

ISSN 2433-5819

# 研 究 年 報

令和 3 年度

第 5 号

ANNUAL REPORT  
OF  
OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.5  
(2021)



# 目 次

## 報 文

大阪府における2020年感染症発生動向 梶月由香, 本村和嗣, 西田陽子, 柿本健作, 西尾孝之, 三山豪士, 入谷展弘, 小林和夫	1
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 (2020年度) 中田恵子, 山中靖貴, 本村和嗣	11
大阪府の食中毒事例で検出されたノロウイルス流行状況と分子疫学的解析 (2019・2020年度) 白井達哉, 左近直美, 高田利香, 本村和嗣	18
大阪市におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症 サーベイランス (2015年~2020年) 梅田 薫, 秋吉充子, 柴川紗恵子, 平井佑治, 中村寛海, 説田 景, 吉田英樹	25
野菜・果実飲料における糖類および糖アルコール分析 紀 雅美, 工藤鮎子, 寺谷清香, 山崎朋美, 柿本 葉, 新矢将尚	32
栄養成分検査にかかる水分分析条件の検討 山崎朋美, 柿本 葉, 紀 雅美, 萩原拓幸, 新矢将尚	41
分析機器更新による動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価 山口瑞香, 粟津 薫, 白川育子, 野村千枝, 永吉晴奈, 福井直樹, 新矢将尚	48
分析機器更新によるテトラサイクリン系抗生物質分析法の妥当性評価 山口瑞香, 粟津 薫, 白川育子, 野村千枝, 永吉晴奈, 福井直樹, 新矢将尚	55
水質検査における外部精度管理 (2019年度) —ナトリウム及びその化合物— 吉田 仁, 安達史恵	59
水質検査における定量精度に影響を及ぼす因子の解明 (2020年度) —大阪府建築物飲料水水質検査業 (臭素酸) — 吉田 仁, 中島孝江, 長谷川有紀, 小泉義彦	66
水質検査における定量精度に影響を及ぼす因子の解明 (2020年度) —大阪府建築物飲料水水質検査業 (ホルムアルデヒド) — 長谷川有紀, 吉田 仁, 小泉義彦	73
住民における2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレートおよび2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレートの尿中代謝物の分析法 吉田俊明	80
大阪府における環境および食品中放射能調査 (令和2年度報告) 肥塚利江, 大山正幸, 小泉義彦, 小池真生子, 山口進康	90
抄 録	
新型コロナウイルス感染症の無症状感染者比率の推定 (英文) 西浦 博, 小林鉄郎, 三山豪士, 鈴木絢子, Sung-mok JUNG, 林 克磨, 木下 諒, Yichi Yang, Baoyin Yuan, Andrey R. Akhmetzhanov, Natalie M. Linton	98
日本におけるRSウイルス感染症発生動向の季節変動 (英文)	

三山豪士, 入谷展弘, 西尾孝之, 鶴飼友彦, 梶月由香, 宮田明未, 新谷歩, 廣井 聡, 本村和嗣, 小林和夫 . . . . .	98
2016年に発生した関西国際空港での麻疹アウトブレイク:二次性ワクチン不全と初感染患者間の排 泄麻疹ウイルス量と感染性についての解析 (英文) 倉田貴子, 山元誠司, 西村公志, 弓指孝博, 本村和嗣, 木下 優 . . . . .	99
鶏肉由来 <i>Enterococcus saigonensis</i> VE80 <sup>T</sup> におけるバンコマイシン耐性機構 (英文) 原田哲也, 元岡大祐, 中村昇太, 山本容正, 山口貴弘, 河原隆二, 川津健太郎 . . . . .	99
日本で初めて分離されたマクロライド耐性百日咳菌について (英文) 山口貴弘, 川崎康寛, 勝川千尋, 河原隆二, 川津健太郎 . . . . .	100
日本の市販鶏肉からの <i>mcr-5</i> 陽性 <i>Salmonella</i> Albany の分離とプラスミド解析 (英文) 若林友騎, 関塚 剛, 山口貴弘, 福田 昭, 鈴木仁人, 河原隆二, 田口真澄, 黒田 誠, 仙波敬子, 四宮博人, 川津健太郎 . . . . .	100
ノロウイルス感染症に対する受動的免疫療法のためのヘテロダイマー抗体フラグメント (英文) 幸 義和, 黒河志保, 佐藤慎太郎, 佐生 愛, 松本直実, 鈴木明男, 左近直美, 合田有希, 竹山夏実, 三好龍也, H. Marcotte, 田中智之, L. Hammarstrom, 清野 宏 . . . . .	101
ヒトノロウイルスに中和活性を示すコメ型抗体の開発 (英文) 佐生 愛, 幸 義和, 黒河志保, 佐藤慎太郎, 合田有希, 内田征男, 松本直実, 相良 洋, 渡邊裕治, 黒田昌治, 左近直美, 杉浦琴美, 中橋理佳, 牛島 廣, 藤橋浩太郎, 清野 宏 . . . . .	101
国際的にみたノロウイルスの概況と今後の課題 左近直美, 白井達哉, 上間 匡 . . . . .	102
ウイルス性食中毒に関する話題～ノロウイルスの最新情報～ 左近直美, 白井達哉, 本村和嗣 . . . . .	102
ダニが媒介する感染症 弓指孝博 . . . . .	103
進化系統の異なる大阪北部と南部の 2 系統の SFTS ウイルスの系統学的解析～SFTS ウイルスは系 統ごとに独立した感染環を維持している～ (英文) 池森 亮, 青山幾子, 佐々木正大, 高林弘の, 森定一稔, 木下 優, 生田和良, 弓指孝博, 本村和嗣 . . . . .	103
猫の口腔内から分離された新菌種 <i>Capnocytophaga felis</i> (英文) 鈴木道雄, 梅田 薫, 木村昌伸, 今岡浩一, 森川 茂, 前田 健 . . . . .	104
<i>bla</i> IMP-1, <i>bla</i> GES-5 および <i>mcr-9</i> を保有する臨床分離株 <i>Enterobacter roggkampii</i> の遺伝学的解析 (英文) 梅田 薫, 中村寛海, 福田 昭, 松本悠希, 元岡大祐, 中村昇太, 安井良則, 吉田英樹, 河原隆二 . . . . .	104
日本近海産マイワシから検出されたアニサキス属幼線虫の分子同定と寄生率 馬場 孝 . . . . .	105
河川氾濫による水害に遭遇した植物標本のカビ汚染とその対策	

浜田信夫, 馬場 孝, 佐久間大輔 . . . . .	105
ニホンヤモリの食性 (英文) 秋田耕佑, 松岡 悠, 山崎一夫 . . . . .	106
指定外着色料パテントブルー群の名称と識別について 新矢将尚, 紀 雅美, 山口之彦 . . . . .	106
on-chip 染色型マイクロ流路デバイスを用いたレタスと牛肉中の腸管出血性大腸菌 O157:H7 の迅速定量 (英文) 徳永佑亮, 山口進康 . . . . .	107
LC-MS/MS を利用した迅速簡便な 6 種類防かび剤分析法の開発 吉光真人, 上野 亮, 松井啓史, 小阪田正和, 内田耕太郎, 福井直樹, 阿久津和彦, 角谷直哉 . . . . .	107
ヒトのチトクローム P450 酵素による 2'-, 3'-, 4'-メトキシフラボンの酸化における O-脱メチル化反応の優先性 (英文) 永吉晴奈, 村山典恵, 辻野正樹, 竹中重雄, 片平じゅん, Vitchan Kim, Donghak Kim, 小森雅之, 山崎浩史, F Peter. Guengerich, 島田 力 . . . . .	108
Aspa/Hcn1 ダブルノックアウトラットの本態性振戦の発現における NMDA 受容体の役割 (英文) 西谷あい, 永吉晴奈, 竹中重雄, 浅野雅秀, 清水佐紀, 大野行弘, 庫本高志 . . . . .	108
液体クロマトグラフィータンデム質量分析計を用いたヒトチトクローム P450 による 2'-,3'-,4'-,6-ヒドロキシフラバノンの代謝物解析 (英文) 島田 力, 永吉晴奈, 村山典恵, 竹中重雄, 片平じゅん, Vitchan Kim, Donghak Kim, 小森雅之, 山崎浩史, F Peter. Guengerich . . . . .	109
日本の飲料用ポリエチレンテレフタレートボトルに含まれる金属類の一斉分析 (英文) 岸 映里, 尾崎麻子, 大嶋智子, 阿部 裕, 六鹿元雄, 山口之彦, 山野哲夫 . . . . .	109
脂質膜環境におけるアポリポタンパク質の凝集・アミロイド線維化機構 水口智晴, 扇田隆司, 斎藤博幸 . . . . .	110
生鮮鶏卵と加工鶏卵における 4 種類の卵白アレルゲン Gal d 1-4 に対する LC-MS/MS 法の開発 (英文) 清田恭平, 吉光真人, 内田耕太郎, 梶村計志 . . . . .	110
PET ボトル入りミネラルウォーター中のホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの簡便迅速法による分析 (英文) 阿部 裕, 小林憲弘, 山口未来, 六鹿元雄, 尾崎麻子, 岸 映里, 佐藤恭子 . . . . .	111
顕微 FTIR によるマイクロプラスチック分析の試みと課題 中尾賢志, 秋田耕佑, 梶元慶子, 尾崎麻子, 奥田哲士 . . . . .	111
カンナビノイド受容体に対する機能活性及び吸入曝露試験における生体影響によるカルボキサミド型合成カンナビノイドの評価 (英文) 武田章弘, 土井崇広, 浅田安紀子, 鈴木俊也, 湯澤勝廣, 安藤 弘, 久保喜一, 長澤明道, 海鉦藤文, 長谷川悠子, 田中和良, 五十嵐海, 前野智和, 鈴木淳子, 清水聖子, 植村望美, 中嶋順一, 鈴木 仁, 田上貴臣 . . . . .	112

シテイ（柿蒂）について： HPLCによるベツリン酸，ウルソール酸及びオレアノール酸分析法の検討と市場品及び採取品の分析	石原理恵，有本恵子，伊藤美千穂，居村克弥，大井逸輝，岡坂 衛，河端昭子，酒井英二，嶋田宏志，嶋田康男，田上貴臣，辻本絵理，西尾雅世，野村涼坪，松田久司，松本卓也，山本 豊，横倉胤夫	112
ポータブル・マイクロ流路システムを用いた淡水環境中の細菌の迅速オンサイト・モニタリング（英文）	山口進康，藤井雄大	113
子どもにおけるフタル酸エステル類の摂取と住宅室内空気質の寄与（英文）	吉田俊明，味村真弓，左近直美	113
モルモット曝露実験による肺の病理学的変化での亜硝酸の最小毒性濃度（英文）	大山正幸，西村公志，東 賢一，峰島知芳，竹中規訓，安達修一	114
日本における大気中の二酸化窒素濃度に関連する気候と大気汚染要因の時系列解析（英文）	三山豪士，松井啓史，東 賢一，峰島知芳，板野泰之，竹中規訓，大山正幸	114
「ただし書きの運用」による人槽緩和規定の事後検証調査	安達史恵，吉田 仁，高塚 遼，光田聖庸，長尾綾佳，土屋 誠	115
有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（有害物質含有家庭用品規制法）におけるメタノール，トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレン試験法改定に係る検討	河上強志，菅谷なえ子，田原麻衣子，大嶋智子，西以和貴，上村 仁，塩田寛子，鈴木郁雄，田畑佳世，五十嵐良明	115
<b>学位論文概要</b>		
因果推論を用いた酪農生産獣医療における問題指向型実地疫学的研究	三山豪士	116
LSRはLKB1-AMPK経路を介してエネルギーストレス下で上皮性卵巣癌細胞の細胞生存を促進する	高橋佑介	119

## ANNUAL REPORT OF OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

### CONTENTS

#### Original Articles

Surveillance of infectious diseases in 2020 in Osaka prefecture (in Japanese)	Y. SATSUKI, K. MOTOMURA, Y. NISHIDA, K. KAKIMOTO, T. NISHIO, T. MIYAMA, N. IRITANI and K. KOBAYASHI	1
Epidemic Situation and molecular-epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2020 Report) (in Japanese)	K. NAKATA, Y. YAMANAKA and K. MOTOMURA	11
Epidemic and molecular epidemiological analysis of norovirus outbreaks in case of food poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2019・2020 Report) (in Japanese)	T. SHIRAI, N. SAKON, R. TAKADA and K. MOTOMURA	18

Surveillance of carbapenem-resistant <i>Enterobacteriales</i> (CRE) infections in Osaka city, 2015-2020 (in Japanese)	K. UMEDA, A. AKIYOSHI, S. SHIBAKAWA, Y. HIRAI, H. NAKAMURA, A. SETSUDA and H. YOSHIDA . . . . .	25
Analysis of sugar and sugar alcohol in commercially available vegetable and fruit juices (in Japanese)	M. KI, A. KUDO, S. TERATANI, T. YAMASAKI, Y. KAKIMOTO and M. SHINYA	32
Moisture content analysis of food products for nutrition-labeling compliance test (in Japanese)	T. YAMASAKI, Y. KAKIMOTO, M. KI, T. HAGIWARA and M. SHINYA . . . . .	41
Validation study for analytical method of veterinary products due to the renewal of analytical instruments (in Japanese)	M. YAMAGUCHI, K. AWAZU, I. SHIRAKAWA, H. NAGAYOSHI, C. NOMURA, N. FUKUI and M. SHINYA . . . . .	48
Validation study for analytical method of tetracyclines antibiotics due to the renewal of analytical instruments (in Japanese)	M. YAMAGUCHI, K. AWAZU, I. SHIRAKAWA, H. NAGAYOSHI, C. NOMURA, N. FUKUI and M. SHINYA . . . . .	55
Results of external quality control on the analytical methods for sodium in tap water, performed in 2019 in Osaka Prefecture (in Japanese)	J. YOSHIDA and F. ADACHI . . . . .	59
Elucidation of factors affecting quantitative accuracy for bromate in water quality measurements, performed in 2020 in Osaka Prefecture (in Japanese)	J. YOSHIDA, T. NAKAJIMA, Y. HASEGAWA and Y. KOIZUMI . . . . .	66
Elucidation of factors affecting quantitative accuracy for formaldehyde in water quality measurements, performed in 2020 in Osaka Prefecture (in Japanese)	Y. HASEGAWA, J. YOSHIDA and Y. KOIZUMI . . . . .	73
Analytical method for urinary metabolites of 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediolmonoisobutyrate and 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanedioldiisobutyrate in the general population (in Japanese)	T. YOSHIDA . . . . .	80
Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2020 Report) (in Japanese)	T. HIZUKA, M. OHYAMA, Y. KOIZUMI, M. KOIKE and N. YAMAGUCHI . . . . .	90
<b>Abstracts</b>		
Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19)	H. NISHIURA, T. KOBAYASHI, T. MIYAMA, A. SUZUKI, SM. JUNG, K. HAYASHI, R. KINOSHITA, Y. YANG, B. YUAN, AR. AKHMETZHANOV and NM. LINTON . . . . .	98
Seasonal shift in epidemics of respiratory syncytial virus infection in Japan	T. MIYAMA, N. IRITANI, T. NISHIO, T. UKAI, Y. SATSUKI, H. MIYATA, A. SHINTANI, S. HIROI, K. MOTOMURA and K. KOBAYASHI . . . . .	98
A measles outbreak in Kansai International Airport, Japan, 2016: Analysis of the quantitative difference and infectivity of measles virus between patients who are immunologically naive versus those with secondary vaccine failure	T. KURATA, S. P. YAMAMOTO, H. NISHIMURA, T. YUMISASHI, K. MOTOMURA and M. KINOSHITA . . . . .	99
Detection of genetic elements carrying <i>vanA</i> in vancomycin-resistant <i>Enterococcus saigonensis</i> VE80 <sup>T</sup> isolated from retail chicken meat	T. HARADA, D. MOTOOKA, S. NAKAMURA, Y. YAMAMOTO, T.	99

YAMAGUCHI, R. KAWAHARA and K. KAWATSU.....	
The first report of macrolide-resistant <i>Bordetella pertussis</i> isolation in Japan T. YAMAGUCHI, Y. KAWASAKI, C. KATSUKAWA, R. KAWAHARA and K. KAWATSU . . . . .	100
Isolation and plasmid characterisation of <i>Salmonella enterica</i> serovar Albany harbouring <i>mcr-5</i> from retail chicken meat in Japan Y. WAKABAYASHI, T. SEKIZUKA, T. YAMAGUCHI, A. FUKUDA, M. SUZUKI, R. KAWAHARA, M. TAGUCHI, M. KURODA, K. SEMBA, H. SHINOMIYA and K. KAWATSU . . . . .	100
A heterodimer antibody fragment for the passive immunotherapy against norovirus infection Y. YUKI, S. KUROKAWA, S. SATO, A. SASOU, N. MATSUMOTO, A. SUZUKI, N. SAKON, Y. GODA, N. TAKEYAMA, T. MIYOSHI, H. MARCOTTE, T. TANAKA, L. HAMMARSTROM and H. KIYONO . . . . .	101
Development of Antibody-Fragment-Producing Rice for Neutralization of Human Norovirus A. SASOU, Y. YUKI, S. KUROKAWA, S. SATO, Y. GODA, M. UCHIDA, N. MATSUMOTO, H. SAGARA, Y. WATANABE, M. KURODA, N. SAKON, K. SUGIURA, R. NAKAHASHI-OUCHIDA, H. USHIJIMA, K. FUJIHASHI and H. KIYONO . . . . .	101
Overview of norovirus from an international perspective and future challenges (in Japanese) N. SAKON, T. SHIRAI and M. UEMA . . . . .	102
Foodborne viral diseases-up date of norovirus - (in Japanese) N. SAKON, T. SHIRAI and K. MOTOMURA . . . . .	102
Tick-borne infectious diseases (in Japanese) T. YUMISASHI . . . . .	103
Two Different Strains of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus (SFTSV) in North and South Osaka by Phylogenetic Analysis of Evolutionary Lineage: Evidence for Independent SFTSV Transmission R. IKEMORI, I. AOYAMA, T. SASAKI, H. TAKABAYASHI, K. MORISADA, M. KINOSHITA, K. IKUTA, T. YUMISASHI and k. MOTOMURA . . . . .	103
<i>Capnocytophaga felis</i> sp. nov. isolated from the feline oral cavity M. SUZUKI, K. UMEDA, M. KIMURA, K. IMAOKA, S. MORIKAWA and K. MAEDA . . . . .	104
Genomic characterization of clinical <i>Enterobacter roggenkampii</i> co-harboring <i>blaIMP-1-</i> and <i>blaGES-5</i> -encoding IncP6 and <i>mcr-9</i> -encoding IncHI2 plasmids isolated in Japan. K. UMEDA, H. NAKAMURA, A. FUKUDA, Y. MATSUMOTO, D. MOTOOKA, S. NAKAMURA, Y. YASUI, H. YOSHIDA and R. KAWAHARA . . . . .	104
Molecular identification and prevalence of <i>Anisakis</i> larvae in Japanese sardine <i>Sardinops melanostictus</i> from Japanese waters (in Japanese) T. BABA . . . . .	105
Contaminated fungi on botanical specimens by water hazard of flood (in Japanese) N. HAMADA, T. BABA and D. SAKUMA . . . . .	105
<i>Gekko japonicus</i> (Schlegel's Japanese Gekko). Diet K. AKITA, H. MATSUOKA and K. YAMAZAKI . . . . .	106

Nomenclature and identification method of non-permitted dyes of Patent Blue Group (in Japanese) M. SHINYA, M. Ki and Y. YAMAGUCHI · · · · ·	106
Rapid quantification of Escherichia coli O157:H7 in lettuce and beef using an on-chip staining microfluidic device Y. TOKUNAGA and N. YAMAGUCHI · · · · ·	107
Development of an LC-MS/MS-based rapid and simple analytical method for six fungicides (in Japanese) M. YOSHIMITSU, R. UENO, H. MATSUI, M. OSAKADA, K. UCHIDA, N. FUKUI, K. AKUTSU and N. KAKUTANI · · · · ·	107
Preference for O-demethylation reactions in the oxidation of 2'-, 3'-, and 4'-methoxyflavones by human cytochrome P450 enzymes H. NAGAYOSHI, N. MURAYAMA, M. TSUJINO, S. TAKENAKA, J. KATAHIRA, V. KIM, D. KIM, M. KOMORI, H. YAMAZAKI, F P. GUENGERICH and T. SHIMADA · · · · ·	108
Involvement of NMDA receptors in tremor expression in Aspa/Hcn1 double-knockout rats A. NISHITANI, H. NAGAYOSHI, S. TAKENAKA, M. ASANO, S. SHIMIZU, Y. OHNO and T. KURAMOTO · · · · ·	108
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oxidation of 2'-, 3'-, 4'- and 6-hydroxyflavanones by human cytochrome P450 enzymes T. SHIMADA, H. NAGAYOSHI, N. MURAYAMA, S. TAKENAKA, J. KATAHIRA, V. KIM, D. KIM, M. KOMORI, H. YAMAZAKI and F P. GUENGERICH · · · · ·	109
Determination of various constituent elements of polyethylene terephthalate bottles used for beverages in Japan E. KISHI, A. OZAKI, T. OOSHIMA, Y. ABE, M. MUTSUGA, Y. YAMAGUCHI and T. YAMANO · · · · ·	109
Mechanism of aggregation and amyloid fibril formation of apolipoprotein on lipid membrane environment (in Japanese) C. MIZUGUCHI, T. OHGITA and H. SAITO · · · · ·	110
Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of hen's egg white allergens Gal d 1-4 in fresh and processed eggs K. KIYOTA, M. YOSHIMITSU, K. UCHIDA and K. KAJIMURA · · · · ·	110
Determination of formaldehyde and acetaldehyde levels in poly(ethylene terephthalate) (PET) bottled mineral water using a simple and rapid analytical method Y. ABE, N. KOBAYASHI, M. YAMAGUCHI, M. MUTSUGA, A. OZAKI, E. KISHI, K. SATO · · · · ·	111
Trial and subjects of microplastics analysis by FTIR microscopy (in Japanese) S. NAKAO, K. AKITA, K. MASUMOTO, A. OZAKI and T. OKUDA · · · · ·	111
Evaluation of carboxamide-type synthetic cannabinoids on the functional activities at cannabinoid receptors and biological effects via inhalation exposure test A. TAKEDA, T. DOI, A. ASADA, T. SUZUKI, K. YUZAWA, H. ANDO, Y. KUBO, A. NAGASAWA, F. KAIHOKO, Y. HASEGAWA, K. TANAKA, K. IGARASHI, T. MAENO, A. SUZUKI, S. SHIMIZU, N. UEMURA, J. NAKAJIMA, J. SUZUKI and T. TAGAMI · · · · ·	112
Studies on KAKI CALYX (in Japanese) R. ISHIHARA, K. ARIMOTO, M. ITO, K. IMURA, I. OI, M. OKASAKA, A. KAWABATA, E. SAKAI, H. SHIMADA, Y. SHIMADA, T. TAGAMI, E.	112

TSUJIMOTO, K. NISHIO, R. NOMURA, H. MATSUDA, T. MATSUMOTO, Y.  
YAMAMOTO and T. YOKOKURA ·····

Rapid on-site monitoring of bacteria in freshwater environments using a portable microfluidic counting system	N. YAMAGUCHI and Y. FUJII ·····	113
Intakes of phthalates by Japanese children and the contribution of indoor air quality in their residences	T. YOSHIDA, M. MIMURA and N. SAKON ·····	113
Lowest observed adverse effect level of pulmonary pathological alterations due to nitrous acid exposure in guinea pigs	M. OHYAMA, H. NISHIMURA, K. AZUMA, C. MINEJIMA, N. TAKENAKA, and S. ADACHI ·····	114
Time series analysis of climate and air pollution factors associated with atmospheric nitrogen dioxide concentration in Japan	T. MIYAMA, H. MATSUI, K. AZUMA, C. MINEJIMA, Y. ITANO, N. TAKENAKA, and M. OHYAMA ·····	114
Verification survey with Johkasou after defining standards (in Japanese)	F. ADACHI, J. YOSHIDA, R. TAKATSUKA, A. MITSUDA, A. NAGAO and M. TSUCHIYA ·····	115
Examination of analytical method for methanol, trichloroethylene, and tetrachloroethylene to revise the official methods based on “Act on the Control of Household Products Containing Harmful Substances”(in Japanese)	T. KAWAKAMI, N. SUGAYA, M. TAHARA, T. OOSHIMA, I. NISHI, H. UEMURA, H. SHIODA, I. SUZUKI, K. TABATA and Y. IKARASHI ·····	115
<b>Thesis summary</b>		
Problem-oriented field epidemiological study in dairy production medicine using a causal inference approach	T. MIYAMA ·····	116
LSR promotes epithelial ovarian cancer cell survival under energy stress through the LKB1-AMPK pathway	Y. TAKAHASHI ·····	119

## 大阪府における 2020 年感染症発生動向

梶月由香<sup>a</sup>, 本村和嗣<sup>b</sup>, 西田陽子<sup>a</sup>, 柿本健作<sup>a</sup>, 西尾孝之<sup>a</sup>, 三山豪士<sup>c</sup>, 入谷展弘<sup>a</sup>, 小林和夫<sup>d</sup>

2020 年、新型コロナウイルスの感染が世界中に拡大し、その感染拡大防止のため人々は行動変容を求められた。感染症発生動向調査に基づき収集した感染症情報を分析し、2020 年と過去 5 年の感染症発生数を比較することにより、2020 年の感染症発生に対する新型コロナウイルス感染症の感染予防対策等の影響について考察を行った。その結果、飛沫・接触・経口感染する感染症及び輸入感染症は、2020 年の報告数が減少しており、新型コロナウイルス感染症の影響を受けたと考えられた。新型コロナウイルス感染症の感染予防対策であるマスク着用や身体的距離の確保等による飛沫感染防止や手洗い・手指の消毒等による接触・経口感染防止は飛沫・接触・経口により感染する感染症に有効であったと考えられた。

キーワード：感染症発生動向調査、新型コロナウイルス感染症、感染症対策、2020 年

感染症発生動向調査は、1999 年（平成 11 年）4 月に施行された「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」（感染症法）に基づく調査である。その目的は、感染症の発生情報を把握、分析し、その結果を国民や医療関係者へ迅速に提供・公開することにより、感染症に対する有効かつ確かな予防・診断・治療に係る対策を図り、多様な感染症の発生及びまん延を防止するとともに、病原体情報を収集、分析することで、流行している病原体の検出状況及び特性を確認し、適切な感染症対策を立案することである。

同調査における感染症の発生情報については、感染症発生動向調査事業実施要綱により対象とする感染症が定められており、全数を把握する感染症（全数把握感染症）と指定された医療機関（定点医療機関）からの報告数を把握する感染症（定点把握感染症）がある。全数把握感染症は、周囲への感染拡大防止を図ることが必要な場合及び発生数が希少な場合であり、定点把握感染症は発生動向の把握が必要なもののうち、患者数が多数で全数を把握す

る必要がない場合である<sup>1)</sup>。これらは、国が定める届出基準に基づいて、診断した医師等から保健所に届けられる。保健所が届け出内容を感染症発生動向調査システム(National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease :NESID)に登録することにより、都道府県を通じて厚生労働省に報告される。

新型コロナウイルス感染症（Coronavirus disease 2019:COVID-19）は、2019 年 12 月に中華人民共和国湖北省武漢市において確認され、その後世界中に感染が拡大した。世界保健機関（World Health Organization:WHO）は、2020 年 1 月 30 日に「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」を宣言し、3 月 11 日には「パンデミック（世界的な大流行）の状態にある」と表明した。COVID-19 は飛沫や接触により感染するため、その感染拡大防止策として、日本ではマスクの着用、身体的距離の確保、手洗い・手指の消毒、3 密（密閉、密集、密接）を避けるなどの「新しい生活様式」の実践が求められた。また、渡航制限や緊急事態宣言を発出することにより人の流れを抑制する対策が取られた。

a 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部健康危機管理課

b 大阪府感染症情報センター

c 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

d 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部

COVID-19 が世界各地で大流行する一方で、COVID-19 以外の感染症は減少したとの報告があり<sup>2-5)</sup>、大阪府においても COVID-19 以外の感染症の発生に、例年と異なる傾向が認められた。そこで、2020 年の大阪府における感染症発生状況を把握し、過去 5 年間の発生状況と比較して、COVID-19 によるその他の感染症の発生への影響について検討した。

## 調査方法

### 1. 調査期間と対象疾患

調査期間は 2015 年から 2020 年までとした。対象疾患は感染症発生動向調査実施要綱に定める定点把握感染症及び全数把握感染症のうち 3~5 類感染症を対象とした(表 1)。ただし、全数把握感染症のうち全国における 2015 年から 2019 年までの年平均累積報告数が 12 例以下の感染症、潜伏期間が長い感染症、感染経路又は病原体が明確ではない感染症、創傷により感染する感染症、土壌や水などの環境中に存在する病原体から感染する感染症は、報告数が少ないため比較が困難、COVID-19 に関係しないことが明らか等の理由により対象外とした(表 2)。

表 1 対象とした感染症

	分類	感染症
定点把握感染症	小児科定点・インフルエンザ定点	インフルエンザ、RS ウイルス感染症、咽頭結膜熱、A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎、感染性胃腸炎、水痘、手足口病、伝染性紅斑、突発性発しん、ヘルパンギーナ、流行性耳下腺炎
	眼科定点	急性出血性結膜炎、流行性角結膜炎
	基幹定点	細菌性髄膜炎、無菌性髄膜炎、マイコプラズマ肺炎、クラミジア肺炎(オウム病を除く)、感染性胃腸炎(ロタウイルス)
	性感染症定点	性器クラミジア、性器ヘルペス、尖圭コンジローマ、淋菌
	基幹定点	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症、ペニシリン耐性肺炎球菌感染症、薬剤耐性緑膿菌感染症
全数把握感染症	3 類	細菌性赤痢、腸管出血性大腸菌感染症、腸チフス、パラチフス
	4 類	E 型肝炎、A 型肝炎、重症熱性血小板減少症候群、チクングニア熱、つつが虫病、デング熱、日本紅斑熱、マラリア、ライム病
	5 類	アメーバ赤痢、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症、クリプトスポリジウム症、後天性免疫不全症候群、ジアルジア症、侵襲性インフルエンザ菌感染症、侵襲性髄膜炎菌感染症、侵襲性肺炎球菌感染症、水痘(入院例)、梅毒、バンコマイシン耐性腸球菌感染症、百日咳、風しん、麻しん、薬剤耐性アシネトバクター感染症

表 2 対象外とした感染症

	分類	感染症
全数把握対象感染症	3 類	コレラ
	4 類	ウエストナイル熱、エキノコックス症、黄熱、オウム病、オムスク出血熱、回帰熱、キャサヌル森林病、Q 熱、狂犬病、コクシジオイデス症、サル痘、ジカウイルス感染症、腎症候性出血熱、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、炭疽、東部ウマ脳炎、鳥インフルエンザ(H5N1 を除く)、ニパウイルス感染症、日本脳炎、ハンタウイルス肺症候群、B ウイルス病、鼻疽、ブルセラ症、ベネズエラウマ脳炎、ヘンドラウイルス感染症、発疹チフス、ボツリヌス症、野兔病、リッサウイルス感染症、リフトバレー熱、類鼻疽、レジオネラ症、レプトスピラ症、ロッキー山紅斑熱、
	5 類	ウイルス性肝炎、急性弛緩性麻痺、急性脳炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、劇症型溶血性レンサ球菌感染症、先天性風しん症候群、播種性クリプトコックス症、破傷風、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症

表3 2020年の累積報告数と平年との比較表現

2020年の累積報告数	平年との比較
平年平均*1+2SD*2以上	かなり多い
平年平均+SD以上	多い
平年平均+2SD未満	
平年平均-SD以上	平年並み
平年平均+SD未満	
平年平均-2SD以上	少ない
平年平均-SD未満	
平年平均-2SD未満	かなり少ない

\*12015年から2019年までの累積報告数の平均

\*22015年から2019年までの累積報告数の標準偏差

## 2.方法

NESIDより大阪府及び全国における各年の感染症報告数を収集し、定点把握感染症については大阪府の定点あたり累積報告数(定点あたり報告数)を、全数把握感染症については大阪府及び全国の累積報告数を用いた。過去5年間(平年)を2015年から2019年までとし、各感染症における過去5年間の累積報告数の平均(平年平均値)及び標準偏差(SD)を算出した。2020年の累積報告数と平年平均値を比較して、表3の通り分類し(かなり多い、多い、平年並み、少ない、かなり多い)、COVID-19の影響について検討した。大阪府内での年平均累積報告数が12例以下の全数把握感染症は比較困難であるため、全国の累積報告数を用いて比較した。

## 結 果

大阪府における定点把握対象感染症の定点あたり報告数(2020年)及び平年との比較を表4に、全数把握対象感染症の累積報告数(2020年)及び平年との比較を表5に示した。

### 1.定点把握感染症

2020年の大阪府における小児科定点・インフルエンザ定点・眼科定点に指定された医療機関(小児科・インフルエンザ・眼科定点)からの報告数の総計は76,096例であり、平年(183,538例)と比較し58.5%減少していた。伝染性紅斑、流行性耳下腺炎は定点あたり報告数が平年並みであったが、手足口病、突発性発しんは平年より少なく、それ以外の感染症は平年よりかなり少なかった(表4)。

基幹定点では、感染性胃腸炎(ロタウイルス)の定点あたり報告数が平年よりかなり少なく、細菌性髄膜炎、無菌性髄膜炎、ペニシリン耐性肺炎球菌感染症、薬剤耐性緑膿菌感染症は平年より少なかった。それ以外の感染症は平年並みであった(表4)。

性感染症定点では、性器クラミジアは定点あたり報告数が平年よりかなり多かったが、それ以外の感染症は、平年並みであった(表4)。

### 2.全数把握感染症(3類感染症)

大阪府の報告数で比較することができたのは腸管出血性大腸菌感染症のみであり、平年より少なかった。全国の報告数で比較した腸チフス、パラチフスの報告数は平年よりかなり少なく、細菌性赤痢の報告数は、平年より少なかった(表5)。

### 3.全数把握感染症(4類感染症)

大阪府の報告数で比較することができたのは、A型肝炎、デング熱であり、共に報告数は平年より少なかった。なお、2020年のデング熱は2015年以降で最も少ない報告数であった。全国の報告数で比較し、報告数が平年よりかなり少なかったのは、マラリアであった。報告数が平年よりかなり多かったのは、日本紅斑熱、つつが虫病及びライム病であった。それ以外の感染症は平年並みであった(表5)。

### 4.全数把握感染症(5類感染症)

大阪府の報告数で比較することができた11感染症のうち4感染症(アメーバ赤痢、侵襲性肺炎球菌感染症、水痘(入院例)、百日咳)の報告数は平年よりかなり少なく、後天性免疫不全症候群は平年より少なかった。それ以外の感染症は平年並みであった。全国の報告数で比較した4感染症(クリプトスポリジウム症、ジアルジア症、侵襲性髄膜炎菌感染症、薬剤耐性アシネトバクター感染症)の報告数は平年よりかなり少なかった(表5)。

## 考 察

### 1.定点把握感染症

定点把握感染症の小児科定点・インフルエンザ定点・眼科定点及び基幹定点からの報告が平年よりかなり少なくなった感染症は、飛沫・接触・経口によ

表4 大阪府における定点把握感染症の定点あたり報告数及び平年との比較

	感染症	2020年	平年平均値	標準偏差	平年との比較*1
小児科 定点・ インフル エンザ 定点	インフルエンザ	143.69	272.70	60.49	かなり少ない
	RSウイルス感染症	5.76	53.87	7.81	かなり少ない
	咽頭結膜熱	10.45	25.66	1.31	かなり少ない
	A群溶血性レンサ球菌咽頭炎	47.89	110.89	3.93	かなり少ない
	感染性胃腸炎	120.88	304.24	42.55	かなり少ない
	水痘	9.06	21.10	4.16	かなり少ない
	手足口病	3.17	78.84	55.87	少ない
	伝染性紅斑	3.85	16.57	13.67	平年並み
	突発性発しん	19.43	23.43	2.87	少ない
	ヘルパンギーナ	7.93	29.87	7.42	かなり少ない
	流行性耳下腺炎	2.85	25.39	27.73	平年並み
眼科 定点	急性出血性結膜炎	0.22	0.71	0.19	かなり少ない
	流行性角結膜炎	7.04	22.57	4.38	かなり少ない
基幹 定点	細菌性髄膜炎	0.63	1.18	0.31	少ない
	無菌性髄膜炎	0.94	2.35	0.76	少ない
	マイコプラズマ肺炎	5.81	27.76	23.80	平年並み
	クラミジア肺炎（オウム病を除く）	0.06	0.23	0.18	平年並み
	感染性胃腸炎（ロタウイルス）	0.38	18.76	4.82	かなり少ない
	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症	49.53	46.05	4.33	平年並み
	ペニシリン耐性肺炎球菌感染症	3.88	4.76	0.61	少ない
性 感染 症 定点	薬剤耐性緑膿菌感染症	0.18	0.51	0.31	少ない
	性器クラミジア	40.59	37.32	1.36	かなり多い
	性器ヘルペス	13.95	13.88	1.85	平年並み
	尖圭コンジローマ	9.43	9.50	1.04	平年並み
	淋菌	13.24	11.84	2.07	平年並み

\*1平年との比較は、2020年の定点あたり累積報告数と平年平均値の偏差に基づいて平年と比較した。

表5 全数把握対象感染症の累積報告数及び平年との比較

感染症	主な感染経路等	大阪府				全国				
		2020年	平年 平均値	標準偏差	平年との 比較*1	2020年	平年 平均値	標準偏差	平年との 比較*1	
3類	腸管出血性大腸菌感染症	経口感染	147	233	82	少ない	3,092	3,744	138	かなり少ない
	細菌性赤痢	輸入感染	1	6	3	-	87	165	59	少ない
	腸チフス	輸入感染	1	3	1	-	21	40	7	かなり少ない
	パラチフス	輸入感染	0	1	1	-	7	22	7	かなり少ない
4類	デング熱	輸入感染	5	30	15	少ない	45	308	100	かなり少ない
	マラリア	輸入感染	3	3	2	-	21	52	8	かなり少ない
	チクングニア熱	輸入感染	0	2	1	-	3	18	18	平年並み
	日本紅斑熱	節足動物 媒介感染	11	6	3	-	421	290	47	かなり多い
	つつが虫病	節足動物 媒介感染	0	1	1	-	536	447	38	かなり多い
	ライム病	節足動物 媒介感染	0	0	0	-	27	13	5	かなり多い
	重症熱性血小板減少症候群	節足動物 媒介感染	0	0	1	-	78	78	18	平年並み
	E型肝炎	経口感染	4	6	3	-	454	362	112	平年並み
	A型肝炎	経口感染	7	26	14	少ない	120	430	286	少ない
	5類	アメーバ赤痢	経口感染	49	102	23	かなり少ない	613	1,009	149
クリプトスポリジウム症		経口感染	1	1	1	-	6	18	4	かなり少ない
ジアルジア症		経口感染	6	7	3	-	28	67	11	かなり少ない
侵襲性髄膜炎菌感染症		飛沫・ 接触感染	2	4	2	-	14	37	9	かなり少ない
侵襲性肺炎球菌感染症		飛沫・ 接触感染	116	242	47	かなり少ない	1,655	3,003	417	かなり少ない
水痘（入院例）		飛沫・ 接触感染	11	26	5	かなり少ない	362	380	91	平年並み
侵襲性インフルエンザ菌 感染症		飛沫・ 接触感染	25	41	18	平年並み	253	393	121	少ない
後天性免疫不全症候群		性感染症	115	175	32	少ない	1,096	1,360	91	かなり少ない
梅毒		性感染症	902	809	358	平年並み	5,871	5,348	1,755	平年並み
百日咳*1		飛沫・ 接触感染	111	949	165	かなり少ない	2,947	14,480	3,345	かなり少ない
風しん		飛沫・ 接触感染	7	57	63	平年並み	102	1,124	1,384	平年並み
麻しん		飛沫・ 接触感染	1	45	61	平年並み	12	282	273	平年並み
バンコマイシン耐性腸球菌 感染症		薬剤耐性菌 感染症	22	20	12	平年並み	136	74	10	かなり多い
カルバペネム耐性腸内細菌科細 菌感染症	薬剤耐性菌 感染症	157	172	31	平年並み	1,952	1,905	373	平年並み	
薬剤耐性アシネトバクター 感染症	薬剤耐性菌 感染症	2	1	1	-	10	29	6	かなり少ない	

\*1平年との比較は、2020年の累積報告数と平均値の偏差に基づいて平年と比較した。

\*2百日咳は2018年から全数把握感染症となったため、平均値は2018～2019年とした。

り感染する感染症であり、同じ感染経路であるCOVID-19の予防対策による影響を受けたと考えられた。手足口病、伝染性紅斑、流行性耳下腺炎も飛沫・接触により感染するが、平年並みか、平年より

少なかった。他の小児科定点の感染症は毎年ほぼ一定以上の報告数があるが（図1-1）、手足口病、伝染性紅斑、流行性耳下腺炎には流行の周期があり、非流行年の定点あたり報告数が10例以下と少なかった。

たためと考えられた(図1-2)。しかし、2020年の手足口病と流行性耳下腺炎の定点あたり報告数は過去5年間で最も少なく、伝染性紅斑は2番目に少なかったことから、これらの感染症もCOVID-19の予防対策による影響を受けたと考えられた。突発性発疹については、好発年齢が0~1歳であり、0歳児人口の減少とともに報告数は年々減少している<sup>6)</sup>。また、突発性発疹の感染経路は既感染成人からの唾液による水平感染と考えられており、COVID-19による予防対策の影響を受けにくかったと考えられた。細菌性髄膜炎、無菌性髄膜炎、マイコプラズマ肺炎、クラミジア肺炎(オウム病を除く)は300床以上の基幹定点医療機関からの報告であり、年間報告数が少ないため、今回はCOVID-19による影響について判断することはできなかった。

## 2.全数把握感染症(3類感染症及び4類感染症)

腸管出血性大腸菌感染症、E型肝炎、A型肝炎の主な感染経路は経口感染と考えられる。腸管出血性大腸菌感染症の報告数は、大阪府で平年より少なく、全国でかなり少なかった。手洗い、手指消毒の徹底により、人から人への感染が減少したことに加え、経口感染の機会が減少したと考えられた。食中毒統計資料によると、家庭での食中毒事件件数に変化はあまりないが、飲食店における食中毒事件件数も減少しており<sup>7)</sup>、外出自粛に伴う外食の機会の減少も影響したと考えられた。全国での報告数が平年並みであったE型肝炎は、食品の加熱調理が感染予防に重要であり<sup>8)</sup>、COVID-19による影響を受けなかったと考えられた。A型肝炎は、経口感染の他に同性間性的接触による感染も報告されているが<sup>9)</sup>、手洗いの徹底や外食の機会の減少などによる影響で平年より少なくなった可能性がある。

腸チフス、パラチフス、デング熱及びマラリアは輸入感染症であり、渡航制限により2020年の訪日外国人旅行者数及び日本人出国者数が減少しており<sup>10)</sup>、それに伴い報告数が減少したと考えられた。チクングニア熱も輸入感染症であるが、全国でも年間総数が10例未満の年があり、今回は比較が困難であった。細菌性赤痢の報告には、国内発生例と国外発生例があり、渡航制限による国外発生例の減少

が報告数の減少に影響したと考えられた。

日本紅斑熱、つつが虫病、ライム病及び重症熱性血小板減少症候群は節足動物媒介感染症である。これらの感染症については2020年の報告数に減少が認められず、日本紅斑熱、つつが虫病及びライム病の報告数は平年よりかなり多くなっている。COVID-19が流行している中で人との接触を避けるためキャンプ等の野外活動をする機会が増えた<sup>11)</sup>ことが理由の一つと考えられた。

## 3.全数把握感染症(5類感染症)

飛沫・接触により感染すると考えられる侵襲性髄膜炎菌感染症、侵襲性肺炎球菌感染症、水痘(入院例)、百日咳の報告数が平年よりかなり少なく、COVID-19による予防対策の影響を受けたと考えられた。大阪府で平年並み、全国で平年より少なかった侵襲性インフルエンザ菌感染症も飛沫感染する感染症であり、大阪府における2020年の報告数は過去5年間で最も少なかった。また全国では2015年以降年々増加傾向にあったが、2020年の報告数は2019年より半減しており、COVID-19の予防対策による影響を受けたと考えられた。飛沫あるいは飛沫核感染により感染する風しん及び麻しんの報告数は、大阪府、全国とも平年並みであった。風しんは、厚生労働省の報道発表資料<sup>12)</sup>によると、全国的に2018年第30週頃から増加し、2019年も報告数が多くなっていたが、2019年37週以降は20例を下回る報告数となっている。風しんは国外発生事例もあり、2020年の報告数は平年の約10分の1であり、COVID-19による影響があったことが示唆された。麻しんは過去において大きな流行があり、その後も散発的な発生が認められたが<sup>13)</sup>、2020年第24週以降発生はなかった。麻しんは、海外で感染し国内に持ち込まれることが多く、渡航制限による影響があったのではないかと考えられた。経口感染するアメーバ赤痢、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症は海外での感染事例も報告されていることから<sup>14)</sup>、手洗い・手指消毒や渡航制限によって報告数が減少したと考えられた。

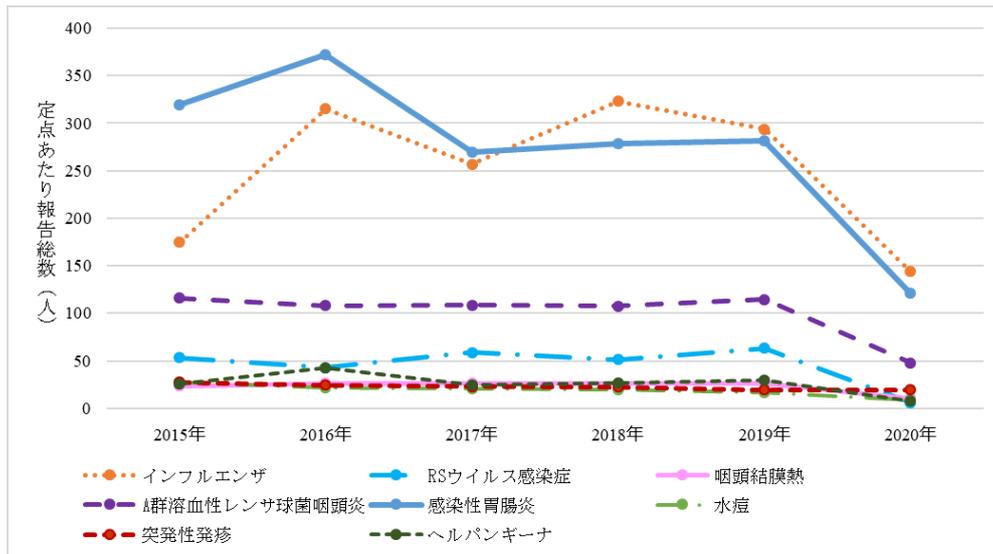


図 1-1 大阪府における 2015 年～2020 年の定点把握感染症定点あたり報告数（手足口病、伝染性紅斑、流行性耳下腺炎を除く）

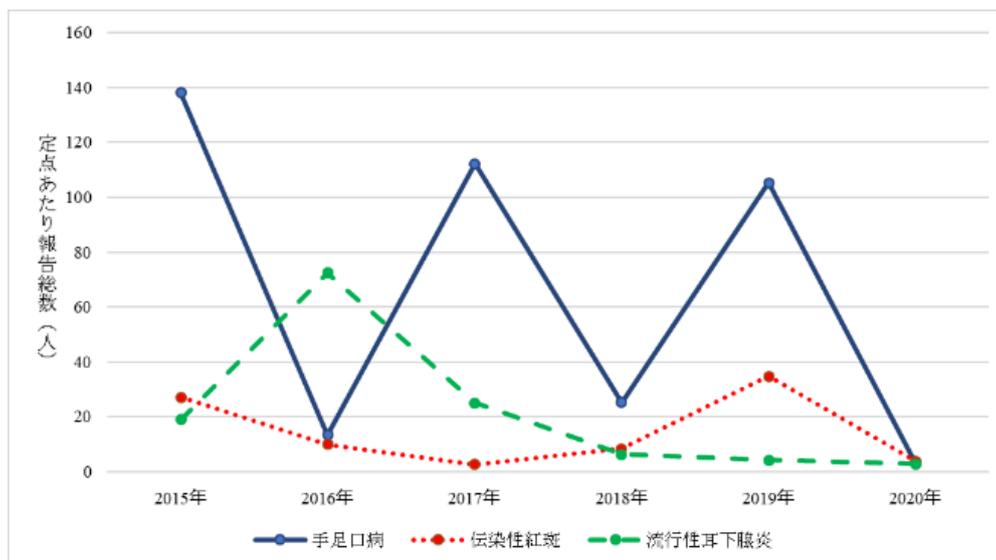


図 1-2 手足口病、伝染性紅斑、流行性耳下腺炎の大阪府における 2015 年～2020 年の定点把握感染症定点あたり報告数

#### 4. 性感染症

後天性免疫不全症候群の報告数は年々減少傾向にあったことに加え、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）の検査数が大きく減少したとの報告<sup>13)</sup>もあり、COVID-19の影響について判断することはできなかった。梅毒、性器ヘルペス、尖圭コンジローマ及び淋菌については2020年の報告数が平年並みであり、COVID-19の予防対策による影響はなかったと考えられた。一方で平年よりかなり多い報告数となった

性器クラミジアは全国において年々増加傾向<sup>16)</sup>であり、COVID-19の影響について判断することはできなかった。

#### 5. 薬剤耐性菌感染症

薬剤耐性菌であるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症、薬剤耐性アシネトバクター感染症及び定点把握感染症のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌、ペニシリン耐性肺炎球菌感染症、薬剤耐性緑

膿菌感染症は、大阪府及び全国の平年との比較において、平年よりかなり少ない感染症から平年よりかなり多い感染症までばらつきが大きく、今回はCOVID-19による影響について判断することはできなかった。

## ま と め

COVID-19と同様に飛沫・接触感染する感染症や経口感染する感染症は、COVID-19の感染予防対策であるマスク着用等の咳エチケット、手洗い・手指の消毒、身体的距離の確保等が感染予防に有効であることが示唆された。また、COVID-19の対策である渡航制限は輸入感染症を減少させた。

一方、3密（密閉、密集、密接）を避けるために増加したと考えられる野外活動は、節足動物媒介感染症の発生に影響したようである。性感染症の多くは平年並みの報告数でCOVID-19の予防対策は影響しなかったと考えられた。これらの感染症については、特有の感染予防対策が必要である。

2021年は、10歳未満の小児においてCOVID-19の流行中もライノウイルスの検出率が上昇したとの報告<sup>17)</sup>やRSウイルスによる感染症が増加しているとの報告<sup>18)</sup>がある。今後もCOVID-19以外の感染症の発生動向に注意し、COVID-19の流行による他の感染症への影響について検討していく。

## 謝 辞

大阪府感染症発生動向調査事業にご協力いただきました医療機関の方々及び関係機関の方々に深謝します。

## 利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) 厚生労働省. 感染症発生動向調査について.  
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/00115283.html>
- 2) Sherman AC, Babiker A, Sieben AJ, Pyden A, Steinberg J, Kraft CS, Koelle K, Kanjilal S. The Effect of Severe Acute Respiratory Syndrome

Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Mitigation Strategies on Seasonal Respiratory Viruses: A Tale of Two Large Metropolitan Centers in the United States. *Clin Infect Dis* 2020; **72**: 154-157

- 3) Yeoh DK, Foley DA, Minney-Smith CA, Martin AC, Mace AO, Sikazwe CT, Le H, Levy A, Blyth CC, Moore H. Impact of Coronavirus Disease 2019 Public Health Measures on Detections of Influenza and Respiratory Syncytial Virus in Children During the 2020 Australian Winter. *Clin.Infect.Dis* 2021; **72**: 2199-2202
- 4) Sakamoto H, Ishikane M, Ueda P. Seasonal Influenza Activity During the SARS-CoV-2 Outbreak in Japan. *JAMA* 2020; **323**: 1969-1971
- 5) Matthew A. Crane, Aleksandra Popovic, Rohan Panaparambil,, Andrew I. Stolbach,, John A. Romley,, Khalil G. Ghanem, Reporting of Infectious Diseases in the United States During the COVID-19 Pandemic *Clin.Infect.Dis* 2021;  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciab529>
- 6) 国立感染症研究所. 突発性発疹 2000～2020年. *IASR* 2020; **41**: 211-212
- 7) 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](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html)
- 8) 国立感染症研究所. 人獣共通感染症としてのE型肝炎. *IASR* 2014; **35**: 4-5
- 9) 国立感染症研究所. A型肝炎 2015～2019年3月現在. *IASR* 2019; **40**: 147-148
- 10) 国土交通省 訪日外国人旅行者数・出国日本人数  
[https://www.mlit.go.jp/kankochu/siryuu/toukei/in\\_ou\\_t.html](https://www.mlit.go.jp/kankochu/siryuu/toukei/in_ou_t.html)
- 11) やまごころ.jp. インバウンドニュース  
<https://www.yamatogokoro.jp/inboundnews/pickup/42274/>
- 12) 厚生労働省. 風しん対策（抗体検査）の実施率の向上策について.  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage\\_09247.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_09247.html)
- 13) 国立感染症研究所 麻疹 2020年2月現在. *IASR* 2020; **41**: 53-55
- 14) 国立感染症研究所. 日本の輸入感染症例の動向について 2021年1月19日更新版.  
[https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/imported/PDF/202101\\_WebupImportedIDs\\_final.pdf](https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/imported/PDF/202101_WebupImportedIDs_final.pdf)

- 15) 厚生労働省. 第155回エイズ動向委員会(令和2年第1・第2四半期) エイズ動向委員会委員長コメント. [https://api-net.jfap.or.jp/status/japan/data/2020/2009/20200915\\_coment.pdf](https://api-net.jfap.or.jp/status/japan/data/2020/2009/20200915_coment.pdf)
- 16) 国立感染症研究所. 性器クラミジア感染症の発生動向. 2019年  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/chlamydia-std-m/chlamydia-std-idwrs/10202-chlamydia-21jan.html>
- 17) Takashita E, Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Shimizu K, Ozawa H, Kumazaki M, Usuku S, Tanaka N, Okubo I, Morita H, Nagata S, Watanabe S, Hasegawa H, Kawaoka Y. Increased risk of rhinovirus infection in children during the coronavirus disease-19 pandemic. *Influenza Other Respi Viruses*. 2021; **15**: 488-494
- 18) 大阪府感染症情報センター. 大阪府感染症発生動向調査週報(速報) 2021年 第21週 5月24日~5月30日.  
<http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/surv21/topics21.pdf>

WEB サイトの内容は2021年6月21日に確認した。

### **Surveillance of infectious diseases in 2020 in Osaka Prefecture**

Yuka SATSUKI, Kazushi MOTOMURA, Yoko NISHIDA, Kensaku KAKIMOTO, Takayuki NISHIO,  
Takeshi MIYAMA, Nobuhiro IRITANI and Kazuo KOBAYASHI

SARS-CoV-2 has spread around the world in 2020. It had people change the behavior to prevent the spread of infection. We investigated surveillance data of infectious diseases based on National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases. We compared the number of reported infectious diseases in 2020 with that of 5 previous years to consider the impact of infection prevention measures for coronavirus disease 2019 (COVID-19). The number of infectious diseases reported for droplet, contact, oral transmissions and imported cases have decreased 2020 as compared with that of 5 previous years. Our findings suggest that prevention measures against COVID-19 (e.g. physical distancing, wearing a mask, washing hand, hygiene hands, avoiding the 3 Cs (i.e., crowded places, close-contact settings, and closed spaces) are effective against droplet, contact and oral transmissions.

