

ISSN 2433-5819

研 究 年 報

令和 4 年度

第 6 号

ANNUAL REPORT
OF
OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.6
(2022)



地方独立行政法人

大阪健康安全基盤研究所

Osaka Institute of Public Health

目 次

報 文

大阪府における 2021 年の感染症発生動向

山中靖貴, 皐月由香, 西田陽子, 柿本健作, 鶴飼友彦, 西尾孝之, 三山豪士, 入谷展弘, 本村和嗣	1
--	---

全ゲノム配列情報に基づく大阪府内の severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 の分子疫学解析

若林友騎, 河原隆二, 柿本健作, 山口貴弘, 梅川奈央, 西嶋駿弥, 森川佐依子, 廣井 聡, 池森 亮, 白井達哉, 阪野文哉, 前田和穂, 岐部亜子, 平井佑治, 岡田和真, 永吉晴奈, 徳永佑亮, 上野 亮, 村野晃一, 北口大毅, 田上貴臣, 安達史恵, 森 治代, 本村和嗣, 小笠原準	9
---	---

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, 森 治代	20
------------	----

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 (2021 年度)

白井達哉, 左近直美, 森 治代	27
------------------	----

SARS-CoV-2 陰性検体からの呼吸器ウイルスの検出 -COVID-19 流行時の呼吸器ウイルスの動向 2020 および 2021 年度-

森川佐依子, 大塚真紀, 廣井 聡, 中田恵子, 加瀬哲男, 森 治代	37
-------------------------------------	----

大阪府における蚊媒介ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2021 年度)

青山幾子, 池森 亮, 横田正春, 弓指孝博	44
------------------------	----

透析-LC/MS 法を用いた食品中の甘味料 7 種類の一斉分析

徳永佑亮, 新矢将尚	52
------------	----

食品中の亜硝酸根検査法の妥当性評価

野村千枝, 栗津 薫, 紀 雅美, 新矢将尚	59
------------------------	----

畜水産物中の有機塩素系農薬分析法の改良と妥当性評価

國頭茉莉, 山口瑞香, 栗津 薫, 永吉晴奈, 福井直樹, 新矢将尚	63
------------------------------------	----

畜産物中のホルモン剤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	70
--	----

大阪市で発生した牛乳の苦情事例について

北口大毅, 岸 映里, 中村実沙子, 昌山 敦, 宮本伊織, 水口智晴, 平田祥太郎, 柿本幸子, 仲谷 正, 尾崎麻子, 高取 聡	75
--	----

フォトダイオードアレイ検出器付き HPLC を用いた牛の多様な食用部分を対象とした抗寄生虫薬一斉分析法の検討

平田祥太郎, 昌山 敦, 仲谷 正, 星 英之, 高取 聡	83
-------------------------------	----

畜水産物中における残留動物用医薬品一斉分析法の検討

昌山 敦, 平田祥太郎, 高取 聡	91
-------------------	----

公衆浴場の浴槽水等における過マンガン酸カリウム消費量および TOC の関係

安達史恵, 小池真生子, 枝川亜希子, 足立伸一	104
--------------------------	-----

水質検査における外部精度管理（2020 年度）—セレンおよびその化合物— 安達史恵, 中島孝江	112
水質検査における外部精度管理（2020 年度）—陰イオン界面活性剤— 安達史恵, 中島孝江	119
水質検査における定量精度に影響を及ぼす因子の解明（2021 年度）—大阪府建築物飲料水水質検査業— 長谷川有紀, 中島孝江, 小泉義彦	129
大阪府における環境および食品中放射能調査（令和 3 年度報告） 小泉義彦, 肥塚利江, 大山正幸, 小池真生子, 山口進康	140
抄 録	
現象的モデル及び機構的モデルを用いた新型コロナウイルス感染症の流行初期における予測（英文） 三山豪士, Sung-mok Jung, 林 克磨, 安齋麻美, 木下 諒, 小林鉄郎, Natalie M. Linton, 鈴木絢子, Yichi Yang, Baoyin Yuan, 茅野大志, Andrei R. Akhmetzhanov, 西浦 博	148
修飾麻疹患者と典型麻疹患者における血液生化学マーカーとウイルス量の関係性（英文） 倉田貴子, 上林大起, 駒野 淳, 本村和嗣	148
大阪府内における麻疹特異的抗体の保有状況と麻疹発生動向 倉田貴子, 上林大起, 森 治代, 本村和嗣	149
回帰分析によって新規構築した変換表に基づく腸管出血性大腸菌血清群 0157, 026, 0111 の反復配列多型解析法（英文） 若林友騎, 原田哲也, 河合高生, 高橋佑介, 梅川奈央, 泉谷秀昌, 川津健太郎	149
鶏肉からの <i>Escherichia albertii</i> 分離のための新規の選択的増菌培地（NCT-mTSB）の提案（英文） 若林友騎, 勢戸和子, 神吉政史, 原田哲也, 川津健太郎	150
日本の食品および食鳥処理場からの <i>Staphylococcus argenteus</i> の分離と分離菌株の性状解析（英文） 若林友騎, 武本康平, 岩崎聡美, 矢嶋朋也, 城戸亜紀子, 山内明子, 黒岩杏子, 熊井優子, 吉原静恵, 徳本勇人, 川津健太郎, 安木真世, 三宅眞実	150
2 成分エンテロトキシン BEC 遺伝子保有ウエルシュ菌の完全ゲノム解析と pCP13 ファミリープラスミドに関する比較ゲノム解析（英文） 上田賢吾, 河原一樹, 木本成美, 山口祐亮, 山田和弘, 沖 大也, 吉田卓也, 松田重輝, 松本悠希, 元岡大祐, 川津健太郎, 飯田哲也, 中村昇太, 大久保忠恭, 余野木伸哉	151
環境水から高頻度に分離された IS1151 プラスミド型エンテロトキシン（CPE）遺伝子保有ウエルシュ菌の人口集中地区への局在 下中晶子, 余野木伸哉, 川津健太郎, 枝川亜希子	151
小児の急性胃腸炎におけるノロウイルス遺伝子型の世界動向（英文） JL CANNON, J BONIFACIO, F BUCARDO, J BUESA, L BRUGGINK, MC CHAN, YM FUMIAN, S GIRI, MD GONZALEZ, J HEWITT, JH LIN, J MANS, C MUÑOZ, CY PAN, XL PANG, C PIETSCH, M RAHMAN, 左近直美, R SELVARANGAN, H BROWNE	152

BARCLAY, J VINJÉ	
感染性胃腸炎の発生動向の変化 左近直美	152
健康ボランティアにおける呼吸器ウイルス感染実態に関する縦断研究 (英文) 森川佐依子, 大塚真紀, 弓指孝博, 本村和嗣	153
1~5 歳の小児における現在のインフルエンザワクチンの有効性に対する過去のインフルエンザワクチン接種の影響 (英文) 松本一寛, 福島若葉, 森川佐依子, 藤岡雅司, 松下 享, 久保田恵巳, 八木由奈, 高崎好生, 進藤静生, 山下裕二, 横山隆人, 清松由美, 廣井 聡, 中田恵子, 前田 章子, 近藤 亨子, 伊藤一弥, 加瀬哲男, 大藤 さとこ, 廣田良夫	153
梅毒トレポネーマ亜種エンデミカムの、成人、特に関西地方の男性とセックスする男性の感染における臨床的観点：症例シリーズでの検討 (英文) 篠原 浩, 古林敬一, 小島洋子, 森 治代, 駒野 淳, 川畑拓也	154
egc2 関連・新型エンテロトキシンの高産生により食中毒事例が発生した (英文) 梅田 薫, 小野久弥, 和田崇之, 元岡大祐, 中村昇太, 中村寛海, 胡東良	154
大阪市立小学校での「生き物さがし」事業により確認された昆虫類 秋田耕佑, 榎元慶子, 中谷憲一, 山崎一夫	155
ホルムアルデヒド処理後の免疫磁気分離法とマイクロ流路を用いた鶏肉中の <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium の迅速定量 (英文) 徳永佑亮, 若林友騎, 余野木伸哉, 齋藤 守, 山口進康	155
赤唐辛子における 5, 6-ジヒドロチミジンおよびチミジンを指標としたガンマ線照射履歴の検知 (英文) 福井直樹, 藤原拓也, 古田雅一, 高取 聡	156
生及び加熱した食肉中の豚肉定量用 ELISA の開発～変性ミオグロビンに対するモノクローナル抗体と SDS による抽出法の組合せ～ (英文) 山崎朋美, 平川由紀, 門間敬子, 山口 (村上) 友貴絵, 琴浦 聡, 三宅司郎, 成田宏史	156
食品中のアフラトキシン定量分析における改良法の妥当性評価 吉光真人, 内田耕太郎, 小阪田正和, 松井啓史, 上野 亮, 藤原拓也, 阿久津和彦, 新矢将尚	157
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	157
自然酸化オリーブ油は、能動皮膚アナフィラキシーおよび Th2 サイトカイン産生を促進する (英文) 荻野泰史, 奥野智史, 村野晃一, 上野 仁	158
下水・下水汚泥処理工程における繊維状マイクロプラスチック (マイクロファイバー) の循環 (英文) 中尾賢志, 秋田耕佑, 尾崎麻子, 榎元慶子, 奥田哲士	158

HPLC を用いた畜水産物を主原料とした加工食品中の残留抗菌性物質分析法の検討 平田祥太郎, 昌山 敦, 仲谷 正, 星 英之, 高取 聡	159
麻痺性貝毒 (PSTs) に毒化されたシジミおよびイガイ中における毒量のマウス試験法および HILIC-MS/MS による分析結果の比較 (英文) 仲谷 正, 昌山 敦, 清田恭平, 角谷直哉, 山口之彦, 山野哲夫	159
抽出・分解反応場として固相を用いた、化粧品中のホルムアルデヒド遊離型防腐剤イミダゾリジニルウレアの定量法開発 (英文) 土井崇広, 武田章弘, 浅田安紀子, 清田恭平, 田上貴臣, 山野哲夫	160
t-Boc メタンフェタミンの、ヒト・ラットマイクロソームおよびラット尿由来代謝物の解析 (英文) 掛橋秀直, 土井崇広, 和田美暁, 鎌田徹, 志摩典明, 三宅亜香里, 新田篤志, 浅井龍太郎, 藤井史保子, 松田駿太郎, 佐々木啓子, 鎌田寛恵, 西岡裕, 三木昭宏, 長谷川潤, 片木宗弘	160
いわゆる健康食品中に含まれていたタダラフィル及びタダラフィル類似物質の立体異性体の測定について 吹譚友秀, 山崎 翠, 高橋和長, 土井崇広, 川口正美, 榎本啓吾, 吉野宏毅, 内本勝也, 西村真紀	161
大阪府内の病院および環境から分離された FRI カルバペネマーゼ産生 <i>Enterobacter</i> spp. の特性解析 (英文) 安達史恵, 関塚剛史, 倭 正也, 福岡京子, 山口進康, 黒田 誠, 河原隆二	161
入浴施設の浴槽に浮かべて使用するゴム製アヒルの微生物汚染とその洗浄方法の検討(英文) 枝川亜希子, 松田宗大, 小倉 徹, 植園健一, 泉山信司, 藤井 明	162
子どもにおける住宅内でのピレスロイド剤の曝露と室内空気質の寄与 (英文) 吉田俊明, 味村真弓, 左近直美	162
子どもにおける住宅内での防虫剤 <i>p</i> -ジクロロベンゼンおよびナフタレンの曝露と室内空気質の寄与 (英文) 吉田俊明, 味村真弓, 左近直美	163
水道水中におけるペルフルオロおよびポリフルオロアルキル化合物の分析法検討 高木総吉, 吉田 仁	163
GC/MS ターゲットスクリーニング分析法の水道原水および浄水への適用 高木総吉, 長谷川有紀, 小池真生子, 吉田 仁, 安達史恵, 山口進康	164
液体クロマトグラフィー質量分析による水道水中の陰イオン 6 種の一斉分析法の検討と妥当性評価 小林憲弘, 高木総吉, 木下輝昭, 仲野富美, 古川浩司, 粕谷智浩, 松巾宗平, 寺中郁夫, 山本 剛, 米久保淳, 田中誠也, 丹羽宏之, 会田祐司, 高原玲華, 齊藤香織, 五十嵐良明	164
大阪府内浄水場の水道原水および浄水中におけるイプフェンカルバゾンの存在実態 長谷川有紀, 小池真生子, 高木総吉, 吉田 仁, 安達史恵, 小泉義彦, 中島孝江, 竹中凜代, 山口進康	165
高度浄水処理による臭化物 (臭化物イオン) およびその消毒副生成物の処理特性	

吉田 仁, 小泉義彦, 高木総吉, 安達史恵, 中島孝江, 長谷川有紀, 小池真生子, 中村美沙希, 孝石 健, 高田裕志, 小田原光弘, 山口進康	165
繊維製品に含まれる防炎加工剤のビス (2, 3-ジブロモプロピル) ホスフェイト及びトリス (2, 3-ジ ブロモプロピル) ホスフェイトの GC-MS 分析法 大嶋智子, 角谷直哉, 山口之彦, 河上強志	166
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) における繊維製 品中防虫加工剤試験法改定に係る検討 西以和貴, 上村 仁, 大嶋智子, 菅谷なえ子, 印南佳織, 田畑佳世, 河上強志	166
医薬品製造施設を想定した室内環境における微小粒子の滞留と換気による除去 味村真弓, 馬場貴志, 和田匡司, 古内正美, 那須正夫	167
学位論文概要	
日本における <i>Staphylococcus argenteus</i> の分布状況調査と分離菌株の性状解析 若林友騎	168

ANNUAL REPORT OF OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

CONTENTS

Original Articles

Surveillance of infectious diseases in Osaka Prefecture in 2021 (in Japanese) Y. YAMANAKA, Y. SATSUKI, Y. NISHIDA, K. KAKIMOTO, T. UKAI, T. NISHIO, T. MIYAMA, N. IRITANI and K. MOTOMURA	1
Whole genome sequencing and molecular epidemiological analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in Osaka (in Japanese) Y. WAKABAYASHI, R. KAWAHARA, K. KAKIMOTO, T. YAMAGUCHI, N. UMEKAWA, S. NISHIJIMA, S. MORIKAWA, S. HIROI, R. IKEMORI, T. SHIRAI, F. BANNO, K. MAEDA, A. KIBE, Y. HIRAI, K. OKADA, H. NAGAYOSHI, Y. TOKUNAGA, R. UENO, K. MURANO, D. KITAGUCHI, T. TAGAMI, F. ADACHI, H. MORI, K. MOTOMURA and J. OGASAWARA	9
Epidemic situation and molecular-epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2021 Report) (in Japanese) K. NAKATA and H. MORI	20
The epidemic and molecular epidemiological analysis of norovirus outbreaks in cases of food poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2021 report) (in Japanese) T. SHIRAI, N. SAKON and H. MORI	27
Detection of respiratory viruses in SARS-CoV-2 negative specimens -Respiratory virus trends during the COVID-19 epidemic 2020 and 2021- (in Japanese) S. MORIKAWA, M. OTSUKA, S. HIROI, K. NAKATA, T. KASE and H. MORI	37
Mosquito-Borne Virus Surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2021 Report) (in Japanese) I. AOYAMA, R. IKEMORI, M. YOKOTA and T. YUMISASHI	44
Simultaneous analysis of seven artificial sweeteners in foods by dialysis and LC/MS (in Japanese) Y. TOKUNAGA and M. SHINYA	52

Results of validity study of a nitrite inspection method for food (in Japanese) C. NOMURA, K. AWAZU, M. KI and M. SHINYA	59
Improvement and validation of a method for the analysis of organochlorine pesticides in livestock and fishery products by GC-MS/MS (in Japanese) M. KUNITOU, M. YAMAGUCHI, K. AWAZU, H. NAGAYOSHI, N. FUKUI and M. SHINYA	63
Validation study of an analytical method for the detection of hormones in livestock products (in Japanese) M. YAMAGUCHI, K. AWAZU, I. SHIRAKAWA, H. NAGAYOSHI, C. NOMURA, N. FUKUI and M. SHINYA	70
Complaint Case Report on Milk in Osaka City (in Japanese) D. KITAGUCHI, E. KISHI, M. NAKAMURA, A. MASAYAMA, I. MIYAMOTO, C. MIZUGUCHI, S. HIRATA, S. KAKIMOTO, T. NAKATANI, A. OZAKI and S. TAKATORI	75
Simultaneous determination of residual anthelmintics in cattle livestock products using HPLC with a photo-diode array detector (in Japanese) S. HIRATA, A. MASAYAMA, T. NAKATANI, H. HOSHI and S. TAKATORI	83
Simultaneous analysis of veterinary drugs in seafood, livestock products and milk (in Japanese) A. MASAYAMA, S. HIRATA and S. TAKATORI	91
Relationship between potassium permanganate consumption and TOC in bath water from public bathhouses (in Japanese) F. ADACHI, M. KOIKE, A. EDAGAWA and S. ADACHI	104
Results of external quality control for the analytical method for the measurement of selenium in tap water, performed in Osaka Prefecture in 2020 (in Japanese) F. ADACHI and T. NAKAJIMA	112
Results of external quality control for the analytical method for the measurement anionic surfactant in tap water, performed in Osaka Prefecture in 2020 (in Japanese) F. ADACHI and T. NAKAJIMA	119
Elucidation of factors affecting quantitative accuracy in water quality measurements, performed in Osaka Prefecture in 2021 (in Japanese) Y. HASEGAWA, T. NAKAJIMA and Y. KOIZUMI	129
Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2021 Report) (in Japanese) Y. KOIZUMI, T. HIZUKA, M. OHYAMA, M. KOIKE and N. YAMAGUCHI	140
Abstracts	
Phenomenological and mechanistic models for predicting early transmission data of COVID-19 T. MIYAMA, SM. JUNG, K. HAYASHI, A. ANZAI, R. KINOSHITA, T. KOBAYASHI, NM. LINTON, A. SUZUKI, Y. YANG, B. YUAN, T. KAYANO, AR. AKHMETZHANOV and H. NISHIURA	148
Relationship between biochemical markers and measles viral load in patients with immunologically naive cases and secondary vaccine failure T. KURATA, D. KANBAYASHI, J. KOMANO and K. MOTOMURA	148
Measles epidemiology and seroprevalence in Osaka prefecture (in Japanese) T. KURATA, D. KANBAYASHI, H. MORI and K. MOTOMURA	149

Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> serogroups O157, O26, and O111 based on a <i>de novo</i> look-up table constructed by regression analysis Y. WAKABAYASHI, T. HARADA, T. KAWAI, Y. TAKAHASHI, N. UMEKAWA, H. IZUMIYA, and K. KAWATSU · · · · ·	149
Proposal of a novel selective enrichment broth, NCT-mTSB, for isolation of <i>Escherichia albertii</i> from poultry samples Y. WAKABAYASHI, K. SETO, M. KANKI, T. HARADA and K. KAWATSU · · · ·	150
Isolation and characterization of <i>Staphylococcus argenteus</i> strains from retail foods and slaughterhouses in Japan Y. WAKABAYASHI, K. TAKEMOTO, S. IWASAKI, T. YAJIMA, A. KIDO, A. YAMAUCHI, K. KUROIWA, Y. KUMAI, S. YOSHIHARA, H. TOKUMOTO, K. KAWATSU, M. YASUGI and M. MIYAKE · · · · ·	150
Analysis of the complete genome sequences of <i>Clostridium perfringens</i> strains harbouring the binary enterotoxin BEC gene and comparative genomics of pCP13-like family plasmids K. UEDA, K. KAWAHARA, N. KIMOTO, Y. YAMAGUCHI, K. YAMADA, H. OKI, T. YOSHIDA, S. MATSUDA, Y. MATSUMOTO, D. MOTOOKA, K. KAWATSU, T. IIDA, S. NAKAMURA, T. OHKUBO and S. YONOGI · · · · ·	151
IS1151-cpe-positive <i>Clostridium perfringens</i> frequently isolated from environmental surface water samples and localized in urban areas in Osaka, Japan (in Japanese) A. SHIMONAKA, S. YONOGI, K. KAWATSU and A. EDAGAWA · · · · ·	151
Global trends in norovirus genotype distribution among children with acute gastroenteritis JL CANNON, J BONIFACIO, F BUCARDO, J BUESA, L BRUGGINK, MC CHAN, YM FUMIAN, S GIRI, MD GONZALEZ, J HEWITT, JH LIN, J MANS, C MUÑOZ, CY PAN, XL PANG, C PIETSCH, M RAHMAN, N SAKON, R SELVARANGAN, H BROWNE, L BARCLAY and J VINJÉ · · · · ·	152
Impact of COVID-19 on infectious gastroenteritis (in Japanese) N. SAKON · · · · ·	152
A longitudinal study on respiratory viral infection for healthy volunteers S. MORIKAWA, M. OTSUKA, T. YUMISASHI and K. MOTOMURA · · · · ·	153
Influence of prior Influenza vaccination on current Influenza vaccine effectiveness in children aged 1 to 5 years K. MATSUMOTO, W. FUKUSHIMA, S. MORIKAWA, M. FUJIOKA, T. MATSUSHITA, M. KUBOTA, Y. YAGI, Y. TAKASAKI, S. SHINDO, Y. YAMASHITA, T. YOKOYAMA, Y. KIYOMATSU, S. HIROI, K. NAKATA, A. MAEDA, K. KONDO, K. ITO, T. KASE, S. OHFUJI and Y. HIROTA · · · · ·	153
Clinical perspectives of <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>Endemicum</i> infection in adults, particularly men who have sex with men in the Kansai area, Japan: A case series K. SHINOHARA, K. FURUBAYASHI, Y. KOJIMA, H. MORI, J. KOMANO and T. KAWAHATA · · · · ·	154
High production of <i>egc2</i> -related staphylococcal enterotoxins caused a food poisoning outbreak K. UMEDA, HK. ONO, T. WADA, D. MOTOOKA, S. NAKAMURA, H. NAKAMURA and DL. HU · · · · ·	154
Insect fauna found by the environmental education program of biodiversity at elementary schools in Osaka City (in Japanese) K. AKITA, K. MASUMOTO, K. NAKATANI and K. YAMAZAKI · · · · ·	155
Microfluidic rapid quantification of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium collected from chicken meat using immunomagnetic separation after formaldehyde treatment Y. TOKUNAGA, Y. WAKABAYASHI, S. YONOGI, M. SAITO and N. YAMAGUCHI ·	155

Detection of gamma-irradiated red peppers using a combination of 5,6-dihydrothymidine and thymidine as irradiation indicator N. FUKUI, T. FUJIWARA, M. FURUTA and S. TAKATORI	156
Enzyme-linked immunosorbent assay for pork determination in raw and heated meats: combination of monoclonal antibodies to denatured porcine myoglobin and sodium dodecyl sulfate extraction T. YAMASAKI, Y. HIRAKAWA, K. MOMMA, Y. MURAKAMI-YAMAGUCHI, S. KOTOURA, S. MIYAKE and H. NARITA	156
Validation study on an improved quantitative method for aflatoxins in foods (in Japanese) M. YOSHIMITSU, K. UCHIDA, M. OSAKADA, H. MATSUI, R. UENO, T. FUJIWARA, K. AKUTSU and M. SHINYA	157
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	157
Naturally oxidized olive oil promotes active cutaneous anaphylaxis and Th2 cytokine production H. OGINO, T. OKUNO, K. MURANO and H. UENO	158
Circulation of fibrous microplastic (microfiber) in sewage and sewage sludge treatment processes S. NAKAO, K. AKITA, A. OZAKI, K. MASUMOTO and T. OKUDA	158
Determination of residual antibacterial substances in processed foods manufactured from livestock and marine products using HPLC (in Japanese) S. HIRATA, A. MASAYAMA, T. NAKATANI, H. HOSHI and S. TAKATORI	159
Comparison between mouse bioassay and HILIC-MS/MS for quantification of paralytic shellfish toxin in Japanese basket clams and mussels caught off coastal Osaka Bay in Japan T. NAKATANI, A. MASAYAMA, K. KIYOTA, N. KAKUTANI, Y. YAMAGUCHI and T. YAMANO	159
The development of dual-function solid-phase method as extraction and a decomposition reaction media for the determination of a formaldehyde releaser, imidazolidinyl urea, in cosmetics T. DOI, A. TAKEDA, A. ASADA, K. KIYOTA, T. TAGAMI and T. YAMANO	160
Human and rat microsomal metabolites of N-tert-butoxycarbonylmethamphetamine and its urinary metabolites in rat H. KAKEHASHI, T. DOI, M. WADA, T. KAMATA, N. SHIMA, A. MIYAKE, A. NITTA, R. ASAI, S. FUJII, S. MATSUTA, K. SASAKI, H. KAMATA, H. NISHIOKA, A. MIKI, H. HASEGAWA and M. KATAGI	160
The configuration of tadalafil and tadalafil analogues found in dietary supplements (in Japanese) T. FUKIWAKE, M. YAMAZAKI, K. TAKAHASHI, T. DOI, M. KAWAGUCHI, K. ENOMOTO, H. YOSHINO, K. UCHIMOTO and M. NISHIMURA	161
Characterization of FRI carbapenemase-producing <i>Enterobacter</i> spp. isolated from a hospital and the environment in Osaka, Japan F. ADACHI, T. SEKIZUKA, M. YAMATO, K. FUKUOKA, N. YAMAGUCHI, M. KURODA and R. KAWAHARA	161
Microbial contamination of rubber ducks floating in bathtubs of bathing facilities, and an evaluation of their washing methods A. EDAGAWA, N. MATSUDA, T. OGURA, K. UEZONO, S. IZUMIYAMA and A. FUJII	162
Estimating household exposure to pyrethroids and the relative contribution of inhalation pathway in a sample of Japanese children	

