 ）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（降水・ちり）：当所本館南側屋上（地上約 15 m）に設置した水盤（表面積 5000 cm^2 ）に降下した降水およびちりを 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）を用いて蒸発濃縮した。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した後、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℃の乾燥器（Panasonic 社製、MOV-212-PJ）で乾燥させた後に、石英製容器に移して電気マッフル炉（ADVANTEC 社製、FUW263PA）で 450℃、24 時間灰化した。それぞれの灰試料は 0.35 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 2 L をマリネリビーカー（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）をマリネリビーカー（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、茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、泉佐野市に設置した 6 基（地上 1 m）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⁾。

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、78 試料中 18 例か

表2 降水中全ベータ放射能測定結果

年 月	降水量 mm	件数 (検出数)	濃度 Bq/L	月間降下量 MBq/km ²
平成31年 4月	56	8 (4)	ND～0.83	16.2
令和元年 5月	89	4 (2)	ND～0.33	8.5
令和元年 6月	80	7 (1)	ND～0.31	5.3
令和元年 7月	208	10 (1)	ND～0.35	1.1
令和元年 8月	187	6 (0)	ND	ND
令和元年 9月	103	6 (1)	ND～0.42	2.7
令和元年 10月	220	10 (0)	ND	ND
令和元年 11月	5	2 (1)	ND～0.55	0.7
令和元年 12月	47	5 (3)	ND～0.42	9.1
令和2年 1月	94	8 (3)	ND～0.91	17.5
令和2年 2月	62	4 (1)	ND～0.43	5.6
令和2年 3月	119	8 (1)	ND～0.27	2.6
平成31年度	1270	78 (18)	ND～0.91	69.3
過去3年間の値				
平成28年度 ¹⁾	1257	83 (22)	ND～0.75	67.9
平成29年度 ²⁾	1380	75 (33)	ND～1.46	147.5
平成30年度	1478	77 (23)	ND～1.63	56.9

ND: 計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

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

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

ら検出されたが、過去 3 年間と同レベルであった。

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。なお、表 3 には各測定項目の直近の過去 3 年間の測定結果の最大値と最小値を参考値として掲載する。

(1) ^{134}Cs および ^{137}Cs : ^{137}Cs が土壌の 5～20 cm 層と海底土の各試料から検出されたが、そのレベルは過去 3 年間の値と同程度であった。なお、過去 3 年間共、土壌の 0～5 cm 層の試料から検出限界に近い値で ^{137}Cs は検出されていたが、平成 31 年度は土壌の 0～5 cm 層の試料から ^{137}Cs は検出されなかった。また、他の試料では過去 3 年間同様 ^{137}Cs の検出はなかった。 ^{134}Cs は、過去 3 年間同様の試料からも検出されなかった。

(2) ^{131}I : ^{131}I は、上水原水試料から微量 (0.77 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 ^{131}I については、原水が平成元年度から、蛇口水が平成 2 年度から時々検出されており、そのレベルも過去の値 (原水: ND～4.9、蛇口水: ND～1.4 mBq/L)³⁾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⁴⁾に述べたように、その起源は医学利用によるものであろうと推定される。

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31～令和元年 4月～6月	H31.4.2 ～R1.6.18	mBq/m ³	ND	ND	ND	ND
令和元年 7月～9月	R1.7.2 ～R1.9.18	〃	ND	ND	ND	0.13±0.038
10月～12月	R1.10.3 ～R1.12.17	〃	ND	ND	ND	ND
令和 2年 1月～3月	R2.1.8 ～R2.3.17	〃	ND	ND	ND	ND
平成31年度		mBq/m ³	ND	ND	ND	ND～0.13
過去3年間の値		mBq/m ³	ND	ND	ND	ND～0.21
降下物						
平成31年 4月	H31.3.29 ～H31.4.26	MBq/km ²	ND	ND	ND	1.40±0.22
令和元年 5月	H31.4.26 ～R1.5.31	〃	ND	ND	ND	0.93±0.20
6月	R1.5.31 ～R1.6.28	〃	ND	ND	ND	ND
7月	R1.6.28 ～R1.8.1	〃	ND	ND	ND	ND
8月	R1.8.1 ～R1.8.30	〃	ND	ND	ND	ND
9月	R1.8.30 ～R1.10.2	〃	ND	ND	ND	1.23±0.21
10月	R1.10.2 ～R1.10.31	〃	ND	ND	ND	0.91±0.20
11月	R1.10.31 ～R1.12.4	〃	ND	ND	ND	0.86±0.19
12月	R1.12.4 ～R2.1.6	〃	ND	ND	ND	ND
令和 2年 1月	R2.1.6 ～R2.2.3	〃	ND	ND	ND	0.77±0.19
2月	R2.2.3 ～R2.3.2	〃	ND	ND	ND	ND
3月	R2.3.2 ～R2.3.31	〃	ND	ND	ND	ND
平成31年度		MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.4
過去3年間の値		MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.1
上水・原水	R1.6.7	mBq/L	ND	ND	0.77±0.15	79±2.6
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND～3.4	62～83
上水・蛇口水	R1.6.18	mBq/L	ND	ND	ND	94±2.8
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND～0.66	78～90
海水	R1.7.9	Bq/L	ND	ND	ND	5.2±0.38
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	2.9～3.9
海底土	R1.7.9	Bq/kg dry	ND	1.8±0.27	ND	650±12
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	1.8～2.4	ND	620～670
土壌	R1.7.26	Bq/kg dry	ND	ND	ND	640±11
0～5cm層		(MBq/km ²)	(ND)	(ND)	(ND)	(32000±528)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	1.3～2.0	ND	660～690
		(MBq/km ²)	(ND)	(73～110)	(ND)	(33000～38000)
土壌	R1.7.26	Bq/kg dry	ND	0.9±0.23	ND	703±11
5～20cm層		(MBq/km ²)	(ND)	(150±37)	(ND)	(12000±1800)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	0.8～2.9	ND	680～710
		(MBq/km ²)	(ND)	(120～490)	(ND)	(91000～110000)
農産物 タマネギ	R1.6.12	Bq/kg生	ND	ND	ND	51±0.37
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	44～51
農産物 キャベツ	R1.12.11	Bq/kg生	ND	ND	ND	63±0.44
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

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⁴⁾でも論じたように、そのレベルは飲食物摂取制限の基準⁵⁾(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は多くの試料

で検出されたが、その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⁹⁾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 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 1 m)

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31年 4月	30	96	75	76
令和元年 5月	31	86	75	76
6月	30	101	75	76
7月	31	92	70	74
8月	31	104	72	74
9月	30	87	72	73
10月	31	80	62	71
11月	30	75	65	67
12月	31	83	66	68
令和 2年 1月	31	86	64	67
2月	29	88	65	66
3月	31	80	65	67
平成31(令和元)年度	366	104	62	71
過去3年間の値				
平成28年度(地上20m)	365	82	39	42
平成29年度(地上20m)	365	67	40	42
平成30年度(地上20m)	205	65	40	42
(地上1m)*	160	99	72	76

※：平成30年10月地上1mに移設

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31年 4月	30	76	54	57
令和元年 5月	31	65	54	57
6月	30	77	53	57
7月	31	77	53	55
8月	31	71	52	56
9月	30	65	53	56
10月	31	67	54	57
11月	30	66	56	58
12月	31	69	55	58
令和 2年 1月	31	69	54	56
2月	29	76	54	56
3月	31	70	54	56
平成31(令和元)年度	366	77	52	57
過去3年間の値				
平成28年度	365	92	52	56
平成29年度	365	85	52	56
平成30年度	365	86	52	57

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31年 4月	30	89	68	70
令和元年 5月	31	81	69	70
6月	30	86	62	68
7月	31	86	63	65
8月	31	89	63	65
9月	30	78	63	65
10月	31	80	64	65
11月	30	82	65	66
12月	31	90	64	66
令和 2年 1月	31	85	64	66
2月	29	86	64	66
3月	31	81	64	66
平成31(令和元)年度	366	90	62	67
過去3年間の値				
平成28年度	365	117	69	72
平成29年度	365	95	69	71
平成30年度	365	98	68	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31年 4月	30	98	75	77
令和元年 5月	31	93	74	77
6月	30	102	74	77
7月	31	98	73	76
8月	31	105	73	77
9月	30	88	73	77
10月	31	88	74	77
11月	30	87	76	78
12月	31	101	75	78
令和 2年 1月	31	99	74	77
2月	29	98	74	77
3月	31	92	74	77
平成31(令和元)年度	366	105	73	77
過去3年間の値				
平成28年度	365	124	74	78
平成29年度	365	103	75	78
平成30年度	365	108	72	77

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31年 4月	30	74	61	62
令和元年 5月	31	70	61	62
6月	30	82	60	62
7月	31	77	60	62
8月	31	77	61	62
9月	30	73	60	62
10月	31	73	61	62
11月	30	73	61	62
12月	31	85	61	63
令和 2年 1月	31	83	61	62
2月	29	81	60	62
3月	31	76	60	62
平成31(令和元)年度	366	85	60	62
過去3年間の値				
平成28年度	365	97	61	63
平成29年度	365	82	60	63
平成30年度	365	90	60	62

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31年 4月	30	70	50	52
令和元年 5月	31	68	50	52
6月	30	72	49	51
7月	31	75	48	51
8月	31	72	48	51
9月	30	63	49	51
10月	31	71	49	51
11月	30	65	50	52
12月	31	69	50	52
令和 2年 1月	31	76	49	51
2月	29	77	49	51
3月	31	70	49	51
平成31(令和元)年度	366	77	48	51
過去3年間の値				
平成28年度	365	133	48	51
平成29年度	365	90	49	52
平成30年度	365	91	48	51

平成 31 年度の 1 時間値の変動範囲および年平均値は、大阪市 62～104、71 nGy/h、茨木市 52～77、57 nGy/h、寝屋川市 62～90、67 nGy/h、東大阪市 73～105、77 nGy/h、富田林市 60～85、62 nGy/h、泉佐野市 48～77、51 nGy/h であった。このうち、茨木市、東大阪市、富田林市、泉佐野市においては、変動範囲、年平均値とも過去 3 年間で類似の値であった。大阪市および寝屋川市においては、過去 3 年間の値（大阪市においては地上 1m に移設した平成 30 年 10 月以降）と比べ最低値や平均値が低い値を示した。最高値は、既報⁷⁾で示したように降雨の状況により影響されるため年により異なるが、最低値や平均値が例年よりやや低い値を示したため、空間放射線量率の経年変化と周辺状況の確認を行った。

その原因を検討するため、大阪市と寝屋川市のモニタリングポストによる空間放射線量率の日平均値の推移をで図 1 と図 2 に示す。日平均値では、時折、降雨によると考えられる高値が認められるものの、年度当初は、大阪市内で 75、76 nGy/h、寝屋川市内で 70 nGy/h 前後で推移していた。しかし、その後、大阪市内では 7 月 5 日ごろに一旦 73、74 nGy/h に低下し安定したのち 10 月中旬に再び低下し、その後、66 nGy/h 前後で推移していた。また、寝屋川市内では、6 月 20 日から値が低下し、その後、65 nGy/h 前後で安定して推移していた。

空間放射線量率に影響する周辺状況については、大阪市内では、年度当初にはモニタリングポストの横にコンクリート製の 4 階建て駐車場が隣

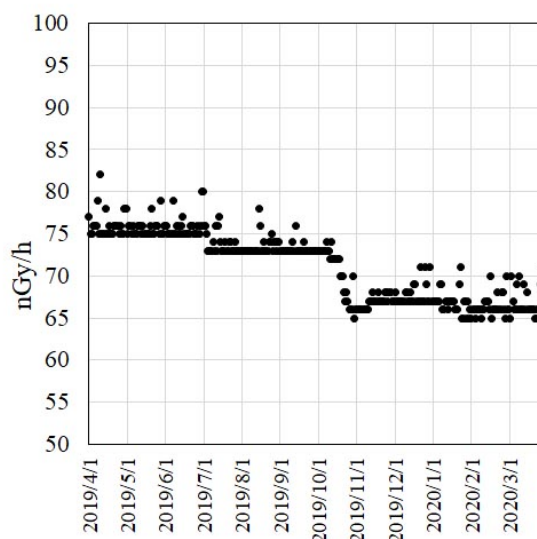


図 1. モニタリングポストによる
空間線量率の日平均値の年変化
(大阪市)

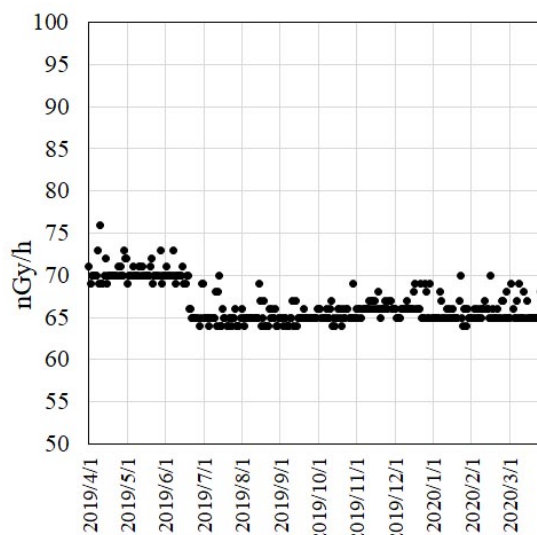


図 2. モニタリングポストによる
空間線量率の日平均値の年変化
(寝屋川市)

接しており（図 3）、7 月 3 から 5 日に駐車場解体工事のための塀が立てられ（図 4. 黒い矢印）、空間放射線量率の日平均値が 73、74 nGy/h に低下したときと一致した。7 月の空間放射線量率の低下はこの塀による遮へい効果によると考えられる。その後、塀の内側に養生足場（パネル付）を設置した（図 4. 白い矢印）が、養生足場による空間放射線量率への影響は認められなかった。駐車場は約 4 カ月かけ解体され、瓦礫は解体現場に