Key words : surveillance of infectious diseases, coronavirus disease 2019, infection prevention measures,2020

## 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 (2020年度)

中田恵子<sup>a</sup>, 山中靖貴<sup>a</sup>, 本村和嗣<sup>b</sup>

2020年度の無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギーナ患者から検出されたエンテロウイルスはそれぞれ、エコーウイルス9型(1名)とエコーウイルス14型(1名)、コクサッキーウイルスA4型(2名)、同じくコクサッキーウイルスA4型(2名)であった。コクサッキーウイルスA4型の分離株のViral Protein 1領域を用いた系統樹解析の結果、2020年度の4株全てが同じクラスターに分類された。また、2020年度の株は、2018年の中国の株が最も近縁であった。新型コロナウイルス感染症(COVID-19)流行下で国内外の人流が制限され、既知の感染症患者が非常に少なく推移したシーズンでさえ、エンテロウイルス感染症では前シーズンの主流とは異なるウイルス型が主となり、系統樹解析では国外からのウイルスの流入が疑われた。今後も引き続きエンテロウイルス感染症の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」(以下、感染症法)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<sup>1)</sup>。また、ウイルス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<sup>2)</sup>ことや、流行するウイルス型が一定の周期で繰り返す傾向が認められるため<sup>3)</sup>、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、2020年4月1日から2021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

2020年4月1日から2021年3月31日の期間に、大阪府内(ただし大阪市および堺市を除く)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18名から採取された33検体を対象とした。検体種別の内訳は髄液が8検体、咽頭ぬぐい液(鼻汁含む)が15検体、便(腸内容物含む)が6検体、その他が4検体(血清が1検体、尿が2検体、水疱内容物が1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10%FBSを添加したイーグルMEM培地(日水製薬株式会社)で培養し、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。咽頭ぬぐい液は、綿棒で

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公衆衛生部

咽頭を擦過後、検体輸送用培地に浸漬した溶液（検体溶液）を、髄液は無処理でそれぞれ 100 µL ずつを各細胞に接種した。便（腸内容物含む）は、緩衝液（ラクトアルブミン水解物溶解液）で 10% 懸濁液（便乳剤）を作製し、15,000 rpm で 5 分間遠心分離後、その上清を同緩衝液で 10 倍希釈し、0.45 µm シリンジフィルターでろ過した溶液から 100 µL を各細胞に接種した。各細胞への検体接種後、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C の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 が出現した場合に陽性と判定し、培養上清を回収した。なお、3 代盲継代を繰り返し、CPE が出現しなかった場合を陰性と判定した。

### 3. 検体および培養上清からのウイルス遺伝子検出および系統樹解析

便乳剤の遠心上清およびその他の全ての検体からそれぞれ 200 µL を採取し、ウイルス RNA 抽出用検体とした。ウイルス RNA 抽出は、Magtration®-MagaZorb RNA Common Kit（PSS 社）を用いて、全自動核酸抽出装置 Magtration® System 6GC または 12GC（PSS 社）で行った。EV の Viral Protein（VP）4-2 領域に対する seminested RT-PCR<sup>4)</sup>を実施後、増幅産物のダイレクトシーケンスを実施し、BLAST 解析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 µL を採取し、上述の方法でウイルス RNA を抽出した。培養上清から抽出したウイルス RNA を用いて EV の VP1 領域に対する RT-PCR<sup>5)</sup>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。

4. 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 1310-05-5）、「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 8 名で、年齢の中央値は 2 か月（範囲：0 か月-14 歳 2 か月）、性別は男性 6 名、女性 2

名であった。手足口病と診断された患者は 7 名で、年齢の中央値が 1 歳 9 か月（1 歳 4 歳 5 か月）、性別は男性 1 名、女性 6 名であった。ヘルパンギーナと診断された患者は 3 名で、年齢の中央値は 2 歳 5 か月（1 歳 7 か月-2 歳 5 か月）、性別は男性 1 名、女性 2 名であった。

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 18 名分、33 検体のうち 6 名分、6 検体で EV が陽性となった。無菌性髄膜炎患者の 8 名中 2 名から EV の遺伝子が検出され、それぞれエコーウイルス 9 型（Echovirus9；E9）と E14 であった。両名ともに便検体でのみ陽性であった。手足口病では 7 名中 2 名から、ヘルパンギーナでは 3 名中 2 名から EV の遺伝子が検出され、全てコクサッキーウイルス A4 型（Coxsackievirus A4；CV-A4）と型別された。CV-A4 陽性検体では、遺伝子検出および培養細胞（RD-A 細胞でのみ）によるウイルス分離検査の双方で陽性となった（表 1、2、3）。

### 2. 疾患別月別の検出 EV の遺伝子型

無菌性髄膜炎患者からは 9 月に E14 が、1 月に E9 が検出された（図 1）。手足口病とヘルパンギーナ患者からは CV-A4 のみが検出されたが、検出時期は 9 月から 11 月までであった（図 2）。

### 3. CV-A4 の VP1 領域に対する系統樹解析

CV-A4 の分離株 4 株について、ウイルス抗原決定領域である VP1 領域（解析が可能であった 661 塩基）の系統樹解析を実施した。その結果、2020 年度株の 4 株は同じクラスターを形成し、2018 年の中国株に最も近縁であった。また、2020 年度株は、過去の当センター分離株とは独立したクラスターを形成し、当センター分離株では 2018 年度株よりも 2016 年度株が近縁であった（図 3）。

## 考 察

2020 年度の EV 感染症の流行状況は非常に低調であった。季節性に毎年流行する他のウイルス感染症の流行が非常に低調であったのと同様に、COVID-19 の世界的な感染拡大の影響による人々の行動変容、受診抑制、マスクや手洗いなどのウイルス感染防止策を実行したことが要因として考えられる。また、緊急事態宣言の発令に従い、人流が抑制され、休園や休校措置により EV 感染症の好発年

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 (鼻汁含む) (n=5)		便 (腸内容物含む) (n=6)		髄液 (n=8)		その他 (n=3)	
	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	遺伝子検査	分離培養
E9	0	0	1	0	0	0	0	0
E14	0	0	1	0	0	0	0	0
合計 (%)	0	0	2 (33)	0	0	0	0	0

その他：血清<sup>1</sup>、尿<sup>2</sup>

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=7)		その他 (n=1)	
	遺伝子検査	分離培養	遺伝子検査	分離培養
CV-A4	2	2	0	0
合計 (%)	2 (29)	2 (29)	0	0

その他：水疱内容物

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=3)	
	遺伝子検査	分離培養
CV-A4	2	2
合計 (%)	2 (67)	2 (67)

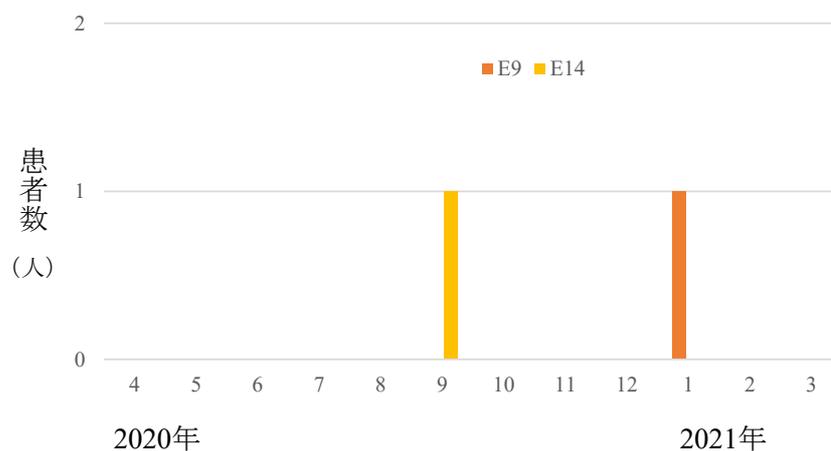


図 1. 無菌性髄膜炎患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

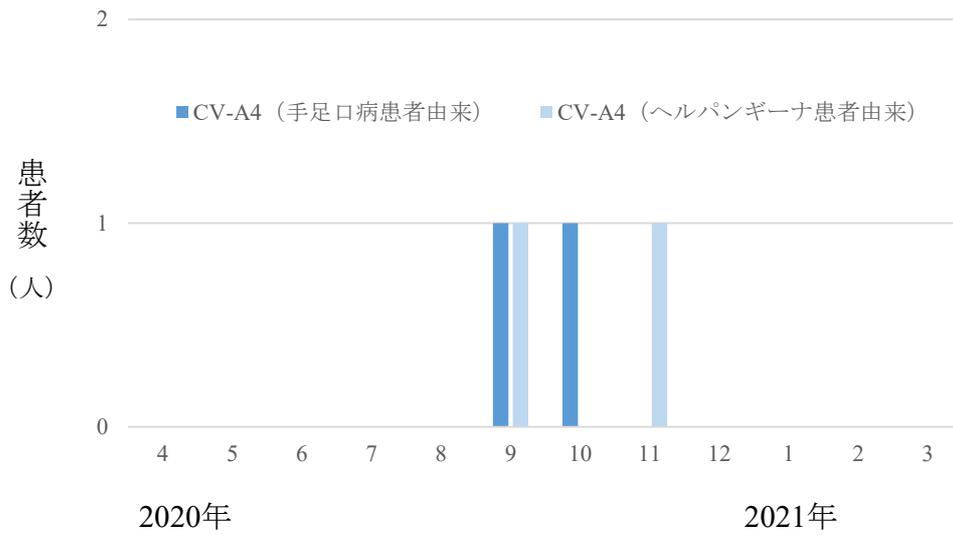


図2. 手足口病およびヘルパンギーナ患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

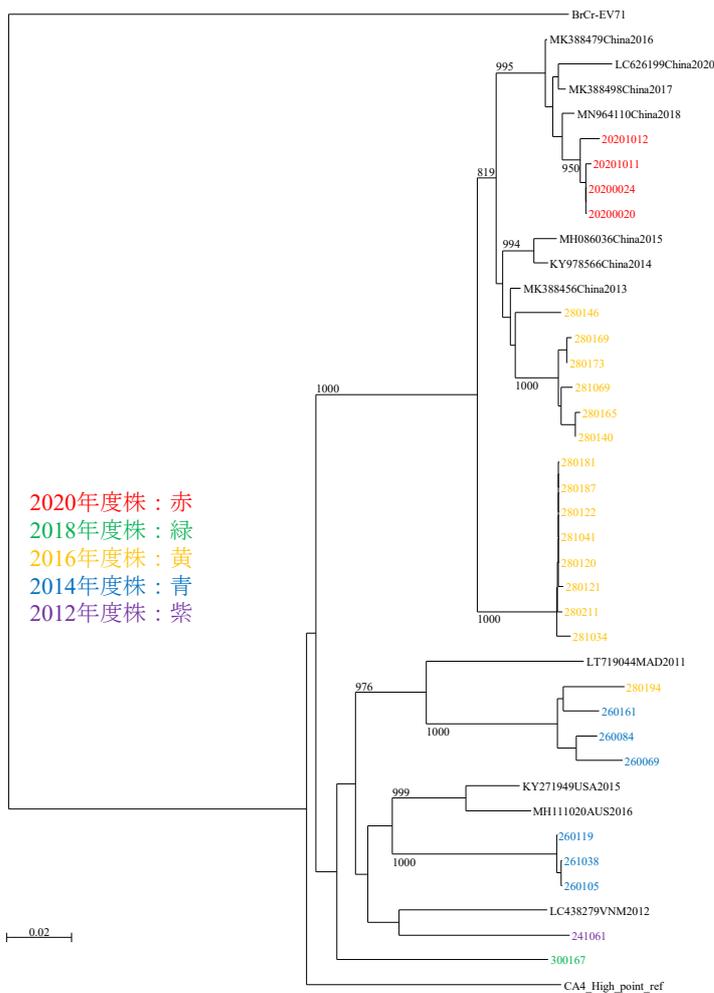


図3. CV-A4 のVP1 領域に対する系統樹解析 (661 塩基)

齢である乳幼児や学童幼児の接触が減少したことも大きく関与していると考えられる。

このような状況下においても無菌性髄膜炎患者からは E9 と E14 が検出された。E9 は 2013 年度以降、E14 は近年 10 年間、当センター搬入の無菌性髄膜炎疑い患者検体からは検出されていない<sup>6-11)</sup>。無菌性髄膜炎は症候群として診断されるため一定の疫学パターンをとらないが、ウイルスが原因となる場合は、EV の占める割合が高いことから、基本的な発生動向は EV の流行状況を反映するとされている<sup>12)</sup>。無菌性髄膜炎の全国規模の流行は、1983 年、1989-1991 年、1997-1998 年に発生した E30 によるものが知られているが、その後は E9、E13、E30 などによる集団発生事例が地域的に報告されている<sup>13)</sup>。国内では長期間、EV による無菌性髄膜炎の大規模な流行は発生していないため、無菌性髄膜炎の原因となる EV に対する抗体を保有していない感受性者の増加による大規模な流行が懸念される。引き続き、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。

手足口病およびヘルパンギーナの患者からは CV-A4 が検出された。CV-A4 が検出された全ての検体から分離株が得られ、VP1 領域の分子系統樹解析が実施可能であった。当センターでは、2012 年度以降隔年で CV-A4 が分離されている。例年、手足口病やヘルパンギーナ患者からは初夏から盛夏に EV の検出が目立つが、2020 年度の CV-A4 の検出は 9 月からと、秋以降となった。2020 年度は検体数が非常に少なかったため、この現象の原因の詳細は不明だが、COVID-19 の感染拡大に伴う、好発の年齢層の接触機会の変化が影響している可能性が推測される。CV-A4 の系統樹解析の結果では、2020 年度の分離株は全て同じクラスターに分類され、過去の当センター分離株のクラスターとは独立していた。また、2020 年度 CV-A4 の分離株は 2018 年の中国株 (MN964110 China2018) と最も近縁関係にあり、2016、2017、2020 年の中国株が過去の当センター分離株より近縁であった。国内では、CV-A4 が分離されていなかった年度には CV-A6 等の他の EV が主流となっていたことから、毎年の主流 EV は夏季を中心としたシーズンで一旦終結し、次のシーズンには中国などの近隣アジア諸国から国内に流入した株が関与して広がる可能性が示唆された。

2020 年度は COVID-19 感染拡大防止のため、国

外からの人流は大きく抑制された。しかし、無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナの疑い患者からは 2019 年度とは異なる型の EV が検出され、CV-A4 に関しては系統樹解析の結果から国外からのウイルスの流入が強く疑われた。EV は、不明熱をはじめとする軽症事例や不顕性感染を引き起こすことが広く知られている。完全な人流抑制が不可能である場合は、国外からウイルスの侵入をコントロールすることは困難であると考えられた。

COVID-19 感染防止対策下で EV 感染症の患者は少なく抑えられたシーズンでも、国外からのウイルスの流入が示唆された。EV 感染症は、流行するウイルスの型によって症状や疫学的動向も異なり、抗体保有状況によっては大規模な流行も懸念される。今後も引き続き、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。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深謝いたします。

#### 利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

#### 文 献

- 1) Heinz Z, 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* 2018 doi: 10.1016/j.ejpn.2018.04.007.
- 3) 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, 奥那覇麻理, 栄賢司. 遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定. *臨床とウイルス* 1999; 27(4): 283-93.
- 5) 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.
- 6) 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研究報告 (平成 27 年度)*. 2015; 7-14.
- 7) 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感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2015 年度). *大阪府立公衆衛生研究所研究報告 (平成 28 年度)*. 2016; 9-16.
- 8) 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.
- 9) 中田恵子, 弓指孝博. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2017 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (平成 30 年度)*. 2018; 1-8.
- 10) 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 感染症の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.
- 11) 中田恵子, 本村和嗣. 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). *大阪健康安全基盤研究所研究年報 (令和 2 年度)*. 2020; 1-8.
- 12) 国立感染症研究所. 無菌性髄膜炎とは. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/520-viral-meningitis.html>
- 13) 国立感染症研究所. IASR Vol.39p89-90:2018 年 6 月号. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/viral-meningitis-m/viral-meningitis-iasrtpc/8085-460t.html>

WEB サイトの内容は 2021 年 8 月 4 日に確認した。

**Epidemic Situation and molecular-epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2020 Report)**

Keiko NAKATA, Yasutaka YAMANAKA and Kazushi MOTOMURA

From April 2020 to March 2021, multiple type enteroviruses were detected and obtained from specimens of aseptic meningitis, hand-foot-and-mouth disease, and herpangina patients. The types of viruses detected were Echovirus9 and Echovirus14 from each one patient with aseptic meningitis, and CV-A4 was detected from two patients with hand-foot-and-mouth disease and herpangina, respectively. The phylogenetic trees constructed by using partial sequences at the viral protein 1 region showed that the CV-A4 isolates of the 2020 epidemic formed a single cluster. Also, the 2020 epidemic strains of CV-A4 were most closely related to the 2018 China strain. In 2020 season, the domestic and international movement was severely restricted to prevent the spread of coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection outbreak. Nevertheless, as a result of phylogenetic tree analysis of CV-A4, it was suspected that viruses were imported from overseas. It is necessary to continue the pathogen surveillance.

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

## 大阪府の食中毒事例で検出されたノロウイルス流行状況と分子疫学的解析 (2019・2020年度)

白井達哉<sup>a</sup>, 左近直美<sup>a</sup>, 高田利香<sup>b</sup>, 本村和嗣<sup>c</sup>

2019年度、当課で検査した食中毒事例51事例中21事例(41.2%)からノロウイルスを検出した。2020年度は32事例中3事例(9.4%)であり、ノロウイルス陽性事例数は2019年度比85.7%の減少であった。ノロウイルス陽性事例から数検体を選択し、ORF1のRdRpコード領域とORF2のVP1コード領域の部分遺伝子解析を行い、遺伝子型を決定した。2019年度には8種類が検出され、そのうち最も多く検出された遺伝子型はGII.4[P31](7事例、33.3%)、次いでGII.2[P16](5事例、23.8%)であった。2020年度はGII.2[P16](2事例、66.7%)及びGII.17(P-Type不明、1事例、33.3%)の2種類に留まり、2002年度以降毎年検出されてきたGII.4は検出されなかった。

2019年度のGII.4[P31]及びGII.4[P16]についてVP1コード領域(1623塩基)を解析した。アミノ酸配列を過去のGII.4 variantと比較したところ、1995年以降のパンデミックに影響したと推察されるアミノ酸5箇所全てにおいて、2012年に出現したGII.4 Sydney 2012 variantと一致していた。

キーワード：ノロウイルス、食中毒、遺伝子型、VP1

ノロウイルスは冬季を中心に嘔吐や下痢などを引き起こす感染性胃腸炎の起因ウイルスである<sup>1)</sup>。例年世界中の5歳以下の小児の約7万人が死亡し、社会経済的損失は6兆円に達すると推計される<sup>2)</sup>。食中毒の原因として最も多く患者を出す病原体であり<sup>3)</sup>、流行状況の把握は食品衛生管理において重要である。

ノロウイルスはカリシウイルス科に分類され、エンベロープはなく、約7.5kbのプラス一本鎖RNAゲノムを持つ。ゲノムは3つのORF(Open-Reading-Frame)で構成されており、ORF1はRNA-dependent-RNA-polymerase(RdRp)などの非構造タンパク、ORF2及びORF3はそれぞれ構造タンパクVP1及びVP2をコードする。ノロウイルスはVP1のアミノ酸配列により大きく10種(GI-GX)の遺伝子群(Genogroup)に分類され(VP1 typing)、さらに48以上のGenotypeに分類される。人に感染する主なGenogroupはGIとGIIである。また、ORF1の3'

端に位置するRdRpコード領域のアミノ酸配列に基づき、VP1同様にP-groupに分けられ(RdRp typing)、60以上のP-typeに分類される。ORF1とORF2の間では遺伝子組換えが起こることが知られており、これが大きな流行につながると考えられている<sup>4,5)</sup>ため、GenotypeとP-type両方の解析(Dual-typing)が推奨されている<sup>6)</sup>。

パンデミックと呼ばれる世界的な流行を何度も起こしてきた遺伝子型であるGII.4だが<sup>7)</sup>、2012年のGII.4 Sydney 2012 variant(GII.4[P31])によるもの以降は起きていない。2016年にはGII.4 Sydney 2012 variantがORF1/2間での組換えを起こしたGII.4[P16]が世界各地で検出されたが、パンデミックと呼べるほどの拡大には至らなかった。

GII.4のVP1コード領域に関しては、モノクローナル抗体を用いたエピトープマッピングで得られたエピトープ(Motif/Antigenic site A、C、D、E及びG)の中から、HBGA blockade assayや分子疫学

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪府茨木保健所

c 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部

的解析を通じて、過去の GII.4 variant による世界での感染拡大に関わる 5 つのアミノ酸部位が推定されており、それが VP1 アミノ酸配列の 352、355、357、368 及び 378 番目 (以下、5 amino acid residues) とされている<sup>8,9)</sup>。これらについて、GII.4 Sydney 2012 variant に関しては GII.4[P31] (Accession number (ACN) : JX459908) と GII.4[P16] (ACN : LC175468) に差異は認められていない。

2019 年度及び 2020 年度の食中毒事例において検出されたノロウイルスについて、Dual-typing による遺伝子型別及び VP1 コード領域のアミノ酸配列解析の結果とその特徴について報告する。

## 調査方法

### 1. 検査材料

2019 年度に当課で検査した食中毒事例 (疑い、有症苦情、他府県依頼分を含む) 51 事例のうちノロウイルス遺伝子が検出された 21 事例、及び 2020 年度の 32 事例のうちノロウイルス遺伝子が検出された 3 事例を対象とした。遺伝子の検出は、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル<sup>10)</sup>に準拠したリアルタイム PCR により実施した。

また、2012 年度から 2018 年度にかけて発生した食中毒事例について当課で検査し、ノロウイルスが検出された計 363 事例を比較対象とした。

### 2. ノロウイルスの遺伝子解析

各ノロウイルス陽性事例から数検体を選択し、遺伝子解析を行った。Dual-typing による遺伝子解析のために、ORF1 の RdRp コード領域及び ORF2 の VP1 コード領域に対し、ノロウイルス GI は Mon432/G1-SKR、ノロウイルス GII は Mon431/G2-SKR のプライマーを用いて RdRp/VP1 typing 領域を増幅した<sup>10)</sup>。検体のコピー数が少なく Dual-typing が適用できなかった事例については、ノロウイルス GI は G1-SKF/G1-SKR、ノロウイルス GII は G2-SKF/G2-SKR のプライマーを用いた conventional PCR もしくは semi-nested PCR により VP1 typing 領域を増幅した<sup>10)</sup> (図 1)。目的とする PCR 増幅産物は電気泳動で確認した後、ゲルを切り出して遠心しその上清を精製水で希釈して用いた。BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Norovirus Typing Tool Version 2 (<http://www.rivm.nl/m>

pf/typingtool/norovirus/) により遺伝子型を決定した。

2012 年度から 2018 年度の食中毒のノロウイルス陽性事例については、VP1 typing 領域のデータを用いた。

### 3. ノロウイルス GII.4 の VP1 コード領域のアミノ酸配列解析

2019 年度にノロウイルス GII.4 が検出された検体の一部について、COG2F/TX30SXN のプライマー<sup>11)</sup>を用いて PCR を行い、前述と同様にダイレクトシーケンス法により VP1 コード領域の全塩基配列 (今回解析した検体について 1623 塩基) を決定した (図 1)。アミノ酸配列に変換したのちに、過去の GII.4 variant と比較した<sup>8,9,12)</sup>。比較対象となる variant には表 2 の代表株を用い、GII.4 Sydney 2012 variant については GII.4[P31] と GII.4[P16] の両方の代表株を用いた。

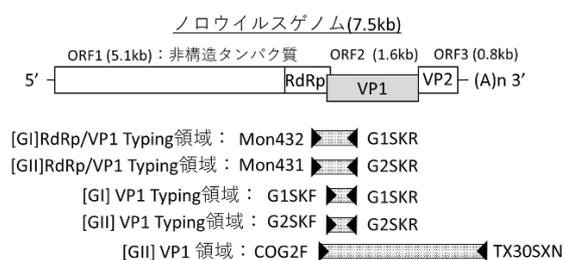


図 1 ノロウイルスゲノム構造と解析領域

4. 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 0710-03-4)、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施したものである。

## 結果

### 1. ノロウイルスの検出状況

食中毒事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型別月別の検出状況を表 1 に示す。2019 年度に確認された遺伝子型は Genotype 不明であったものを除いて 8 種類あり、GII.4[P31]が 7 事例 (33.3%)、GII.2[P16]が 5 事例 (23.8%)、GII.17[P17]、GI.4[P4] 及び GII (Genotype 及び P-Type 不明) がそれぞれ 2 事例 (9.5%)、GII.4[P16]、GII.6[P7]、GI.2 (P-type 不明) 及び GI.7 (P-type 不明) がそれぞれ 1 事例 (4.8%) であった。GII.17[P17]と GI.2 (P-type 不明) が検出された事例のうちの 1 つは混合事例 (同一事例において複数の遺伝子型を検出) であり、1 検体のみの

検査で2種類が検出された。

2019年度は、2020年3月に最も事例数が多く、2019年12月から2020年3月までに事例の61.9%が発生した。月別にみると、2019年4月から11月まではGII.4[P31]の検出は1事例に留まったが、2019年12月以降6事例確認され、主に冬春季に検出された。GII.4[P31]は2019年12月から2020年3月の事例の46.2%を占めた。これに対し、GII.2[P16]は2019年4月、5月、11月及び2020年3月に検出されており、明確な季節性が見られなかった。

2020年度に確認された遺伝子型は2種類に留まり、GII.2[P16]が2事例(66.7%)、GII.17(P-type不明)が1事例(33.3%)であった。前年度に陽性事例数が最も多かったGII.4[P31]は検出されなかった。2020年4月から2020年11月まで検出はなく、2020年12月、2021年2月と3月にそれぞれ1事例で検出された。

## 2. ノロウイルス陽性事例数と検出された Genotype の変化 (2012年度～2020年度)

2012年度以降2020年度までの、ノロウイルスが検出された事例数の変動及び Genotype の内訳を図2に示した。対象期間のノロウイルス陽性事例数は387事例で、最も多く検出された Genotype はGII.4で129事例(33.3%、混合事例を除く。)であった。GII.4に次いでGII.17が64事例(16.5%)、GII.2が50事例(12.9%)の順に多かった。GIIについては、前述の3つの他に8つの Genotype (GII.1、GII.3、GII.6、GII.7、GII.11、GII.12、GII.13及びGII.14)が検出され、Genotype が確認されていない事例(GII ND: Not Defined)が69事例あった。一方、GIについては2013年度の7事例が最多となり、2012年以降に9つの Genotype (GI.2、GI.3、GI.4、GI.5、GI.6、GI.7、GI.11及びGI.14)が検出された。図2に各年度のGII.4、GII.17、GII.2、GIIその他、GII ND、GI及び混合事例の内訳を示した。2014年度はGII.17が41.3%(26/63事例)、2016年度、2018年度及び2020年度はGII.2がそれぞれ44.2%(23/52事例)、34.4%(10/29事例)及び66.7%(2/3事例)となり最も多い Genotype であったが、その他の年度はGII.4が最も多く検出され、2019年度まで毎年検出された。ノロウイルス陽性事例数は減少傾向であり、2019年度は2012年度以降で2020年度に次いで2番目に少なく、最も少なかった2020年度は3事例で前年度(21事例)に対して85.7%減少した(図2)。

## 3. ノロウイルス GII.4 の VP1 コード領域のアミノ酸配列解析

2019年度に検出されたGII.4[P31]の3株及びGII.4[P16]の1株のアミノ酸配列(540塩基)を解析した。また、そのエピトープのアミノ酸配列(31残基)を過去のGII.4 variant と比較し、表2に示した。

GII.4[P31]の3株のVP1アミノ酸配列相同性は99.8～100%であり、比較した全てのエピトープのアミノ酸配列が一致した。GII.4[P31]とGII.4[P16]の相同性は97.4～97.6%であり、エピトープの比較ではエピトープGで配列が一致したが、エピトープAの297、372及び373番目、エピトープCの377番目、エピトープDの393番目及びエピトープEの414番目で差異が見られた。

GII.4[P31]は過去のvariantと比較してGII.4 Sydney 2012 variant(GII.4[P31])との相同性が98.1～98.3%と最も高く、エピトープ領域ではエピトープAの297、372及び373番目、エピトープEの414番目で差異が見られた。また、GII.4[P16]は過去のvariantの中でGII.4 Sydney 2012 variantのリコンビナント(GII.4[P16])との相同性が99.6%と最も高く、エピトープ領域ではエピトープCの377番目のみ差異が見られた。

2019年に検出された株の5 amino acid residues は、GII.4[P31]とGII.4[P16]のいずれもGII.4 Sydney 2012 variantと完全に一致した(表2)。

## 考 察

2019年度及び2020年度に食中毒事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型を解析した。2019年度はGII.4[P31]が多かったが、2020年度にはGII.4は検出されなかった。これは2002年度以降、当課の食中毒事例の遺伝子解析において初めてのことであった<sup>13)</sup>。

ノロウイルスはORF1/2間の遺伝子組み換えなどをきっかけとした、VP1コード領域の変異が大きな流行の一要因と考えられている<sup>5)</sup>。GII.4についてはVP1エピトープ上のアミノ酸変異の研究が進められ、5 amino acid residuesの変異が過去のGII.4 variantの世界的な感染拡大に関わったと推察されている<sup>8)</sup>。

2019年度に検出したGII.4[P31]及びGII.4[P16]を比較すると、エピトープA、C、D及びEのアミノ酸配列に差異が見られた。RdRpの違いがこのような違いを生み出している可能性があり、Dual-typing

表1 月別ノロウイルス遺伝子型検出状況（2019年度及び2020年度）

年度	年 月	ノロウイルス 陽性事例数	遺伝子型											
			GII.4 [P31]	GII.4 [P16]	GII.2 [P16]	GII.17 [P17]	GII.17*	GII.6 [P7]	GI.4 [P4]	GI.2*	GI.7*	GII ND**		
2019	4月	3	1		2									
	5月	1			1									
	6月	1						1						
	7月	0												
	8月	2				1							1	
	9月	0												
	10月	0												
	11月	1			1									
	12月	2	1									1		
	2020	1月	2	1				1***				1***		
	2月	4	2		1								1	
	3月	5	2			1					2			
	計		21	7	1	5	2	0	1	2	1	1	2	
2020	4月	0												
	5月	0												
	6月	0												
	7月	0												
	8月	0												
	9月	0												
	10月	0												
	11月	0												
	12月	1			1									
	2021	1月	0											
	2月	1			1									
	3月	1					1							
	計		3	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	

\*: P-type不明    \*\*: Not Defined (Genotype、P-type不明)    \*\*\*: 同一事例から検出

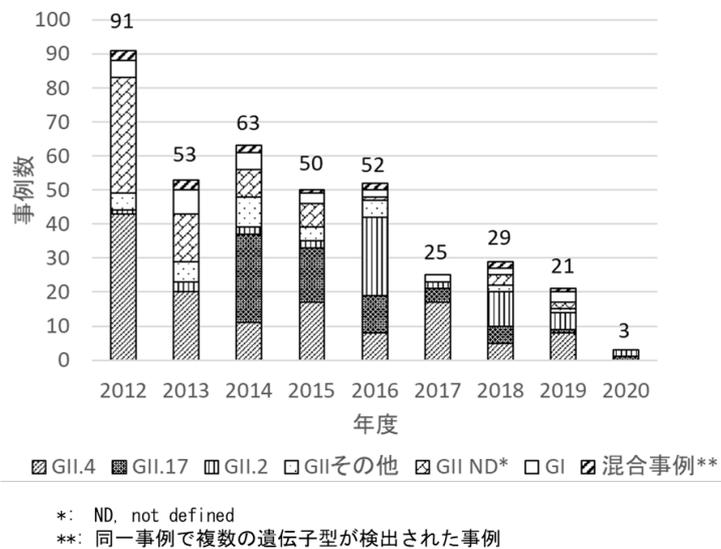


図2 ノロウイルス陽性事例数と検出された Genotype（2012年度～2020年度）

の重要性を示唆している。一方で 5 amino acid residues は一致しており、GII.4 Sydney 2012 variant と比較しても差異はなかった（表2）。これらのことから今回検出した株は感染拡大につながる変異は起こしていないと推察される。海外においては、新規の GII.4 Hong Kong variant が2017年以降にアジアやヨーロッパ圏で報告されており、これは 5 amino acid

residues のうち4箇所が GII.4 Sydney 2012 variant と異なっていた<sup>9)</sup>。現状 GII.4 Hong Kong variant による日本での感染拡大は確認されていないが、VP1 アミノ酸配列解析を通じて新しい変異株の侵入を早期に捉える必要がある。GII.4 Sydney 2012 variant は2012年度に世界に感染拡大し<sup>14)</sup>、大阪府や全国でのノロウイルス陽性事例数も増加した<sup>15,16)</sup>。しかし

表2 GII.4のVP1各エピトープのアミノ酸配列比較

	Name	Accession Number	Amino acid position																														
			Motif/Antigenic site A					Motif/Antigenic site C					Motif/Antigenic site D	Motif/Antigenic site E				Motif/Antigenic site G															
			294	295	296	297	298	368	372	373	339	340	341	375	376	377	378	393	394	395	396	397	407	411	412	413	414	352	355	356	357	359	364
GII.4 variant	Farmington Hills 2002	AY502023	A	G	T	H	N	N	N	R	G	D	F	E	T	G	N	G	T	H	Q	S	R	T	G	H	S	D	V	H	T	S	
	Hunter 2004	DQ078814	A	G	T	Q	N	S	S	N	R	R	D	F	E	T	G	S	T	T	H	Q	D	R	D	S	H	S	S	V	H	T	S
	Den Haag 2006	EF126965	A	G	S	R	N	S	E	N	K	G	D	F	E	T	H	S	T	T	H	R	S	R	N	V	H	Y	S	A	P	T	S
	Osaka 2007	AB434770	A	G	S	R	N	A	D	N	R	S	D	F	E	S	G	S	T	T	H	R	N	R	T	G	H	L	S	A	D	A	R
	New Orleans 2009	KX353972	T	G	S	R	N	A	D	N	R	T	D	F	E	T	N	G	T	T	H	R	S	R	N	T	H	Y	S	A	D	S	R
	Sydney 2012 (GII.4[P31])	JX459908	T	G	S	R	N	E	D	R	R	T	D	F	E	A	N	G	T	T	H	R	S	R	N	T	H	Y	S	A	D	A	R
	Sydney 2012 (GII.4[P16])	LC175468	T	G	S	R	N	E	D	H	R	T	D	F	E	A	N	S	T	T	H	R	S	R	N	T	H	Y	S	A	D	A	R
Hong Kong	MN400355	A	G	T	R	Q	G	E	D	K	G	D	L	Q	S	G	E	N	P	H	F	S	R	T	G	H	S	A	A	D	A	N	
Sample	19-177 (GII.4[P31])	LC645995	T	G	S	H	N	E	N	N	R	T	D	F	E	A	N	G	T	T	H	R	S	R	N	T	P	Y	S	A	D	A	R
	19-187 (GII.4[P16])	LC645996	T	G	S	R	N	E	D	H	R	T	D	F	E	V	N	S	T	T	H	R	S	R	N	T	H	Y	S	A	D	A	R
	19-219 (GII.4[P31])	LC645997	T	G	S	H	N	E	N	N	R	T	D	F	E	A	N	G	T	T	H	R	S	R	N	T	P	Y	S	A	D	A	R
	19-232 (GII.4[P31])	LC645998	T	G	S	H	N	E	N	N	R	T	D	F	E	A	N	G	T	T	H	R	S	R	N	T	P	Y	S	A	D	A	R

注：白抜き数字(Amino acid position)は特に重要とされる5つのアミノ酸残基を表す。

2012年度以降、GII.4は引き続き検出されてはいるものの、検出数が減少傾向にある。この点には5 amino acid residuesに変異が見られていないことが関連している可能性がある。GII.4は当課でも2002年度以降2019年度まで毎年検出されてきたGenotypeであり<sup>13)</sup>、ノロウイルス陽性事例数の変化に与える影響も大きい。そのためGII.4陽性事例数の減少がノロウイルス陽性事例全体の減少に影響していると推察される(図2)。エピトープの変異と流行の関連についてはGII.17についても示唆されており<sup>17)</sup>、GII.17やGII.2に関しても同様の解析を進めていきたい。

一方で、2007年に検出されたGII.4 Osaka 2007 variantや2017年のGII.4 Hong Kong variantのように5 amino acid residuesに変異が複数見られたにも関わらず(表2)、世界的な感染拡大には至っていないGII.4 variantも存在する。例えば、ウイルスゲノムの変異により、細胞内でのウイルスRNA複製や粒子形成などにも変化が起きる可能性がある。エピトープの変異だけでなくウイルスの感染及び増殖機構、公衆衛生を含めた包括的な研究が必要である。

ノロウイルスが検出された事例数が2020年度に顕著に減少したのは、新型コロナウイルス対策として大阪府に緊急事態宣言が発令され(1回目:2020年4月7日~5月21日、2回目:2021年1月13日~2月28日)、飲食店の休業あるいは時短営業が実施されたこと、加えて緊急事態宣言がノロウイルス流行期に相当していたことが大きく影響したと考えられた。厚生労働省から発表されている全国の食中毒発生状況においてもノロウイルス食中毒事例

数の顕著な減少が報告されており、2020年度(29件)は2019年度(183件)に比べて84.2%減少していた<sup>3)</sup>。これは当課でのノロウイルス陽性事例数の減少と同程度であった。

GII.4において流行に関わるとされるVP1コード領域の変異が起こっていないことに加え、新型コロナウイルス対策に伴う飲食店の休業あるいは時短営業、個々人の手洗いやマスクなど衛生対策意識の向上によりノロウイルス流行は2020年度に大きく抑えられたと推察された。しかし、新型コロナウイルス流行が終息し社会活動が活発になった後、流行規模の拡大や、これまで流行期とされていなかった季節での流行が懸念される。加えて新たな変異株の出現には注意が必要であり、ORF1/2間の遺伝子組換えを探知するためのDual-typingやVP1アミノ酸配列の情報を集積し、その変化や動向をいち早く捉えることが引き続き重要である。

### 利益相反

開示すべき利益相反はない。

### 文献

- 1) R Green KY. (eds. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B and Straus SE). *Caliciviridae: The Noroviruses. Fields Virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 949-979.*
- 2) Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY.

- Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS One* 2016; **11**(4): e0151219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219>
- 3) 厚生労働省 4.食中毒統計資料. [http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html)
- 4) Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**(7): 1079-1085.
- 5) Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol* 2013; **87**(11): 6270-6282.
- 6) Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, Wang Q, White PA, Katayama K, Vennema H, Koopmans MPG, Vinje J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol* 2019; **100**(10): 1393-1406.
- 7) Parra GI. Emergence of norovirus strains: A tale of two genes. *Virus Evol* 2019, **5**(2):vez048 <https://doi.org/10.1093/ve/vez048>
- 8) Tohma K, Lepore CJ, Gao Y, Ford-Siltz LA, Parra GI. Population Genomics of GII.4 Noroviruses Reveal Complex Diversification and New Antigenic Sites Involved in the Emergence of Pandemic Strains. *mBio* 2019; **10**(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02202-19>
- 9) Chan MC, Roy S, Bonifacio J, Zhang LY, Chhabra P, Chan JCM, Celma C, Igoy MA, Lau SL, Mohammad KN, Vinje J, Vennema H, Breuer J, Koopmans M, de Graaf M, for Noropatrol. Detection of Norovirus Variant GII.4 Hong Kong in Asia and Europe, 2017-2019. *Emerg Infect Dis* 2021; **27**(1): 289-293.
- 10) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル ノロウイルス (第1版) 令和元年6月 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf>
- 11) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 2008; **82**(22): 11247-11262.
- 12) Mallory ML, Lindesmith LC, Graham RL, Baric RS. GII.4 Human Norovirus: Surveying the Antigenic Landscape. *Viruses* 2019; **11**(2). <https://doi.org/10.3390/v11020177>
- 13) Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, Mantani M, Kase T, Takahashi K, Komano J. Impact of genotype-specific herd immunity on the circulatory dynamism of norovirus: a 10-year longitudinal study of viral acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 2015; **211**(6): 879-888
- 14) 国立感染症研究所. ノロウイルス遺伝子型GII.4変異型の急速な拡大. *IASR Vol.34* p45,48: 2013年2月号 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrf/3180-fr3964.html>
- 15) 高田利香, 左近直美, 中田恵子, 本村和嗣, 弓指孝博. 大阪府における食中毒事例から検出されたノロウイルスの流行状況と分子疫学的解析 (2016年度). 大阪健康安全基盤研究所研究年報 平成29年度 2017; **1**: 10-19.
- 16) 高田利香, 左近直美, 中田恵子, 本村和嗣, 弓指孝博. 大阪府における食中毒事例から検出されたノロウイルスの流行状況と分子疫学的解析 (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**: 10-16.
- 17) Yi Y, Wang X, Wang S, Xiong P, Liu Q, Zhang C, Yin F, Huang Z. Identification of a blockade epitope of human norovirus GII.17. *Emerg Microbes Infect* 2021; **10**(1): 954-963.
- WEB サイトの内容は 2021 年 5 月 25 日に確認した。

**Epidemic and molecular epidemiological analysis of norovirus outbreaks in case of food poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2019 • 2020 report)**

Tatsuya SHIRAI<sup>a</sup>, Naomi SAKON<sup>a</sup>, Rika TAKADA<sup>b</sup> and Kazushi MOTOMURA<sup>a</sup>

Norovirus is a leading cause of acute gastroenteritis in the world. In 21 out of 51 suspected foodborne outbreaks, noroviruses were detected in our tests during the 2019 season (April 2019 to March 2020). We detected noroviruses in 3 out of 32 cases during the 2020 season, and norovirus-detected cases decreased by 85.7% compared to the previous season. We conducted comprehensive genome analysis to perform a molecular epidemiological study. A dual-typing (Genotype and P-type) system is proposed for GI and GII noroviruses using partial regions of the ORF1 RdRp encoding region and ORF2 VP1 encoding region. In the 2019 season, GII.4[P31] (7/21, 33.3%) and GII.2[P16] (5/21, 23.8%) were found to be prevalent. On the one hand, only two genotypes, GII.2[P16] and GII.17 were detected and GII.4 viruses were not detected in the 2020 season. Four strains of GII.4 detected in the 2019 season (3 of GII.4[P31] and one of GII.4[P16]) were analyzed sequences of the full-length VP1 region(540aa). A recent large-scale sequence analysis and antibody blockage confirmation study proposed a set of 5 amino acid residues on VP1 that are influential in the emergence and replacement of pandemic GII.4. Norovirus GII.4 Sydney 2012 variant, has been circulated from 2012 in the world. We observed that all 5 residues on GII.4[P31] and GII.4[P16] strains analyzed in this study have no substitution compared with GII.4 Sydney 2012 variant.