T. YOSHIDA, M. MIMURA and N. SAKON • • • • •	162
Estimating household exposure to moth repellents <i>p</i> -dichlorobenzene and naphthalene and the relative contribution of inhalation pathway in a sample of Japanese children T. YOSHIDA, M. MIMURA and N. SAKON • • • • •	163
Development of analytical method for per- and polyfluoroalkyl substances in drinking water (in Japanese) S. TAKAGI and J. YOSHIDA • • • • •	163
Application of GC-MS target screening analysis for raw and drinking water samples (in Japanese) S. TAKAGI, Y. HASEGAWA, M. KOIKE, J. YOSHIDA, F. ADACHI and N. YAMAGUCHI • • • • •	164
Development and validation of a simultaneous analytical method for six anions in drinking water by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) (in Japanese) N. KOBAYASHI, S. TAKAGI, T. KINOSHITA, F. NAKANO, K. FURUKAWA, T. KASUYA, S. MATSUHABA, I. TERANAKA, T. YAMAMOTO, J. YONEKUBO, S. TANAKA, H. NIWA, Y. AITA, R. TAKAHARA, K. SAITO and Y. IKARASHI • • • •	111 164
Ipfencarbazone in raw and finished water at water purification plants in the Osaka Prefecture (in Japanese) Y. HASEGAWA, M. KOIKE, S. TAKAGI, J. YOSHIDA, F. ADACHI Y. KOIZUMI, T. NAKAJIMA, T. TAKENAKA and N. YAMAGUCHI • • • • •	165
Advanced water treatment for the removal of bromide ions and associated disinfection by-products (in Japanese) J. YOSHIDA, Y. KOIZUMI, S. TAKAGI, F. ADACHI, T. NAKAJIMA, Y. HASEGAWA, M. KOIKE, M. NAKAMURA, K. KOUSEKI, Y. TAKADA, M. ODAWARA and N. YAMAGUCHI • • • • •	165
Analysis of flame retardants bis (2, 3-dibromopropyl) phosphate and tris (2,3-dibromopropyl) phosphate in textile products by GC-MS (in Japanese) T. OOSHIMA, N. KAKUTANI, Y. YAMAGUCHI and T. KAWAKAMI • • • • •	166
Examination of analytical method for mothproofing agents to revise the official methods based on "Act on the control of household products containing harmful substances" (in Japanese) I. NISHI, H. UEMURA, T. OOSHIMA, N. SUGAYA, K. INNAMI, K. TABATA and T. KAWAKAMI • • • • •	166
Suspension of fine particles in air and their removal by ventilation in an Indoor environment as a model of a pharmaceutical manufacturing facility (in Japanese) M. MIMURA, T. BABA, M. WADA, M. FURUUCHI and M. NASU • • • • •	167
Thesis summary Isolation and characterization of <i>Staphylococcus argenteus</i> strains in Japan Y. WAKABAYASHI • • • • •	168

大阪府における 2021 年の感染症発生動向

山中靖貴^a, 皐月由香^a, 西田陽子^a, 柿本健作^a, 鶴飼友彦^a,
西尾孝之^a, 三山豪士^b, 入谷展弘^a, 本村和嗣^c

新型コロナウイルス感染症が世界中で流行している中で、わが国では、感染拡大防止に向けて、緊急事態宣言等が発出され、人々の行動制限ないし自粛が図られた。ワクチン 3 回接種率の上昇に伴い、新規陽性者数は徐々に落ち着きつつあり、コロナ禍における行動制限や感染予防対策の緩和措置が段階的に講じられている。その中で、2020、2021 年、大阪府における定点把握感染症の発生動向について検討した。定点把握感染症のうち、多くの感染症でその報告数が 2020 年と比べて 2021 年は少なくなった、または変化がなかった一方で、RS ウイルス感染症、感染性胃腸炎及び手足口病は報告数が大きく増加した。行動緩和措置が進む中で、他の感染症の動向にも変化が認められており、今後も、その発生動向に注視する必要がある。

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、2021 年、RS ウイルス感染症、感染性胃腸炎、手足口病

感染症発生動向調査は¹⁾、1981 年から開始され、1999 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）による施策として位置付けられた調査である。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蔓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・実施することである。

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²⁾。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は、2019 年 12 月に中華人民共和国湖北省武漢市にて確認され、2020 年 3 月 11 日に、世界保健機関 (WHO) は、世界的大流行（パンデミック）と宣言した。新型コロナウイルス感染症は、飛沫、エアロゾル、接触により感染するため、その感染防止対策として、国内では、マスク着用、身体的距離の確保、手洗い・手指消毒、三密（密閉、密集、密接）を避ける等の「新しい生活様式」の実践が求められている。また、緊急事態宣言・まん延防止等重点措置や渡航制限措置により、人々の行動制限や自粛が図られた。このような経緯の中で、2020 年は大阪府のみならず国内外で、新型コロナウイルス感染症以外の感染症の報告数が減

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 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部疫学解析研究課

c 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部

少するなど例年と異なる傾向が認められた^{2,4)}。一方で、2021年2月に新型コロナワクチンが国内で初めて特例承認され、ワクチン接種が進み、また、治療用モノクローナル抗体、抗ウイルス薬が開発・承認された。今後は、感染拡大を防止しながら、社会経済活動を両立する取組みが進むと予想される。

2021年の大阪府における新型コロナウイルス感染症の新規陽性者数について、第4波が第1週（1月4日～10日）、第5波が第17週（4月26日～5月2日）及び第6波は第34週（8月23日～29日）にそれぞれピークに達した（図1）^{5,6)}。2021年に大阪府では3度の緊急事態宣言が発令され、大阪府新型コロナ警戒信号（大阪モデル）の赤信号も2度点灯した。また、9月26日時点で、大阪府のワクチン2回接種率が12歳以上人口で53.1%、11月21日時点で79.3%に達した^{7,8)}。

我々は、コロナ禍における2020年の大阪府及び全国の感染症発生動向を調査しており²⁾、2021年の大阪府における感染症の発生動向について、新型コロナウイルス感染症流行以前の過去5年（2015～2019年）および2020年と比較検討した。

方 法

調査期間は2015年から2021年までとして、2015～2019年の過去5年間の過去5年間を平年とした。

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のうち、小児科定点・インフルエンザ定点・眼科定点疾患（小児科・インフルエンザ・眼科定点）とした。

NESIDより大阪府における各年の感染症報告数情報を収集した。NESIDの感染症報告数情報には、週別の報告者数と定点あたり報告者数（週別の報告者数を定点数で除したもの）が含まれる。各年の週別定点あたり報告数の合計を年別の定点あたり報告数とし解析に用いた。各感染症における平年の年別定点あたり報告数の平均〔average、Avg（本稿では平年 Avg と称す）〕及びその標準偏差（standard deviation、SD）を算出した。2020、2021年の報告数と平年 Avg を比較して、表1の通り分類するとともに、定点あたり報告数について、週ごとの傾向を確認し、コロナ禍における感染症発生動向について検討した。

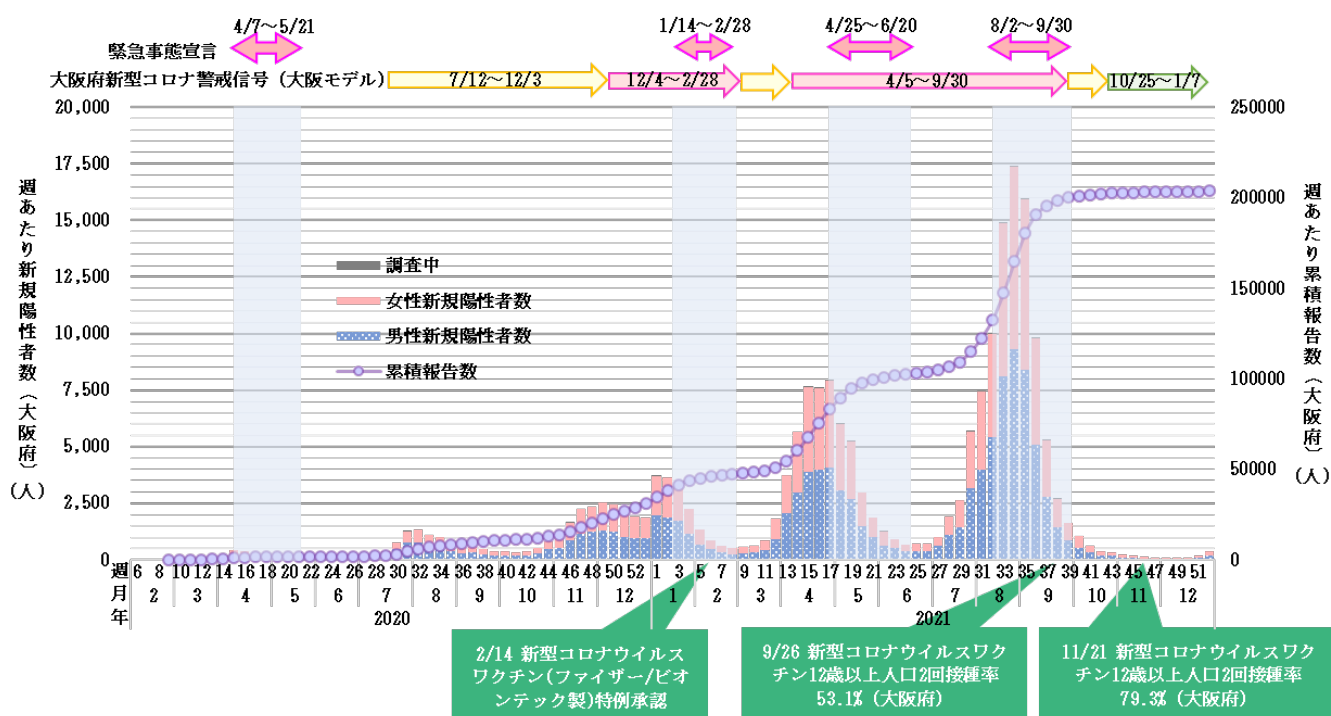


図1 大阪府における新型コロナウイルス感染症週別新規陽性者数・累積数とワクチン接種状況
（大阪府感染症情報センター 新型コロナウイルス感染症 <http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/disease/corona.html> を改変）

表1 2020、2021年の報告数と平年との比較表現

2020、2021年の累積報告数	平年との比較
平年 Avg ^{*1} +3SD ^{*2} 以上	多い (+++)
平年 Avg+2SD 以上	多い (++)
平年 Avg+3SD 未満	
平年 Avg+SD 以上	多い (+)
平年 Avg+2SD 未満	
平年 Avg-SD 以上	平年並み
平年 Avg+SD 未満	
平年 Avg-2SD 以上	少ない (-)
平年 Avg-SD 未満	
平年 Avg-3SD 以上	少ない (--)
平年 Avg-2SD 未満	
平年 Avg-3SD 未満	少ない (---)

*¹2015～2019 年までの年別定点あたり報告数の平均 [average、Avg (本稿では平年 Avg と称す)]

*²2015～2019 年までの年別定点あたり報告数の標準偏差 (standard deviation、SD)

結 果

2020、2021 年の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を表 2 に示した。

2020、2021 年について小児科・インフルエンザ・眼科定点に指定された大阪府の医療機関からの報告数の総計はそれぞれ88,662、76,119 例であり、2021 年は 2020 年と比較して 14.1%減少していた。しかしながら、RS ウイルス感染症、感染性胃腸炎及び手足口病の累積報告数については、2020 年よりも 2021 年は増加した (図 2)。特に RS ウイルス感染症は、平年と比べても大幅に増加し、大阪府において過去 10 年で最多の報告数が確認された⁹⁾。定点あたり報告数は、2015～2019 年において第 29～41 週 (7～10 月) で 1 を超えるようになり、第 35～49 週 (8 月～12 月) でピークに到達する傾向であった^{9,10)}。一方、2021 年は、第 10 週 (3 月 8 日～14 日) で 1 を超え、第 21 週 (5 月 24 日～30 日) でピークに到達した (図 3-1)。特に、2021 年第 21 週の 5.05 は、2012～2020 年で最大であった 2019 年第 37 週 (9 月 9 日～15 日) の 4.55 より増加した。

感染性胃腸炎について、報告数のピークは、平年の流行年と同様に 2021 年も第 50～52 週 (12 月) であった (図 3-2)¹¹⁾。2021 年の定点あたり累積報告数は、平年と比べ少ないが、2021 年の第 50～52 週

表2 2020、2021 年の大阪府における定点把握感染症の年別定点あたり報告数及び平年との比較

感染症		Avg	SD	2020年	平年と2020年の比較*	2021年	平年と2021年の比較
小児科・インフルエンザ	インフルエンザ	272.70	60.49	143.69	少ない(---)	0.32	少ない(---)
	R S ウイルス感染症	53.87	7.81	5.76	少ない(---)	81.93	多い(+++)
	咽頭結膜熱	25.66	1.31	10.45	少ない(---)	11.41	少ない(---)
	A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎	110.89	3.93	47.89	少ない(---)	24.77	少ない(---)
	感染性胃腸炎	304.24	42.55	120.88	少ない(---)	190.58	少ない(--)
	水痘	21.10	4.16	9.06	少ない(--)	4.90	少ない(---)
	手足口病	78.84	55.87	3.17	少ない(-)	40.06	平年並み
	伝染性紅斑	16.57	13.67	3.85	平年並み	0.57	少ない(-)
	突発性発しん	23.43	2.87	19.43	少ない(-)	16.87	少ない(--)
	ヘルパンギーナ	29.87	7.42	7.93	少ない(--)	12.84	少ない(--)
	流行性耳下腺炎	25.39	27.73	2.85	平年並み	2.44	平年並み
眼科	急性出血性結膜炎	0.71	0.19	0.22	少ない(--)	0.29	少ない(--)
	流行性角結膜炎	22.57	4.38	7.04	少ない(---)	5.42	少ない(---)

*平年との比較は、表1に従い分類した。

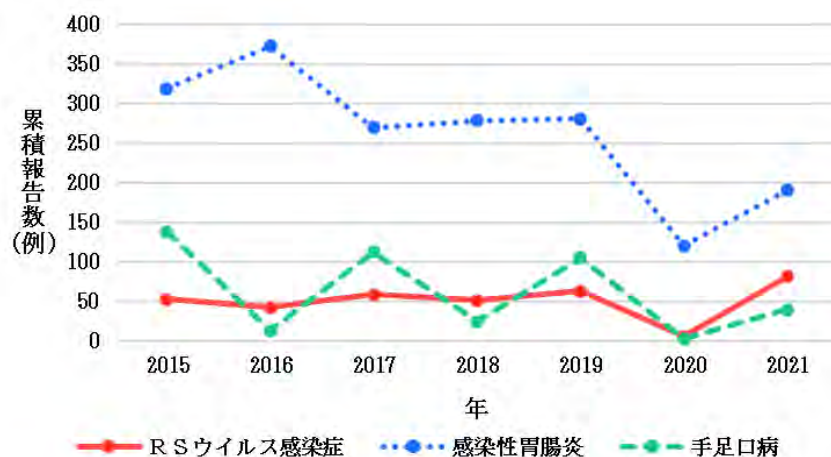


図2 2015～2021年大阪府におけるRSウイルス感染症、感染性胃腸炎及び手足口病の年別累積報告数の推移

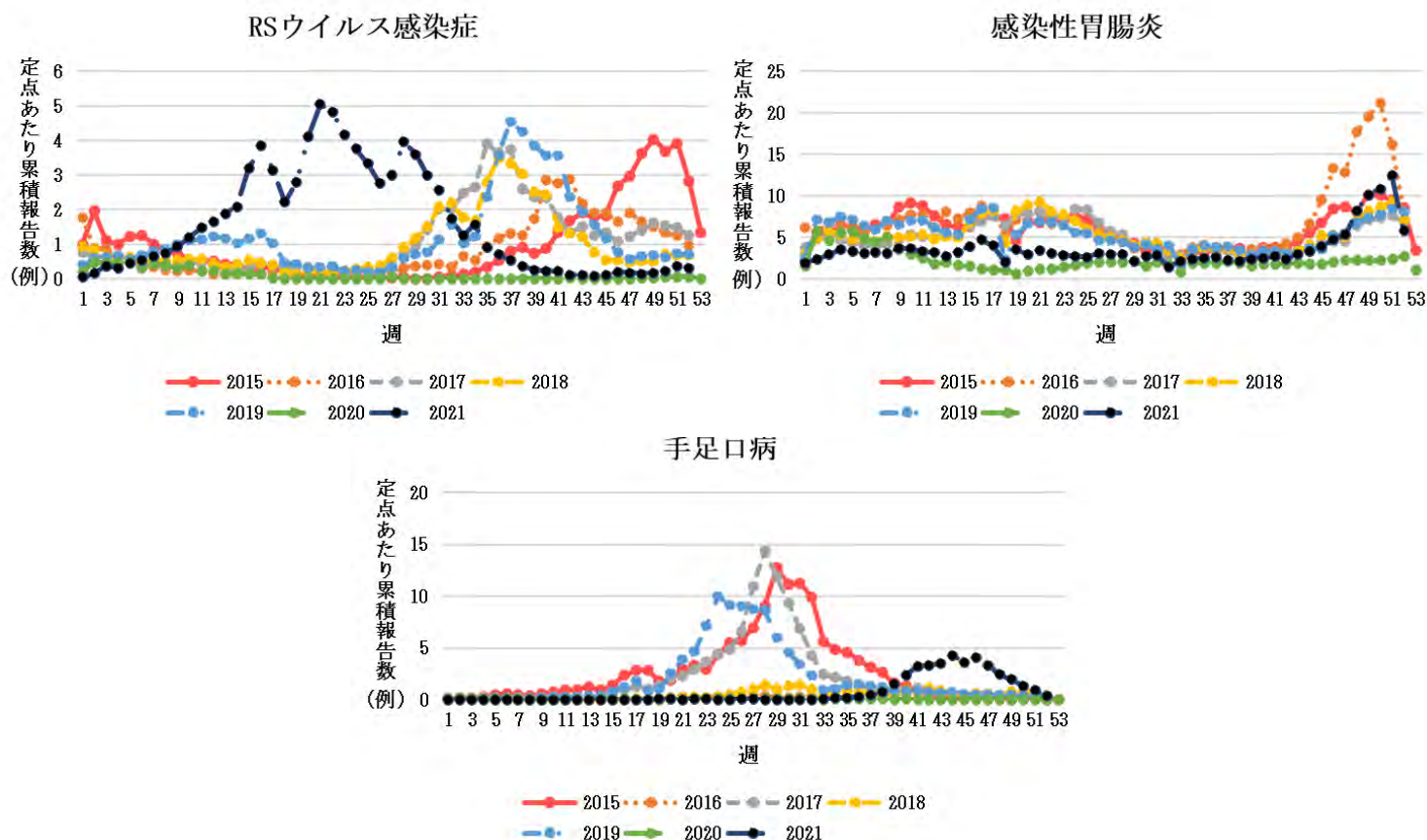


図3 2015～2021年大阪府におけるRSウイルス感染症(図3-1)、感染性胃腸炎(図3-2)及び手足口病(図3-3)の週別定点あたり報告数の推移

の定点あたり報告数は、ノロウイルス Group II の2型 (GII.2) 新変異株による流行が起きた2016年¹²⁾に次ぐ報告数となった(表2、図3-2)¹¹⁾。

手足口病については、流行年であった2015、2017及び2019年において、第15～17週(4月)で1を

超えるようになり、第24～29週(6月～7月)でいずれも5以上となり、ピークに到達する傾向であった。一方2021年は、第39週(9月27日～10月3日)で1を超えるようになり、第44週(11月1日～11月7日)で4.27となりピークに到達した(図

3-3) ¹³⁾。

インフルエンザ、水痘、伝染性紅斑及び突発性発しんは 2021 年の方が少なくなった。その他は 2020 年と 2021 年で大きな変化がなかった(表 2)。なお、インフルエンザについては、2019/20 シーズンの流行として、2020 年第 1～5 週(1 月)と第 6～9 週(2 月)の累積報告数がそれぞれ 26,042 例、13,259 例であったが、2020/21 および 2021/22 シーズンは流行が認められなかった。

考 察

新型コロナウイルス感染症が流行している中で、大阪府における定点把握感染症の小児科・インフルエンザ・眼科定点からの報告数は 2020 年に引き続き 2021 年も減少したが、RS ウイルス感染症、感染性胃腸炎及び手足口病の累積報告数は大きく増加した。

RS ウイルス感染症は、生後 1 歳までに 50%以上が、2 歳までにほぼ 100%の人が RS ウイルスに感染する ¹⁴⁾。大阪府における 0～5 歳児の年齢別感染者割合について、平年、2020 年と比べて 2021 年は 0 歳の占める割合は減少し、2～5 歳の各割合は増加し、1 歳は大きな変化がなかった(図 4)。また、全国においても大阪府と同様に 2021 年第 1～29 週で、0 歳の占める割合が減少し、2、3 及び 4 歳以上の各

割合が増加した ¹⁵⁾。2020 年に新型コロナウイルス感染症の感染防止対策が徹底されたことに加えて、全国的に保育園・保育所等の休園が増加し ¹⁶⁾、子供の人との接触機会が減少したことで、その当時 1～4 歳の年齢であった子供の感染者が減少したと考えられる。また 2021 年も、2020 年と同様の理由で子供の接触機会は減少していると考えられるが、流行が生じた。これは 2020 年から 2021 年に感染が持ち越されたことで感受性個体数が大きく増加した影響が接触機会減少による影響より上回ったことが原因ではないかと推察される。また江川らは、2021 年大阪府で認められた RS ウイルスの遺伝子型が、近年国内で優勢を示す型であったことを報告しており、RS ウイルス感受性者の蓄積は、季節的流行を認める従来の遺伝子型の RS ウイルスが季節に関わりなく流行する原因になりうる と述べている ¹⁷⁾。

2021 年の感染性胃腸炎については、平年の同時期に報告数の増加が認められた。緊急事態宣言及び大阪モデル赤信号の解除により、秋～冬にかけての人流抑制緩和措置がとられ、人々の活動が活発になったことが、感染性胃腸炎の秋～冬の報告数が増加した一因と考えられる。

手足口病については、平年では 2015、2017 及び 2019 年の隔年おきにコクサッキーウイルス A6 (Coxsackievirus A6: CA6) が主な原因となり ^{18,19)}、夏に流行した ²⁰⁾。2021 年もこれまでの傾向と同様に

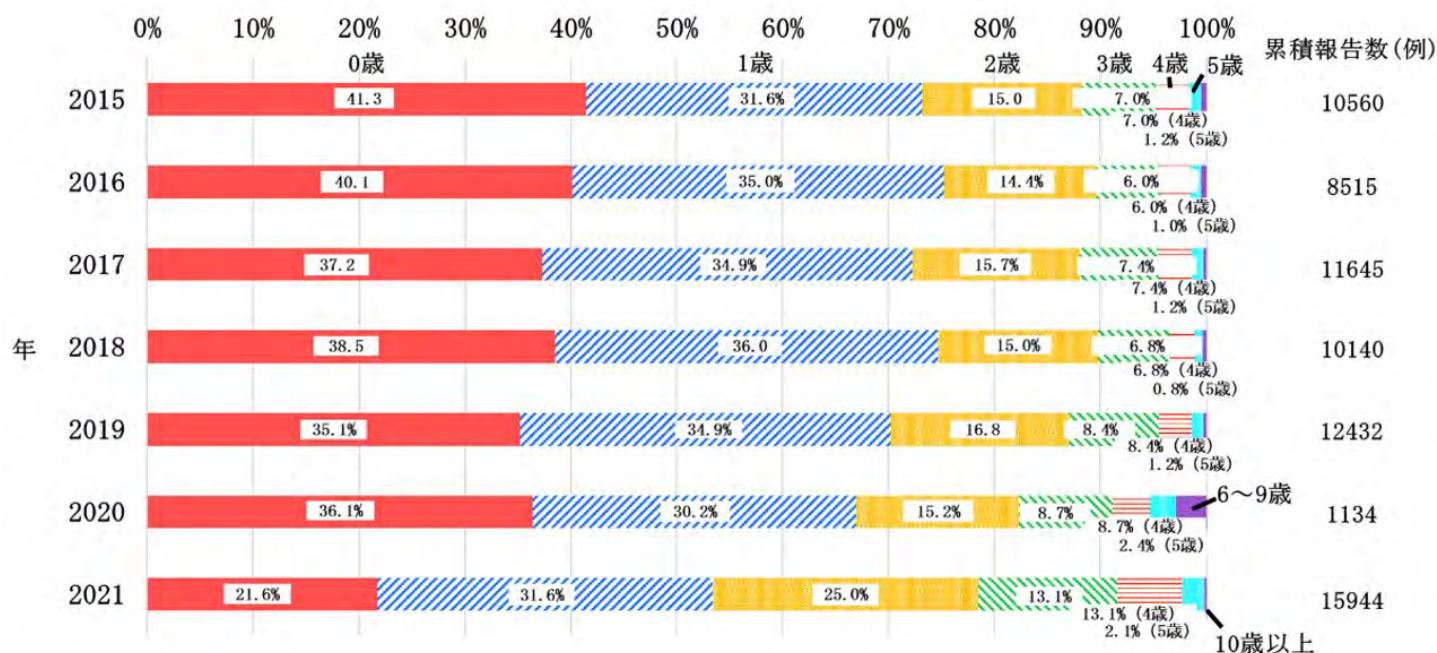


図 4 2015～2021 年大阪府における RS ウイルス感染症の年齢階級別発生状況

CA6 による流行が確認されたが²¹⁾、過去と異なり、秋～冬にかけて流行した。原因の1つとして、感染性胃腸炎と同様に、秋以降からの人流抑制の緩和措置が影響したのではないかと考えられた。

2020 年と比較した 2021 年の報告数について、変化がなかった、または少なくなった感染症は、インフルエンザ、咽頭結膜熱、A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎、伝染性紅斑、ヘルパンギーナ、流行性耳下腺炎、急性出血性結膜炎、流行性角結膜炎があげられる。これらの感染症の感染経路は飛沫、接触または経口であるため、既報の通り、行動様式の変化、感染予防対策、渡航制限による影響を受けたと考えられた²⁾。またこれらの感染症について、感受性個体数が増加していると考えられるが、流行が起きなかった詳細な原因は不明であった。