図 3. 大阪市モニタリングポスト横 立体駐車場



図 5. 大阪市モニタリングポスト横 駐車場解体後

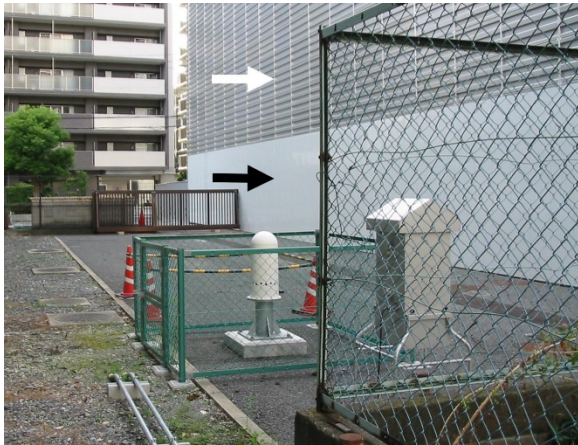


図 4. 大阪市モニタリングポスト横 塀設置



図 6. 寝屋川市モニタリングポスト周辺（石柱列跡）

山積みになっていた。その後、山積みの瓦礫は塀より低い高さで台形に均され、その作業と並行して 10 月 18 から 24 日にモニタリングポスト付近の養生足場の取り外し作業が行われた（図 5）。山積みの瓦礫の均し作業が 10 月の空間放射線量率の低下に影響したと考えられる。瓦礫が解体現場から撤去された前後での空間放射線量率への影響は認められておらず、塀の遮へい効果によると考えられる。寝屋川市については、平成 31 年度には表 4-3 と図 2 に示したように、6 月に明確な測定値の低下が起きた。モニタリングポスト周辺の平成 31 年度の環境変化については、平成 23 年度のモニタリングポスト設置時に近接して立てられていた石柱の列（矢印：石柱列跡）が撤去されているのを令和元年 9 月に確認している（図 6）。寝屋川市のモニタリングポスト周辺の石柱の撤去工事が行われた日付は不明だが、平成 31 年 4 月には、石柱は建てられていたので、石柱の撤

去が空間放射線量率の明確な変化に影響を与えたのではないかと考えられる。

ま と め

核種分析により人工放射性核種である ^{131}I および ^{137}Cs が検出された。医学利用等に由来すると考えられる ^{131}I は上水（原水）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検出されており、平成 31 年度も土壌の 5～20 cm 層や海底土からは検出されたが、土壌の 0～5 cm 層では検出されなかった。また、他の人工放射性核種はいずれの試料からも検出されなかった。空間放射線量率では、茨木市、東大阪市、富田林市、泉佐野市においては、過去の値と類似の値であり、大阪市と寝屋川市では、モニタリングポスト周辺の環境の変化によると考えられる値の変化が観察された。

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31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31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) 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.
- 4) 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.
- 5) 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)
- 6) 公益財団法人 日本分析センター. 平成31年度原子力施設等防災対策等委託費 (環境放射能水準調査 (放射能分析)) 環境試料の放射能測定における精度管理評価結果
- 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.

WEB サイトの内容は2020年6月4日に確認した

Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2019 Report)

Masayuki OHYAMA, Toshie HIZUKA and Nobuyasu YAMAGUCHI

We investigated the radioactivity of environment and foods in Osaka Prefecture by commission from Nuclear Regulatory Agency in 2019 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. An artificial radionuclide, ^{131}I , was detected at extremely low levels in raw water for tap water as in the past. ^{137}Cs , an artificial radionuclide frequently detected in soil and seabed soil, was detected in low levels in 5-20 cm layer of soil and seabed soil, but not in 0-5 cm layer of soil. These results suggested that the radioactivity and the air radiation dose rates in the environmental samples and various foods in FY2019 were at similar level to last year, and that no new artificial radioactive substances were released into the environment.

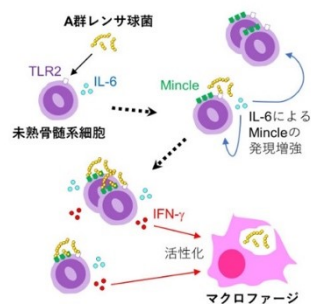
Key words: environmental radioactivity, gross beta activity, radionuclide analysis, environmental gamma activity

Sequential sensing by TLR2 and Mincle directs
immature myeloid cells to protect against invasive group
A streptococcal infection in mice

T. MATSUMURA^a, T. IKEBE^a, K. ARIKAWA^b,
M. HOSOKAWA^b, M. AIKO^c, A. IUCHI^c,
I. TOGASHI^a, S. KAI^c, S. OHARA^d, N. OHARA^d,
M. OHNISHI^a, H. WATANABE^a, K. KOBAYASHI^e,
H. TAKEYAMA^b, S. YAMASAKI^f, Y. TAKAHASHI^a
and M. ATO^a

Cell Reports, 27(2), 561-571 (2019)

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は約 30 %が死亡する致死率の高い感染症であり、その大部分が A 群レンサ球菌の感染によって引き起こされる。著者らが以前発見したインターフェロン γ 産生未熟骨髄系細胞 (γ IMCs) は劇症型感染マウスモデルにおいて宿主防御に寄与するが、その防御機構の詳細は不明であった。本研究で、 γ IMCs において Toll 様受容体 2 によるレンサ球菌の感知によりインターロイキン 6 が誘導され、オートクラインおよびパラクラインにインターロイキン 6 が作用し、 γ IMCs 上の C 型レクチン受容体 Mincle が発現増強されることがインターフェロン γ 産生に必須であるというシークエンシャル・センシング機構を見出した。今後、本防御機構を利用した新規免疫学的治療法の開発が期待される。



- a 国立感染症研究所
b 早稲田大学
c 東京工科大学
d 岡山大学
e 大阪健康安全基盤研究所
f 大阪大学

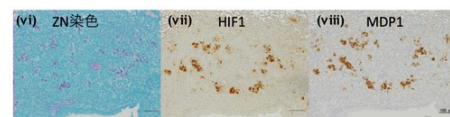
TLR2 と Mincle による連続した感知は未熟骨髄系細胞に劇症型溶血性レンサ球菌感染症に対する防御免疫を誘導させる

Metabolic adaptation to glycolysis is basic defense
mechanism of macrophages for *Mycobacterium*
tuberculosis infection

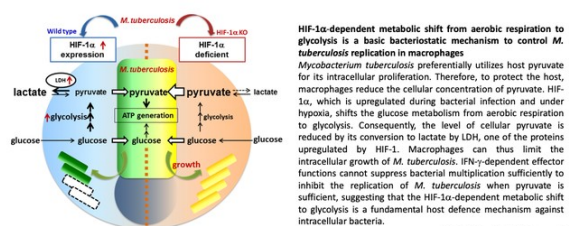
M. OSADA-OKA^a, N. GODA^b, H. SAIGA^c,
M. YAMAMOTO^c, K. TAKEDA^c, Y. OZEKI^d,
T. YAMAGUCHI^d, T. SOGA^d, Y. TATEISHI^d,
K. MIURA^e, D. OKUZAKI^e, K. KOBAYASHI^f
and S. MATSUMOTO^d

International Immunology, 31, 781-793 (2019)

マクロファージは結核菌感染防御における主要な細胞である。マクロファージが結核菌を捕食後、低酸素で誘導される転写因子 HIF1 が安定化し、殺菌活性を示す一酸化窒素 (NO) 産生を惹起し、加えて、脂質から解糖系代謝に変換させることが判明した。その機序は、結核菌がマクロファージの産生するピルビン酸を利用して増殖するため、ピルビン酸を LDH によって枯渇させ、感染宿主は結核菌の増殖を抑制していた。すなわち、マクロファージの解糖系代謝転換は結核菌への宿主防御応答である



結核菌感染マウス肺で、結核菌 (ZN)、HIF1、MDP1 (結核菌蛋白質) の共局在が顕著



Osada-Oka et al., Int Immunol

- a 京都府立大学
b 早稲田大学
c 大阪大学
d 新潟大学
e 大阪市立大学
f 大阪健康安全基盤研究所

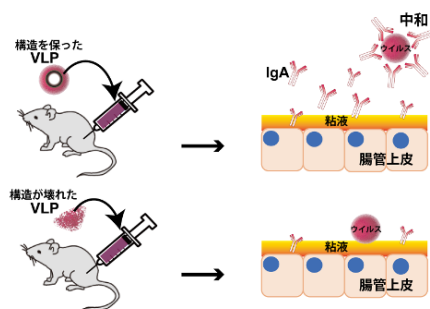
マクロファージの解糖系代謝転換は結核菌への宿主防御応答である

Immune-focusing properties of virus-like particles improve protective IgA responses

T. ONODERA^a, K. HASHI^a, R. SHUKLA^a, M. MIKI^b,
R. TODAKA^b, A. FUJIMOTO^b, M. KURAOKA^c,
T. MIYOSHI^d, K. KOBAYASHI^e, H. HASEGAWA^a,
M. ATO^a, G. KELSOE^c, K. KATAYAMA^b
and Y. TAKAHASHI^a

Journal of Immunology, 203, 3282-3292 (2019)

ノロウイルス感染症に対するワクチンとして、ノロウイルス様粒子 (VLP) ワクチンの臨床開発が進められているが、その有効性評価を可能とする免疫サロゲートは特定されていない。本研究では、ノロウイルス VLP ワクチンが惹起するヒト防御液性免疫を様々な免疫学的手法を駆使して解析した。その結果、ノロウイルス VLP ワクチンの粒子構造が、1) ヒト化マウスにおいてヒト免疫グロブリン A (IgA) 抗体を強く誘導すること、2) 誘導された IgA 抗体はノロウイルス抗原の特定領域 (P 領域) を優先的に認識することで高い中和活性を有すること、3) マウス感染モデルで IgA 抗体は高い防御活性を示すことを明らかにした。これらの結果は、ノロウイルス VLP ワクチンの新しい免疫学的特性を示すとともに、P 領域に対する IgA 抗体が免疫標的指標になる可能性を示唆している。



a 国立感染症研究所

b 北里大学

c Duke University

d 堺市衛生研究所

e 大阪健康安全基盤研究所

f 大阪大学

ウイルス粒子構造は防御能に優れた IgA 抗体応答を誘導する

FTA-Sodium hydroxide-based polymerase chain reaction (PCR): An efficient and cheaper option for *Theileria parva* detection in dairy cattle in Mbarara, Uganda

L. UCHIDA^a, J. BYARUHANGA^b, I. OKAMURA^a,
T. MIYAMA^{a,c}, Y. MURAMATSU^a, P. VUDRIKO^b
and K. MAKITA^a

Journal of Veterinary Medical Science, 18, 188-192 (2020)

東海岸熱は *Theileria parva* により引き起こされる牛のダニ媒介感染症で、酪農業に及ぼす経済的損害が問題視されている。本研究では、3 つの DNA 抽出法(DNA 抽出キット、FTA-NaOH、FTA-TENT)を比較し経済性、信頼性に優れた方法を検討した。また、ウガンダ共和国のムバララ県における *T. parva* の有病率について調査した。方法の比較検討は、シトクロム C オキシダーゼのサブユニット I(COI)及び *T. parva*-p104 遺伝子を増幅させ実施した。FTA-NaOH を用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出率が、COI、*T. parva*-p104 遺伝子共に最も高かった。動物単位の *T. parva* 有病率は 45.0%、農場単位では 83.3%であった。FTA-NaOH を用いた PCR は簡単、経済的かつ感度が高く資源の限られた環境において有用であることが示された。

a 酪農学園大学獣医学群

b マケレレ大学獣医学部

c 大阪健康安全基盤研究所 (現所属)

FTA-NaOH を用いたポリメラーゼ連鎖反応：ウガンダ共和国ムバララ県の乳牛の効率的で安価な *Theileria parva* の検出方法

The rate of underascertainment of novel coronavirus
(2019-nCoV) infection: estimation using Japanese
passengers data on evacuation flights

H. NISHIURA^{a, b}, T. KOBAYASHI^a, Y. YANG^a,
K. HAYASHI^a, T. MIYAMA^c, R. KINOSHITA^a,
NM. LINTON^a, SM. JUNG^a, B. YUAN^a, A. SUZUKI^a
and AR. AKHMETZHANOV^a

Journal of Clinical Medicine, 9, E419 (2020)

2020年1月29-30日、565人の日本国民が中華人民共和国の武漢市から3機のチャーター航空便により帰国した。日本到着時には、全ての乗客の症状と新型コロナウイルス感染の有無が確認された。平均のウイルス検出間隔を平均世代間隔(7.5日と推定)と仮定した場合、新型コロナウイルス感染が診断される率は9.2% (95%信頼区間: 5.0, 20.0) と推定された。この結果より、無症状キャリア、軽症例を含めた武漢市の新型コロナウイルス全感染者数は20,767と推定された。よって感染者全体の致死リスクは0.3-0.6%と推測され、1957-58年に大流行したアジアインフルエンザと同等と考えられる。

Communicating the risk of death from novel coronavirus
disease (COVID-19)

T. KOBAYASHI^a, SM. JUNG^a, NM. LINTON^a,
R. KINOSHITA^a, K. HAYASHI^a, T. MIYAMA^c,
A. ANZAI^a, Y. YANG^a, B. YUAN^a,
AR. AKHMETZHANOV^a, A. SUZUKI^a
and H. NISHIURA^{a, b}

Journal of Clinical Medicine, 9, E580 (2020)