Key words : norovirus, food poisoning, genotype, VP1

---

a Osaka Institute of Public Health

b Ibaraki Public Health Center, Osaka

## 大阪市におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症 サーベイランス (2015 年～2020 年)

梅田 薫<sup>a</sup>, 秋吉充子<sup>a</sup>, 柴川紗恵子<sup>a</sup>, 平井佑治<sup>a</sup>, 中村寛海<sup>a</sup>, 説田 景<sup>b</sup>, 吉田英樹<sup>b</sup>

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) は多様な感染症を引き起こし、5 類感染症に指定されている。中でもカルバペネマーゼ産生菌は治療が困難な上に院内感染の原因となりうる。2015 年～2020 年に大阪市保健所に届出された CRE 感染症の内、54 医療機関由来の分離菌株 262 株について、疫学情報集約や耐性遺伝子検出等によるサーベイランスを行った。CRE 患者は高齢者に多く、菌株数は 2018 年より増加傾向にあった。262 株中カルバペネマーゼ産生菌は 76 株 (29%) であった。*Klebsiella pneumoniae* および *Escherichia coli* ではカルバペネマーゼ産生菌の割合が 60%以上であったのに対して、*Enterobacter cloacae*、*Klebsiella aerogenes*、*Serratia marcescens* では 10%未満であった。カルバペネマーゼ遺伝子は近畿地方で多く検出される IMP-6 が多数を占め、大阪市内での長期的な流行と多菌種への拡散が示唆された。他に IMP-1 の持続した検出、KHM-1 や IMP-1 と GES-5 の同時保有株といった稀なカルバペネマーゼ遺伝子の検出が認められた。また、メロペネムに耐性を示すことがカルバペネマーゼ産生菌の鑑別に有効なことが分かった。

キーワード：薬剤耐性菌、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)、カルバペネマーゼ産生菌、IMP 型

薬剤耐性菌が世界中に拡大し、問題となっている。このまま対策が行われなければ、2050 年には耐性菌によって亡くなる人の数が世界で年間 1000 万人に達するとの試算がある<sup>1)</sup>。国際的には 2015 年に WHO 総会で薬剤耐性 (AMR) に関するグローバルアクションプランが採択され、国内でも 2016 年に AMR 対策アクションプランが策定された<sup>1)</sup>。重要項目の 1 つとして耐性菌サーベイランスの強化が挙げられている。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) は、グラム陰性菌による感染症の治療において最も重要な抗菌薬であるカルバペネム系抗菌薬および広域β-ラクタム剤に対して耐性を示し、しばしば、院内感染の原因となる<sup>2)</sup>。2014 年 9 月には、CRE 感染症が感染症法に基づく感染症発生動向調査の 5 類全数把握疾患に追加された<sup>3)</sup>。CRE の中でも、カルバペネム分解酵素であるカルバペネマーゼを産生する菌は、複数の系統の薬剤に汎耐性を示すことが

多く、プラスミド上に存在するカルバペネマーゼ遺伝子は水平伝達により別の菌種にまで拡散されることから、臨床上的問題となっている<sup>2)</sup>。

カルバペネマーゼ遺伝子にはいくつかの種類があり、国内で多く検出される IMP 型、海外で広がっている NDM 型、KPC 型、OXA-48 型などが知られている<sup>2)</sup>。その分布には地域特異性が見られることから、地域での流行状況を把握して医療機関等に情報を還元することが求められている。2017 年 3 月には、CRE 感染症の届出があった際には、地方衛生研究所等において分離菌株のカルバペネマーゼ産生性の確認や耐性遺伝子検出等の試験検査を実施する旨が厚生労働省より通知された<sup>4)</sup>。

大阪市では本通知に先駆けて、2015 年より市内医療機関で発生した CRE 感染症の分離菌株を収集し、疫学情報の集約および各種試験検査によるサーベイランスを実施してきた。本稿では、2015 年～2020 年の 6 年間にわたるサーベイランスにより得られ

a 大阪健康安全基盤研究所 微生物部 微生物課

b 大阪市保健所

た結果として、CRE 感染症届出状況、CRE 菌株数およびカルバペネマーゼ産生菌株数の年次推移、菌種内訳、カルバペネマーゼ遺伝子検出状況等について報告する。

## 材 料 と 方 法

### 1. 供試菌株

2015年4月から2020年12月までに、感染症法に基づき大阪市保健所に届出がなされたCRE感染症例のうち、54か所の医療機関より提供されたCRE菌株262株を供試した。発生病に記載された情報を基に、主な症状(診断名)、分離検体、年代、性別および、耐性の判定に用いた薬剤について集計した。

### 2. 菌種同定およびカルバペネマーゼ産生スクリーニング試験

菌種同定には、菌種同定キットAPI 20E(ビオメリュー)を用いた。スクリーニング試験は、各種カルバペネマーゼに特異的な阻害剤を用いて実施した。メタロ-β-ラクタマーゼ(IMP型、KHM型、NDM型等)は、メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)ディスク(栄研化学)、セリン-β-ラクタマーゼ(KPC型等)は、3-アミノフェニルボロン酸をそれぞれ用いて、病原体検出マニュアルに記載された方法<sup>5)</sup>に従って行った。

### 3. カルバペネマーゼ産生性の確認試験

CarbaNPテストあるいは、modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM)により実施した<sup>5)</sup>。

### 4. カルバペネマーゼ遺伝子の検出および型別

6種類のカルバペネマーゼ遺伝子(IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型、VIM型、GES型)を検出するためのマルチプレックスPCR法<sup>6)</sup>を実施した。IMP-1とIMP-6の識別には、KayamaらのPCR法を用いた<sup>7)</sup>。KHM型の検出および型別は、単独PCR法を行った後、得られた産物のシーケンス解析により実施した<sup>5)</sup>。GES型および、IMP-1、IMP-6以外のIMP型の型別には、単独PCR法を行った後、得られた産物のシーケンス解析を行った<sup>5)</sup>。カルバペネマーゼ産生性試験陽性かつ、カルバペネマーゼ遺伝子が検出された場合をカルバペネマーゼ産生菌と判定した。

### 5. 倫理に関する声明

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1602-03-2)、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施したものである。

## 結 果

### 1. CRE感染症の届出情報

CRE菌株262株について、届出情報を図1に集計した。主な症状(診断名)は、尿路感染症が最も多く、次いで敗血症/菌血症、肺炎、胆嚢炎/胆管炎、腹膜炎等であった。その他には、手術後の創部感染症、膿瘍、潰瘍、骨髄炎、副鼻腔炎等が含まれた(図1A)。分離検体は、尿が最も多く、次いで血液、喀痰、胆汁、膿等であった。その他には、ドレーン廃液、創部浸出液、胃粘膜、膿瘍等が含まれた。通常無菌とされる検体(血液、胆汁、腹水、胸水)が、全体の40%近くを占めた(図1B)。患者の性別は、男性が148例(57%)、女性が114例(43%)であった。患者の年代は20代~90代と幅広かったが、60代以上が全体の90%近くを占めた(図1C)。

### 2. CRE菌株およびカルバペネマーゼ産生菌の検出状況および年次推移

CRE菌株262株の内、カルバペネマーゼ産生菌は76株(29%)であった。CRE菌株数およびカルバペネマーゼ産生菌株数の年次推移を図2に示す。CRE菌株数は2015年~2017年には年間30株程度であったのが、2018年に年間55株まで増加した後、2020年まで年間50株以上で推移した。カルバペネマーゼ産生菌株数は毎年10株~19株の間で推移したが、CRE菌株数に占める割合は年度により異なっており、2015年が44%、2016年が40%、2017年が34%、2018年が18%、2019年が16%、2020年が37%であった。

### 3. 菌種の内訳

CRE菌株およびカルバペネマーゼ産生菌株の菌種内訳を図3に示す。CRE菌株は、*Enterobacter cloacae*が最も多く、全体の30%近くを占めた。次いで、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella aerogenes*、*Escherichia coli*、*Serratia marcescens*、以上の5菌種で全体の92%を占めた。以下、*Citrobacter koseri*、*Citrobacter freundii*、*Citrobacter braakii*、*Enterobacter*

*asburiae*、*Klebsiella oxytoca*、*Providencia rettgeri*、*Proteus mirabilis*、*Morganella morganii* の計 13 菌種であった。カルバペネマーゼ産生菌の割合は菌種によって著しく異なり、*E. cloacae* が 9%、*K. pneumoniae* が 69%、*K. aerogenes* が 2%、*E. coli* が 63%、*Serratia marcescens* が 4%、*C. freundii* が 75%、*E. asburiae* が 50%、*K. oxytoca* が 50%、*P. rettgeri* が 50%であった。

#### 4. カルバペネマーゼ遺伝子検出状況

カルバペネマーゼ産生菌 76 株のうち、カルバペネマーゼ遺伝子検出数は IMP-6 が 61 株と最も多く、次いで IMP-1 が 10 株、KHM-1 が 3 株、IMP-11 が 1 株、IMP-1 および GES-5 を同時保有する株

が 1 株であった (表 1)。検出された医療機関数は IMP-6 が 34 か所、IMP-1 が 7 か所、KHM-1 が 1 か所であった。年度別の検出数から、IMP-6 は毎年 9 株～13 株、IMP-1 は毎年 1 株～4 株が検出された。その他の遺伝子は散発的な検出であった。IMP-6 陽性株は 6 菌種の内、*K. pneumoniae* と *E. coli* が大半を占めた。IMP-1 陽性株は 6 菌種の内、*E. cloacae* と *K. pneumoniae* が各 3 株、その他の菌種は各 1 株であった。KHM-1 陽性株は *C. freundii* が 2 株、*E. cloacae* が 1 株であった。IMP-11 陽性株、*E. IMP-1* および GES-5 を同時保有する株は *E. cloacae* であった。

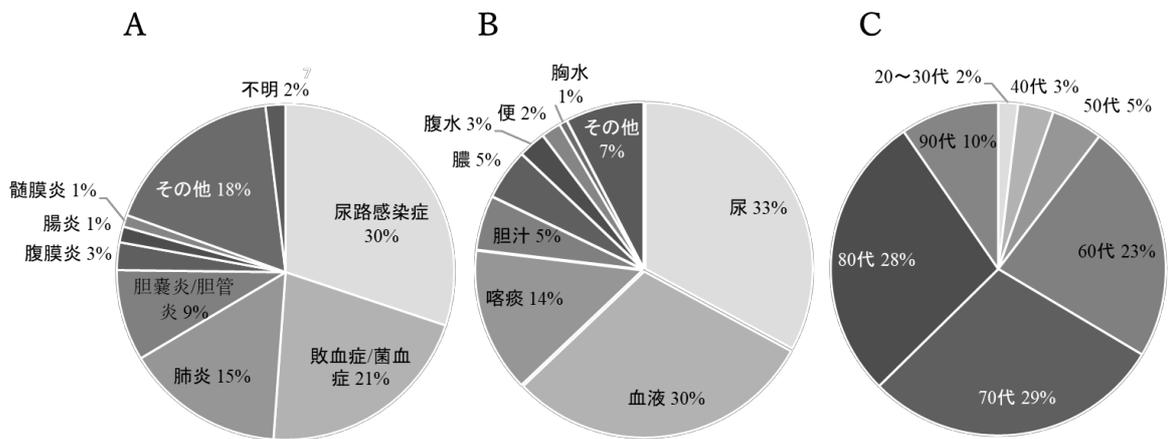


図1 CRE 菌株 262 株における A 患者の主な症状 B 分離検体内訳 C 患者年代

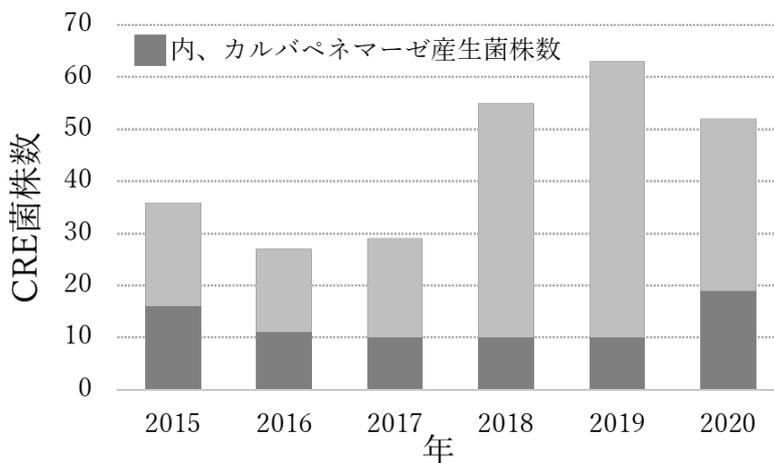


図2 CRE 菌株数の年次推移 (内、カルバペネマーゼ産生菌株数)

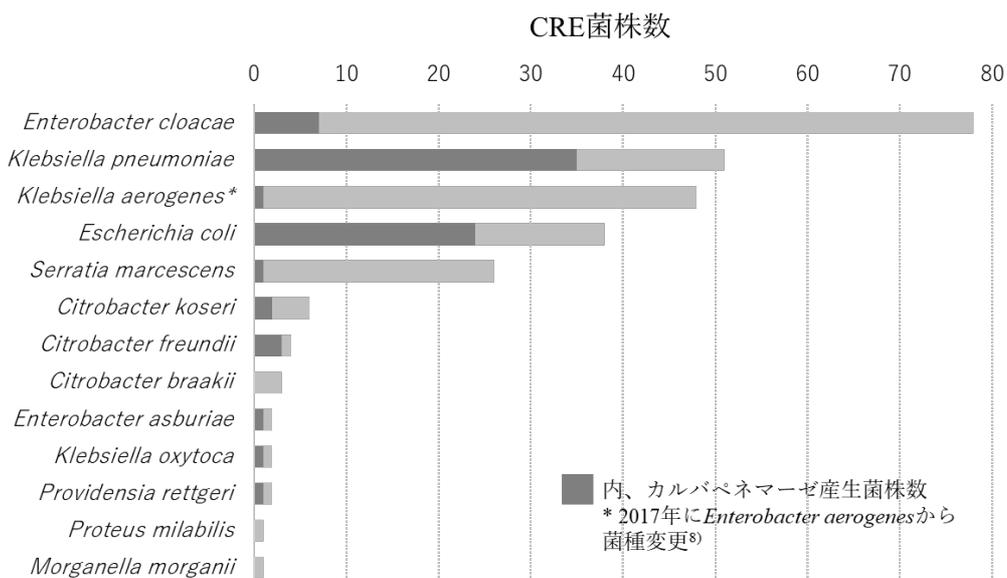


図3. CRE 菌株の菌種内訳 (内、カルバペネマーゼ産生菌株)

表1 カルバペネマーゼ遺伝子検出数と菌種内訳

カルバペネマーゼ遺伝子	検出数/年						合計	菌種(菌株数)
	2015	2016	2017	2018	2019	2020		
IMP-6	13	9	9	9	8	13	61	<i>K. pneumoniae</i> (32), <i>E. coli</i> (24), <i>E. cloacae</i> (1), <i>K. aerogenes</i> (1), <i>S. marcescens</i> (1), <i>C. koseri</i> (1), <i>K. oxytoca</i> (1)
IMP-1	2	1	1	1	1	4	10	<i>E. cloacae</i> (3), <i>K. pneumoniae</i> (3), <i>C. koseri</i> (1), <i>C. freundii</i> (1), <i>E. asburiae</i> (1), <i>P. rettgeri</i> (1)
KHM-1		1				2	3	<i>C. freundii</i> (2), <i>E. cloacae</i> (1)
IMP-11	1						1	<i>E. cloacae</i>
IMP-1+GES-5*					1		1	<i>E. cloacae</i>

\* IMP-1遺伝子およびGES-5遺伝子を同時保有

表2 カルバペネマーゼ遺伝子検出数と菌種内訳

薬剤*	CRE菌株数	カルバペネマーゼ産生菌株数 (%)
メロペネム	116	75 (64.7)
イミペネム+セフメタゾール	143	1 (0.7)
不明	3	0 (0.0)

\*耐性の判定に必要な検査所見<sup>3)</sup>

メロペネムの基準：メロペネムの MIC 値 2 $\mu$ g/ml 以上またはメロペネム感受性ディスク阻止円直径 22mm 以下

イミペネムかつセフメタゾールの基準：イミペネムの MIC 値 2 $\mu$ g/ml 以上またはイミペネム感受性ディスク阻止円直径 22mm 以下かつ、セフメタゾールの MIC 値 64 $\mu$ g/ml 以上またはセフメタゾール感受性ディスク阻止円直径 12mm 以下

5. 耐性の判定に用いた薬剤とカルバペネマーゼ産生

CRE 感染症届出時に、医療機関において分離菌株の耐性を確認した薬剤は、メロペネムが 116 株、

イミペネムとセフメタゾールが 143 株、不明が 3 株であった。両方の基準で確認した場合は、メロペネムとして集計した。その内、カルバペネマーゼ産生菌株数とその割合は、メロペネムの基準で判定され

た株では75株(65%)の一方、イミペネムとセフメタゾールの基準で判定された株では1株のみ(0.7%)と著しく異なった(表2)。

## 考 察

CREは主に感染防御機能の低下した患者や外科手術後の患者、抗菌薬を長期にわたって使用している患者などに感染症を引き起こす<sup>2)</sup>。大阪市内におけるCRE感染症の患者は60代以上の高齢者が多く、主に尿路感染症、敗血症/菌血症、肺炎の原因菌として検出されていた(図1)。カルバペネム耐性は、各種カルバペネマーゼの産生以外に、AmpC型β-ラクタマーゼや基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)などのカルバペネム分解性の弱いβ-ラクタマーゼの産生と細胞膜の透過性低下の組み合わせにより獲得されることが多い<sup>9)</sup>。カルバペネマーゼ産生菌とその他の菌とは院内感染対策上も治療上も区別が必要と考えられている<sup>2)</sup>。大阪市内のCRE患者届出数は2018年以降増加した一方で、カルバペネマーゼ遺伝子検出株の割合は減少した(図2)。同様の傾向は国内全域のサーベイランスにおいても報告されている<sup>2)</sup>。しかしカルバペネマーゼ産生菌は毎年10株以上が検出され、2020年には増加していることから、持続した流行下にあると言える。

カルバペネマーゼ産生菌の割合は菌種により大きく異なっていた(図3)。*K. pneumoniae*および*E. coli*においては、カルバペネマーゼ産生菌の割合が60%以上であったのに対して、*E. cloacae*、*K. aerogenes*、*S. marcescens*等においては10%未満であった。これらの菌種は染色体性のAmpC型β-ラクタマーゼを保有することが多く、その作用でカルバペネム耐性を示したものと推察された<sup>10,11)</sup>。国内全域のサーベイランスより、カルバペネマーゼ産生菌の菌種は、関東地方では*E. cloacae*が多く、近畿地方では*K. pneumoniae*、*E. coli*が多い<sup>12)</sup>とされており、大阪市内においても近畿地方に特有の傾向が認められた。

国内で多くみられるIMP型カルバペネマーゼには、アミノ酸配列の違いにより多くの型が存在する。中でもIMP-6は、近畿地方から中国地方で多く分離され、IMP-1はそれ以外の地域を中心に全国から幅広く分離されている<sup>10,12)</sup>。大阪市内においてもIMP-6がカルバペネマーゼ遺伝子の大半を占めた

(表1)。菌種は、*K. pneumoniae*が最も多く、次いで*E. coli*となっており、この傾向も近畿地方で共通している<sup>12)</sup>。しかし、それ以外の5菌種からもIMP-6遺伝子が検出され、耐性プラスミドを介したIMP-6遺伝子の菌種を超えた拡散が推察される。過去には大阪市内の医療機関でIMP-6産生菌の長期間にわたる院内伝播が発生し<sup>9)</sup>、また、IMP-6産生菌が市中で拡散している可能性も否定できない<sup>13)</sup>ことから、今後も監視が必要である。

IMP-1陽性株は少数だが毎年検出された。多菌種からIMP-1遺伝子が検出されたため、IMP-6遺伝子と同様、耐性プラスミドを介したIMP-1遺伝子の拡散が示唆される。KHM-1陽性株およびIMP-1とGES-5の同時保有株は、国内のみならず国際的にも稀なタイプであったことから、耐性プラスミドの次世代シーケンス解析を実施した<sup>14,15)</sup>。KHM-1陽性株では、耐性プラスミドに多数の耐性遺伝子の集積が見られ、IMP-1とGES-5の同時保有株では、IS26を介したIMP-1遺伝子の挿入および、耐性プラスミドを複数個持つことによるコリスチン耐性遺伝子の獲得が認められた。両株ともに医療機関において高度耐性化が進んでいることが推定される特徴を示しており、今後の流行状況を注視する必要がある。

CRE感染症届出時には、医療機関において分離株のカルバペネム耐性を判定することが求められている<sup>3)</sup>。カルバペネマーゼ産生菌の検出にはメロペネムが感度・特異度ともに優れているが、臨床現場では最初に市販されたイミペネムの薬剤感受性の方が広く測定されていたことから、イミペネム・セフメタゾールの2剤が届出基準に加えられている<sup>9,10)</sup>。両基準でカルバペネマーゼ産生菌の割合が著しく異なった(表2)ことから、医療機関でCREが検出された際にカルバペネマーゼ産生菌かどうかを推察するには、メロペネムに耐性を示すことが鑑別に有用であることが分かった。

2015年～2020年の6年間にわたるCRE感染症分離菌株のサーベイランス調査の結果、大阪市内のCRE感染症届出数の増加傾向とカルバペネマーゼ産生菌の持続した流行が明らかになった。また、IMP-6陽性株が多数を占める中、IMP-1陽性株や稀なカルバペネマーゼ遺伝子陽性株も検出された。各医療機関における耐性菌対策が功を奏し、この期間に大阪市内で大規模な院内感染は発生せず、国内での検出数が年々増加して定着が危惧されている海

外型カルバペネマーゼ遺伝子(主にNDM型やKPC型)<sup>2)</sup>の検出も認められなかった。今後も、必要に応じてCRE保菌者分離菌株の解析や耐性プラスミドの解析等を加味しながら、CRE感染症の分離菌株サーベイランスにおいてその動向を注視するとともに、得られた情報を還元し、院内感染はもとより、市中における蔓延を防止していきたい。

#### 謝 辞

本研究において、菌株収集、情報提供、諸連絡、技術指導、検査補助等に携わって頂きました、大阪市保健所、大阪市各保健福祉センター、医療機関、国立感染症研究所薬剤研究センター、大阪健康安全基盤研究所微生物部の皆様に深謝いたします。

#### 利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

#### 文 献

- 1) 大曲貴夫. 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020 の背景. *臨床と微生物* 2017; **44**: 291-295.
- 2) 国立感染症研究所. <特集>カルバペネム腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症. *病原微生物検出情報* 2019; **40**: 17-30.
- 3) 厚生労働省. 感染症法に基づく医師の届出のお願い 3 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症. <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekakukansenshou11/01-05-140912-1.html>.
- 4) 厚生労働省. 平成29年3月28日付け健感発0328第4号厚生労働省健康局結核感染症課長通知「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症等に係る試験検査の実施について」. 2017.
- 5) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 令和2年6月改訂版 Ver2.0. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/ResistantBacteria20200604pdf>. 2020.
- 6) Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, Aoki M, Uchida K, Matsumoto Y, et al. Single-tube multiplex polymerase chain reaction for the detection of genes encoding *Enterobacteriaceae* carbapenemase. *Jpn J Infect Dis* 2020; **73**: 166-172.

- 7) Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Onodera M, Yokozaki M, Ohge H, et al. Rapid detection of *bla*<sub>IMP-6</sub> by amplification refractory mutation system. *J Microbiol Methods* 2012; **88**: 182-184.
- 8) Tindall B, Sutton G, Garrity G. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the approved lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; **67**: 502-504.
- 9) 国立感染症研究所. <特集>カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症. *病原微生物検出情報* 2014; **35**: 281-291.
- 10) 鈴木里和. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の疫学. *化学療法の領域* 2016; **32**: 2023-2029.
- 11) 中村明子, 海住博之. 薬剤耐性菌検出のために臨床検査室が実施すべき検査法. *The Chemical Times* 2016; **239**: 10-14.
- 12) 国立感染症研究所. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 病原体サーベイランス, 2018年. *病原微生物検出情報* 2019; **40**: 157-158.
- 13) Yamamoto N, Asada R, Kawahara R, Hagiya H, Akeda Y, Shanmugakani R, et al. Prevalence of, and risk factors for, carriage of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* among hospitalized patients in Japan. *J Hosp Infect* 2017; **97**: 212-217.
- 14) Umeda K, Nakamura H, Fukuda A, Yamaguchi T, Matsumoto Y, Motooka D, et al. Molecular characterization of *bla*<sub>KHM-1</sub> encoding plasmid in an *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* isolate from blood culture. *PLoS One* 2020; **15**: e0227605.
- 15) Umeda K, Nakamura H, Fukuda A, Matsumoto Y, Motooka D, Nakamura S, et al. Genomic characterization of clinical *Enterobacter roggenkampii* co-harboring *bla*<sub>IMP-1</sub>- and *bla*<sub>GES-5</sub>-encoding IncP6 and *mcr-9*-encoding IncHI2 plasmids isolated in Japan. *J Glob Antimicrob Resist* 2021; **24**: 220-227.

WEBサイトの内容は2021年5月14日に確認した。

### Surveillance of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections in Osaka city, 2015-2020

Kaoru UMEDA<sup>a</sup>, Atsuko AKIYOSHI<sup>a</sup>, Saeko SIBAKAWA<sup>a</sup>, Yuji HIRAI<sup>a</sup>, Hiromi NAKAMURA<sup>a</sup>,  
Aogu SETSUDA<sup>b</sup>, and Hideki YOSHIDA<sup>b</sup>

Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) cause a wide variety of infections and have been designated as a category V infectious disease. Among them, carbapenemase-producing bacteria are difficult to treat and can cause nosocomial infections. In this study, 262 isolates of CRE infections from 54 hospitals reported to Osaka city from 2015 to 2020 were collected, and surveillance were conducted by epidemiological information and resistance genes detection. CRE infectious patients were predominantly elderly, and CRE isolates have increased since 2018. Of the 262 isolates, 76 isolates (29%) produced carbapenemase. The proportion of carbapenemase-producing bacteria was more than 60% in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, whereas it was less than 10% in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, and *Serratia marcescens*. The most common carbapenemase gene was IMP-6, which is frequently detected in the Kinki region, suggesting a long-term epidemic in Osaka city and the spread of carbapenemase genes to multiple species. IMP-1 genes were detected persistently, and rare carbapenemase genes of KHM-1 or co-harboring IMP-1 and GES-5 were observed. Meropenem resistance was found to be useful in differentiating carbapenemase-producing bacteria in medical facilities.

Key words : Antimicrobial-resistant bacteria, Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE), Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, IMP type

---

a Osaka Institute of Public Health

b Osaka City Public Health Office

## 野菜・果実飲料における糖類および糖アルコール分析

紀 雅美<sup>a</sup>, 工藤鮎子<sup>b</sup>, 寺谷清香<sup>b</sup>, 山崎朋美<sup>a</sup>, 柿本 葉<sup>a</sup>, 新矢将尚<sup>a</sup>

野菜・果実飲料の糖分析を目的とし、単糖類・二糖類および糖アルコールの計 10 種について液体クロマトグラフ-示差屈折率検出器を用いた測定条件を検討した。分析に用いたのはポリマー系親水性相互作用クロマトグラフィー用カラムで、感度、ピーク分離および分析時間を考慮し、移動相には 75%アセトニトリルを用いて分析することとした。陰性であることを確認した野菜飲料に糖を添加し 1 日に 5 併行で 3 日間の妥当性の評価を行い、真度および精度が良好であることを確認した。確立した分析法を用い市販の野菜・果実飲料を分析した結果、糖類を含まない旨の表示がある野菜飲料 2 種類からは分析対象とした糖は検出されなかった。糖質を含む表示があった飲料から検出された単糖類はフルクトース、グルコース、二糖類はスクロースで、果実を含む飲料からは微量のソルビトールも検出された。フルクトース、グルコース、スクロースの合計値で求めた糖類含有量は表示値に対して-14~4%となり、食品表示基準で示されている許容差の範囲である±20%に収まった。

キーワード：糖類、糖アルコール、栄養成分、食品表示法、示差屈折率検出器

昨今、血糖値のコントロールやダイエットを目的とした炭水化物や糖質の摂取量を制限する食事法である糖質制限やロカボなどの言葉をよく耳にする。また、スーパーやコンビニエンスストアなどでは、シュガーレス、無糖、低糖、糖質オフ、糖類オフ、糖質ゼロ、糖類ゼロ、砂糖不使用など糖を意識した食品が多く販売され、糖摂取に対する世間の関心の高さがうかがえる。糖を示す言葉も、糖含有量の程度を意味する言葉も様々であるが、現在、栄養成分の量及び熱量等に関する表示は食品表示法<sup>1)</sup>と同法に基づく食品表示基準<sup>2)</sup>において定められている。食品表示法は、消費者の自主的かつ合理的な食品選択の機会の確保を目的とし、食品衛生法、日本農林規格等に関する法律および健康増進法の食品の表示に関する規定を一元化して 2015 年に施行された法であり<sup>1)</sup>、安全性審査済みの遺伝子組換え食品やアレルギーを含む食品の表示に関する事項と並んで栄養成分表示についても規定されている<sup>1,2)</sup>。食品表示基準において、炭水化物は「当該食品の質量から、たんぱく質、脂質、灰分及び水分を除い

たもの」、糖質は「炭水化物から食物繊維を引いたもの」、糖類は「単糖類、二糖類であって糖アルコールではないもの」と定義されている<sup>2)</sup>。このうち最も効率的なエネルギー源となるのが糖類であり、血糖値を急激に上昇させるために注意が必要なのも糖類である。また、炭水化物、糖質、糖類の 3 つの分類の中で栄養成分表示欄とは別に、含まない旨、低い旨、低減の強調表示について表示基準が定められているのも糖類である<sup>2)</sup>。そこで、既に行政検査として実施している遺伝子組換え食品やアレルギー物質の検査と同様、今後、栄養成分表示についても検査を行うことを想定し、なかでも関心が高く表示が多い糖類の検査法を確立することを目的とした。

国や地方公共団体が行う栄養成分の検査は、食品表示基準の「別添 栄養成分等の分析方法等」(以下、別添の分析法)<sup>3)</sup>に従う必要がある。食品中の糖類の分析法を確立するにあたり、別添の分析法を参考にして、前処理が容易かつ市販されている種類が多く、糖類の表示がある試料として野菜・果実飲

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食品化学 2 課

## 調 査 方 法

料を選択した。一方、別添の分析法において測定対象となる単糖類と二糖類は具体的に規定されていないため、文部科学省の日本食品標準成分表 2020年版（八訂）（以下、食品成分表）<sup>4)</sup> および食品成分表炭水化物成分表編<sup>5)</sup> において記載のある糖類を対象にした。利用可能炭水化物として収載されている単糖類のグルコース、フルクトース、ガラクトース、二糖類のスクロース、マルトース、ラクトース、トレハロースと備考欄に記載されている二糖類のイソマルトースの8種類である。糖アルコールは糖類には含まれないが、糖類と同時に分析が可能であるため、食品成分表に記載されているソルビトール及びマンニトールについても測定対象とした<sup>5)</sup>。最初に、対象成分10種類について分析条件の検討を行い、確立した条件で野菜・果実飲料を対象とした妥当性確認を行った。その後、市販の野菜・果実飲料について分析を行い、糖類含有量を求め表示値との比較を行ったので報告する。

### 1. 試料

2020年10月から2021年3月にかけて、大阪府下で入手した野菜・果実飲料6種類8試料を検査対象とした。一覧を表1に示す。栄養成分表示欄の糖類含有量が0 g/100 gまたは0 g/100 mLである飲料が2試料（No.1 および No.2）あり、いずれも糖質ゼロまたは無糖といった糖類を含まない旨の強調表示があった。これらは2ロットずつ分析を行った。No.3～6は糖質含有量が6.2～9.0 g/100 mLの試料で、うち3試料には砂糖不使用の任意表示があった。

### 2. 標準品および標準液

D (-) -フルクトース（特級）、D (+) -ガラクトース（特級）、D (+) -グルコース（特級）、スクロース（特級）、ラクトース一水和物（特級）、D (+) -マルトース一水和物（特級）、D (-) -ソルビトール（一級）、D (-) -マンニトール（特級）：富士フイ

表1 本研究に用いた試料

No.	原材料 <sup>*1</sup>	糖類表示値 g/100mL	糖に関する 強調表示等	分析に用いた ロット数
1	野菜（大麦若葉、ケール）、抹茶、食物繊維、大麦若葉粉末、亜鉛酵母、寒天/ビタミンC	0 <sup>*2</sup>	糖質ゼロ	2
2	野菜（大麦若葉、ケール）、大麦若葉粉末、抹茶、亜鉛酵母/増粘多糖類、ビタミンE	0	無糖	2
3	野菜（にんじん、トマト、むらさきいも、赤ピーマン、いんげんまめ、モロヘイヤ、めキャベツの葉、レタス、ケール、ピーマン、だいこん、はくさい、アスパラガス、グリーンピース、セロリ、しそ、ブロッコリー、かぼちゃ、あしたば、こまつな、ごぼう、にがうり、しょうが、ブロッコリー（芽ばえ）、パセリ、クレソン、キャベツ、はつかだいこん、ほうれんそう、みつば）、レモン果汁、海藻カルシウム、ライスマグネシウム/ビタミンC	6.2	—	1
4	野菜（にんじん、こまつな、ケール、ブロッコリー、ピーマン、ほうれんそう、アスパラガス、赤じそ、だいこん、はくさい、セロリ、めキャベツ（プチヴェール）、紫キャベツ、ピーツ、たまねぎ、レタス、キャベツ、パセリ、クレソン、かぼちゃ）、果実（りんご、オレンジ、レモン）/クエン酸、香料、ビタミンC	6.7	砂糖・甘味料 不使用	1
5	野菜（にんじん、ケール、ほうれんそう、アスパラガス、クレソン、パセリ、かぼちゃ、レタス、キャベツ、ピーツ、だいこん、はくさい、たまねぎ、セロリ）、果実（りんご、レモン、ブルーベリー、クランベリー）、食物繊維、殺菌発酵豆乳、はっ酵乳、寒天、アサイーエキス、植物性乳酸菌（殺菌）/香料、安定剤（ベクチン）、クエン酸、ピロリン酸第二鉄、	8.9	砂糖・甘味料 無添加	1
6	野菜（にんじん、ピーマン、こまつな、ケール、ほうれんそう、アスパラガス、クレソン、パセリ、かぼちゃ、レタス、キャベツ、ピーツ、だいこん、はくさい、たまねぎ、セロリ）、果実（りんご、ぶどう、レモン、キウイフルーツ、バナナ）、食物繊維/香料、クエン酸、ビタミンC、ベニバナ黄色素、クチナシ青色素	9.0	砂糖・甘味料 無添加	1

\*1 原材料の野菜名および果実名は日本食品標準成分表2020年版（八訂）の食品名表記を参考にした。

\*2 表示値の単位は g/100g

ルム和光純薬、D (+) -トレハロース二水和物 (>98.0%)、イソマルトース (>97.0%) : 東京化成工業、いずれも 60°C、5 時間減圧乾燥したものを使用した。

100 mg/mL 標準原液 : 標準品は無水物に換算して 1.000 g をはかり取り、水に溶解して 10 mL に定容した。

10 mg/mL 混合標準液 : ①フルクトース、ガラクトース、グルコース、スクロース、ラクトース、マルトースについて、100 mg/mL 標準原液から 1 mL ずつ採り、10 mL に水で定容した。②ソルビトール、マンニトール、トレハロース、イソマルトースについて、100 mg/mL 標準原液から 1 mL ずつ採り、10 mL に水で定容した。

検量線用標準溶液 : 10 mg/mL 混合標準液をもとに、最終 50% アセトニトリル溶液となるように 0.1 ~ 5 mg/mL の検量線用標準溶液を調製した。

単一糖標準溶液 : 糖類または糖アルコールそれぞれにおいて、最終 50% アセトニトリル溶液となるように 0.1、1、5 mg/mL の標準溶液を調製した。

### 3. 試薬および試液

水酸化ナトリウム (特級) およびアセトニトリル (LCMS 用) : 富士フィルム和光純薬

水 : 超純水製造装置で 18.2 MΩ · cm まで精製したもの。

10 w/v% 水酸化ナトリウム溶液 : 水酸化ナトリウム 10 g を水に溶かし 100 mL とした。

### 4. 装置・器具

超純水製造装置 : メルクミリポア Milli-Q IQ 7003

遠心分離機 : KUBOTA 4000

液体クロマトグラフ : Agilent 1290 Infinity II LC システム

示差屈折率検出器 : Agilent 1260 Infinity

カラム : 昭和電工 Shodex Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E (内径 4.6 mm、長さ 250 mm)

15 mL、50 mL 遠沈管 : Watson 製

### 5. 前処理

別添の分析法<sup>3)</sup>を一部変更し、前処理を行った。50 mL 遠沈管によく混合した試料 5 mL を採取し、5 mL の水を加え、液性が酸性の場合には 10 w/v% 水酸化ナトリウム溶液で pH 5 ~ 7 に調整した。30 分間超音波処理した後、全量を 25 mL メスフラスコに

移して水で定容した。50 mL 遠沈管に移して遠心分離 (3000 回転/分、1 分間) した。上清 1 mL を採取し、等量のアセトニトリルと混合し、メンブランフィルター (0.45 μm) にかけてものを試験溶液とした。

### 6. 糖分析

高速液体クロマトグラフィーを用いて、以下の条件で行った。

移動相 : 75%、77.5%、80% アセトニトリル

流速 : 0.8 mL/min

注入量 : 10 μL

カラム : 昭和電工 Shodex Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E (内径 4.6 mm、長さ 250 mm)

カラム温度 : 30°C

検出器 : 示差屈折率検出器

検出器光学系温度 : 30°C

検量線用標準溶液を装置にインジェクションし、糖または糖アルコール濃度に対してピーク高さをプロットし検量線を作成した。試験溶液のクロマトグラムから、標準溶液と同じ保持時間にあるピークの高さを求め、検量線を用いて試料中の糖類または糖アルコール濃度を算出した。

### 7. LC 分析の条件検討

移動相のアセトニトリルを 75%、77.5%、80% の 3 濃度について検量線用標準溶液をインジェクションして、保持時間、ピーク分離、感度および検量線の比較を行った。

### 8. ピーク高さ比較

検量線用標準溶液の 0.1、1、5 mg/mL、および単一糖標準溶液 0.1、1、5 mg/mL について、移動相に 75% アセトニトリルを用いて分析した。検量線用標準溶液については 3 回、単一糖標準溶液は 2 回ずつインジェクションを行った。糖類または糖アルコールごとに、検量線用標準溶液のピーク高さ平均を単一糖標準溶液のピーク高さ平均で除してピーク比を求めた。

### 9. 妥当性評価

陰性試料 5 mL に 50 mg の対象成分を添加し (n=5)、3 日間分析を行った。添加回収率により真度を、添加回収率の一元配置分散分析により精度を確認した。

## 結果および考察

### 1. LC 分析における移動相の検討

示差屈折率検出器は紫外吸収が少ない成分の検出に用いられ、光の屈折率の違いにより測定する検出器である。ベースラインの安定性が重要であり、溶媒の比率を変化させるグラジエント条件分析を用いることができないため、ピークの重なりを避けるために分析対象を①②の 2 グループに分けて分析した。

移動相のアセトニトリル濃度 75%、77.5%、80% の 3 濃度において、5 mg/mL 検量線用標準溶液を分析したときのクロマトグラムを図 1 に示す。分析に用いたカラムは、糖類の分析に適したカラムで、移動相に水-アセトニトリル混液を用いて糖分析する場合、水の比率が高いほど早く溶出し、また基本的に分子量が小さいものから溶出する<sup>9)</sup>。①では単糖類であるフルクトース、ガラクトース、グルコース、②ではグルコースが還元されたソルビトールおよびマンニトールが先に溶出し、次いで二糖類が溶出した。アセトニトリル濃度が高くなるほど分析に要する時間が長くなり、保持時間の差は大きくなるが、ピーク高さ、すなわち感度は低くなることから分かる。①②の検量線用標準溶液の保持時間平均を比べた

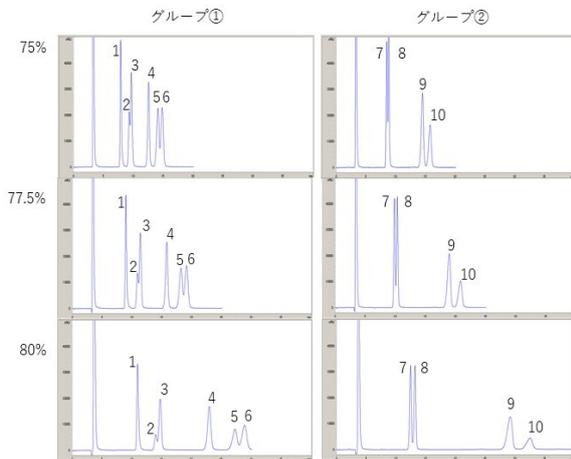


図 1 移動相におけるアセトニトリル濃度の影響  
 グループ①：1. フルクトース、2. ガラクトース、3. グルコース、  
 4. スクロース、5. ラクトース、6. マルトース  
 グループ②：7. ソルビトール、8. マンニトール、  
 9. トレハロース、10. イソマルトース  
 75%、77.5%、80%：移動相のアセトニトリル濃度

ときに、アセトニトリル 75% ではラクトース 14.0 分、トレハロース 14.4 分およびマルトース 14.7 分、77.5% ではトレハロース 18.7 分とマルトース 18.9 分、80% ではマルトース 29.0 分とトレハロース 29.0 分となり、移動相に用いるアセトニトリル濃度によりトレハロースとラクトースやマルトースを分離するのは困難であることが示された。トレハロースは天然の食品ではきのこと類に含まれているが、最近では食品添加物として使用されている食品も多く、今後、異なる分析カラムの使用など更なる検討が必要である。

次に 0.1~5 mg/mL の検量線用標準溶液を 2 回ずつ分析し、糖類または糖アルコール濃度に対してピーク高さをプロットし検量線を作成した (図 2)。移動相のアセトニトリル濃度が高くなるほど、感度は下がるため、検量線の傾きは小さくなった。検量線は移動相のアセトニトリル濃度に関係なく全ての糖類または糖アルコールにおいて 0.1~5 mg/mL の範囲で良好な直線性を示した (決定係数  $R^2 > 0.99$ )。しかしながら低濃度領域において、検量線用標準溶液について検量線の回帰直線から算出した濃度と理論値の乖離が大きいため、検量線として使用した範囲はフルクトースで 0.5~5 mg/mL、その他の糖類および糖アルコールにおいては 0.2~5 mg/mL とし

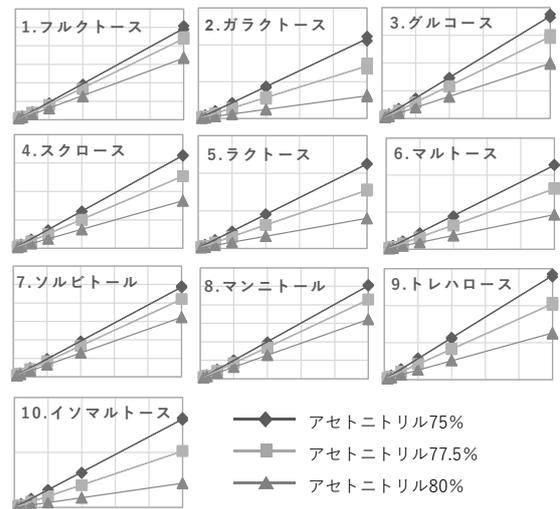


図 2 アセトニトリル濃度の検量線への影響  
 横軸：糖濃度 (mg/mL)、1 目盛りは 1 mg/mL に相当  
 縦軸：ピーク高さ (nRIU)、1 目盛りは 10000 nRIU に相当

表 2 単一糖標準溶液および検量線用標準溶液におけるピーク高さ比較

濃度 (mg/mL)	ピーク高さ比 <sup>*1</sup>									
	フルクトース	ガラクトース	グルコース	スクロース	ラクトース	マルトース	ソルビトール	マンニトール	トレハロース	イソマルトース
0.5	0.90	0.96	0.96	0.91	0.98	0.97	0.97	0.98	0.96	1.02
1	0.90	0.99	0.96	0.92	0.95	0.93	1.03	1.01	0.96	0.96
5	1.10	1.17	1.13	1.11	1.14	1.15	1.01	1.04	1.02	0.99

\*1 検量線用標準溶液におけるピーク高さの平均値÷単一糖標準溶液のピーク高さ平均値

表 3 妥当性評価

	フルクトース	ガラクトース	グルコース	スクロース	ラクトース	マルトース	ソルビトール	マンニトール	トレハロース	イソマルトース
総平均 (%)	98.0	96.3	97.0	98.6	98.3	97.8	100.8	99.9	100.5	100.1
併行精度 (RSD, %)	2.2	2.1	2.2	2.1	2.1	2.2	4.6	4.7	4.9	5.0
室内精度 (RSD, %)	5.7	2.9	2.6	2.1	2.1	3.2	5.1	4.9	6.4	5.8

た。したがって、試料中の定量下限はフルクトースで 0.5 g/100 mL、その他の糖類および糖アルコールにおいては 0.2 g/100 mL、検出限界は検量線用標準溶液で最も低い濃度 0.1 mg/mL から試料中濃度に換算して 0.1 g/100 mL とした。

本研究の調査試料は原材料からフルクトース、グルコース、スクロース中心の分析になることが推定されるため、分析時間が短く、感度が良い 75%アセトニトリルを用いることにしたが、ガラクトースとグルコース、ラクトースとマルトース、ソルビトールとマンニトールのピークは完全に分離していないため、定量性の確認を行った。75%アセトニトリルを用いて分析した単一糖標準溶液のピーク高さに対する混合標準溶液である検量線用標準溶液のピーク高さの比を求め表 2 に示した。混合標準溶液中で単一のピークとして存在しているフルクトース、スクロース、トレハロース、イソマルトースのピーク比が 0.5 mg/mL では 0.90~1.02、1 mg/mL では 0.90~0.96、5 mg/mL では 0.99~1.11 であるのに対し、ピーク分離が不十分であるガラクトース、グルコース、ラクトース、マルトース、ソルビトール、マンニトールは 0.5 mg/mL では 0.96~0.98、1 mg/mL では 0.93~1.03、5 mg/mL では 1.01~1.17 と同等のピーク比を示し、ピーク分離が不十分な糖類または糖アルコールと、単一ピークとして存在する糖類は同等の定量性があると考えられた。

## 2. 妥当性評価

予め測定対象成分が含まれていないことを確認

した陰性飲料 5 mL に 50 mg の対象成分を添加し (5 併行、3 日間)、前処理を行い移動相アセトニトリル濃度 75%で分析を行った。添加量は試料換算すると各対象成分 1 g/100 mL となり、糖類含有量として 8 g/100 mL、野菜・果実飲料を構成する主要な糖類であるフルクトース、グルコース、スクロースの 3 糖類の合計値は 3 g/100 mL となる。回収率 (%) を求め、回収率 (%) の総平均により真度の評価を、回収率を一元配置分散分析にて求めた併行精度 (%) および室内精度 (%) により、精度の評価を行った。結果を表 3 に示す。総平均 96.3~100.8%、併行精度 2.1~5.0%、室内精度 2.1~6.4%となり、分析法として妥当であることが確認された。

## 3. 市販の野菜・果実飲料の分析

市販の野菜・果実飲料について試料あたり 3 併行

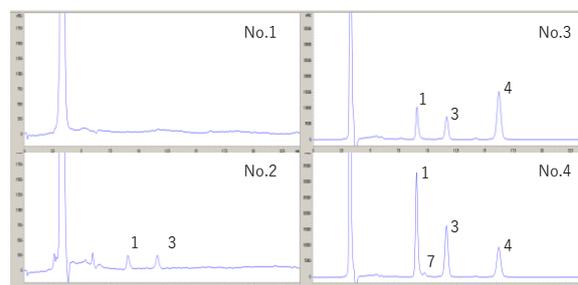


図 3 野菜・果実飲料のクロマトグラム

No. 1 および No. 2 は糖類ゼロ表示のある飲料で縦軸 (nRIU) は No. 3 および No. 4 の 20 分の 1 である。

1. フルクトース、3. グルコース、4. スクロース、7. ソルビトール

で前処理を行い分析した。クロマトグラムの一部を図3に、検出限界を超えて検出された糖について結果を表4に示す。糖類を含まない旨の表示があったNo.1において、ロットに関係なくピークは確認されなかった。なお、No.1の糖類含有量表示は重量あたりで示されていたが、糖は検出されなかったので他の試料と同等100 mLあたりの表示値として結果を示した。同じく糖類を含まない旨の表示があったNo.2においては、両ロットともにフルクトースとグルコースの小さいピークが確認できたが、検出限界未満であった。No.3~6からはフルクトース、グルコース、スクロースのピークが確認された。原材料の種類が多く、糖の組成や含有量に大きく寄与する原材料は特定できないが、食品成分表炭水化物成分表編の本表データ<sup>7)</sup>によると、にんじんやかぼちゃ、果実などの糖類含量の影響が大きいと推察された。またNo.4~6は糖アルコールであるソルビトールが検出されたが、No.6は定量下限に満たなかったため表4にはTrで示した。ソルビトールはりんご、梨、プルーンに多く含まれることが知られている。今回、調査した試料の原材料のうち食品成分表に記載がある原材料でソルビトールを含む食品はりんごのみであった<sup>7)</sup>。したがって、検出されたソルビトールはりんご由来である可能性が高いと考えられた。No.5には原材料中に野菜・果実以外に豆乳やはっ酵乳が含まれる。食品成分表によると調整豆乳にはマルトースが0.3 g/100 g、はっ酵乳にはラクトースが3.6 g/100 g含まれるが<sup>7)</sup>、今回の分析でマルトースおよびラクトースの明確なピークは得られなかった。原材料中の豆乳およびはっ酵乳の割合が低かったものと考えられる。

#### 4. 表示値との比較

食品表示基準において糖類は「単糖類、二糖類であって糖アルコールではないもの」と定義されているため、検出された単糖類フルクトース、グルコース、二糖類スクロース含有量を合計し糖類含有量を算出し、表示値との比較を行った(表5)。なお糖類としての定量下限は、検出されている糖の中で高い定量下限である0.5 g/100 mLとした。食品表示基準において栄養成分の表示値は、原材料における栄養成分含有量のばらつきや加工の影響などを考慮し成分ごとに許容値の範囲やゼロと表示できる量が定められており、糖類の許容値の範囲は $\pm 20\%$ 、ゼロ表示をすることができる量は100 gあたり(清涼飲

料水等にあたっては100 mLあたり)0.5 g未満と定められている<sup>2)</sup>。国や地方公共団体が行う検査において、別添の分析方法に従って得られた分析値の表示値に対する割合が許容差の範囲外であった場合、食品表示基準違反の疑いがある。本調査は別添の分析法に従った分析を実施し、その結果、糖類を含まない旨の表示があったNo.1およびNo.2からは糖類は検出されず、またNo.3~6について分析値は表示値の4~14%と表示値に対して分析値が低めではあったが、分析値は許容差の範囲内にあり、表示値は妥当であると考えられた。しかしながら今後、糖類を含まない旨または低い旨の表示がある食品など調査対象食品を広げていくにあたり、現状の定量下限付近の精確な分析が要求されることが予想される。そのため、フルクトース、ガラクトース、グルコース、スクロース、ラクトース、マルトース、ソルビトール、マンニトールを対象とし、低濃度領域の分析を検討した。すなわち、検量線の範囲を0.05~1 mg/mLとし、陰性試料5 mLに妥当性評価の10分の1である5 mgを添加し添加回収試験を実施したところ、検量線および回収率(99.6~111.5%)で良好な結果が得られた。今後、データの蓄積を行ったうえで低濃度領域の分析が可能となる。

さらにNo.1およびNo.2では糖類を含まない旨、No.4~6では砂糖不使用の表示があった。糖類を含まない旨の表示基準は飲用に供する液状の食品100 mLあたり0.5 g未満である<sup>2)</sup>。この値は栄養成分表示欄に糖類含有量をゼロと表示することができる基準と同じであり、分析の結果、表示とも矛盾がないことが確認された。また、砂糖不使用の表示は、①いかなる糖類も添加していないこと、②糖類に代わる原材料又は添加物を使用していないこと、③酵素分解その他何らかの方法により、当該食品の糖類含有量が原材料及び添加物に含まれていた量を超えていないこと、④当該食品の100 g若しくは100 mL又は一食分、一包装その他の一単位当たりの糖類の含有量を表示しているという基準をクリアした食品に表示が認められている<sup>2)</sup>。砂糖不使用の表示がある食品は、原材料由来のスクロースをはじめとする糖類は含んでおり、それらが原材料由来であるかどうかは分析では判別できないため、砂糖不使用の表示がある試料の検査についても、分析値が表示値の許容差の範囲内に収まるかを確認するに留まった。また本調査では糖類および糖アルコールの分析法確立を目的としているため甘味料分析

表4 野菜・果実飲料から検出された糖類および糖アルコール

No.	Lot	フルクトース (g/100mL)	グルコース (g/100mL)	スクロース (g/100mL)	ソルビトール (g/100mL)
1	1	ND	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND	ND
2	1	ND	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND	ND
3	-	1.3 ± 0.0	1.2 ± 0.0	2.8 ± 0.0	ND
4	-	2.6 ± 0.1	1.4 ± 0.0	2.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0
5	-	4.2 ± 0.1	2.0 ± 0.0	2.1 ± 0.0	0.3 ± 0.2
6	-	3.6 ± 0.1	2.6 ± 0.0	1.7 ± 0.0	Tr
検出限界		0.1	0.1	0.1	0.1
定量下限		0.5	0.2	0.2	0.2

平均±標準偏差

ND；検出限界未満

Tr；検出限界以上、定量下限未満

表5 野菜・果実飲料における糖類含有量と表示値との比較

No.	Lot	表示値 (g/100mL)	分析値 (g/100mL)	RSD%	対表示 <sup>*1</sup> (%)	許容差の範囲
1	1	0 <sup>*2</sup>	ND	-	-	0.5 g /100mL 未満
	2	0 <sup>*2</sup>	ND	-	-	
2	1	0	ND	-	-	± 20%
	2	0	ND	-	-	
3	-	6.2	5.3 ± 0.1	1.0	-14	± 20%
4	-	6.7	6.4 ± 0.1	1.8	-4	
5	-	8.9	8.2 ± 0.2	2.0	-7	
6	-	9.0	7.9 ± 0.2	2.2	-13	

平均±標準偏差

ND；定量下限未満、定量下限0.5g/100mL

\*1 対表示 (%) = 分析値 ÷ 表示値 × 100 - 100

\*2 表示値の単位はg/100g

は実施していないが、砂糖不使用表示の検証のためには、今後、甘味料の分析も必要である。さらに、示差屈折率検出器による分析はピーク同定の手段が保持時間のみであり定性の情報が少なく、ピークが重なった場合の同定も困難であることから、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置（LC-MS/MS）を用いた糖の定性分析について検討を行う予定である。

食品表示基準の別添の分析法に基づいて市販の野菜・果実飲料の糖分析を行った結果、分析値は食品表示基準に定められている許容差の範囲以内であり、また糖類を含まない旨や砂糖不使用の表示とも矛盾がなかった。今回、調査した試料は前処理が容易な野菜・果実飲料であったが、糖類に関する表示がある食品は炭酸飲料やアルコール飲料、菓子類など多く流通しているため、分析対象を広げていく可能性を考慮して検査体制を拡充する必要がある。

#### 謝 辞

本調査にあたり、大阪府健康医療部生活衛生室食の安全推進課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。

#### 参 考 文 献

- 1) 食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）
- 2) 食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）
- 3) 消費者庁：食品表示基準 別添 栄養成分等の分析方法等  
[https://www.caa.go.jp/policies/policy/food\\_labeling/food\\_labeling\\_act/pdf/food\\_labeling\\_cms101\\_200327\\_11.pdf](https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_labeling_act/pdf/food_labeling_cms101_200327_11.pdf)
- 4) 文部科学省：日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）  
[https://www.mext.go.jp/a\\_menu/syokuhinseibun/mext\\_01110.html](https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_01110.html)
- 5) 文部科学省：日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）炭水化物成分表編 ー利用可能炭水化物、糖アルコール、食物繊維 及び有機酸ー  
[https://www.mext.go.jp/content/20201225-mxt\\_kagsei-mext\\_01110\\_041.pdf](https://www.mext.go.jp/content/20201225-mxt_kagsei-mext_01110_041.pdf)
- 6) 昭和電工：HILIC モードによる単糖、二糖、三糖の分析 (1) (NH2P-50 4E)  
<https://www.shodex.com/ja/dc/03/02/12.html>
- 7) 文部科学省：日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）炭水化物成分表編 ー利用可能炭水化物、糖アルコール、食物繊維 及び有機酸ー、第 2 章本表（データ）  
[https://www.mext.go.jp/content/20201225-mxt\\_kagsei-mext\\_01110\\_042.xlsx](https://www.mext.go.jp/content/20201225-mxt_kagsei-mext_01110_042.xlsx)

WEB サイトの内容は 2021 年 6 月 21 日に確認した。

### **Analysis of sugar and sugar alcohol in commercially available vegetable and fruit juices**

Masami KI<sup>a</sup>, Ayuko KUDO<sup>b</sup>, Sayaka TERATANI<sup>b</sup>, Tomomi YAMASAKI<sup>a</sup>, Yo KAKIMOTO<sup>a</sup> and Masanao SHINYA<sup>a</sup>

To analyze sugars in commercially available vegetables and fruits juices, the measurement conditions for 3 monosaccharide, 5 disaccharide and 2 sugar alcohol, by liquid chromatography with polymer-based columns for hydrophilic interaction chromatography and refractive index detector, were examined. Considering sensitivity, peak separation and total run time, we decided isocratic analysis with 75% acetonitrile for mobile phase. For validation study, 50mg each sugars were spiked 5mL sugar free vegetable juice and were analyzed for 3 days with 5 points. As a result of the validation study in 10 sugars, the trueness, repeatability and within-laboratory reproducibility were 96.3~100.8%, less than 5.0 and 6.4%, respectively.