水痘については 2020 年に引き続き 2021 年も少なくなっており、新型コロナウイルス感染症対策に加えて、2014 年に定められたワクチン定期接種による効果と考えられる²²⁾。

総 括

コロナ禍では、報告数及び流行時期が平年と異なる挙動を示す感染症が確認されており、今後も新型コロナウイルス感染症対策と社会経済活動の両立が進む中で、個々の感染症発生動向に注視する必要があると考えられた。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、大阪府感染症発生動向調査にご協力いただきました自治体、保健所等の関係機関及び医療機関の皆様に深謝申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 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/0000115283.html>
- 2) 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. 大阪

府における 2020 年感染症発生動向. 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所研究年報. 2021; 5, 1-10

- 3) Sakamoto H, Ishikane M, Ueda P. Seasonal Influenza Activity During the SARS-CoV-2 Outbreak in Japan. *JAMA* 2020; **323**: 1969-1971
- 4) 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>
- 5) Osaka Prefectural Government. Latest updates on COVID-19 in Osaka | 大阪府 新型コロナウイルス感染症対策サイト. COVID-19 Task Force website. <https://covid19-osaka.info/en>
- 6) 大阪府感染症情報センター 新型コロナウイルス感染症
<http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/disease/corona.html>
- 7) 大阪府. 第 59 回大阪府新型コロナウイルス対策本部会議 現在の感染状況について
https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/38215/00408277/1-1_kansen0928.pdf
- 8) 大阪府. 第 61 回大阪府新型コロナウイルス対策本部会議 現在の感染状況について
https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/38215/00412172/1-1_kansenzyoukyou1125.pdf
- 9) 大阪府感染症情報センター RS ウイルス感染症
<http://www.iph.pref.osaka.jp/teiten/20210128105633.html>
- 10) Takeshi Miyama, Nobuhiro Iritani, Takayuki Nishio, Tomohiko Ukai, Yuka Satsuki, Hiromi Miyata, Ayumi Shintani, Satoshi Hiroi, Kazushi Motomura, Kazuo Kobayashi. Seasonal shift in epidemics of respiratory syncytial virus infection in Japan. *Epidemiol Infect* 2021; **149**: e55
- 11) 大阪府感染症情報センター 感染性胃腸炎
<http://www.iph.pref.osaka.jp/teiten/20210305164459.html>
- 12) 本村和嗣. 高齢者のウイルス感染症の現状と対策. 日本老年医学会雑誌 2021; 第 58 巻第 1 号: 60-64 3. ノロウイルス感染症
- 13) 大阪府感染症情報センター 手足口病

- <http://www.iph.pref.osaka.jp/teiten/20210128110012.html>
- 14) 国立感染症研究所. IDWR 2013 年第 36 号<注目すべき感染症>RS ウイルス感染症
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/rs-virus-m/rs-virus-idwrc/3972-idwrc-1336-01.html>
 - 15) 国立感染症研究所. RS ウイルス感染症 2018～2021. *IASR* 2022; **43**: 79-81
 - 16) 厚生労働省. 第 83 回新型コロナウイルス感染症対策アドバイザリーボード 資料 5-2 全国の新型コロナウイルス感染者数と保育所の臨時休園数の推移
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000937671.pdf>
 - 17) 江川和孝, 改田厚, 山元誠司, 平井有紀, 岡田和真, 阿部仁一郎, 小笠原準, 西田陽子, 梶月由香, 柿本健作, 梶勝史, 村上貴孝, 荒木敦, 木野稔, 青野慎太郎, 太田早紀, 北村聡, 説田景, 中山浩二, 吉田英樹. 2021 年春の RS ウイルス感染症流行—大阪市. *IASR* 2021; **42**: 192-197.
 - 18) 国立感染症研究所. 手足口病 都道府県別主なエンテロウイルス、2009-2015 年
https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/natsu/teashi/150903/tetizu_161101.gif
 - 19) 国立感染症研究所. 手足口病 都道府県別主なエンテロウイルス、2016-2019 年
https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/natsu/teashi/150903/tetizu_191118.gif
 - 20) 大阪府. 感染症発生動向調査事業報告書 第 38 報 [2019 年版] 38-39 (手足口病)
 - 21) 国立感染症研究所. 都道府県別病原体別手足口病由来ウイルス、2021 年
<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2021/data2021116j.pdf>
 - 22) 森野紗衣子, 多屋馨子. 水痘ワクチン定期接種化で水痘発生動向はどう変わったか. モダンメディア. 2021; **67** 巻 2 号 話題の感染症 25

Surveillance of infectious diseases in Osaka Prefecture in 2021

Yasutaka YAMANAKA^a, Yuka SATSUKI^a, Yoko NISHIDA^a, Kensaku KAKIMOTO^a, Tomohiko UKAI^a,
Takayuki NISHIO^a, Takeshi MIYAMA^b, Nobuhiro IRITANI^a and Kazushi MOTOMURA^c

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has spread all over the world. The Japanese government declared a state of emergency to regulate the spread of COVID-19 for the first time in April 2020, and first approved a vaccine against SARS-CoV-2 in February 2021. The vaccination rate reached almost 80% in Osaka prefecture in November 2021. As the rate increases, the number of deaths and severe cases have decreased, and behavioral restriction or infection prevention measures are moderated in a graded manner. In this study, we surveyed infectious diseases other than COVID-19 in Osaka Prefecture in 2021 in comparison to 2020. The number of patients with many infectious diseases reported by sentinel medical faculties were lower or unchanged. However, the number of patients with RS virus infection, infectious gastroenteritis, and hand-foot-and-mouth disease significantly increased. We found that the trend of individual infectious diseases in COVID-19 pandemic is divergent. Thus, continuous monitoring of infectious disease trends is required.

Key words: surveillance of infectious diseases, coronavirus disease 2019, 2021, RS virus infection, infectious gastroenteritis, hand-foot-and-mouth disease

a Health Crisis Management Division, Osaka Institute of Public Health

b Epidemiological Analysis Research Division, Osaka Institute of Public Health

c Public Health Department, Osaka Institute of Public Health

全ゲノム配列情報に基づく大阪府内の severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 の分子疫学解析

若林友騎, 河原隆二, 柿本健作, 山口貴弘, 梅川奈央, 西嶋駿弥, 森川佐依子, 廣井 聡, 池森 亮,
白井達哉, 阪野文哉, 前田和穂, 岐部亜子, 平井佑治, 岡田和真, 永吉晴奈, 徳永佑亮, 上野 亮,
村野晃一, 北口大毅, 田上貴臣, 安達史恵, 森 治代, 本村和嗣, 小笠原準

2021 年 1 月 1 日から 2021 年 12 月 31 日までに大阪府内で採取され、全ゲノム配列が解読された severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 について、全ゲノム配列情報に基づく分子疫学解析を実施した。第 3 波（2020 年 10 月 10 日～2021 年 2 月 28 日）では PANGO 系統の B.1.1.214、第 4 波（2021 年 3 月 1 日～2021 年 6 月 20 日）では B.1.1.7、第 5 波（2021 年 6 月 21 日～2021 年 12 月 16 日）では AY.29 が主に検出された。大阪府内における懸念される変異株（アルファ株およびデルタ株）の PANGO 系統あるいは各亜系統の推移を調査したところ、各遺伝子系統の検出割合は感染拡大の波ごとに異なっていた。全ゲノム配列情報に基づく系統解析は、極めて高い感度で病原体の異同を判断できることから、現行のサーベイランスに効果的に活用することで、感染症対策の高精度化につながることを期待される。

キーワード：severe acute respiratory syndrome coronavirus 2、分子疫学解析、全ゲノム配列解析

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) は新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因ウイルスである。2019 年末に中国で初めて検出された SARS-CoV-2 は、急速に世界中に拡散し、2020 年 3 月 11 日に世界保健機関 (WHO) は COVID-19 のパンデミック (世界的大流行) を宣言した¹⁾。以来、2022 年 5 月末現在まで全世界的な COVID-19 の流行が継続している。

29.9kb の一本鎖 RNA ゲノムを有する SARS-CoV-2 は、そのゲノム複製の過程で少しずつゲノム上に変異を蓄積する。Nextstrain による初期の解析では、その変異蓄積速度は 8×10^{-4} 塩基置換/サイト/年、すなわち年間でゲノム上に概ね 24 塩基置換が生じると推定された²⁾。一般に、このような変異の多くはウイルスの病原性や複製能力に影響を与えないが、一部の変異は、タンパク質の構造変化等を伴って、ウイルスの性質を変化させる³⁾。感染伝播力の増強やワクチン効果の変化にかかわる変異を獲得したウイルスは、懸念される変異株 (Variants of Concern,

VOC) として各国でゲノムサーベイランス等の監視対象に定められている。国立感染症研究所 (感染研) がこれまでに VOC に指定した変異株 (現在は VOC と指定されていない変異株を含む) には、Alpha (アルファ株)、Delta (デルタ株)、Omicron (オミクロン株) 等があり、それぞれ PANGO 系統の B.1.1.7 および Q 系統、B.1.617.2 および AY 系統、B.1.1.529 および BA 系統が含まれる (表 1)。

表 1 これまでに感染研が VOC に指定した変異株の一部 (本文中で取り上げるものを抜粋)

WHO 名称	PANGO 系統	Nextclade clade
Alpha	B.1.1.7, Q	20I
Delta	B.1.617.2, AY	21A, 21I, 21J
Gamma	P.1	20J
Omicron	B.1.1.529, BA	21K, 21L, 21M, 22A, 22B, 22C

大阪健康安全基盤研究所

本研究では大阪府内における SARS-CoV-2 の流行動態を明らかにする目的で、2021 年の大阪府内における SARS-CoV-2 検出株について、全ゲノム配列情報に基づく分子疫学解析を実施し、VOC を中心とする大阪府内の SARS-CoV-2 変異株の推移について調査した。

調 査 方 法

1. 全ゲノム配列の解読

SARS-CoV-2 の全ゲノム配列は、感染研が公開するプロトコールに準じて解読した⁴⁾。シーケンスには、iSeq 100 (Illumina) あるいは MinION Mk1b (Oxford Nanopore) を使用した。配列の構築には、感染研が提供する解析サーバーを使用した。

2. データセットの構築

大阪健康安全基盤研究所において解読した全ゲノム配列に加え、Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) からダウンロードした配列データ (fasta 形式) を解析に使用した⁵⁾。2021 年 1 月 1 日から 2021 年 12 月 31 日までに大阪府内で採取された SARS-CoV-2 ゲノムを解析対象とした。

3. PANGO 系統および Clade 判定

SARS-CoV-2 の系統の判定には、PANGOLIN (version 4.0.6) および Nextclade CLI (version 1.5.1) プログラムを使用し、それぞれ PANGO 系統および Clade を決定した^{6,7)}。

4. 分子系統解析

分子系統解析には、Nextstrain CLI (version 3.0.6) および Auspice (version 2.29.1) を使用した⁸⁾。系統樹の annotation には iTOL (version 6) を使用した⁹⁾。

5. COVID-19 感染拡大の波の定義

本研究では、大阪府における COVID-19 の感染拡大の波について、2020 年 10 月 10 日～2021 年 2 月 28 日を第 3 波、2021 年 3 月 1 日～2021 年 6 月 20 日を第 4 波、2021 年 6 月 21 日～2021 年 12 月 16 日を第 5 波、2021 年 12 月 17 日以降を第 6 波とそれぞれ定義した¹⁰⁾。

結 果

大阪健康安全基盤研究所において、554 株の良質な全ゲノム配列を新規に解読した。これにデータベースからダウンロードした 14,927 株分のゲノムデータを加えた、合計 15,481 株分の全ゲノム配列をデータセットとして、PANGO 系統および Clade 判定、並びに分子系統解析を実施した。当該期間に大阪府が発表した新規陽性者数の合計が 173,775 人 (2022 年 5 月 12 日時点) であることから、これは新規陽性者数の 8.9%に該当する。新規陽性者数の推移と SARS-CoV-2 の Clade 判定結果の推移を図 1 に示す。また、各 PANGO 系統の割合を図 2 に示す。

第 3 波においては、Clade 20B、PANGO 系統の B.1.1.214 に分類されるウイルスが主に検出された。また、第 4 波では Clade 20I、PANGO 系統の B.1.1.7 に分類されるアルファ株、第 5 波では Clade 21J、PANGO 系統の AY.29 およびその子孫系統 (AY.29.1、AY.29.2) に分類されるデルタ株が主に検出された。第 6 波の始まりにあたる第 51 週には、Clade 21K、PANGO 系統の BA.1 およびその子孫系統 (BA.1.1、BA.1.1.1、BA.1.1.2、BA.1.1.5) に分類されるオミクロン株が検出された。

2021 年の第 4 週以降、スパイクタンパク質の E484K のアミノ酸置換を有する変異株である PANGO 系統の R.1 が検出され、第 11 週には解析した SARS-CoV-2 の 19%を占めた (図 2)。その後、R.1 の検出割合は減少し、第 25 週以降は大阪府内において検出されていない。また、Gamma (ガンマ株、Clade 20J、PANGO 系統 P.1) および Kappa (カップ株、Clade 21B、PANGO 系統 B.1.617.1) が、それぞれ第 12 週および第 17 週に 1 株ずつ検出された。

大阪府内で検出されたアルファ株の全ゲノム配列情報に基づく時間系統樹を図 3 に示す。本研究では、特定の塩基置換の有無に基づいて 5 つのアルファ株 sublineage を定義した。すなわち、nuc:C2842T、および nuc:C11173T の塩基置換を特徴的に有する系統をそれぞれ α -sublineage I および α -sublineage II とした。また、nuc:G17019T の塩基置換を特徴的に有する系統を α -sublineage IIIa とし、そこからさらに 2 つの特徴的な塩基置換 (nuc:T23659C、nuc:C26464T) を獲得した系統を α -sublineage IIIb に、 α -sublineage IIIb からさらに 2 つの特徴的な塩基置換 (nuc:C19813T、nuc:A24538G) を獲得した系統を α -sublineage IIIc とした。また、どの塩基置換も有し

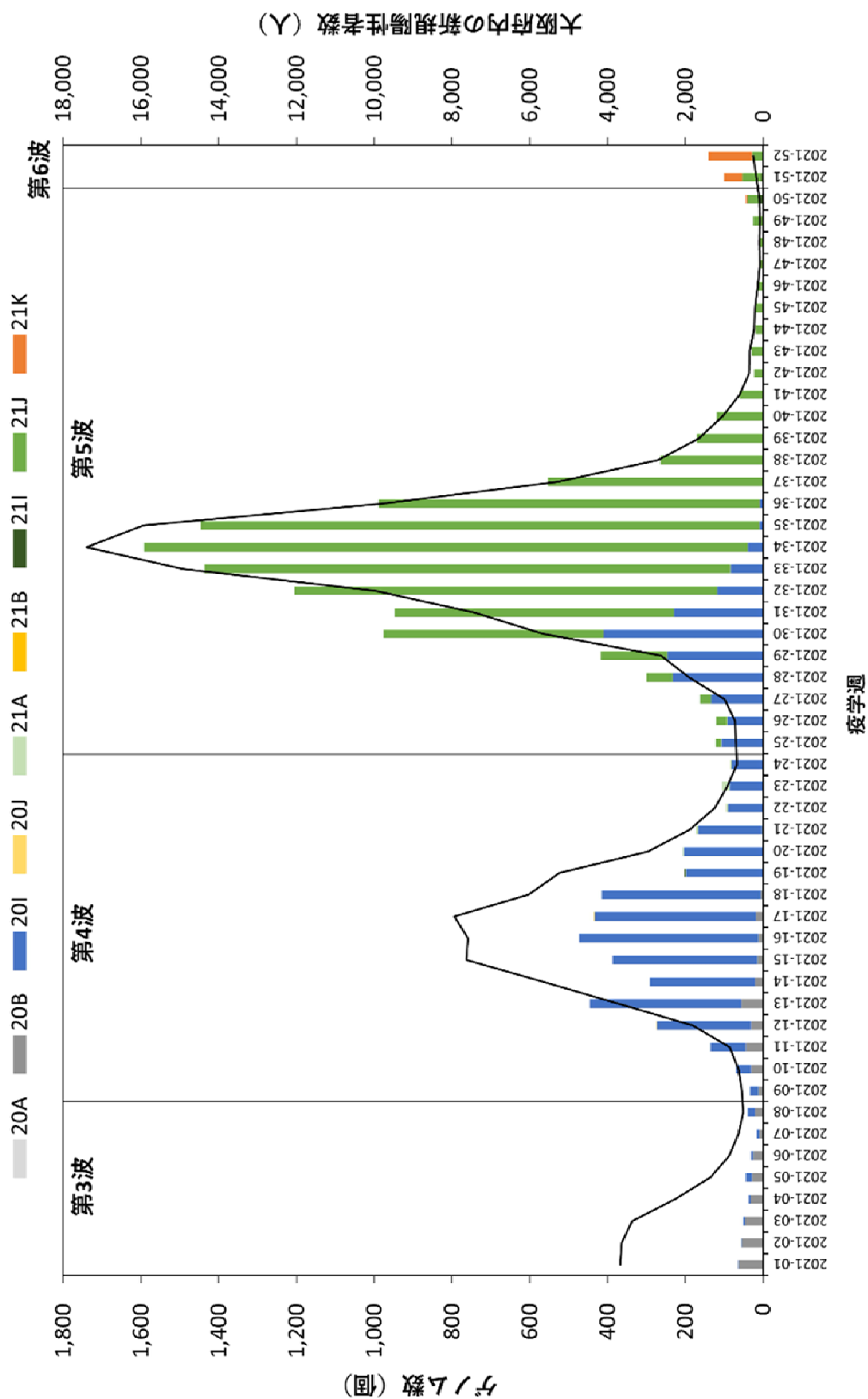


図1 各疫学週において大阪府内で検出された SARS-CoV-2 の Clade 判定結果 (積み上げ棒グラフ、左軸) と計上された新規陽性者数の推移 (折れ線グラフ、右軸)。対応する各感染拡大の波をグラフ中に示した。第52週は、2021年12月27日から12月31日までの総計。また、2021年1月1日から1月3日は、2020年の第53週に該当するため、本グラフ中に含まれない。

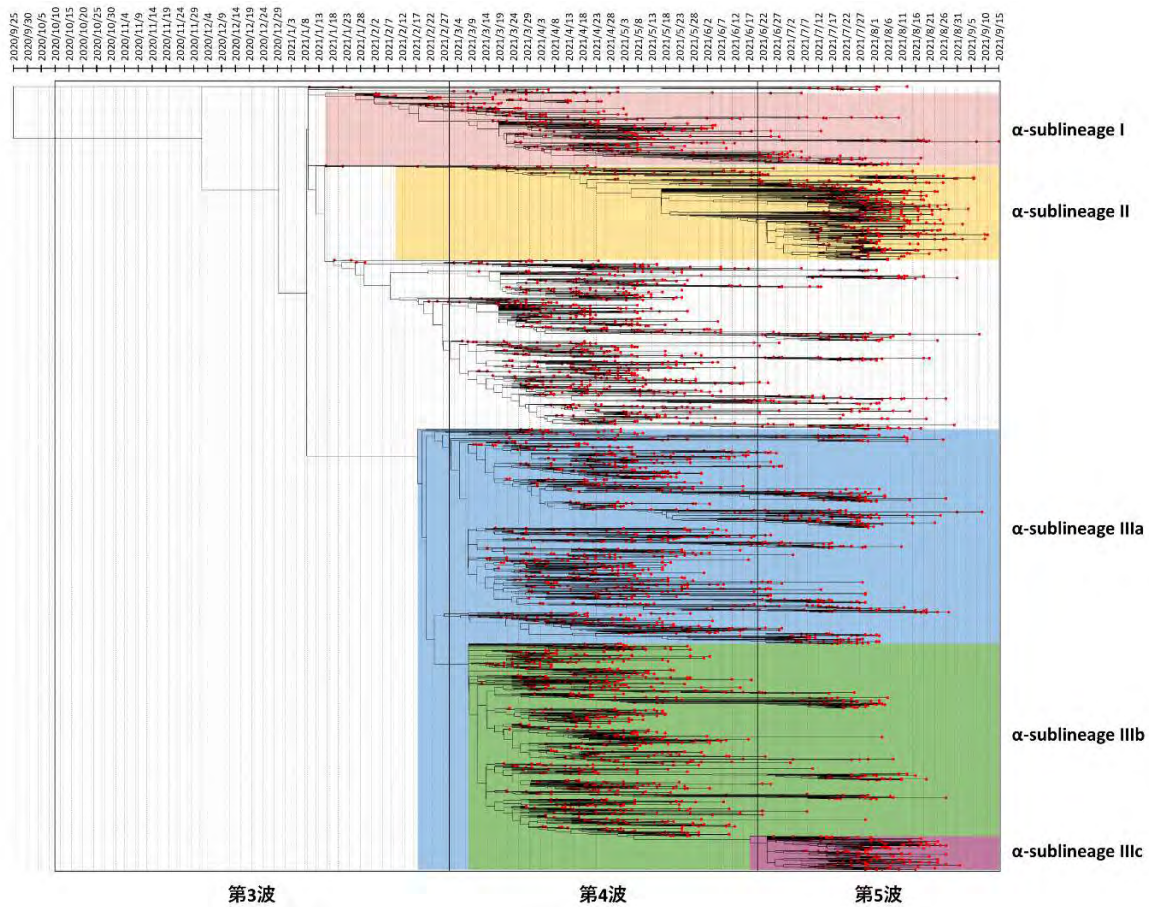


図 3 大阪府内で検出されたアルファ株の時間系統樹。各節の先端を赤丸で示した。各 sublineage は色付け背景で示した。

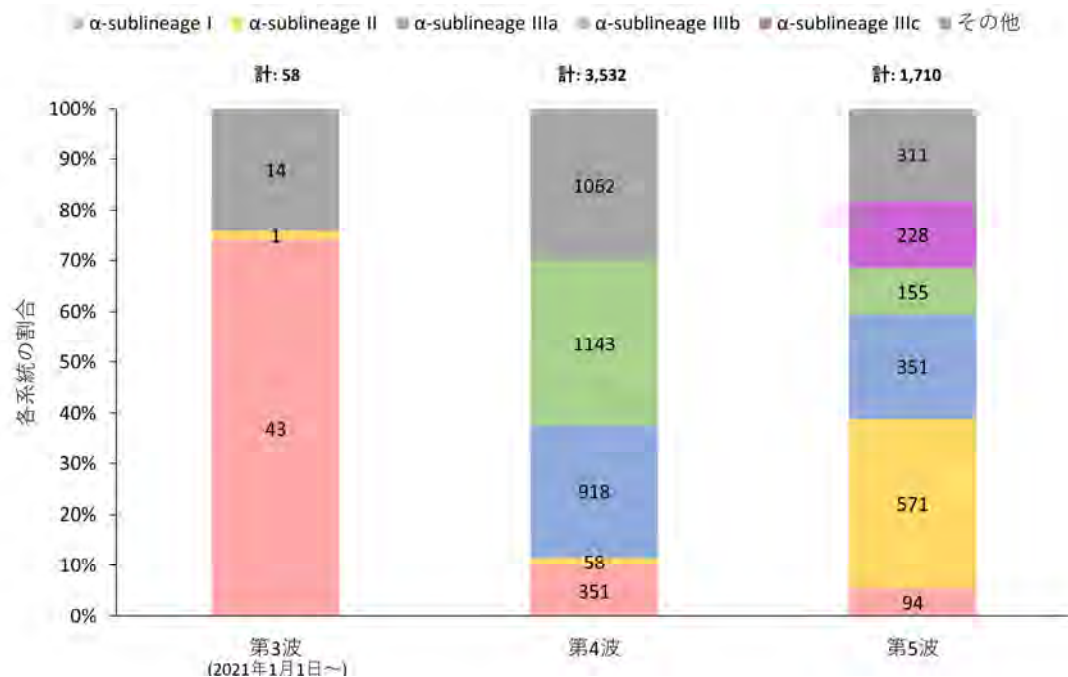


図 4 2021 年に大阪府内で検出されたアルファ株における各系統の割合。グラフ中に記載の数値は、各系統に分類されたゲノム数を示す。

ないアルファ株をその他とした。各感染拡大の波において、各系統に分類されたゲノムの検出割合の推移を図4に示した。

第3波において検出されたアルファ株は、 α -sublineage I が70%以上を占めていた(図3、図4)。第4波では、 α -sublineage I とは遺伝子系統の異なる α -sublineage IIIa および α -sublineage IIIb が58%を占めた。第5波においては、第3波、第4波でほとんど検出されなかった α -sublineage II が最も多くなり、33%を占めた。加えて第5波では、 α -sublineage IIIb から派生した α -sublineage IIIc が新たに出現し、第5波におけるアルファ株全体の13%を占めた。

大阪府内で検出されたデルタ株の全ゲノム配列情報に基づく時間系統樹を図5Aに示す。また、この系統樹においてPANGO系統のAY.29に該当する枝を集約した系統樹を図5Bに示す。大阪府内で検出されたデルタ株の99%は、PANGO系統のAY.29およびその子孫系統であった。AY.29は2つの特徴的な塩基置換(nuc:C5365T, nuc:C28170T)を有する系統(AY.29-sublineage I)と、この2つの塩基置換を有しない系統(AY.29-sublineage II)に大きく分類された(図5A)。PANGO系統のAY.29.1(スパイクタンパク質のQ173Hのアミノ酸置換を有するAY.29系統)およびAY.29.2(スパイクタンパク質のQ414Rのアミノ酸置換を有するAY.29系統)は、それぞれAY.29-sublineage II およびAY.29-sublineage I に分類された。各感染拡大の波において、各系統に分類されたゲノムの検出割合の推移を図6に示した。