疫学的に感染症の重症度を評価する際、致死リスクの推定がよく行われる。致死リスクは、感染者における死亡割合と定義される。しかし、このリスクを正しく評価するには、以下の3点について注意する必要がある。第1に、割り算で計算される値(累積死亡者数/累積感染者数)は本当のリスクを過小評価している。これは計算時にはまだ観察されていない死亡者数を含めていないためであり、より正確に推定するためには、発症から死亡までの遅れを考慮する必要がある。第2に、報告者数は、全感染者の一部でしかなく、実際には多くの無症状キャリアや軽症例が診断されずに潜んでいる。第3に、検出間隔を短く、また診断方法の感度を低く仮定することで診断バイアスと致死リスクは低く推定される。現在の新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の拡大下においては、上記3点に留意し、COVID-19の死亡リスクの不確実性を考慮した上で、リスクの高い集団を特定すべきである。COVID-19は、過半数の人においては軽い感染症であるが、若年成人の死亡リスクは季節性インフルエンザよりも高く、特に基礎疾患のある高齢者はより一層の注意が必要である。

a 北海道大学大学院医学研究院

b 科学技術振興機構 CREST

c 大阪健康安全基盤研究所

新型コロナウイルス感染が診断されない率：中華人民共和国武漢市から日本へ退避した航空便の乗客を用いた推定

a 北海道大学大学院医学研究院

b 科学技術振興機構 CREST

c 大阪健康安全基盤研究所

新型コロナウイルス感染症の死亡リスクについて

Assessing the impact of reduced travel on exportation dynamics of novel coronavirus infection (COVID-19)

A. ANZAI^a, T. KOBAYASHI^a, NM. LINTON^a,
R. KINOSHITA^a, K. HAYASHI^a, A. SUZUKI^a,
Y. YANG^a, SM. JUNG^a, T. MIYAMA^c,
AR. AKHMETZHANOV^a and H. NISHIURA^{a, b}

Journal of Clinical Medicine, 9, E601 (2020)

2020 年 1-2 月に、中華人民共和国では人の移動は急激に減少した。この効果を中国以外の新型コロナウイルス感染者の報告数を用いて定量化した。統計モデルを用いて以下の 3 つの指標を推定し、移動制限しないシナリオと比較した：(1) 輸出症例数、(2) 感染拡大が起こる確率、(3) 感染拡大までの時間。2020 年 1 月 28 日-2 月 7 日の期間において、226 人 (95%信頼区間: 86, 449) の輸出症例が抑制された。これは移動制限しないシナリオと比較して 70.4% の減少であった。日本における感染拡大確率は 7-20% 減少し、感染拡大を 2 日 (中央値) 遅らせた。シナリオによっては、感染拡大までの遅れは 1 日未満であった。流行拡大の遅れが限定的であったことから、人の移動制限は疫学的及び経済的影響のバランスを考慮すべきである。

a 北海道大学大学院医学研究院

b 科学技術振興機構 CREST

c 大阪健康安全基盤研究所

移動制限が輸出症例による新型コロナウイルス感染症の流行動態に及ぼす影響

WQ-3810: a new fluoroquinolone with a high potential against fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Y. OUCHI^a, T. MUKAI^b, K. KOIDE^a,
T. YAMAGUCHI^a, JH. PARKA^a, H. KIM^b,
K. YOKOYAMA^c, A. TAMARU^d, SV. GORDON^e,
C. NAKAJIMA^a and Y. SUZUKI^a

Tuberculosis (Edinb), 120, 101891 (2020)

結核菌 (*Mtb*) のフルオロキノロン (FQ) 耐性は DNA gyrase のアミノ酸置換によって引き起こされる。WQ-3810 は FQ 耐性病原体に対して高い活性を有する新規 FQ であるが、*Mtb* に対するその有用性は評価されていない。ここでは、組換え *Mtb* DNA gyrase を使用して、*Mtb* に対する WQ-3810 の有効性を調べた。さらに、DNA gyrase 遺伝子を耐性関与変異型に置き換えた組み換え BCG 株で WQ-3810 の *in vitro* での抗菌活性を調べた。WQ-3810 は、FQ 耐性変異を有するほとんどの組換え DNA ジャイレースに対して、レボフロキサシンよりも高い阻害活性を示した。さらに、WQ-3810 は、臨床 *Mtb* 分離株で FQ に対する高度耐性を付与する G88C 変異を含む DNA gyrase 変異体に対しても阻害を示した。対照的に、組み換え BCG 株を用いた FQ 感受性テストでは、WQ-3810 はモキシフロキサシンと比較して比較的弱い抗酸菌活性しか示さなかった。しかし、WQ-3810 とエタンブトールの組み合わせは最大の相乗効果を示した。FQ とエタンブトールは結核の多剤療法で併用されているため、WQ-3810 は FQ 耐性 *Mtb* 株に対しても有効な新しい強力な抗結核薬になる可能性がある。

a 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

b 国立感染症研究所

c キッセイ薬品工業株式会社中央研究所

d 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

e UCD School of Veterinary Medicine, University College Dublin

WQ-3810 : キノロン耐性結核菌治療に高い可能性を有する新しいフルオロキノロン

Mycobacterium triplex pulmonary disease in an immunocompetent host: a case report and literature review

M. SHIRATA^a, A. TAMARU^b, S. MARUMO^a
and M. FUKUI^a

IDCases, 18, e00648 (2019)

<https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00648>

マイコバクテリウムトリプレックス (*M. triplex*) は、重度の肺疾患を引き起こす可能性のある細菌種である。その臨床的重要性にもかかわらず、*M. triplex* 感染症の報告は稀である。ここでは、胸部 X 線およびコンピューター断層撮影スキャンで異常な所見を示した免疫不全でない患者の *M. triplex* 肺感染症のまれなケースを報告する。この患者では、起因菌は 16S rRNA および hsp65 遺伝子の DNA シーケンス分析により同定した。患者は適切な化学療法により治癒した。この症例と比較するため他の *M. triplex* 感染症の症例報告も検討した。

Genetic relatedness of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from bathrooms of healthy volunteers, rivers, and soils in Japan with human clinical isolates from different geographical areas

K. ARIKAWA^a, T. ICHIIRO^b, S. NAKAJIMA^a,
Y. NISHIUCHI^c, H. YANO^d, A. TAMARU^e,
S. YOSHIDA^f, F. MARUYAMA^g, A. OTA^g (他 5 名)

Infection, Genetics and Evolution, 74, 103923 (2019)

日本では、非結核性抗酸菌肺疾患の発生率が高いと報告されている (2014 年に 100,000 人あたり 14.7 人)。日本では、最も一般的な病因は *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) である。MAH は典型的な環境菌であり、特に浴室は潜在的な感染源と考えられている。この仮説を裏付けるために、健康なボランティアの浴室での MAH の検出率を通常の培養法で決定し、これらの分離株と患者や他のソースからの分離株の遺伝的関連性を分析した。

全国の 180 か所の住宅から、浴槽の入口、シャワーヘッド、浴室の排水口、シャワー水を綿棒で集めた。全体の MAH 検出率は 16.1%であったが、その率は地域によって異なり、関東 (9/34, 26.5%) および近畿 (9/33, 27.3%) で高く、九州 (0/11, 0%)、東北 (1/23, 4.3%)、北海道 (2/23, 8.7%) で低かった。MAH は主に浴槽の入口サンプルで検出された (170 の住居のうち 25)。

VNTR 型別を使用して、健康なボランティアの浴室からの MAH 株と患者や環境由来の MAH の遺伝的関連性を調べたところ、健康なボランティアの浴室からの分離株は、日本人患者、患者の浴室、および河川水からの分離株とは遺伝的関連性が高いが、ロシアの患者および日本豚由来株とは遺伝的関連性はないことを示した。これらの結果は、浴室が日本の MAH の重要な感染源の 1 つであることを示唆している。

a 北野病院呼吸器センター

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

マイコバクテリウムトリプレックスによる易感染性宿主の肺感染症；症例報告と文献レビュー

a 神戸市環境保健研究所 b 大阪大学 c 大阪市立大学

d 東北大学 e 大阪健康安全基盤研究所 f 近畿中央呼吸器センター g 京都大学

日本の健康なボランティアの浴室、河川、土壌から分離された *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* と異なる地理エリアでの臨床分離株との遺伝学的関連

High prevalence of colistin-resistant *Escherichia coli* with chromosomally carried *mcr-1* in healthy residents in Vietnam

T. YAMAGUCHI^a, R. KAWAHARA^a,
K. HAMAMOTO^b, I. HIRAI^b, D. T. KHONG^c,
T. N. NGUYEN^c, H. T. TRAN^c, D. MOTOOKA^d,
S. NAKAMURA^d and Y. YAMAMOTO^{e, f}

mSphere, 5(2), e00117-20 (2020)
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00117-20>

コリスチン耐性大腸菌の分布状況を解明するために、ベトナム人の糞便から分離されたコリスチン耐性大腸菌が保有するコリスチン耐性遺伝子 (*mcr*) の遺伝的背景を調べた。ハノイ郊外にある町の健康者 98 人から糞便の提供を受け、コリスチン耐性大腸菌 57 株を分離した。分離株のうち染色体上、プラスミド上および染色体とプラスミド両方に *mcr-1* を保有する割合は、それぞれ 36.8%、63.2%および 1.8%であった。14 株の分離株の全ゲノムシーケンシングを行ったところ、染色体上に *mcr-1* を保有する 7 株のうち 6 株では、染色体上の様々な位置に完全なトランスポゾン Tn6330 (*ISApII-mcr-1-PAP2-ISApII*) が挿入されていた。一方、*mcr-1* を保有するプラスミドを持つ 8 株のうち 7 株では、上流および下流の両方の *ISApII* が欠落していた。遺伝子構造の違いから、*mcr-1* のプラスミドから染色体への移行が、ごく最近に住民の中で起こった可能性が示唆された。染色体上の耐性遺伝子はより安定化すると考えられるため、今後のコリスチン耐性大腸菌の拡散に注意が必要である。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 琉球大学大学院保健学研究科

c タイビン医科薬科大学

d 大阪大学微生物研究所附属遺伝情報実験センター

e 大阪大学大学院薬学研究科

f 岐阜大学研究推進・社会連携機構科学研究基盤センタ

ー

ベトナム健康者の染色体性 *mcr-1* 保有コリスチン耐性大腸菌の高い保有率について

ウエルシュ菌による食中毒とその予防

余野木伸哉

感染制御と予防衛生, 3(2), 42-50 (2019)

ウエルシュ菌は芽胞を形成するグラム陽性の桿菌であり、食中毒の原因菌の一つである。本報ではウエルシュ菌による食中毒の予防のために、ウエルシュ菌とそれによる食中毒について近年の知見や事例をまとめ、これらについて考察した。

細菌性食中毒は一般的に夏季に多発するが、近年のウエルシュ菌による食中毒は冬季にも発生しており、通年の注意が必要である。また、これまでに知られていた原因毒素 *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE)に加えて、*Binary Enterotoxin of Clostridium perfringens* (BEC)も食中毒の原因になることが報告されている。さらに、カナマイシン低度耐性菌をはじめ、非定型ウエルシュ菌による食中毒事例も増加しており、検査の際はこれらのことを念頭に対応する必要がある。

一方で、ウエルシュ菌による食中毒の発生に、食品の不適切な保存が関与することは従来と変わらない。ウエルシュ菌による食中毒事件の発生数はこの 10 年間減少しておらず、食品の取り扱いについて改めて注意が必要である。

大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

Foodborne outbreaks caused by *Clostridium perfringens* and its prevention

Evolutionary analysis of the VP1 and RNA-dependent
RNA polymerase regions of human norovirus GII.P17-
GII.17 in 2013–2017

Y. MATSUSHIMA^a, F. MIZUKOSHI^b, N. SAKON^c,
(他 23 名)

Frontiers in Microbiology (2019)
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02189>

ノロウイルス GII.P17-GII.17 (Kawasaki 2014 variant) は 2014 年に出現し、世界中で胃腸炎の原因として報告されている。GII.P17-GII.17 の VP1 領域と RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 領域の両方の進化を明らかにするために、2013～2017 年に検出されたグローバルおよび新規の日本株の両方を分析した。進化系統解析の結果、祖先の GII.17 VP1 領域は 1949 年頃に分岐したのに対し、GII.P17 RdRp 領域は 2010 年頃に分岐した。同じクラスター内で VP1 の組織血液型抗原結合部位の周囲にアミノ酸置換が認められた。さらにいくつかのアミノ酸置換部位は RdRp の活性部位とモノマーの間にあることが推察された。GII.P17-GII.17 ウイルスが、過去 10 年間でウイルスの抗原性、宿主結合能力、および複製能力を変化させて変異株を作り出したことを示唆した。

新生児集中治療室 (NICU) における
ロタウイルス集団発生

左近直美^a, 本村和嗣^a, 井石倫弘^b, 塩見正司^b,
元岡大祐^c, 中村昇太^c

病原微生物検出情報 (IASR), 40, 109 (2019)

2018 年 3 月に NICU におけるロタウイルス A の集団感染 (3 名) が発生し、約 2 週間の間隔をあけて GCU (回復室) へのロタウイルスの伝播が確認された。これらの感染確認事例から NSP4 リアソータント G9P [8] が検出された。

ロタウイルスが検出された小児の症状は軽微であり、胃腸炎症状が認められず発熱のみであったケースや無症候も認められた。新生児におけるロタウイルス臨床像が典型的ではなく比較的軽症であるが、院内における伝播を防ぐために、症状の有無にかかわらずスクリーニング検査を行うこと、陰性化確認も必要と考えられた。また、ロタウイルスは分節型の RNA をゲノムとして有することからリアソータントを形成しやすい。本事例では NSP4 のリアソータントであることが早期に判明したことで、その後の検出例に 4 分節の遺伝子型、塩基配列の一致を確認することで、同一株による伝播であることを確認することができた。

^a 川崎市健康安全研究所

^b 栃木県保健環境センター

^c 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

2013 年から 2017 年に検出されたノロウイルス GII.P17-GII.17 の VP1 および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ領域の進化系統解析