Each sugar was not detected in 2 vegetable juice expressed sugar content zero in nutrition information. Fructose, glucose and sucrose were detected in 4 vegetable and fruit juices, and sorbitol was detected juices included fruits. Sugar contents obtained by sum of fructose, glucose and sucrose were -14~-4% of expressed sugar content in nutrition information.

Key words : sugar, sugar alcohol, nutrition information, Food Labeling Act, refractive index detector

---

a Osaka Institute of Public Health Division Hygienic Chemistry Food Chemistry Section 1

b Osaka Institute of Public Health Division Hygienic Chemistry Food Chemistry Section 2

## 栄養成分検査にかかる水分分析条件の検討

山崎朋美, 柿本 葉, 紀 雅美, 萩原拓幸, 新矢将尚

菓子類、野菜・果物加工品、大豆加工品及びチーズについて、加熱乾燥法による水分分析の乾燥条件の検討を行った。菓子類は、135℃では水分以外の成分の変化や揮発が顕著であり、100℃または減圧・100℃の条件が適切と考えられた。野菜・果物加工品は、135℃や100℃では水分以外の成分の変化や揮発が顕著であり、減圧・70℃または減圧・60℃の条件が適切と考えられた。大豆加工品及びチーズは、それぞれ検討した2つの条件が適用できた。また、炭水化物が10g/100g以下と少ない試料では、乾燥条件の違いによる水分分析値の差が小さい場合でも、炭水化物に換算すると大きな差となった。

キーワード：栄養成分分析、栄養成分表示、食品表示法、加熱乾燥法

食品表示法が2015年4月1日に施行され、2020年4月1日より原則すべての一般用加工食品に栄養成分表示が義務化された。それに伴い大阪府では流通食品の栄養成分表示の真正性を確認するための検査の実施を検討している。当所においても大阪府と連携して検査体制の構築にあたることとなった。栄養成分表示の真正性の確認を目的とする場合、食品表示基準で規定されている成分の測定及び算出は、消費者庁次長通知「食品表示基準について（平成27年3月30日消食表第139号）別添 栄養成分等の分析方法等（以下、公定法）」<sup>1)</sup>に定められた分析法に従い実施する必要がある。

水分は、炭水化物の量を計算するために分析する必要があり、水分分析の公定法として、試料の加熱乾燥による減量を水分量とする方法（乾燥助剤法、減圧加熱乾燥法、常圧加熱乾燥法、プラスチックフィルム法）またはカールフィッシャー法が定められている。前者の加熱乾燥による方法は、簡便かつ多くの食品に適用でき、また、国内で実施された技能試験<sup>2,3)</sup>においてほぼ全ての参加機関が採用している。加熱乾燥による方法は、水分のみを蒸発させ、かつ水分以外の食品成分の変化を最小限に抑えられるように、原材料等を考慮し最適な乾燥温度と時間を設定する必要がある。しかし公定法には、代表的な食品の乾燥条件は記載されているが、様々な原材料から成る加工食品については記載されていない大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

い。また、「加熱乾燥後の試料の色が変わったり、焦げ等が発生している場合は、加熱温度を下げる又は減圧加熱乾燥を採用する等、乾燥条件の検討が必要」と記載されており、様々な加工食品について最適な乾燥条件を設定するためには、データや経験の蓄積が必要である。

本報告では、実際の栄養成分検査で搬入される可能性がある加工食品について、複数の乾燥条件による水分分析を行い、得られた定量値や恒量が得られるまでの時間、焦げなどの有無を比較した。それにより、実際の検査の際の条件設定に寄与するデータの蓄積を目的とした。また、水分分析における乾燥条件の違いが、炭水化物の計算値へどのように影響するか考察した。

### 方 法

#### 1. 試料

2019年10月から2021年3月に大阪府内で流通している市販の栄養機能食品または栄養成分の量について訴求する表示があり、かつ合理的な推定により得られた値を示す文言の表示がない食品を対象とした。菓子類を6種類、野菜・果実加工品を4種類、大豆加工品及びチーズを4種類、合計14種類の加工食品を使用した。菓子類としてシリアルA、シリアルB（乾燥果実を含むもの）、栄養調整食品

A (小麦粉を主成分として成形後、焼成したもの)、栄養調整食品 B (小麦粉を主成分として成形後、アーモンドをトッピングし焼成したもの)、スナック菓子 (小麦粉を主成分として成形後、小さくカットし煎ったもの)、クリームサンドビスケットを使用した。野菜・果実加工品として、コーン缶、果物ジュース (果汁 25%)、スムージー A (野菜及び果物を主原料とするもの)、スムージー B (野菜及び果物を主原料とし豆乳及びヨーグルトを含むもの) を使用した。大豆加工品及びチーズとして大豆ミート (脱脂大豆を高温・高圧乾燥したもの)、無調整豆乳、インスタントみそ汁、プロセスチーズを使用した。

## 2. 水分の分析方法

試料を必要に応じてミル等で粉碎・均質化し、公定法に示される水分の常圧加熱乾燥法、減圧加熱乾燥法及び乾燥助剤法に準じて行った。乾燥による質量の変化量が、水分 (%) として 0.1% 以内になったときを恒量とみなした。

## 3. 炭水化物の計算方法

公定法に示される炭水化物の計算方法 (差し引き

法) により計算した。計算に用いるたんぱく質、脂質、及び灰分は、公定法に準じて分析した。

## 結果及び考察

### 1. 菓子類について

公定法を含む 4 つの文献<sup>1,4,6</sup>からシリアル、栄養調整食品、スナック菓子、クリームサンドビスケットに適用可能な乾燥条件例を抽出し、表 1 の菓子類の欄にまとめた。公定法には、穀粒、乾めん、せんべい類の乾燥条件例として 135℃・3 時間のみが記載されているが、他の文献にはクッキーなどの焼菓子類の乾燥条件例として 100℃・恒量などが記載されている。これらの例を参考に 3 種類の乾燥条件で分析を行った結果を表 2 の菓子類の欄に示した。全ての試料において、水分分析値は 135℃ で他の条件より高い値となった。また、135℃ では、全ての菓子類の試料に焼き色がついた。各条件につき n=2 で行った水分分析値の相対標準偏差 (RSD) は 0.047~8.4% だった。また、乾燥条件の違いによる水分分析値のばらつきは、5.0~40% だった。今回使用した菓子類はいずれも水分含量が 100g 当たり 10g 以下

表 1 使用した試料に該当し得る食品の乾燥条件例

食品の種類	乾燥条件例		
	食品	乾燥温度 <sup>a</sup> ・時間	文献
菓子類	穀粒、乾めん、せんべい類	135℃・3時間	1, 6)
	あられ、せんべい類	135℃・3時間	4, 5)
	クッキーなどの焼菓子類	100℃・恒量	4)
	クッキーなどの焼菓子類	V100℃・恒量	5)
	クッキーなどの焼菓子類	V90~100℃・5時間	6)
野菜・果物加工品	野菜、果実及びその加工品	V70℃・5時間	1)
	野菜類、果実類、乾燥野菜類	V70℃・5時間	6)
	果実飲料	V70℃・5時間	4, 5)
	缶・びん詰類 (野菜類)	V70℃・5時間	4)
大豆加工品	きな粉、脱脂大豆	130℃・1時間	1, 4-6)
	油あげ、豆腐、納豆	100℃・5時間	1)
	豆腐類	105℃・2時間	4, 5)
	みそ	V70℃・5時間	1, 4-6)
チーズ	チーズ	105℃・5時間	1)
	チーズ類	105℃・4時間	4, 5)
	チーズ	105℃・4~5時間	6)

<sup>a</sup>Vは減圧加熱乾燥を示す。

表2 各乾燥条件における水分分析値および炭水化物計算値

分類	試料	乾燥条件			水分		炭水化物	
		温度 (°C) <sup>a</sup>	時間	乾燥 助剤	分析値(RSD) <sup>b</sup>	乾燥条件の 違いによる ばらつき <sup>c</sup>	計算値 <sup>d</sup>	乾燥条件の 違いによる ばらつき <sup>c</sup>
菓子類	シリアルA	135	3	なし	3.2 (2.2 )		82.3	
		100	5	なし	2.6 (0.047)	9.9	83.0	0.34
		V 100	5	なし	2.6 (0.10 )		82.9	
	シリアルB (乾燥果実を含むもの)	135	3	なし	8.0 (3.6 )		70.6	
		100	5	なし	5.0 (1.5 )	33	73.6	2.5
		V 70	5	なし	3.6 (2.2 )		75.0	
	栄養調整食品A (小麦粉を主成分として成形後焼成したもの)	135	3	なし	9.3 (1.1 )		53.1	
		100	5	なし	8.5 (0.76 )	5.0	53.9	0.81
		V 100	5	なし	8.3 (1.0 )		54.1	
	栄養調整食品B (小麦粉を主成分として成形後アーモンドをトッピングし焼成したもの)	135	3	なし	3.5 (1.0 )		58.1	
		100	5	なし	2.4 (1.9 )	16	59.3	0.81
		V 100	5	なし	2.7 - <sup>e</sup>		59.0	
	スナック菓子 (小麦粉を主成分として成形後、小さくカットし煎ったもの)	135	3	なし	3.5 (2.3 )		65.2	
		100	5	なし	1.5 (2.1 )	40	67.2	1.3
		V 100	5	なし	1.8 (1.2 )		66.9	
	クリームサンドビスケット	135	3	なし	2.9 (0.49 )		73.0	
		100	5	なし	1.6 (8.4 )	23	74.2	0.70
		V 100	5	なし	2.2 (1.5 )		73.7	
野菜・果物加工品	コーン缶	135	3	なし	82.2 (0.36 )		12.9	
		100	5	なし	81.5 (0.50 )	0.69	13.6	4.2
		V 70	5	海砂	80.9 (0.10 )		14.2	
	果物ジュース (果汁25%)	135	3	なし	93.7 (0.19 )		5.8	
		100	5	なし	92.1 (0.026)	2.7	7.4	30
		V 70	5	海砂	87.8 (0.016)		11.7	
	スムージーA (野菜及び果物を主原料とするもの)	135	3	海砂	95.6 (0.15 )		3.3	
		100	5	海砂	93.6 (0.042)	1.7	5.4	28
		V 70	5	海砂	92.5 (0.23 )		6.5	
	スムージーB (野菜及び果物を主原料とし豆乳及びヨーグルトを含むもの)	V 60	5	海砂	91.3 (0.16 )		7.7	
		V 70	5	海砂	90.3 (0.16 )	0.35	8.8	3.8
		V 60	5	海砂	91.0 (0.026)		8.2	
大豆加工品	大豆ミート (脱脂大豆を高温・高圧乾燥したもの)	135	1	なし	8.4 (0.63 )	1.7	34.5	0.40
		130	1	なし	8.1 (0.067)		34.7	
	無調整豆乳	100	3	海砂	92.1 (0.025)	0.43	0.6	41
		V 70	3	海砂	91.3 (0.42 )		1.4	
		V 70	3	海砂	51.7 (0.19 )	1.1	21.4	2.8
インスタントみそ汁	V 60	5	海砂	52.8 (0.071)		20.3		
チーズ	プロセスチーズ	105	4	なし	46.9 (0.13 )	0.15	4.5	1.6
		100	4	なし	46.7 (0.13 )		4.7	

<sup>a</sup>Vは減圧加熱乾燥を示す。

<sup>b</sup>n=2またはn=3で行った平均値(g/100gまたはg/100ml)及び相対標準偏差(%)

<sup>c</sup>各条件での分析値または計算値の相対標準偏差(%)

<sup>d</sup>炭水化物の平均値(g/100gまたはg/100ml)

<sup>e</sup>n=2で行ったが片方のデータのみ得られたのでRSDを計算できなかった。

と少なく炭水化物含量が 100 g 当たり 50~80 g 程度と多い試料のため、これらのばらつきは炭水化物の計算値の違いにほとんど影響しなかった。

水分の分析は恒量をもって終点とするが、シリアル A を除く全ての菓子類の試料は、135 °C で繰り返し加熱を行う度に重量が減少し恒量を得られなかった。シリアル A、シリアル B、栄養調整食品 B、クリームサンドビスケットの加熱による重量変化を図 1 の(a)~(d) に示した(栄養調整食品 A、スナック菓子については省略)。加熱による減量は、水分の蒸発以外にもアルコール類や揮発性有機酸の揮発、加熱による成分変化の影響が含まれる。135 °C の場合、焼き色が付いたことから、メイラード反応などにより試料中の成分が変化し、水分以外の成分の揮発がより顕著だったと考えられる。これらのことから、菓子類の乾燥条件として 135 °C は適さない場合が多いと考えられた。シリアル B を除く菓子類の試料はいずれも、100 °C または減圧・100 °C の条件において 2~3 回の加熱で恒量を得られたため、どちらかの条件で得られた値を採用することが適切と考えられた。シリアル B は 100 °C の乾燥で恒量は得られず、減圧・70 °C の加熱により恒量を得られたため、後者の条件で得られた値を採用することが適切と考えられた。シリアル B は乾燥果実が含まれており、100 °C の加熱では試料中の成分が変化し、水分以外の成分の揮発がより著しかったと考えられた。

竹林らが行った技能試験の報告<sup>3)</sup>では、水分分析値が不適切な結果となった原因の一つとして、恒量の基準に適合するため必要以上に乾燥を繰り返すことが挙げられている。今回の検討においても、135 °C の加熱では恒量が得られにくかったが、このような場合は値を採用せず温度を下げて再度実施する等、採用基準を明確にする必要があると考えられた。

## 2. 野菜・果実加工品について

公定法を含む 4 つの文献から果物ジュース、スムージー、コーン缶に適用可能な乾燥条件例を抽出し、表 1 の野菜・果物加工品の欄にまとめた。野菜、果物は加熱によって変化しやすい食品のため、公定法を含む 4 つの文献で減圧 70 °C・5 時間と例示されている。乾燥条件の違いによる水分分析値の比較及びデータの蓄積を目的とし、減圧 70 °C・5 時間を含めた複数の乾燥条件で分析を行い、結果を表 2 の野

菜・果物加工品の欄に示した。いずれの試料でも、135 °C 及び 100 °C による水分分析値は、減圧 70 °C または減圧 60 °C による値よりわずかに高かった。また、135 °C で乾燥した際、コーン缶で試料の一部が黒変し、それ以外の野菜・果物加工品の試料で焼き色がついた。各条件につき n=2 または n=3 で行った水分分析値の RSD は 0.016~0.50% だった。また、乾燥条件の違いによる水分分析値のばらつきは、0.35~2.7% だった。今回使用した野菜・果物加工品はいずれも水分含量が 100 g 当たり 80~90 g 程度と多く、炭水化物含量が 100 g 当たり 10 g 以下と少ない試料のため、これらのばらつきは炭水化物の計算値の違いに大きく影響した。

スムージー及び果物ジュースは、135 °C、100 °C の乾燥では恒量を得られず、減圧 70 °C 及び減圧 60 °C で恒量を得られた。代表としてスムージー A の加熱乾燥による試料重量の変化を図 1(e) に示した。野菜・果物加工品は加熱により変化しやすいため、今回の試料においても 135 °C や 100 °C の加熱で試料中の成分が変化し、水分以外の成分の揮発がより著しかったと考えられた。図には示さなかったが、コーン缶については 135 °C では恒量が得られず、100 °C、減圧 70 °C で恒量を得られた。これらのことから、野菜・果物加工品の水分分析における乾燥条件は、4 つの文献で例示された減圧 70 °C が適切であると確認できた。また、減圧 60 °C による分析値を採用することも可能であると考えられた。

## 3. 大豆加工品及びチーズについて

公定法を含む 4 つの文献から大豆ミート、無調整豆乳、インスタントみそ汁、プロセスチーズに適用可能な乾燥条件例を抽出し、表 1 の大豆加工品及びチーズの欄にまとめた。大豆ミートは、形態の近い脱脂大豆の 130 °C・1 時間、インスタントみそ汁はみその減圧 70 °C・5 時間、プロセスチーズはチーズの 105 °C・4~5 時間の乾燥条件がそれぞれ適用可能と考えられた。そこでこれらの試料については、乾燥条件の違いによる水分分析値の比較及びデータの蓄積を目的とし、それぞれの試料に適用可能と考えられた条件を含めた 2 つの条件で水分分析を行った。一方、無調整豆乳は、成分組成が近い豆腐の 100 °C、及び、水分を多く含む食品に適用される減圧 70 °C の 2 つの条件で水分分析を行った。結果を表 2 の大豆加工品及びチーズの欄に示した。インスタントみそ汁以外の試料において、乾燥温度が高

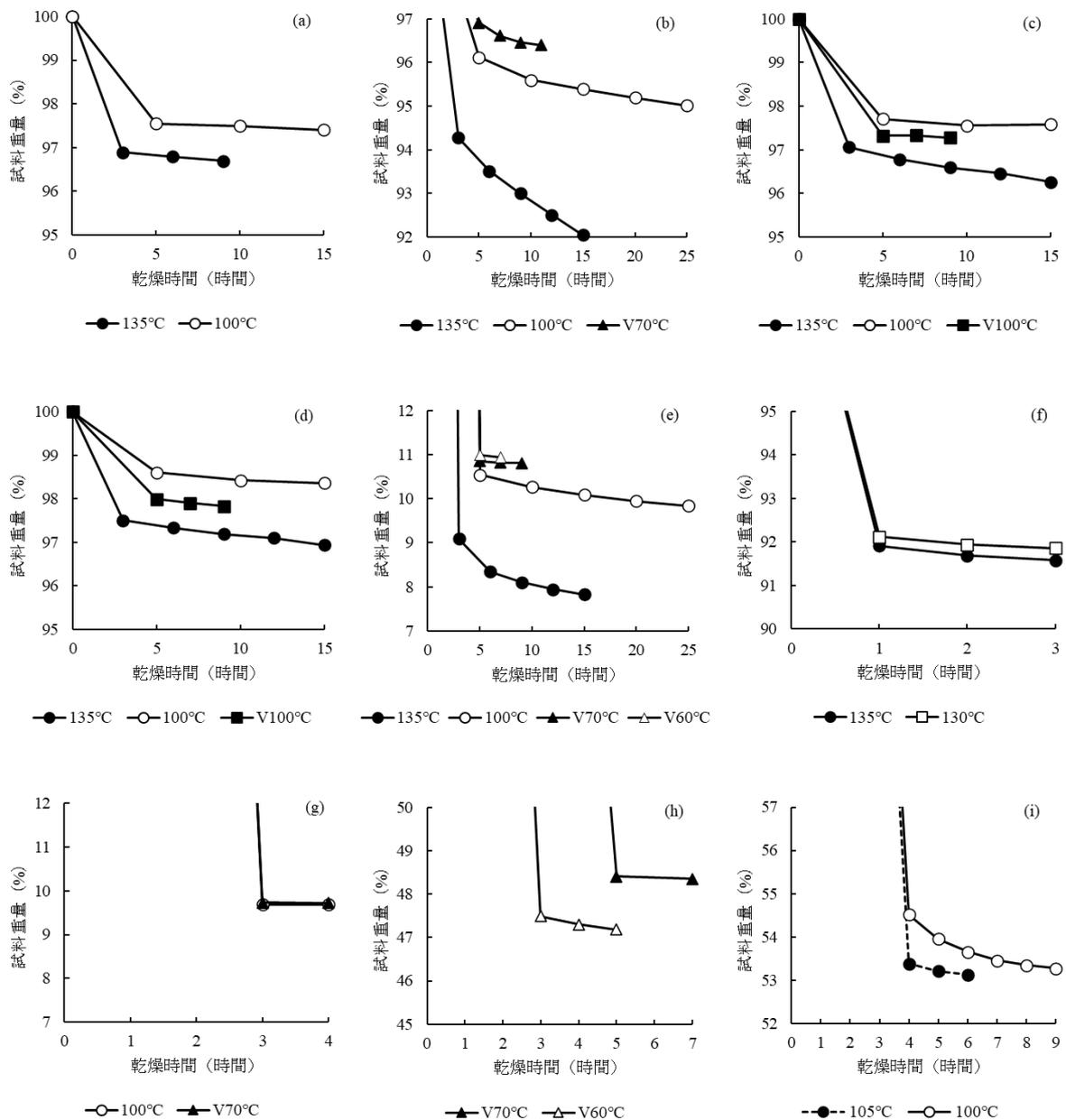


図1 加熱乾燥による試料重量の変化

(a) : シリアル A、(b) : シリアル B、(c) : 栄養調整食品 B、(d) : クリームサンドビスケット、(e) : スムージー A、(f) : 大豆ミート、(g) : 無調整豆乳、(h) : インスタントみそ汁、(i) : プロセスチーズ

い条件での水分分析値が高くなった。乾燥条件の違いによる水分分析値のばらつきは、0.43～1.7%と少なかった。また、大豆ミート及びプロセスチーズの各条件でわずかに焼き色が付いた。乾燥条件の違いによる炭水化物の計算値の違いは無調整豆乳が41%と大きかった。大豆加工品及びチーズでは、図1の(f)～(i)に示すように、プロセスチーズの100℃以外の乾燥条件において、2～3回の加熱で恒量を得られた。プロセスチーズの100℃では、恒量が得られるまでに6回加熱を繰り返す必要があった。今回、大豆加工品及びチーズでは2つの条件で乾燥を行ったが、どちらの結果を採用しても良いと考えられた。ただし、プロセスチーズは加熱を繰り返す回数の少ない105℃で行った方が効率的である。また、無調整豆乳のように炭水化物含量が少ない食品の場合、乾燥条件の違いによる水分分析値の差が小さくても、炭水化物に換算すると差が大きくなる可能性がある。そのため、表示の根拠となった値の測定時に用いた乾燥条件と異なる条件で水分分析を行うと、炭水化物の計算値が表示値から大きくずれる可能性がある。そのため、今回の無調整豆乳の様に炭水化物の表示値が10 g/100 g以下、かつ、文献などに乾燥条件例が記載されていない食品の場合、採用される複数の乾燥条件で水分分析を行うことが望ましいと考えられた。

#### まとめ

今回使用した試料では、菓子類は100℃または減圧・100℃の条件の適用が望ましかった。ただし、乾燥果実が使用されている場合は、減圧・70℃の条件で適切な結果が得られると考えられた。菓子類は水分含量が少ないため、乾燥条件の違いによる水分分析値の差が40%程度ある場合でも、炭水化物の値にはほとんど影響しなかった。野菜・果物加工品は、減圧・70℃または減圧・60℃の条件で適切な結果が得られた。大豆加工品及びチーズではそれぞれ2つの条件で乾燥を行った結果、どちらを適用しても良いと考えられた。乾燥条件の違いによる水分分析値の差は、菓子類が5.0～40%、野菜・果物加工品が0.35～2.7%、大豆加工品及びチーズが0.15～1.7%であり、水分含量の少ない検体で大きくなる傾向にあった。一方、これらの差を炭水化物に換算すると、菓子類が0.34～2.5%、野菜・果物加工品が3.8～30%、大豆加工品及びチーズが0.40～41%となっ

た。特に、炭水化物が10 g/100 g以下と少ない試料では、水分分析値の差が小さい場合でも、炭水化物に換算すると大きな差になった。そのため、表示の根拠となった値の測定時に用いた分析条件と異なる条件で水分分析を行うと、炭水化物の計算値が表示値から大きくずれることが示唆された。今回得られた結果は、検査の際の条件設定に役立つものとなった。

#### 謝辞

本研究は大阪府健康医療部生活衛生室食の安全推進課の事業の一環として実施されたものであり、関係した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) 食品表示基準について（平成27年3月30日消費表第139号）「別添 栄養成分等の分析方法等」
- 2) 竹林純, 松本輝樹, 石見佳子. 栄養成分表示値の信頼性確保—主要栄養成分に関する分析技能試験の試み—. *栄養学雑誌* 2017; **75**(1): 3-18.
- 3) 竹林純, 高坂典子, 鈴木一平, 中阪聡亮, 平林尚之, 石見佳子, 梅垣敬三, 千葉剛, 渡辺卓穂. 食品中の栄養成分検査の技能試験(2017-2018). *食品衛生学雑誌* 2020; **61**(2): 63-71.
- 4) 日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針 理化学編 2015. 日本食品衛生協会; 2015. 20-32.
- 5) 安井明美, 渡邊智子, 中里孝史, 瀧上賢一. 日本食品標準成分表 2015年版(七訂) 分析マニュアル・解説. 建帛社; 2016. 11-24.
- 6) 日本薬学会. 衛生試験法・注解 2020. 金原出版; 2020, 197-199.

**Moisture content analysis of food products for nutrition-labeling compliance test**

Tomomi YAMASAKI, Yo KAKIMOTO, Masami KI, Takuyuki HAGIWARA and Masanao SHINYA

Moisture contents of confectionery products, vegetable and fruit products, soybean products and cheese were determined by drying method at various temperatures at normal pressure or reduced pressure. When confectionery products were dried at 135 °C, changes and volatilization of components other than water were remarkable. For drying of confectionery products, 100 °C at normal or reduced pressure were considered appropriate. When vegetable and fruit products were dried at 135 °C and 100 °C, changes and volatilization of components other than water were remarkable. For drying of vegetable and fruit products, 70 °C at reduced pressure or 60 °C at reduced pressure were considered appropriate. For soybean products and cheese, the two conditions examined were applicable. In the sample with a small amount of carbohydrates, even if the difference in water analysis value due to the difference in drying conditions was as small as a few percent, there was a large difference in terms of carbohydrates.

Key words : nutrition analysis, nutrition labeling, Food Labeling Act, drying method

## 分析機器更新による動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価

山口瑞香, 栗津 薫, 白川育子, 野村千枝, 永吉晴奈, 福井直樹, 新矢将尚

食品中の残留動物用医薬品の一斉分析法の妥当性評価を行った。LC-MS/MS の更新に伴い、検出感度が向上したため、方法の一部を見直した。48成分の動物用医薬品を用いて添加回収試験を実施した結果、一部を除き、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。

キーワード: 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)、合成抗菌剤、駆虫剤、妥当性評価

当所では以前より食肉、魚介類、牛乳および鶏卵中の動物用医薬品の分析を行っており、サルファ剤、キノロン系抗菌剤、葉酸拮抗剤および駆虫薬を対象とした一斉分析法を用いてきた。既報<sup>1)</sup>では、前処理の過程で遠心エバポレーターによる濃縮操作を行っていた。しかし、機器の更新により検出感度が向上したため、濃縮が不要となった。この方法を用いて、動物用医薬品の妥当性評価を行なったので報告する。

### 実 験 方 法

#### 1. 試料および試薬等

(1) 試料: 市販の鶏卵、牛乳、鶏肉、牛肉、豚肉、サケ、エビおよびハマチを用いた。

(2) 標準品: 混合標準溶液は、富士フィルム和光純薬(株)製動物用医薬品混合標準液サルファ剤+葉酸拮抗剤およびキノロン剤を用いた。

駆虫薬の Albendazole sulfone、Oxibendazole、Thiabendazole、5-OH Thiabendazole、Praziquantel、Flubendazole、Levamisole は富士フィルム和光純薬(株)製、2-Amino flubendazole は Sigma-Aldrich 社製、Parbendazole は USP 製を用いた。

(3) 試薬等: アミノプロピル基を結合した固相抽出遠心カラムは GL Science 社製 MonoSpin L NH<sub>2</sub>、メンブランフィルターはアドバンテック東洋(株)製 DISMIC(親水性 PTFE, 13 mm φ, 0.2 μm)、残留農薬試験用ヘキサソールおよび無水硫酸ナトリウム、LC/MS 用アセトニトリル、メタノールおよびギ酸、試薬特級ギ酸は富士フィルム和光純薬(株)製を使用した。水は富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用超純水または Merckmillipore 社製 Milli-Q Integral3 により精製して用いた。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

ールおよびギ酸、試薬特級ギ酸は富士フィルム和光純薬(株)製を使用した。水は富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用超純水または Merckmillipore 社製 Milli-Q Integral3 により精製して用いた。

#### 2. 装置および測定条件

(1) 装置: 高速ホモジナイザーはポリトロン PT3100(KINEMATICA 社製)、遠心分離器は himac CF7D2 (日立工機(株)製)、高速振とう機は CM-1000(東京理化器械(株)製)、LC-MS/MS は AQUITY UPLC I-Class-Xevo TQ-XS(Waters 社製)を使用した。

#### (2) LC-MS/MS 測定条件

分析カラム: Waters CORTECS UPLC C18 (100×2.1 mm i.d., 1.6 μm)、カラム温度: 50°C、流速: 0.2 mL/min、注入量: 1 μL、移動相: A液; 0.1%ギ酸水溶液 B液; 0.1%ギ酸メタノール、グラジエント条件; B%:10%(0-5 min), 10-74% (5-17 min), 95% (17.1-22 min)、イオン化モード: ESI(+/-)、測定モード: SRM、イオン源温度: 150°C、コーンガス(窒素)流量: 200L/h、脱溶媒ガス(窒素)温度および流量: 600°Cおよび 1000 L/h。物質ごとの条件は表1に示した。

#### 3. 試験溶液の調製

(1) 抽出: 筋肉試料は細切均一化し、鶏卵は複数個を割り均一化した。牛乳はそのまま試験に供した。試料 2 g を 50 mL 遠沈管に計り採り、1%

ぎ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル 15 mL および無水硫酸ナトリウム 5 g を加え、高速ホモジナイザーで混合粉碎した。3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を新しい 50 mL 遠沈管に分取した。残渣に 1% ぎ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル 15 mL を加えて高速振とう器で 5 分間振とうし、同様に遠心分離後、上清を合わせ、1% ぎ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリルで 30 mL に定容した。ここにヘキサン 10 mL を加えて高速振とう器で約 5 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した下層を抽出液とした。

(2) 精製: 15 mL 遠沈管に MonoSpin L NH<sub>2</sub> を付け、抽出液 750 μL を負荷して 3,000 rpm で約 5 分間遠心分離した。ここに 1% ぎ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル 200 μL を加え、同様に遠心分離した。MonoSpin L NH<sub>2</sub> を外して水を加えて 1 mL とした。これをさらに水で 5 倍に希釈し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

#### 4. 検量線の作成

マトリックス入り標準溶液は各試料の種類に応じて調製した。添加試料と同様に抽出および精製を行なったブランク溶液に標準溶液を添加し、0.05~2 ng/mL となるように調製した。

#### 5. 妥当性評価

「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」<sup>2)</sup>に基づき、鶏卵、牛乳、豚肉およびサケについて妥当性評価試験(分析者 5 名、2 併行×1 日間)を行なった。牛肉、鶏肉、エビおよびハマチについては併行精度評価(6 併行)のみを行なった。各試料に 0.01、0.1 μg/g となるよう標準溶液を添加し、上記方法にて試験を行なった。

### 結果及び考察

#### 1. LC-MS/MS の最適化

2020 年に質量分析計を Waters 社製の Xevo TQ-S から Xevo TQ-XS に更新した。測定条件の最適化のため、動物用医薬品の標準溶液を測定した。しかし、キノロン剤の一部ではピーク形状が不良となった(図 1a)。キノロン系抗菌剤は、

カルボニル基を有する化学構造の為、金属とキレートを作りやすい物質としても知られている。今回のピーク形状の不良はこのためであると考えられた。そこで、装置や分析カラムの金属部分を不活化させることにより、ピーク形状を良好にすることができた(図 1b)。これらの検討の結果、Xevo TQ-S より検出感度が向上し、定量下限を下げるることができた。

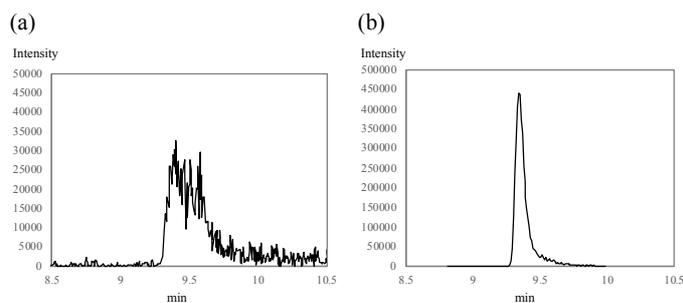


図 1 Danofloxacin のクロマトグラム  
(a)最適化前、(b)最適化後

#### 2. 試験法の検討

LC-MS/MS の移動相の初期条件は 0.1% ぎ酸含有 10%メタノール溶液であり、試験溶液がこの組成に近い溶媒でない場合に、保持時間のズレや、ピーク形状の異常が認められた。そのため従来は、試験溶液を初期条件の組成を近づけるため濃縮して 10%メタノール溶液に再溶解していた。しかし、LC-MS/MS の更新に伴って検出感度が向上したため、遠心エバポレーターでアセトニトリルを除去して溶媒を置換する必要がなくなった。そこで、MonoSpin L NH<sub>2</sub> からの溶出液を水で希釈して初期条件に近い 20%アセトニトリル水溶液にすることとした。濃縮操作が不要となり、前処理時間を短縮することができた。

#### 3. マトリックス効果の検証

マトリックス添加標準溶液と溶媒標準で検量線を作成し、検量線の傾きを比較することにより、各試料のマトリックス効果について検証した。鶏卵、牛乳、豚肉およびサケについて 0.05~2 ng/mL の範囲で作成した検量線を比較した結果、マトリックス添加標準溶液と溶媒標準の検量線の傾き比は、85~120%であった(表 2)。概ねマトリックスの影響はなく、溶媒標準の検量線でも定量できると考えられた。しかし、実際の定量結果では、牛乳のキノロン剤の一部で、

溶媒標準で定量した場合のみ目標値<sup>2)</sup>を満たさないものがあつた。そのため、マトリックス検量線での定量を行うこととした。

#### 4. 妥当性評価結果

上記方法にて妥当性評価を実施した結果を表3に示した。下線で示した一部試料の駆虫剤の代謝物については真度が70%未満であつたため妥当性評価ガイドラインの目標値を満たさなかつた。その他の物質は、真度が70~117%、併行精度が11%以下、室内精度が14%以下であり、概ね良好な結果であつた。

#### ま と め

LC-MS/MSを使用した畜水産物中の動物用医薬品一斉分析法を確立した。添加回収試験の結

果は、概ね妥当性評価ガイドラインを満たすものであり日常の検査に利用できると思はれた。

#### 利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

#### 文 献

- 1) 山口瑞香, 吉田優子, 永吉晴奈, 柿本健作, 白川育子, 北川陽子, 梶村計志. 畜水産物中の動物用医薬品の一斉分析法の妥当性評価 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所年報 2018; 2: 53- 59.
- 2) 平成22年厚生労働省食安発 1224 第1号1

表1 LC-MS/MS 測定条

Compound	posi/nega	Precursor ion (m/z)	Product ion1 (m/z)	Product ion2 (m/z)	Retention time (min)
Enrofloxacin	+	360	316	245	9.0
Ciprofloxacin	+	332	231	314	8.5
Oxfloxacin	+	362	318	261	8.0
Orbifloxacin	+	396	295	352	9.3
Sarafloxacin	+	386	342	299	9.5
Difloxacin	+	400	356	299	9.4
Danofloxacin	+	358	340	314	8.9
Norfloxacin	+	320	233	276	8.1
Marbofloxacin	+	363	72	320	6.9
Oxolinic acid	+	262	244	216	11.5
Nalidixic acid	+	233	215	187	13.2
Flumequine	+	262	202	244	13.6
Piromidic acid	+	289	271	243	15.1
Sulfaethoxypyridazine	+	295	156	92	10.5
Sulfaquinoxaline	+	301	156	92	11.6
Sulfachlorpyridazine	+	285	156	92	8.5
Sulfadiazine	+	251	156	92	2.8
Sulfadimidine	+	279	186	92	7.9
Sulfadimethoxine	+	311	156	92	11.3
Sulfacetamide	+	215	156	92	2.1
Sulfathiazole	+	256	156	92	3.4
Sulfadoxine	+	311	156	92	9.6
Sulfatroxazole	+	268	92	156	9.1
Sulfantran	-	334	136	270	13.3
Sulfapyridine	+	250	156	92	4.1
Sulfabromomethazine sodium	+	357	92	156	13.5
Sulfabenzamide	+	277	156	92	10.0
Sulfamethoxazole	+	254	156	92	8.8
Sulfamethoxy-pyridazine	+	281	92	156	8.1
Sulfamerazine	+	265	92	156	4.9
Sulfamonomethoxine	+	281	156	92	8.9
Sulfisozole	+	240	156	92	4.9
Sulfisomidine	+	279	124	186	2.9
Sulfamethoxydiazine	+	281	92	156	7.0
Sulfisoxazole	+	268	156	92	9.5
Ormetoprim	+	275	123	259	8.3
Diaveridine	+	261	245	123	5.3
Trimethoprim	+	291	230	123	7.1
Pyrimethamine	+	249	177	233	11.2
Albendazole metabolite	+	240	133	198	4.4
Oxibendazole	+	250	218	176	12.2
Thiabendazole	+	202	175	131	6.9
5-OH-Thiabendazole	+	218	147	191	4.7
Parbendazole	+	248	216	145	14.4
Praziquantel	+	313	203	83	16.4
Flubendazole	+	314	123	282	14.7
2-Amino-flubendazole	+	256	123	95	11.2
Levamisole	+	205	178	91	3.4

表2 検量線の傾き比

	salmon	pork	egg	milk
Enrofloxacin	97	95	106	107
Ciprofloxacin	102	97	104	115
Oxfloxacin	99	95	99	99
Orbifloxacin	93	88	99	100
Sarafloxacin	97	95	98	105
Difloxacin	101	95	102	107
Danofloxacin	96	94	101	110
Norfloxacin	99	95	101	107
Marbofloxacin	100	91	106	104
Oxolinic acid	93	96	99	98
Nalidixic acid	94	94	99	102
Flumequine	95	93	100	106
Piromidic acid	98	93	101	99
Sulfaethoxypyridazine	91	87	92	105
Sulfaquinoxaline	89	85	91	105
Sulfachlorpyridazine	91	87	93	111
Sulfadiazine	92	89	93	110
Sulfadimidine	91	86	92	110
Sulfadimethoxine	92	87	93	103
Sulfacetamide	91	87	93	109
Sulfathiazole	92	87	91	111
Sulfadoxine	91	87	93	108
Sulfatroxazole	93	87	93	110
Sulfantran	92	91	92	120
Sulfapyridine	91	87	92	110
Sulfabromomethazine sodium	91	86	89	101
Sulfabenzamide	91	87	93	114
Sulfamethoxazole	94	88	92	109
Sulfamethoxy-pyridazine	92	88	91	110
Sulfamerazine	91	87	93	111
Sulfamonomethoxine	91	89	93	108
Sulfisozole	90	88	95	110
Sulfisomidine	92	88	93	106
Sulfamethoxydiazine	93	88	92	110
Sulfisoxazole	91	88	92	108
Ormetoprim	94	91	96	96
Diaveridine	95	92	99	96
Trimethoprim	95	90	98	98
Pyrimethamine	95	91	98	96
Albendazole metabolite	95	91	98	107
Oxibendazole	96	91	98	95
Thiabendazole	97	94	98	98
5-OH-Thiabendazole	97	94	99	96
Praziquantel	90	83	94	105
Parbendazole	96	92	98	93
Flubendazole	93	87	95	94
2-Amino-flubendazole	98	94	99	104
Levamisole	97	93	98	97

表3 妥当性評価結

Compound	hen egg						bovine milk					
	Spiked level: 0.01 µg/g			Spiked level: 0.1 µg/g			Spiked level: 0.01 µg/g			Spiked level: 0.1 µg/g		
	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre
Enrofloxacin	109	3.2	4.6	105	1.1	2.7	111	2.4	4.2	105	2.0	4.7
Ciprofloxacin	97	3.9	8.2	96	3.3	4.2	104	5.4	5.4	102	3.4	3.4
Ofloxacin	109	5.3	5.3	100	2.6	2.6	112	1.9	2.4	102	2.8	3.5
Orbifloxacin	110	2.3	3.2	111	1.2	1.8	114	1.2	2.8	113	1.6	2.9
Sarafloxacin	107	3.5	4.5	101	2.6	3.1	109	6.5	6.5	104	1.5	3.5
Difloxacin	109	2.4	3.2	106	2.6	2.6	113	2.5	3.2	108	1.3	3.9
Danofloxacin	108	1.9	2.6	104	1.3	1.6	113	3.2	5.0	106	1.4	3.5
Norfloxacin	95	6.3	10.2	94	2.3	2.5	106	3.0	5.6	100	2.1	2.8
Marbofloxacin	109	3.7	3.7	103	1.0	3.6	112	2.8	2.9	105	2.9	3.5
Oxolinic acid	101	4.2	4.3	103	3.2	3.2	106	3.3	4.3	107	2.6	3.4
Nalidixic acid	104	2.4	5.6	104	1.2	1.8	106	5.3	5.6	103	1.3	1.6
Flumequine	105	3.0	3.3	105	1.4	1.4	106	1.9	4.0	106	2.0	2.9
Piromidic acid	106	6.8	6.8	104	4.0	7.7	109	6.2	6.2	111	1.6	5.3
Sulfaethoxypyridazine	88	5.0	5.0	92	2.9	3.8	93	0.7	2.5	94	1.7	2.3
Sulfaquinoxaline	90	5.6	5.8	93	2.5	3.5	96	2.0	3.1	95	1.3	2.4
Sulfachlorpyridazine	87	6.1	6.4	92	1.4	3.0	93	1.2	1.4	94	1.7	1.7
Sulfadiazine	89	4.0	4.0	92	2.4	3.4	93	1.0	3.0	94	1.2	2.3
Sulfadimidine	90	5.6	5.6	92	2.8	3.7	93	2.3	2.7	94	2.0	3.0
Sulfadimethoxine	92	6.4	6.4	94	2.6	3.5	94	2.7	3.0	96	0.9	2.1
Sulfacetamide	91	4.6	4.6	94	2.4	3.2	94	0.9	1.9	95	1.5	2.2
Sulfathiazole	86	4.4	4.4	89	3.2	3.8	93	1.3	2.4	93	1.4	2.5
Sulfadoxine	92	4.7	4.7	94	2.9	3.7	94	0.6	2.5	94	1.8	2.7
Sulfatinoxazole	91	6.8	6.8	93	3.0	4.6	96	3.6	4.9	95	2.2	2.4
Sulfantran	101	5.2	5.5	101	1.5	1.9	102	6.6	6.6	100	1.9	2.3
Sulfapyridine	89	5.3	5.3	91	3.1	3.5	93	1.2	2.4	93	1.4	2.0
Sulfabromomethazine sodium	95	4.9	4.9	96	2.2	4.2	100	1.2	1.6	97	1.3	2.1
Sulfabenzamide	92	4.2	4.7	94	2.1	3.5	93	1.6	2.2	95	1.7	2.2
Sulfamethoxazole	91	6.2	6.2	94	1.9	4.0	97	2.9	4.3	95	1.9	1.9
Sulfamethoxyypyridazine	88	5.7	5.7	91	2.5	4.0	91	3.0	3.3	93	1.9	3.3
Sulfamerazine	91	5.2	5.2	92	2.6	3.8	94	1.9	2.9	94	1.7	2.1
Sulfamonomethoxine	91	5.0	5.3	93	2.7	4.5	94	2.3	3.8	94	2.0	2.6
Sulfisozole	92	5.1	5.1	94	2.1	3.8	95	1.7	3.7	95	1.7	2.3
Sulfisomidine	88	4.5	4.5	89	2.8	3.0	92	0.9	2.5	91	1.4	2.1
Sulfamethoxydiazine	90	4.2	4.2	93	2.7	3.8	95	2.0	3.2	94	1.5	2.3
Sulfisoxazole	90	4.6	4.6	93	3.0	3.9	95	1.9	4.0	94	1.3	2.3
Ormetoprim	95	2.8	2.8	95	1.9	2.7	97	1.3	2.6	96	1.9	2.3
Diaveridine	94	2.8	2.8	93	1.3	1.6	97	1.3	2.9	94	1.6	1.9
Trimethoprim	96	3.6	3.6	94	1.2	1.3	96	2.0	3.8	95	1.3	1.9
Pyrimethamine	102	3.1	3.1	97	1.3	2.2	103	1.5	2.9	98	2.0	2.0
Albendazole metabolite	84	2.9	3.2	83	1.4	1.5	91	2.3	3.1	88	1.5	2.1
Oxibendazole	101	3.3	3.7	101	1.1	1.3	103	1.2	3.1	100	1.6	2.5
Thiabendazole	99	3.7	4.3	98	2.1	2.8	100	7.1	7.7	98	2.0	2.4
5-OH-Thiabendazole	94	4.6	5.4	92	2.7	2.9	98	1.8	3.5	94	2.4	3.0
Parbendazole	108	2.9	2.9	108	0.9	1.0	107	2.7	2.7	107	1.0	1.9
Praziquantel	107	2.9	2.9	109	1.9	1.9	110	3.1	4.0	112	1.7	4.0
Flubendazole	107	3.0	3.7	107	1.7	2.5	108	2.4	2.8	108	1.3	2.1
2-Aminoflubendazole	93	3.5	3.5	87	2.0	2.0	102	1.9	2.7	95	1.4	1.9
Levamisole	100	5.3	5.3	99	1.1	2.2	100	1.2	2.3	96	2.4	2.8