第4波で検出されたデルタ株は、Clade 21A、PANGO系統のB.1.617.2に分類されるウイルスが88%を占めた(図5B、図6)。一方、第5波ではPANGO系統AY.29がデルタ株全体の99%以上を占め、AY.29.2を含むAY.29-sublineage I が46%、AY.29.1を含むAY.29-sublineage II が54%であった(図5A、図6)。2021年第32週に初めて検出されたAY.29.2は(図2)、第38週以降、新規陽性者数が減少する中で、デルタ株に占める検出割合が経時的に増加し、第49週でピークに達した(図2、図5A)。第6波においては、AY.29.2を含むAY.29-sublineage I がデルタ株全体の70%を占めた(図6)。

考 察

本研究では、大阪府で検出されたSARS-CoV-2の全ゲノム配列情報に基づく系統解析を実施し、VOCを中心に各感染拡大の波におけるウイルス系統の推移を解析した。その結果、第3波ではB.1.1.214、第4波ではB.1.1.7、第5波ではAY.29がそれぞれ感染拡大に寄与したことが明らかになった。第4波および第5波においては、第3波以前と比較して新規陽性者数が増加したが、より感染伝播力の高い変異株の出現が影響したと考えられた。また、第3波から第4波初期には、R.1の検出割合が一時的に増加した。R.1は、2021年1月以降に関東地方や東北地方において急速に拡散したことが報告されている¹¹⁾。大阪府内においてB.1.1.7の検出割合が急激に増加する中で、全国的なR.1の拡散の影響が大阪府にも及んでいたことが示唆された。

アルファ株およびデルタ株について、感染拡大の波ごとに検出された遺伝子系統を比較すると、興味深いことに同じVOCであっても、異なる遺伝子系統株が検出されていた。例えば、第4波に検出されたデルタ株は、B.1.617.2が9割近くを占めたが、第5波において、大規模な感染拡大を引き起こした系統は、AY.29であった(図1、図5、図6)。第4波で検出されたB.1.617.2と同じ遺伝子系統のウイルスは、2021年6月28日を最後に7月以降は大阪府内で確認されていない(図5B)。このことは、大阪府内におけるB.1.617.2による感染の連鎖が6月で途切れたことを意味しており、保健所等による早期の感染者の囲い込みが有効に機能したことを示唆している。ただし、本研究では、大阪府内で発生したSARS-CoV-2陽性症例の1割程度しか解析できなかったため、水面下で感染の連鎖が継続していた可能性は否定できない。アルファ株についても同様に、第3波で主に検出された α -sublineage Iの検出割合は、第4波以降では1割程度に抑えられており、保健所等による初動対応が有効に機能し、 α -sublineage Iの感染拡大が抑制された可能性が考えられた。

第5波では、大阪府内の1日の新規陽性者数が最大で3,000人を超えるなど、これまでになく規模で感染が拡大した。これは、感染伝播力の高いデルタ株の影響と考えられている。一方で、第5波の初期にはアルファ株が主に検出されていた(図1)。この時期は、大阪府内における第3回緊急事態宣言(2021年4月25日から6月20日)が解除され、まん延防止等重点措置(2021年6月21日から8月

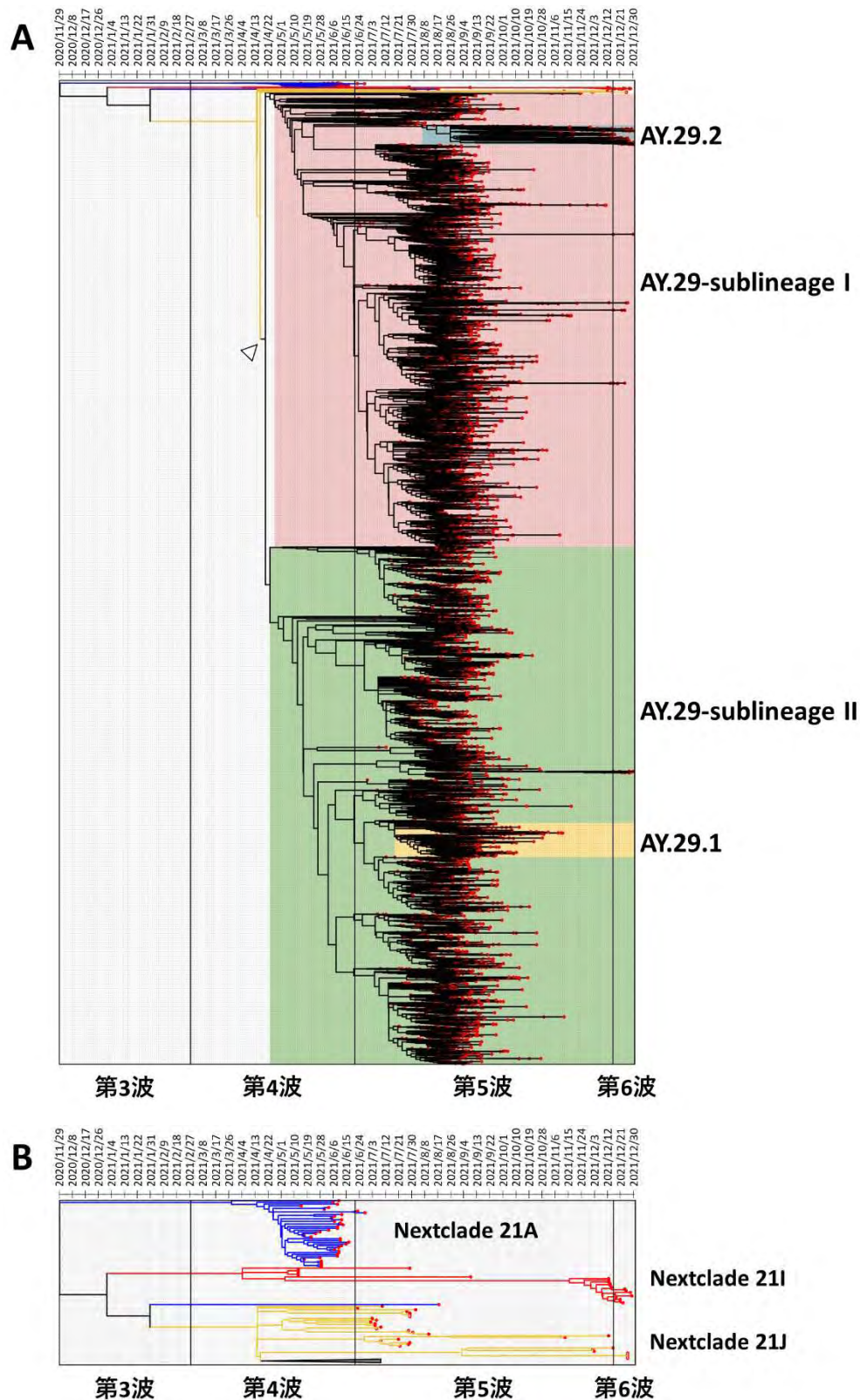


図 5 大阪府内で検出されたデルタ株の時間系統樹。各節の先端は赤丸で示した。(A) AY.29 を含む全デルタ株の系統樹。各 sublineage および AY.29.1、AY.29.2 は色付け背景で示した。矢頭は図 B において、系統樹を集約した位置。(B) AY.29 系統を集約した系統樹。系統樹の色は Clade を表し、Clade 21A は青、Clade 21I は赤、Clade 21J は黄色でそれぞれ色付けした。

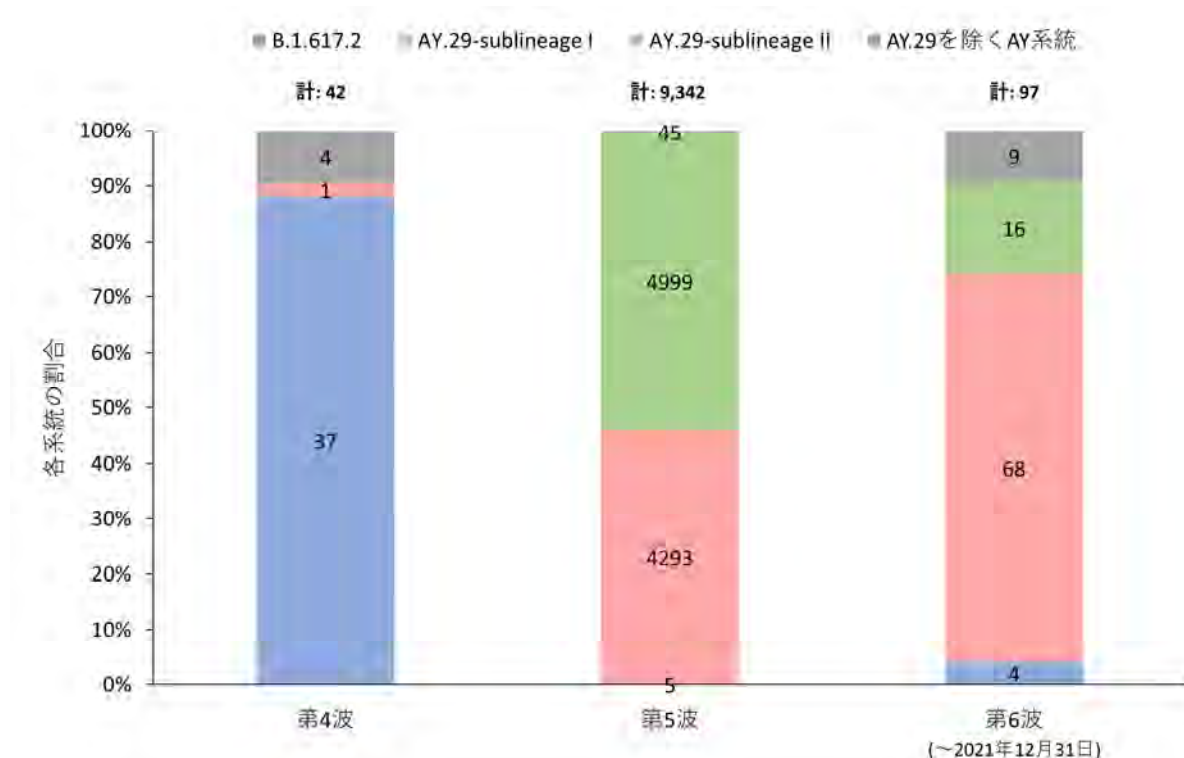


図 6 2021 年に大阪府内で検出されたデルタ株における各系統の割合。グラフ中に記載の数値は、各系統に分類されたゲノム数を示す。

1 日)へ移行したタイミングに該当する。まん延防止等重点措置へ移行後に人流が増加したというデータを踏まえると¹²⁾、第5波の初期においては、デルタ株の影響、すなわちウイルス側の要因だけでなく、社会活動の活発化による影響が感染拡大に寄与した可能性が考えられた。

第5波のピークを過ぎて新規陽性者数が減少する中で、AY.29.2の検出割合は増加した。AY.29.2の検出割合の増加が認められる2021年10月は、大阪府内におけるSARS-CoV-2ワクチンの2回目接種が一定程度完了した時期であり¹³⁾、AY.29.2がその他のAY.29系統と比較して、免疫逃避に有利な変異を有している可能性が考えられた。AY.29.2はスパイクタンパク質のQ414Rのアミノ酸置換を有している。しかし、これまでにQ414Rの変異が免疫逃避に有利に働くことを示唆する実験データは報告されておらず、第5波の後半にAY.29.2の検出割合が増加した要因についての明確な根拠はない。本研究では、塩基配列情報のみに基づいて解析を実施したが、塩基配列の変異が表現型に与える影響を評価する「Genotype to Phenotype」

のアプローチを組み合わせることが、より実効性の高い感染症対策につながると期待される。例えば、AY.29-sublineage IとAY.29.2の中和抗体との結合性等を比較することで、大阪府内でAY.29.2の検出割合が増加した要因について、ウイルス学的な視点から評価できると考えられる。

全ゲノム配列情報に基づく系統解析は、SARS-CoV-2のみならず病原体全般について、1塩基置換レベルの極めて高い精度で病原体の異同あるいは系統関係を判定できる。このようにして得られた高精度な病原体情報から、感染症がどのように拡散・拡大したかを推測し、行政機関・保健所へ情報還元することで、感染症拡大防止に活用できると期待される。一方で、コストや多検体処理能力の面では課題が残されており、現状では解析できる症例はごく一部に限られている。また、SARS-CoV-2以外の病原体については、国内では全ゲノム配列情報を活用したサーベイランスがほとんど実施されていない。全ゲノム配列情報を効率的かつ効果的に活用できる病原体サーベイランス体制の構築が必要である。

本研究では、GISAID に登録された配列データを解析に使用しました。GISAID の配列登録者である、以下の先生方に深くお礼申し上げます（五十音順、アルファベット順）。大阪大学微生物病研究所 (Atsushi Kumanogoh, Daisuke Motoooka, Daisuke Okuzaki, Emi E. Nakayama, Haruhiko Hirata, Hidenori Nakagawa, Hiroshi Ogura, Hiroya Oki, Hisatake Matsumoto, Kentaro Tanaka, Kiyoko Amo, Ko Ida, Lu Xiuyuan, Masahiro Yamamoto, Michinori Shirano, Miwa Sasai, Ritsuko Kubota-Koketsu, Ryo Morita, Shota Nakamura, Sho Yamasaki, Tadahiro Sasaki, Takeshi Ebihara, Tatsuo Shioda, Tetsushi Goto, Yasuhiro Kato, Yasunori Fujikawa, Yu-chen Liu)、大阪母子医療センター (Itaru Yangihara, Satoshi Yanagihara, Yukiko Nakura)、関西医科大学 (Masami Kashiwara)、京都大学 (Masaki Yamamoto, Miki Nagao, Yasufumi Matsumura)、国立感染症研究所 (Ai Kawana-Tachikawa, Chang-Kweng Lim, Chikako Shimokawa, Daisuke Kobayashi, Eri Nakayama, Eunsil Park, Harutaka Katano, Hazuka Y Furihata, Hidemasa Izumiya, Hiromizu Takahashi, Hussein H. Aly, Ken-ichi Lee, Ken Miyazawa, Ken Shimuta, Kentaro Itokawa, Koichi Ishikawa, Kousho Wakae, Makoto Kuroda, Masanori Hashino, Masatomo Morita, Masumichi Saito, Midori Nakamura-Hoshi, Minoru Nagi, Motohiko Ogawa, Naomi Nojiri, Nobuo Koizumi, Nozomu Hanaoka, Rina Tanaka, Sana Uchikoba, Sayuri Seki, Shigeru Kusagawa, Shigeru Tajima, Shigeru Tanjima, Sho Miyamoto, Shouji Yamamoto, Shun Iida, Sunao Iyoda, Tadaki Suzuki, Takahiro Maeki, Takanobu Kato, Takashi Sakudoh, Tsuguto Fujimoto, Tsuyoshi Sekizuka, Yasutaka Hoshino, Yoshihiro Kaku, Yuichiro Hirata)

また、大阪健康安全基盤研究所で SARS-CoV-2 の全ゲノム配列を解読するにあたり、技術的な支援をいただきました国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの黒田誠先生、関塚剛先生、糸川健太郎先生に感謝申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

- 1) Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed.* 2020; **91**(1): 157-160.
- 2) A. Rambaut, Phylodynamic Analysis | 176 genomes | 6 Mar 2020. *Virological* 2020; <https://virological.org/t/phylodynamic-analysis-176-genomes-6-mar-2020/356>.
- 3) Motozono C, Toyoda M, Zahradnik J, Saito A, Nasser H, Tan TS, Ngare I, Kimura I, Uriu K, Kosugi Y, Yue Y, Shimizu R, Ito J, Torii S, Yonekawa A, Shimono N, Nagasaki Y, Minami R, Toya T, Sekiya N, Fukuhara T, Matsuura Y, Schreiber G; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, Ikeda T, Nakagawa S, Ueno T, Sato K. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. *Cell Host Microbe* 2021; **29**(7): 1124-1136.e11.
- 4) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル、新型コロナウイルスゲノム解析マニュアル. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-2020-04-14-10-09-54.html>
- 5) Khare S, Gurry C, Freitas L, Schultz MB, Bach G, Diallo A, Akite N, Ho J, Lee RT, Yeo W, Curation Team GC, Maurer-Stroh S. GISAID's Role in Pandemic Response. *China CDC Wkly.* 2021; **3**(49): 1049-1051.
- 6) O'Toole Á, Scher E, Underwood A, Jackson B, Hill V, McCrone JT, Colquhoun R, Ruis C, Abu-Dahab K, Taylor B, Yeats C, du Plessis L, Maloney D, Medd N, Attwood SW, Aanensen DM, Holmes EC, Pybus OG, Rambaut A. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. *Virus Evol.* 2021; **7**(2): veab064.
- 7) Aksamentov I, Roemer C, Hodcroft EB, Neher RA. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *J Open Source Softw.* 2021; **6**(67): 3773.
- 8) Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, Sagulenko P, Bedford T, Neher RA. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics.* 2018; **34**(23): 4121-4123.

- 9) Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021; **49**(W1): W293-W296.
 - 10) 大阪府. 第 76 回大阪府新型コロナウイルス対策本部会議【資料 1-2】現在の療養状況について.
https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/38215/00427688/1-2_ryouyouzyoukyou0518.pdf
 - 11) Sekizuka T, Itokawa K, Hashino M, Okubo K, Ohnishi A, Goto K, Tsukagoshi H, Ehara H, Nomoto R, Ohnishi M, Kuroda M; Virus Diagnosis Group (NIID Toyama); COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan (COG-JP). A discernable increase in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 R.1 lineage carrying an E484K spike protein mutation in Japan. *Infect Genet Evol.* 2021; **94**: 105013
 - 12) 大阪府. 第 60 回大阪府新型コロナウイルス対策本部会議【資料 1-4】滞在人口の推移.
https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/38215/00410045/1-4_taizaizinkou1021.pdf
 - 13) 大阪府. 第 60 回大阪府新型コロナウイルス対策本部会議【資料 1-3】感染状況と医療提供体制の状況について.
https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/38215/00410045/1-3_iryouryouyoutaisei1021.pdf
- WEB サイトの内容は 2022 年 6 月 1 日に確認した。

Whole genome sequencing and molecular epidemiological analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in Osaka

Yuki WAKABAYASHI, Ryuji KAWAHARA, Kensaku KAKIMOTO, Takahiro YAMAGUCHI, Nao UMEKAWA, Syunnya NISHIJIMA, Saeko MORIKAWA, Satoshi HIROI, Ryo IKEMORI, Tatsuya SHIRAI, Fumiya BANNO, Kazuho MAEDA, Ako KIBE, Yuji HIRAI, Kazuma OKADA, Haruna NAGAYOSHI, Yusuke TOKUNAGA, Ryo UENO, Koichi MURANO, Daiki KITAGUCHI, Takaomi TAGAMI, Fumie ADACHI, Haruyo MORI, Kazushi MOTOMURA and Jun OGASAWARA

We conducted a phylogenetic analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) genomes sampled in Osaka Prefecture in 2021. In total, 15,481 genomes were analyzed. We found that the third wave of SARS-CoV-2 infection was mainly caused by PANGO lineage B.1.1.214, while the fourth and the fifth waves were caused by PANGO lineage B.1.1.7 and AY.29, respectively. Intriguingly, major lineages and/or sub-lineages of Alpha or Delta variants differed in each wave of infections. Whole genome sequencing reveals the phylogenetic relationships of pathogens in high resolution, and is a powerful tool for surveillance to prevent the spread of infectious diseases.

Key words : severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, molecular epidemiology, whole-genome sequencing

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 (2021 年度)

中田恵子, 森 治代

2021 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 6 型 (1 名)、コクサッキーウイルス A6 型 (13 名) とコクサッキーウイルス A16 型 (2 名)、コクサッキーウイルス A4 型 (1 名) であった。コクサッキーウイルス A6 型の分離株の Viral Protein 1 領域を用いた系統樹解析の結果、2021 年度の 11 株全てが同じクラスターに分類され、遺伝子型は D であった。また、2021 年度の株は、2019 年度の大阪健康安全基盤研究所森ノ宮センター分離株および 2017 年、2018 年、2019 年に中国で検出された株と同じクラスターを形成した。2021 年度のコクサッキーウイルス A6 は、2019 年度以前に国内に流入した後、国内で循環していた可能性が考えられた。各疾患の原因ウイルスの遺伝子型およびその系統樹解析から得られるウイルス株の遺伝子情報の傾向が毎年異なることから、今後も引き続き動向を調査する必要がある。

キーワード：無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ、エンテロウイルス

毎年夏季に小児の患者数が増加するエンテロウイルス (Enterovirus; EV) 感染症の中で、無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(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¹⁾。また、ウイルスの型によっては中枢神経症状を引き起こす等、重症化との関連が疑われる²⁾ことや、流行するウイルス型が一定の周期で繰り返される傾向が認められるため³⁾、流行を予測する観点から毎年の流行解析は重要である。本稿では、2021 年 4 月 1 日から 2022 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

2021 年 4 月 1 日から 2022 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センター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 36 名から採取された 48 検体を対象とした。検体種別の内訳は髄液が 11 検体、咽頭ぬぐい液が 26 検体、便が 9 検体、その他が 2 検体 (血液が 1 検体、唾液が 1 検体) であった。患者情報 (患者の年齢、性別、診断名、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ウシ胎児血清を 10% の濃度で添加したイーグル 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 μ L ずつを各細胞に接種した。便は、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 μ m シリンジフィルターでろ過した溶液から 100 μ L を各細胞に接種した。各細胞への検体接種後、CO₂ 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遺伝子型別

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 μ L 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-PCR⁴⁾を実施後、増幅産物のダイレクトシーケンスを実施し、BLAST 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 μ L 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-PCR⁵⁾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い、BLAST 解析により遺伝子型別を実施した。

4. 哺乳マウスによるウイルス分離および系統樹解析

手足口病およびヘルパンギーナの患者由来検体については哺乳マウスを用いたウイルス分離を実施した。生後 72 時間以内の哺乳マウス 3 匹を 1 群とし、ウイルス分離用に上述のように処理した検体を頸部皮下に 5-10 μ L 接種した。その後、1 週間観察し、麻痺を呈した個体から筋肉部分を回収した。回収した筋肉を緩衝液と混和後、ホモジナイズし、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。その上清から 200 μ L を採取し、上述の方法でウイルス RNA を抽出した。抽出したウイルス RNA を用いて EV の VP1 領域に対する RT-PCR⁵⁾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い、近隣結合法を用いた系統樹解析を実施した。なお、麻痺を起こさなかった場合、陰性とした。

本研究は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の承認を得て（承認番号 1310-05-6）、「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。

本研究における動物実験は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所動物実験委員会に承認された動物実験計画書に沿って、適切に実施した（承認番号 D-H30-2-4）。

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 36 名のうち、無菌性髄膜炎と診断されたのは 15 名で、年齢の中央値は 1 か月（範囲：0 か月-37 歳）、性別は男性 8 名、女性 7 名であった。手足口病と診断された患者は 18 名で、年齢の中央値が 1 歳 9 か月（1 歳 1 か月-3 歳 11 か月）、性別は男性 12 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 1 歳 7 か月（1 歳 2 か月-7 歳 5 か月）、性別は男性 2 名、女性 1 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 36 名分、48 検体のうち 17 名分、18 検体で EV が陽性となった。無菌性髄膜炎患者の 15 名中 1 名の咽頭ぬぐい液と便からエコーウイルス 6 型（Echovirus 6; E6）の遺伝子が検出された（表 1）。手足口病では 18 名中 13 名からコクサッキーウイルス A6 型（Coxsackievirus A6; CV-A6）、2 名から CV-A16 の遺伝子が検出された。CV-A6 遺伝子陽性検体の 13 検体中、ウイルス分離が可能であったのは、培養細胞（RD-A）では 1 株のみであったが、哺乳マウスでは 11 株であった（表 2）。ヘルパンギーナでは 3 名中 1 名から CV-A4 遺伝子が検出された（表 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 10 月に 1 名から E6 が検出された。手足口病の患者からは 8 月から CV-A6 の検出が始まり 11 月まで続き、12 月には CV-A16 が検出された（図 1）。ヘルパンギーナ患者からは 9 月に CV-A4 が 1 名より検出された。

3. 哺乳マウスによる CV-A6 分離株の VP1 領域に対する系統樹解析

CV-A6 の哺乳マウス分離株 11 株について、ウイルス抗原決定領域である VP1 領域 (915 塩基中、解析が可能であった 656 塩基) の系統樹解析を実施した。その結果、2021 年度の 11 株は、2019 年度の当

センター分離株 2 株および 2017、2018、2019 年の中国株と同じクラスターを形成した。また、2021 年度株は、過去の当センター分離株と同様に、全て遺伝子型 D (サブジェノグループ D3) であった (図 2)。

表 1 無菌性髄膜炎患者由来検体におけるウイルス検出結果

	咽頭ぬぐい液 (n=5)		便 (n=9)		髄液 (n=11)		その他* (n=2)	
	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
E6	1	1	1	1	0	0	0	0
合計 (%)	1 (20)	1 (20)	1 (11)	1 (11)	0	0	0	0

*その他：血液1, 唾液1

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=18)		
	遺伝子検査	分離培養 (細胞)	分離培養 (哺乳マウス)
CV-A6	13	1	11
CV-A16	2	0	0
合計 (%)	15 (83)	1 (6)	11 (61)

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 (細胞)	分離培養 (哺乳マウス)
CV-A4	1	1	0
合計 (%)	1 (33)	1 (33)	0