^a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

^b 石井記念愛染園附属愛染橋病院小児科

^c 大阪大学微生物病研究所感染症メタゲノム分野

An outbreak of rotavirus at a neonatal intensive care unit (NICU) in Osaka

大阪府におけるロタウイルス検出状況

左近直美^a, 白井達哉^a, 本村和嗣^a, 西尾孝之^b,
田邊雅章^c, 吉田英樹^d, 山本 憲^e

病原微生物検出情報 (IASR), 40, 208-209 (2019)

大阪府において報告される小児科定点医療機関（小児科定点数 197:2019 年第 44 週現在）から報告される感染性胃腸炎患者報告数と、基幹病院（基幹病院定点数 17:2019 年 10 月 17 日現在）からのロタウイルス胃腸炎患者報告数について 2017 年第 1 週～2019 年第 44 週までを抽出した結果、基幹病院において報告されたロタウイルス胃腸炎患者報告数は 2017 年 237 人、2018 年 239 人、2019 年（第 44 週まで）376 人であり、2019 年の増加が確認された。また、感染症発生動向調査においても過去 5 年間で検出数が最も多く、G9 が 28 件（80%）検出され、本年の主要な遺伝子型となっていた。

我々は、2018 年 3 月の新生児集中治療室 (NICU) における集団発生の原因が G9 であり、11 分節の型別は NSP4 遺伝子が E2 である G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E2-H1 のモノリアソータントであったことを報告した。2019 年 4 月以降に検出した G9 20 株について VP7-VP4-VP6-NSP4 の遺伝子型別を実施した。3 株（15%）は G9-P[8]-I1-E1 であったが、17 株（85%）は G9-P[8]-I1-E2 であった。

2019 年は基幹病院から報告されるロタウイルス胃腸炎数および感染性胃腸炎検体からの検出数も増加し、ロタウイルスの流行が過去 2 年に比べて大きいことが明らかとなった。流行の主要な流行株は G9 であり、モノリアソータント株であることが考えられ、ロタウイルスサーベイランスに当たっては、11 分節の型別を実施する必要があると考えられた。

A measles outbreak from an index case with immunologically confirmed secondary vaccine failure

T. KURATA^a, D. KANBAYASHI^a, K. EGAWA^b,
M. KINOSHITA^c, H. YOSHIDA^d, M. MIYAZONO^e
and K. MOTOMURA^a

Vaccine, 38(6), 1467-1475 (2020)

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.11.075>

麻疹排除達成後、ワクチン接種歴が 2 回以上ある患者からの麻疹伝播はまれにはあるが、報告されている。それらの患者からの麻疹の伝播については、primary vaccine failure (PVF) と secondary vaccine failure (SVF) のどちらによるものか、ウイルス学および免疫学的な解析の報告はまだ少なく、十分な知見がなかった。2018 年 11 月から 12 月にかけて大阪府内で報告された麻疹アウトブレイク事例について、vaccine failure との関連を解析した。

本アウトブレイクでは 3 人の二次感染者、6 人の三次感染者を含む 10 人の患者が遺伝子検査で確定された。二次感染者を除き、全ての患者にワクチン接種歴があった。Index case と三次感染者はともに高い IgG 抗体価と avidity を示した。特に index case は顕著に高い中和抗体価 (425,590 mIU/mL) を呈し、免疫学的に SVF であると考えられた。本研究は、2 回のワクチン接種歴を有する SVF 患者からの麻疹の感染伝播を初めて証明した。麻疹排除を達成した国々における麻疹の伝播とアウトブレイク防止のためには、SVF の麻疹患者にも注意を払う必要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 大阪府感染症情報センター

c 大阪府健康医療部医療対策課

d 大阪市保健所

e 堺市衛生研究所

Description of rotavirus detection in Osaka

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

c 大阪府健康医療部医療対策課

d 大阪市保健所

e 寝屋川市保健所

免疫学的に 2 次性ワクチン不全の患者を初発とする麻疹アウトブレイク

An epidemic of hand, foot, and mouth disease caused by
Coxsackievirus A6 in Osaka city, Japan, in 2017

D. KANBAYASHI^a, A. KAIDA^a, Y. HIRAI^a,
SP. YAMAMOTO^a, R. FUJIMORI^b, M. OKADA^b,
H. KUBO^a and N. IRITANI^a

Japanese Journal of Infectious Diseases,
72(5), 334-336 (2019)
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.532>

2017 年の大阪市内における手足口病流行について解析し、コクサッキーウイルス A6 (CV-A6) が主要な原因ウイルスであることを明らかにした。手足口病は、風疹と同様に発疹性疾患である。1982 年の調査開始以来、大阪市内において 2 番目に大きい規模で手足口病が流行した。主要な原因ウイルスは CV-A6 であった。検出された CV-A6 の VP1 全長 (915nt) を用いた系統樹解析から、検出された CV-A6 は、genetic group A3 と A4 に分類された。

Ongoing rubella epidemic in Osaka, Japan in 2018–2019

D. KANBAYASHI^a, T. KURATA^a, H. KUBO^a,
A. KAIDA^a, SP. YAMAMOTO^a, K. EGAWA^a,
Y. HIRAI^a, K. OKADA^a, R. IKEMORI^a,
T. YUMISASHI^a, A. YAMAMOTO^b, H. YOSHIDA^c,
T. HIRAYAMA^d, K. IKUTA^a and K. MOTOMURA^a

Western Pacific Surveillance and Response,
11(1), 1-3 (2020)
<https://doi.org/10.5365/wpsar.2019.10.3.001>

2018 年から 2019 年にかけて日本国内で風しんが流行した。大阪府内で核酸検査により風しんが確定された 241 症例中、119 症例で遺伝子型を決定した。検出された風しんウイルスの遺伝子型は、遺伝子型 1E (118/119; 99.2%)、遺伝子型 2B (1/119 ; 0.8%) であった。遺伝子型 1E の風しんウイルスについて、系統樹解析したところ東南アジア、東アジア地域を中心に検出されている遺伝子型 1E-Lineage2 に分類された。2018 年の 34 週以降に検出された遺伝子型 1E の風しんウイルスの遺伝子配列は 99.2% から 100% の相同性を有していた。患者の疫学情報から、抗体保有率の低い成人男性が流行の中心であったことが明らかになった。よって、海外から風しんウイルスが持ち込まれ、国内の感受性集団の間で感染が拡大したと推測された。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部

b 大阪市保健所感染症対策課

2017 年の大阪市内におけるコクサッキーウイルス A6 による手足口病の流行について

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部

b 堺市衛生研究所長

c 大阪市保健所長

d 大阪府健康医療部保健医療室医療対策課

2018 年から 2019 年の大阪府内における風しんの流行について

Clonal expansion and spread of the ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain FC428 identified in Japan in 2015 and closely related isolates

K. LEE^a, S. NAKAYAMA^a, K. OSAWA^b,
H. YOSHIDA^c, S. ARAKAWA^d, K. FURUBAYASHI^e,
H. KAMEOKA^f, K. SHIMUTA^a, T. KAWAHATA^g,
M. UNEMO^h and M. OHNISHI^a

Journal of Antimicrobial Chemotherapy,
74(7), 1812-1819 (2019)
<https://doi.org/10.1093/jac/dkz129>

淋菌の薬剤耐性化が進む中、抗菌薬セフトリアキソンは淋病の単回療法に残された唯一の選択肢であるため、淋菌におけるセフトリアキソン耐性は重大な公衆衛生上の懸案となっている。

2015 年に大阪で分離されたセフトリアキソン耐性淋菌株 FC428 は、国内外に広がっている可能性がある。そこで我々は、FC428 および 2 つの子孫分離株の完全なゲノム全長について記述し、2015 から 2017 年の間に京都、大阪、兵庫で分離された 6 つのセフトリアキソン耐性淋菌分離株と、2017 年にオーストラリア、カナダ、デンマークで分離された 4 つのセフトリアキソン耐性淋菌分離株のゲノム疫学について検討した。

Bejel, a nonvenereal treponematoses, among men who have sex with men, Japan

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

Emerging Infectious Diseases, 25(8), 1581-1583 (2019)
<https://doi.org/10.3201/eid2508.181690>

5 例の梅毒症例から、風土病性トレポネーマ症の一つである「ベジェル」の病原体である *Treponema pallidum* subsp. *Endemicum* (TEN) を、日本を含めた東アジア・太平洋地域で初めて検出した。症例はすべて梅毒として診断されており、梅毒とベジェルは、梅毒診断に利用される抗体検査では区別出来ないため、国内には他にも梅毒として診断されているベジェル症例があると考えられる。また、患者が全て日本人の MSM であり、海外渡航歴のない者が含まれていることから、TEN の国内流行が強く示唆される。

a 国立感染症研究所細菌第一部

b 神戸大学大学院内科学教室感染症分野

c 神戸大学附属病院感染制御部

d 三田市民病院

e そねざき古林診療所

f 亀岡クリニック

g 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

h 淋病および他の STI の WHO 共同研究センター、エレブルー大学病院微生物部臨床検査科、スウェーデン

2015 年に日本で確認されたセフトリアキソン耐性淋菌株 FC428 のクローンの増殖と拡散

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 京都市立病院

d 国立病院機構名古屋医療センター

日本の MSM における非性病性トレポネーマ症であるベジェルの流行

Estimating HIV-1 incidence in Japan from the proportion of recent infections

S. MATSUOKA^a, M. NAGASHIMA^b,
K. SADAMASU^b, H. MORI^c, T. KAWAHATA^c,
S. ZAITSU^d, A. NAKAMURA^c, M. S. de SOUZA^a
and T. MATANO^a

Preventive Medicine Reports, 21(16), 100994 (2019)
<https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2019.100994>

2006年から2015年の東京、大阪、福岡の3つの都市において新たに診断されたHIV-1症例のうち、最近感染した症例かどうかの割合を、最近の感染かどうかを測定する検査の結果を用いて決定した。感染から診断までの平均期間は、東京、大阪、福岡でそれぞれ1.0年、1.8年、2.9年であった。HIV/AIDSサーベイランスデータからの逆算法による年間HIV-1発生率の推定では、2006年から2015年までの新規HIV-1感染の未診断の頻度は、東京で18%、大阪で22%、福岡で38%、日本全体では28%であった。

-
- a 国立感染症研究所エイズ研究センター
 - b 東京都健康安全研究センター微生物部
 - c 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
 - d 福岡市保健環境研究所
 - e 福岡県保健環境研究所

最近のHIV感染の割合から推定した日本におけるHIV発生率

病原体検出マニュアル「後天性免疫不全症候群」改訂の経緯

貞升健志^a，長島真美^a，吉村和久^a，川畑拓也^b，
佐野貴子^c，近藤真規子^c，松岡佐織^d，
草川 茂^d，立川 愛^d

病原微生物検出情報 (IASR), 40(10), 166-167 (2019)

2011年に作成された病原体検出マニュアル「エイズ/HIV感染症」では、HIVスクリーニング検査や確認検査法その他、様々な先端技術が多く掲載され、HIV調査研究のバイブルとも言えるマニュアルに仕上がっていたが、昨今、HIV陽性例の頻度が少ない地衛研ではHIV検査の知識や技術習得の機会が少なく、人事異動等でその引継ぎが難しいことといった実情があり、厚労科研で実施された精度管理でも、参加した地衛研間で結果判定にばらつきが見られた事が報告されている。また確認検査の外部委託が進み、現在確認検査を実施している地衛研は約70%との報告もある。

こうした中、神奈川県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、東京都健康安全研究センター、感染研を中心に、2018年10月に上記マニュアルが改訂・公開された。改訂版の趣旨として、原点である「HIV検査」に特化した内容となっており、HIV検査フローチャートに基づき、HIVスクリーニング検査、HIV確認検査およびHIV核酸増幅検査について詳細に記載された。

本マニュアルは2019年10月頃に再び改訂の予定であるが、抗体確認検査の項目に、確認検査試薬として新しく承認されたGeenius HIV1/2キットと従来のWB法が並列で記載されることが予定されている。

地衛研の責務の原点として、保健所のHIV検査を確実・正確・迅速に実施し、医療機関への受診へ確実につなげることこそが、エイズ終焉の実現に近づいていくものと思われる。

-
- a 東京都健康安全研究センター
 - b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課
 - c 神奈川県衛生研究所
 - d 国立感染症研究所エイズ研究センター

Revision of the laboratory manual for pathogen detection, “AIDS/HIV infection”

臨床的に梅毒と診断した日本人患者から分子疫学解析によって本邦で初めて検出された bejel の病原体 *Treponema pallidum* ssp. *endemicum*

川畑拓也^a, 阪野文哉^a, 小島洋子^a, 森 治代^a, 本村和嗣^a, 駒野 淳^b, 篠原 浩^c, 古林敬一^d

病原微生物検出情報 (IASR), 41(1), 4-5 (2020)

土病性トレポネーマ症には、yaws (いちご腫、熱帯フランベジア)、bejel (ベジェル)、Pinta (ピンタ、熱帯白斑性皮膚病) が知られており、それぞれ *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* (TPE)、ssp. *endemicum* (TEN)、*T. carateum* が原因菌である。我々は国内感染が強く疑われるベジェルの5例を東アジア・太平洋地域で初めて遺伝学的に確認したが、その後検出された2例を追加し、合わせて報告する。

我々は tp0548 遺伝子と tp0856 遺伝子の塩基配列を用いて系統樹解析を行い、これら7例が TEN の感染事例であり、ベジェルの国内初症例群と結論づけた。発症時期が 2014～2019 年とばらつきがあるものの、全員が日本人の MSM であること、海外渡航歴の無い患者が含まれること、渡航歴のある患者も渡航時期と病期が合致しないことから、全員が国内で感染したと推定される。

ベジェルは梅毒と同じ抗菌薬治療が奏功するが、今回検出した TEN は、23S rRNA 遺伝子領域の解析が不可能であった1事例を除き、すべての株にマクロライド系抗菌薬の耐性変異と考えられている 23S rRNA 遺伝子の A2058G 変異を保有していた。