Compound	pork						salmon					
	Spiked level: 0.01 µg/g			Spiked level: 0.1 µg/g			Spiked level: 0.01 µg/g			Spiked level: 0.1 µg/g		
	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre
Enrofloxacin	108	2.3	3.0	100	2.9	4.3	106	4.5	8.0	96	3.9	5.2
Ciprofloxacin	92	0.6	3.9	89	1.5	3.2	90	4.2	5.1	86	1.8	5.0
Ofloxacin	104	3.0	3.1	96	1.7	2.5	101	5.0	5.0	93	2.5	4.0
Orbifloxacin	106	3.1	4.9	103	2.3	4.3	98	4.3	4.7	94	2.9	4.5
Sarafloxacin	101	3.7	5.2	97	1.2	2.2	98	7.8	7.8	93	1.7	3.2
Difloxacin	110	1.9	3.9	101	1.6	4.2	106	6.2	7.4	96	1.7	4.8
Danofloxacin	108	2.6	4.2	99	0.7	4.8	104	2.9	3.7	95	2.6	5.5
Norfloxacin	90	3.8	10.0	87	3.4	4.9	82	7.8	9.0	86	3.9	6.7
Marbofloxacin	109	3.2	4.2	106	2.8	5.6	105	4.2	5.0	97	2.0	4.6
Oxolinic acid	102	2.4	3.9	101	3.0	4.8	98	2.3	4.4	98	4.3	6.0
Nalidixic acid	101	3.0	6.0	99	1.0	3.4	101	4.0	7.0	95	1.9	5.0
Flumequine	102	1.4	3.4	102	1.5	3.6	99	3.2	4.9	98	2.8	5.9
Promidic acid	107	3.6	4.7	105	1.8	3.2	102	2.3	6.3	99	2.7	4.9
Sulfaethoxypyridazine	92	1.0	4.8	92	1.3	3.5	88	2.9	5.1	88	2.1	4.7
Sulfaquinoxaline	92	1.5	5.0	92	1.6	2.5	88	3.2	5.3	89	2.3	5.5
Sulfachlorpyridazine	94	3.7	6.9	93	0.8	4.4	89	2.6	5.7	89	2.1	4.5
Sulfadiazine	93	1.7	5.6	92	1.3	2.7	89	3.3	6.0	89	1.8	4.5
Sulfadimidine	92	1.8	6.3	93	1.6	2.7	88	2.3	5.3	89	2.1	4.3
Sulfadimethoxine	95	1.7	2.4	94	1.4	2.1	89	3.0	5.0	89	2.5	5.1
Sulfacetamide	95	1.8	5.5	93	1.4	3.3	90	2.7	5.5	90	2.0	4.8
Sulfathiazole	90	1.3	4.7	90	1.4	3.6	86	3.2	5.1	86	1.8	4.9
Sulfadoxine	94	1.8	4.8	93	1.3	2.5	90	3.2	4.7	90	1.5	5.0
Sulfatroxazole	93	3.9	6.5	93	2.1	3.0	87	5.2	6.6	90	2.6	4.9
Sulfanitran	99	4.6	8.3	96	3.1	4.0	96	8.0	14.1	93	2.6	5.4
Sulfapyridine	92	2.3	5.5	92	1.1	3.5	88	3.1	5.2	88	2.0	5.1
Sulfabromomethazine sodium	96	4.7	6.3	93	1.0	3.1	90	6.6	6.6	90	1.4	4.7
Sulfabenzamide	94	1.5	4.4	93	1.4	3.7	89	3.7	5.7	89	2.5	5.2
Sulfamethoxazole	94	2.7	5.8	93	1.5	3.4	88	3.9	5.5	89	2.7	5.2
Sulfamethoxypyridazine	93	3.1	6.4	91	1.7	4.2	87	1.9	5.3	88	1.5	4.3
Sulfamerazine	94	1.8	5.3	93	1.5	3.6	90	2.6	5.8	89	2.7	4.9
Sulfamonomethoxine	94	2.3	6.4	92	2.1	2.4	90	3.3	5.3	90	2.7	5.0
Sulfisozole	95	2.1	4.7	94	1.2	2.8	93	4.1	5.5	92	2.1	5.6
Sulfisomidine	89	2.1	5.7	88	1.0	3.6	85	3.2	5.7	85	1.7	4.9
Sulfamethoxydiazine	94	2.0	5.6	93	0.9	3.3	90	3.4	5.5	89	2.1	5.3
Sulfisoxazole	94	4.0	5.8	92	2.3	3.3	90	4.8	6.8	89	1.7	5.0
Ormetoprim	92	2.9	4.8	90	1.8	3.2	89	3.8	4.6	87	2.2	5.3
Diaveridine	90	1.4	3.7	88	0.9	2.7	87	2.9	4.7	85	2.1	5.0
Trimethoprim	92	1.8	2.5	88	1.3	3.4	89	2.6	4.2	85	1.9	4.7
Pyrimethamine	98	2.9	4.2	93	1.7	3.0	94	2.3	4.7	90	2.2	5.1
Albendazole metabolite	78	3.0	5.2	77	1.2	4.5	74	3.7	7.0	73	1.7	6.1
Oxibendazole	100	1.2	2.3	96	1.0	4.1	96	2.8	3.9	92	2.5	5.7
Thiabendazole	94	3.2	5.5	93	3.1	3.2	92	5.0	5.0	90	2.9	6.0
5-OH-Thiabendazole	69	3.2	9.0	64	1.9	10.7	80	3.3	6.8	78	2.5	6.8
Parbendazole	102	2.1	4.3	101	1.9	3.3	96	3.3	4.3	95	2.6	5.2
Praziquantel	109	1.3	4.0	105	1.4	5.0	101	2.3	4.6	97	2.2	5.0
Flubendazole	103	1.3	3.0	102	1.3	3.2	97	2.5	3.3	94	2.8	5.5
2-Aminoflubendazole	89	2.1	4.3	82	0.9	5.0	84	2.0	4.3	77	1.5	5.4
Levamisole	98	1.5	3.4	95	2.2	3.9	96	2.4	4.7	92	3.0	5.4

Compound	beef				chicken				prawn				yellowtail			
	Spiked level: 0.01 µg/g		Spiked level: 0.1 µg/g		Spiked level: 0.01 µg/g		Spiked level: 0.1 µg/g		Spiked level: 0.01 µg/g		Spiked level: 0.1 µg/g		Spiked level: 0.01 µg/g		Spiked level: 0.1 µg/g	
	rec	repeat	rec	repeat												
Enrofloxacin	98	6.0	85	3.8	91	5.1	80	3.6	96	6.1	97	3.2	117	2.5	100	2.6
Ciprofloxacin	79	6.6	73	4.1	72	3.0	73	2.6	90	5.2	87	5.9	92	3.0	90	4.6
Ofloxacin	91	4.3	81	4.2	88	1.2	75	3.9	103	3.5	93	2.4	109	3.4	99	3.1
Orbifloxacin	91	4.9	91	3.3	90	4.4	85	3.1	96	3.1	94	3.8	103	2.9	100	2.6
Sarafloxacin	89	6.8	80	2.6	91	3.9	76	3.9	94	5.8	96	4.2	104	2.8	98	2.7
Difloxacin	101	1.8	91	3.2	99	5.5	83	3.3	106	5.4	96	4.0	115	2.7	105	3.0
Danofloxacin	95	2.9	82	4.6	93	5.3	79	3.3	103	3.7	96	3.4	104	3.6	98	2.5
Norfloxacin	77	3.7	71	3.6	77	7.9	74	5.1	84	6.9	87	5.1	92	8.2	90	4.8
Marbofloxacin	100	5.8	94	3.5	100	4.2	86	4.6	103	7.2	99	3.6	108	5.3	103	3.6
Oxolinic acid	86	3.2	82	3.8	84	5.0	80	3.5	96	2.5	99	2.8	103	2.7	106	3.1
Nalidixic acid	84	3.9	84	2.5	83	3.9	80	3.2	95	5.2	96	2.3	105	5.0	101	3.6
Flumequine	84	2.9	87	2.3	82	4.1	83	2.9	95	2.2	98	3.3	107	1.8	105	3.9
Piromidic acid	91	3.2	94	3.0	86	5.6	86	3.7	97	3.4	102	3.2	108	2.7	104	2.5
Sulfathoxy-pyridazine	77	3.6	76	2.9	76	3.5	74	2.5	90	2.3	91	2.4	91	1.9	96	2.1
Sulfafinoxaline	76	5.0	76	3.3	77	4.4	75	3.0	90	4.4	91	2.3	94	3.3	95	2.5
Sulfachlorpyridazine	78	3.1	75	3.1	77	4.1	74	2.4	90	5.5	92	2.4	91	4.1	94	2.6
Sulfadiazine	78	4.2	77	2.5	76	2.7	75	2.7	92	2.3	92	2.0	94	1.5	97	2.7
Sulfamidine	78	3.3	76	2.0	76	3.4	74	2.2	91	2.9	93	2.3	92	3.0	98	1.9
Sulfadimethoxine	78	4.0	78	2.8	77	3.6	74	2.7	93	2.3	93	2.4	94	1.3	97	2.6
Sulfacetamide	77	3.3	76	2.4	76	2.7	75	2.7	90	2.6	92	2.4	95	2.1	100	2.7
Sulfathiazole	72	4.7	73	3.6	71	3.5	72	3.1	88	2.9	90	2.4	89	2.5	94	2.6
Sulfadoxine	80	2.9	78	2.6	77	3.4	75	2.1	90	2.5	92	2.1	95	2.5	98	2.3
Sulfatinoxazole	79	3.6	79	1.5	77	3.4	75	3.6	92	3.9	93	2.9	95	2.4	98	3.9
Sulfamitran	77	5.7	80	3.1	80	4.8	77	3.6	88	11.4	94	2.7	104	7.4	99	3.7
Sulfapyridine	78	3.2	76	2.8	76	2.7	74	2.6	90	3.0	91	2.4	91	2.4	97	2.5
Sulfabromomethazine sodium	78	4.8	79	4.3	78	3.8	76	3.2	92	4.7	93	2.1	93	5.0	97	2.0
Sulfabenzamide	77	4.9	75	3.8	79	3.8	74	3.1	91	2.8	92	2.1	93	1.8	97	2.8
Sulfamethoxazole	81	3.5	77	2.4	79	4.6	76	2.4	89	3.4	92	2.5	91	3.6	99	3.0
Sulfamethoxy-pyridazine	78	4.0	76	3.7	75	3.1	74	3.2	90	3.9	92	3.2	90	1.8	95	2.8
Sulfamerazine	78	2.3	77	2.6	77	3.8	74	2.2	91	0.9	91	2.2	92	2.6	97	2.3
Sulfamonomethoxine	76	3.5	77	3.6	81	5.6	74	3.9	95	4.0	92	2.7	95	3.7	96	2.4
Sulfisozole	78	3.7	77	2.0	77	3.7	75	3.0	92	3.9	92	2.9	94	2.6	98	2.7
Sulfisomidine	73	3.4	73	3.1	71	2.2	70	3.1	86	3.1	88	2.9	87	2.0	91	2.6
Sulfamethoxy-diazine	78	5.2	76	2.7	78	3.6	75	3.0	92	2.7	92	2.3	95	2.6	97	2.5
Sulfisoxazole	77	5.8	76	2.8	77	4.4	76	2.9	89	5.9	92	2.9	96	2.6	96	3.5
Ormetoprim	74	2.8	73	3.4	73	4.1	70	3.7	89	2.6	88	2.4	92	3.6	93	2.7
Diaveridine	74	2.5	71	3.3	71	2.5	71	3.1	87	3.0	86	3.2	90	1.2	89	2.7
Trimethoprim	74	3.3	72	3.3	72	5.2	71	2.8	87	2.4	87	3.0	91	2.6	90	2.0
Pyrimethamine	81	2.7	77	3.3	81	3.8	74	3.3	95	2.8	91	2.8	99	1.5	96	2.8
Albendazole metabolite	<u>61</u>	4.8	<u>63</u>	4.4	<u>60</u>	2.9	<u>59</u>	4.2	79	2.4	76	3.8	75	3.5	78	3.0
Oxibendazole	84	2.1	83	2.1	82	4.6	79	3.4	93	3.1	94	2.9	101	1.8	98	2.3
Thiabendazole	80	3.5	81	2.8	80	2.5	75	3.6	92	2.8	93	3.9	99	3.2	97	3.6
5-OH-Thiabendazole	<u>56</u>	6.7	<u>47</u>	3.0	72	3.3	<u>67</u>	3.6	85	2.4	86	4.2	<u>66</u>	6.1	<u>52</u>	15.6
Parbendazole	90	2.4	89	2.7	89	4.2	82	3.3	94	3.0	96	2.9	98	3.7	101	2.6
Praziquantel	96	2.8	95	2.3	92	3.7	87	3.7	101	3.2	102	2.9	109	2.2	105	2.5
Flubendazole	91	3.0	94	2.6	87	3.7	83	2.5	95	3.0	99	3.0	107	1.4	105	2.2
2-Aminoflubendazole	74	10.6	70	3.0	74	3.6	70	3.6	84	3.5	82	4.5	86	2.1	82	2.4
Levamisole	83	1.8	79	2.6	81	4.1	76	4.0	94	2.7	92	2.0	101	2.6	99	3.1

rec; recovery (%)

repeat; repeatability (%)

Inter. Pre; intermediate precision (%)

**Validation study for analytical method of veterinary products due to the renewal of analytical instruments**

Mizuka YAMAGUCHI, Kaoru AWAZU, Ikuko SHIRAKAWA, Haruna NAGAYOSHI, Chie NOMURA, Naoki FUKUI and Masanao SHINYA

The method for simultaneous analysis for residual veterinary drugs in food were validated. Since the detection sensitivity was improved with the update of LC-MS/MS, a part of the method was reviewed. As a result of recovery test using 48 components of veterinary drugs, the target values of the validity evaluation guidelines were satisfied except for some cases.

Key words : LC-MS/MS, synthetic antibacterial drug, anthelmintic agent, validation study

## 分析機器更新によるテトラサイクリン系抗生物質分析法の妥当性評価

山口瑞香, 粟津 薫, 白川育子, 野村千枝, 永吉晴奈, 福井直樹, 新矢将尚

食品中のテトラサイクリン系抗生物質分析法の妥当性評価を行った。LC-MS/MS の更新に伴い、検出感度が向上したため、最終液を希釈して測定した。添加回収試験を実施した結果、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。

キーワード: 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)、テトラサイクリン系抗生物質、妥当性評価

当所では以前より魚介類および牛乳中のテトラサイクリン系抗生物質の検査を行ってきた。機器の更新により検出感度が向上したため、既報の試験溶液をさらに希釈して測定する方法を検討した。この方法について、妥当性評価を行なったので報告する。

## 実 験 方 法

## 1. 試料および試薬等

(1) 試料: 市販の牛乳、サケ、エビ、ハマチおよび牛肉を用いた。

(2) 標準品: オキシテトラサイクリン塩酸塩、テトラサイクリン塩酸塩、クロルテトラサイクリン塩酸塩およびドキシサイクリンヒクラーは富士フィルム和光純薬(株)、オキシテトラサイクリン-<sup>13</sup>C,<sub>3</sub> は林純薬工業(株)を用いた。

(3) 試薬等: 固相抽出カラムは Waters 社製 Oasis HLB(60 mg/3 mL, 30 μm)、メンブランフィルターはアドバンテック東洋(株)製 DISMIC(親水性 PTFE, 13 mm φ, 0.2 μm)、アセトニトリル、メタノールおよびギ酸は富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用、クエン酸および

リン酸二ナトリウムは富士フィルム和光純薬(株)製試薬特級を使用した。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウ

ム塩二水和物(EDTA)は(株)同仁化学研究所製を用いた。水は富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用超純水または Merckmillipore 社製 Milli-Q Integral3 により精製して用いた。ガラスビーズは直径 1 mm のものをシラン処理して使用した。

## 2. 装置および測定条件

(1) 装置: 遠心分離器は 6200 (久保田商事(株)製)、高速振とう機は CM-1000(東京理化工械(株)製)、LC-MS/MS は AQUITY UPLC I-Class-Xevo TQ-XS (Waters 社製)を使用した。

## (2) LC-MS/MS 測定条件

分析カラム: Waters CORTECS UPLC C18 (100×2.1 mm i.d., 1.6 μm)、カラム温度: 30°C、流速: 0.2 mL/min、注入量: 1 μL、移動相: A 液; 0.1%ギ酸水溶液 B 液; アセトニトリル、グラジエント条件: B%; 10-30%(0-10 min), 30-90%(10-12 min)、イオン化モード: ESI(+), 測定モード: SRM、イオン源温度: 150°C、コーンガス(窒素)流量: 200 L/h、脱溶媒ガス(窒素)温度および流量: 600°Cおよび 1000 L/h。物質ごとの条件は表 1 に示した。

表 1 LC-MS/MS 測定条

Compound	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion1 ( <i>m/z</i> )	Product ion2 ( <i>m/z</i> )	Retention time (min)
Oxytetracycline	461	426	443	3.7
Chlortetracycline	479	444	462	6.8
Tetracycline	445	410	427	4.3
Doxycycline	445	428	154	7.7
Oxytetracycline- <sup>13</sup> C, <sub>3</sub>	465	430	447	3.7

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

### 3. 試験溶液の調製

(1) 抽出: 魚介類および牛の筋肉は細切均一化し、牛乳はそのまま試験に供した。試料 2 g を 50 mL 遠沈管に量り取り、内部標準物質を添加した。ここに、EDTA 含有クエン酸緩衝液を 20 mL と約 1.5 g のガラスビーズを加え、高速振とう器を用いて 1,500 rpm で 10 分振とう粉砕し均質化した後、5,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。この上清を抽出液とした。

(2) 精製: メタノール 3 mL と水 3 mL で前処理した固相抽出カラムに抽出液を 10 mL 負荷した。次に、4%メタノール溶液 2 mL で固相カラムを洗浄し、50%アセトニトリル溶液 1 mL で溶出した。溶出液に 0.1% ぎ酸水溶液を加え 2 mL に定容して試験液とした。機器の測定感度に合わせて試験液を 0.1% ぎ酸水溶液で希釈し、メンブランフィルターでろ過して測定した。

### 4. 検量線の作成

標準溶液に内部標準物質を添加し、0.002~0.1  $\mu\text{g/mL}$  となるように調製した。これを測定濃度に合わせ、0.1% ぎ酸水溶液で希釈して使用した。

### 5. 妥当性評価

牛乳、エビおよびサケについて妥当性評価試験(分析者 5 名、2 併行×1 日間)を行なった。牛肉およびハマチについては併行精度評価(6 併行)のみを行なった。各試料に 0.01 および 0.1  $\mu\text{g/g}$  となるよう標準溶液を添加し、上記方法にて試験を行なった。試験液を 10 倍に希釈して測定した。

## 結果 及 び 考 察

### 1. 試験法の検討

2020年に質量分析計を Waters 社製の Xevo TQ-S から Xevo TQ-XS に更新した。これに伴いテトラサイクリン系抗生物質の測定感度が向上した(図 1)。従来の濃度で検量線を測定した際に検量線の直線性が低下したため、測定濃度を下げることにした。測定溶液の希釈率を 4 倍から 10 倍に変更して測定を行ったところ、検量線の直線性は良好であり、定量下限の S/N は 10 以上であった。

### 2. 妥当性評価結果

上記方法にて妥当性評価を実施した結果を表 2

に示した。真度は 73~116%、併行精度は 6%以下、室内精度は 6%以下であった。概ね良好な結果であり、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<sup>2)</sup>の目標値を満たした。

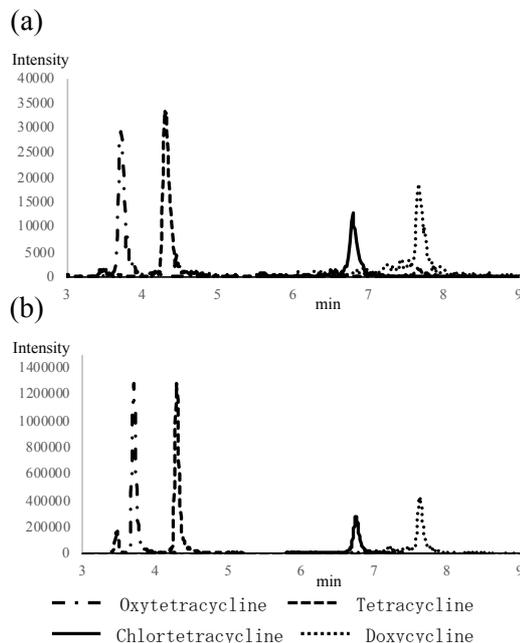


図 1 テトラサイクリン類のクロマトグラム  
(a)TQ-S 0.125 ng/mL (b)TQ-XS 0.1 ng/mL

## ま と め

LC-MS/MS を使用した畜水産物中のテトラサイクリン系抗生物質分析法を確立した。添加回収試験の結果は、概ね妥当性評価ガイドラインを満たすものであり日常の検査に利用できると考えられた。

## 利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) 藤田瑞香, 柿本健作, 田口修三, 田中之雄. LC/MS/MS による食品中のテトラサイクリン系抗生物質の分析法の検討. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2007; 45: 53- 59.
- 2) 平成 22 年厚生労働省食安発 1224 第 1 号

表2 妥当性評価結果

Compound	Spiked level: 0.01 µg/g			Spiked level: 0.1 µg/g		
	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre
Salmon						
Oxytetracycline	103	1.3	1.3	103	1.4	1.7
Chlortetracycline	80	3.0	4.1	92	0.8	2.5
Tetracycline	103	1.8	1.8	104	0.9	1.7
Doxycycline	73	2.6	2.6	88	5.0	5.0

Compound	Bovine milk			Prawn		
	rec	repeat	Inter.Pre	rec	repeat	Inter.Pre
Oxytetracycline	104	3.5	4.1	100	1.1	1.2
Chlortetracycline	94	2.1	2.8	94	1.6	2.2
Tetracycline	101	1.0	1.2	99	1.4	1.4
Doxycycline	96	2.7	3.4	96	1.9	4.2

Compound	Spiked level: 0.01 µg/g		Spiked level: 0.1 µg/g	
	rec	repeat	rec	repeat
Beef				
Oxytetracycline	95	1.6	102	1.5
Chlortetracycline	85	4.4	88	2.4
Tetracycline	96	1.5	101	2.5
Doxycycline	81	2.7	78	4.7

Compound	Yellowtail			
	rec	repeat	rec	repeat
Oxytetracycline	94	1.5	102	0.6
Chlortetracycline	81	1.4	83	6.4
Tetracycline	91	2.4	98	2.1
Doxycycline	84	3.6	85	4.6

rec; recovery (%)  
 repeat; repeatability (%)  
 Inter.Pre; intermeditate precision (%)

**Validation study for analytical method of tetracyclines antibiotics due to the renewal of analytical instruments**

Mizuka YAMAGUCHI, Kaoru AWAZU, Ikuko SHIRAKAWA, Haruna NAGAYOSHI, Chic NOMURA, Naoki FUKUI and Masanao SHINYA

The validity of the tetracycline antibiotic analysis method in food was evaluated. Since the detection sensitivity improved with the renewal of LC-MS/MS, the final solution was diluted and measured. As a result of recovery test, the target value of the validity evaluation guideline was satisfied.

Key words : LC-MS/MS, tetracyclines antibiotics, validation study

## 水質検査における外部精度管理（2019 年度）

### —ナトリウム及びその化合物—

吉田 仁, 安達史恵

水道水質検査精度の向上を図ることを目的とし、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た。水道事業者等に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、24 検査値中 2 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。外れ値と評価されたこれら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ナトリウム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、ナトリウム及びその化合物、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<sup>1-10)</sup>。

2019 年度の対象項目は、無機項目として「ナトリウム及びその化合物」を選定した。水道水中のナトリウムの多くは、自然由来によるものであるが、海水、顔料・染色・パルプ工場排水などの混入や苛性ソーダによる pH 調整、次亜塩素酸ナトリウムによる塩素処理等の浄水処理に由来することがある<sup>11,12)</sup>。

ナトリウムはヒトにおいて重要な元素ではあるが、食塩過剰摂取による急性影響として、けいれん、筋硬直、肺浮腫などある<sup>12)</sup>。ただし、一般的な飲料水中のナトリウムは 1 日のナトリウム総摂取量のわずかにしか寄与していない。現在までに飲料水中のナトリウムとそれに関する疾病との関係は明確になっておらず、健康影響に関する指針値は設定されていない<sup>11)</sup>。ナトリウムの水質基準については、1992 年以降、新たに追加すべき知見がないことから 1992 年の専門委員会

の評価値 200 mg/L が味覚の観点から現在も維持されている<sup>11)</sup>。

### 方 法

#### 1. 参加機関

本研究に参加した水道事業者等は、24 機関であった。その内訳は水道事業者 21 機関、保健所 1 機関および公的研究機関 2 機関であった。

#### 2. 実施方法

##### (1)精度管理試料の調製方法

2019 年 9 月 24 日に水道水約 30 L をポリタンクに採水し、精度管理試料とした。採水した水道水の水質分析結果を表 1 に示す。500 mL 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 26 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)試料の検査方法

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—原子吸光光度計による一斉分析法

表 1. 精度管理試料の水質分析結果

試験項目	結果
1 一般細菌	0 /mL
2 大腸菌	不検出
34 鉄及びその化合物	0.01 mg/L未滿
37 マンガン及びその化合物	0.005 mg/L未滿
38 塩化物イオン	8.4 mg/L
39 カルシウム、マグネシウム等（硬度）	32 mg/L
46 有機物(全有機炭素(TOC)の量)	0.6 mg/L
47 pH値	8.0
48 味	異常を認めない
49 臭気	異常を認めない
50 色度	0.2度
51 濁度	0.04度
遊離残留塩素	0.1 mg/L

(FLAA 法)、フレイム-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)、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) およびイオンクロマトグラフ (陽イオン) による一斉分析法 (IC 法) とした<sup>13)</sup>。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。

### (3) 評価の検証方法およびフォローアップ

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。

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<sup>14)</sup> 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。  

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

Z スコアは四分位数法で算出し<sup>15)</sup>、Z スコアの絶対値 3 未滿を許容範囲とした。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ナトリウム及びその

化合物の変動係数の目標が 10% であるためである<sup>16)</sup>。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。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。

## 結果 および 考察

### 1. 精度管理試料の均一性および安定性

精度管理試料の均一性を確認するために、2019 年 9 月 24 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=0.64)、均一性に問題がないことを確認した。また、配付日、配付 1、4、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、精度管理試料の安定性に問題はないと判断した。

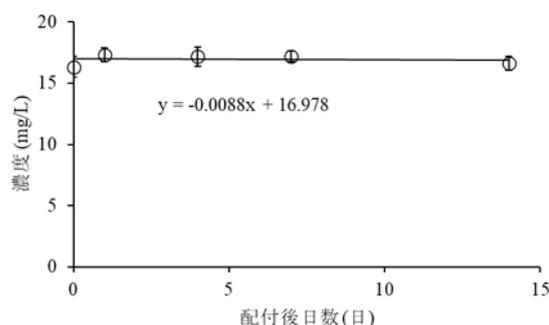


図 1 精度管理試料に含まれるナトリウムの分析値の安定性 (n = 5、平均±標準偏差)

### 2. 検査方法

参加機関が用いた検査方法を表 2 に示す。

表 2. 参加機関の検査方法およびデータ数

検査方法	データ数
フレイムレス-原子吸光光度計による一斉分析法 (FLAA法)	1
フレイム-原子吸光光度計による一斉分析法 (AAS法)	1
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)	0
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)	2
イオンクロマトグラフ(陽イオン)による一斉分析法 (IC法)	20
計	24

本研究においては、IC 法でナトリウム及びその化合物の検査を実施する機関が最も多く、次いで ICP-MS 法、FLAA 法および AAS 法と続いた。ICP-AES 法を使用した機関はなかった。

### 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 24 機関から報告された 24 の検査値、変動係数、誤差率および Z スコアを表 3 に、各機関の検査値のヒストグラムを図 2 に示す。

表 3. 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	16.6	1.78	-4.61	-2.51
A-2	IC	17.1	0.26	-2.08	-1.09
A-3	IC	17.1	0.92	-1.97	-1.03
A-4	IC	17.1	0.32	-1.74	-0.90
A-5	IC	17.2	0.26	-1.51	-0.77
A-6	IC	17.3	0.86	-0.94	-0.45
A-7	IC	17.3	0.00	-0.82	-0.39
A-8	IC	17.4	0.57	-0.25	-0.06
A-9	IC	17.4	0.00	-0.25	-0.06
A-10	IC	17.4	0.00	-0.25	-0.06
A-11	IC	17.4	0.00	-0.25	-0.06
A-12	IC	17.4	0.00	-0.25	-0.06
A-13	IC	17.4	0.31	-0.02	0.06
A-14	ICP-MS	17.5	1.24	0.21	0.19
A-15	IC	17.5	1.62	0.32	0.26
A-16	IC	17.5	0.26	0.44	0.32
A-17	IC	17.6	0.51	0.67	0.45
A-18	IC	17.7	0.00	1.47	0.90
A-19	IC	17.8	0.85	1.81	1.09
A-20	IC	17.9	0.31	2.39	1.41
A-21	IC	18.0	1.49	3.07	1.80
A-22	IC	18.2	0.30	4.57	2.63
A-23*	AAS	19.4	0.94	11.0	6.23
A-24*	FLAA	20.1	4.80	15.0	8.48
平均値		17.6			
最大値		20.1			
最小値		16.6			
標準偏差		0.72			
変動係数(%)		4.1			
n		24			

真値：17.4 mg/L

\*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

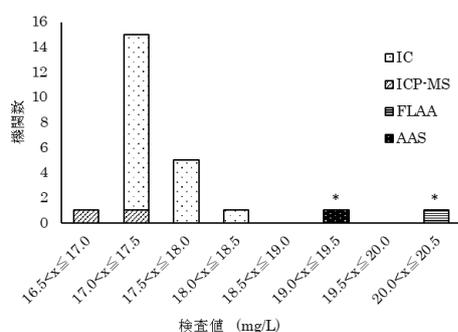


図 2. 検査法別の検査値のヒストグラム

(\* : 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。

はじめに、「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、2 検査値 (A-23 および A-24) が棄却され、

残りの 22 検査値を平均した 17.4 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を超えたのは 2 機関 (A-23 および A-24) であり、誤差率はそれぞれ、誤差率と Z スコアとの両方の許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当する機関は 2 機関 (A-23 および A-24) であった。外れ値の存在率は 8.3% (2/24) であった。「外れ値」となった機関 A-23 および A-24 に対してフォローアップ調査を行った。

#### (2) フォローアップ調査

機関 A-23 は、AAS 法を用いており、検査値は 19.4 mg/L、Z スコアは 6.23 および誤差率は 11.0% であった。提出された資料から告示に逸脱する点等は見られなかった。機関 A-23 の検査担当者に問い合わせたところ、空試験の結果が検量線の下限值未満であったが、普段の検査結果より 2 倍程度高かったことが明らかになった。検査担当者は、精度管理試料の希釈等に使用した精製水を入れた洗瓶にナトリウムが混入していたのではないかと回答した。空試験の結果を減算して再計算をした結果、検査値は 17.1 mg/L となり誤差率は 1.9% となった。そこで、機関 A-23 の検査担当者に前処理時にナトリウムの汚染に留意するよう助言した。具体的には、検査に使用する精製水は使用直前に用意すること、洗瓶については分析毎に精製水を入れ替えること、使用する器具は使用直前に精製水でリンスして乾燥させることを助言した。その後、機関 A-23 の検査担当者は、再試験を実施した。再試験の際、検査担当者は、我々の助言に加え前処理時の汚染を低減させるために加熱時間をこれまでの 2 時間から 1 時間～1.5 時間程度に短くした。その結果、検量線の下限值に対する空試験の吸光度の比が 0.258 から 0.225 に改善された。そして、検査値は 17.4 mg/L となり、当所が測定した再調製試料の検査値 16.7 mg/L に対して誤差率 4.56% と良好な結果を得ることができた。ナトリウムは一般環境中に広く存在する物質であるため、汚染が発生しやすい検査項目と考えられる。特に、IC 法以外の方法の内、AAS 法および FLAA 法は加熱操作に加え希釈操作が必要となるため、前処理中の雰囲気からの汚染に注意が必要である。そのため、今回の事例の様に空試験が普段の値より高値を示した場合は、検査値の精度が低下している可能性があるため、留意する必要があることが明らかになった。

機関 A-24 は、FLAA 法を用いており、検査値は 20.1 mg/L、Z スコアは 8.48、「真値」に対する誤差率は 15.0%であった。提出された資料から、機関 A-24 では、測定波長が 330.2 nm で告示法の 589 nm とは異なっていた。また、告示法で定められている加熱操作を実施していなかった。さらに、分析装置の動作不良により 2 週間以内の検査が実施できなかった。機関 A-24 の検査担当者に問い合わせたところ、測定波長が告示法と異なった理由として、告示法通りの測定波長ではナトリウムの吸光度が高すぎるため、感度を低下させるために波長を変更していたことがわかった。また、現在使用している原子吸光度計について、機器メーカーによる修理は実施したものの装置の完全な復旧とはならず、機器メーカー担当者より装置の経年劣化が指摘されていたことが明らかになった。以上の結果より、告示を遵守した標準作業手順書 (SOP) を制定するとともに、検査に使用する機器は保守点検等により常に性能を維持する必要があることが明らかになった。なお、機関 A-24 では次年度に ICP-MS を新たに購入し、ナトリウムを含め FLAA 法で実施していた検査をすべて ICP-MS による検査に移行する予定であったため、今回のフォローアップでは、告示法からの逸脱部分についての助言のみを行った。

### (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<sup>13)</sup>。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、機関 A-14 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<sup>13,17)</sup>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<sup>13)</sup>。FLAA 法、AAS 法、ICP-AES 法、ICP-MS 法および IC 法の上限はそれぞれ 0.2、0.6、20、200 および 200 mg/L となっている。機関 A-24 では、最も高い検量点が告示の範囲を超えていたため、SOP の修正が必要であった。

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<sup>13)</sup>。本研究ではすべての機関が空試験を実施しており、検量線の下限値を下回ることを確認していた。

#### ② 前処理および標準液

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<sup>13)</sup>。本研究では、前処理操作において AAS 法もしくは FLAA 法で検査した 2 機関が 10 ~ 100 倍の範囲で希釈操作を実施していた。

告示法では、IC 法において孔径 0.2 μm のフィルターろ過処理を行うこととなっているが機関 A-2 および A-5 では、ろ過処理を行っていなかったため、SOP の修正が必要であった。また、AAS 法、FLAA 法、ICP-AES 法および ICP-MS 法では加熱操作を行うこととされているが、機関 A-24 において加熱操作は行われておらず、また SOP にも加熱操作の記載がなかったため、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 条もしくは第 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も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<sup>13)</sup>。また、告示法の標準液も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<sup>13)</sup>。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<sup>13)</sup>。本研究においては、すべての機関で市販の標準原液もしくは混合標準液を使用していたが、4 機関 (機関 A-9、A-17、A-21 および A-22) では認証付きの製品を使用していなかった。これらの機関は認証付きの製品を使用する必要がある。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。

#### 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<sup>17)</sup>。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て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。本研究では機関 A-2 および A-22 を除く機関がキャリーオーバーの評価を実施していた。なお、機関 A-22 では分析機器が 2019 年 9 月 6 日に納入されたため、外部精度管理実施時においては妥当性試験を行っている最中であった。検量線の真度および精度の評価を、それぞれ 88% (21/24) および 83% (20/24) の機関が実施していた。添加試料の真度および精度の評価については、いずれも 83% (20/24) 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、ナトリウム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 24 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。24 機関の内、誤差率±10%を超えたのは 2 機関であった。また、Z スコアの絶対値が 3 以上であったのは 2 機関であった。両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当したのは 2 機関であった。「外れ値」の存在率は、8.3% (2/24) であった。そして、検証の結果、検査精度を向上するためには、以下の留意点が考えられた。

- (1) 告示に基づいた SOP を作成すること。
- (2) 分析機器については、保守点検を行いその性

能を維持すること。性能が維持できない場合は、機器を更新する必要がある。

- (3) ナトリウムの測定では汚染の可能性がある。とくに空試験の結果が普段の検査結果に比べて高い値になったときは、分析時に汚染が発生した可能性が懸念されるため、留意する必要がある。

#### 謝 辞

本研究は「令和元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, 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 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-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.
- 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-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.
- 6) 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.
- 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 吉田仁, 中島孝江. 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-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2020; 4: 93-99.
  - 11) 厚生労働省. 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/k37.pdf>
  - 12) 真柄泰基. 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社; 1994. 56.
  - 13) 厚生労働省. 厚生労働省告示第 261 号「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」.  
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000615898.pdf>
  - 14) 日本工業標準調査会. JIS Z8402-2: 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度-第 2 部: 標準測定方法の併行精度及び再現性を求めるための基本的な方法). 日本規格協会; 1999. 309-310.
  - 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) 厚生労働省. 建水発第 1010001 号「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」.  
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000763260.pdf>
  - 17) 厚生労働省. 建水発 0906 第 4 号「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて」.  
<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/hourei/jimuren/dl/120906-4.pdf>

WEB サイトの内容は 2021 年 5 月 6 日に確認した

**Results of external quality control on the analytical methods for sodium in tap water, performed in 2019  
in Osaka Prefecture**

Jin YOSHIDA and Fumie ADACHI

In order to improve the accuracy of water quality measurements, we implemented the external quality control on analytical methods for sodium in tap waters, with water supply corporations, public health centers and public research institutes in Osaka Prefecture. As a result, two of 24 examination values were evaluated as outliers. We executed the follow up survey for these facilities. The survey showed that the examination value was suggested to be influenced by the sodium contamination in the process of the preparation step of the measurement.

**Key words** : tap water, sodium, 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 (2020 年度)

## —大阪府建築物飲料水水質検査業 (臭素酸) —

吉田 仁, 中島孝江, 長谷川有紀, 小泉義彦

水道水質検査における定量精度に影響を与える因子を抽出し、分析法改良の提案を行うことを目的に、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外部精度管理を実施した。臭素酸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、14 機関中 3 機関が、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。これら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、検量点数の不足、不適切な検量線濃度範囲および標準液調製操作の不備が定量値に影響を及ぼす要因となることが明らかになった。

キーワード：水道水、臭素酸、水道水質検査、定量精度、建築物飲料水水質検査業

(地独) 大阪健康安全基盤研究所では、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、水道水質検査における定量精度に影響を与える因子を抽出し、分析法改良の提案を行うことを目的に、「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 (以下、登録水質検査業者) を対象に外部精度管理を実施している<sup>1-4)</sup>。

2020 年度の対象項目は、無機項目である「臭素酸」を選定した。臭素酸 (臭素酸イオン、 $\text{BrO}_3^-$ ) の多くは塩として存在し、一般的な形態としては、臭素酸カリウム、臭素酸ナトリウムとして存在している。臭素酸カリウムは小麦粉改良剤として、臭素酸ナトリウムは分析用試薬や毛髪のコールドウェーブ用薬品等として使用されている。さらに臭素酸は、水道水の消毒に用いる次亜塩素酸ナトリウムの不純物として含まれる可能性があり、また浄水処理工程の 1 つであるオゾン処理時に水に含まれる臭素が酸化され生成することが知られている<sup>5)</sup>。一方で臭素酸は凝集沈殿処理やエアレーションでは除去することが困難であるの

でオゾン処理時においてはオゾン注入率や pH を制御することにより生成を抑制することが重要である<sup>5)</sup>。

ヒトの健康影響について、International Agency for Research Cancer では、臭素酸カリウムは実験動物の発がん性に関して十分な証拠があるとして Group2B (ヒトでの発がんの可能性あり) に分類されている<sup>6)</sup>。臭素酸は遺伝毒性を示す発がん性物質として考えられているため、動物実験の結果からリスク計算を行い、最終的にその基準値は 0.01 mg/L に設定された<sup>7)</sup>。

## 方 法

## 1. 参加機関

本研究に参加した登録水質検査業者は、14 機関であった。

## 2. 実施方法

## (1) 水質検査用模擬試料の調製方法

2020 年 9 月 28 日に精製水約 15 L をポリタンクに採水した。臭素酸標準液 (富士フィルム和

光純薬：2000 mg/L、保証期限 2021 年 1 月、ロット番号 KCR4333) 1.0 mL を精製水で 100 mL にメスアップして 20 mg/L 標準液を調製した。この標準液 3.75 mL をポリタンクに添加した後に攪拌し、250 mL のポリエチレン製容器に分注したもの（設定濃度：0.005 mg/L）を水質検査用模擬試料とした。なお、標準液添加前の精製水に存在する臭素酸は 0.001 mg/L 未満であり、試料調製の精製水として問題ないと判断した。9 月 29 日に各登録水質検査業者にチルド便にて送付した。

## (2) 試料の検査方法

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」（平成 15 年 7 月 22 日付け厚生労働省告示第 261 号〔最終改正 令和 2 年 3 月 25 日付け厚生労働省告示第 95 号〕（告示法）のイオンクロマトグラフィーポストカラム吸光光度法（IC 法）（別表第 18）および液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS/MS 法）（別表 18 の 2）とした<sup>8)</sup>。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。

## (3) 評価の検証方法およびフォローアップ

各参加機関から返送された「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。

評価の実施に先立って、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<sup>9)</sup>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。

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

Z スコアは四分位数法で算出し<sup>10)</sup>、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は、水道基準項目の測定精度における臭素酸の変動係数の目標値を根拠に 10% とした<sup>11)</sup>。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。その後、「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。

## 結果 および 考察

### 1. 水質検査用模擬試料の均一性および安定性

精度管理試料の均一性を確認するために、2020 年 9 月 28 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。その後、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 ( $p=0.55$ )、均一性に問題がないことを確認した。また、試料の安定性を確認するために、配付日、配付 1、2、5、7、12 および 14 日後に試料を測定した結果を図 1 に示す。

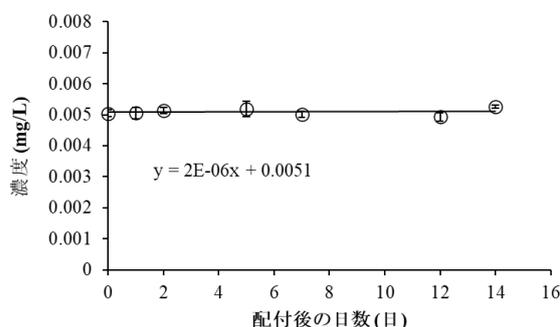


図 1 水質検査用模擬試料に含まれる臭素酸の分析値の安定性 (n = 5、平均±標準偏差)

近似直線の傾きはほぼ 0 で、水質検査用模擬試料の安定性に問題はないと判断した。

### 2. 検査方法

本研究においては、14 機関中 13 機関が IC 法で臭素酸の検査を実施し、残り 1 機関が LC/MS/MS 法により実施していた。大半の登録水質検査業者は臭素酸の測定を IC 法により測定していることがわかった。

### 3. 検査結果の検証

(1)誤差率、Zスコア及び「外れ値」

参加機関 14 機関から報告された 14 の検査値、変動係数、誤差率および Z スコアを表に示す。さらに、各機関の検査値のヒストグラムを図 2 に示す。

表. 各参加機関から報告された検査値の概要

機関番号	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	誤差率 (%)	Zスコア	検査方法
A-01*	0.00357	1.31	-26.6	-7.78	IC法
A-02*	0.00403	1.44	-17.4	-5.03	IC法
A-03	0.00471	2.2	-3.22	-0.85	IC法
A-04	0.00473	4.05	-2.86	-0.74	LC/MS/MS法
A-05	0.00479	3.35	-1.75	-0.41	IC法
A-06	0.00481	0.97	-1.17	-0.24	IC法
A-07	0.00482	0.85	-1.01	-0.19	IC法
A-08	0.00489	1.14	0.31	0.19	IC法
A-09	0.00489	1.7	0.43	0.23	IC法
A-10	0.00491	1.23	0.72	0.32	IC法
A-11	0.00499	1.18	2.4	0.81	IC法
A-12	0.005	0.85	2.65	0.89	IC法
A-13	0.00504	4.47	3.51	1.14	IC法
A-14*	0.00545	6.04	11.8	3.61	IC法
平均値	0.00476				
最大値	0.00545				
最小値	0.00357				
標準偏差	0.00045				
変動係数 (%)	9.5				
n	14				

真値：0.00487 mg/L (Grubbsの棄却検定で棄却された機関を除いた平均)  
 \* : Grubbsの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、かつZスコアの絶対値が3以上の機関 (外れ値)

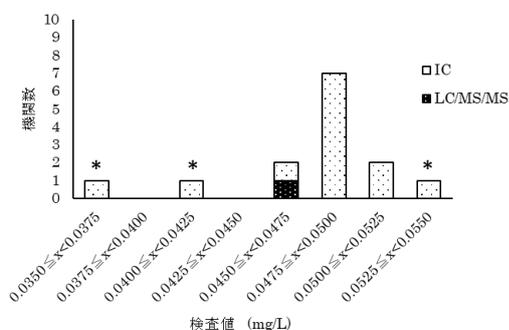


図 2. 検査法別の検査値のヒストグラム (\* : 外れ値)

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、3 機関 (A-01、A-02 および A-14) が棄却され、残りの 11 検査値を平均した 0.00487 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を超えたのは 3 機関

(A-01、A-02 および A-14) であり、誤差率はそれぞれ、-26.6、-17.4 および 11.8% であった。次に、14 検査値を用いて Z スコアを求めた結果、Z スコアの範囲は -7.78 ~ 3.61 となり、Z スコアが許容範囲を超えたのは 3 機関 (A-01、A-02 および A-14) であり、Z スコアはそれぞれ、-7.78、-5.03 および 3.61 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 3 機関 (A-01、A-02 および A-14) であった。外れ値の存在率は 21% (3/14) であった。「外れ値」となった機関 A-01、A-02 および A-14 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-01 は、IC 法を用いており、検査値は 0.00357 mg/L、「真値」に対する誤差率は -26.6%、Z スコアは -7.78 であった。

機関 A-01 の検査担当者は、外れ値となった原因として標準液の調製ミスが推測されると回答した。その理由として、普段の標準系列のピーク面積に比べて今回の標準系列のピーク面積が高かったためとのことであった。機関 A-01 では、原体を用いて標準原液を調製していた。機関 A-01 の SOP における標準原液の調製方法は、臭素酸カリウム 1.31 g を精製水に溶かして 1 L としていた (1000 mg/L)。この調製方法は、告示法の調製方法、すなわち臭素酸カリウム 2.63 g を精製水に溶かして 1 L とする (2000 mg/L) とは臭素酸カリウムの量が異なっていた。担当者は機関 A-01 の SOP に従って標準原液および標準系列を測定当日に調製していた。そのため、担当者が標準液の調製をどの箇所で間違えたか明らかにすることはできなかった。その後、担当者は市販の標準原液を購入して標準系列を調製し精度管理試料を再測定した結果、標準系列のピーク面積が普段の検査と近い値となり、検査値は 0.00491 mg/L、真値に対する誤差率は 0.76%、Z スコアは 0.15 と共に許容範囲に収まり改善された。以上より、検査精度を維持するためには標準溶液を正確に調製すること。さらに、日頃から測定対象物質の検出感度を確認し、異なる場合はその原因を追究することが重要であることがわかった。

機関 A-02 は、IC 法を用いており、検査値は 0.00403 mg/L、「真値」に対する誤差率は -17.4%、

Z スコアは-5.03 であった。

機関 A-02 の検査担当者は、検量点数が少ない不適切な検量線を使用したことが原因として推測されるとのことであった。機関 A-02 の検量点は 0.001、0.01、0.02 mg/L であった。

機関 A-14 は、IC 法を用いており、検査値は 0.00545 mg/L、「真値」に対する誤差率は 11.8%、Z スコアは 3.61 であった。

機関 A-14 の検査担当者は、検量点数が少ない不適切な検量線を使用したこと、およびメンブレンフィルターを使用しなかったことが原因として推測されるとのことであった。機関 A-14 の検量点は、0、0.0015、0.006、0.015 mg/L であり 0 を除くと 3 点で検量線を作成していた。

A-02 および A-14 はいずれも検量点数が少ない不適切な検量線を使用したことが外れ値の原因と考えられた。本研究において、検量点数が 4 点未満であった機関は 2 機関であったが、そのいずれも外れ値となった。このように、定量精度に影響を及ぼす因子として検量点数は重要であり、検査精度を向上させるためには、検量点数は 4 点以上、告示法に準拠した検量線濃度範囲など適切な検量線を作成する必要があると考えられた。さらに、両機関に対して検量点数は 4 点以上必要であること、公比は 4 以内であることが望ましいことを助言した。その後、A-02 に対して水質検査用模擬試料を再送付し、検量点を 4 点 (0.001、0.002、0.005、0.01 mg/L) に増やした検量線で再測定を実施した。その結果、A-02 の検査値が 0.00484 mg/L となり当所で測定した結果 (0.00497 mg/L) に対する誤差率が-2.54%と良好な結果を得ることができた。

### (3) 全体的な留意点

#### ① 標準手順作業書と妥当性試験

標準手順作業書 (SOP) について、フロー図のみで SOP の体をなしておらず、未整備と分類した機関が 2 機関あった。標準液の具体的な調製方法および検量線の濃度と点数については、すべての機関が記載していた。一方、精製水を含む試薬類および器具・装置の規格をすべて記載した機関は 2 機関であった。SOP へ記載されていなかった項目として、空試験の実施方法、連続測定を実施する場合の措置、試料の採取および保存、試験開始までの時間等があった。SOP は、精度良く検査を実施する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となるものを整備する必要がある。

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評価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<sup>12)</sup>。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。妥当性評価ガイドラインは、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ケット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を満たす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。SOP に従って行う妥当性評価は自社の検査法の精度を客観的に評価できるものであり、検査結果の信頼性に繋がるものである。検量線の妥当性評価を実施していた機関は 9 機関、添加試料の妥当性評価を実施していた機関は 8 機関であった。登録建築物飲料水水質検査業においては妥当性評価の重要性を認識する必要があると考えられた。

#### ② 検査開始までの時間

告示法では検査開始までの時間は 2 週間以内と定められているが、すべての機関が 2 週間以内に検査を開始しており、問題はなかった。

#### ③ 前処理

告示法では、前処理として検水をメンブレンフィルターろ過装置でろ過することと記載されている<sup>8)</sup>。また使用するメンブレンフィルターの孔径は約 0.2 μm と規定されている。

メンブレンフィルターでろ過していない機関が 3 機関存在した。また、メンブレ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 1 機関あった。検査に使用する器具、試薬などは告示を遵守した SOP に定められた規格のものを使

用する必要がある。

#### ④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<sup>8)</sup>。また、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<sup>8)</sup>。IC 法では 0.001~0.02 mg/L、LC/MS/MS 法では 0.0005~0.02 mg/L である。本研究において、検量線が濃度範囲を逸脱した機関、原点を強制的に通過させた機関、検量線の範囲外で測定した機関はなかった。一方、0 mg/L を検量点としていた機関は 1 機関、0 mg/L を除いた検量点数が 4 点未満だった機関が 2 機関であった。なお、2 機関の内 1 機関はフォローアップ調査により改善されている。

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、その値が検量線の濃度範囲の下限値（基準値の 1/10 以下）を下回ることを確認する必要がある。今回、空試験が未実施の機関は無かったが、検量点の最小濃度が基準値の 1/10 より高いため、判定値を下回ることを確認できない機関が 1 機関存在した。検量線の下限値は基準値の 1/10 以下に設定することが必要である。

#### ⑤標準液

告示法では、標準原液、標準液または混合標準液は原体から自己調製したもの、もしくは計量法（平成 4 年法律第 51 号）第 136 条若しくは第 144 条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書が添付され、かつ、告示法の標準原液と同濃度のもの又は告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものの使用が認められている<sup>8)</sup>。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<sup>8)</sup>。本研究においては、原体から標準原液を調製した機関が 2 機関、市販の標準原液を使用した機関が 12 機関であった。原体から標準原液を調製した 2 機関のうち、1 機関の標準原液が告示（2000 mg/L）と異なり 1000 mg/L となっていたため SOP の改善が必要であった。市販の標準原液を使用した機関のうち、1 機関の標準原液濃度が告示（2000 mg/L）と異なっていたため改善が必要であった。一方、すべての機関において検量

線作成用標準液は用時調製していた。

#### ま と め

大阪府の登録建築物飲料水水質検査業を対象に、臭素酸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 14 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。14 機関の内、誤差率±10%を超えたのは 3 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 3 機関であった。「外れ値」の存在率は、21%（3/14）であった。検証の結果、検査精度を向上するためには、以下の留意点が考えられた。

- (1) 告示法に準拠した SOP を整備する。
- (2) 分析操作は告示法を遵守し、SOP から逸脱しないようにする。
- (3) 検量点数は 4 点以上、告示法に準拠した検量線濃度範囲など適切な検量線を作成する。
- (4) 標準液を正確に調製する。
- (5) 日頃から測定対象物質の検出感度を確認し、異なる場合はその原因を追究する。

#### 謝 辞

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

研究実施にあたり協力していただいた大阪府健康医療部生活衛生室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: 73-

- 79.
- 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) 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(2019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 2020; 4: 100-109.
  - 5) 厚生労働省. 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/konkyo0303.html>
  - 6) International Agency for Research Cancer. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>
  - 7) 真柄泰基. 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社; 1994. 56.
  - 8) 厚生労働省. 厚生労働省告示第261号「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」. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000615898.pdf>
  - 9) 日本工業標準調査会. JIS Z8402-2: 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度-第2部: 標準測定方法の併行精度及び再現性を求めるための基本的な方法). 日本規格協会; 1999. 309-310.
  - 10) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験(1). 環境と測定技術 2000; 27: 51-56.
  - 11) 厚生労働省. 建水発第1010001号「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」. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000763260.pdf>
  - 12) 厚生労働省. 建水発0906第4号「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて」.