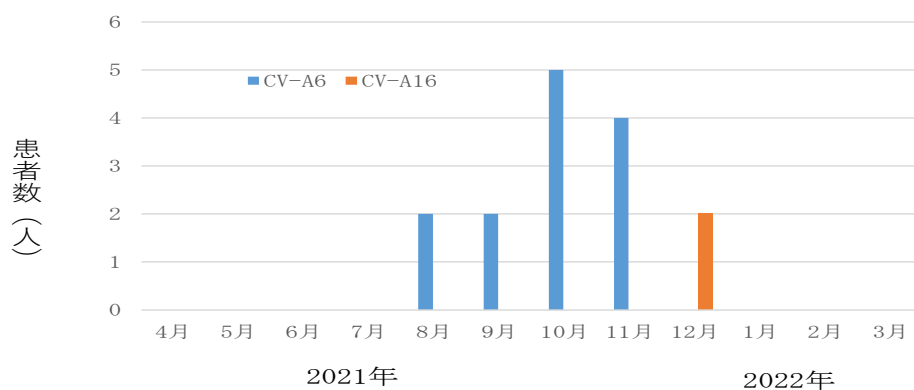


図 1 手足口病患者からの EV 検出状況

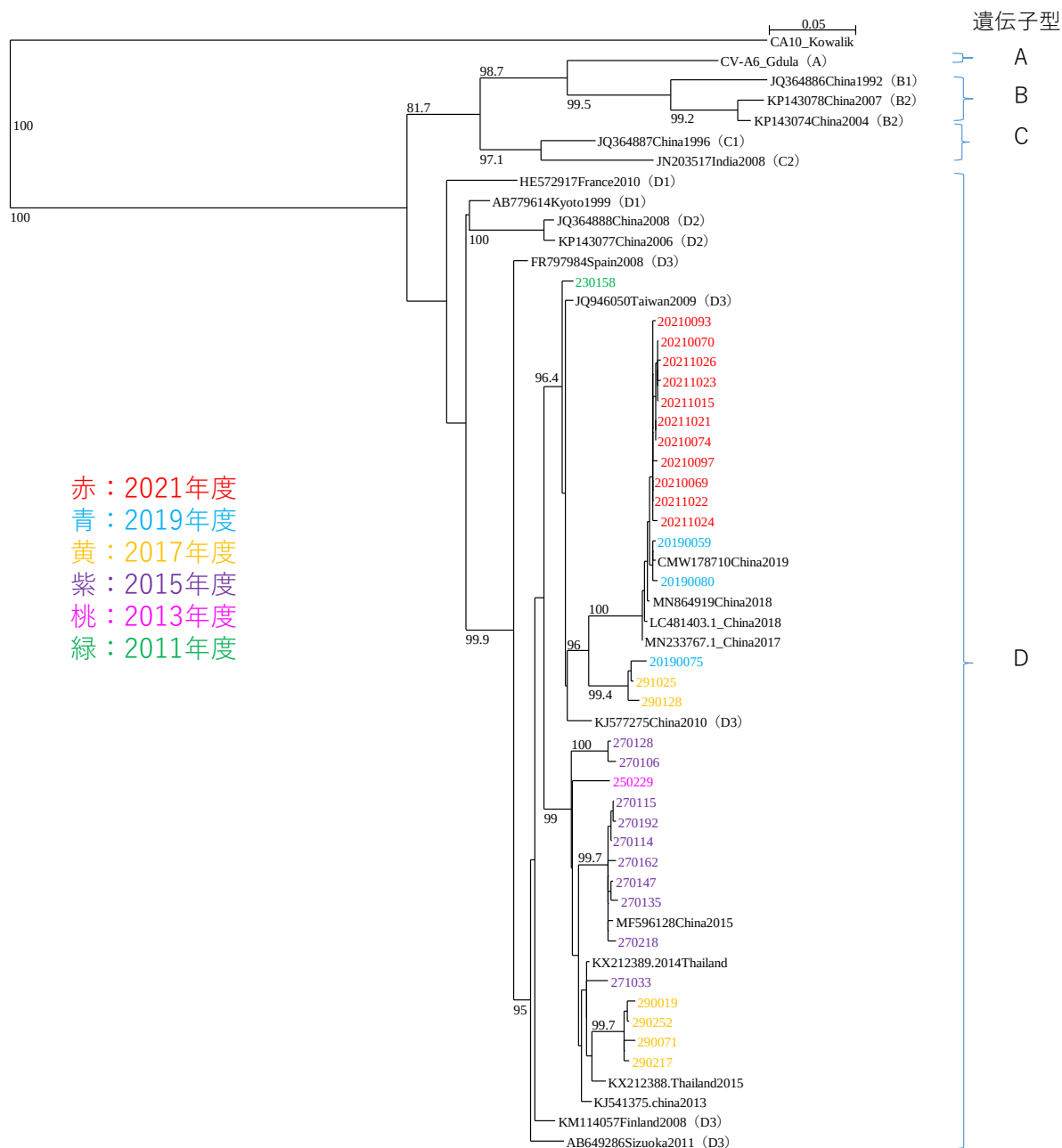


図2 CV-A6 の VP1 領域に対する系統樹解析 (656 塩基)

考 察

2021 年度の EV 感染症の流行状況は 2020 年度に引き続き低調であった。未だ警戒が必要な COVID-19 への感染対策が継続されたことが要因として考えられる。このような状況下であっても、無菌性髄膜炎患者から E6 が検出された。E6 は 2016 年度以降、当センター搬入の無菌性髄膜炎疑い患者由来検体から検出されておらず⁶⁻¹⁵⁾、5 年ぶりの検出となった。EV による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¹⁶⁾。当センターでは 2013 年度に無菌性髄膜炎疑いの患者検体より E6 の検出数の増加が認められたが、散発的な検出であった⁸⁾。国内では長期間、EV による無菌性髄膜炎の大規模な流行が発生していないため、E6 を含めて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。

手足口病では、8月から11月までCV-A6が、12月にCV-A16が検出された。シーズン全体としてはCV-A6が主流であった。大阪府では2011年度以降、CV-A6は隔年で検出の増加が認められており、COVID-19感染防止対策下においても、このサイクルは維持された。

CV-A6は、培養細胞では分離が困難であるため、古くから哺乳マウスによる分離が実施されてきた。2021年度においても、培養細胞では1株であったが、哺乳マウスでは11株と高率に分離された(表2)。今後もCV-A6の流行時には哺乳マウスによる分離培養を併用する必要があると考えられた。2021年度、哺乳マウスにより分離したCV-A6、11株のVP1領域の分子系統樹解析の結果、2019年度の当センター分離株および2017年、2018年、2019年に検出された中国株と同じクラスターを形成した。そのため、2021年度の株は、2019年度以前に国外より流入した後に、国内で循環した可能性が考えられた。また、当センターの2011年度以降の株全てが遺伝子型D(サブジェノグループD3)であった。遺伝子型D(サブジェノグループD3)は、中国を中心に近隣諸国でも主流な遺伝子型であることから¹⁷⁾、2011年以降、隔年で検出数の増加が認められたCV-A6は、近隣諸国と日本の間で相互に循環している可能性が推察された。

CV-A6が手足口病で主流となった過去のシーズンでは、ヘルパンギーナ疑い患者からもCV-A6が検出されたが、2021年度はCV-A4が1株検出されたのみであった。これは、CV-A6による手足口病の流行規模が小さかったことが原因の一つと考えられた。

2021年度は2020年度に引き続き、COVID-19感染防止対策下でEV感染症の患者数報告は少なかった。しかし、無菌性髄膜炎、手足口病では2020年度に検出されていたEVとは異なる遺伝子型のウイルスが検出された。EV感染症は流行規模に関わらず、各ウイルスの型の検出増加には特有の周期性が認められる。また、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): 283-293.
- 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): 1941-1948.
- 6) 中田恵子, 山崎謙治, 左近直美, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2011年度). *大阪府立公衆衛生研究所研究報告 (平成24年度)*. 2012; 8-13.
- 7) 中田恵子, 山崎謙治, 左近直美, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2012年度). *大阪府立公衆衛生研究所研究報告 (平成25年度)*. 2012; 7-13.
- 8) 中田恵子, 山崎謙治, 左近直美, 駒野淳, 加瀬

- 哲男. 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2013 年度). 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 (平成 26 年度). 2014; 7-14.
- 9) 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.
- 10) 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). 大阪健康安全基盤研究所研究年報 (平成 28 年度). 2016; 9-16.
- 11) 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.
- 12) 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. 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 中田恵子, 山中靖貴, 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 (2020 年度). 大阪健康安全基盤研究所研究年報 (令和 3 年度). 2021; 11-17.
- 16) 国立感染症研究所. 無菌性髄膜炎からのウイルスの検出、2017 年末現在. *IASR* 2018; **39**: 89-90
- 17) Song Y, Zhang Y, Ji T, Gu X, Yang Q, Zhu S, Xu W, Xu Y, Shi Y, Huang X, Li Q, Deng H, Wang X, Yan D, Yu W, Wang S, Yu D, Xu W. Persistent circulation of Coxsackievirus A6 of genotype D3 in mainland of China between 2008 and 2015. *Sci Rep*. 2017;7(1):5491.doi: 10.1038/s41598-017-05618-0.

**Epidemic situation and molecular-epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture
(Fiscal 2021 Report)**

Keiko NAKATA and Haruyo MORI

From April 2021 to March 2022, multiple types of enteroviruses were detected in specimens obtained from patients with aseptic meningitis, hand-foot-and-mouth disease, and herpangina. Echovirus 6 was detected from a patient with aseptic meningitis, Coxsackievirus (CV) A6 and CV-A16 were detected in 13 and 2 patients, respectively, with hand-foot-and-mouth disease, and CV-A4 was detected in a patient with herpangina. The phylogenetic trees constructed using partial sequences at the viral protein 1 region showed that the CV-A6 isolates of the 2021 epidemic formed a single cluster, all isolates were classified as genotype D. The 2021 epidemic strains of CV-A6 were closely related to the 2019 Osaka strains and 2017, 2018, and 2019 China strains. The origin of the CV-A6 isolates of the 2021 epidemic might have been imported before 2019, and then circulated domestically. As the changes in the dynamics of the epidemic viruses can be elucidated by analyzing viral genomes, it is necessary to continue 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 (2021 年度)

白井達哉, 左近直美, 森 治代

2021 年度、当所で検査したノロウイルス陽性の食中毒及び有症苦情事例 10 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。2021 年度には 4 種類が検出され、最も多く検出された遺伝子型は GII.2[P16] (5 事例、50%)、次いで GII.4[P31] (3 事例、30%) であった。Dual typing により全事例を解析している 2019 年度以降の遺伝子型では、GII.2[P16] が最も多く検出されていた。2019～2021 年度の GII.2[P16] について RdRp コード領域 (1530 塩基) 及び VP1 コード領域 (1623 塩基) の各領域の全長を解析したところ、系統樹解析ではそれぞれの領域で共に、すべての株が 2016 年度の GII.2[P16] 流行以降に検出された株と同じクラスターに分類された。RdRp アミノ酸配列 (510 アミノ酸) を解析したところ、GII.2[P16] の 2016 年以降の流行株に特徴的な 5 つのアミノ酸は保存されていたが、その他の部位で複数のアミノ酸変異を有する株が存在した。一方、VP1 アミノ酸配列 (542 アミノ酸) では T399I の変異が 2020 年度以降の 7 株中 5 株で検出された。ORF1/2 間の遺伝子組換えと点変異による流行への影響を解明するために、継続した遺伝子解析が必要である。

キーワード：ノロウイルス、食中毒、RdRp、GII.2[P16]

ノロウイルスは冬季を中心に流行し嘔吐や下痢などを引き起こす、すべての年齢層における感染性胃腸炎の起因ウイルスである¹⁾。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²⁾。食中毒の原因として患者が最も多い病原体の一つであり³⁾、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 Viral protein (VP) 1 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⁴⁾。人に感染する主な Genogroup は大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) である。また、ORF1 の 3' 端に位置する RdRp のアミノ酸配列に基づき、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要因と考えられているため^{5,6)}、Genotype と P-type 両方の解析 (Dual typing) による遺伝子型別が推奨されており⁴⁾、「Genotype が GII.2、P-type が GII.P16」の場合は GII.2[P16] と表現する。

日本では近年、多数の Genotype の中でも GII.2 と GII.4 が検出数で上位を占めている⁷⁾。このうち、GII.4 は世界的なパンデミックを何度も起こしてきた Genotype であるが⁸⁾、GII.4 の流行拡大には組換えによる変異だけではなく VP1 のエプिटープにおけるアミノ酸変異が原因となることがわかってきた⁹⁾。GII.2[P16] は 2009 年に日本で出現し¹⁰⁾、2016 年に日本を含むアジア諸国で大規模な流行を起こした^{11,12)}。系統樹解析および塩

基配列解析により、2016年以降のGII.2[P16]はそれ以前のGII.2と比較してVP1に特徴的なアミノ酸変異がないことから、免疫逃避や組織血液型抗原に対する親和性の変化（宿主感受性）以外の要因が流行に参与している可能性が示唆され、この点でGII.4と異なっていた^{13,14)}。一方でRdRp領域には、2016年以降に報告されたGII.2[P16]に特徴的な5つのアミノ酸変異（D173E、S293T、V332I、K357Q、T360A）が見られた^{13,15)}。この変異はGII.4[P16]でも確認されており、GII.4がGII.2[P16]と組換えを起こしたことが示唆されている¹³⁾。

2021年度の食中毒及び有症苦情事例において検出されたノロウイルスのDual typingによる遺伝子型別結果、及び主要な遺伝子型であったGII.2[P16]のRdRp及びVP1コード領域の塩基配列解析結果を報告する。

実験方法

1. 検査材料

2021年度に当所で検査した食中毒及び有症苦情事例（他府県依頼分を含む）23事例のうちノロウイルス遺伝子が検出された10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¹⁶⁾に準拠したリアルタイムPCRにより実施した。

また、2019年度から2020年度にかけて発生した事例について当所で検査し、ノロウイルスが検出された計24事例のデータを解析に使用した¹⁷⁾。

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。RdRpコード領域及びVP1コード領域に対し、ノロウイルスGIはMon432/G1-SKR、GIIはMon431/G2-SKRのプライマーを用いてDual typing領域を増幅した¹⁶⁾（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シング法により塩基配列を決定し、Norovirus Typing Tool Version 2（<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>）により遺伝子型を決定した。

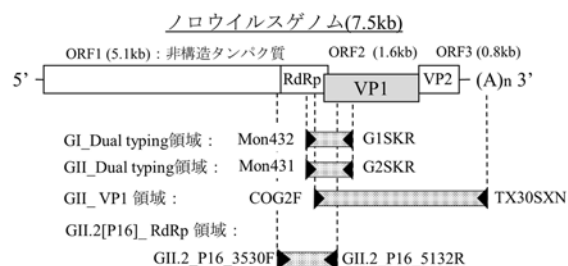


図1 ノロウイルスゲノム構造及び解析領域と増幅に使用したプライマー

3. ノロウイルスGII.2[P16]のRdRpコード領域及びVP1コード領域の解析

2019年度から2021年度にノロウイルスGII.2[P16]が検出された検体の一部について、RdRpコード領域はGII.2_P16_3530F/5132Rのプライマーセット（GII.2_P16_3530F: ATCTGTGCCACACAGGGAAG、GII.2_P16_5132R: GGCTGCACCATCAGTAGATG）を、VP1コード領域はCOG2F/TX30SXNのプライマーセット¹⁸⁾を用いてPCRを行い、前述と同様にダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した（図1）。RdRpコード領域は1530塩基、VP1コード領域は1626塩基の各領域の全長を解析対象とした（共に、終止コドンを除く）。解析には事例ごとに代表株1株以上を用いてRdRp及びVP1領域の配列を決定し、検出年度の下2桁を株名の前に付けた。MEGA Xを用い、最尤法（Maximum-Likelihood法）により系統樹解析を実施した¹⁹⁾。比較対象とした配列はGII.2[P16] 14株（Accession Number (ACN): KJ407074、KY421121、LC145786、LC209442、LC209450、LC209451、LC209454、LC209458、LC209467、LC209476、LC213890、LC213892、LC646333、MN493873）及び、流行以前にGII.2の主流であったGII.2[P2]4株（ACN: LC209457、LC209463、LC209464、LC209472）を用いた。RdRpコード領域の系統樹にはGII.4[P16]（ACN: LC175468、MK073890、MK073885、MK073894）を解析に含めた。これらは、NCBIのデータベースに登録されている塩基配列にRdRpとVP1のコード領域がすべて含まれているものを抽出し、各配列が完全に一致しているデータはそのうちのひとつを代表とした。また、GII.2とGII.16の分類時の参照配列（ACN: X81879、AY772730）をVP1及びRdRp各コード領域の系統樹に含めた⁴⁾。系統樹の外群としてRdRpコード領域ではGII.2[P30]（ACN: AY134748）とGII.2[P2]4株（ACN: LC209457、LC209

463、LC209464、LC209472) を、VP1 コード領域では GII.13 (ACN: AY113106) を使用した。

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 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

解析した 10 事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型別月別の状況を表 1 に示す。2021 年度に確認された遺伝子型は 4 種類あり、GII.2[P16]が 5 事例 (50%)、GII.4[P31]が 3 事例 (30%)、GII.17[P17]、GII.3[P25]、がそれぞれ 1 事例 (10%) で検出された。2020 年度に引き続いて GI は検出されなかった¹⁷⁾。

2021 年 4 月と 2022 年 1 月に複数の事例が発生し、この 2 か月で 2021 年度の陽性事例の 70% を占めた。内訳をみると GII.2[P16]は 4 月に 4 事例中 3 事例で検出されたのに対し、1 月は検出されなかつ

た。1 月は 3 事例中 2 事例で GII.4[P31]が検出された。また、7 月から 10 月の間はノロウイルスが検出されなかった。

2. ノロウイルス Dual typing の結果 (2019 年度～2021 年度)

2019 年度から 2021 年度までの各年度のノロウイルス陽性事例数と、検出ウイルスの Dual typing の結果について表 2 に示した。対象期間の陽性事例総数は 34 事例で、最も多く検出された遺伝子型は GII.2[P16]で 12 事例 (35.3%)、次いで GII.4[P31]が 10 事例 (29.4%)、GII.17[P17]が 3 事例 (8.8%) であった。年度別においても GII.2[P16]は主要な遺伝子型であった。Genotype としては GI.2、GI.4、GI.7、GII.2、GII.3、GII.4、GII.6、GII.17 の 8 種類、P-type としては GI.P4、GII.P7、GII.P16、GII.P17、GII.P25、GII.P31 の 6 種類が検出された。一つの Genotype について 2 つの P-type が確認されたのは GII.4 (GII.P16、GII.P31) のみであった。一つの P-type について 2 つの Genotype が確認されたのは GII.P16 (GII.2、GII.4) のみであった。

表 1 月別ノロウイルス遺伝子型検出状況 (2021 年度)

	ノロウイルス 陽性事例数	遺伝子型			
		GII.2 [P16]	GII.4 [P31]	GII.17 [P17]	GII.3 [P25]
2021年	4月	4 (1)	3 (1)	1	
	5月				
	6月	1	1		
	7月				
	8月				
	9月				
	10月				
	11月	1 (1)	1 (1)		
	12月				
	1月	3 (2)	2 (1)		1 (1)
	2月				
	3月	1		1	
年度合計		10 (4)	5 (2)	3 (1)	1 (1)

表中 () 内の数字は、食中毒事例として断定されたものを示す。

表 2 ノロウイルス陽性事例数と検出された遺伝子型 (2019 年度～2021 年度)

Genotype	GI.2	GI.4	GI.7	GII.2	GII.3	GII.4		GII.6	GII.17		GII.ND	合計
P-type	ND	P4	ND	P16	P25	P16	P31	P7	P17	ND		
2019年度	1	2	1	5 (3)		1	7	1	2		1	21
2020年度				2 (2)						1		3
2021年度				5 (5)	1		3		1			10
合計	1	2	1	12	1	1	10	1	3	1	1	34

■ : 年度で最も多い ■ : 年度で2番目に多い ■ : 年度で3番目に多い

ND: Not Defined

表中()内の数字は、系統樹解析 (図2及び図3) 及びアミノ酸配列解析 (表3及び表4) に用いた株を含む事例数

3. ノロウイルス GII.2[P16]の系統樹解析

2019 年度から 2021 年度にかけて検出された GII.2[P16]12 事例のうち、RdRp コード領域（1530 塩基）及び VP1 コード領域（1626 塩基）の両方の遺伝子配列を確定できた 10 事例（表 2）10 株について解析した。2019 年度検出の 3 事例 3 株（19-020、19-159、19-225）、2020 年度検出の 2 事例 3 株（20-094、20-099、20-108）及び 2021 年度検出の 5 事例 5 株（21-004、21-026、21-029、21-080、21-111）を用いた。20-099 及び 20-108 は同一事例内の株であり、それぞれ VP1 と RdRp の解析の代表とした。

(1) RdRp コード領域

系統樹解析結果を図 2 に示す。解析した 10 株は一つのクラスターに属し、全ての株は 2016 年以降

に流行した GII.2[P16]もしくは GII.4[P16]から分岐した。10 株中 8 株は 2020 年に検出された株（ACN: LC646333）に近縁とされたが、2019 年度に検出した 2 株（19-020、19-159）は 2016 年に検出された株（ACN: KY421121）に近縁であった。

(2) VP1 コード領域

系統樹解析結果を図 3 に示す。解析した 10 株は一つのクラスターに属し、2016 年以降に流行した GII.2[P16]から分岐した。10 株中 8 株は 2020 年に検出された株（ACN: LC646333）に近縁とされたが、2019 年度に検出した 2 株（19-020、19-159）は 2016 年に検出された株（ACN: KY421121）に近縁であった。

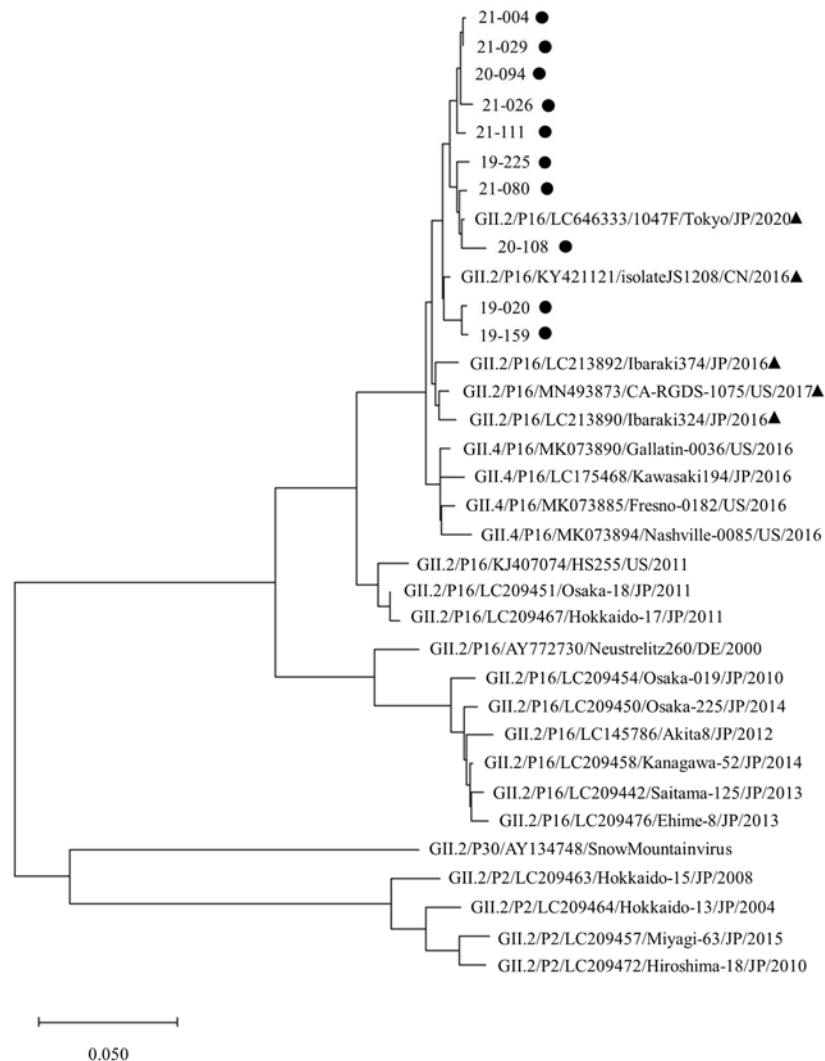


図 2 ノロウイルス GII.P16 の RdRp 塩基配列による分子系統樹（最尤法、1530 塩基）

●は当所で検出された株を、▲は図 4 で使用した参照配列を示す。外群として、GII.2[P2]、GII.2[P30]の配列を使用した。

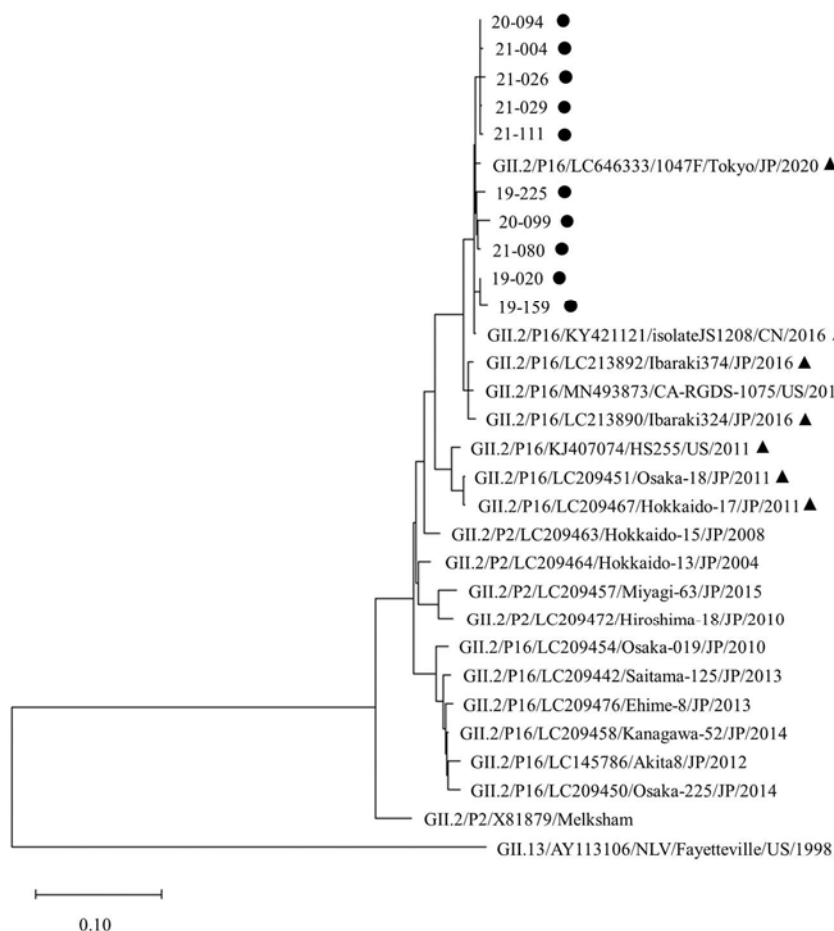


図3 ノロウイルス GII.2 の VP1 塩基配列による分子系統樹（最尤法、1626 塩基）
●は当所で検出された株を、▲は図5で使用した参照配列を示す。外群として、GII.13 の配列を使用した。