今回、我々が TEN を初めて発見できたのは、梅毒トレポネーマ(TPA)の分子疫学研究を精力的に実施した成果と考える。

Prevalence and genetic characterization of cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* among dogs and cats in an animal shelter

K. UMEDA^a, A. HASE^a, M. MATSUO^b, T. HORIMOTO^b and J. OGASAWARA^a

Journal of Medical Microbiology, 68(3), 339-345 (2019)

薬剤耐性菌、特にセファロスポリン耐性菌の蔓延は、ヒトや動物の健康にとって大きな問題である。我々は、様々な背景を有する収容犬・猫におけるセファロスポリン耐性菌の保有状況を調査し、分離株の薬剤感受性試験や遺伝子型別等を行った。セファロスポリン耐性菌は、犬 151 頭中 22 頭 (14.6%) および猫 182 頭中 20 頭 (11.0%) から検出された。うち 21 頭は ESBL 産生菌、20 頭は AmpC 産生菌、1 頭は ESBL 産生菌と AmpC 産生菌を保有していた。検出されたβラクタマーゼ遺伝子は、国内のヒト患者、産業動物、環境等からよく検出される遺伝子を含んでいた。CTX-M-14 遺伝子 (n=9)、CIT 遺伝子 (n=9) が最も多く検出され、CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-8、CTX-M-15、CTX-M-24、CTX-M-27、CTX-M-55、DHA 遺伝子も検出された。PFGE 法、MLST 法等を用いた遺伝子型別により、検出された菌は高い遺伝学的多様性を有することが明らかになった。セファロスポリン耐性菌の保有と動物の個体情報との関連では、犬において性別および栄養状態との関連性が検出されたが、菌保有と人間との関わりの履歴の有無との間に相関はなかった。本研究では、大阪市内において、多様なタイプのセファロスポリン耐性菌が、様々な個体情報を持つ犬・猫の間に広く分布していることを明らかにした。伴侶動物は、ヒトとその他の由来の間における薬剤耐性菌の循環において橋渡しのような役割を担っている可能性が示された。

a 大阪健康安全基盤研究所

b 大阪薬科大学薬学部感染制御学教室

c 京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学

d そねざき古林診療所

Bejel's pathogen *Treponema pallidum* ssp. *endemicum* first detected in Japan by molecular epidemiology analysis from a Japanese patient clinically diagnosed with syphilis

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪市動物管理センター

収容されたイヌおよびネコにおけるセファロスポリン耐性腸内細菌科細菌群の分布と遺伝子解析

Prevalence and mechanisms of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among sheltered companion animals

K. UMEDA^a, A. HASE^a, A. FUKUDA^a,
M. MATSUO^b, T. HORIMOTO^b
and J. OGASAWARA^a

Access Microbiology, 2(1), 15-21 (2020)
<https://doi.org/10.1099/acmi.0.000077>

人や畜産動物、環境における耐性菌の循環を理解する上で、様々な生活背景を持つ収容動物のサーベイランスは有用なマーカーとなりうる。収容された犬・猫におけるフルオロキノロン耐性大腸菌の分布状況を明らかにするため、犬 38 頭と猫 78 頭のスクリーニング検査を行い、分離菌の耐性機序を調べた。フルオロキノロン耐性大腸菌は犬 18 頭 (47.4%)、猫 14 頭 (17.9%) から検出された。分離株は、染色体のキノロン耐性決定領域の *gyrA*、*parC*、および *parE* 遺伝子に 1~4 箇所の変異を持ち、これらの変異数とシプロフロキサシンの MIC 値との間に関連性が認められた。一方、プラスミド媒介性キノロン耐性遺伝子は、9 株が *aac*-(6')-Ib-cr 遺伝子、5 株が *qnrS* 遺伝子、1 株が *qnrB* 遺伝子を保有していた。これらの遺伝子の保有とシプロフロキサシンの MIC 値との間には関連性が認められなかった。動物の個体情報とフルオロキノロン耐性大腸菌保有率との関連性について統計学的に検討した結果、フルオロキノロン耐性大腸菌は、様々な生活背景を持つ犬・猫の間に広く分布していることが分かった。これは、国内においてフルオロキノロン耐性菌が人および畜産動物や環境から広く分離されることと関連する可能性がある。

Molecular characterization of *bla*_{KHM-1} encoding plasmid in an *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* isolate from blood culture

K. UMEDA^a, H. NAKAMURA^a, A. FUKUDA^a,
T. YAMAGUCHI^a, Y. MATSUMOTO^b,
D. MOTOOKA^b, S. NAKAMURA^b
and R. KAWAHARA^a

PLOS ONE, 15(1), e0227605 (2020)

KHM-1 型メタロ-β-ラクタマーゼは国内で 1997 年に分離された *Citrobacter freundii* KHM243 株より初めて報告されたが、その後の分離報告は少ない。大阪市内の医療機関において血液培養から KHM-1 産生 *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii* OIPH-N069 株が検出され、プラスミド比較解析等により遺伝学的特性を明らかにした。OIPH-N069 株は 4 つのプラスミドを保有し、*bla*_{KHM-1} は 136,816 bp の IncA/C₂ プラスミド pN069-1 上に存在した。ANI より *E. cloacae* complex の *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii* に菌種同定され、ST78 に分類された。OIPH-N069 株は *bla*_{KHM-1} 以外の薬剤耐性遺伝子を多数保有し、セフェム系以外の薬剤にも耐性を示す多剤耐性菌であった。接合伝達試験より pN069-1 は 2.9×10^{-7} の頻度で *E. coli* DH5α 株に伝達した。プラスミド比較解析より、pN069-1 は既報の KHM243 株 *bla*_{KHM-1} プラスミド pKHM-1 と、プラスミド骨格構造、インテグロンカセット、*bla*_{KHM-1} 塩基配列等が一致していた。一方、pN069-1 のみが *bla*_{CTX-M-2} を保有していた。KHM-1 産生株の分離年代や菌種が異なるにも関わらず *bla*_{KHM-1} プラスミドの構造はよく保存されていた。*bla*_{KHM-1} プラスミドは組換えや新たな耐性遺伝子の挿入を繰り返しながら複数の菌種に水平伝播している可能性が示唆された。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 大阪市動物管理センター

収容動物におけるフルオロキノロン耐性大腸菌の分布と耐性機序の解析

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部

b 大阪大学微生物病研究所

血液培養から分離されたカルバペネマーゼ KHM-1 産生 *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* の耐性プラスミド解析

Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus

I. TAKAYAMA^a, M. NAKAUCHI^a, H. TAKAHASHI^a,
K. OBA^b, S. SENBA^c, A. KAIDA^d, H. KUBO^d,
S. SAITO^a, S. NAGATA^a, T. ODAGIRI^a
and T. KAGEYAMA^a

Journal of Virological Methods, 267, 53-58 (2019)

インフルエンザウイルスおよびRSウイルスの感染初期における確定診断のツールとして、クエンチングプライマーを用いたリアルタイムRT-LAMP法による検査系を構築した。さらに、実際の臨床検体におけるその検出感度について、リアルタイムRT-PCR法との比較を行った。本検査系で得られる陽性例は検査開始後15分以内に検出可能であることから、実験室レベルはもちろんのこと、医療機関および検疫所においても有用であることが考えられた。

Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rhinovirus detection

M. NAKAUCHI^a, I. TAKAYAMA^a, H. TAKAHASHI^a,
S. SENBA^b, S. SAITO^a, H. KUBO^c, A. KAIDA^c,
K. OBA^d, S. NAGATA^a, T. ODAGIRI^a
and T. KAGEYAMA^a

Journal of Medical Virology, 91, 1232-1238 (2019)

ライノウイルスA・B型およびC型遺伝子をそれぞれ検出可能とする2系統のリアルタイムRT-LAMP法の開発を行った。さらに、実際のライノウイルス分離株および臨床検体を用いて、その特異性および感度に関する検証を行った結果、いずれも高い特異性をもつことおよび大半の野外流行株の検出が可能であることが明らかとなった。

a 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター

b 公立昭和病院小児科

c 栄研化学株式会社生物化学第二研究所第二部

d 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

クエンチングプライマーを用いたリアルタイムRT-LAMP法によるインフルエンザウイルスおよびRSウイルス検出系の開発

a 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター

b 栄研化学株式会社生物化学第二研究所第二部

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

d 公立昭和病院小児科

リアルタイムRT-LAMP法を用いたライノウイルス検出系の開発

同一患者臨床検体からの A および B 型インフルエンザウイルスの重複分離例

久保英幸

日本小児呼吸器学会雑誌, 30 (1), 10-17 (2019)

大阪市感染症発生動向調査事業の一環として、インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザウイルス (FluV) の分離・同定試験を毎年実施している。過去 5 インフルエンザシーズンのうち、2013/14、2015/16 および 2017/18 シーズンにおいては、A および B 型 FluV の混合流行が認められ、このうちの 2013/14 および 2015/16 シーズンにおいては、計 4 名のインフルエンザ患者の同一臨床検体から、A および B 型 FluV が重複して分離・同定された。FluV の混合流行が認められる場合には、A および B 型 FluV の重複感染例発生の可能性を考慮する必要があると考えられる。

金管楽器内で生育するカビの金属耐性

浜田信夫^a, 阿部仁一郎^b, 佐久間大輔^a

日本防菌防黴学会誌, 47(7), 265-271 (2019)

金管楽器では、*Purpureocillium* や *Fusarium* が多く見られるが、室内環境でよく見られる *Penicillium* などは少ない。金管楽器中のカビ相を制御する環境要因について研究した。楽器を長期間使用すると、*Purpureocillium* などが顕著に増加することが分かった。緑青が古い金管楽器に見られることから、金属イオンがカビの成長に影響する可能性が示唆されたので、金管楽器で多い 6 株のカビと、住環境から分離された 5 株のカビについて、金属耐性を比較した。その結果、*P. lilacinus*、*F. oxysporum* が室内環境の普通種より銅や亜鉛のイオンに対して耐性があった。また、金管楽器から分離したカビは、銀イオンに対しても耐性があった。一方、一般環境に多い第二鉄とアルミニウムのイオンは、金管楽器から分離したかどうかに関係なく、カビの成長を阻害した。金管楽器に多いカビは、銅、亜鉛、銀の各金属イオンの多い環境に適応していると考えられる。

大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

Co-isolation of influenza type A and B viruses from the same influenza patient specimen

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

Metal tolerance of fungi growing in brass instruments

Ochroconis species isolated from limestone areas as the origin of indoor *Ochroconis*

N. HAMADA^a and N. ABE^b

Biocontrol Science, 24(4), 193-200 (2019)

浴室で生育するカビは、合成洗剤の主成分である非イオン界面活性性を栄養にできる特性がある。この中で *Ochroconis humicola* は、0.25%の濃度の非イオン界面活性剤だけを添加した寒天培地で生育する。浴室のカビは元々野外に生育していたことは確かだが、何処でどんな環境で生育していたか？野外で生育していた *Ochroconis* 属のカビの中で、どのような特性を持った種や株が、ここ 50 年余りの間に住宅の水回りという環境下で優占種となったのかその解明を試みた。*Ochroconis* 属のカビがアルカリ性培地でよく生育することに着目し、伊吹山、秋吉台、東京都日原など、石灰岩帯の土壌から *Ochroconis* 属のカビの分離を試みた。一般の土壌とは異なって、石灰岩帯の土壌から多くの種類の *Ochroconis* 属のカビが検出された。いくつかの株は、非イオン界面活性剤だけを添加した寒天培地でも生育した。しかし、*O. humicola* は見つからなかった。そこで、室内の水回りでは温水をしばしば使うことから、必要な環境条件として温度の影響も考えて、暖地である沖縄の石灰岩帯まで調査地域を拡大した。その結果、*O. humicola* の野外での発見に至った。

詳細な問診と遺伝子解析により安全に駆虫し得た、ニュージーランドでの感染が疑われた無鉤条虫症の 1 例

森田涼^{a,b}，白野倫徳^a，木俣勲^b，馬場孝^c，
阿部仁一郎^c，中川裕太^a，福岡里紗^a，
山根和彦^a，小西啓司^a，麻岡大裕^a，中河秀憲^a，
笠松悠^{a,d}，後藤哲志^a，黒川克博^c，藤川康則^c，
金子明^a

Clinical Parasitology, 30(1), 40-42 (2019)

Taenia (テニア) 属条虫の駆虫にあたっては、自家感染の危険性がある有鉤条虫症か否かの見極めが重要である。詳細な問診と遺伝子解析により安全に駆虫し得た、ニュージーランドでの感染が疑われた無鉤条虫症の 1 例を経験した。

入浴時に、浴槽中に乳白色で長さ 2mm 程の短い紐状物体を発見。まもなく長さ 1m 程の乳白色の紐状物体が肛門から排出され、近医で寄生虫症と診断。元来生食が嫌いで国内外問わず十分に加熱した食品しか食べない。海外では特に注意を払っているが、ニュージーランドでは友人に強く勧められ内部の加熱が不十分なローストビーフを喫食した。虫体の排出経過から、無鉤条虫、アジア条虫が疑われたが、患者が持ち込んだ虫体標本は乾燥し形態学的評価が困難であったため、遺伝子解析を実施した。テニア科条虫を種鑑別するマルチプレックス PCR では無鉤条虫が陽性となり、増幅産物の相同性検索の結果からも無鉤条虫と同定された。人や物の往来が盛んな昨今、従来稀とされた感染症が発生、増加する可能性は高まっている。今後のニュージーランドでの無鉤条虫症の発生状況を注視するとともに、衛生的であるとされる国でも加熱不十分な牛肉の生食は避けるよう注意喚起が必要である。

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

室内に分布する *Ochroconis* は石灰岩地帯の *Ochroconis* に由来する

a 大阪市立総合医療センター感染症内科

b 大阪市立大学医学部寄生虫学

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

d 京都府立大学附属病院感染症科

e 大阪市立総合医療センター臨床研究センター

A case of *Taenia saginata* infection from New Zealand and safe treatment with careful medical interviewing and gene analysis