<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/hourei/jimuren/dl/120906-4.pdf>

WEB サイトの内容は 2021 年 5 月 6 日に確認した

**Elucidation of factors affecting quantitative accuracy for bromate in water quality measurements,  
performed in 2020 in Osaka Prefecture**

Jin YOSHIDA, Takae NAKAJIMA, Yuki HASEGAWA and Yoshihiko KOIZUMI

In order to elucidate the factors that affect the quantitative accuracy and improve the water quality measurements, we implemented the external quality control on analytical methods for bromate in tap waters, with building inspection contractors in Osaka Prefecture. As a result, 3 from 14 examination values was evaluated as an outlier. We executed the follow up survey for these facilities. From this survey, the examination value was suggested to be influenced by the inappropriate calibration points and calibration curve concentration range, inadequate standard solution preparation and sensitivity fluctuation of analytical instrument.

**Key words** : tap water, bromate, 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 (2020 年度)

### —大阪府建築物飲料水水質検査業 (ホルムアルデヒド) —

長谷川有紀, 吉田 仁, 小泉義彦

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所では、一般社団法人 大阪ビルメンテナンス協会からの受託研究として、2015 年度より外部精度管理を実施している。この外部精度管理は、水道水質検査における定量精度に影響を与える因子を抽出し、分析法改良の提案を行うことを目的として実施している。2020 年度は、ホルムアルデヒドを選定し、大阪府の登録建築物飲料水水質検査業の 17 機関が参加した。各参加機関のホルムアルデヒドの検査値を「真値」に対する誤差率 (誤差率) と Z スコアの 2 つの方法で評価した。「外れ値」に該当した 1 機関に対してフォローアップ調査を行った。外れ値となった原因は、使用した精製水にホルムアルデヒドが含まれていたからであった。したがって、使用する精製水に含まれるホルムアルデヒドの濃度が定量精度に影響を与えないことを確認してから、検査を行うことが重要であると分かった。

キーワード：水道水、ホルムアルデヒド、外部精度管理、建築物飲料水水質検査業

2015 年度より地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所では、一般社団法人 大阪ビルメンテナンス協会からの受託研究として、外部精度管理を実施しており<sup>1)</sup>、水道水質検査における定量精度に影響を与える因子を抽出し、分析法改良の提案を行うことを目的としている。対象は、「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者である。

2020 年度は「ホルムアルデヒド」を選定した。ホルムアルデヒドは、石炭酸系、尿素系、メラミン系合成樹脂原料、ポリアセタール樹脂原料、界面活性剤、ヘキサメチレンテトラミン、農薬、消毒剤、その他一般防腐剤等に用いられている<sup>2)</sup>。水道水中のホルムアルデヒドは、浄水過程において塩素およびオゾン処理の際にアミン等の有機物質と反応して生成される<sup>3)</sup>。ホルムアルデヒドは活性炭処理により除去が可能であり、ホルムアルデヒド前駆物質は通常処理においての凝集沈殿ろ過、活性炭処理による除去性があり、塩素注入点を変更することでホルムアルデヒドの生成を低減することができる<sup>4)</sup>。

毒性について、ホルムアルデヒドは International Agency for Research Cancer により、Group1 (ヒトに対する発がん性がある) に分類されているが、経口では明らかな発がん性はないとされている<sup>5)</sup>。しかし、吸入暴露による影響を考慮し、TDI 値 15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  から水質基準値は 0.08  $\text{mg}/\text{L}$  以下と定められている<sup>6)</sup>。

#### 方 法

##### 1. 参加機関

本外部精度管理に参加した建築物飲料水水質検査業の機関は、17 機関であった。

##### 2. 実施方法

###### (1) 精度管理試料の調製方法

2020 年 9 月 25 日に精製水約 20 L をステンレス製タンクに採水した。2020 年 9 月 28 日に精製水約 20 L に対して、ホルムアルデヒド標準液 (富士フイルム和光純薬: 1009  $\text{mg}/\text{L}$ 、保証期限 2021 年 3 月末、ロット番号 ESN0912) を 0.4 mL、マイクロピペットを用いて添加後、十分に攪拌し、500 mL ガラス

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

製瓶に分注した（設定濃度：0.0202 mg/L）。なお、標準液添加前の精製水に含まれるホルムアルデヒドは基準値の1/10である0.008 mg/L未満であった。よって、試料調製用の精製水として問題ないと判断した。

2020年9月29日（火）に各参加機関にチルド便にて送付した。

また、精度管理試料の均一性および安定性を確認するため、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回測定を行った。測定方法は、「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」（平成15年7月22日厚生労働省告示第261号〔最終改正令和2年3月25日厚生労働省告示第95号〕（告示法）誘導體化—液体クロマトグラフ—質量分析法（LC/MS/MS法）（別表第19の3）とした<sup>7)</sup>。

得られた測定結果を基に一元配置分散分析を行ったところ、試料間の変動は有意とならず（ $p=0.0547$ ）、試料水中のホルムアルデヒドの均一性に問題がないことを確認した。また、配付日、配付1、2、5および7日後に試料を測定した結果を図1に示す。図1中に示した一次直線式（ $y=-3E-05x+0.0157$ ）の傾きが概ね0に近いことから、7日間の経日変化がほぼないことを確認した。

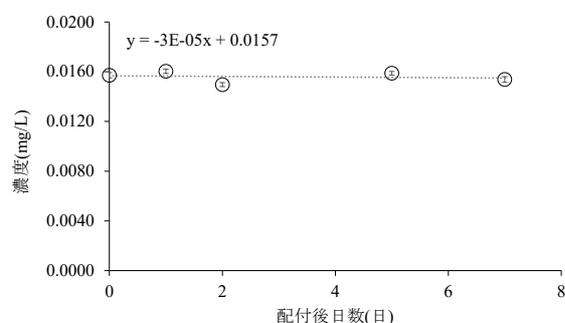


図1 精度管理試料に含まれるホルムアルデヒドの安定性（ $n=5$ 、平均±標準偏差）

また、各試料の平均値の変動係数は2.74%で安定性にも問題がないことを確認した。

## (2)試料の検査方法

検査方法は、告示法<sup>7)</sup>の溶媒抽出—誘導體化—ガスクロマトグラフ—質量分析法（GC/MS法）（別表第19）、誘導體化—高速液体クロマトグラフ法（LC法）（別表第19の2）および誘導體化—液体クロマ

トグラフ—質量分析法（LC/MS/MS法）（別表第19の3）とした。5回測定した値を平均し、有効数字3桁にしたものを検査値とした。検査値および測定条件等を「外部精度管理検査結果報告書」に記入し、標準作業手順書（SOP）、分析チャート、検量線、分析に係るメモ等の資料も合わせて報告を依頼した。

## (3)評価の検証方法およびフォローアップ

我々は、各参加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、検査値の評価を行った。参加機関が報告した測定値（ $n=5$ ）の変動係数は、20%を許容範囲とし、20%を超えた機関については外部精度管理の評価の対象外とした。次に、検査値は「真値」に対する誤差率（誤差率）およびZスコアの2つの方法で評価した。真値の求め方は、参加機関の検査値を用いて有意水準を5%としてGrubbsの棄却検定<sup>8)</sup>を行った。それにより、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、真値に対して±20%以内を許容範囲とした。

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

Zスコアは四分位数法で算出し<sup>9)</sup>、絶対値3未満を許容範囲とした。

これら2つの方法で許容範囲を超えた検査値のみを「外れ値」と評価し、報告書および分析チャート等を確認し、原因等について検証した。評価において、「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。

## 結果および考察

### 1.参加機関の分析方法

11機関はGC/MS法を、6機関はLC法を用いており、LC/MS/MS法を用いている機関はなかった。

### 2.検査結果の検証

#### (1)誤差率、Zスコア及び「外れ値」

17機関から報告された検査値、変動係数、誤差率およびZスコアを表1に示す。また、各機関の検査値の分布を図2に示す。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ため、全て

の検査値を用いて評価を行った。真値は、Grubbs の棄却検定で棄却された1つの検査値を除いて、16 機関の検査値を平均した 0.0216 mg/L となった。誤差率は検査値を丸めずに算出した。誤差率の範囲は-49.25~16.88%となり、許容範囲を超えたのは 1 機関 (B-01) であった。一方、17 検査値を用いて Z スコアを求めた結果、Z スコアの範囲は-5.65~2.18 となり、Z スコアが許容範囲を超えたのは 1 機関 (B-

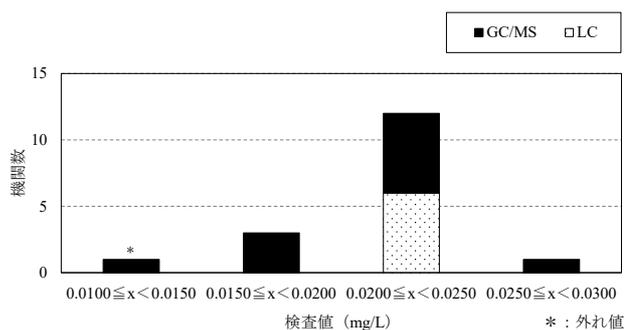


図2 検査法別による検査値の分布

表1 参加機関の検査値、変動係数、誤差率およびZスコア

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-01*	0.0110	3.63	-49.25	-5.65
B-02	0.0188	6.88	-12.76	-1.33
B-03	0.0192	3.26	-11.00	-1.12
B-04	0.0199	1.45	-8.03	-0.77
B-05	0.0202	4.68	-6.55	-0.59
B-06	0.0202	6.59	-6.37	-0.57
B-07	0.0207	8.76	-3.96	-0.29
B-08	0.0209	2.47	-3.13	-0.19
B-09	0.0213	1.47	-1.55	0.00
B-10	0.0217	1.20	0.67	0.26
B-11	0.0218	5.30	0.76	0.27
B-12	0.0224	0.40	3.91	0.65
B-13	0.0226	2.11	4.84	0.76
B-14	0.0234	3.04	8.17	1.15
B-15	0.0235	3.24	9.01	1.25
B-16	0.0236	2.00	9.10	1.26
B-17	0.0252	0.66	16.88	2.18
平均値	0.0210			
最大値	0.0252			
最小値	0.0110			
標準偏差	0.00310			
変動係数 (%)	14.78			
N	17			

真値：0.0216mg/L (Grubbs の棄却検定で棄却された機関を除いた平均)

+ : Grubbs の棄却検定で棄却された機関

\* : 真値に対する誤差率が±20%を超え、かつ Z スコアの絶対値が 3 以上の機関 (外れ値)

01) であった。

以上の結果より、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」に該当する機関は 1 機関であった。「外れ値」となった機関 B-01 に対してはフォローアップ調査を行った。

(2)フォローアップ調査

機関 B-01 は、GC/MS 法を用いており、検査値は 0.0110mg/L、誤差率は-49.25%、Zスコアは-5.65 であった。分析チャートを確認すると、ホルムアルデヒドのピークが空試験において検出されていた。空試験の面積比 (0.15) は、告示法通り検量線最小濃度の面積比 (0.22) を下回っていたが、両者にはほとんど差がみられなかった。このことから、測定に使用した精製水にホルムアルデヒドが含まれていた可能性が考えられた。そこで、図3に機関 B-01 が従来使用していた精製水 (検量線 A  $y=13.558x+0.1013$ ) および我々の提供した精製水 (検量線 B  $y=14.077x+0.0145$ ) を示した。

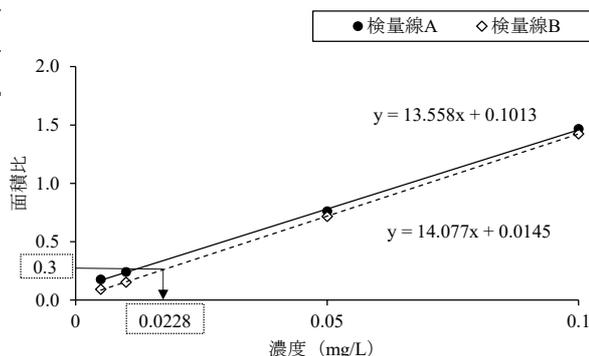


図3 機関 B-01 による検量線 A および検量線 B

その結果、検量線 A の切片が 0.1013、検量線 B の切片が 0.0145 となり、A の切片のほうが B の切片よりも高くなった。そこで、機関 B-01 が精度管

理試料を測定したときの面積比 (0.34...) を用いて、検量線 B で試料濃度を算出した。その結果、0.0228 mg/L となり、真値に対する誤差率が 5.56% に改善された。このことから、検量線 A で用いた精製水にホルムアルデヒドが含まれていたため、ホルムアルデヒドが定量に影響を及ぼさない濃度の精製水から作成した検量線よりも切片が高くなったことにより、定量値が低く算出されたと考えられた。したがって、外れ値の原因は検量線に使用した精製水にホルムアルデヒドが含まれていたことであった。ホルムアルデヒドを測定する際、ホルムアルデヒドが定量に影響をなるべく与えない精製水を用いることが重要であることがわかった。

### (3) 全体的な留意点

#### ① SOP の整備状況

SOP を未提出の機関が 1 機関、フロー図のみ等で SOP の体をなしていない SOP 未整備の機関が 1 機関あった。また、使用器具や試薬の規格等、必要な記載が欠けて不十分とした機関が 14 機関であった。SOP は精度よく検査を実施するために必要なものであり、検査担当者全員が SOP 通りに検査を行えば、誰でも検査できるものを整備する必要がある。

#### ② 妥当性評価

検量線の妥当性評価を実施していた機関は 9 機関、添加試料の妥当性評価を実施していた機関は 8 機関であった。妥当性評価は、SOP 通りに行った検査で得られた結果が、水質検査の目的とする濃度レベルに適合していることを確認するためのものである<sup>10,11)</sup>。これは、検査法の精度を客観的に評価できるものであり、検査結果の信頼性に繋がるものである。登録建築物飲料水水質検査業において、妥当性評価の重要性を認識する必要があると考えられた。もし、機関 B-01 が妥当性評価を実施していれば、精製水に含まれたホルムアルデヒドが精度に影響を与えていることに気づいた可能性がある。

#### 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 72 時間以内と定められている<sup>7)</sup>が、5 機関が 72 時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、72 時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た。しかし通常の検査において、速やかに分析できない場合、試料水を冷蔵保存し、72 時間以内に前処理しなければならぬ。また、SOP にも検査開

始までの時間を明記し、それに従って検査する必要がある。

#### ④ 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定められている<sup>7)</sup>。濃度範囲は検査方法によって異なり、GC/MS 法では 0.001~0.1 mg/L、LC 法及び LC/MS/MS 法では 0.005~0.1 mg/L である。検量点に 0 mg/L を使用している機関が 2 機関、検量線を強制的に原点通過させている機関が 1 機関、検量点数が告示法と異なる (4 点未満) 機関が 2 機関、溶媒ブランクを測定していない機関が 13 機関あり、改善が必要である。

#### ⑤ 前処理

告示法では、GC/MS 法による測定では「検水 50 mL (検水に含まれるホルムアルデヒドの濃度が 0.1 mg/L を超える場合には、0.001~0.1 mg/L となるように精製水を加えて 50 mL に調製したもの) を採り、ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン溶液 3 mL を加えて混合する。2 時間静置後、硫酸 (1+1) 0.8 mL および塩化ナトリウム 20 g を加えて混合する。次に、内部標準添加ヘキサン 5 mL を加えて 5 分間激しく振り混ぜ、数分間静置後、ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムを少量加える。この溶液を一定量採り、試験溶液とする。」と記載されている<sup>7)</sup>。検水を 50 mL 分注していない機関が 1 機関存在した。また、誘導体化試薬および硫酸 (1+1) の添加量が告示法と異なっている機関、塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムを添加していない機関が各々 1 機関あった。ヘキサン抽出時と同時に内部標準液を添加していない機関が 3 機関存在した。検水量、試薬の添加の有無、試薬の添加量および試薬を添加する手順は、告示法を遵守した上で検査をする必要がある。

LC 法では、告示法において「検水 10 mL (検水に含まれるホルムアルデヒドの濃度が 0.1 mg/L を超える場合には、0.005~0.1 mg/L となるように精製水を加えて 10 mL に調製したもの) を採り、リン酸 (1+4) 0.2 mL および DNPH 溶液 0.5 mL を加えて混合する。20 分間静置後、この溶液を一定量採り、試験溶液とする。」と記載されている<sup>7)</sup>。LC 法を用いた機関において、告示法と異なる前処理をした機関は存在しなかった。

#### ⑥ 空試験

空試験は、告示法で精製水を検水と同様に前処理

する試験のこととされており、検量線の下限値を下回ることを確認する必要がある<sup>7)</sup>。空試験を実施していない機関は1機関存在した。一方、空試験のエリア面積が、検量線の濃度範囲の下限値のエリア面積より高かった機関は無かった。空試験は、告示法において必要であるため、今後の検査において必ず実施する必要がある。

#### ⑦標準液

告示法では、標準原液、標準液または混合標準液は原体から自己調製したもの、もしくは計量法(平成4年法律第51号)第136条若しくは第144条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書が添付され、かつ、告示法の標準原液と同濃度のもの又は告示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<sup>7)</sup>。なお、告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものは開封後速やかに使用することとし、開封後保存したものを使用してはならない<sup>7)</sup>。参加した全機関が、市販品の標準原液を使用していた。そのうちの1機関は、市販の購入日が不明、かつ、市販の保証期限が過ぎているものを使用していた。また、標準液の調製方法が告示法と異なる機関は6機関、標準液が用時調製されていない機関は1機関、標準液を希釈する時の試薬名が不明の機関が1機関存在した。これらの機関は、告示法に遵守し、標準液を用時調製する必要がある。

#### ⑧内部標準液

GC/MS法では内部標準液を用いてホルムアルデヒドを測定することとなっている。告示法では、「内部標準原液は、1-クロロデカン 0.100 g をヘキサン 60 mL を入れたメスフラスコに採り、ヘキサンを加えて 100 mL としたものである。この溶液 1 mL は、1-クロロデカン 1 mg を含む。この溶液は、調製後直ちに 10 mL ずつをねじロバイアルに入れて冷凍保存する。」と記載されている<sup>7)</sup>。また、内部標準添加ヘキサンについては、「内部標準原液をヘキサンで 2000 倍に薄めたものである。この溶液 1 mL は、1-クロロデカン 0.0005 mg を含む。この溶液は、使用の都度調製する。」と告示法において記載されている<sup>7)</sup>。内部標準物質を使用していない機関は1機関、内部標準原液調製後、冷凍保存していない機関が1機関、内部標準添加ヘキサンを都度調製していない機関が2機関、内部標準液の調製方法が告示法と異なる機関が3機関存在した。これらの機関は、告示法通りに内部標準物質を使用する必要がある。

## ま と め

大阪府の登録建築物飲料水水質検査業の機関のうち参加した17機関を対象に、ホルムアルデヒドの検査結果を「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。報告された17検査値のうち、変動係数が20%を超えた機関は存在せず、全て評価対象とした。Grubbsの棄却検定で1機関が棄却され、棄却された1機関を除いた16検査値を平均した0.0216 mg/Lを「真値」とした。誤差率±20%を超えたのは1機関、Zスコアの絶対値が3以上であった機関は1機関であった。以上の結果より、「外れ値」に該当する機関は1機関であった。なお、「外れ値」等の原因を検証した結果、検査精度を向上する上で、次の留意点が考えられた。

- 1) 予め使用する精製水に含まれる対象物質の濃度を確認する。
- 2) 告示法に準拠したSOPを整備する。
- 3) 分析操作は告示法を遵守し、SOPから逸脱しないようにする。
- 4) 分析は告示法通り72時間以内に開始する。
- 5) 妥当性評価の試験を実施する。

## 謝 辞

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

研究実施にあたり協力していただいた大阪府健康医療部生活衛生室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: 73-79.
- 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

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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 (2019 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 2020; 4: 100-109.
- 6) 厚生労働省. 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/konkyo0303.html>
- 7) International Agency for Research Cancer. List of Classifications. Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–129. <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/>
- 8) 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 年厚生労働告示第 261 号) . <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000615898.pdf>
- 9) 日本工業標準調査会. JIS Z8402-2: 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度-第 2 部: 標準測定方法の併行精度及び再現性を求めるための基本的な方法). 日本規格協会; 1999. 309-310.
- 10) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験 (1). 環境と測定技術 2000; 27: 51-56.
- 11) 厚生労働省. 健水発 0906 第 1~4 号「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて」. <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/hourei/jimuren/dl/120906-4.pdf>
- 12) 厚生労働省. 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン. [https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000181618\\_2.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000181618_2.pdf)

WEB サイトの内容は 2021 年 5 月 24 日に確認した。

**Elucidation of factors affecting quantitative accuracy for formaldehyde in water quality measurements,  
performed in 2020 in Osaka Prefecture**

Yuki HASEGAWA, Jin YOSHIDA and Yoshihiko KOIZUMI

We have been conducted external quality control as a commissioned research from the Osaka Building Maintenance Association. This external quality control was carried out for the purpose of suggesting improvement of analytical method and extracting factors that affect the quantitative accuracy in water quality measurements. In 2020, formaldehyde was selected as the object substance of an organic compound and 17 institutions of the building inspection contractor participated in Osaka Prefecture. The formaldehyde test values of each participating institution were evaluated by two methods: the error rate and the Z score. The only institution B-01 exceeded the error rate of  $\pm 20\%$ , and was out of Z score range ( $\geq 3$ ). As a result, B-01 corresponded to outlier because the purified water to prepare the standard solution was contaminated with formaldehyde. Therefore, it is important to confirm that formaldehyde contained in purified water did not affect the quantitative accuracy before conducting the water quality measurements.

**Key words** : tap water, formaldehyde, external quality control

# 住民における 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート および 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレートの 尿中代謝物の分析法

吉田俊明

厚生労働省により住宅等室内における空气中濃度指針値の策定が検討されている 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート (TMB) および 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート (TDB) への住民の曝露量を把握することを目的として、今回、TMB の主要な尿中代謝物を検索し、TMB および TDB の尿中代謝物の分析方法を確立した。TMB を腹腔内投与 (300 mg/kg) したラットの尿中より、これまでに知られている TDB の尿中代謝物と同じ 2 種の代謝物 (2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールおよび 3-ヒドロキシ-2,2,4-トリメチル吉草酸) が検出された。これらの代謝物を酵素で加水分解したのち尿中よりトルエンで抽出し、トリメチルシリル化した後ガスクロマトグラフィー/質量分析により定量した。各代謝物の検量線の直線性は良好であり、尿中濃度 300  $\mu\text{g/L}$  以下の代謝物を正確かつ再現性よく定量することが可能であることが示唆された (検出下限濃度: 0.2-0.3  $\mu\text{g/L}$ )。また、採取した尿試料は、一ヶ月間冷凍庫で保存が可能であった。著者から一週間連続的に採取した尿試料に本法を適用したところ、両代謝物の尿中濃度の間に有意な相関性が見られた。本法は、TMB および TDB の曝露のモニタリング手法として、今後の調査や研究に有用であると考えられた。

キーワード: テキサノール、TXIB、曝露指標、ガスクロマトグラフィー/質量分析

2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート (CAS No.: 25265-77-4、以下 TMB と略、代表的商品名 テキサノール) および 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート (CAS No.: 6846-50-0、以下 TDB と略、代表的商品名 TXIB) は、主に水性塗料や水性接着剤の造膜助剤 (塗料や接着剤表面のコーティングを促進させるための添加剤) および可塑剤 (主にプラスチックなど樹脂製品に柔軟性を与えるための添加剤) として建材や家庭用品等に使用される。ともに 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール (TMPD) のエステル化合物であり、TMB は 2 種の異性体の混合物として市販されている (図 1)。建材中の化学物質による室内空気汚染が主原因となるシックハウス症候群が社会的問題となり、厚生労働省では室内で健康上問題

となる可能性の高い化学物質を選定し、トルエン (油性塗料の溶剤などとして使用) やフタル酸ジ-*n*-ブチル (主に可塑剤として使用) 等これまでに 13 物質の室内空气中濃度指針値を策定してきた<sup>2-5)</sup>。

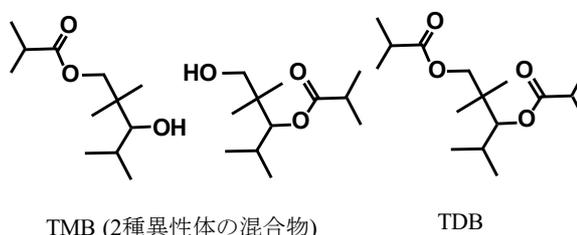


図 1. 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート(TMB)及び 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート(TDB)の化学構造式

その結果、これらの規制対象化学物質が原因となるシックハウス症候群の発症事例は減少し、大きな成果が得られたものと考えられる。しかし一方で、規制されたこれら化学物質の代わりに建材等へ使用された TMB 等の代替化学物質による健康被害事例が、北海道の小学校で発生した事例<sup>6)</sup>をはじめ全国的に散発している。厚生労働省では、このような状況を鑑み、2017年に開催された「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」<sup>7)</sup>において TMB および TDB の室内濃度指針値(それぞれ  $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$  および  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )を新たに提案した。しかし、翌年に開催された同検討会において、関係者が対策を講ずるに当たり、科学的知見のさらなる収集が必要であり、また技術的観点から実効性に疑義のある値が提案されている可能性があるとのパブリックコメント等の意見を踏まえ、ヒトへの安全性に係る情報や代替物の情報等を引き続き集積し、国際動向も踏まえながら、指針値について再検討することになった<sup>8)</sup>。

海外においても TMB および TDB とシックハウス症候群との関連性が報告されている<sup>9,10)</sup>。また、TMB および TDB による室内空気汚染の実態は国内外ともにほとんど把握されていないが、これまでの限定的な調査でのこれらの室内空気中からの検出率は高く<sup>11,12)</sup>、一般住民におけるこれらの体内汚染(体内摂取)は広範に及んでいる可能性が高い。現在世界的流行となっている新型コロナウイルスの感染防止対策を契機として住民の在宅時間が増長すると考えられ、住宅の建材等から放散されるこれら化学物質の体内摂取量は今後さらに増加すると推測される。TMB および TDB は喘息等アレルギー性疾患を悪化させるとの報告があり<sup>13-15)</sup>、近年増加している子どものアトピー性皮膚炎等アレルギー性疾患との関連性も懸念される。これらのことから、住民における TMB および TDB による健康被害の防止を目指し、これらへの曝露に関する知見を得ることは非常に重要と考えられるが、日常生活環境下での住人における毎日の曝露量(吸収量)については国内外を通じて全く知られていない。一般に、化学物質の曝露量は尿中に排泄される化学物質の代謝物量を指標として把握される。経口的に TDB を投与したラットの尿中から TMPD および 3-ヒドロキシ-2,2,4-トリメチル吉草酸(HTMV)(図2)が排泄されることがこれまでに知られている<sup>16)</sup>。一方、TMB の尿中代謝物に関する知見は見当たらない。

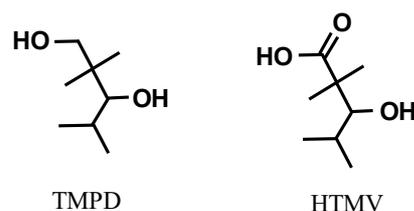


図 2. 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール(TMPD)及び3-ヒドロキシ-2,2,4-トリメチル吉草酸(HTMV)の化学構造型式

本研究では、住民における TMB および TDB の曝露量を把握することを目的として、今回、TMB の主要な尿中代謝物を明らかにするとともに、TMB および TDB の尿中代謝物の分析方法を確立したので報告する。

## 方法

### 1. 試薬および材料

標準用試薬 TMPD(純度 98.3%) および HTMV(同 97%) はそれぞれ東京化成工業および Toronto Research Chemicals より、内部標準物質 (IS) *n*-オクチル-*d*<sub>17</sub> アルコール (純度 99.0%) は CDN Isotopes より入手した。TMB (2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール-1-モノイソブチレート (61.4%) と 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール-3-モノイソブチレートとの混合物) は東京化成工業より入手した。他の試薬はすべて富士フィルム和光純薬製または東京化成工業製を使用した。アセトンおよびトルエンは残留農薬・PCB 試験用、無水硫酸ナトリウムは PCB・フタル酸エステル試験用、1-トリメチルシリルイミダゾールおよび *N,O*-ビス(トリメチルシリル)アセトアミドはガスクロマトグラフ用を使用した。

スルファターゼ (*Helix pomatia* 由来、Type H-1、活性 >10,000 units/g (pH 5.0)、β-グルクロニダーゼ活性 >300 units/mg) はシグマ-アルドリッチより、ラット (SD 系、雄、8 週令) は日本エスエルシーより入手した。

### 2. TMB の尿中代謝物の定性

#### (1) ラットへの TMB の投与と採尿

入荷後施設の環境で一週間飼育したラット 2 匹

(体重 325 g および 340 g) の腹腔内に、オリーブ油に溶かした TMB (100 mg/mL) を 300 mg/kg 投与した。代謝ケージ (日本クレア製 CT-10S 型) を用いて投与後 21 時間内に排泄される尿を全て採取して試料尿とした。TMB を含有しないオリーブ油を別のラット 2 匹 (体重 310 g および 330 g) に 3 mL/kg 投与後同様に採尿し、ブランク尿とした。採取した尿は分析までの期間冷凍庫に保存した。

なお、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-R2-1)。

## (2) 試料の分析

ピレスロイド系殺虫剤<sup>17)</sup> やフタル酸系可塑剤<sup>18)</sup> の尿中代謝物の定量法としてこれまでに確立した方法を一部改変して試料尿およびブランク尿を分析した。

解凍した尿を遠心分離 (3000 回転 × 10 分) し、その上清 10 mL を分取した。2M-酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.75 mL、スルファターゼ 7 mg を加えて 22 時間 37 °C で反応させ、抱合体を加水分解した。濃塩酸 0.5 mL および硫酸アンモニウム 9 g を加えた後トルエン 2 mL で代謝物を 2 回抽出した。抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウム 1 g を加えて脱水した。無水硫酸ナトリウムをトルエン 1 mL で洗い、抽出液に合わせた後窒素気流下 60 °C にて 1 mL に濃縮した。この液にトリメチルクロロシラン、*N,O*-ビス (トリメチルシリル) アセトアミドおよび 1-トリメチルシリルイミダゾールを各 30 µL 添加後、90 °C で 30 分間反応させ、各代謝物のトリメチルシリル化誘導体を形成した。水 1 mL で 2 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウム 0.5 g を加えて脱水した。さらに、無水硫酸ナトリウムをトルエン 1 mL で洗い、脱水液に合わせて試料溶液とした。試料溶液をトルエンで適宜希釈した後、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) により測定した。

装置には島津製作所製 AOC-20 型オートサンプラーを装着した GCMS-QP2010 型ガスクロマトグラフ質量分析計を使用し、以下の条件のもと分析を行った。分析カラム：アジレント製 J&W DB-5MS (長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 µm)、注入量：1.0 µL、注入モード：スプリットレス (サンプリング 2.0 分)、キャリアーガス：ヘリウム、制御モード：圧力 (定圧)、キャリアーガス圧力：89.7 kPa、注入口温度：260 °C、カラムオープン温度：90 °C (2 分保持) -

5 °C/min - 120 °C - 9 °C/min - 280 °C (5 分保持)、インターフェイス温度：260 °C、イオン化方式：電子イオン化 (EI)、イオン源温度：200 °C、イオン化電圧：70 eV、分析モード：SCAN (*m/z* : 50~360)。

## (3) TMB 代謝物の同定

試料尿およびブランク尿の分析結果から尿中への排泄が推定された TMB 代謝物のうちその化合物が市販されているものを標準物質として入手した。標準物質をトルエン 1 mL に溶解し、上記「2. (2) 試料の分析」の方法に従って誘導體化試薬と反応させた後、同様に処理して分析した。試料尿中の TMB 代謝物と推定されるピークの保持時間及びマススペクトルを標準物質のそれらと比較してそれぞれ同定した。

## 3. TMB の尿中代謝物の定量

本定量法の確立のために使用する尿は全て著者から採取した。

### (1) 保存用混合標準原液および保存用内部標準液の調製

上記「2. TMB の尿中代謝物の定性」において TMB の尿中代謝物として同定された TMPD および HTMV の標準用試薬をそれぞれ別々にアセトンで褐色高気密ビンに溶解し、保存用標準原液 (10 mg/mL) を調製した。さらに各標準原液を別の褐色高気密ビンに等量ずつ混合し、アセトンで希釈して保存用混合標準原液 (各化学物質濃度：100 µg/mL) を調製した。

IS をアセトンで希釈して 150 µg/mL の濃度に褐色高気密ビンに調製し、保存用内部標準液とした。

### (2) 試料溶液の調製

採取後分析までの期間 -20 °C にて保存した尿を解凍し、上記「2. (2) 試料の分析」の方法により処理して、試料溶液を調製した。ただし、尿の遠心分離により得た上清 10 mL に保存用内部標準液 3 µL を添加した後尿中の抱合体を加水分解した。また、各代謝物のトリメチルシリル化誘導體形成後、水洗、脱水した溶液は、60 °C で 0.15 mL に濃縮した後、試料溶液とした。

### (3) 検量線作成のための標準尿溶液の調製

複数回採取した尿のうち、あらかじめ測定対象とする代謝物 TMPD および HTMV の含有量が低レベ

ルであることが確認された尿を混合してプール尿とし、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した。試料の分析に際し、プール尿を解凍し、その 10 mL ( $n = 7$ ) にアセトンで希釈した保存用混合標準原液の一定量を添加して、各代謝物の尿中添加濃度 0、1、3.3、10、33、100 および 333  $\mu\text{g/L}$  の尿を調製した。上記「3.(2) 試料溶液の調製」の方法に従って処理し、標準尿溶液とした。

#### (4) ガスクロマトグラフィー/質量分析

調製された試料溶液および標準尿溶液を、上記「2.(2) 試料の分析」に示す分析条件のもと GC/MS により測定した。ただし、質量分析計の分析モードは SIM (Selected Ion Monitoring) とし、各分析対象物質の定量イオン・参照イオン ( $m/z$ ) は、それぞれ TMPD (145・247)、HTMV (145・261) および IS (204・205) とした。

#### (5) 定量

尿中代謝物は内部標準法により定量した。各標準尿溶液を分析した際に得られる検量線 ([各代謝物濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )] ( $x$ ) - [各代謝物ピーク面積 / IS ピーク面積] ( $y$ )) の回帰式より、試料溶液中の各代謝物濃度を算出した。

#### (6) 本法の妥当性に関する試験

各尿中代謝物の分析における本法の妥当性について以下のとおり試験した。

##### ① 回収率

分析対象代謝物のグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体およびトリメチルシリル化誘導体の標準物質は市販されており入手できないため、抱合された代謝物の加水分解反応および代謝物の誘導体化反応の効率を調べることはできない。そのため、代謝物の加水分解のための加温から誘導体化処理の前までの回収率について試験した。

プール尿 10 mL ( $n = 5$ ) に、既知量の代謝物を添加 (保存用混合標準原液 5  $\mu\text{L}$ : 尿中濃度として 50  $\mu\text{g/L}$ ) し、本法に従って処理した (サンプル)。一方、代謝物を添加していないプール尿 ( $n = 7$ ) をトルエン抽出物 1 mL に濃縮するまで同様に処理した後、5 試料に同量の各代謝物を添加 (コントロール) し、2 試料には添加せず (ブランク) に、誘導体化処理を行った。サンプル、コントロールおよびブランク中の各代謝物を測定し、次式に従い各代謝物の回収

率  $R(\%)$  を算出した。

$$R = (X_s - X_b) / (X_c - X_b) \times 100$$

ここで、 $X_s$ 、 $X_c$  および  $X_b$  は、それぞれサンプル、コントロールおよびブランク中の代謝物の量 (各平均値) である。

##### ② 検出下限

いずれの代謝物もプール尿から検出されるためプール尿 ( $n = 5$ ) を本法に従って分析し、各代謝物の定量値の標準偏差を算出した。また、検量線作成時の最低添加濃度の標準尿溶液 (1  $\mu\text{g/L}$ ,  $n = 5$ ) を分析し、同様に定量値の標準偏差を算出した。各代謝物について、より高値の標準偏差の値を用いて、その値の 3 倍をそれぞれ尿中検出下限濃度とした<sup>4)</sup>。

##### ③ 定量値の正確性および再現性

プール尿 10 mL ( $n = 5$ ) に、既知量 (2.0  $\mu\text{g}$ ) の代謝物を添加 (保存用混合標準原液 20  $\mu\text{L}$ : 尿中濃度として 200  $\mu\text{g/L}$ ) し、本法に従って分析した (サンプル)。一方、代謝物を添加していないプール尿 ( $n = 2$ ) を同様に分析し、ブランクとした。サンプルの測定値からブランク (2 試料の平均値) の測定値を差し引き、その定量値の平均と標準偏差を算出した ( $n = 5$ )。定量値の正確性は相対誤差により、定量値の再現性は変動係数によりそれぞれ評価した。プール尿に各代謝物 0.2  $\mu\text{g}$  または 0.02  $\mu\text{g}$  (尿中濃度としてそれぞれ 20  $\mu\text{g/L}$  および 2  $\mu\text{g/L}$ ) を添加して調製した試料についても、定量値の正確性および再現性を同様に評価した。

##### ④ 保存に対する安定性

実試料は採取後分析までの期間冷凍庫 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) 内で保存することを想定し、保存に対する各代謝物の安定性について試験した。プール尿 300 mL に保存用混合標準原液 150  $\mu\text{L}$  を添加した (尿中添加濃度として 50  $\mu\text{g/L}$ ) 後、15 mL ずつ 15 本のバイアルビンに分注し、分析までの期間冷凍庫内に保存した。定期的に 3 本ずつ取り出し、本法に従って分析した (サンプル)。一方、各サンプルの分析時、保存用混合標準原液を添加していないプール尿 ( $n = 1$ ) を同様に分析し、ブランクとした。添加した各代謝物の定量値の保存期間中における変動について評価した。

#### (7) 分析法の実試料への適用

尿を 1 週間連続的に毎日朝晩 2 回採取し、各尿中

代謝物を測定した。朝は起床時（月曜日から日曜日の6時30分～8時）に、勤務日の晩は勤務終了直後（月曜日から木曜日の18時30分～19時30分）に、休日の晩は外出先から帰宅直後（金曜日から日曜日の19時～21時）においてそれぞれ採尿した（ $n=14$ ）。2種の代謝物濃度の相関性、朝・晩における各代謝物濃度の差異について評価した。各代謝物の濃度は、尿の濃淡を考慮し、各尿試料について Folin-Wu 法<sup>19)</sup>により定量されたクレアチニン濃度により補正した。

## 結果 および 考察

### 1. 代謝物の誘導体化試薬の選定

著者らはこれまでに、生活環境下でのピレスロイド系殺虫剤、フタル酸系可塑剤および有機リン剤（殺虫剤および難燃剤）への曝露を評価する目的で、これら各薬剤の尿中代謝物の分析方法を確立した<sup>17, 18, 20)</sup>。いずれも、代謝物を *tert*-ブチルジメチルシリル化した後 GC/MS により測定する方法である。誘導体化された代謝物は水に対して安定であり、大きな分子を形成するために分析に際して選択性に優れている。今回も、*N*-(*tert*-ブチルジメチルシリル)-*N*-メチルトリフルオロアセトアミドを用いた TMPD および HTMV の *tert*-ブチルジメチルシリル

化誘導体の分析を試みた。しかし、生成した誘導体のマスフラグメンテーションにおいて高強度の高質量数のフラグメントイオンは生じず、選択性に優れた高感度な分析は困難と判断された。つぎに、各代謝物のトリメチルシリル化誘導体の分析について検討した。トリメチルクロロシランを触媒として 1-トリメチルシリルイミダゾールによる代謝物の誘導体化を試みたが、定量値の再現性が乏しく、誘導体化反応の効率が一定しないことが示唆された。そのため、最強のシリル化剤の組み合わせとして知られている<sup>21)</sup> トリメチルクロロシラン、1-トリメチルシリルイミダゾールおよび *N,O*-ビス(トリメチルシリル)アセトアミドの等量混合液を使用して生成した TMPD および HTMV のトリメチルシリル化誘導体を分析することにした。各代謝物の定量には、マスフラグメンテーションにより生じたフラグメントイオン $[(\text{CH}_3)_2\text{CHCHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$  ( $m/z$  145) を用いた（図3）。

### 2. TMB の尿中代謝物の定性

TMB を投与したラットにおける尿（試料尿）を分析した際に得られたクロマトグラムおよび各ピークのマスペクトルを、TMB を投与していないラットから得られた結果（ブランク尿）と比較したところ、試料尿から TMB に由来すると考えられる複数のピークが検出された。これらのうち、保持時間 9.9 分および 11.2 分に検出されたピークのマスペクトルは、それぞれ市販の TMPD および HTMV を分析した際に得られた保持時間とマスペクトル（図3）と一致し、それぞれ同定された。試料尿中より投与物質 TMB に由来するピーク（2種の異性体の保持時間：それぞれ 12.3 分および 13.5 分）も検出されたが、上記2種のピークと比較して明らかにその強度は小さく、投与された TMB は尿中には大部分代謝された後に排泄されることが示唆された。同定された2種の代謝物はいずれも TDB の尿中代謝物として報告されている<sup>16)</sup>。TMB は TMPD のモノエステル化合物、TDB は TMPD のジエステル化合物であることから、体内に吸収された TDB の一部は TMB に加水分解され、その後さらに TMPD、HTMV に代謝されて尿中に排泄されると推定された。

以下、この2種の代謝物 TMPD および HTMV の定量方法について検討した。

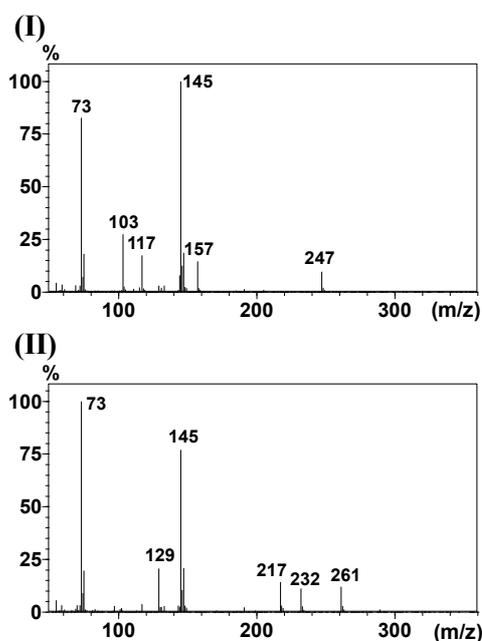


図3. トリメチルシリル化された TMPD (I) 及び HTMV (II) のマスペクトル

### 3. TMB の尿中代謝物の定量

#### (1) クロマトグラフィー

標準尿溶液を分析した際に得られたクロマトグラムを図4に示す。各ピーク強度は定量イオンと参照イオンのシグナルの和である。ISは7.0分、TMPDは9.9分、HTMVは11.2分にそれぞれ検出された。溶液中にはこれら3物質の測定に影響を及ぼす他の化学物質によるピークは検出されなかった。したがって、試料中の各代謝物の分離定量は可能であると考えられた。

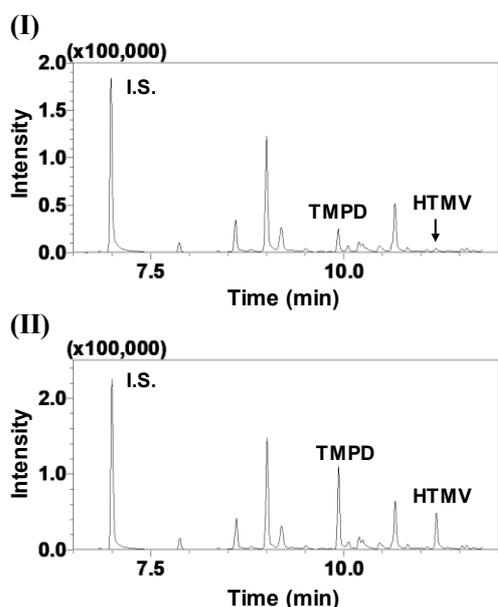


図4. 標準尿溶液 (尿中への添加濃度: (I) 0 µg/L, (II) 3.3 µg/L) のトータルイオンクロマトグラム

#### (2) 検量線

標準尿溶液を分析して検量線を作成した際、その回帰直線の傾きと相関係数の値を表1に示す。いずれの代謝物についても、その検量線は333 µg/L以下の尿中濃度において良好な直線性を示した。

#### (3) 回収率

本法に従って試料を調製した際の各代謝物の回収率を表1に示す。TMPDの回収率はほぼ100%であり、試料の調製過程、すなわち、加水分解のための尿試料の加温、トルエンによる抽出、抽出溶媒の濃縮の過程においてほとんど損失しないと考えられた。一方、HTMVの回収率はTMPDに比較して低く、約7割であった。したがって、HTMVを正確に定量するためには、本法のとおり、標準物質を添加したプール尿を試料と同様に処理して調製した標準尿溶液を分析して検量線を作成する必要があると考えられた。

#### (4) 検出下限

いずれの代謝物においても、標準尿溶液 (尿中添加濃度: 1 µg/L) を分析した際に得られた定量値の標準偏差は、プール尿を分析した際の標準偏差よりも高値であった。尿中におけるTMPDおよびHTMVの検出下限濃度はそれぞれ0.2 µg/L、0.3 µg/Lであった (表1)。

#### (5) 定量値の正確性および再現性

一定量のTMPDおよびHTMVを添加したプール尿を本法に従い分析し、定量値の相対誤差および変

表1. 本法における各代謝物の検量線、回収率、検出下限および定量値の正確性および再現性

	検量線		回収率 (%)	LOD <sup>b</sup>	正確性及び再現性					
	傾き	$r^a$			2 µg/L <sup>c</sup>		20 µg/L		200 µg/L	
					R.E. <sup>d</sup>	C.V. <sup>e</sup>	R.E.	C.V.	R.E.	C.V.
TMPD	0.087	0.9999	107	0.2	8.7	5.3	6.7	4.2	1.5	6.4
HTMV	0.047	0.9994	72	0.3	6.1	7.8	6.7	9.7	4.5	5.6

<sup>a</sup> 相関係数

<sup>b</sup> 尿中検出下限濃度 (µg/L)

<sup>c</sup> 代謝物のプール尿への添加濃度

<sup>d</sup> 相対誤差 (%、 $n = 5$ )

<sup>e</sup> 変動係数 (%、 $n = 5$ )

動係数を算出した (表 1)。いずれの添加量においても、各代謝物の定量値の相対誤差、変動係数はそれぞれ 9 %以下、10 %以下であり、TMPD および HTMV の定量値の正確性、分析における再現性はともに良好であると考えられた。

#### (6) 保存に対する安定性

一定期間保存後に分析した尿試料中の各代謝物の残存率の経日変化を表 2 に示す。尿中の TMPD および HTMV の定量値はともに 35 日間の保存期間中ほぼ一定であり、大幅な増減は見られなかった。したがって、採取した尿試料は、1 ヶ月間は冷凍庫内で保存可能であると考えられた。

#### (7) 分析法の実試料への適用

一週間 (毎日朝晩各 2 回) 連続して採取した尿試料中の各代謝物の分析結果を表 3 に示す。TMPD および HTMV はともに全ての尿試料から検出された。平均濃度は TMPD 3.9  $\mu\text{g/g creatinine}$ 、HTMV 1.3  $\mu\text{g/g creatinine}$  であり、全ての試料において TMPD の濃度が HTMV の濃度よりも高かった。また、各試料中の両代謝物濃度間に有意な相関性 ( $r=0.54$ ) が認められ、2 つの代謝物の共通の源が存在することが示唆された。すなわち、これらの代謝物の一定量は体内に取り込まれた特定の同じ化学物質から生じたものと推定された。この結果は、TMB または

表 2. 冷凍庫内の尿試料中代謝物の残存率 (%)

	保存期間 (日)				
	3	9	15	24	35
TMPD	92	90	102	100	96
HTMV	104	95	102	95	92

表 3. 尿試料中の各代謝物濃度 ( $\mu\text{g/g creatinine}$ )

		月	火	水	木	金	土	日	平均
TMPD	朝	6.12	3.44	3.64	5.02	5.28	4.38	5.49	4.77
	晩	1.73	1.73	2.51	2.44	3.08	3.61	6.71	3.12
									3.94 (全平均)
HTMV	朝	1.48	1.32	2.30	1.14	1.32	1.24	1.64	1.49
	晩	0.85	0.82	0.78	0.79	1.33	1.21	1.49	1.04
									1.27 (全平均)

TDB の曝露量を把握するための指標として、TMPD および HTMV が妥当であることを支持するものと考えられた。さらに、各代謝物について、朝に採取した試料中と晩に採取した試料中の濃度を比較する ( $t$ -検定) と、ともに朝に採取した試料中の濃度の方が有意 ( $p<0.05$ ) に高かった。一般に化学物質の代謝物の尿中排泄量は採尿前数時間の曝露を反映していることから、著者においては自宅での睡眠中の TMB または TDB への曝露レベルが、屋外や職場でのそれらへの曝露レベルに比較して高いことが示唆された。

これまでに著者らは、厚生労働省の提案する空气中 TMB および TDB の分析法<sup>4)</sup>について検証し、提案された方法は室内空气中のこれら化学物質の分析に十分適用できることを報告した<sup>22)</sup>。今回確立した方法と合わせて活用し、住民における TMB および TDB の一日摂取量や住宅室内空気質の摂取量への寄与に関する知見を集積するなど、これら化学物質による健康被害の軽減や防止を目的とした今後の調査や研究のために本法は有用である。

## 結 論

TMB への曝露において尿中に排泄される代謝物を、ラットを用いた動物実験により検索したところ、これまでに知られている TDB の尿中代謝物<sup>16)</sup>と同じ TMPD および HTMV が検出された。未変化の TMB の尿中からの検出レベルは 2 種の代謝物に比較して低く、体内に取り込まれた TMB は尿中には大部分代謝された後に排泄されることが示唆された。

一般生活環境下の住民における尿中 TMPD および HTMV の定量に際し、これまでにピレスロイド

系殺虫剤<sup>17)</sup>やフタル酸系可塑剤<sup>18)</sup>の尿中代謝物の定量法として確立した方法の適合性について検証した。代謝物の *tert*-ブチルジメチルシリル化誘導体はマスフラグメンテーションにおいて高強度の高質量数のフラグメントイオンを生じず、既法では選択性に優れた高感度な分析は困難と判断されたため、3種の誘導体化試薬の混合液との反応により生じた代謝物のトリメチルシリル化誘導体を定量することにした。TMPD および HTMV の検量線はいずれも 333 µg/L 以下の尿中濃度において良好な直線性を示し、それぞれ 0.2 および 0.3 µg/L 以上の尿中濃度において検出可能であった。本分析法は、これらの代謝物を正確かつ再現性よく、また、尿中の他の夾雑成分の影響を受けずに定量することが可能な方法であることが示唆された。さらに、採取した尿試料は、一ヶ月間冷凍庫での保存が可能であると考えられた。本法は、TMP および TDP の曝露のモニタリング手法として、今後の調査や研究に有用である。

## 謝 辞

本研究は、(公財)大同生命厚生事業団からの助成金「地域保健福祉研究助成(医学)」およびJSPS 科研費(課題番号 21K10431)により実施した。

## 利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) 化学工業日報社. 16313 の化学商品. 化学工業日報社; 2013. 562-563.
- 2) 厚生省生活衛生局長. 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法について(通知). 生衛発 1093 号. 2000.  
[https://www.mhlw.go.jp/web/t\\_doc?dataId=00ta5192&dataType=1&pageNo=1](https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00ta5192&dataType=1&pageNo=1)
- 3) 厚生省生活衛生局長. 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び総揮発性有機化合物の室内濃度暫定目標値等について(通知). 生衛発 1852 号. 2000.
- 4) 厚生労働省医薬局長. 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について(通知). 医薬発 828 号. 2001.
- 5) 厚生労働省医薬局長. 室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について(通知). 医薬発 0207002 号. 2002.
- 6) 小林 智, 武内伸治, 小島弘幸, 高橋哲夫, 神和夫, 秋津裕志, 伊佐治信一. 水性塗料成分 1-メチル-2-ピロリドン及びテキサノールによる新築小学校の室内空気汚染. *室内環境* 2010; **13** (1): 39-54.
- 7) 厚生労働省. 第 21 回シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会(2017/4/19) 配付資料. 室内空気汚染に係るガイドライン案について—室内濃度に関する指針値案—. 2017.  
<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000166137.pdf>
- 8) 厚生労働省. シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会中間報告書—第 23 回までのまとめ. 2019.  
<https://www.mhlw.go.jp/content/000470188.pdf>
- 9) Sahlberg B, Gunnbjörnsdóttir M, Soon A, Jogi R, Gislason T, Wieslander G, Janson C, Norback D. Airborne molds and bacteria, microbial volatile organic compounds (MVOC), plasticizers and formaldehyde in dwellings in three North European cities in relation to sick building syndrome (SBS). *Sci Total Environ* 2013; **444**: 433-440.
- 10) Metiäinen P, Mussalo-Rauhamaa H, Viinikka M. TXIB-emission from floor structure as a marker of increased risk for some specific symptoms. *Indoor Air* 2002, *Proceedings of the 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate* 2002; **2**: 108-113.
- 11) 厚生労働省. 第 21 回シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会(2017/4/19) 配付資料. 新規指針値策定候補となる揮発性有機化合物の実態調査. 2017.  
<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000166139.pdf>
- 12) 溝内重和, 市場正良, 宮島 徹, 兒玉宏樹, 高椋利幸, 染谷 孝, 上野大介. 小学校室内環境における未規制 VOCs 濃度の現状把握. *室内環境* 2014; **17** (2): 69-79.
- 13) Bönisch U, Böhme A, Kohajda T, Mögel I, Schütze N, von Bergen M, Simon JC, Lehmann I, Polte T. Volatile organic compounds enhance allergic airway

- inflammation in an experimental mouse model. *PLoS One* 2012; **7** (7): e39817.
- 14) Choi H, Schmidbauer N, Sundell J, Hasselgren M, Spengler J, Bornehag C-G. Common household chemicals and the allergy risks in pre-school age children. *PLoS One* 2010; **5** (10): e13423.
- 15) Kim JL, Elfman L, Mi Y, Wieslander G, Smedje G, Norbäck D. Indoor molds, bacteria, microbial volatile organic compounds and plasticizers in schools - associations with asthma and respiratory symptoms in pupils. *Indoor Air* 2007; **17** (2): 153-163.
- 16) Astill BD, Terhaar CJ, Fassett DW. The toxicology and fate of 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; **22** (3): 387-399.
- 17) Yoshida T. Analytical method for pyrethroid metabolites in urine of the non-occupationally exposed population by gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 2017; **55** (9): 873-881.
- 18) Yoshida T. Analytical method for urinary metabolites as biomarkers for monitoring exposure to phthalates by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2017; **31** (7): e3910.
- 19) Bonsnes RW, Taussky HH. On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. *J Biol Chem* 1945; **158** (3): 581-591.
- 20) Yoshida T, Yoshida J. Simultaneous analytical method for urinary metabolites of organophosphorus compounds and moth repellents in general population. *J Chromatogr B* 2012; **880** (1): 66-73.
- 21) 小川 茂. GC/MS, LC/MS のための誘導体化. *ぶんせき* 2008; (7): 332-336.
- 22) 吉田俊明, 味村真弓, 大嶋智子, 山口進康. 室内空气中 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート及び 2-エチル-1-ヘキサノールの分析法の検討. *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2019; **3**: 89-95.