4. ノロウイルス GII.2[P16]のアミノ酸配列解析

2019年度から2021年度にかけて当所で検出された GII.2[P16]10 株の RdRp 及び VP1 の各アミノ酸配列について、参照配列（図2に▲で示す）と比較して変異が認められた部位をまとめた（図4、5）。比較する参照配列には系統樹解析で用いた2016年以降の GII.2[P16]5 株を選択した。

(1) RdRp 領域

当所で検出された10株のアミノ酸配列について、2016年度以降の GII.2[P16]の特徴とされる D173E、S293T、V332I、K357Q、T360A の5つのアミノ酸置換は保存されていた^{13, 15)}。21-026 は今回解析した他の9株には見られなかった変異が4か所（G18D、K68R、H121Y、T464N）あり、解析した株の中で変異箇所が最も多かった。解析した10株間では510個のアミノ酸に対して11か所（2.2%；第14、18、68、81、111、121、175、208、274、386、464番目）

で差異が認められた（図4）。

(2) VP1 領域

当所で検出された10株のアミノ酸配列を確認したところ、T399I のアミノ酸置換は参照配列及び2019年度に検出された配列で見られなかったのに対し、2020年度及び2021年度検出の7株のうち5株で変異が認められた。解析した10株間では542個のアミノ酸に対して10か所（1.8%；第17、99、130、193、309、335、342、348、399、410番目）で差異が認められた（図5）。

考 察

2021年度の食中毒及び有症苦情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。検査した23事例中10事例からノロウイルスが検出され、過去10年間で2020年度に次いで少なかった¹⁷⁾。こ

	Amino acid number(RdRp region)																					
Strain	14	18	68	71	81	111	121	123	137	173	175	208	274	293	332	357	360	386	421	430	464	
LC213890/Ibaraki324/JP/2016	L	G	K	T	S	A	H	Y	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
MN493873/CA-RGDS-1075/US/2017	L	G	K	T	S	A	H	Y	T	E	I	A	I	T	I	Q	T	N	S	M	T	
LC213892/Ibaraki374/JP/2016	L	G	K	T	S	A	H	Y	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
KY421121/isolateJS1208/CN/2016	L	G	K	T	S	A	Y	H	I	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	T	T	
LC646333/1047F/Tokyo/JP/2020	L	G	K	I	S	A	H	H	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
19-020	L	G	K	T	G	A	H	H	T	E	V	T	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
19-159	L	G	K	T	G	A	H	H	T	E	V	A	I	T	I	Q	A	D	P	M	T	
19-225	L	G	K	T	S	A	H	H	T	E	I	A	T	I	Q	A	N	P	M	T		
20-094	L	G	K	T	S	A	H	H	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
20-108	L	G	K	T	S	A	H	H	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
21-004	I	G	K	T	S	A	H	H	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
21-026	L	D	R	T	S	A	Y	H	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	N	
21-029	L	G	K	T	S	A	H	H	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
21-080	L	G	K	T	S	V	H	H	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
21-111	L	G	K	T	S	A	H	H	T	E	I	A	I	T	I	Q	A	N	P	M	T	
	●	●	●		●	●	●			※	●	●		※	※	※	※	●				

◆ 当所で検出した10株間で差異があった部位

※ 2016年以降の流行株でみられる特徴的なアミノ酸置換部位

注：白抜き文字はAccession No.LC213890を基準にした場合に置換が見られたアミノ酸を示す。

図4 GIL2[P16]の RdRp アミノ酸配列の変異部位 (510 アミノ酸)

Strain	Amino acid number(VP1 region)														
	17	78	99	130	193	256	309	319	335	342	348	399	410		
LC213890/Ibaraki324/JP/2016	G	N	Y	V	D	V	N	I	I	H	N	T	Y		
MN493873/CA-RGDS-1075/US/2017	G	S	Y	V	D	V	N	I	I	H	N	T	Y		
LC213892/Ibaraki374/JP/2016	G	N	Y	V	D	V	N	V	I	H	N	T	Y		
KY421121/isolateJS1208/CN/2016	G	N	Y	V	D	I	N	I	I	H	N	T	Y		
LC646333/1047F/Tokyo/JP/2020	G	N	Y	V	D	I	N	I	I	H	N	T	Y		
19-020	G	N	Y	I	D	I	N	I	I	H	N	T	Y		
19-159	G	N	Y	I	D	I	N	I	I	H	S	T	N		
19-225	G	N	Y	V	D	I	N	I	I	H	N	T	Y		
20-094	G	N	Y	V	D	I	N	I	I	H	N	I	Y		
20-099	G	N	Y	V	D	I	N	I	I	H	N	T	Y		
21-004	S	N	Y	V	D	I	N	I	V	H	N	I	Y		
21-026	G	N	C	V	D	I	N	I	I	H	N	I	Y		
21-029	G	N	Y	V	D	I	S	I	I	H	N	I	Y		
21-080	G	N	Y	V	E	I	N	I	I	H	N	T	Y		
21-111	G	N	Y	V	D	I	N	I	I	Y	N	I	Y		

◆ 当所で検出した10株間で差異があった部位

注：白抜き文字はAccession No.LC213890を基準にした場合に置換が見られたアミノ酸を示す。

図5 GIL2[P16]の VP1 アミノ酸配列の変異部位 (542 アミノ酸)

れは、新型コロナウイルス感染症流行により 2020 年 4 月に大阪府で緊急事態宣言が発令されて以降、緊急事態宣言とまん延防止措置が繰り返され、各人が大人数での飲食を避け、マスクや手洗いなどの衛生措置が習慣化したことが影響していると考えられる。当所のノロウイルス検出事例数は 2019 年度以降 2021 年度まで、各年度で 21 事例、3 事例、10 事例となり、2020 年度及び 2021 年度は、新型コロナウイルス流行前の 2019 年度に対してそれぞれ 14.3%、47.6%であった (表 2)。厚労省の統計によ

れば、全国ノロウイルス食中毒事例数は 2019 年度以降 2021 年度まで、各年度で 183 事例、44 事例、71 事例となり、2020 年度及び 2021 年度は、2019 年度に対してそれぞれ 24.0%、38.8%であった³⁾。当所の検出事例数は全国の集計に対して 2020 年度の落ち込みが大きいものの、2021 年度は同様の増加傾向を示した。2022 年度以降、新型コロナウイルスに対する社会的な行動制限等の対策が緩和傾向になる際は、ノロウイルスの流行に注意する必要がある。

ノロウイルス GII.2 は大阪府では 2011 年度以前から小児の集団胃腸炎事例では多く検出されていたものの、食中毒もしくは有症苦情事例での検出は他の遺伝子型と比較して多いものではなかった²⁰⁾。しかし、GII.2[P16]は 2016 年に日本を含むアジア諸国で大規模な流行を起こして以降、当所で毎年検出されており、検出数に占める割合も高いものとなっている¹⁷⁾。

そこで、2019 年度以降に検出された GII.2[P16]の遺伝子解析を行った。GII.P16 の系統樹解析ではすべてが 2016 年以降の GII. P16 に近縁で一つのクラスターに含まれた。アミノ酸配列については、2016 年以降の流行株に特徴的な 5 つのアミノ酸置換部位 (D173E、S293T、V332I、K357Q、T360A) は保存されていたが、2021 年度の 21-026 のように変異を 4 か所有する株も存在した。1 か所の変異が RdRp の性質に影響することも報告されており²¹⁾、同様の変異を持った株が流行していないか今後の注意が必要である。

GII.2 VP1 コード領域の系統樹解析においても、解析した株すべてが 2016 年以降の GII.2[P16]に近縁で一つのクラスターに含まれた。アミノ酸配列の解析では、2016 年以降の GII.2[P16]と比較して T399I の変異が確認された。NCBI の Genbank に登録されている配列の中から、“Norovirus” “GII.2”

“VP1” のキーワードで抽出される 2016 年以降検出の 125 株 (1200 塩基以上) において T399I の変異を有するのは 3 株であったが、当所では 2020 年度以降の 7 株中 5 株で確認されたことから大阪府で近年優勢となっている可能性が示唆された。GII.2 に関する研究では VP1 のアミノ酸変異が流行拡大に関わっているとされる報告はなく、これらの株が検出された 2020 年度から 2021 年度はノロウイルスの流行が例年に比べて小さいものであったため、今のところ、この変異が大きな流行を引き起こす可能性は低いと考えられる。しかし、新型コロナウイルス感染症対策の影響でノロウイルスの流行が小さかったとも考えられるため、今後も VP1 の変異は GII.2 の流行拡大に影響しないのか、引き続き研究が求められる。

本報告では GII.2[P16]に注目したが、GII.P16 は他にも GII.3、GII.4、GII.12、GII.17 などとの組換え株が報告されている²²⁾。中でも GII.4[P16]は大阪府内での検出は少なく (表 2)、その要因は不明であるが、世界的な流行株の一つとなっている。GII.2[P16]の

便中のウイルスコピー数が GII.4[P31]や GII.17[P17] に比して多いことから、GII.P16 RdRp は高い複製活性を有することが示唆される²³⁾。GII.2 と GII.4 はこの同じ GII.P16 を有していても、VP1 における変異は GII.4 が GII.2 に比べて多く、エピトープの変異も複数見られたのに対し、GII.2 では保存されていた¹⁴⁾。これらのことから、GII.4 は GII.2 より免疫による選択圧を受けやすいことが推察される。また、当所で検出した GII.2[P16]株間でのアミノ酸置換部位の割合が、VP1 が RdRp より高いわけではなかったことから、GII.2 は免疫による選択圧の影響を受けにくいことが示唆される (図 4、5)。今後は、RdRp の複製効率や変異率の違いに関する研究により、RdRp の性質の違いが各遺伝子型のノロウイルスに与える影響も明らかにする必要がある。

新たな ORF1/2 間の遺伝子組換えを早期に探知するための Dual typing、それに加えて、点変異によるウイルスの変化を見逃さないよう、RdRp や VP1 の全長の遺伝子解析を行う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) Ahmed SM, Lopman BA, Levy K. A systematic review and metaanalysis of the global seasonality of norovirus. *PLoS One* 2013; **8**: e75922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075922>.
- 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
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 国立感染症研究所. IASR ノロウイルス等検出速報 (自動更新2022年6月13日作成) . <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr/511-surveillance/iasr/tables/1493-iasrtv.html>.
- 8) Parra GI. Emergence of norovirus strains: A tale of two genes. **Virus Evol** 2019, 5(2):vez048. <https://doi.org/10.1093/ve/vez048>.
- 9) Kendra JA, Tohma K, Ford-Siltz LA, Lepore CJ, Parra GI. Antigenic cartography reveals complexities of genetic determinants that lead to antigenic differences among pandemic GII.4 noroviruses. **Proc Natl Acad Sci** 2021; **118**(11): e2015874118.
- 10) Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K, Goto K, Ogura H, Seto Y. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009–2010 season in Osaka City, Japan. **J Med Virol** 2012; **84**(3): 517-25.
- 11) Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Nobuhiko Okabe, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Suzuki Y, Ryo A, Fujita K, Oishi K, Katayama K, Kimura H. Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016-2017. **Front Microbiol** 2018; **9**: 1. doi: 10.3389/fmicb.2018.00001. eCollection 2018.
- 12) Ao Y, Wang J, Ling H, He Y, Dong X, Wang X, Peng J, Zhang H, Jin M, Duan Z. Norovirus GII.P16/GII.2-associated gastroenteritis, China, 2016. **Emerg Infect Dis** 2017; **23**(7):1172–5. doi: 10.1038/s41598-020-64148-4.
- 13) Tohma K, Lepore CJ, Ford-Siltz LA, Parra GI. Phylogenetic Analyses Suggest that Factors Other Than the Capsid Protein Play a Role in the Epidemic Potential of GII.2 Norovirus. **mSphere** 2017; **2**(3).
- 14) Zheng GL, Zhu ZX, Cui JL, Yu JM. Evolutionary analyses of emerging GII.2[P16] and GII.4 Sydney [P16] noroviruses. **Virus Evol** 2022; **8**(1): veac030. doi: 10.1093/ve/veac030. eCollection 2022.
- 15) Ao Y, Cong X, Jin M, Sun X, Wei X, Wang J, Zhang Q, Song J, Yu J, Cui J, Qi J, Man M, Duan Z. Genetic Analysis of Reemerging GII.P16-GII.2 Noroviruses in 2016–2017 in China. **J Infect Dis** 2018; **218**: 133–43.
- 16) 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>.
- 17) 白井達哉, 左近直美, 高田利香, 本村和嗣. 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). 大阪健康安全基盤研究所研究年報 令和3年度 2021; **5**: 18-24.
- 18) 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.
- 19) Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol** 2018; **35**(6): 1547-1549.
- 20) 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):879-88
- 21) Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. **PLoS Pathog** 2010; **6**: e1000831.
- 22) Kendra JA, Tohma K, Parra, GI. Global and regional circulation trends of norovirus genotypes and recombinants, 1995-2019: A comprehensive review of sequences from public databases. **Rev Med Virol** 2022: e2354.
- 23) Cheung SKC, Kwok K, Zhang LY, Mohammad KN, Lui GCY, Lee N, Nelson EAS, Lai RWM, Leung TF, Chan PKS, Chan MC. Higher Viral Load of Emerging Norovirus GII.P16-GII.2 than

Pandemic GII.4 and Epidemic GII.17, Hong Kong, China. ***Emerg Infect Dis*** 2019; **25**(1): 119-122.

WEBサイトの内容は2022年6月13日に確認した。

The epidemic and molecular epidemiological analysis of norovirus outbreaks in cases of food poisoning in Osaka Prefecture (Fiscal 2021 report)

Tatsuya SHIRAI, Naomi SAKON and Haruyo MORI

In the 2021/2022 season (from April 2021 to March 2022), we detected norovirus in 10 suspected foodborne outbreaks in Osaka. 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. Four genotypes were detected in the 2021/2022 season, with GII.2[P16] (n=5, 50%) being the most frequently detected, followed by GII.4[P31] (n=3, 30%). GI was not detected. GII.2[P16] was the most common genotype in the past four seasons. We analyzed the RdRp coding regions (1530 bases) and the VP1 coding regions (1623 bases) of GII.2[P16], which were detected from the 2019/2020 season to the 2021/2022 season. The phylogenetic tree of each of RdRp and VP1 showed that, in both coding regions, all strains form one cluster with GII.2[P16] strains detected since 2016. An amino acid sequences analysis of RdRp (510aa) showed that five unique amino acid substitutions sites, mutations that were suspected to be advantageous in GII.2[P16], which have spread since 2016, were conserved in all strains. On the other hand, there were strains with multiple amino acid mutations at other sites. For the VP1 amino acid sequence (542aa), the T399I mutation was present in five of the seven strains detected in 2020–2021. It is important to continue to investigate the association between mutations and outbreaks through ongoing genetic analyses.

Key words : norovirus, foodborne outbreak, RdRp, GII.2[P16]

SARS-CoV-2 陰性検体からの呼吸器ウイルスの検出

-COVID-19 流行時の呼吸器ウイルスの動向 2020 および 2021 年度-

森川佐依子^a, 大塚真紀^{a,b}, 廣井 聡^a, 中田恵子^a, 加瀬哲男^b, 森 治代^a

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的流行となった 2020 年 3 月以降、大阪健康安全基盤研究所ウイルス課で行っている感染症発生動向調査事業に伴う、ウイルス性呼吸器感染症の検出のための患者検体の搬入数は著しく減少した¹⁾。そこで、2020 年度、2021 年度に当所に搬入された新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検査検体のうち、SARS-CoV-2 遺伝子検査が陰性であった上気道由来検体を用いて A,B 型インフルエンザウイルス、RS ウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス OC43、パラインフルエンザウイルス 3 型の遺伝子検出を試みた。上気道由来検体 439 検体のうち、アデノウイルスは 3 検体から検出された。エンテロウイルス/ライノウイルス共通領域は 23 検体から検出された。VP 4/2 領域の系統樹解析による型別を実施した結果、解析可能であった 20 検体のうち、19 検体はライノウイルス、1 検体はエンテロウイルスと同定された。1 検体はアデノウイルスと A 群ライノウイルスの重複感染例であった。1 検体からはパラインフルエンザウイルス 3 型が検出された。インフルエンザウイルス、RS ウイルス、コロナウイルス OC43 は全ての検体で陰性であった。

キーワード： SARS-CoV-2 陰性、リアルタイム PCR (polymerase chain reaction) 法、呼吸器ウイルス、感染対策

大阪健康安全基盤研究所ウイルス課 (当課) では、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 (感染症法) に基づき、感染症法に規定された疾患について、患者由来の臨床検体より原因ウイルスの検出および詳細な血清型や遺伝子型の同定、流行動態の把握を行っている。また、筆者らは厚生労働行政推進調査事業費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「ワクチンの有効性・安全性と効果的適用に関する疫学研究」の分担研究者として、インフルエンザの流行解析に加え、ワクチンの有効性を低下させる原因である、インフルエンザウイルス以外の原因ウイルスによる「臨床的インフルエンザ」を検出する目的で、インフルエンザウイルスの陰性検体からは感染症法に規定された疾患以外の原因ウイルスも含め、呼吸器ウイルスを網羅的に検出している²⁾。

2019 年 12 月に中国に端を発した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的流行が発生し、当課においてもウイルス検出のための搬入検体数は著しく減少した。ウイルス性呼吸器疾患の原因

となるウイルスは多岐にわたっているが、ほとんどが飛沫感染を主な感染経路としているため、検体数が減少した理由としては、予防対策の徹底による流行の抑制に加え、重い呼吸器症状を呈した患者の多くが COVID-19 疑い例となり新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検査のみが実施された事、また軽症者ではクリニックへの受診控えが起こっていた事も一因として考えられた。そこで COVID-19 を疑う患者の中に COVID-19 以外のウイルス性呼吸器感染症患者が紛れ込む可能性を考慮し、SARS-CoV-2 遺伝子検査が陰性であった上気道由来検体を用いてインフルエンザウイルスを含めた主な呼吸器ウイルスの検出を試みた。対象ウイルスは、COVID-19 患者の年齢層で感染者数が多いと考えられる A,B 型インフルエンザウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス、および対象期間中に小児での流行が報告された RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス 3

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学

型、そして新型コロナウイルス出現前から流行が見られていたヒトコロナウイルスの 4 種類のコロナウイルスのうち、SARS-CoV-2 と同じ β コロナウイルス属に属し、遺伝学的に近縁とされる³⁾ コロナウイルス OC43 とした。

調 査 方 法

1. 対象検体

2020 年 4 月 1 日から 2022 年 3 月 31 日までに当課にて実施された SARS-CoV-2 遺伝子検査が陰性であった RNA 検体から対象を選出した。同一集団発生事例と推測された複数検体からは 1 検体のみを選択した。

COVID-19 の流行とその後の民間検査センターでの PCR 検査体制の構築に伴って、搬入検体数、陰性検体数は変動したが、検体数が多い月は各週 5 検体ずつを 4 週間または 5 週間分選出し、毎月の上限は 25 検体とした。また、上気道由来検体に該当しない唾液検体からの抽出 RNA は除外し、2020 年度は 265 検体、2021 年度は 174 検体を対象とした。

2. ウイルス検出

A,B 型インフルエンザウイルス、RS ウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス OC43、パラインフルエンザウイルス 3 型の遺伝子検出を試みた。

A,B 型インフルエンザウイルス遺伝子の検出は国立感染症研究所のマニュアルに従い、対象 RNA を用いたリアルタイム RT-PCR 法を実施した⁴⁾。

他のウイルスについては RNA 検体をランダムプライマーにて逆転写し、cDNA を作製後、それぞれのウイルス特異的なプライマーセットを用いたリアルタイム PCR 法を実施した⁵⁾。

エンテロウイルスとライノウイルスについてはリアルタイム PCR 法にて両ウイルスのもつ共通領域を検出し、陽性となった検体について VP4/2 領域に対する semi-nested RT-PCR 法を行い、増幅産物のダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定し、各ウイルス型の代表株の塩基配列とともに系統樹解析を行い、遺伝子型別を実施した⁶⁾。

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 2107-02）、「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。

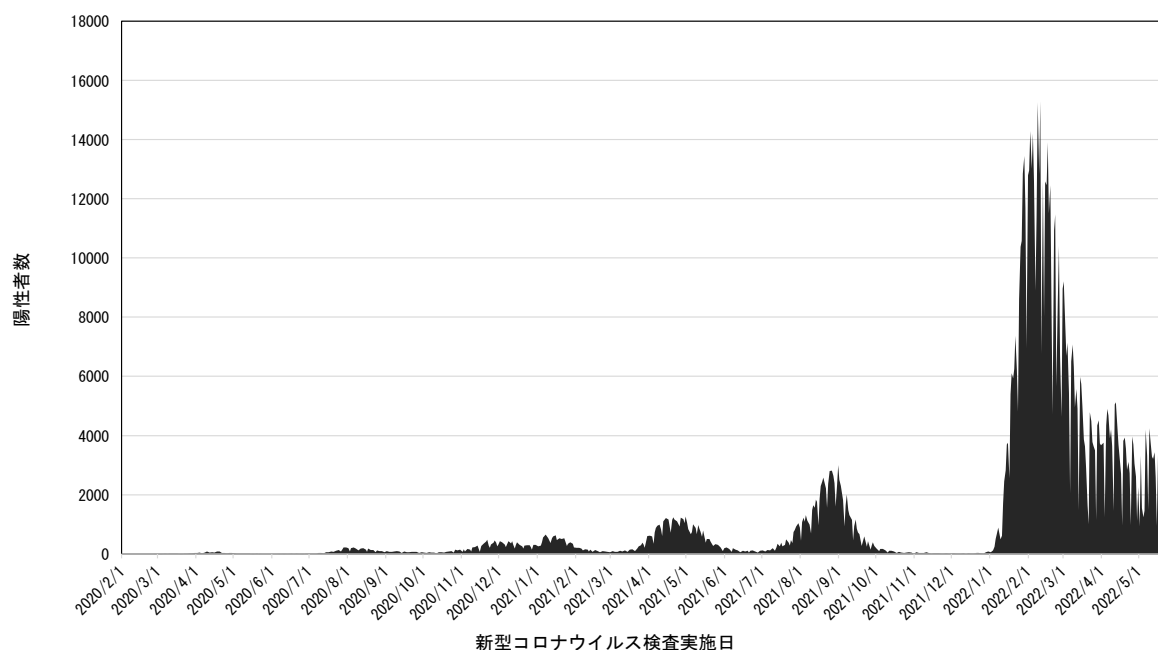


図1 大阪府の新型コロナウイルス新規感染者数（日別）
大阪府オープンデータ（引用文献7）より作成

結 果

研究期間中の大阪府内の COVID-19 流行状況は、2020 年 2 月より SARS-CoV-2 陽性者が増加し、2020 年 4 月の中旬をピークとした第 1 波、8 月の上旬をピークとした第 2 波、2021 年 1 月の中旬をピークとした第 3 波を経験した。2021 年度も同様の流行像を示し、4 月の中旬をピークとした第 4 波、9 月の上旬をピークとした第 5 波、2022 年 2 月の中旬をピークとした第 6 波と、おおよそ 4 ヶ月毎に流行が見られ、流行毎に 1 日あたりの感染者数、ピーク時の感染者数は増加した。新規感染者数が過去最大となったのは 2022 年 2 月 11 日で、15291 名であった⁷⁾ (図 1)。

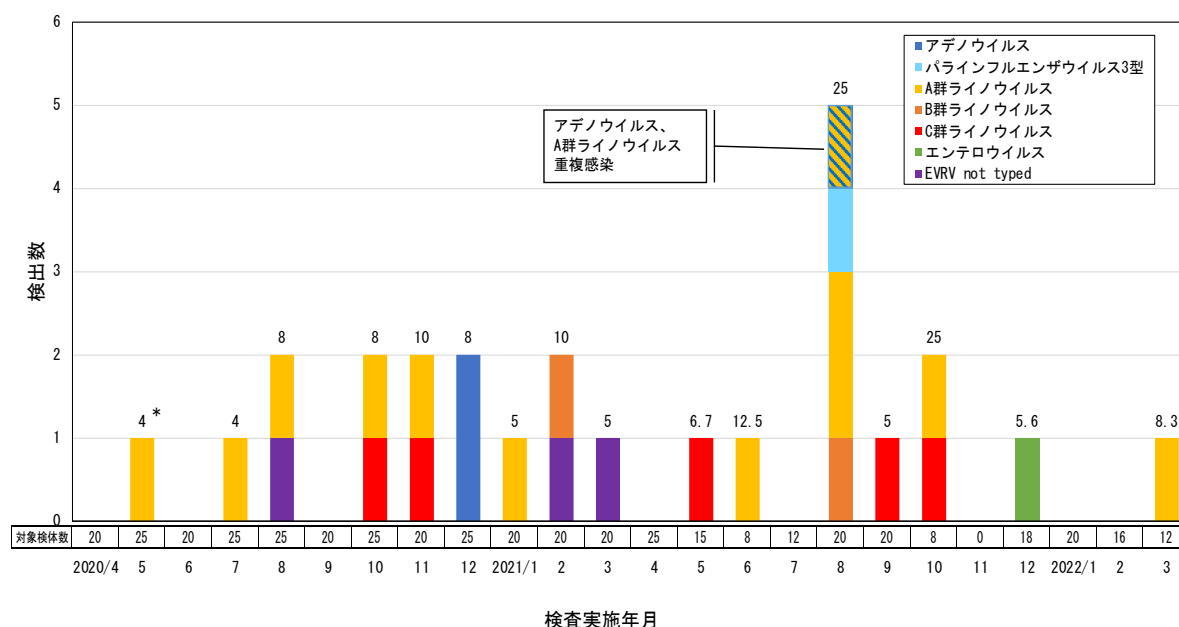
当課への搬入検体数は COVID-19 の流行状況および民間の臨床検査会社での PCR 検査の拡充に伴い変動した。PCR 検査の対象検体に唾液が採用されることが多くなり、流行の波がピークアウトするタイミングで、対象となる SARS-CoV-2 遺伝子検査陰性の上気道由来検体数は一桁に減少した (2021 年 6、10、11 月 (図 2))。