Molecular differentiation of five *Sarcocystis* species in sika deer (*Cervus nippon centralis*) in Japan based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (*cox1*) sequences

N. ABE^a, K. MATSUO^b, J. MORIBE^c,
Y. TAKASHIMA^c, T. BABA^a and B. GJERDE^d

Parasitology Research, 118(6), 1975-1979 (2019)

野生のシカに寄生する住肉胞子虫は、食中毒原因物質の一つと推測されている。シカ寄生種が多様であり、その形態学的特徴も乏しいことから、国内でのシカ寄生種の分類はこれまで不明であった。本研究では、18S rDNA による解析に供した岐阜県産野生シカに寄生する住肉胞子虫について、ミトコンドリア *cox1* 領域の遺伝子解析からその分類を試みた。その結果、遺伝的に異なる 5 タイプの存在が明らかとなり、うち 4 つのタイプは新種と考えられた。残りのタイプはリトアニアのニホンジカより近年新種として報告された *Sarcocystis pilosa* であった。住肉胞子虫の遺伝学的分類はこれまで、18S rDNA 領域の系統解析が用いられていたが、それによる分類には限界があり、形態学的近縁種間の鑑別には *cox1* 領域の解析が有用であることを明らかにした。

Morphological and molecular characteristics of seven *Sarcocystis* species from sika deer (*Cervus nippon centralis*) in Japan, including three new species

N. ABE^a, K. MATSUO^b, J. MORIBE^c,
Y. TAKASHIMA^c, T. IRIE^d, T. BABA^a and B. GJERDE^c

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 10, 252-262 (2019)

日本産野生シカに寄生する住肉胞子虫の種分類を明らかにするため、岐阜県産ホンシュウジカ 53 頭により由来する 220 個の住肉胞子について、形態学的、遺伝学的に解析を行った。住肉胞子壁の微細な形態を確認した後に、マルチプレックス PCR または PCR-シーケンス法により住肉胞子のタイプ分けを行った。その結果、220 個の住肉胞子は 7 つのタイプに分類され、タイプ 4 と 7 は各々海外のシカから報告のある *Sarcocystis pilosa*、*S. ovalis* であった。タイプ 1、3、5 は既知種とは遺伝学的に大きく異なり、各々を新種 *S. japonica*、*S. matsuoae*、*S. gjerdei* とした。タイプ 2 と 6 は各々既知種 *S. tarandi*、*S. taeniata* と形態学的、遺伝学的にも類似したが、*cox1* 領域の系統解析により両種は各既知種と異なるクラスターを形成したことから、両種を *S. cf. tarandi*、*S. cf. taeniata* とした。これら新種などの感染率は、調査したシカ 53 頭中次のとおりであった：*S. japonica* (94.3%、50/53)、*S. pilosa* (54.7%、29/53)、*S. cf. tarandi* (41.5%、22/53)、*S. gjerdei* (18.9%、10/53)、*S. matsuoae* (15.1%、8/53)、*S. cf. taeniata* (11.3%、6/53)、*S. ovalis* (1.9%、1/53)。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 岐阜県飛騨家畜衛生検査所

c 岐阜大学応用生物科学部

d ノルウェー生命科学大学

ニホンジカより検出された 5 種住肉胞子虫の *cox1* 遺伝子解析による相異

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 岐阜県飛騨家畜衛生検査所

c 岐阜大学応用生物科学部

d 北海道立衛生研究所感染症部

e ノルウェー生命科学大学

ニホンジカより検出された 3 つの新種を含む 7 種の住肉胞子虫の遺伝学的、形態学的特徴

Blowing in the wind: a unique aerial descent on a leaf in
a caterpillar

K. YAMAZAKI

Ecology, 100, e02779 (2019)

チョウ目幼虫が若齢期に風に乗って移動分散する例は知られているが、体重が増加した老熟幼虫では知られていなかった。今回、ヒメフサキバガ幼虫は、成熟すると寄主植物であるムクノキの葉に潜んで、風に乗って林床へと移動分散することを野外調査から明らかにした。老熟幼虫は林冠でまず葉先に糸をかけて葉折を作る。次に葉柄をあと少しで切れる寸前までかじる。その後、葉折に潜んで風を待ち、風が葉を揺らして葉柄が切断されると、風に乗って滑空し林床へと分散される。つまり、本種は葉をグライダーのように使用する。林床で幼虫は葉を食べ進み、やがてリターの間で蛹になった後に羽化する。幼虫の飼育から、林床活動性のヤドリバエに低い確率で寄生されるが、林冠での捕食寄生はあまり受けていないことが分かった。風による分散は、林冠での天敵を回避し、林床でも広い範囲に分散されることによりアリや捕食寄生者などの天敵の攻撃を減少させる意義があると考えられた。

Estimation of irradiation doses of raw beef liver samples
using 5,6-dihydrothymidine
as an irradiation markerT. FUJIWARA^a, N. FUKUI^a, Y. KITAGAWA^b,
K. KAJIMURA^c, H. OBANA^d, E. ISHIKAWA^e,
M. FURUTA^e and S. TAKATORI^f

ACS Omega, 4(7), 12325-12332 (2019)

食品の放射線照射（以下、照射）は、香辛料の品質保持や食肉の殺菌など、世界的に広く用いられている。一方国内では、馬鈴薯の発芽防止を例外として照射は禁止されているが、牛生レバー等への適用が期待されている。著者らは食品の照射履歴を検知する方法として、照射により DNA 中に生成する損傷ヌクレオシドである 5,6-ジヒドロチミジン (DHdThd) を指標とする方法を開発した。既に γ 線照射した牛生レバー試料に対する有用性を確認しており、本報告では、線源を電子線とした場合の適用性を検討した。その結果、線源を問わず DHdThd は照射特異的に生成し、検知指標とする DHdThd のチミジン (dThd) に対する比 (DHdThd/dThd) は線量依存的に上昇した。DHdThd/dThd は加熱および数カ月の冷凍保存に対して安定であった。さらに、作成した線量依存曲線から他の試料の照射線量を推定したところ、実際の線量に対する推定線量の比率は、0.74~1.30 と良好な範囲に収まった。

大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

風に吹かれて：チョウ目幼虫によるユニークな葉に乗った空中降下

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

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

d 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

e 大阪府立大学地域連携研究機構

f 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

5,6-ジヒドロチミジンを検知指標として牛生レバーの照射線量を推定する

Development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of the fungicide mepanipyrim and its metabolite

S. MIYAKE^{a, b, c}, Y. HIRAKAWA^{a, d},
T. YAMASAKI^{a, d, e}, E. WATANABE^f, A. HARADA^g,
K. ADACHI^{h, i}, S. IWASA^g and H. NARITA^d

Journal of Pesticide Science, 44(3), 156-161 (2019)

野菜中のアニリノピリミジン系殺菌剤メパニピリムの分析を目的に、直接競合 ELISA を開発した。メパニピリム、または、その代謝物の R1 位にカルボン酸を導入した 2 種類の誘導体を合成し、スカシ貝ヘモシアニンと結合させ Balb/c マウスに免疫、抗メパニピリムモノクローナル抗体 MPP107 と MPP204 を調製した。MPP107 を用いた直接競合 ELISA はメパニピリムと 0.12-1.8 ng/mL、MPP204 を用いた直接競合 ELISA はメパニピリムと 0.12-2.4 ng/mL、メパニピリムプロパノール体と 0.2-5.7 ng/mL の測定範囲で反応した。これらは、いずれも日本の野菜や果物の残留基準値 1~15 mg/kg を検出するのに十分な感度だった。添加回収実験や HPLC との相関性試験の結果は、直接競合 ELISA が野菜中に残留するメパニピリムとそのプロパノール体の検出に適用できることを示した。

Immunoassay for highly water-soluble nitenpyram: evaluating the analytical performance of an easy-to-use screening method for agricultural samples

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

Analytical Letters, 53(2), 174-187 (2020)

ネオニコチノイド系殺虫剤のニテンピラムは親水性が高い。農産物中のニテンピラムを分析するため、酵素免疫測定法 (ELISA) による、有機溶媒を使用しない簡易で迅速な分析法を構築した。ニテンピラムに対して特異的なモノクローナル抗体を利用した。ELISA の競合反応時、有機溶媒を用いなかった場合の I_{50} 値は 4.8 ng/mL であり、5%メタノールを使用した場合の I_{50} 値: 12 ng/mL より 2.5 倍高感度であった。4 種類の野菜 (ピーマン、ナス、キュウリ、トマト) から水によりニテンピラムを抽出し、さらに水で希釈することで抽出液のマトリクス効果を減少させた。抽出溶媒、操作を①水、手で振とう 3 分、又は②アセトニトリル、ブレンダー 3 分、により得られた抽出液を ELISA で測定し比較した結果、一般的な②による抽出に比べて①による抽出でも、十分に用いた野菜類からニテンピラムを抽出できた。添加回収試験の結果は 88~108%、RSD は 3~9%と良好であった。農薬を散布した野菜を分析した結果、HPLC による分析値と高い相関性を示した。

a 京都高度技術研究所

b 堀場製作所

c 麻布大学 (現所属)

d 京都女子大学

e 大阪健康安全基盤研究所食品化学 1 課 (現所属)

f 農研機構農業環境変動研究センター

g 豊橋技術科学大学

h 科学技術交流財団

i iBody 株式会社 (現所属)

殺菌剤メパニピリムとその主要代謝物の分析のための直接競合 ELISA の開発

a 農研機構農業環境変動研究センター

b 京都高度技術研究所

c 京都女子大学

d 大阪健康安全基盤研究所食品化学 1 課 (現所属)

e 豊橋技術科学大学

f 堀場製作所

g 麻布大学 (現所属)

親水性農薬ニテンピラムのイムノアッセイ: 農作物を対象とした簡便なスクリーニング法としての評価

Simultaneous detection of six different types of pesticides by an immunosensor based on surface plasmon resonance

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

Analytical Sciences, 36(3), 335-340 (2020)

表面プラズモン共鳴を利用したイムノセンサを構築し、農薬6種類（アゾキシストロビン、ボスカリド、クロルフェナピル、イマザリル、イソキサチオン、およびニテンピラム）の同時定量に成功した。各農薬の構造に特異的に反応するモノクローナル抗体6種類をセンサチップに固相化し同時定量に用いた。各農薬の測定範囲は、アゾキシストロビン:3.5~19 ng/mL、ボスカリド:4.5~50 ng/mL、クロルフェナピル:2.5~25 ng/mL、イマザリル:5.5~50 ng/mL、イソキサチオン:3.5~50 ng/mL、ニテンピラム:8.5~110 ng/mLであり、各抗体は対応する農薬にのみ反応した。トマトを用いた添加回収試験の結果、回収率は、アゾキシストロビン:104~116%、ボスカリド:94~101%、クロルフェナピル:90~112%、イマザリル:96~106%、イソキサチオン:107~119%、ニテンピラム:104~109%だった。農薬を散布した野菜または、抽出時に農薬を添加したサンプルを分析した結果、HPLCによる分析値と高い相関性を示した。本イムノセンサは、野菜の残留農薬分析に高い適用性を示した。

Development of an LC-MS/MS-based analytical method for quantification of soybean allergen Gly m 4 in soybean grains and processed foods

M. YOSHIMITSU^a, K. KIYOTA^b,
K. KAJIMURA^b and T. YAMANO^c

Food and Agricultural Immunology, 30(1), 25-33 (2019)

大豆アレルゲン Gly m 4 は花粉-食物アレルギー症候群の原因となるアレルゲンである。しかし、利用可能な分析法がなく、食品中での実態が不明である。そこで、我々はLC-MS/MSを用いた Gly m 4 分析法を開発した。リコンビナント Gly m 4 を用いて分析法の性能を評価した結果、大豆穀粒での添加回収率は 128%で、併行精度は 12.8%、室内精度は 13.2%、定量下限値は 0.1 µg/g であった。本法を用いて食品中の Gly m 4 を分析したところ、大豆穀粒で 309-421 µg/g、大豆加工品で 2.7-67 µg/g であった。本法は食品中の Gly m 4 分析法として十分な性能を有しており、食品に含まれる Gly m 4 濃度を明らかにすることで、Gly m 4 アレルギー患者の、食品からの Gly m 4 摂取量を制御するための情報を提供できると考えられた。

a 京都高度技術研究所

b 堀場製作所

c 麻布大学（現所属）

d 京都女子大学

e 大阪健康安全基盤研究所食品化学1課（現所属）

f 農研機構農業環境変動研究センター

g 豊橋技術科学大学

表面プラズモン共鳴を利用したイムノセンサによる農薬6種類の同時定量

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衛生化学部医薬品課

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

LC-MS/MSを用いた大豆穀粒および大豆加工品に含まれる大豆アレルゲン Gly m 4 分析法の開発

ボウルの材質 3 種類における
小麦アレルギー残留性の比較

橋本博行^a, 吉光真人^b, 清田恭平^c

日本家政学会誌, 70(11), 756-761 (2019)

調理器具における食物アレルギーの残留性については依然として不明な点が多い。本研究では、学校給食の調理器具として一般的なボウル、および小麦アレルギーに着目した。ボウルには、材質が異なるガラス、ステンレス、ポリプロピレンの 3 種類を選択し、材質間の小麦アレルギーの残留性を比較調査した。小麦粉と水で調製したバター液をボウルに付着させ、水洗、スポンジ洗剤洗浄、すすぎ操作を行い、その残留物を拭き取った。同一の拭き取り液をイムノクロマト法と ELISA 法に供し、残留性を評価した。小麦アレルギーは、スポンジ洗剤洗浄後も約 50%の陽性率で残留し、ボウル材質間において残留性に差異はなかった。このことは、調理現場における小麦アレルギーの衛生管理上の注意点であると考えられる。