WEB サイトの内容は 2021 年 5 月 7 日に確認した。

**Analytical method for urinary metabolites of 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediolmonoisobutyrate and 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediolediisobutyrate in the general population**

Toshiaki YOSHIDA

Guideline values of the concentrations in indoor air for two compounds, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediolmonoisobutyrate (TMB) and 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediolediisobutyrate (TDB), are presently being deliberated by Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan. In order to understand the exposure to these two compounds in the general population, we identified the major urinary metabolites of TMB and established an analytical method for the urinary metabolites of TMB and TDB. Two metabolites, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol and 3-hydroxy-2,2,4-trimethylvaleric acid, which had been known as urinary metabolites resulted from TDB, were found in the urine samples collected from rats administered intraperitoneally with TMB (300 mg/kg). These metabolites were enzymatically hydrolyzed and extracted with toluene. After transformation to their trimethylsilyl derivatives, they were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry. The calibration curves for the metabolites were linear. They could be determined accurately and reproducibly at urinary concentrations of up to 300 µg/L (detection limits: 0.2 - 0.3 µg/L). The collected urine samples could be stored for up to 1 month at -20 °C in a freezer. The proposed method was applied to determine urine samples collected continuously for one week from author. There was a significant correlation between the urinary concentrations of both metabolites. The method was considered to be available for future researches as a monitoring method of the exposures to TMB and TDB in the general population.

**Key words** : Texanol, TXIB, biomarker, gas chromatography/mass spectrometry

## 大阪府における環境および食品中放射能調査（令和 2 年度報告）

肥塚利江，大山正幸，小泉義彦，小池真生子，山口進康

令和 2 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）および食品試料（タマネギ、キャベツ）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。その結果、令和 2 年度の環境および各種食品中の放射能および放射線のレベルは、過去の値と同様であり、人工放射性物質の環境への新たな放出はなかったことが確認された。

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測定調査を実施している。この調査は、人工放射性降下物および原子力施設等からの放射性物質の漏洩による環境汚染の有無およびそのレベルを明らかにする目的で行っており、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 ( $^{134}\text{Cs}$ )、セシウム 137 ( $^{137}\text{Cs}$ )、ヨウ素 131 ( $^{131}\text{I}$ )、カリウム 40 ( $^{40}\text{K}$ ) 等] を行い、モニタリングポストによる空間放射線量率の調査を行った。

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、令和 2 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（令和 2 年度）」<sup>1)</sup> 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  $\text{cm}^2$ ）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）で行った。比較試料は、酸化ウラン ( $\text{U}_3\text{O}_8$ ：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。

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	76
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	守口市大庭町 大阪府庭窪浄水場	年1回(令和2年 6月)	1
		蛇口水	大阪市東成区 当所本館1F	年1回(令和2年 6月)	1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(令和2年 7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(令和2年 7月)	1
	土壌	0~5cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(令和2年 8月)	1
		5~20cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(令和2年 8月)	1
	野菜	タマネギ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(令和2年 6月)	1
		キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(令和2年12月)	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2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2年 8月)	1	
寒天		(公財) 日本分析センターで調製	年1回(令和2年 8月)	5	
空間線量率	モニタリングポスト		大阪市東成区 当所本館北側駐車場	毎日/年間	355
			茨木市大住町 茨木保健所	毎日/年間	363
			寝屋川市八坂町 寝屋川市保健所	毎日/年間	361
			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	356
			富田林市寿町 富田林保健所	毎日/年間	359
			泉佐野市羽倉崎 市立佐野中学校	毎日/年間	362

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

② 降下物（雨水・ちり）：当所本館南側屋上（地上約15m）に設置した水盤（表面積5000cm<sup>2</sup>）に降下した雨水およびちりを1ヶ月間採取し、採取した試料全量を、上水自動濃縮装置（柴田理化学器械製）を用いて蒸発濃縮させた。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固させた後、残留物をU-8容器に移し測定用試料とした。

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

参照）。

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

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

⑥ 標準試料法による相互比較分析：（公財）日本分析センターが数核種を添加して調製した放射能標準容積線源（寒天）（以下「寒天」という）および放射能標準容積線源（模擬土壌（アルミナ）（以下「模擬土壌」という））ならびに分析比較試料（模擬牛乳）（以下「模擬牛乳」という）について、寒天（U-8容器：試料高さの違う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（ $^{134}\text{Cs}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{131}\text{I}$  および  $^{40}\text{K}$  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 1m）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、令和 3 年 1 月 18 日から 28 日にかけて、6 基のモニタリングポストが更新されたので、それに伴い、それぞれ、2 から 10 日間の欠測がある。

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<sup>2)</sup>。

## 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結果を示

す。

降水中の全ベータ放射能は、76 試料中 17 例から検出されたが、異常値は検出されなかった。

表 2 降水中全ベータ放射能測定結果

年 月	降水量 mm	件数 (検出数)	濃度 Bq/L	月間降下量 MBq/km <sup>2</sup>		
令和2年	4月	124	4 (0)	ND	ND	
	5月	104	4 (2)	ND~0.42	27.2	
	6月	174	8 (1)	ND~0.42	1.6	
	7月	418	15 (1)	ND~0.51	1.4	
	8月	109	4 (2)	ND~0.48	31.1	
	9月	108	9 (2)	ND~0.36	1.1	
	10月	207	7 (0)	ND	ND	
	11月	48	5 (2)	ND~0.43	2.0	
	12月	9	2 (1)	ND~0.32	1.9	
	令和3年	1月	82	7 (4)	ND~0.93	4.7
		2月	47	3 (0)	ND	ND
		3月	151	8 (2)	ND~1.26	5.6
令和2年度	1581	76 (17)	ND~1.26	76.6		
過去3年間の値						
平成29年度*	1380	75 (33)	ND~1.46	147.5		
平成30年度	1478	77 (23)	ND~1.63	56.9		
平成31年度	1270	78 (18)	ND~0.91	69.3		

ND：計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

\*：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。

## 2. 核種分析

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

(1)  $^{134}\text{Cs}$  および  $^{137}\text{Cs}$ ：今年度も例年同様、 $^{137}\text{Cs}$  が土壌および海底土の各試料から検出されたが、そのレベルは過去の値と同程度であった。その他の試料では  $^{137}\text{Cs}$  の検出はなかった。 $^{134}\text{Cs}$  は、どの試料からも検出されなかった。

(2)  $^{131}\text{I}$ ： $^{131}\text{I}$  は、上水原水および蛇口水試料から微量（1.1 および 0.68 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  $^{131}\text{I}$  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<sup>3)</sup>）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<sup>4)</sup>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。

上水中に存在する  $^{131}\text{I}$  による府民への健康影響については、既報<sup>4)</sup>でも論じたように、そのレベルは飲食物摂取制限の基準<sup>5)</sup>（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。

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

試料	採取年月日	単位	<sup>134</sup> Cs	<sup>137</sup> Cs	<sup>131</sup> I	<sup>40</sup> K
大気浮遊じん						
令和2年 4月～6月	R2.4.6 ～R2.6.18	mBq/m <sup>3</sup>	ND	ND	ND	ND
7月～9月	R2.7.2 ～R2.9.17	〃	ND	ND	ND	0.13±0.038
10月～12月	R2.10.5 ～R2.12.17	〃	ND	ND	ND	ND
令和3年 1月～3月	R3.1.5 ～R3.3.17	〃	ND	ND	ND	ND
令和2年度		mBq/m <sup>3</sup>	ND	ND	ND	ND～0.13
過去3年間の値		mBq/m <sup>3</sup>	ND	ND	ND	ND～0.16
降下物						
令和2年 4月	R2.3.31 ～R2.4.30	MBq/km <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND
5月	R2.4.30 ～R2.6.1	〃	ND	ND	ND	ND
6月	R2.6.1 ～R2.7.1	〃	ND	ND	ND	ND
7月	R2.7.1 ～R2.8.3	〃	ND	ND	ND	ND
8月	R2.8.3 ～R2.9.1	〃	ND	ND	ND	ND
9月	R2.9.1 ～R2.10.1	〃	ND	ND	ND	ND
10月	R2.10.1 ～R2.11.2	〃	ND	ND	ND	ND
11月	R2.11.2 ～R2.12.1	〃	ND	ND	ND	ND
12月	R2.12.1 ～R3.1.4	〃	ND	ND	ND	ND
令和3年 1月	R3.1.4 ～R3.2.1	〃	ND	ND	ND	ND
2月	R3.2.1 ～R3.3.1	〃	ND	ND	ND	ND
3月	R3.3.1 ～R3.3.31	〃	ND	ND	ND	0.81±0.20
令和2年度		MBq/km <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND～0.81
過去3年間の値		MBq/km <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND～1.4
上水・原水	R2.6.22	mBq/L	ND	ND	1.1±0.12	64±2.4
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND～3.4	62～79
上水・蛇口水	R2.6.5	mBq/L	ND	ND	0.68±0.20	82±2.6
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND～0.66	78～94
海水	R2.7.30	Bq/L	ND	ND	ND	4.1±0.37
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	3.2～5.2
海底土	R2.7.30	Bq/kg dry	ND	1.5±0.21	ND	630±11
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	1.8～2.4	ND	620～650
土壌	R2.8.7	Bq/kg dry	ND	1.1±0.21	ND	680±11
0～5cm層		(MBq/km <sup>2</sup> )	(ND)	(58±11)	(ND)	(35000±540)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	ND～2.0	ND	640～660
		(MBq/km <sup>2</sup> )	(ND)	(ND～110)	(ND)	(32000～38000)
土壌	R2.8.7	Bq/kg dry	ND	0.87±0.15	ND	680±10
5～20cm層		(MBq/km <sup>2</sup> )	(ND)	(140±26)	(ND)	(110000±1700)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	0.8～2.9	ND	680～710
		(MBq/km <sup>2</sup> )	(ND)	(120～490)	(ND)	(110000～120000)
農産物 タマネギ	R2.6.5	Bq/kg生	ND	ND	ND	53±0.36
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	44～51
農産物 キャベツ	R2.12.11	Bq/kg生	ND	ND	ND	68±0.46
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	63～70

ND：計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

表4 モニタリングポストによる空間放射線量率

表4-1 大阪市 大阪健康安全基盤研究所：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：大阪市)				
		最高値	最低値	平均値		
令和2年	4月	30	91	64	66	
	5月	31	77	65	66	
	6月	30	105	64	66	
	7月	31	86	64	66	
	8月	31	88	64	65	
	9月	30	84	63	66	
	10月	31	75	63	66	
	11月	30	84	65	66	
	12月	31	92	64	66	
	令和3年	1月	21*	72	63	65
		2月	28	102	62	64
		3月	31	93	61	64
令和2年度	355*	105	61	66		
過去3年間の値						
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)*2	160	99	72	76		
平成31年度(地上1m)*2	366	104	62	71		

\*：令和3年1月機器更新のため欠測  
\*2：平成30年10月地上1mに移設

表4-2 茨木市 茨木保健所：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：茨木市)				
		最高値	最低値	平均値		
令和2年	4月	30	69	53	56	
	5月	31	70	55	57	
	6月	30	84	53	57	
	7月	31	72	52	55	
	8月	31	65	54	57	
	9月	30	70	55	58	
	10月	31	64	55	57	
	11月	30	66	55	57	
	12月	31	74	55	58	
	令和3年	1月	29*	69	53	56
		2月	28	75	53	55
		3月	31	82	53	55
令和2年度	363*	84	52	56		
過去3年間の値						
平成29年度	365	85	52	56		
平成30年度	365	86	52	57		
平成31年度	366	77	52	57		

\*：令和3年1月機器更新のため欠測

表4-3 寝屋川市 寝屋川市保健所：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：寝屋川市)				
		最高値	最低値	平均値		
令和2年	4月	30	86	64	65	
	5月	31	78	64	66	
	6月	30	93	64	66	
	7月	31	84	63	65	
	8月	31	76	64	65	
	9月	30	80	63	65	
	10月	31	74	63	66	
	11月	30	79	64	66	
	12月	31	89	64	66	
	令和3年	1月	27*	79	64	66
		2月	28	102	64	66
		3月	31	91	64	66
令和2年度	361*	102	63	66		
過去3年間の値						
平成29年度	365	95	69	71		
平成30年度	365	98	68	71		
平成31年度	366	90	62	67		

\*：令和3年1月機器更新のため欠測

表4-4 東大阪市 東大阪市環境衛生検査センター：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：東大阪市)				
		最高値	最低値	平均値		
令和2年	4月	30	97	74	77	
	5月	31	89	75	78	
	6月	30	115	74	78	
	7月	31	96	73	76	
	8月	31	84	75	78	
	9月	30	92	75	78	
	10月	31	88	75	77	
	11月	30	96	75	77	
	12月	31	104	75	78	
	令和3年	1月	22*	86	74	77
		2月	28	112	74	77
		3月	31	105	74	77
令和2年度	356*	115	73	77		
過去3年間の値						
平成29年度	365	103	75	78		
平成30年度	365	108	72	77		
平成31年度	366	105	73	77		

\*：令和3年1月機器更新のため欠測

表4-5 富田林市 富田林保健所：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：富田林市)				
		最高値	最低値	平均値		
令和2年	4月	30	73	60	62	
	5月	31	73	61	62	
	6月	30	75	60	62	
	7月	31	70	60	61	
	8月	31	78	61	63	
	9月	30	73	61	62	
	10月	31	71	61	62	
	11月	30	75	61	62	
	12月	31	91	61	63	
	令和3年	1月	25*	67	59	61
		2月	28	83	59	60
		3月	31	81	59	60
令和2年度	359*	91	59	62		
過去3年間の値						
平成29年度	365	82	60	63		
平成30年度	365	90	60	62		
平成31年度	366	85	60	62		

\*：令和3年1月機器更新のため欠測

表4-6 泉佐野市 佐野中学校：地上1m

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：泉佐野市)				
		最高値	最低値	平均値		
令和2年	4月	30	72	49	51	
	5月	31	74	49	51	
	6月	30	85	49	52	
	7月	31	72	48	51	
	8月	31	60	50	52	
	9月	30	69	49	51	
	10月	31	62	49	51	
	11月	30	65	49	51	
	12月	31	67	50	52	
	令和3年	1月	28*	73	48	51
		2月	28	72	48	50
		3月	31	98	48	50
令和2年度	362*	98	48	51		
過去3年間の値						
平成29年度	365	90	49	52		
平成30年度	365	91	48	51		
平成31年度	366	77	48	51		

\*：令和3年1月機器更新のため欠測

(3)  $^{40}\text{K}$  : 天然放射性核種である  $^{40}\text{K}$  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<sup>6)</sup>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、 $En$  数の絶対値も「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に示す。

令和2年度の大阪市の空間放射線量率値(表4-1)の1時間平均値は、61~105 nGy/h の範囲であった。この結果は、モニタリングポストの設置場所が当研究所敷地内の地上20 m の場所から地上1 m の場所に変更された平成30年の10月以降(62~104 nGy/h) と類似の範囲であった。

また、表4-2 から表4-6 に示したその他の地上1 m に設置されている5ヶ所の空間放射線量率値は、茨木市(表4-2)が52~84 nGy/h、寝屋川市(表4-3)が63~102 nGy/h、東大阪市(表4-4)が73~115 nGy/h、富田林市(表4-5)が59~91 nGy/h および泉佐野市(表4-6)が48~98 nGy/h の範囲であった。このうち、寝屋川市、東大阪市および泉佐野市の最高値で過去3年間より若干高い値を観測したが、その値は、平成28年度に示した最高値(寝屋川市:117、東大阪市:124、泉佐野市:133 nGy/h)<sup>7)</sup>より低い値であり、また、高値を示した日の降雨の状況<sup>8)</sup>およびピーク時のスペクトルより、平成28年度の高値同様、降雨による天然核種であるラドン娘核種の降下が原因であると推定できた<sup>7)</sup>。

また、昨年度大阪市および寝屋川市でみられた周辺環境の変化によるとみられる値の変化<sup>9)</sup>は、本年度はみられなかった。

### ま と め

核種分析により人工放射性核種である $^{131}\text{I}$ および $^{137}\text{Cs}$ が検出された。医学利用等に由来すると考えられる $^{131}\text{I}$ は上水(原水および蛇口水)に極低レベルで検出された。 $^{137}\text{Cs}$ は土壌や海底土から例年同様検出されたが、そのレベルは低値であ

った。また、他の人工放射性核種はいずれの試料からも検出されなかった。空間放射線量率では、大阪市のモニタリングポストでは移設に伴う地上高の影響と思われる僅かな測定値の上昇が継続して認められたが、平常値の範囲内であった。また、3ヶ所のモニタリングポストで過去3年間の最高値より若干高い値を観測したが、降雨によるラドン娘核種の降下が原因と推定できた。

### 謝 辞

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

注: 本報告は、電源開発促進対策特別会計法に基づく原子力規制庁からの受託事業として、大阪健康安全基盤研究所が実施した令和2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. 令和2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 一平成元年4月~平成2年3月一. 大阪府立公衛研所報 公衆衛生編 1990; 28: 165-170.
- 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 日制定, 平成 30 年 7 月 25  
日改正, 令和 2 年 10 月 28 日一部改正)

- 6) 公益財団法人日本分析センター. 令和 2 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年報*  
2017; **1**: 101-110.
- 8) 気象庁. 過去の気象データ検索.  
[https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.p  
hp](https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php)
- 9) 大山正幸, 肥塚利江, 山口進康. 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). *大阪健康安全基盤研究所年報*  
2020; **4**: 123-131

WEB サイトの内容は 2021 年 5 月 6 日に確認し  
た

## Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2020 Report)

Toshie HIZUKA, Masayuki OHYAMA, Yoshihiko KOIZUMI, Maoko KOIKE and Nobuyasu YAMAGUCHI

We investigated the radioactivity of environment and foods in Osaka Prefecture by commission from Nuclear Regulatory Agency in 2020 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 six sites in Osaka Prefecture were monitored. An artificial radionuclide,  $^{131}\text{I}$ , was detected at extremely low levels in source water and faucet water as in the past.  $^{137}\text{Cs}$ , an artificial radionuclide, was also detected at low levels in soil and sea sediment as in the past. No other artificial radionuclides were detected in any of the samples.

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

Estimation of the asymptomatic ratio of novel  
coronavirus infections (COVID-19)

H. NISHIURA<sup>a</sup>, T. KOBAYASHI<sup>a</sup>, T. MIYAMA<sup>b</sup>,  
A. SUZUKI<sup>a</sup>, SM. JUNG<sup>a</sup>, K. HAYASHI<sup>a</sup>,  
R. KINOSHITA<sup>a</sup>, Y. YANG<sup>a</sup>, B. YUAN<sup>a</sup>,  
AR. AKHMETZHANOV<sup>a</sup> and NM. LINTON<sup>a</sup>

International Journal of Infectious Diseases, 94, 154-155  
(2020)  
doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.020

統計的に推定される中華人民共和国の感染者数と中国政府の公表している新型コロナウイルス感染確定症例数との間には差異が認められることから、一定割合で無症状の感染者が存在することが考えられる。

本研究は、チャーター航空機を利用して中華人民共和国湖北省武漢市から帰国した日本在住者を対象に新型コロナウイルス感染者のうち無症状者の比率の推定を行った。ベイズの定理を用いた推定の結果、無症状感染者比率は 30.8% (95%信頼区間 7.7-53.8%) であった。

Seasonal shift in epidemics of respiratory syncytial virus  
infection in Japan

T. MIYAMA<sup>a</sup>, N. IRITANI<sup>b</sup>, T. NISHIO<sup>b</sup>,  
T. UKAI<sup>a,b</sup>, Y. SATSUKI<sup>b</sup>, H. MIYATA<sup>c</sup>,  
A. SHINTANI<sup>d</sup>, S. HIROI<sup>e</sup>,  
K. MOTOMURA<sup>a,f</sup> and K. KOBAYASHI<sup>a</sup>

Epidemiology and Infection, 149, e55  
(2021)  
doi: 10.1017/S0950268821000340

従来、日本の RS ウイルス感染症流行は秋から冬に起こっていたが、近年、流行の季節性変動が指摘されている。本研究は、その季節変動が統計学的に有意であるか明らかにするため実施した。RS ウイルス感染症の 2012~2016 年における流行期は 9~12 月であったが、2017~2019 年の流行期は 7~10 月であったことが統計学的に証明され、流行期の季節変動が立証された。

a 北海道大学大学院医学研究院

b 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課  
新型コロナウイルス感染症の無症状感染者比率の推定

a 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

b 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部健康危機管理課

c 大阪大学大学院医学系研究科

d 大阪市立大学大学院医学研究科

e 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

f 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部 (現所属)

日本におけるRSウイルス感染症発生動向の季節変動

A measles outbreak in Kansai International Airport, Japan, 2016: Analysis of the quantitative difference and infectivity of measles virus between patients who are immunologically naive versus those with secondary vaccine failure

T. KURATA<sup>a,b</sup>, S. P. YAMAMOTO<sup>c</sup>,  
H. NISHIMURA<sup>a</sup>, T. YUMISASHI<sup>a</sup>,  
K. MOTOMURA<sup>a,d</sup> and M. KINOSHITA<sup>e</sup>

Journal of Medical Virology 93(6), 3446-3454 (2021)  
<https://doi.org/10.1002/jmv.26733>

既報のデータから予防接種歴を有する二次ワクチン不全 (SVF) では患者からのウイルス伝播のリスクが低いことが示唆されている。しかし、SVFのウイルス学的検討は十分になされていない。本研究では、麻疹患者を麻疹に免疫をもたない感受性群と SVF 群に分類し、ウイルス検出率と検出量を比較した。

2016 年に関西国際空港で発生した麻疹患者の血液、咽頭スワブ及び尿検体について解析を行った。患者は麻疹特異的 IgG 抗体価とその親和性に基づき感受性群および SVF 群に分類され、各々ウイルス分離とリアルタイム PCR によるウイルスゲノムの定量が行われた。その結果、血液検体中のウイルス核酸量で両群間に有意な差がみられた他、咽頭拭い及び尿から検出されるウイルスゲノム量も感受性群で SVF 群よりも 100 倍多かった。感染性のウイルスは、感受性グループからのみ分離された。

本研究では、麻疹患者の SVF 群ではウイルスゲノム排泄量が少なく、感染性粒子の排泄が非常少ないために感染伝播リスクが低いことをウイルス学的に証明できた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪健康安全基盤研究所企画部精度管理室 (現所属)

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

d 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部 (現所属)

e 大阪府健康医療部医療対策課

2016 年に発生した関西国際空港での麻疹アウトブレイク：二次性ワクチン不全と初感染患者間の排泄麻疹ウイルス量と感染性についての解析

Detection of genetic elements carrying *vanA* in vancomycin-resistant *Enterococcus saigonensis* VE80<sup>T</sup> isolated from retail chicken meat

T. HARADA<sup>a</sup>, D. MOTOOKA<sup>b</sup>, S. NAKAMURA<sup>b</sup>,  
Y. YAMAMOTO<sup>c</sup>, T. YAMAGUCHI<sup>a</sup>,  
R. KAWAHARA<sup>a</sup> and K. KAWATSU<sup>a</sup>

Foodborne Pathogens and Disease, 17(12), 772-774  
(2020)

ベトナムで流通する鶏肉より分離され 2016 年に新種提唱した *Enterococcus saigonensis* について、type strain である VE80<sup>T</sup> のバンコマイシン耐性機構をサンガーシーケンス法、サザンハイブリッド法、全ゲノムシーケンス法により決定した。その結果、*vanA* 遺伝子群をコードする Tn1546 様構造が 76kb のプラスミド pVE80-1 上に存在することが明らかとなった。また、*vanS* 遺伝子にアミノ酸変異を伴う 3 か所の点変異が確認され、これらは台湾あるいは日本の鶏由来株で報告されている配列と一致した。新種のバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の出現は、ベトナムの養鶏産業における VRE サーベイランスの重要性を示していると考えられる。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 大阪大学微生物病研究所

c 岐阜大学 ライフサイエンスリサーチセンター

鶏肉由来 *Enterococcus saigonensis* VE80<sup>T</sup> におけるバンコマイシン耐性機構

The first report of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* isolation in Japan

T. YAMAGUCHI<sup>a</sup>, Y. KAWASAKI<sup>b</sup>,  
C. KATSUKAWA<sup>c</sup>, R. KAWAHARA<sup>a</sup>  
and K. KAWATSU<sup>a</sup>

Japanese Journal of Infectious Diseases, 73, 361-362  
(2020)

百日咳は特有のけいれん性の痙咳発作を生じ、特に生後 6 ヶ月未満の乳児では呼吸困難により死に至る危険性が高い急性呼吸器感染症である。百日咳の治療には、第一選択薬としてマクロライド系抗菌薬が推奨されているが、近年マクロライド耐性百日咳菌 (*Macrolide-resistant Bordetella pertussis*: MRBP) の出現が海外では問題視されている。一方、これまでわが国では MRBP の分離報告はなかったが、2018 年に大阪府で分離された百日咳菌が MRBP であったため、その概要および解析結果について報告する。

大阪府で分離した MRBP は、エリスロマイシン、クラリスロマイシンの MIC (最小発育阻止濃度) が 256 µg/mL 以上、アジスロマイシンの MIC が 32 µg/mL であり高い耐性を示した。また 23SrRNA に変異があり、これまでに海外で分離された MRBP と同様であった。Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) の遺伝子型 (MT-195) および遺伝子多型 (ptxP1/ptxA1/prn1/fim3A/fhaB3) の解析結果から、国内では稀な遺伝子型であり、中国の一部地域でアウトブレイクを引き起こした MRBP の遺伝子型と一致していた。本症例は国内初の MRBP 感染事例であり、その遺伝子型解析結果は、すでに海外から MRBP が侵入していることを示唆するものであった。今後、MRBP の流行を防ぎマクロライド系抗菌薬を有効に使用するためには、百日咳菌の分離、収集、解析を行う積極的な病原体サーベイランスが必要であると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 川崎こどもクリニック

c 大阪府立大学 生命環境科学研究科

日本で初めて分離されたマクロライド耐性百日咳菌について

Isolation and plasmid characterisation of *Salmonella enterica* serovar Albany harbouring *mcr-5* from retail chicken meat in Japan

Y. WAKABAYASHI<sup>a</sup>, T. SEKIZUKA<sup>b</sup>,  
T. YAMAGUCHI<sup>a</sup>, A. FUKUDA<sup>c,d</sup>, M. SUZUKI<sup>e</sup>,  
R. KAWAHARA<sup>a</sup>, M. TAGUCHI<sup>a</sup>, M. KURODA<sup>b</sup>,  
K. SEMBA<sup>f</sup>, H. SHINOMIYA<sup>f</sup> and K. KAWATSU<sup>a</sup>

FEMS Microbiology Letters, 367(15), fnaa127 (2020)  
doi: 10.1093/femsle/fnaa127

コリスチンは多剤耐性菌に対する治療の切り札であり、プラスミド媒介性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr*) の出現は世界的な懸念事項となっている。しかし、国内で分離されるサルモネラ属菌における *mcr* の保有状況は明らかでない。本研究では、国内で 2012 年~2016 年に市販食肉から分離した 203 株のサルモネラ属菌株に対して *mcr-1*~*mcr-5* のスクリーニングを実施した。*Salmonella* Albany 27A-368 株から *mcr-5* が検出され、残りの 202 株からは *mcr* は検出されなかった。全ゲノム配列解析の結果、*mcr-5* は 115 kb のプラスミド (p27A-368) 上に存在することが分かった。p27A-368 は、*S. Infantis* に接合伝達し、接合伝達株中で安定的に保持された。p27A-368 の塩基配列は、既報の *mcr-5* 保有プラスミドである pSE13-SA01718 よりも、むしろ ESBL 遺伝子保有プラスミドである pCOV27 と高い相同性を示した。一方で、p27A-368 において *mcr-5* はトランスポゾン上に存在しており、そのトランスポゾンの塩基配列は、pSE13-SA01718 に見られるトランスポゾンの配列と相同性が高かった。コアゲノム上の Single Nucleotide Variants に基づく系統解析の結果、27A-368 株は東南アジアで分離された *S. Albany* 株と遺伝的に近縁であることが示された。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

d 酪農学園大学 (現所属)

e 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター

f 愛媛県立衛生環境研究所

日本の市販鶏肉からの *mcr-5* 陽性 *Salmonella* Albany の分離とプラスミド解析

## A heterodimer antibody fragment for the passive immunotherapy against norovirus infection

Y. YUKI<sup>a</sup>, S. KUROKAWA<sup>a</sup>, S. SATO<sup>a,b,c,d</sup>,  
A. SASOU<sup>a</sup>, N. MATSUMOTO<sup>b</sup>, A. SUZUKI<sup>c</sup>,  
N. SAKON<sup>e</sup>, Y. GODA<sup>a</sup>, N. TAKEYAMA<sup>a</sup>,  
T. MIYOSHI<sup>f</sup>, H. MARCOTTE<sup>g</sup>, T. TANAKA<sup>f</sup>,  
L. HAMMARSTROM<sup>g</sup> and H. KIYONO<sup>a,h,i,j</sup>

Journal of Infectious Diseases, 222, 470-478 (2020)  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa115>

ヒトノロウイルス感染は世界中で年間6億8500万人、死亡例は20万人と推定されている。GII.4とGI.1に対するワクチン開発が進められているが、その他の遺伝子型に対するワクチンや抗体に関する情報はない。我々は、GII.4とGII.17のヒトノロウイルスに対して、それぞれ7C6と1E4という2つの可変ドメインラマ重鎖抗体フラグメント(VHH)クローンを開発した。7C6は、GII.17、GII.6、GII.3、GII.4のウイルス様粒子(VLP)と交差反応したが、GII.4のノロウイルスのみを中和した。一方、1E4はGII.17のVLPにのみ反応し、中和した。これら2つのVHHを用いて、GII.4とGII.17のノロウイルスを中和するヘテロ二量体VHHフラグメントを作製した。熱や酸に安定な組換えモノクローナル抗体であることから、若年者、高齢者、免疫不全者のGII.4およびGII.17ノロウイルスに対する経口免疫療法や予防に有用であると考えられる。

a 東京大学医科学研究所粘膜ワクチン開発センター  
b 大阪大学微生物病研究所 BIKEN 次世代ワクチン協働研究所  
c 大阪大学微生物病研究所 BIKEN 次世代ワクチン開発研究センター  
d 大阪市立大学医学研究科医学部ゲノム免疫学  
e 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課  
f 堺市衛生研究所 g カロリンスカ大学  
h 東京大学医科学研究所粘膜免疫学  
i 千葉大学医学部免疫学  
j 千葉大学—カリフォルニア大学粘膜免疫・アレルギー・ワクチン サンディエゴセンター  
ノロウイルス感染症に対する受動的免疫療法のためのヘテロダイマー抗体フラグメント

## Development of Antibody-Fragment-Producing Rice for Neutralization of Human Norovirus

A. SASOU<sup>a</sup>, Y. YUKI<sup>a,b</sup>, S. KUROKAWA<sup>a</sup>,  
S. SATO<sup>b,c,d</sup>, Y. GODA<sup>a</sup>, M. UCHIDA<sup>e</sup>,  
N. MATSUMOTO<sup>c</sup>, H. SAGARA<sup>f</sup>, Y. WATANABE<sup>f</sup>,  
M. KURODA<sup>g</sup>, N. SAKON<sup>h</sup>, K. SUGIURA<sup>a</sup>,  
R. NAKANISHI-OUCHIDA<sup>a,b</sup>, H. USHIJIMA<sup>i</sup>,  
K. FUJIHASHI<sup>j,k</sup> and H. KIYONO<sup>a,b,l,m</sup>

Frontiers in Plant Science (2021)  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.639953>

ヘテロ二量体VHH(7C6-1E4)がGII.4とGII.17の両方のノロウイルスに対して高い中和活性を示すことを明らかにした。コメ型抗体MucoRice-VHH(7C6-1E4)は、90°Cで20分間加熱処理しても中和活性を維持していた。これらの結果は、MucoRice-VHHヘテロ二量体を、健康な成人や小児だけでなく、免疫不全患者や高齢者を対象としたGII.4およびGII.17ノロウイルスに対する経口免疫療法や予防薬の候補として開発を進めるための基盤となるものである。

a 東京大学医科学研究所粘膜免疫学  
b 東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター粘膜ワクチン学  
c 大阪大学微生物病研究所 BIKEN 次世代ワクチン協働研究所  
d 大阪市立大学医学研究科医学部ゲノム免疫学  
e アステラスファーマ  
f 東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリー  
g 農業・食品産業技術総合研究機構  
h 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課  
i 日本大学医学部病理・微生物学  
j 東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター臨床ワクチン学  
k アラバマ大学小児歯科  
l 千葉大学医学部免疫学  
m 千葉大学—カリフォルニア大学粘膜免疫・アレルギー・ワクチン サンディエゴセンター  
ヒトノロウイルスに中和活性を示すコメ型抗体の開発

国際的にみたノロウイルスの概況と  
今後の課題左近直美<sup>a</sup>, 白井達哉<sup>a</sup>, 上間 匡<sup>b</sup>

クリーンテクノロジー, 30, 65-70 (2020)

ノロウイルスは胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、世界中ですべての年齢層で年間約6億8400万件の症例と21万2000人の死亡原因になっていると推計された。それに伴う社会経済的損失は大きく、速やかな対策が講じられるべき疾患として認識された。一般にウイルス対策を考える上で、根幹となる手法は培養である。培養によってウイルスの性状解析をはじめ薬剤あるいは抗ウイルス薬の開発・基礎評価そして中和抗体の測定が可能となる。2016年、長年の課題であったヒトノロウイルスの培養がヒト腸管細胞由来オルガノイドを用いて成功し、培養を用いた消毒薬の評価も行われるようになった。今後、培養の実用化により、ノロウイルス研究・対策に大きな進展が期待されている。

本稿ではノロウイルスの分類法や感染動態、培養法など最近の話題について紹介する。

ウイルス性食中毒に関する話題  
～ノロウイルスの最新情報～左近直美<sup>a</sup>, 白井達哉<sup>a</sup>, 本村和嗣<sup>a,b</sup>

食品機械装置, 57, 10-14 (2020)

ノロウイルスは世界中で発生する胃腸炎の主要な原因として報告され、社会経済的損失の大きな疾患であることが認識されている。その証明は半世紀前に遡る。1968年ノーウォーク州の学校で集団胃腸炎が発生し、1972年患者血清を用いた免疫電顕によって集団胃腸炎の原因であることが証明された。その後、遺伝子検査が導入され、ノロウイルスを原因とする食中毒(集団胃腸炎)や小児の胃腸炎が多数報告されることとなった。ウイルス検出に遺伝子検査が積極的に導入されるきっかけになったといってもよい。平成9年以降、食中毒検査にノロウイルス遺伝子検査が実施されるようになり、不顕性感染者による食品の二次汚染問題やウイルスの長期感染性維持などが明らかされた。同時にノロウイルスの感染制御の困難さと、対応策の拡充を必要とすることとなった。食中毒を防ぐには「一人がしていない」＝「全員がしていない」ことになるという意識を持ち続けることが大事である。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

Overview of norovirus from an international perspective and future challenges

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公衆衛生部(現所属)

Foodborne viral diseases-up date of norovirus

## ダニが媒介する感染症

弓指孝博

防菌防黴, 48(12), 635-644 (2020)

ダニ類は非常に多くの種類を含んでおり、土壌中、植生上、水中などほとんどあらゆる環境に適応して生息している。その中には人や動物に寄生したり、アレルギー疾患の原因になるなど人に害を及ぼす種類も含まれるが、その最たるものが感染症を媒介するダニ類である。ここでは、我が国で患者発生数が多いツツガムシ病、日本紅斑熱、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) をはじめダニ媒介性脳炎、ライム病、その他の新しい紅斑熱群リケッチア症などについて、その疫学、病原体、症状について概説した。また、媒介者であるツツガムシ、マダニについても、その種類や生態、それらの調査法や同定について簡単に紹介し、これらのダニや感染症に対する注意点も付記した。

Two Different Strains of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus (SFTSV) in North and South Osaka by Phylogenetic Analysis of Evolutionary Lineage  
: Evidence for Independent SFTSV Transmission

R. IKEMORI<sup>a</sup>, I. AOYAMA<sup>a</sup>, T. SASAKI<sup>a,b</sup>,  
H. TAKABAYASHI<sup>c,d</sup>, K. MORISADA<sup>e</sup>,  
M. KINOSHITA<sup>f</sup>, K. IKUTA<sup>a,b</sup>, T. YUMISASHI<sup>a</sup>  
and K. MOTOMURA<sup>a,g</sup>

Viruses, 13(2), 1-5 (2021)

<https://doi.org/10.3390/v13020177>

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は、近年発見されたダニ媒介性感染症である。そのため、これまでに得られている SFTS ウイルス (SFTSV) の全ゲノムに関する情報は未だ少ない。本研究では、次世代シーケンサー (NGS) を用い、2017 年および 2018 年に大阪において患者から分離された 2 株の SFTSV の全長ゲノム配列を明らかにし、それらの系統学的解析を行った。

系統樹より、2017 年に検出された SFTSV は C5 遺伝子型、2018 年に検出された株は J1 遺伝子型と、それぞれ異なる遺伝子型に分類された。本研究で解析した C5 遺伝子型の SFTSV は、L と M 分節が C5 遺伝子型、S 分節のみ C4 遺伝子型に型別されたことから、リアソータントである可能性が示唆された。過去の研究において、C5 遺伝子型の SFTSV は中国本土において確認されていることから、大阪で検出された C5 遺伝子型の SFTSV は渡り鳥を介して中国から日本へ伝播したと考えられた。本研究において、異なる遺伝子型の SFTSV が大阪の異なる地域で検出されたことから、それぞれの地域で感染環を維持している可能性が示された。

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課  
Tick-borne infectious diseases

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪大学微生物病研究所 (現所属)

c 藤井寺保健所 d 池田保健所 e 高槻市保健所

f 大阪府健康医療部感染症対策課

g 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部 (現所属)

進化系統の異なる大阪北部と南部の 2 系統の SFTS ウイルスの系統発生分析～SFTS ウイルスは系統ごとに独立した感染環を維持している～

*Capnocytophaga felis* sp. nov. isolated from the feline oral cavity

M. SUZUKI<sup>a</sup>, K. UMEDA<sup>b</sup>, M. KIMURA<sup>a</sup>,  
K. IMAOKA<sup>a</sup>, S. MORIKAWA<sup>c</sup> and K. MAEDA<sup>a</sup>

International Journal of Systematic and Evolutionary  
Microbiology, 70(5), 3355-3360 (2020)

犬や猫の口腔内に常在する *Capnocytophaga* 属菌の一部は、人に咬傷や搔傷から感染して敗血症等の重篤な症状を引き起こす動物由来感染症（カブノサイトファーガ感染症）起因菌として知られている。国内で 2007 年から 2011 年の間に、猫の口腔内ぬぐい液から分離された 4 株の *Capnocytophaga* 属菌（大阪市内の猫から分離された 2 株を含む）について、16SrRNA 塩基配列系統解析、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法、各種生化学性状解析、全ゲノム解析等を実施した。その結果、これらの菌株は既存の *Capnocytophaga* 属菌には属さない新菌種であることが示唆された。よって、新菌種“*Capnocytophaga felis*”として命名申請を行った。国際微生物学協会連合（IUMS）公的機関誌である International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 誌に記載されたことから、*C. felis* は新菌種として正式に命名された。

Genomic characterization of clinical *Enterobacter roggenskampii* co-harboring *blaIMP-1*- and *blaGES-5*-encoding IncP6 and *mcr-9*-encoding IncHI2 plasmids isolated in Japan

K. UMEDA<sup>a</sup>, H. NAKAMURA<sup>a</sup>, A. FUKUDA<sup>b</sup>,  
Y. MATSUMOTO<sup>c</sup>, D. MOTOOKA<sup>c</sup>,  
S. NAKAMURA<sup>c</sup>, Y. YASUI<sup>d</sup>, H. YOSHIDA<sup>e</sup>  
and R. KAWAHARA<sup>a</sup>

Journal of Global Antimicrobial Resistance, 24,  
220-227 (2021)

大阪市内の医療機関において、カルバペネム耐性を付与するカルバペネマーゼ遺伝子 *blaIMP-1* および *blaGES-5* に加えて、カルバペネム耐性菌の治療薬として汎用されるコリスチン耐性遺伝子 *mcr-9* を持つ薬剤耐性菌が分離された。次世代シーケンス解析から、*blaIMP-1* および *blaGES-5* は約 40 kbp の IncP6 プラスミドの異なる領域に存在し、*blaGES-5* 領域を保有するプラスミドに可動性遺伝因子 IS26 を介して *blaIMP-1* 領域が挿入されたと考えられた。本株はさらに *mcr-9* をコードする約 272 kbp の IncHI2 プラスミドを保有していた。本報告は *blaGES-5* および *blaIMP-1* が同一プラスミド上に存在することだけでなく、*mcr-9* をコードするプラスミドの同時保有を示した初めての報告である。IS26 を介したカルバペネマーゼ遺伝子の挿入や複数の薬剤耐性プラスミドの同時保有による高度耐性化には、今後も監視が必要である。

a 国立感染症研究所

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

c 岡山理科大学

猫の口腔内から分離された新菌種 *Capnocytophaga felis*

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

b 酪農学園大学

c 大阪大学微生物病研究所

d 済生会中津病院

e 大阪市保健所

*blaIMP-1*、*blaGES-5* および *mcr-9* を保有する臨床分離株 *Enterobacter roggenskampii* の遺伝学的解析

日本近海産マイワシから検出されたアニサキス属  
幼線虫の分子同定と寄生率

馬場 孝

日本水産学会誌, 87(1), 52-54 (2021)

2017年11月から2020年3月に大阪府内で販売されたマイワシからアニサキス属幼線虫を検出し、その種と寄生率を調べた。その結果、マイワシ872尾中6尾(0.7%)の内臓から *Anisakis simplex sensu stricto* が、1尾(0.1%)の内臓から *A. pegreffii* がそれぞれ1虫体、2尾(0.2%)の筋肉から *A. simplex* s.s. が3虫体検出された。本報は、マイワシ筋肉から検出したアニサキス属幼線虫の種と寄生率を初めて明らかにした。

河川氾濫による水害に遭遇した植物標本の  
カビ汚染とその対策

浜田信夫<sup>a</sup>, 馬場 孝<sup>b</sup>, 佐久間大輔<sup>a</sup>

Bulletin of the Osaka Museum of Natural History, 75,  
29-34 (2021)

2020年7月に発生した豪雨による球磨川氾濫で被害を受けた熊本県の人吉城歴史館の植物標本を、乾燥・クリーニングする過程で、その汚染カビの種類や性質について、14サンプルを調べた。最も多く繁殖していたカビは、*Trichoderma* で、その他に、*Fusarium*、*Penicillium* などが検出された。いずれも貧栄養な土壌中に一般的に見られる好湿性のカビであった。保存した植物標本に生育するカビには好乾性カビは見つからなかったことから、いずれも洪水に由来し、浸水と同時に発生したカビと思われる。これらの汚染カビは、十分な乾燥を数カ月行えば、消失すると思われる。あわせて、乾燥や酸素遮断を優先するカビ被害への初期対処法の提言も行った。

---

大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

Molecular identification and prevalence of *Anisakis* larvae in Japanese sardine *Sardinops melanostictus* from Japanese waters

---

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

Contaminated fungi on botanical specimens by water hazard of flood

*Gekko japonicus* (Schlegel's Japanese Gekko). Diet

K. AKITA<sup>a</sup>, H. MATSUOKA<sup>b</sup> and K. YAMAZAKI<sup>c</sup>

Herpetological Review, 51, 578-579 (2020)

ニホンヤモリは日本国内に広く分布するが、摂食習性の調査は不十分である。今回、大阪府の自然海岸に生息する本種が、海生貝類であるタマキビを捕食することを確認した。また、小石を飲み込む習性ももっていた。この行動の適応的意義として、小石を胃石のように利用し硬い餌の消化を助ける機能が考えられる。これらの摂食習性はヤモリ類において初めて報告された。

指定外着色料パテントブルー群の名称と識別について

新矢将尚<sup>a,b</sup>, 紀 雅美<sup>a,b</sup>, 山口之彦<sup>a</sup>

食品衛生学雑誌, 61(2), 58-62 (2020)

指定外着色料の一つであるパテントブルーV による、輸入食品の食品衛生法違反は後を絶たない。パテントブルー色素の名称で市販されているものには、化合物名が異なるものがある一方、複数の異なる化合物がパテントブルーの名称で市販されている場合もあるため、注意が必要である。パテントブルー色素と推察される市販色素 9 品について、TLC、HPLC、LC-MS/MS で分析したところ、いずれの方法でもパテントブルーV、アズールブルーVX、イソスルファンブルー、アルファズリンA の 4 種に識別され、製品情報が不明瞭な試薬も同定された。パテントブルー群については、命名法を統一することで誤認の可能性を軽減できると考えられる。

---

a 大阪市立環境科学研究センター

b 大阪府立大学生命環境科学研究科

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

ニホンヤモリの食性

---

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 (現所属)

Nomenclature and identification method of non-permitted dyes of Patent Blue Group

Rapid quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce and beef using an on-chip staining microfluidic device

Y. TOKUNAGA<sup>a</sup> and N. YAMAGUCHI<sup>b</sup>

Journal of Food Safety, 40(6), e12851 (2020)

<https://doi.org/10.1111/jfs.12851>

食中毒原因菌の検出は培養法が中心となっており、結果が判明するまでには48時間以上を要するため、より簡便で迅速な方法が必要とされている。マイクロ流路デバイスは樹脂製の小型デバイスであり、細菌を培養することなく数時間で簡便に検出が可能といった特徴を持つ。本研究では独自に開発したマイクロ流路デバイスを用いて、食品中の危害細菌の迅速定量法の構築を行った。

食品は夾雑成分が多いために、マイクロ流路デバイスを用いて細菌数を測定するためには、夾雑成分を除去し、かつ、細菌を高率で回収するための前処理が重要となる。そこでまず、比較的夾雑成分の少ないレタスを用いた添加回収試験を行ったところ、孔径0.2 μm フィルター濾過を行う事で添加した *E. coli* O157:H7 を高精度に回収できた。比較的夾雑成分の多い牛肉を用いた添加回収試験では、低回転数と高回転数での遠心分離を併用する事により、添加した *E. coli* O157:H7 を高精度に回収できた。さらに、回収した *E. coli* O157:H7 をマイクロ流路デバイスを用いて測定したところ、蛍光顕微鏡で測定した値と大きな差は見られなかった。この結果より、マイクロ流路デバイスを用いることで食品中の *E. coli* O157:H7 を約1時間で簡便・高精度に定量可能であると示された。