合計 439 検体のうち、何らかの呼吸器ウイルスが検出されたのは 26 検体 (5.9%) であった。月別の

検出率は 0 から 25%と差があった。アデノウイルスは 3 検体 (0.7%) から、パラインフルエンザウイルス 3 型は 1 検体 (0.2%) から、エンテロウイルス／ライノウイルス共通領域は 23 検体 (5.2%) から検出された。そのうちの 1 検体はアデノウイルスとライノウイルスの重複感染例であった。インフルエンザウイルス、RS ウイルス、コロナウイルス OC43 は全ての検体で陰性であった。

アデノウイルス陽性の検体は採取時期が 2020 年 12 月の 2 検体、および 2021 年 8 月の A 群ライノウイルスとの重複感染例 1 検体であった。パラインフルエンザウイルス 3 型は 2021 年 8 月に 1 検体から検出された (図 2)。

エンテロウイルス／ライノウイルス共通領域が検出された 23 検体について VP4/2 領域のシーケンスおよび系統樹解析による型別を実施した結果、解析可能であった 20 検体のうち 19 検体はライノウイルス、1 検体はエンテロウイルス D68 型 (2021 年 12 月) が検出された。検出されたライノウイルスの型は A 群ライノウイルス 8 種、B 群ライノウイルス 2 種、C 群ライノウイルス 5 種であった (図 2、表 1)。



*カラム上の数字は、各月の検出率 (呼吸器ウイルス陽性検体数/対象検体数 (%)) を示す。

図 2 月別の対象検体数および検出ウイルス
(2020 年 4 月～2022 年 3 月)

表1 検出ライノウイルスの遺伝子型と検出

群	型	検出年月（検出数）
A群	47型	2021年10月(1)
	58型	2021年8月(2)
	59型	2021年8月(1)*アデノウイルスとの重複
	60型	2020年6月(1)、2021年1月(1)
	61型	2020年5月(1)、7月(1)
	78型	2021年6月(1)
	82型	2020年10月(1)
	103型	2020年11月(1)
B群	6型	2021年2月(1)
	48型	2021年8月(1)
C群	6型	2021年9月(1)
	36型	2020年11月(1)
	37型	2021年5月(1)
	43型	2020年10月(1)
	53型	2021年10月(1)

考 察

COVID-19 については 2020 年の国内発生当初は「指定感染症」に指定され、その後「新型インフルエンザ等感染症」に分類されているため、医師は患者の臨床症状や疫学情報から COVID-19 を疑う場合は、検査にて診断後、直ちに発生届を提出しなければならない。呼吸器ウイルス感染症の臨床症状のみからの原因ウイルスの特定は困難で、COVID-19 の市中発生以降は、患者に何らかの呼吸器症状が認められた場合は COVID-19 を疑い、検査を実施する流れとなっている。従って、SARS-CoV-2 以外を原因とする呼吸器感染症の流行像は把握しづらく、感染症発生動向調査事業に基づく病原体定点からの検体搬入数も激減している。そこで SARS-CoV-2 以外の呼吸器ウイルスの流行状況を把握することを目的とし、SARS-CoV-2 が陰性であった上気道由来検体より他の呼吸器ウイルスを検索した。COVID-19 の国内発生当初は全国の地方衛生研究所のみが

SARS-CoV-2 遺伝子検査を実施しており、多数の検体が搬入され、当課でも 1 日の受入可能検体数を上回る検体数が搬入された。その後、民間の臨床検査会社にて SARS-CoV-2 の遺伝子検査体制が整い、検体搬入先が振り分けられたため、当課の搬入検体数は減少した。さらに、呼吸器ウイルスを検出するにあたり、対象検体を上気道由来検体としたため、SARS-CoV-2 検査において特に研究期間後半に多く搬入された唾液検体は除外対象となり、2021 年 11 月には対象検体が 0 となった。

検出された呼吸器ウイルスの主流を占めたのはライノウイルスであり、その遺伝子型は A 群ライノウイルス 8 種、B 群ライノウイルス 2 種、C 群ライノウイルス 5 種と多岐にわたっていた。検出時期は A 群ライノウイルス 58 型が 2021 年の 8 月に 2 検体から検出された以外は、同一月に重複して検出された型はなく、特定の型により流行が形成されているわけではないと考えられた。我々は以前に、呼吸器症状を呈した小児から網羅的に呼吸器ウイル

スを検出し、特に A 群ライノウイルスについては年間を通じて検出されることを報告している⁸⁾。本研究でも同様に、ライノウイルスは期間を通じて検出されており、インフルエンザや RS ウイルス感染症のように季節性ではないことが窺えた。リアルタイム PCR 法にてエンテロウイルス／ライノウイルス共通領域が検出されたにもかかわらず、遺伝子型別ができなかった 3 検体はいずれもリアルタイム PCR の Ct 値が比較的高く、検体中のウイルスゲノム量が少なかったために塩基配列の解析に必要なゲノムコピー数が得られなかったと考えられた。

本研究期間においては、大阪府内では 2021 年の 5 月中旬よりパラインフルエンザウイルス 3 型の保育所での集団発生事例を複数認め (感染症情報解析委員会委員からの情報および複数保健所からの問い合わせによる情報)、4 月中旬から 8 月中旬にかけて RS ウイルスの流行を認めた⁹⁾。全国的にも 2021 年の 5～8 月に RS ウイルスの流行があり、6～7 月にはパラインフルエンザウイルス 3 型の検出報告が増加したことが報告されている^{10,11)}。RS ウイルスやパラインフルエンザウイルスと同じく、乳幼児の下気道炎の原因となる C 型インフルエンザウイルスについて、松寄らは、2021 年 7 月に開催されたインフルエンザウイルス研究者交流の会シンポジウムにて、成人血清中の特異抗体の推移から、小児での流行期に先駆け、非流行期に成人で C 型インフルエンザウイルスの感染が起こっており、抗体の選択圧による抗原変異株が小児にもたらされて流行が起こっていることを見出し、報告している。

本研究においては、松寄らの報告とは異なり、パラインフルエンザウイルス 3 型は小児での流行期終盤の 8 月に検出されており、先行感染ではなく、小児からの感染が疑われた。また、RS ウイルスは全ての検体で陰性であったことより、両ウイルスについては、小児の流行に先行しての成人での流行を検出する結果ではなかった。さらに、小児での流行期においては、SARS-CoV-2 の感染者の年齢階層分布とは異なり、両患者の区別が容易であるため、医療機関において判断がつきやすく、紛れ込みが低かったと考えられた。

我々は COVID-19 発生前の 2017 年冬季に、健康成人のうがい液を定期的に継続して採取し、呼吸器ウイルスを網羅的に検出することで、健康状態と検出される呼吸器ウイルスの関連を調査し、無症状の期間におけるウイルス検出率は個人により差があ

るものの、平均して 9.2%、症状が認められる期間における検出率は 21.5 %であったことを報告している¹²⁾。また、コロナウイルス OC43 の流行については、小児および成人の呼吸器感染症患者の臨床検体から 2.25～8%の割合で、主に冬から春に検出されている^{8,13,14)}。本研究では、対象検体から何らかの呼吸器ウイルスが検出されたのは 5.7%と検出率は無症状ウイルス保有者の平均よりも低く、インフルエンザウイルス、RS ウイルス、コロナウイルス OC43 については研究期間を通じて検出されなかったこと、感染症発生動向調査においても呼吸器感染症の患者報告数が全体に激減している¹⁾ことより、本研究の対象となった COVID-19 感染を疑う主な年齢層に該当する成人においては、呼吸器ウイルス感染症は全体に低流行であったことが推測された。

従って、COVID-19 流行前から実施されてきた冬季の呼吸器疾患対策以上に、マスクの着用、アルコールによる手指消毒等の予防策が徹底されている事、さらに、海外からの感染者の流入を抑える目的で出入国者の制限、入国時の待機期間等が実施、継続されている事が他の呼吸器ウイルスの流行抑制にも効果を発揮していると考えられた。また、本研究で検出されたアデノウイルス、ライノウイルスはいずれもエンベロープを持たないウイルスであり、アルコール消毒に対し抵抗性を持つことから、特にエンベロープを持つウイルスであるインフルエンザウイルス、RS ウイルス、コロナウイルス OC43、パラインフルエンザウイルス 3 型については予防策が流行の抑制に一定の効果をもたらしたと考えられた。

一方、小児においては RS ウイルス感染症、パラインフルエンザウイルス 3 型感染症が流行したが、前年からの同ウイルスの流行抑制により感受性個体が蓄積し、マスク・手指衛生が徹底しにくい小児にウイルスが持ち込まれたことで大きな流行となったと考えられる。その他の流行が見られていないウイルスについても感受性個体は増加しているため、地域に流入する事で通常よりも大きな流行となる可能性がある。今後も引き続き、呼吸器ウイルスの動態の把握につとめたい。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働行政推進調査事業費補助金「ワクチンの有効性・安全性と効果的適用に関

する疫学研究」の一環として行われた。

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

利 益 相 反

本研究において、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 大阪府感染症情報センター. 感染症発生動向調査事業報告書 (年報) . http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/nenpo/2020/39/39_1-1.pdf
- 2) 森川佐依子, 廣井聡, 中田恵子, 加瀬哲男. 2019/2020 シーズンの大阪府におけるインフルエンザの流行について. 厚生労働行政推進調査事業費補助金 (新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業) ワクチンの有効性・安全性の臨床評価と VPD の疾病負荷に関する疫学研究 令和 2 年度総括・分担研究報告書 2021 年; 67-72.
- 3) 国立感染症研究所. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 関連情報「コロナウイルスとは」. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/ia/kansenn/ohanashi/9303-coronavirus.html>
- 4) 国立感染症研究所. インフルエンザ診断マニュアル (第3版) リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) による同定. 平成 26 年. 24-28.
- 5) Morikawa S, Hiroi S, Kase T. Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *J Clin Virol* 2015; **64**: 59-63.
- 6) Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* 2002; **185**: 744-754.
- 7) 大阪府. 新型コロナウイルス感染症対策サイト 大阪府の最新感染動向. <https://covid19-osaka.info/>
- 8) Morikawa S, Kohdera U, Hosaka T, Ishii K, Akagawa S, Hiroi S, Kase T. Seasonal variations of respiratory viruses and etiology of human rhinovirus infection in children. *Journal of Clinical Virology* 2015; **73**: 14-19.
- 9) 大阪府感染症情報センター. RS ウイルス感染症 <http://www.iph.pref.osaka.jp/teiten/20210128105633.html>
- 10) 国立感染症研究所. 週別診断名別 Respiratory syncytial virus 分離・検出報告数、2020&2021 年. <https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2021/data2021101j.pdf>
- 11) 国立感染症研究所. 週別診断名別 Parainfluenza virus 3 分離・検出報告数、2020&2021 年. <https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2021/data2021105j.pdf>
- 12) Morikawa S, Otsuka M, Yumisashi T, Motomura K. A longitudinal study on respiratory viral infection for healthy volunteers. *Health Science Reports* 2021; **4**: e413.
- 13) Komabayashi K, Matoba Y, Tanaka S, Seto J, Aoki Y, Ikeda T, Shimotai Y, Matsuzaki Y, Itagaki T, Mizuta K. Longitudinal epidemiology of human coronavirus OC43 in Yamagata, Japan, 2010-2017: Two groups based on spike gene appear one after another. *Journal of Medical Virology* 2021; **93**: 945-951.
- 14) Zhang S-f, Tuo J-l, Huang X-b, Zhu X, Zhang D-m, Zhou Kl. Epidemiology characteristics of human coronaviruses in patients with respiratory infection symptoms and phylogenetic analysis of HCoV-OC43 during 2010- 2015 in Guangzhou. *PLoS ONE* 2018; **13**(1): e0191789.

WEB サイトの内容は 2022 年 6 月 1 日に確認した。

Detection of respiratory viruses in SARS-CoV-2 negative specimens

- Respiratory virus trends during the COVID-19 epidemic 2020 and 2021-

Saeko MORIKAWA^a, Maki OTSUKA^{a,b}, Satoshi HIROI^a, Keiko NAKATA^a, Tetsuo KASE^b and Haruyo MORI^a

Since March 2020, influenza has not been prevalent nationwide for two influenza seasons, 2020/2021 and 2021/2022, no clinical specimens have been brought to Osaka Institute of Public Health for virus isolation. It was considered that influenza patients were tested for novel coronavirus infection (COVID-19) because each period corresponding to the influenza epidemic season was during the third and sixth waves of COVID-19, respectively. Therefore, specimens brought into our institute in 2020 and 2021 that were negative for novel coronavirus (SARS-CoV-2) were used to investigate influenza A and B viruses, RS viruses, enteroviruses, rhinoviruses and Adenovirus, coronavirus OC43, and parainfluenza virus type 3. In total, 439 specimens were tested. Adenovirus was detected in three specimens. Enterovirus or rhinovirus was detected in 22 specimens; typing by VP4/2 region sequencing was performed and of the 19 specimens available for the analysis, 18 were identified as rhinovirus and one was identified as enterovirus. One specimen collected in August 2021 was a dual infection with adenovirus and group A rhinovirus. Parainfluenza virus type 3 was detected in one specimen. All specimens were negative for influenza virus, RS virus, and coronavirus OC43.

Key words : SARS-CoV-2 negative, real-time PCR method, respiratory viral infection, infection control

^a Osaka Institute of Public Health

^b Osaka City University School of Medicine & Graduate School of Medicine

大阪府における蚊媒介ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2021 年度)

青山幾子, 池森 亮, 横田正春, 弓指孝博

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

2021 年度は 6 月から 9 月にかけて月に 1 度、府内 24 カ所で蚊の捕集を行った。捕集された雌の蚊（6 種 1559 匹、173 プール）について蚊媒介ウイルス（ウエストナイルウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス）の検出を試みたところ、ウイルス遺伝子は検出されなかった。また、死亡カラス 2 羽についてウエストナイルウイルスの検出を試みたが、ウイルス遺伝子は検出されなかった。

キーワード：蚊媒介感染症、媒介蚊、サーベイランス

主な蚊媒介感染症には、ウイルス性疾患である日本脳炎、デング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症、ウエストナイル熱および黄熱や、原虫感染症であるマラリアなどがある。そのうち、現在も日本に常在する感染症は日本脳炎のみであり、それ以外は海外からの輸入感染症である。2019 年、デング熱が世界的に大流行し、日本での患者報告数は過去最高の 461 人となった¹⁾。同様に、2019 年はチクングニア熱も世界的に流行し、国内の患者報告数も過去最高の 49 人となった^{1,2)}。その後、海外ではデング熱の流行は続いているが、新型コロナウイルス感染症の流行による渡航制限のため、輸入症例がほぼなくなり、国内における蚊媒介感染症の患者数は激減した。しかし、海外では蚊媒介感染症は現在も流行しているため、今後渡航制限が解除されると輸入感染症としての蚊媒介感染症の患者数は再び増加することが予想される。

大阪府では蚊が媒介するウイルス性感染症の浸淫状況を監視するため、2003 年度に蚊のサーベイランス調査を開始した^{3,4,5)}。2004 年にはウエストナイル熱対応指針が策定され、蚊のサーベイランス調査や、侵入後の対応を速やかに行える体制が整えられた⁶⁾。サーベイランス調査開始当初はウエスト
大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

ナイル熱、デング熱および日本脳炎を対象としていたが、その後海外でのチクングニア熱、ジカウイルス感染症の流行に伴い、これらの病原ウイルスも検出できるよう検査法を改定した⁷⁾。また、カラスはウエストナイルウイルス (WNV) の感受性が高く、WNV 感染による致死率が高いため、モニタリング調査に利用されている。大阪府においても厚生労働省の通知に従い⁸⁾、死因が不明であるカラスの死骸が同地点で 2 羽以上確認された場合、そのカラスについて WNV 検査を実施している。ここでは 2021 年度の調査結果について報告する。

調 査 方 法

1. 蚊の捕集地点および調査実施期間

大阪府管内、東大阪市内、高槻市内、豊中市内、枚方市内、八尾市内、寝屋川市内および吹田市内に計 24 カ所の捕集地点を設定し（図 1）、2021 年 6 月第 4 週から 9 月第 4 週までの期間、月に 1 回、計 4 回蚊の捕集調査を実施した。

2. 蚊の捕集方法

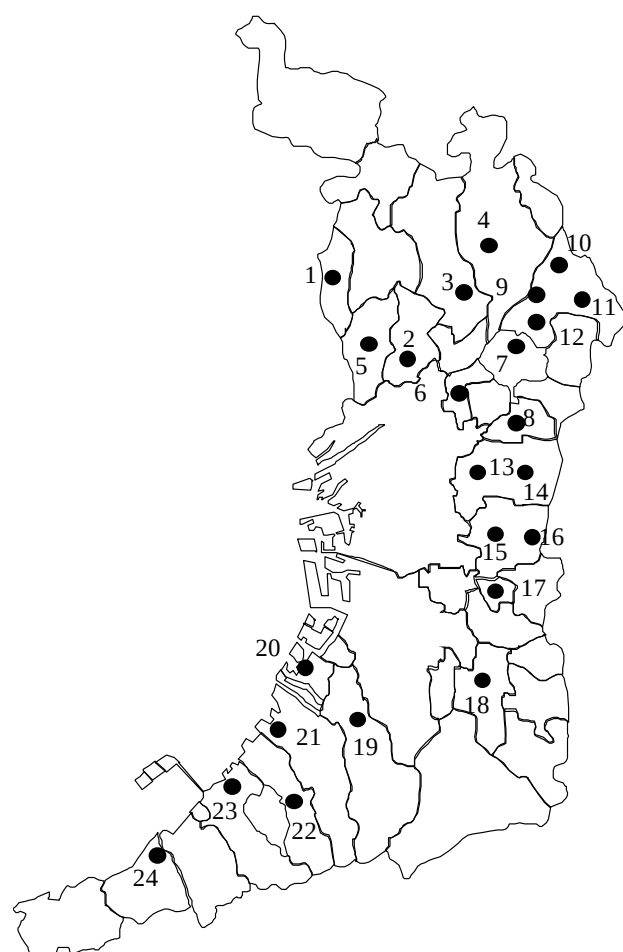
蚊の捕集には CDC ミニライトトラップ (John. W.

Hock Company) を使用し、蚊の誘引のためドライアイス (1~2kg) を併用した。トラップは調査実施日の夕刻 16~17 時から翌朝 9~10 時までの約 17 時間設置した。トラップを設置する高さは地上 1.5~2m に設定した。また枚方市の 4 地点では水曜日の午前中に 8 分間ヒト囿法にて蚊を捕集した。捕集終了時、いずれの方法でも捕集網から蚊が逃げないように注意し、蚊を捕集網ごと約 1 時間冷凍した後に、蚊を取り出して実体顕微鏡下で形態学的に雌雄の鑑別と種を同定した (9, 10)。なお *Culex pipiens pallens* (アカイエカ) と *Culex pipiens molestus* (チカイエカ) については形態学的な同定が困難であるため、それらをまとめて *Culex pipiens complex* (アカイエカ群) とした。蚊は調査日、調査地点、蚊の種類ごとにプールし、ウイルスを媒介する雌の蚊のみウイルス検査に用いた。1 地点 1 種類あたりの検体数が 50 匹を超えた場合は、50 匹ごとに複数のプールに分割した。その後、各検体は遺伝子検査時まで -30℃ で冷凍保存した。

3. 蚊からのウイルス検出

蚊からのウイルス検査は、蚊媒介ウイルスのうち、フラビウイルス科フラビウイルス属の WNV、日本脳炎ウイルス (JEV)、デングウイルス (DENV) およびジカウイルス (ZIKV)、並びにトガウイルス科アルファウイルス属のチクングニアウイルス (CHIKV) を対象として実施した。WNV は多種類の蚊が媒介種となるため、捕集された全ての種類の蚊について遺伝子検査を実施し、DENV、CHIKV は媒介種となるヒトスジシマカについて実施した。JEV、DENV、ZIKV はフラビウイルス共通領域を用いて WNV 遺伝子検査の際に同時に検出を試みた。

蚊の破碎は、2mL のマイクロチューブに検体と滅菌したステンレス製クラッシャーを入れ、0.2% ウシ血清アルブミン (BSA) 加ハanks液を 250μL 加えた後、ビーズ式破碎装置 (シェイクマスターオート、バイオメディカルサイエンス) で約 1 分間振とうして行った。破碎後、マイクロチューブをスピ



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

図1 蚊の捕集地点

ンダウンしてからクラッシャーを除去し、0.2% BSA 加ハanks液を 1 プール 30 匹未満の場合は 500μL、30 匹～50 匹の場合は 750μL 追加して攪拌した。それを 4℃13,000×g で 15 分間遠心し、その上清を 0.22μm または 0.45μm Millex フィルター(ミリポア) で濾過したものを蚊乳剤とした。このうち 200μL を全自動核酸抽出装置 magLEAD 6gC/12gC (プレジジョンシステムサイエンス) を使用して RNA 50μL を抽出した。

フラビウイルス (WNV、JEV、DENV、ZIKV) の RT-PCR は One step で実施した。RNA 抽出液 2.5μL に EmeraldAmp® PCR Master Mix (TaKaRa) 12.5μL、逆転写酵素 (Super Script IV、Thermo Fisher) 0.15μL、25μM Forward プライマー及び Reverse プライマー各 0.2μL、リボヌクレアーゼ阻害剤 (40U/μL、TaKaRa) 0.1μL を加え、蒸留水を加えて最終液量 25μL に調製した。これをサーマルサイクラー (DICE Touch、TaKaRa) を用いて、53℃10 分間の逆転写反応後、92℃ 1 分、53℃ 1 分、72℃ 1 分の PCR 反応を 40 回繰り返した。反応産物 10μL を 1.5%アガロースで電気泳動し、エチジウムブロマ이드染色によりバンドを確認した。

RT-PCR のプライマーには、フラビウイルス共通プライマー (FU1/cFD2)¹¹⁾を用いた。WNV 並びに DENV は FU1/cFD2 で検出可能であるが、さらに検出感度の良い WNV 特異的検出プライマー (WNNY 514/904)¹²⁾、及び DENV 特異的検出プライマー (Dus/Duc)¹³⁾も併用した。

CHIKV については、蚊の核酸を用いた RT-PCR で非特異バンドを認める場合があるため、リアルタイム RT-PCR を実施した¹⁴⁾。反応には QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い、RNA 抽出液 5μL にキット付属の 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix 12.5μL、QuantiTect RT Mix 0.25μL と、100μM Forward プライマー (Taq-Chik607F) 及び Reverse プライマー (Taq-Chik638P) 各 0.25μL、10μM probe (Taq-Chik672R) 0.5μL、リボヌクレアーゼ阻害剤 (40U/μL、TaKaRa) 0.05μL を加え、蒸留水にて最終液量 25μL に調製した。これをリアルタイム PCR 装置 (StepOnePlus、TaKaRa) にて、48℃ 30 分間の逆転写反応、92℃ 10 分反応の後、95℃ 15 秒、57℃ 1 分の PCR 反応を 45 回繰り返す、Threshold 0.5、Ct 値 38 未満で増幅が見られた場合に陽性とした。

4. カラスからのウイルス検出

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

結 果

1. 蚊の捕集結果について

本年度 24 地点で 4 回実施した、のべ 96 回の調査により捕集された雌の蚊は 6 種 1,559 匹であった。そのうち 1 匹は破損が大きく種の同定に至らなかった。もっとも多く捕集された蚊は *Aedes (Stegomyia) albopictus* (ヒトスジシマカ) 947 匹 (60.74%)、次にアカイエカ群 570 匹 (36.56%) で、この 2 種で捕集蚊全体の 97.3%を占めた (図 2)。次いで *Culex tritaeniorhynchus* (コガタアカイエカ) 28 匹、*Armigeres subalbatus* (オオクロヤブカ) 6 匹、*Anopheles sinensis* (シナハマダラカ) 4 匹、*Tripteroides bambusa* (キンパラナガハシカ) 3 匹が捕集された。

調査期間を通じた捕集数の推移をみると (図 3)、ヒトスジシマカは常に捕集され、7 月にピークを示した。アカイエカ群も常に捕集され、捕集数の推移は調査開始時期をピークとして減少した。これは、毎年捕集結果でも同様の傾向を示しており、アカイエカは、秋季の 9 月、10 月に比べて初夏の 6 月に捕集数が多い傾向にあると考えられた。また、ヒトスジシマカはアカイエカよりも遅れて、初夏の 6 月よりも盛夏の 7 月 8 月に捕集数

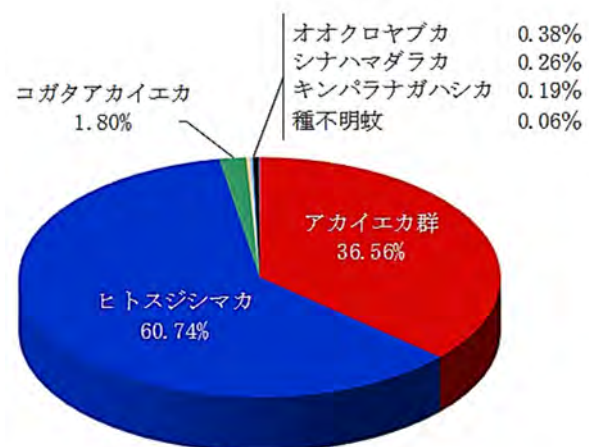


図2 捕集された蚊の比率 (24地点)