放射線損傷ヌクレオシドである
ジヒドロチミジンを指標として
照射食品を検知する

高取 聡^a, 福井直樹^b, 藤原拓也^b,
北川陽子^c, 梶村計志^d, 石川悦子^e, 古田雅一^e

放射線と産業, 146, 30-31 (2019)

食品の放射線照射（以下、照射）を適正に管理するためには、照射履歴の検知法が必要である。その検知法の適否は、対象食品に含まれる成分によって制約を受ける。このため食品により、いくつかの検知法が使い分けられているが、牛生レバーのように、現状では相応しい検知法がない食品もある。

著者らは、照射によって食品中の DNA に生じるジヒドロチミジン（DHdThd）を検知指標とする新たな照射食品の検知法を開発した。DNA は、食品に普遍的に含まれる成分であり、これが照射されることによって生じる DHdThd は、様々な食品に適用できる検知指標となると期待される。

食肉・魚介類等の動物性食品およびトウガラシ等の植物性食品において、本法の適用に必要な DNA 量を抽出できる方法をそれぞれ確立した。次いで抽出した DNA を酵素分解して得られる試験液中の DHdThd をタンデム型質量分析計/高速液体クロマトグラフを用いて分析した。DHdThd は照射特異的かつ線量依存的に生成することが、各食品で認められた。

本法は、動物性食品および植物性食品の双方に広く適用できる新たな照射食品の検知法になることが期待される。

a 三重短期大学

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

Comparison of residual wheat allergen in three types of bowl material

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

c 大阪健康安全基盤研究所企画部研究企画課

d 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

e 大阪府立大学地域連携研究機構

Detection of food irradiation history by measuring of 5,6-dihydro-2'-deoxythymidine

地方衛生・環境研究所の沿革と役割

新矢将尚

水環境学会誌, 43A(2), 40-44 (2020)

地方環境研究所は、地方衛生研究所に端を発して公害対策の試験研究機関として発足し、環境問題に対応する機関として存続している。全国に存在する地方衛生研究所および地方環境研究所を紹介し、機関ごとに分離・統合などの沿革について示した。また、近現代の衛生概念から拡張された環境思想に基づき、人の生活環境を科学的に検証することが地環境研の大きな役割になっており、地域や住民とのかかわりが重要であることを述べた。次に、地方環境研究所の主要な業務である環境モニタリングについて、大阪市のフィールドを中心とした調査研究事例を紹介しながら、モニタリングの継続による行政施策との関連性や、地域特性を踏まえた独創的なモニタリング、市民協働の重要性について述べた。最後に、今後の展望と課題について考えを示した。

ヘッドスペース-GC/MS による食品用ラミネートフィルム中の残留有機溶剤の分析

尾崎麻子^a, 岸 映里^a, 大嶋智子^a, 角谷直哉^a,
阿部 裕^b, 六鹿元雄^b, 山野哲夫^a

食品衛生学雑誌, 60(4), 73-81 (2019)

ラミネートフィルムは、接着剤や印刷用インキなどに由来する有機溶剤を含有することがある。そこで、ヘッドスペース-GC/MS を用いて、これらの溶剤として使用される可能性のあるトルエン、キシレン、アセトン、メチルエチルケトン、酢酸エチル、酢酸ブチル、メタノール、エタノールなど 30 物質の有機溶剤の一斉分析法を確立した。本法は、試料に内標準物質を含む *N, N*-ジメチルホルムアミド溶液を加えて室温で一晩静置後、気相を GC/MS により測定する方法であり、さまざまな材質からなるラミネートフィルムに適用が可能であった。本法を用いて、市販のラミネートフィルム製の食品包装袋 42 試料について測定した結果、6 試料からトルエン、酢酸エチルやヘプタンなどが検出された。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課
History and roles of the local institutes of public health and
environmental studies

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

b 国立医薬品食品衛生研究所

Headspace GC/MS analysis of residual solvents in laminated
films used for food packaging

食品用器具・容器包装の規制をめぐる最新の動向

尾崎麻子

科学と工業, 93, 172-179 (2019)

我々の生活において、コップ、鍋、ラップフィルム、トレイ、ペットボトル、手袋など、様々な器具・容器包装が使用されている。これらに含まれる化学物質が食品に移行して健康を害することがないように、食品衛生法において規格基準が設けられている。

本解説では、器具・容器包装とは何か、また、食品衛生上どのような問題が生じる可能性があるのか、さらに、2020年にポジティブリスト制度が導入され、規制が大幅に強化される見込みであることから、その最新動向について紹介する。

Microplastics contamination in tidelands of the Osaka Bay area in western Japan

S. NAKAO^a, A. OZAKI^b, K. YAMAZAKI^c,
K. MASUMOTO^a, T. NAKATANI^b and T. SAKIYAMA^a

Water and Environment Journal (2019)

<https://doi.org/10.1111/wej.12541>

近年、環境中のマイクロプラスチック汚染の実態が調査されている。しかし、干潟などの生物多様性の高い環境での汚染は十分に調べられていないのが現状である。よって、我々はマイクロプラスチックの汚染レベルを評価するために、大阪湾の干潟において都市部と郊外部の流域をモデルとして調査を実施した。大阪湾の4つの干潟の泥に含まれるマイクロプラスチックのレベルを定量化し、さらに淀川下流部の河口干潟の3種の生物、二枚貝(*Corbicula japonica*)、カニ(*Chiromantes dehaani*)およびカモ(*Aythya fuligula*)からマイクロプラスチックを検出した。マイクロプラスチックのサイズは300 μm から5 mmを対象とした。その結果、泥中のマイクロプラスチックの濃度は、人口密度が高いほど高まる傾向があることが示された。マイクロプラスチック検出率は二枚貝10% (n=30) とカニ6.7% (n=30) であり、8つのマイクロプラスチックが1羽のカモの胃から検出された。これにより、都市部に近い干潟の泥ほど、より多くのマイクロプラスチックが含まれていることが示され、また、高次捕食者の方がマイクロプラスチックの汚染レベルが高いことが示唆された。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学2課

Latest trends in the regulation of food equipment, containers and packaging

a 大阪市立環境科学研究センター

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学2課

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部微生物課

大阪湾圏域の干潟におけるマイクロプラスチック汚染

Concentrations of total mercury and methylmercury in red snow crabs (*Chionoecetes japonicus*) caught off the coast of Japan

S. KAKIMOTO^a, M. YOSHIMITSU^b, K. AKUTSU^b,
K. KIYOTA^c, T. FUJIWARA^b, T. WATANABE^d,
K. KAJIMURA^e and T. YAMANO^e

Marine Pollution Bulletin, 145, 1-4 (2019)

我が国の妥当性ガイドラインを満たした分析法で、日本近海の生ベニズワイガニのメチル水銀濃度および総水銀濃度を調査した。また、茹でたベニズワイガニの総水銀濃度を調査した。生ベニズワイガニ中の総水銀濃度およびメチル水銀濃度との関係を検証した結果、ベニズワイガニでは水銀は概ねメチル水銀の形態で蓄積されていることがわかった。また、カニの重量に対する総水銀濃度、およびメチル水銀濃度に相関があることがわかった。生ベニズワイガニおよび茹でたベニズワイガニの総水銀濃度は同程度であった。ベニズワイガニによる日本人の一般的なメチル水銀摂取量は耐容一週間摂取量の約 1/6 程度で、ただちに問題となる量ではないと考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所企画部精度管理室

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

d 国立医薬品食品衛生研究所

e 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

日本近海で漁獲されたベニズワイガニ中の総水銀とメチル水銀濃度

質量分析計を用いた農産物中残留農薬試験法

宮本伊織

質量分析計, 67, 65-70 (2019)

食品中の残留農薬は、1947 年に制定された食品衛生法により規制が行われ、適用される試験法は 1969 年に公示された。当時の試験法は、電子捕獲型検出器、炎光光度型検出器などを備えたガスクロマトグラフ (GC)、紫外可視吸光光度検出器、蛍光検出器などを備えた液体クロマトグラフ (LC) が用いられた。その後、質量分析計 (MS) が発達し、GC-MS、LC-MS が開発されるようになった。

食品中の農薬等の規制にポジティブリスト制度が導入され、数百種類の農薬を試験可能な多成分一斉試験法が通知された。

通知一斉試験法は、アセトニトリルを用いて抽出を行い、塩析、pH 調整し、グラファイトカーボンやイオン交換樹脂を固相としたカラムを用いて精製を行うものである。測定は GC-MS (MS) および LC-MS (MS) を用いることで、数百種類におよぶ農薬を測定することが可能である。国際的には、迅速試験法として QuEChERS 法が開発され、AOAC などで公定法として採用された。国内でも小型の固相カラムと組み合わせた試験法が開発され、実用化されている。

近年では、汎用性の高い飛行時間型 (TOFMS) やフーリエ変換型の高分解能質量分析計が開発され、メタボロームのスクリーニング解析、環境汚染物質の網羅的分析の定量などに利用されている。TOFMS は、夾雑成分との分離が良好であり、また多成分測定時における複雑なトランジション条件を検討する必要がなく、測定条件の開発が短時間で行える。このため、基準値への適合性を判断する残留試験だけではなく、農薬等の意図的な混入などによる健康危機事案にも迅速に対応できることが期待され、今後、その必要性は高くなっていくものと考えられる。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

Determination of pesticide residue in agricultural products using mass spectrometer

Mechanisms of aggregation and fibril formation of the amyloidogenic N-terminal fragment of apolipoprotein A-I

C. MIZUGUCHI^{a,b}, M. NAKAGAWA^a, N. NAMBA^a,
M. SAKAI^a, N. KURIMITSU^a, A. SUZUKI^a,
K. FUJITA^a, S. HORIUCHI^a, T. BABA^c, T. OHGITA^a,
K. NISHITSUJI^d and H. SAITO^a

The Journal of Biological Chemistry,
294(36), 13515-13524 (2019)

HDL タンパク質アポ A-I は、Iowa (G26R) 型変異により N 末側 1-83 残基フラグメントがアミロイド線維として組織に沈着することが知られている。そのアミノ酸配列中、14-22 残基および 50-58 残基領域の線維形成性が高いと予測されているが、アポ A-I アミロイド線維形成における各領域の役割は明らかではない。本研究では、線維形成領域欠損変異体および部位特異的蛍光標識を用いることにより、アポ A-I アミロイド線維形成機構の解明を目指した。

欠損変異体を用いた評価の結果、14-22 残基の欠損は Iowa 変異型アポ A-I の線維形成を著しく阻害する一方、50-58 残基の欠損は線維核形成および線維伸長速度を抑制するものの線維形成性を維持した。つまり 50-58 残基領域は線維核形成に、14-22 残基領域は線維伸長過程に重要な領域であることが示された。さらに、部位特異的 pyrene 蛍光標識により、N 末端及び C 末端領域は線維構造に寄与していないことが示された。生体膜環境下でのアミロイド線維形成性の評価を行ったところ、Iowa 変異型アポ A-I の脂質膜上での線維形成においては 14-22 残基領域のみが必要であることが示された。

本研究により、Iowa 変異型アポ A-I アミロイド線維形成における各線維形成領域の詳細な役割が明らかとなり、線維形成機構解明につながる知見を得た。

a 京都薬科大学薬品物理化学分野

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

c 産業技術総合研究所創薬基盤研究部門

d 和歌山県立医科大学大学生化学講座

アポ A-I N 末フラグメントのアミロイド線維形成機構の解明

Two-step FRET as a tool for probing the amyloid state of proteins

G. GORBENKO^a, V. TRUSOVA^a,
T. DELIGEORGIEV^b, N. GADJEV^b,
C. MIZUGUCHI^{c,d} and H. SAITO^c

Journal of Molecular Liquids, 294(15), 111675 (2019)

β シート構造を特徴とするタンパク質凝集体であるアミロイド線維は、多くの疾患に関与することが知られている。アミロイド凝集の検出と構造特性評価には蛍光をベースとした技術が必要不可欠である。本研究では、ベンゾチアゾール色素チオフラビン T (ThT)、ホスホニウム色素 TDV、および、スクアライン色素 SQ1 の 3 つの発色団を用いた二段階蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によるアミロイド検出法の確立を目指した。

ThT はアミロイド線維に結合して蛍光を発することから、線維形成性が異なるアポ A-I N 末フラグメントおよび Iowa (G26R) 変異型アポ A-I N 末フラグメントを、エネルギー転移のカスケード反応 ThT→TDV→SQ1 の足場として用いた。二段階 FRET 測定を行った結果、ThT-TDV 間および TDV-SQ1 間での FRET 効率は、アミロイド線維形成性と相関することが分かった。

二段階 FRET は従来の一段階 FRET と比較して、大きなストークスシフトがあり、解像度の高い 3D 蛍光パターンと高いアミロイド検出感度を得られる等、大きな利点があることが実証された。

a V. N. Karazin Kharkiv National University

b Sofia University

c 京都薬科大学薬品物理化学分野

d 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課
二段階 FRET 法によるアミロイド形成の評価

Phosphatidylethanolamine accelerates aggregation of the amyloidogenic N-terminal fragment of apoA-I

N. KURIMITSU^a, C. MIZUGUCHI^{a,b}, K. FUJITA^a,
S. TAGUCHI^c, T. OHGITA^a, K. NISHITSUJI^d,
T. SHIMANOUCI^c and H. SAITO^a

FEBS Letters, 594(9), 1443-1452 (2020)

脂質膜組成は、多くのアミロイド形成タンパク質の凝集および原線維形成に影響を与えることが知られている。本研究では、ホスファチジルエタノールアミン (PE) が、脂質膜上における Iowa (G26R) 変異型アポ A-I N 末フラグメントのアミロイド線維形成に与える影響について評価を行った。