LC-MS/MS を利用した迅速簡便な6種類防かび剤分析法の開発

吉光真人<sup>a</sup>, 上野 亮<sup>a</sup>, 松井啓史<sup>a</sup>,  
小阪田正和<sup>a</sup>, 内田耕太郎<sup>a</sup>, 福井直樹<sup>a</sup>,  
阿久津和彦<sup>a,b</sup>, 角谷直哉<sup>c</sup>

食品衛生学雑誌, 61(4), 143-147 (2020)

我々はLC-MS/MSを用いた迅速簡便な6種類防かび剤分析法を開発した。イマザリル、*o*-フェニルフェノール、シアベンダゾールに加えて、2011年以降に防かび剤としての利用が認められたフルジオキシニル、アゾキシストロビン、ピリメタニルを測定対象とした。迅速かつ簡単な分析法の確立を目指し、残留農薬分析法と抽出操作を共通化した。また、試料からの抽出液1 mLを充填剤500 mgのOasis HLBカラムに負荷、アセトニトリル8 mLで溶出する精製法を採用した。次いで、オレンジ、グレープフルーツ、レモンに6種類の防かび剤を添加して添加回収試験を行ったところ、真度は89.7%から100.0%、室内精度および併行精度はそれぞれ、1.5%から5.0%、0.5%から4.9%となり、食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの目標値を達成した。定量限界は、*o*-フェニルフェノールでは1 mg/kg、その他の防かび剤では0.2 mg/kgとなり、防かび剤の基準値よりも低い値であった。本分析法の有用性を確認するため、2017~2019年に市販柑橘類の分析を行ったところ、検出された防かび剤は表示との整合性が確認された。また、基準値を超過する濃度の防かび剤が検出された検体はなかった。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

on-chip 染色型マイクロ流路デバイスを用いたレタスと牛肉中の腸管出血性大腸菌 O157:H7 の迅速定量

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企画部精度管理室 (現所属)

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

Development of an LC-MS/MS-based rapid and simple analytical method for six fungicides

Preference for *O*-demethylation reactions in the oxidation of 2'-, 3'-, and 4'-methoxyflavones by human cytochrome P450 enzymes

H. NAGAYOSHI<sup>a</sup>, N. MURAYAMA<sup>b</sup>, M. TSUJINO<sup>a</sup>, S. TAKENAKA<sup>c</sup>, J. KATAHIRA<sup>d</sup>, V. KIM<sup>e</sup>, D. KIM<sup>e</sup>, M. KOMORI<sup>d</sup>, H. YAMAZAKI<sup>b</sup>, F. P. GUENGERICH<sup>f</sup> and T. SHIMADA<sup>d</sup>

Xenobiotica, 50(10), 1158-1169 (2020)

2'-, 3'-, および 4'-メトキシフラボン (MeF) を 9 種類の組換えヒトチトクローム P450 (P450 または CYP) 酵素と反応させて、生成物を LC-MS/MS で探索した。

CYP1B1.1 と 1B1.3 が最もよく反応し、酸化反応よりも脱メチル化反応を優先して引き起こすことが判明した。また、脱メチル化したのちに酸素が付加し、ジヒドロキシ体が生成したり、脱メチル化を起こさずに酸化反応へと移行したりすることも示唆された。さらに *in silico* にて分子ドッキング解析を行ったところ、メトキシフラボンの *O*-メトキシ部分と CYP1A2 の活性部位との相互作用の優先性が確認された。

以上から、2'-, 3'-, および 4'-メトキシフラボンが主にヒト P450 によって脱メチル化されてモノおよびジヒドロキシフラボンを形成すること、さらに MeF への直接酸化反応が起こり、モノヒドロキシ化生成物を形成することを明らかにした。

Involvement of NMDA receptors in tremor expression in Aspa/Hcn1 double-knockout rats

A. NISHITANI<sup>a</sup>, H. NAGAYOSHI<sup>b</sup>, S. TAKENAKA<sup>c</sup>, M. ASANO<sup>a</sup>, S. SHIMIZU<sup>d</sup>, Y. OHNO<sup>d</sup> and T. KURAMOTO<sup>a,c</sup>

Experimental Animals, 69(4), 388-394 (2020)

ラットの本態性振戦の原因にアスパルトアシラーゼ (ASPA) と過分極活性化サイクリックヌクレオチドゲートチャネル 1 (HCN1) が関与していることをこれまでの研究で示したが、この報告に使用したラットはヘテロなものであったため、今回均質な遺伝的背景を持つ *Aspaem34Kyo / Hcn1em1Kyo* ダブルノックアウトラット (F344-*Aspa / Hcn1*) 系統を開発し、グルタミン酸受容体の拮抗薬が振戦を抑制する能力を調べた。F344-*Aspa / Hcn1* は、過去検討した二重変異ラットと同等の自発的に強い体振戦を示した。ASPA の基質である *N*-アセチルアスパラギン酸 (NAA) は脳に蓄積し、NAA 代謝物であり *N*-メチル-*D*-アスパラギン酸受容体 (NMDA 受容体) に拮抗作用を持つ *N*-アセチルアスパラチル-グルタミン酸 (NAAG) は、F344-*Aspa / Hcn1* の延髄で減少した。NMDA 受容体のサブタイプ固有の拮抗薬を検証した結果、NR2C / NR2D 拮抗薬が振戦を抑制した。これらのデータは、*Aspa / Hcn1* ダブルノックアウトラットにおける振戦の病因が NR2C / NR2D NMDAR に関与しているという結論を示唆した。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

b 昭和薬科大学

c 大阪府立大学大学院総合リハビリテーション学研究所

d 大阪府立大学大学院生命環境学研究所獣医学専攻

e 建国大学校

f ヴァンダービルト大学医学部

ヒトのチトクローム P450 酵素による 2'-, 3'-, 4'-メトキシフラボンの酸化における *O*-脱メチル化反応の優先性

a 京都大学大学院医学研究科

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

c 大阪府立大学大学院総合リハビリテーション学研究所

d 大阪薬科大学

e 東京農工大学農学部

*Aspa/Hcn1* ダブルノックアウトラットの本態性振戦の発現における NMDA 受容体の役割

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oxidation of 2', 3', 4'- and 6-hydroxyflavanones by human cytochrome P450 enzymes

T. SHIMADA<sup>a</sup>, H. NAGAYOSHI<sup>b</sup>,  
N. MURAYAMA<sup>c</sup>, S. TAKENAKA<sup>d</sup>, J. KATAHIRA<sup>a</sup>,  
V. KIM<sup>e</sup>, D. KIM<sup>e</sup>, M. KOMORI<sup>a</sup>, H. YAMAZAKI<sup>c</sup>  
and F. P. GUENGERICH<sup>f</sup>

Xenobiotica, 51(2), 139-154 (2021)

フラバノンの主要な酸化生成物である 2'-ヒドロキシフラバノン (2'OHFva)、3'OHFva、4'OHFva、および 6OHFva のヒトヒトチトクローム P450 (P450 または CYP) 酵素、CYP1A1、1A2、1B1.1、1B1.3 および 2A6 による酸化を調べた。基質とした各種ヒドロキシフラバノンをそれぞれの酵素で代謝し、形成した生成物を LC-MS/MS で探索した。

フラバノンの酸化には CYP2A6 が優位に作用したがヒドロキシフラバノンについては CYP1 ファミリーの方が優位であり、複数のジヒドロキシ化フラバノン (diOHFva) およびジヒドロキシ化フラボン (diOHFvo) が形成されることを明らかにした。また水酸基が付加する位置をマススペクトルより解析した結果 3'OHFva および 4'OHFva は主に B リングで P450 によって酸化され、6OHFva については A リングで酸化されたことを示唆した。さらに *in silico* の分子ドッキング解析によってもこの仮説が支持される結果を得た。

a 大阪府立大学大学院生命環境学研究科獣医学専攻  
b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課  
c 昭和薬科大学  
d 大阪府立大学大学院総合リハビリテーション学研究科  
e 建国大学校  
f ヴァンダービルト大学医学部  
液体クロマトグラフィータンデム質量分析計を用いたヒトチトクローム P450 による 2',3',4',6-ヒドロキシフラバノンの代謝物解析

Determination of various constituent elements of polyethylene terephthalate bottles used for beverages in Japan

E. KISHI<sup>a</sup>, A. OZAKI<sup>a</sup>, T. OOSHIMA<sup>b</sup>, Y. ABE<sup>c</sup>,  
M. MUTSUGA<sup>c</sup>, Y. YAMAGUCHI<sup>a</sup>  
and T. YAMANO<sup>d</sup>

Packaging Technology and Science, 33,  
183-193 (2020)

ポリエチレンテレフタレート (PET) ボトルは清涼飲料水等の容器として広く用いられている。日本における PET 樹脂の製造工程においては、Sb や Ge などの金属触媒のほか、PET ボトルの品質改善のために金属類を含む添加剤が使用されることがある。しかし、PET ボトル中の金属類の含有量を網羅的に分析した報告は少ない。そこで、日本国内で使用されている未使用の清涼飲料水用 PET ボトル 16 試料について、全 34 元素 (Li、B、Na、Mg、Al、P、K、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、Ge、As、Se、Rb、Sr、Zr、Mo、Ag、Cd、Sn、Sb、Cs、Ba、W、Pb および U) の含有量を定量した。測定には誘導結合プラズマ発光分光分析計 (ICP-OES) および誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を用いた。その結果、16 試料には、重合触媒、安定剤、酸化触媒または青味剤として使用される 5 元素 (Ge : <0.5~50 mg/kg、Ti : <1~26 mg/kg、Sb : <0.1~279 mg/kg、P : <10~48 mg/kg および Co : <0.5~53 mg/kg) が含有されていることが明らかとなった。さらに、日本および海外製の市販ミネラルウォーターの PET ボトル 21 試料の金属類含有量を測定したところ、未使用ボトルと同程度であることが確認された。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課  
b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課  
c 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部  
d 大阪健康安全基盤研究所総務部  
日本の飲料用ポリエチレンテレフタレートボトルに含まれる金属類の一斉分析

脂質膜環境におけるアポリポタンパク質の  
凝集・アミロイド線維化機構水口智晴<sup>a</sup>, 扇田隆司<sup>b</sup>, 斎藤博幸<sup>b</sup>

膜, 46(1), 25-31 (2021)

脂質膜は、様々なアミロイド形成タンパク質のフォールディング、凝集及び線維形成に影響を与えることが知られている。アポリポタンパク質は、血中や脳内でのコレステロール輸送を担うリポタンパク質の代謝を制御するタンパク質群である。例えば、血中高密度リポタンパク質 (HDL) の主要構成タンパク質であるアポリポタンパク質 A-I (アポ A-I) は、循環血中の HDL 粒子の産生、成熟、取込などを制御することでコレステロール恒常性維持を担う。この機能においてアポ A-I の柔軟な構造変化が重要となるが、一方で構造の不安定さゆえ遺伝子変異や酸化修飾などによるアミロイド化を起こしやすいことが知られている。アポ A-I で初めて報告されたアミロイドーシス変異 Iowa (G26R) は、N 末 1-83 フラグメントとして患者臓器から検出された。著者らは、G26R 変異が脂質膜上でのアポ A-I 1-83 フラグメントの凝集と線維形成を促進することを明らかにしてきた。このメカニズム解明のため、アポ A-I 1-83 フラグメント中に 2ヶ所存在する線維化領域(14-22 残基及び 50-58 残基) のペプチドを用いた線維形成性の評価を行い、さらに、部位特異的蛍光標識法を用いてアミノ酸残基レベルでの脂質膜結合能及び線維形成性評価を行った。その結果、G26R 変異に近い 14-22 残基領域は変異により脂質膜上での  $\alpha$  ヘリックス構造が不安定化され、この領域がアミロイド線維に特徴的な  $\beta$  シート構造へと容易に転移することで、アポ A-I 1-83 フラグメントは脂質膜上で凝集・線維を形成することが明らかとなった。さらに、脂質膜の組成によってアポ A-I 1-83 フラグメント中の局所的な構造が異なり、生体内で特定の組織や臓器に沈着するアポ A-I アミロイドの沈着機序解明につながる知見が得られた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

b 京都薬科大学薬品物理化学分野

Mechanism of aggregation and amyloid fibril formation of apolipoprotein on lipid membrane environment

## Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of hen's egg white allergens Gal d 1-4 in fresh and processed eggs

K. KIYOTA<sup>a</sup>, M. YOSHIMITSU<sup>b</sup>,  
K. UCHIDA<sup>b</sup> and K. KAJIMURA<sup>c</sup>

Food Chemistry, 345, 128022 (2021)

鶏卵に含まれる一部の成分は健康に有益で、食品から化粧品、医薬品等にまで幅広く使用されるが、食物アレルギーを引き起こす側面を持つ。本研究では、生鮮鶏卵や加工鶏卵において、4 種類の卵白アレルギー (以下まとめて Gal d 1-4) を同時に定量する LC-MS/MS 法の開発を目的とした。

本法では、Gal d 1-4 をそれぞれトリプシン消化し、得られたペプチドを LC-MS/MS で分析した。Gal d 1-4 について、本法では、定量下限値が 9.77-39.1 ng/mL、生鮮鶏卵および加工鶏卵における添加回収率が 68.3-121.3%、併行精度と室内精度がそれぞれ 1.5-15.7%、2.4-38.1%であった。さらに、27 種類の食品を分析したところ、本法の高い特異性が確認された。

以上より、本法は良好な真度、感度、精度および再現性を示し、定量法として妥当性が確認された。また、本法で測定した実試料中の Gal d 1-4 濃度は、文献値と概ね合致した。今後、本法は、鶏卵の有益成分の分析技術や鶏卵アレルギーの発症防止対策の発展に貢献することが期待される。

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衛生化学部医薬品課  
生鮮鶏卵と加工鶏卵における 4 種類の卵白アレルギー Gal d 1-4 に対する LC-MS/MS 法の開発

Determination of formaldehyde and acetaldehyde levels in poly(ethylene terephthalate) (PET) bottled mineral water using a simple and rapid analytical method.

Y. ABE<sup>a</sup>, N. KOBAYASHI<sup>a</sup>, M. YAMAGUCHI<sup>a</sup>, M. MUTSUGA<sup>a</sup>, A. OZAKI<sup>b</sup>, E. KISHI<sup>b</sup>, K. SATO<sup>a</sup>

Food Chemistry, 344, 128708 (2021)

水に含まれるホルムアルデヒド (FA) とアセトアルデヒド (AA) の含有量を測定するために、簡便で迅速な分析法を開発した。FA と AA は、LC パイアル内で 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによって室温、約 25°C で 20 分間誘導体化し、LC-MS/MS を使用して分析した。検量線は、2~150 ng/mL で優れた直線性を示した。超純水と市販の PET ボトル入りミネラルウォーターを使用した添加回収試験において、良好な真度と精度が得られた。本法を用いて、日本市場の 105 の PET ボトル入りミネラルウォーターの FA および AA 含有量を測定した。その結果、FA は 61% のサンプルから 2.6~31.4 ng/mL 検出され、AA は 68% のサンプルから 5.3~143.5 ng/mL 検出された。これらの結果より、日本市場の PET ボトル入りミネラルウォーター中の FA と AA 濃度は過去 10 年間で大幅に変化していないことが示された。

顕微 FTIR によるマイクロプラスチック分析の試みと課題

中尾賢志<sup>a</sup>, 秋田耕佑<sup>a</sup>, 榎元慶子<sup>a</sup>, 尾崎麻子<sup>b</sup>, 奥田哲士<sup>c</sup>

用水と排水, 62, 649-655 (2020)

海洋や陸水、河川におけるマイクロプラスチック分析の対象サイズは、プランクトンネットの目詰まりの関係上 300~350 μm 以上であり、それよりも小さいサイズのマイクロプラスチックの分析については確固とした分析方法はまだない状況である。また、現在報告されている数十 μm サイズのマイクロプラスチックについての分析方法は研究者によって異なり、その精度も各研究者間で担保されているとはいいがたい。筆者らは 20 μm 以上のマイクロプラスチックの分析方法について実試料である下水と下水汚泥を対象として検討し、顕微 FTIR による分析を試み、それぞれの処理工程における収支の精確性から測定値を検証するため、各処理工程においてマイクロプラスチックの負荷量を算出した。下水汚泥試料はマイクロプラスチック表面の付着物によりうまく分析できない可能性があったが、下水処理系と下水汚泥処理系との間のマイクロプラスチック収支はある程度とれていることがわかった。よって、本法による分析は一定の精度で可能であると考えられた。しかしながら、分析工程において種々の課題が顕在化し、本分析方法の精度担保のためには前処理における試料量の決定、前処理工程におけるマイクロプラスチックのコンタミネーション、フィルターで粒子を捕捉する際の逸失、顕微 FTIR による自動分析および分析値の信頼性といった事項について検討する必要があることがわかった。

a 国立医薬品食品衛生研究所

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課  
PET ボトル入りミネラルウォーター中のホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの簡便迅速法による分析

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 龍谷大学先端理工学部環境生態工学課程

Trial and subjects of microplastics analysis by FTIR microscopy

Evaluation of carboxamide-type synthetic cannabinoids on the functional activities at cannabinoid receptors and biological effects via inhalation exposure test

A. TAKEDA<sup>a</sup>, T. DOI<sup>a</sup>, A. ASADA<sup>a</sup>, T. SUZUKI<sup>b</sup>,  
K. YUZAWA<sup>b</sup>, H. ANDO<sup>b</sup>, Y. KUBO<sup>b</sup>,  
A. NAGASAWA<sup>b</sup>, F. KAIHOKO<sup>b</sup>, Y. HASEGAWA<sup>b</sup>,  
K. TANAKA<sup>b</sup>, K. IGARASHI<sup>c</sup>, T. MAENO<sup>b</sup>,  
A. SUZUKI<sup>b</sup>, S. SHIMIZU<sup>b</sup>, N. UEMURA<sup>b</sup>,  
J. NAKAJIMA<sup>b</sup>, J. SUZUKI<sup>b</sup> and T. TAGAMI<sup>a</sup>

Forensic Toxicology, 38(2), 455-464 (2020)  
<https://doi.org/10.1007/s11419-020-00534-x>

危険ドラッグとは規制薬物などに化学構造を似せて作られ、同様の薬理作用を有する化合物またはそれらを含む製品を指す。その中でも合成カンナビノイドは乾燥植物片に混合し、合法ハーブなどと称して乱用される化合物群である。特に平成26年ごろ流行した「カルボキサミド型合成カンナビノイド」は使用者の死亡事例が多発だけでなく、無関係な人々を巻き込む自動車事故の原因として知られている。

本研究では、平成27年から29年に海外で流通実態が確認された3種類のカルボキサミド型合成カンナビノイド（5F-MDMB-PICA、5F-EMB-PINACA、AMB-CHMICA）について、カンナビノイド受容体に対する機能活性及び吸入曝露試験における生体影響を基に評価を行った。評価の結果、カンナビノイド受容体に対する機能活性が強ければ、吸入曝露による生体影響も強く観察された。対象とした化合物の中でも5F-MDMB-PICAは、過去に多くの死亡事故を引き起こした5F-MDMB-PINACAと同等の活性を有していることを明らかにした。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

b 東京都健康安全研究センター

c 東京都島しょ保健所

カンナビノイド受容体に対する機能活性及び吸入曝露試験における生体影響によるカルボキサミド型合成カンナビノイドの評価

シテイ（柿蒂）について：  
HPLCによるベツリン酸、ウルソール酸及びオレアノール酸分析法の検討と市場品及び採取品の分析

石原理恵<sup>a</sup>, 有本恵子<sup>a</sup>, 伊藤美千穂<sup>a</sup>,  
居村克弥<sup>a</sup>, 大井逸輝<sup>a</sup>, 岡坂 衛<sup>a</sup>,  
河端昭子<sup>a</sup>, 酒井英二<sup>a</sup>, 嶋田宏志<sup>a</sup>,  
嶋田康男<sup>a</sup>, 田上貴臣<sup>a,b</sup>, 辻本絵理<sup>a</sup>,  
西尾雅世<sup>a</sup>, 野村涼坪<sup>a</sup>, 松田久司<sup>a</sup>,  
松本卓也<sup>a</sup>, 山本 豊<sup>a</sup>, 横倉胤夫<sup>a</sup>

生薬学雑誌, 75(1), 1-17 (2021)

シテイには、ベツリン酸、ウルソール酸、オレアノール酸などのトリテルペノイドのほか、ステアリン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸、グルコース、フルクトースなどの糖が含まれていることが報告されている。また、シテイ煎じ液中にもベツリン酸、ウルソール酸及びオレアノール酸が含まれていることが報告されている。本研究では、ベツリン酸、ウルソール酸及びオレアノール酸を指標成分として、分析法の検討を行い、品質評価を実施した。

シテイ中のベツリン酸、ウルソール酸及びオレアノール酸含量について、分析バリデーションを実施し、HPLCによる定量法を確立した。今回確立した定量法で分析した結果、市場品の各成分含量（MEAN±SD）は、ベツリン酸 0.214±0.038%、ウルソール酸 0.087±0.052%、オレアノール酸 0.039±0.015%であった。また、これら3成分のうちウルソール酸含量とオレアノール酸含量の間に有意な正の相関関係が認められた（ $p < 0.01$ , 相関係数 0.975）。

a 生薬品質集談会

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課  
Studies on KAKI CALYX

Rapid on-site monitoring of bacteria in freshwater environments using a portable microfluidic counting system

N. YAMAGUCHI<sup>a</sup> and Y. FUJII<sup>b</sup>

Biological and Pharmaceutical Bulletin, 43, 87-92  
(2020)

水辺や親水空間の衛生微生物学的な安全性を確保するためには、細菌モニタリングが重要である。細菌モニタリングを迅速に行うには蛍光染色法が有効であるが、試料の前処理の煩雑さに加え、測定のための試料の運搬時に細菌の生理状態が変化し、結果に影響が及ぶ等の課題がある。そこで、採水地点において細菌数測定を行うオンサイト・モニタリング法を検討した。

検討にあたっては、これまでの研究で作製した幅・深さ数十マイクロメートルの微小流路内で細菌の染色を行うことができるマイクロ流路デバイスと、独自に開発した持ち運び可能な細菌数測定システムを用いた。池の水および河川水中の全細菌数の測定には核酸結合性の蛍光染色剤 SYBR Green II を、生理活性を持つ細菌数の測定にはエステラーゼにより蛍光を発する 6-carboxyfluorescein diacetate を用いた。

マイクロ流路デバイスの微小流路のデザインを改良した結果、各細菌数の測定に要した時間は1時間以内となった。本方法により得られた細菌数は蛍光顕微鏡により求めた細菌数と高い相関があったことから、水環境の衛生微生物学的な評価のための first screening に適していることがわかった。なお、今回の研究では採水地点にポータブル・マイクロ流路システムと発電機を運んだが、電気自動車を用いることにより、システムの運搬と野外での電源供給が容易になるものと考えられた。

Intakes of phthalates by Japanese children and the contribution of indoor air quality in their residences

T. YOSHIDA<sup>a</sup>, M. MIMURA<sup>a</sup> and N. SAKON<sup>b</sup>

Environmental Science and Pollution Research, 27 (16),  
19577–19591 (2020)  
doi.org/10.1007/s11356-020-08397-w

主に樹脂製品に可塑剤として使用されるフタル酸エステル類のいくつかは、内分泌かく乱作用や発がん性を有することが疑われている。本研究では、子どもにおける一日のフタル酸エステル類の摂取量とそれに及ぼす彼らの自宅室内空気質の影響について把握することを目的とした。

大阪府内在住の子どもを対象とし、彼らの寝室内空気中のフタル酸エステル類濃度と起床直後の尿中に排泄されるこれらの代謝物量を調べた。主なフタル酸エステル類の一日の総摂取量(吸入のほか口や皮膚からの吸収量を含めた総量)は以下のとおり算出された。フタル酸ジメチル: 0.15 (μg/kg/d, 中央値)、フタル酸ジエチル: 0.42、フタル酸ジイソブチル: 1.1、フタル酸ジ-*n*-ブチル: 2.2、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル): 6.3。フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)の総摂取量は、対象としたフタル酸エステルのうち最も多く、欧米諸外国の子どもの摂取量よりも多い傾向を示した。また、その95パーセンタイル値は、米国環境保護庁の勧告する参照用量(RfD値, 20 μg/kg/d)を僅かに超過した。フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)は、子どもの健康影響の観点から最も着目すべきフタル酸エステルであることが示唆された。

さらに、推定された各フタル酸エステル類の経気道吸収量(吸入による吸収量)の総吸収量に対する割合(%、中央値)は、フタル酸ジメチル 7.9、フタル酸ジエチル 4.4、フタル酸ジイソブチル 6.6、フタル酸ジ-*n*-ブチル 3.2、フタル酸ベンジルブチル 0.22、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) 1.0であり、在宅中の子どもにおいて、吸入はこれらの吸収経路として大きく寄与しないと考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪大学大学院薬学研究科衛生・微生物学分野  
ポータブル・マイクロ流路システムを用いた淡水環境中の細菌の迅速オンサイト・モニタリング

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微生物部ウイルス課  
子どもにおけるフタル酸エステル類の摂取と住宅室内空気質の寄与

Lowest observed adverse effect level of pulmonary pathological alterations due to nitrous acid exposure in guinea pigs

M. OHYAMA<sup>a</sup>, H. NISHIMURA<sup>b</sup>, K. AZUMA<sup>c</sup>, C. MINEJIMA<sup>d</sup>, N. TAKENAKA<sup>e</sup>, and S. ADACHI<sup>f</sup>

Environmental Health and Preventive Medicine, 25, 56 (2020)

<https://doi.org/10.1186/s12199-020-00895-0>

我々はモルモットやラットに対し3.6 ppmや5.8 ppmの亜硝酸ガス(HONO)を数週間曝露し、肺気腫様変化や動物実験における喘息の影響指標である肺抵抗が亢進することを報告してきた。今回の研究の目的は、モルモットに対するHONOの曝露実験を等比級数的複数濃度で実施し、肺の組織学的検索結果を基にHONOの最小毒性濃度(LOAEL)を決定することにある。

一群5匹の雄のモルモットにHONO(0.0, 0.1, 0.4, 1.7 ppm)を4週間連続曝露し光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡を用い肺の組織学的検索を行った結果、濃度依存的な中心性の肺気腫様変化を観察し、かつ、肺気腫様変化を定量化するalveolar mean linear intercept法により1.7 ppm群の肺気腫様変化が有意であることを認めた。また、有意ではなかったが、濃度依存的な気管支平滑筋の肥厚傾向が観察され、さらに、透過型電子顕微鏡で0.1, 0.4, 1.7 ppm群の肺胞導の間質に0.0 ppm群では観察されない平滑筋細胞を観察した。これらの結果はHONOのLOAELが0.1 ppm以下であることを示唆する。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

c 近畿大学

d 国際基督教大学

e 大阪府立大学

f 相模女子大学

モルモット曝露実験による肺の病理学的変化での亜硝酸の最小毒性濃度

Time series analysis of climate and air pollution factors associated with atmospheric nitrogen dioxide concentration in Japan

T. MIYAMA<sup>a</sup>, H. MATSUI<sup>b</sup>, K. AZUMA<sup>c</sup>, C. MINEJIMA<sup>d</sup>, Y. ITANO<sup>e</sup>, N. TAKENAKA<sup>f</sup>, and M. OHYAMA<sup>g</sup>

International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(24), 9507 (2020)

<https://doi.org/10.3390/ijerph17249507>

自動車排ガスが主要な発生源の大気環境中の二酸化窒素(NO<sub>2</sub>)は、疫学調査で喘息と関連することが報告されている。しかし、NO<sub>2</sub>の測定では亜硝酸(HONO)もNO<sub>2</sub>として検出され、かつ、動物実験ではHONOはNO<sub>2</sub>よりも喘息への影響が強いことが示唆されている。また、HONOとNO<sub>2</sub>は平衡関係(NO<sub>2</sub>+NO+H<sub>2</sub>O⇌2HONO)にあり、この反応は気温低下や湿度上昇でHONO生成を促進する。このとき、NOが減少しHONO生成されることから、NO<sub>2</sub>測定値はNOの減少分が増加する。今回の研究の目的は、日本で最も沿道でのNO<sub>2</sub>濃度が高い自動車排出ガス測定局と対照的な測定局データや気象庁データを用い、どの様な場所の大気中のNO<sub>2</sub>測定値に含まれるHONO割合が高いかを時系列解析により調べることである。2009年4月から2017年3月までの東京、大阪、愛知と山梨の大気環境測定局と気象庁データで解析した結果、各都府県共に気温はNO<sub>2</sub>と負の関連傾向が認められ、気温低下でNO<sub>2</sub>測定値中のHONO割合が増加することが示唆された。相対湿度はNO<sub>2</sub>との関連が各都府県で一貫していないが、山梨では相対湿度がNO<sub>2</sub>と正の関連が認められた。これらの結果は沿道では郊外よりNO<sub>2</sub>測定値は高いが、NO<sub>2</sub>測定値中のHONOの割合は郊外の方が高いことを示唆する。

a 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

c 近畿大学 d 国際基督教大学

e 大阪市立環境科学研究センター

f 大阪府立大学

g 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

日本における大気中の二酸化窒素濃度に関連する気候と大気汚染要因の時系列解析

「ただし書きの運用」による人槽緩和規定の  
事後検証調査

安達史恵<sup>a</sup>, 吉田 仁<sup>a</sup>, 高塚 遼<sup>b</sup>, 光田聖庸<sup>c</sup>,  
長尾綾佳<sup>d</sup>, 土屋 誠<sup>e</sup>,

月刊浄化槽, 535, 4-10 (2020)

大阪府では、処理対象人員算定基準（JIS A 3302-2000）のただし書の適用基準を定め、平成 27 年 4 月 1 日から運用が開始された。そこで、人槽緩和適用基準の妥当性について検討することを目的に、人槽緩和基準により設置された浄化槽について、運用後の浄化槽の使用状況や放流水質に関する調査を平成 29 年および 30 年度に実施し、府域に設置されている浄化槽の法定検査結果との比較を行った。

その結果、現在のところ、人槽緩和により放流水質に影響はでていないと考えられた。また適用条件の異なる 2 市との比較により、大阪府における人槽緩和適用基準に大きな問題点は認められなかった。

一方、人槽緩和による適用実績は、運用開始後の平成 29 年度から令和元年度までに 28 件と多くない。運用実績の伸び悩みの要因として、基準がやや厳しい等の意見があがっている。水使用量の算定方法などを新たに検討することで、実情に見合った基準へと見直しを行うことができれば、より適用しやすくなるものと考えられる。また、本調査のように人槽緩和により設置された浄化槽について、運用後の検証調査を積極的に実施し、放流水質に問題がないことを広く周知することも重要である。本基準を用いて人槽緩和を行い、汲み取りやみなし浄化槽から合併処理浄化槽への転換推進を積極的に勧めることにより、生活環境の保全や公衆衛生のより一層の向上に寄与できるものと考えている。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪府環境管理室事業所指導課

c 大阪府健康医療部生活衛生室環境衛生課

d 大阪府池田保健所（現所属）

e 枚方市保健所

Verification survey with Johkasou after defining standards

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律  
（有害物質含有家庭用品規制法）における  
メタノール、トリクロロエチレン及び  
テトラクロロエチレン試験法改定に係る検討

河上強志<sup>a</sup>, 菅谷なえ子<sup>b</sup>, 田原麻衣子<sup>a</sup>,  
大嶋智子<sup>c</sup>, 西以和貴<sup>d</sup>, 上村 仁<sup>d</sup>, 塩田寛子<sup>c</sup>,  
鈴木郁雄<sup>e</sup>, 田畑佳世<sup>f</sup>, 五十嵐良明<sup>a</sup>

薬学雑誌, 140, 1485-1494 (2020)

昭和 57 年 4 月 1 日に「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（有害物質含有家庭用品規制法）」によって、対象家庭用品中のメタノール含有量を 5 w/w%以下とする基準値が設定された。また、昭和 58 年 10 月 1 日に同法律により、トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレンについて、対象家庭用品中の基準値 0.1 w/w%以下が設定された。これら規制対象物質は規制開始当時から試験法が改正されていない。現在の分析水準に合わせた精度の高い試験法への改正並びに有害な VOCs を含めた一斉分析法の開発が求められている。そこで、同法における試験法改定にむけて、これら 3 種の有害物質及び妨害成分を既知濃度含有したエアゾル製品を作製し、開発した試験法の妥当性を 7 機関で検討した。真度についてトリクロロエチレン及びテトラクロロエチレンの基準値の 1/10 濃度試料で 1 機関のみ 120%をわずかに超えたものの、その他の機関では 70~120%の範囲にあり、各機関における併行精度（RSDr）は 10%を下回り、室間精度（RSDR）も 15%を下回っていた。以上から、本法は改正試験法として有効であると考えられた。

a 国立医薬品食品衛生研究所

b 横浜市衛生研究所

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

d 神奈川県衛生研究所

e 東京都健康安全研究センター

f 堺市衛生研究所

Examination of analytical method for methanol, trichloroethylene, and tetrachloroethylene to revise the official methods based on “Act on the Control of Household Products Containing Harmful Substances”

# 因果推論を用いた酪農生産獣医療における問題指向型実地疫学的研究

三山豪士

Problem-oriented field epidemiological study in dairy production medicine using a causal inference approach

Takeshi Miyama

## I 緒言

疫学研究は持続可能な酪農を営む上で、生産獣医療現場の問題解決に有用な手法である。疫学研究において、ある暴露因子がアウトカムに及ぼす効果を推定する際、疫学者は観測されたデータを取り扱うことが多くある。観測データでは、暴露群と非暴露群間の条件(背景情報)が異なることが多く、これは交絡を引き起こす。因果効果を推定するためには、この交絡因子を特定し、制御することが重要となる。本博士論文では、酪農生産獣医療における問題点についてリスク因子解析を実施し、その方法について考察した。日本における農場レベルの牛レプトスピラ症浸潤状況は予測モデルを用い、ウガンダにおける東海岸熱(East Coast Fever, ECF)、乳房炎制御、飼料給与管理については因果推論を用いて解析した。

## II 日本の酪農場における牛レプトスピラ症浸潤リスク因子

日本の南東北において、*Leptospira* 血清型 Hardjo によって引き起こされる牛レプトスピラ症の浸潤状況の詳細な報告はなかった。本横断研究により有病率が 65.1%(95%CI: 56.2-74.1%)と南東北に広く浸潤していることが明らかにされた。また、牛群規模が大きいこと( $p = 0.004$ )及び北海道に滞在歴のある牛が農場に在籍すること( $p < 0.001$ )が *L. Hardjo* 感染のリスク因子であることが明らかとなった。*L. Hardjo* の陽性農場の集積 (relative risk = 1.87, log likelihood ratio = 9.93, radius = 13.70 km,  $p < 0.01$ ) が、  
大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

大規模農場の密集する研究対象地域の南部に検出された。本研究では、*L. Hardjo* 感染のリスク因子解析に統計的アルゴリズムであるステップワイズ法を用いた。交絡の定量的評価には Change-in-estimate 基準を用いた。

## III ウガンダの酪農場における殺ダニ剤の使用方法がダニ寄生と *Theileria parva* 感染へ及ぼす影響

ECF は高い疾病率と致死率、乳生産量の低下、ダニ対策費用等による経済損失のため問題となる。ウガンダ国ムバララ県での本研究による個体レベルの *T. parva* 感染の有病率は 45.2%(95%CI: 40.4-50.1)、農場レベルでは 83.3%(95%CI: 64.5-93.7) であった。リスク因子解析により、高品質の牛保定用柵場は牛体表のダニ浸潤の防御因子であった (OR: 0.32, 95%CI: 0.15-0.63,  $p = 0.001$ )。質の良い殺ダニ剤保管庫 (OR: 0.36, 95%CI: 0.17-0.76,  $p = 0.008$ ) と殺ダニ剤計測用シリンダー (OR: 0.32, 95%CI: 0.11-0.93,  $p = 0.036$ ) は、*T. parva* 感染の防御因子であった。また、長期間の同系統の殺ダニ剤の使用 (OR: 1.06, 95%CI: 1.01-1.10,  $p = 0.012$ ) と高い使用頻度 (OR: 11.70, 95%CI: 1.95-70.13,  $p = 0.007$ ) は *T. parva* 感染のリスク因子であった。これらの効果は因果推論を用いて定量的に推定された。

## IV ウガンダの酪農場における乳房炎有病率と搾乳方法との関係

酪農において乳房炎は、世界的に最も経済損失の大きい疾病とされている。ウガンダのいくつかの地

域においても潜在性乳房炎 (Subclinical mastitis: SCM)の 高い有病率が報告されているが、酪農集約地域であるムバララ県の SCM の有病率は報告されておらず、また搾乳衛生・手技に関するリスク因子解析の報告はなかった。本研究により高い個体レベルの SCM 有病率 (68.8%, 95%CI: 64.9-72.2%) が認められ、また分離培養検査により伝染性の微生物が優勢であることが明らかにされた。単変数解析において搾乳前の乳頭清拭に一頭一布を利用することと伝染性微生物の検出との間に負の相関が認められた ( $p=0.025$ )。搾乳終盤に牛が落ち着いていることは SCM の防御因子であった (OR: 0.20, 95%CI: 0.05-0.79,  $p=0.021$ )。粗造な乳頭口は SCM のリスク因子であった (OR: 1.75, 95%CI: 1.14-2.68,  $p=0.011$ )。これら効果は因果推論を用いて定量的に推定された。

#### V ウガンダの酪農場における牛群管理が産乳量・潜在性ケトーシスに及ぼす影響

潜在性ケトーシス(Subclinical ketosis: SCK)は産乳性の低下に伴う経済損失を引き起こす。ウガンダの南西部において SCK の有病率と飼料給与管理方法は報告されてこなかった。本研究において、泌乳初期の牛の SCK 有病率は 17.1% (95%CI: 6.6-33.6%)であった。濃厚飼料を給与した牛は、非給与牛に比べて 1.6 倍高い乳量を示した (95%CI: 1.02-2.34,  $p=0.041$ )。輪換放牧を実施した牛は、非実施牛に比べて 1.7 倍高い乳量を示した (95% CI: 1.11-2.51,  $p=0.017$ )。これら効果は因果推論を用いて定量的に推定された。

#### V まとめ

本博士論文は、酪農生産獣医療現場に浸潤している問題について記述し、それらの問題のリスク因子を明らかにした。これらリスク因子解析を実施する目的は二つある。一つは、牛レプトスピラ症の研究で認められたように、興味の対象である目的変数を予測し、どの因子が予測に貢献しているかを概念的に理解することである。二つ目は、仮説の検証を目的とし、暴露因子が目的変数に及ぼす因果効果を、交絡因子を調整することで定量的に推定することである。この方法は ECF、乳房炎制御、飼料給与管理それぞれの研究において採用された。これらの手

法は研究の目的により適切に選択されるべきである。酪農生産獣医療における問題解決は継続したプロセスである。持続可能な酪農業を目指し、生産性の向上と人獣共通感染症を防ぐには、適切な記録をとること、記録のモニタリング、情報の記述 (視覚化)、評価、介入というサイクルを継続的に実施していく必要がある。本博士論文で用いられた手法と構築された根拠は、生産獣医療の多様な問題解決に役立つものとする。

#### 謝 辞

本研究についてご指導を賜りました酪農学園大学大学院獣医学研究科 蒔田浩平教授、村松康和教授、及川伸教授に心より感謝申し上げます。本研究にご協力をいただきました国際協力機構ムバララ県安全な牛乳生産支援プロジェクトの関係者の皆様、山形県農業共済組合の皆様、山形県の酪農家の皆様に深く感謝致します。また、本研究を実施するに当たりご理解とご協力をいただきました大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部の皆様に厚く御礼申し上げます。

(本稿は、著者が酪農学園大学大学院獣医学研究科において 2020 年 3 月 31 日に博士 (獣医学) の学位を授与された際の論文の概要であり、その詳細は以下に掲載されている。)

#### 発表論文

- 1) Miyama T, Watanabe E, Ogata Y, Urushiyama Y, Kawahara N, Makita K. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo infection in dairy herds in the southern Tohoku, Japan. *Preventive Veterinary Medicine* 2018; **149**: 15-20.
- 2) Miyama T, Byaruhanga J, Okamura I, Nagahata H, Murata R, Mwebembezi W, Muramatsu Y, Makita K. Prevalence of sub-clinical mastitis and its association with milking practices in an intensive dairy production region of Uganda. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2020; **82**: 488-493.
- 3) Miyama T, Byaruhanga J, Okamura I, Uchida L, Muramatsu Y, Mwebembezi W, Vudriko P, Makita K. Effect of chemical tick control practices on tick infestation and *Theileria parva* infection in an intensive dairy production region of Uganda. *Ticks*

*and Tick Borne Diseases* 2020; **11**: 101438

- 4) Miyama T, Byaruhanga J, Okamura I, Nakatsuji H, Nakao T, Oikawa S, Mwebembezi W, Makita K. Current dairy herd management practices and their influence on milk yield and subclinical ketosis in an intensive dairy production region of Uganda. *Journal of Veterinary Epidemiology* 2020; **24**: 1-10

# LSR は LKB1-AMPK 経路を介してエネルギーストレス下で 上皮性卵巣癌細胞の細胞生存を促進する

高橋佑介

LSR promotes epithelial ovarian cancer cell survival under energy stress through the LKB1-AMPK pathway

Yusuke Takahashi

## I 概要

我々は最近、新規癌抗原 Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)の高発現が、卵巣癌の予後不良因子であることを報告した。LSR は接着分子の1つだが、がんの進行における役割については不明な点が多い。過去の報告で、LSR の knockout で示されたがん形質は、AMP-activated protein kinase (AMPK)の代謝調節機能の破綻による、エネルギーストレス下での急速な細胞死誘導の結果起こる現象と極めて類似する。AMPK 活性の制御には、接着分子の発現と上流キナーゼ liver kinase B1 (LKB1)の細胞膜への局在が重要な要素であることから、我々は LKB1-AMPK シグナル経路に着目し、がん形質を特徴づける LSR の役割について調べた。

## II 卵巣癌の新規膜抗原 LSR

卵巣癌は初期の段階では自覚症状に乏しく進行して発見されることが少なくない女性性器悪性腫瘍で、年間死亡者数は 4700 人に上る。予後不良な III・IV期の症例に全症例の 40~50%が分布し、III・IV期の 5 年生存率は約 20%と依然低いことから、既存の治療法に代わる新たな分子標的薬の開発が求められている。我々は以前、卵巣癌患者由来の細胞株と正常卵巣上皮細胞株を用いて iTRAQ 試薬を用いたプロテオーム解析により新規膜抗原 Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)を同定

した。さらに、LSR の発現量は卵巣癌患者の生命予後に負に相関することから、LSR が進行性卵巣癌の予後不良因子であることを報告した。

LSR は初め、主に肝臓に発現するリポプロテインレセプターとして同定され、上皮細胞の接着分子 tricellular tight junction protein の1つとしても知られている。Czulkies らは結腸癌患者由来の細胞株 CaCo-2 を用いた xenograft マウスモデルで、CaCo-2 の LSR 発現停止により腫瘍の成長が著しく抑制されることを報告し、我々も、抗 LSR モノクローナル抗体が xenograft マウスモデルでの LSR 高発現卵巣癌細胞および胃癌細胞の成長を著しく抑制することを明らかにした。しかし、Czulkies によると *in vitro* では LSR knock out が CaCo-2 の細胞増殖を招くことから、LSR は特に *in vivo* での腫瘍の成長に不可欠な役割を果たしていると考えられる。一般的に、生体内の腫瘍は、旺盛な成長と未熟な血管形成により不十分な栄養飢餓や酸素不足に陥っており、細胞内 ATP レベルが低下したエネルギーストレス環境に晒されている。これらの現象は、LSR がエネルギーストレス環境下で腫瘍の成長に促進的に働くタンパク質であることを示唆している。

動物細胞は、細胞外環境に適応するため、細胞内 ATP レベルの低下時に AMP-activated protein kinase (AMPK)というセリンスレオニンキナーゼを活性化させ、異化代謝を亢進させることなどにより細胞内 ATP レベルを保持し、酸化ストレスを軽減し急速な細胞死を免れる調節機構を備えている。また最

近、接着分子の1つ E-cadherin の発現が AMPK の上流シグナル因子 liver kinase b1 (LKB1)の細胞膜への局在を促進し、下流の AMPK の効率よい活性化に間接的に関与すると報告された。そこで本研究では、LSR が LKB1-AMPK シグナル伝達を介したエネルギーストレスの軽減に関わり、腫瘍の成長に促進的に働いているという仮説を立て、がんの進行における LSR の役割の一端を明らかにすることとした。

### III LSR と LKB1-AMPK シグナル伝達

卵巣癌でも LSR が生体内での腫瘍の成長に関わることを確かめるため、small hairpin RNA プラスミドベクターを用いて卵巣癌患者由来細胞株 OVISe の LSR 発現抑制クローンを樹立し、ヌードマウス皮下に接種し経目的な腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)と摘出後の腫瘍重量(mg)を計測した(n=5)。対照の腫瘍は接種後 28 日に摘出するまで成長を続けた(506.8 ± 113.3 mm<sup>3</sup>, 267 ± 52 mg)のに対し、2 種類の LSR 発現抑制クローンから形成された腫瘍は一定の大きさ以上には成長せず(114.2 ± 15.9 mm<sup>3</sup>, 23 ± 4 mg; 37.0 ± 22.4 mm<sup>3</sup>, 11 ± 7 mg)、有意に低値を示した(p<0.01)。一方で、*in vitro* における細胞増殖速度に両者で大きな差は認められなかった。さらに、グルコース不含培地や 1% O<sub>2</sub> 環境下での細胞生存率を比較すると、特にグルコース飢餓条件下で LSR 発現抑制クローンの生存率が、対照の生存率より短時間で急激に低下した。これらの結果は、LSR が卵巣癌細胞株 OVISe でも特に生体内でのエネルギーストレス下で腫瘍の成長に促進的に働いていることを示している。

次に、卵巣癌細胞における LSR の発現と AMPK 活性化との関わりを調べるため、グルコース不含培地で培養時の AMPK シグナル経路の活性化を small interference RNA による発現抑制の有無で比較し調べた。OVISe を用いて調べたところ、対照では培地交換 18 時間後をピークにリン酸化 AMPK (Thr172) とその下流のリン酸化 acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Ser79)の発現量が経時的に増加したのに対し、LSR の発現を抑制するとリン酸化 AMPK (Thr172)とリン酸化 ACC (Ser79)の発現量の増加は抑制されていた。また、プラスミドベクターを用いて LSR を発現誘導した SKOV3 細胞株(LSR の発現が低い卵巣癌細胞株)でも LSR の発現と AMPK と ACC の活性

化に正の相関がみられた。一方で、OVISe や SKOV3 を用いて蛍光免疫細胞染色により細胞内の AMPK の上流因子である LKB1 の細胞内局在を調べたところ、LSR の発現と LKB1 の細胞膜への局在に正の相関がみられた。これらの結果は、卵巣癌細胞において LSR が LKB1 の細胞膜への局在を誘導し、エネルギーストレス下での LKB1-AMPK シグナル伝達を支持し、AMPK の活性化を支持する働きがあることを示唆している。

### IV LSR とエネルギーストレス下での細胞死誘導や細胞増殖活性

AMPK の活性化はエネルギーストレスで誘導される細胞内酸化ストレスを軽減し細胞死を抑制することが知られている。実際、LSR の発現を抑制した OVISe 細胞株では、対照に比べ、グルコース不含培地交換 48 時間後まで急激な細胞数の減少を示し、LSR を発現導入した SKOV3 細胞株でも、対照に比べ、グルコース不足による細胞数の急激な低下を軽減する効果が見られた。一方、これらの細胞を用いて栄養豊富な培地での細胞増殖速度を比較したところ、LSR の発現の有無による細胞増殖に差はほとんど認められなかった。

さらに、LSR の発現を抑制し、ヌードマウスの皮下に移植して 7 日後に摘出した腫瘍組織を免疫組織化学染色により解析したところ、対照群(n=3)の腫瘍組織ではリン酸化 AMPK (Thr172)とリン酸化 ACC (Ser79)の発現が増加していたのに対し、LSR 発現抑制した群(n=3)の腫瘍組織ではこれらのタンパク質の増加が見られなかった。連続切片での細胞増殖マーカーKi-67 の発現量も、対照群に比べ、LSR 発現抑制群で低かった。これらの結果は卵巣癌細胞における LSR の発現は、*in vitro* におけるエネルギーストレス下で誘導された細胞死や、*in vivo* における腫瘍組織での増殖活性を抑制する働きがあることを示している。

### V まとめ

我々は新規膜抗原 LSR の卵巣癌の進行に関わる生物学的役割について分子細胞生物学的に解析し、LSR が LKB1-AMPK シグナル伝達を介したエネルギーストレス下での細胞死の誘導を抑制し、生体内での腫瘍の成長に貢献することを明らかにした。本

研究の成果から、LSR が卵巣癌の増殖をもたらすより詳細な機序と、抗 LSR モノクローナル抗体によるがんの増殖抑制効果の機序解明がさらに進むことが期待される。

## 謝 辞

本研究についてご指導を賜りました大阪大学大学院医学系研究科 免疫・感染制御学講座 仲哲治招へい教授、高知大学医学部 免疫難病センター 藤本稔准教授、世良田聡特任准教授、大河原特任助教、大阪大学大学院医学系研究科産科学婦人科学教室 木村正教授、上田豊講師、平松宏祐助教に感謝申し上げます。本研究にご協力をいただきました岐阜大学工学部 化学・生命工学科 竹森洋教授に感謝申し上げます。本研究にご支援いただきました医薬基盤・健康・栄養研究所 免疫シグナルプロジェクト 金澤佑加子様、西理沙様、原田絵美様に感謝申し上げます。本研究や業務についてご理解をいただきました大阪健康安全基盤研究所細菌課の皆様感謝申し上げます。

(本稿は、著者が大阪大学大学院医学系研究科において令和3年3月24日に博士(医学)の学位を授与された際の論文の概要であり、その詳細は以下に掲載されている。)

- 1) Takahashi Y, Serada S, Ohkawara T, Fujimoto M, Hiramatsu K, Ueda Y, Kimura T, Takemori H, Naka T. LSR promotes epithelial ovarian cancer cell survival under energy stress through the LKB1-AMPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021; **537**: 92-99.
- 2) 高橋佑介、平松宏祐、世良田聡、上田豊、木村正、仲哲治 「LSR はエネルギーストレス環境下で LKB1 を介した AMPK の活性化を制御し癌細胞の生存に寄与する」 第 73 回日本産科婦人科学会学術講演会 2021 年 4 月 25 日

編集委員

浅田安紀子  
池森 亮  
井原 隆  
内田耕太郎  
梅川奈央  
○川津健太郎  
白井達哉  
長谷川有紀  
昌山 敦  
三山豪士  
山崎一夫  
(○編集委員長)

査読者

阿久津和彦  
入谷展弘  
改田 厚  
柿本幸子  
小泉義彦  
田上貴臣  
仲谷 正  
永吉晴奈  
西尾孝之  
萩原拓幸  
福井直樹  
昌山 敦  
森 治代  
山口貴弘

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

研究年報 第5号 令和3年度

ISSN 2433-5819

(無断転載禁止)

令和4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