円偏光二色性測定および等温滴定型カロリメトリから、PE は Iowa 変異型アポ A-I の α ヘリックス形成性および脂質結合特性に影響を与えなかった。一方で、*prodan* および *laurdan* 蛍光により脂質膜環境を評価すると、PE は脂質膜界面およびアシル鎖領域をより密で秩序だったパッキング状態とすることが分かった。また、部位特異的蛍光標識により、アポ A-I の線維形成領域である 14-22 残基領域が、PE の存在によってより疎水的な環境となっていることが示された。これらの結果は、PE がアポ A-I N 末フラグメントの線維形成領域に疎水的な環境を提供することによって、凝集を促進することを示唆する。

Reduction of orange allergen Cit s 2 levels in fresh orange juice with pineapple bromelain enzymatic treatment

K. KIYOTA^a, M. YOSHIMITSU^b, K. KAJIMURA^a,
and T. YAMANO^c

Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), 61(1), 17-21 (2020)

オレンジアレルギーの発症防止には、アレルギーの摂取リスクを抑えることが重要である。オレンジジュースとの組合せで嗜好性のよいパイナップルは、タンパク質分解酵素を含んでいる。そこで我々は、このパイナップル由来酵素を利用して、オレンジアレルギーの分解を試みた。その評価には、著者の既報の ELISA 法を用いた。生鮮オレンジ果汁に対して、1/40 量の生鮮パイナップル果汁を加え 37°C 30 分間処理したところ、オレンジアレルギー濃度が 15%未満に減少した。今後、臨床的検証がさらに必要であるが、パイナップル由来酵素処理は、オレンジアレルギー含有量の低減化に役立つことが示唆された。

^a 京都薬科大学薬品物理化学分野

^b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

^c 岡山大学大学院環境生命科学研究科

^d 和歌山県立医科大学大学生化学講座

ホスファチジルエタノールアミンはアポ A-I N 末フラグメントのアミロイド線維形成を促進する

^a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

^b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

^c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

パイナップル由来酵素処理によるオレンジアレルギー Cit s 2 濃度の減少

女貞子について：

HPLC によるオレアノール酸及びウルソール酸分析法の検討と市場品及び採取調製品の分析

西尾雅世^b, 有本恵子^b, 石原理恵^b,
伊藤美千穂^b, 居村克弥^b, 岡坂 衛^b,
河端昭子^b, 酒井英二^b, 嶋田康男^b,
高井善孝^b, 田上貴臣^{ab}, 十倉佳代子^b,
野村涼坪^b, 松田久司^b, 松本卓也^b,
山本 豊^b, 横倉胤夫^b, 吉川正人^b

生薬学雑誌, 73(2), 55-67 (2019)

女貞子の主要成分としては、トリテルペノイドであるオレアノール酸、ウルソール酸の他、マンニトール、脂肪酸などが知られている。なかでもオレアノール酸については、強心・利尿作用が知られている他、近年の研究では肝臓保護作用、抗腫瘍作用など種々の生理活性について報告がある。オレアノール酸は多くの植物の葉や果実に含まれているが、そのなかでも女貞子は含有量が高いことが報告されている。そこで我々は、女貞子のオレアノール酸及びウルソール酸の分析法を検討した。

直線性、特異性、併行精度、室間再現精度について検証した結果、良好な結果が得られ、女貞子のウルソール酸及びオレアノール酸の定量法として有効な分析法を確立した。また、当該分析法を用いて女貞子市場品を分析した結果、各成分の含量は、ウルソール酸 $0.357 \pm 0.138\%$ (MEAN $\pm$ SD)、オレアノール酸 $0.978 \pm 0.139\%$ であった。また、経年による含量変化は認められなかった。

Rapid quantification of *Escherichia coli* in potable water by fluorescence in situ hybridization performed in liquid (liq-FISH) and a microfluidic system

N. YAMAGUCHI^a and S. GOTO^b

Water, Air, & Soil Pollution, 230, 285 (2019)

飲用水の衛生微生物学的な安全性を確保するためには、危害細菌の特異的かつ迅速・簡便なモニタリング方法が必要である。蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法は、蛍光標識した核酸プローブを菌体内の rRNA にハイブリダイズさせることにより、細菌を培養することなく特異的に検出する方法であり、様々な危害細菌に適応することができる。しかしながら、一般的な FISH 法では、ろ過やフィルター上での煩雑な操作を伴うことが課題となっている。そこで、本研究では、煩雑な操作無く FISH を行うための溶液中 FISH (liq-FISH) 法を開発するとともに、溶液中の細菌を直接検出できるマイクロ流路システムを用いて、簡便に大腸菌数を測定するための系を検討した。

大腸菌および他の細菌標準株試料に対し、固定液と蛍光プローブを含むハイブリダイゼーション溶液を加え、最適化した条件でハイブリダイズさせた後、蛍光顕微鏡で観察したところ、大腸菌のみがプローブ由来の蛍光を発することを確認した。次に、溶液中 FISH を行った試料について、マイクロ流路システムにより大腸菌数を測定したところ、蛍光顕微鏡と同等の値が得られた。溶液中 FISH 法とマイクロ流路システムを用いて飲用水中の大腸菌数を測定するために要する時間は 5 時間以内であり、従来法と比べて迅速かつ簡便に大腸菌数を測定できた。

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 LIGUSTRI FRUCTU

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪大学大学院薬学研究科衛生・微生物学分野

溶液中 FISH (liq-FISH) 法の開発およびマイクロ流路システムによる飲用水中の大腸菌の迅速定量

Investigations on contamination of environmental water samples by *Legionella* using real-time quantitative PCR combined with amoebic co-culturing

A. EDAGAWA^a, A. KIMURA^a and H. MIYAMOTO^b

Biocontrol Science, 24(4), 213-220 (2019)

レジオネラ属菌（以下、レジオネラ）がアメーバ内で増殖することを利用したアメーバ共培養法の手法と、リアルタイム PCR 法（qPCR 法）を組み合わせたアメーバ共培養-qPCR 法を使って、水環境中のレジオネラ生息実態調査を行った。

冷却塔水 19 試料、水景水 31 試料、水道原水河川水 60 試料、計 110 試料を採取した。レジオネラは、培養法では 3 試料（2.5%）のみ陽性であった。アメーバ共培養-qPCR 法は 74.5%、qPCR 法は 75.5% が陽性であった。アメーバ共培養法を行うことにより、19 試料（15.8%）でレジオネラ菌数の 10 倍以上の増殖が確認された。これらの試料について、菌種の同定を行った結果、*L. pneumophila*、*L. anisa* や、培養不能菌種である *L. lytica*、*L. rowbothamii* であった。

本研究により、培養法で不検出の試料中に培養不能菌種を含むレジオネラが生息することが明らかになった。アメーバ共培養-qPCR 法は、レジオネラのヒトへの病原性に関連するアメーバ内増殖能を利用した検出法であることから、病原性を有するレジオネラを検出するために有益な手法である。

Association between indoor nitrous acid, outdoor nitrogen dioxide, and asthma attacks: results of a pilot study

M. OHYAMA^a, T. NAKAJIMA^a, C. MINEJIMA^b, K. AZUMA^c, K. OKA^d, Y. ITANO^e, S. KUDO^f and N. TAKENAKA^f

International Journal of Environmental Health Research, 29(6), 632-642 (2019)

多くの疫学調査により二酸化窒素（NO₂）と喘息の関連が示唆されている。しかし、亜硝酸（HONO）は NO₂ として検出され、かつ、HONO と NO₂ は平衡関係にあるが、それらの疫学調査では HONO は測定されていない。今回の目的は、実際に喘息に影響するのは HONO である可能性を検討するための疫学的試行調査を実施することである。今回、小児喘息患者の喘息発作と、室内の HONO や NO₂ や一酸化酸素（NO）との関連、また、屋外の NO₂ や NO との関連を調べた結果、調査 1 年目には共に 1 次燃焼で発生する HONO と NO の室内濃度の相関性が良く、両者共に喘息発作との関連を U 検定で認め、かつ、調査 2 年目は 1 年目と異なり、喘息発作との有意な関連はいずれの物質においても認められなかったが室内 HONO は屋外 NO₂ との相関性が良かった。2 年目の気温は約 20 度以上の期間が続いたため、2 年目の室内 HONO は換気状態が良かったことにより屋外 NO₂ との平衡反応に由来したものと考えられた。これらの結果は、疫学調査で示唆されている NO₂ と喘息との関連については、HONO を測定する調査により見直す必要性を示唆する。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 佐賀大学医学部

アメーバ共培養-qPCR 法を用いた環境中レジオネラ生息調査

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 国際基督教大学

c 近畿大学

d 大阪府立環境農林水産総合研究所

e 大阪市立環境科学研究センター

f 大阪府立大学

室内亜硝酸と屋外二酸化窒素と喘息発作との関連：疫学的試行調査結果

大阪府内浄水場における農薬代謝物の存在実態
および浄水処理による除去効果

安達史恵^a, 吉田 仁^a, 高木総吉^a,
小泉義彦^a, 中島孝江^a, 北村雅世^b,
鳥居将士^b, 吉田直志^b, 土屋 誠^b,
山口進康^a

水道協会雑誌, 88(12), 10-16(2019)

現在の水道水質検査における対象農薬リスト掲載農薬類の中には、代謝物等が食品安全委員会において評価されているにもかかわらず、測定対象となっていない農薬がある。それらについては、浄水中の形態について把握し、存在の可能性があるものについては、原体と合算した評価が必要と考えられる。本研究では、農薬類としてオリサストロビン、プロチオホス、アミトラズ、イプロジオンを対象とし、これらの代謝物等 5 種 ((5Z)-オリサストロビン、プロチオホスオキソン、N-2,4-ジメチルフェニル-N'-メチルホルムアミジン(DMPF)、N-2,4-ジメチルフェニルホルムアミド(DMF)、イソイプロジオン) について分析方法を確立後、大阪府内浄水場において実態調査を実施した。また併せて、浄水処理過程における除去性について検討した。その結果、(5Z)-オリサストロビンが浄水中に存在していることが明らかとなり、原体であるオリサストロビンとともに合算して評価することは妥当であると考えられた。

on-site モニタリングによる生活環境の
衛生微生物学的安全の確保

山口進康

最新の抗菌・防臭・空気質制御技術, 281-284 (2019)

有史以前より感染症によって多くの命が失われてきたが、その原因菌が特定されたのは、今から百数十年前である。フランスのパスツールにより微生物は自然に発生するという「自然発生説」が否定され、またドイツのコッホにより細菌の純培養法・分離法が開発されるとともに、病原微生物学が発展し、結核菌やコレラ菌をはじめとする多くの病原細菌が分離された。そして、各病原細菌に対する選択培養法が確立されてきた。

しかしながら、環境中の多種多様な微生物は増殖に適した温度や有機物の種類・濃度がそれぞれ異なるため、それらのすべてを同一の条件で培養することは難しく、環境中の細菌の 90%以上が通常の条件下では培養困難であることが明らかになってきている。また培養が可能な細菌であってもその検出には 1 週間以上を要することや、微生物を増やすことによるバイオハザードのリスクの増加が問題となっている。そこで、培養に依存することなく微生物を検出・定量するための方法が開発されてきている。これらの方法には微生物を直接検出する方法と間接的に検出する方法があり、いずれにおいても微生物を数時間から 1 日以内に検出・定量できる。本稿では、微生物を直接可視化する方法として、蛍光染色法について解説するとともに、その on-site モニタリングへの応用例を紹介した。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪府健康医療部環境衛生課

Occurrence and treatment efficiency of pesticide metabolites in water treatment plants in Osaka

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

Ensuring microbiological safety of living environment by on-site monitoring

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」[12]
レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ

枝川亜希子

日本防菌防黴学会誌, 47(6), 229-232 (2019)

自由生活性アメーバ（以下、アメーバ）は、土壌や水などの環境中に広く生息する原生動物である。レジオネラ属菌（以下、レジオネラ）と生息環境が類似しており、アメーバが検出される水環境ではレジオネラが高率で検出される。アメーバの多くは非病原性であるが、レジオネラなどの病原細菌類の増殖の場となり、感染症の発生に関与していることが明らかになってきた。そのため、レジオネラ対策を行う際は、レジオネラだけでなく宿主であるアメーバも含めた対策を講じることが公衆衛生上重要となっている。また、アメーバの中には稀にヒトに強い病原性を有する種が存在する。

本講座では、アメーバの特性やレジオネラとの関係、検出方法、生息状況などについて解説する。

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」[13]
アメーバ共培養法を用いたレジオネラ属菌の検出

井上浩章^a，枝川亜希子^b

日本防菌防黴学会誌, 47(7), 273-277 (2019)

レジオネラ属菌（以下、レジオネラ）は、環境中で自由生活性アメーバ（以下、アメーバ）に捕食され、そのアメーバを宿主として増殖する。近年、レジオネラとアメーバとの密接な関連を利用し、純培養のアメーバの中でレジオネラを増殖させてから検出するアメーバ共培養法を環境水試料に応用する試みが行われている。従来法に加えてアメーバ共培養法を行うことにより、より広範囲にレジオネラを検出することが可能となってきた。

本稿では、アメーバ共培養法を用いた冷却水、浴槽水、水景水からのレジオネラ検出について解説する。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課
The detection and control of *Legionella* host amoeba from
environmental water [12]
Host free-living amoebae of *Legionella*

a アクアス株式会社つくば総合研究所
b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課
The detection and control of *Legionella* host amoeba from
environmental water [13]
The detection of *Legionella* using amoebic co-culture

編集委員

青山幾子
浅田安紀子
池森 亮
大山正幸
皐月由香
○勢戸和子
根岸直矢
昌山 敦
山崎一夫
吉光真人
若林友騎
(○編集委員長)

査読者

阿久津和彦
改田 厚
柿本幸子
河合高生
川津健太郎
紀 雅美
高取 聡
仲谷 正
中村実沙子
西尾孝之
西田陽子
萩原拓幸
福井直樹
村野晃一
山野哲夫
吉田俊明
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4号 令和2年度

ISSN 2433-5819

(無断転載禁止)

令和3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