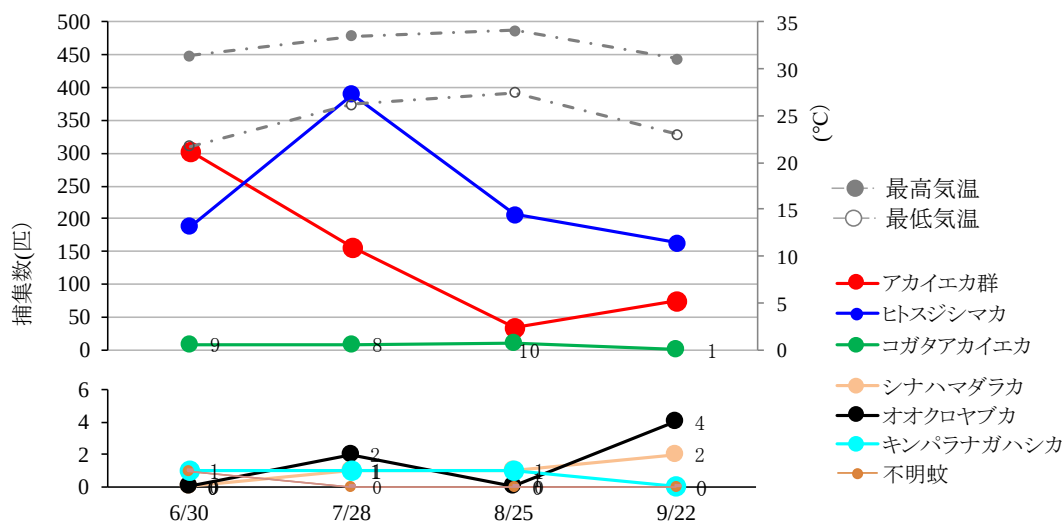


図3 蚊の捕集数の推移

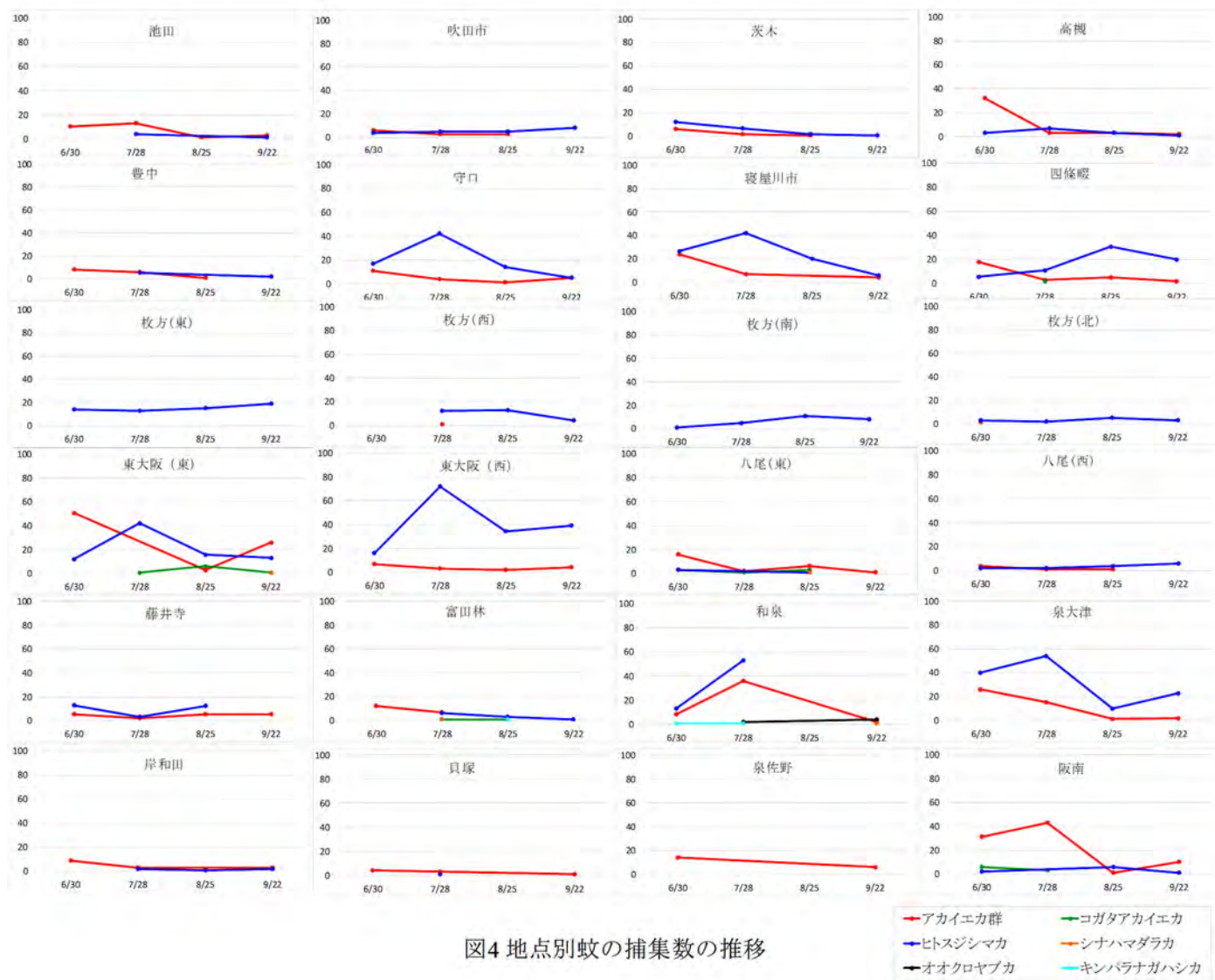


図4 地点別蚊の捕集数の推移

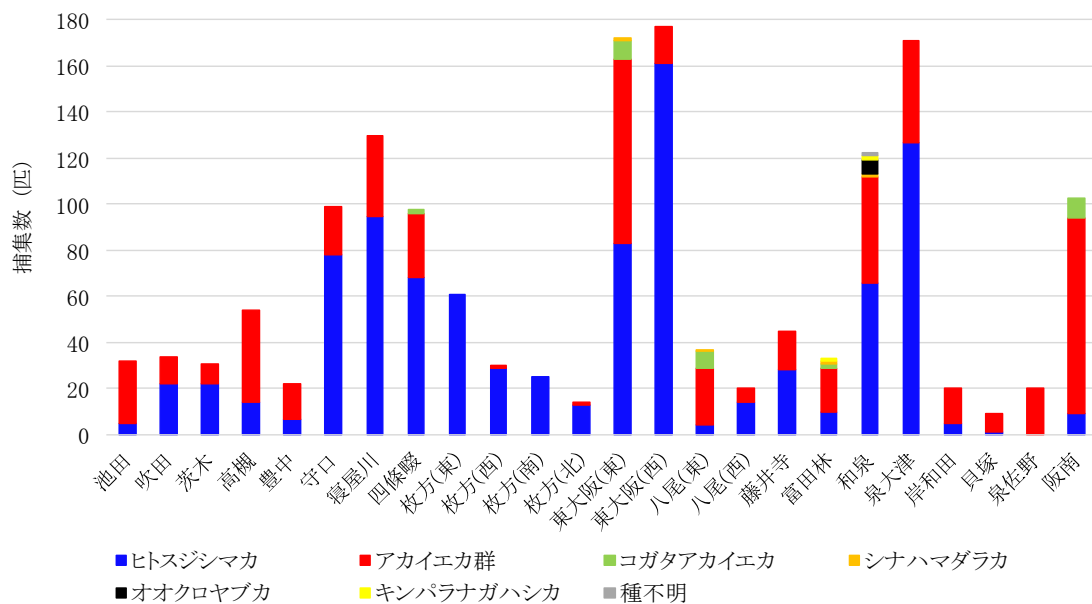


図5 地点別 蚊の捕集数

が多い傾向にあると考えられた。コガタアカイエカは毎回いずれかの地点で捕集されたが、捕集数が少ないため、ピークは示さなかった。

また、地点によって捕集数や捕集される種類に大きな差がみられた(図4、5)。24 調査地点のうち、ヒトスジシマカは23 地点、アカイエカ群は22 地点で捕集されたのに対し、コガタアカイエカは5 地点(四條畷、東大阪西・東、八尾、富田林、阪南)、シナハマダラカは4 地点(東大阪東、八尾、富田林、和泉)、キンパラナガハシカは2 地点(富田林、和泉)、オオクロヤブカは1 地点(和泉)と捕集地点が限られていた。守口、寝屋川、四條畷、東大阪西・東、和泉、泉大津ではヒトスジシマカが多く捕集され、7 月もしくは8 月に大きなピークが見られた。これらの地点での増減が全体のヒトスジシマカの捕集数にも影響したと考えられた。また、多くの地点でヒトスジシマカが優占したが、池田、高槻、八尾(東)、富田林、岸和田、貝塚、泉佐野、阪南ではアカイエカ群が最も多く捕集された。

2. 蚊のウイルス遺伝子検査結果

各地点で捕集された蚊を種類別に分け 173 プールの乳剤を作製して RT-PCR 法による遺伝子検査を実施したところ、すべての検体において WNV、JEV、DENV、ZIKV 遺伝子は検出されなかった。またヒトスジシマカの 79 プールについても、CHIKV 遺伝子は検出されなかった。

3. 死亡カラスのウイルス遺伝子検査結果

今年度回収されたカラス2羽から、WNV の遺伝子は検出されなかった。

考 察

新型コロナウイルス感染症のアウトブレイクにより、保健所業務が逼迫したため、2020 年度は蚊媒感染症のサーベイランスを中止し、2021 年度は予定の半分の回数で実施された。また、調査回数のみでなく、捕集地点数も減らしての調査となったため、29 地点で実施した 2018 年度(のべ 229 回、7 種 4,939 匹)や 2019 年度(のべ 229 回、9 種 4,648 匹)と比較すると、2021 年度の蚊の捕集数は非常に少ない結果(のべ 96 回、6 種 1,559 匹)となった。しかし、2019 年度以前のサーベイランス結果と比較して、捕集した蚊の構成割合(図6)に大きな変化はみられておらず、捕集数の減少は、蚊の発生環境の変化によるものではなく、調査回数の減少によるところが大きいと考えられた。なお、府内で蚊媒感染症が発生した場合は、捕集数の多いヒトスジシマカ、アカイエカ群、コガタアカイエカに注意が必要と考えられた。

個々の調査地点において、富田林、和泉は5 種、八尾(東)では4 種の蚊が捕集された。通常、蚊の種類により、好む生育環境は異なる。これら地点の

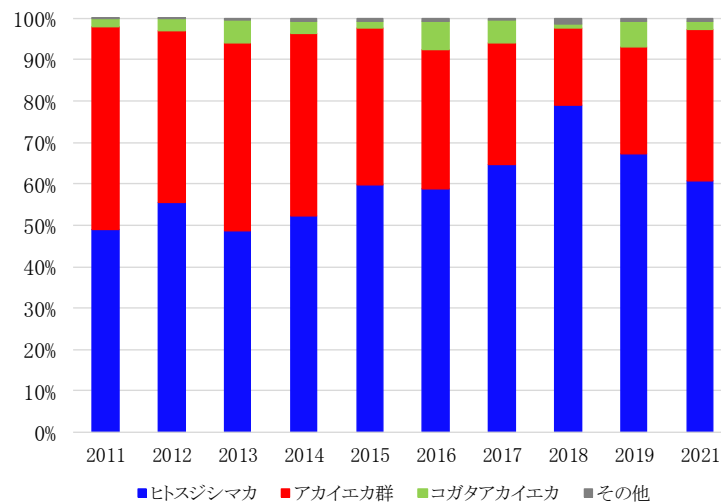


図6 捕集された蚊の構成割合（10年間）

周囲には、水田や池、竹林などが確認されており、このような環境が多種類の蚊の発生源となり、地点当たりの捕集蚊の種類が多くなったと考えられた。泉佐野は毎年ヒトスジシマカが捕集されているが、今回の調査では全地点で唯一ヒトスジシマカが捕集されなかった。その一因として、7月と8月の調査では、トラップの転倒落下による動作不良が考えられた。

大阪府では、2025年に大阪・関西万博の開催が予定されており、海外からの渡航者の増加と、それに伴い蚊媒介感染症のアウトブレイクが起きる可能性が危惧される。本サーベイランスにより府内の蚊の生息状況を把握しておくことは、感染症発生時における蚊の防除対策のうえで重要な資料となる。また、サーベイランスにおいて定期的に蚊の同定検査が実施されるため、我々研究員だけでなく、環境衛生監視員の蚊の同定技術の維持にも本サーベイランスは寄与している。

国外での蚊媒介感染症による患者数は多く、今後海外との人の行き来が再び増加すると、これらの感染症が国内に侵入する危険性は高まると考えられる。デング熱やチクングニア熱、ジカウイルス感染症を媒介するヒトスジシマカは、大阪府内のような都市環境でも多くの地点で多数捕集された。この蚊はヒトとの接触・吸血頻度が高い種類であるため、大阪府内に感染症が浸淫した場合に病原体を媒介する可能性が高く、府内どの地域でもアウトブレイクが起こる可能性がある。今後アウトブレイクが発生した場合などの緊急時に、迅速に対応するためには、本調査で実施しているような衛生研究所（大阪

健康安全基盤研究所）、保健所および行政間の連携が必要不可欠であることから、本サーベイランス事業は危機管理対策の一つとしても重要と考えられる。

謝 辞

本調査は、大阪健康安全基盤研究所、大阪府健康医療部環境衛生課および各保健所の協力のもとに大阪府健康医療部保健医療室医療対策課の事業として実施されたものであり、調査に関係した多くの方々に深謝致します。また、データの提供にご協力頂いた東大阪市保健所、高槻市保健所、豊中市保健所、枚方市保健所、八尾市保健所、寝屋川市保健所、吹田市保健所の関係者の方々に深くお礼申し上げます。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査週報.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>
- 2) Geographical distribution of chikungunya virus disease cases reported worldwide, 2019, European Centre for Disease Prevention and Control.
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/geographical-distribution-chikungunya-virus->

- disease-cases-reported-worldwide-2019
- 3) 弓指孝博, 瀧幾子, 齋藤浩一, 伊藤房子, 石田誠良, 倉持隆, 大竹徹, 奥野良信. 大阪府におけるウエストナイル熱に関する蚊のサーベイランス調査 (平成 16 年度報告). *大阪府立公衆衛生研究所所報* 2004; **42**: 57-63.
 - 4) 瀧幾子, 弓指孝博, 吉田永祥, 田中智之, 大竹徹, 奥野良信. 大阪府の住宅地域における蚊の分布調査. *大阪府立公衆衛生研究所所報* 2004; **42**: 65-70.
 - 5) 青山幾子, 山元誠司, 山口敬治, 石川温子, 弓指孝博. 大阪府における蚊媒介性ウイルス感染症に対するサーベイランス調査 (2016 年度). *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2017; **1**: 29-35.
 - 6) 大阪府健康福祉部. ウエストナイル熱対応指針 2004.
 - 7) 青山幾子, 弓指孝博, 中田恵子, 佐藤功, 佐藤良江, 倉持隆, 上澤行成, 加瀬哲男, 高橋和郎. 大阪府におけるウエストナイルウイルスに対するサーベイランス調査 (2008 年度). *大阪府立公衆衛生研究所所報* 2009; **47**: 1-7.
 - 8) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知 (2003 年 12 月 13 日). ウエストナイル熱の流行予測のための死亡カラス情報の収集等について.
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb8583&dataType=1&pageNo=1
 - 9) 弓指孝博, 青山幾子. ウエストナイル熱 (脳炎). 大阪府立公衆衛生研究所感染症プロジェクト委員会編 感染症検査マニュアル第III集 2004; 1-13.
 - 10) ウエストナイル熱媒介蚊対策研究会. ウエストナイル熱媒介蚊対策ガイドライン. 日本環境衛生センター. 2003.
 - 11) Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the Genus Flavivirus. *J Virol* 1998; **72**(1): 73-83
 - 12) 国立感染症研究所. ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル Ver.4.
<https://www.niid.go.jp/niid/images/vir1/div2/WNVLbotest.pdf>
 - 13) 国立感染症研究所. デングウイルス感染症診断マニュアル.
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf>
 - 14) 国立感染症研究所. チクングニアウイルス検

査マニュアル Ver1.1.

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/CHIKV.v1.1.pdf>

WEB サイトの内容は 2022 年 6 月 10 日に確認した。

Mosquito-borne virus surveillance in Osaka prefecture (Fiscal 2021 report)

Ikuko AOYAMA, Ryo IKEMORI, Masaharu YOKOTA and Takahiro YUMISASHI

In Osaka Prefecture, mosquito-borne arbovirus surveillance has been conducted since 2003 to monitor the invasion of imported infectious diseases caused by arboviruses, such as West Nile virus (WNV) and dengue virus (DENV), together with domestic Japanese encephalitis virus (JEV). Monitoring of Chikungunya virus (CHIKV) and Zika virus (ZIKV) has also been included in mosquito-based surveillance since 2008 and 2015, respectively.

In 2021, we performed RT-PCR examinations to detect arboviruses in a total of 173 mosquito pools from 1,559 female mosquitoes (6 species) collected at 24 points in Osaka Prefecture from June to October, and for WNV on 2 dead wild crows. All mosquito pools were negative for WNV, DENV, JEV, CHIKV, and ZIKV. The crows were negative for WNV.

Key words : mosquito-borne infection, vector mosquitoes, surveillance

透析-LC/MS 法を用いた食品中の甘味料 7 種類の一斉分析

徳永佑亮, 新矢将尚

透析-液体クロマトグラフィー/質量分析法による 7 種類 (アセスルファムカリウム、サッカリンナトリウム、ネオテーム、アドバンテーム、サイクラミン酸ナトリウム、アリテーム、ズルチン) の甘味料の一斉分析を検討した。透析液の種類と内液に添加する塩化ナトリウム量について検討した結果、透析内液に塩化ナトリウム 0.25 g (5%塩化ナトリウム溶液 5 mL)、透析外液に蒸留水を用いて攪拌子で常時攪拌させながら 10°C にて 24 時間透析を行うことで全成分の抽出が可能であった。清涼飲料水、クッキー、イチゴジャム、漬物および煮豆を用いた添加回収試験では回収率 81~117%、相対標準偏差は 8.9%以下となり、良好な結果が得られた。

キーワード：透析、LC/MS、甘味料

近年、甘味料は砂糖の代替として利用され、消費者のダイエット志向の高まりからカロリー低減を目的に様々な食品での使用が増えている。わが国では、サッカリンおよびそのナトリウム塩とカルシウム塩 (SA)、アセスルファムカリウム (AK)、ネオテーム (NEM)、アドバンテーム (ADM) 等が甘味料として許可されており、国内で使用されている。その他に、過去には使用が許可されていたが現在は禁止されているものとしてズルチン (DU)、サイクラミン酸およびそのナトリウム塩とカルシウム塩 (CY) があり、アリテーム (AL) はオーストラリアなどで許可されているが、日本では許可されていない。食品の味をショ糖に近づけるため、複数の甘味料が添加されているケースが多い。そのため、複数の甘味料を同時に分析することが求められている。

食品中の甘味料の抽出には透析法¹⁻³⁾や溶媒抽出法⁴⁾が使用されており、抽出後に固相精製を組み合わせた方法は公定法など⁵⁻⁷⁾で採用されている。前回の報告⁷⁾では、食品中の甘味料を透析-固相抽出-高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析法を用いて高感度に分析する方法を開発した。この方法は透析液に 0.01 mol/L の塩酸を用いて常温で常時振盪しながら透析した後に固相抽出する方法であり、食品中の甘味料を 0.00005 g/kg まで定量する大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

ことができる。実際の検査においては一度に多くの検体を処理・分析する必要があることから、より簡便な方法を採用しながら、感度を十分に担保した分析方法を開発する必要がある。そこで本研究では、前回の報告⁷⁾で使用している透析法を採用しつつ、固相精製を使用しない透析-液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 法を用いて上記 7 種の甘味料の一斉分析方法について検討を行った。

実 験 方 法

1. 試料

大阪市内で市販された、甘味料を使用していない清涼飲料水、クッキー、イチゴジャム、漬物 (べつたら漬) および煮豆を使用した。

2. 標準品および試薬等

アセスルファムカリウム (生化学用)、サッカリンナトリウム (特級)、サイクラミン酸ナトリウム (特級)、ズルチン (食品分析用)、アドバンテーム (食品分析用) は富士フィルム和光純薬 (株) 製、アリテーム (Reference Standard) は United States Pharmacopeial Convention, Inc 製、ネオテーム (Analytical standard) はシグマアルドリッチ社製を用いた。

メタノール（高速液体クロマトグラフ用または LC/MS 用）、ぎ酸（LC/MS 用）、塩酸（有害金属測定用）、塩化ナトリウム（特級）、炭酸ナトリウム（無水、特級）は富士フイルム和光純薬（株）製を使用した。透析用セルロースチューブは富士フイルム和光純薬（株）製ダイアライシスメンブラン（サイズ 36、平均ポアサイズ：25-50 Å、分画分子量 14,000、直径：28 mm）を使用した。精製水にはメルク社製 MiliQ Integral 3 で製造した水を、蒸留水にはメルク社製 Elix Advantage 5 で製造した水を用いた。

3. 標準原液および混合標準溶液

AK、SA、AL、CY は 1000 µg/mL になるように精製水で、NEM、DU、ADM は 1000 µg/mL になるように 80%メタノールで調製したものを標準原液とした。各標準原液 10 mL を採り、精製水を加えて 100 mL としたものを混合標準原液とした（100 µg/mL）。さらに精製水で希釈し、0.01 µg/mL～1 µg/mL の濃度系列の混合標準溶液を調製した。

4. 試験液

透析内液には 10%塩化ナトリウム含有 0.01 mol/L 塩酸溶液（塩化ナトリウムが 10%および塩酸が 0.01 mol/L になるように蒸留水で溶解・希釈）、2.5～10% 塩化ナトリウム溶液（塩化ナトリウムが 2.5、5、10% になるように蒸留水で溶解）、30%メタノール溶液（メタノールが 30%になるように蒸留水で希釈）および 10%炭酸ナトリウム溶液（炭酸ナトリウムが 10%になるように蒸留水で溶解）を用いた。透析外液には 0.01 mol/L 塩酸溶液（塩酸が 0.01 mol/L になるように蒸留水で希釈）、30%メタノール溶液および蒸留水を用いた。

5. 装置および測定条件

分析に使用した装置および測定条件を表 1 に示す。ここに記していない条件については自動最適化された条件で行った。低温インキュベーターには（株）日立製作所製 CR-32、マグネチックスターラーはアズワン（株）製 HS-360 を使用した。

6. 試験操作

均質化した試料 10 g を内容物がすべて入るように適切な長さに切った透析膜へ透析内液とともに封入した。これを 500 mL 容のガラスビーカーに吊るし透析外液で全量が 500 mL となるようにした。攪

表 1 測定条件

装置			
LC 部	Shimadzu Prominence UFLC		
MS 部	Shimadzu LCMS-2020		
LC 条件			
カラム	Inertsil ODS-4 (2.1x100 mm, 3mm)		
移動相	A: 0.1%ギ酸 / B: アセトニトリル		
グラジエント条件	B: 3% (0-4min) → 90% (18-19.5min) → 3% (21min)		
カラム温度	40°C		
流速	0.2 mL/min		
注入量	5 μL		
MS条件			
測定モード	SIM		
DL温度	250°C		
ネブライザーガス流量	1.5 L/min (N ₂)		
ヒートブロック温度	200°C		
ドライイングガス流量	15 L/min (N ₂)		
成分	保持時間 (min)	定量イオン (m/z)	イオン化モード
AK	3.9	162	ESI (-)
SA	8.6	182	ESI (-)
NEM	13.6	377	ESI (-)
ADM	12.9	457	ESI (-)
CY	10.8	178	ESI (-)
AL	11.4	330	ESI (-)
DU	11.9	181	ESI (+)

拌子を入れ、マグネチックスターラー上で攪拌させながら 10°C で 3～48 時間透析した。

透析終了後の外液を 0.45 µm メンブレンフィルターでろ過したのち、LC/MS 分析に供した。

7. 添加回収試験

清涼飲料水、クッキー、イチゴジャム、漬物および煮豆の 5 食品試料に 0.002 g/kg および 0.02 g/kg になるように混合標準液を添加した。すべて 5 併行で添加回収試験を行った。

結 果 お よ び 考 察

1. 定量下限値と検量線

LC/MS 測定において、AL と DU を除く 5 成分では 0.01 µg/mL 以上の濃度で、AL、DU においては 0.02 µg/mL 以上の濃度で標準液のピーク面積値の相対標準偏差は 10%未満であった。従って定量下限値はすべての成分において 0.02 µg/mL とした。検量線は 0.02～1 µg/mL の間で決定係数 = 0.999 以上の良好な直線性が得られた。

2. 透析内液および外液の検討

甘味料の透析時における内液と外液には様々なものが用いられている。一般的には、微生物の繁殖抑制を目的に透析液に塩酸を添加する方法（HCl 法、内液：10%塩化ナトリウム含有 0.01 mol/L 塩酸溶液 / 外液：0.01 mol/L 塩酸溶液）が多く用いられている^{1,5,7,8)}。その他には水を含むと膨潤する食品や油分を多く含む試料に対する操作性を改善する目的で透析液にメタノール溶液を用いる方法（MeOH 法）⁹⁾も使用されている。当課では SA 分析時には内液に透析補助液（10%炭酸ナトリウム溶液 0.5 mL）を添加した精製水、外液に精製水を使用する Na₂CO₃ 法、CY 分析時には内液に塩化ナトリウム 2 g を添加した精製水、外液に精製水を使用する方法¹⁰⁾を用いている。そこで、7 種甘味料を同時に抽出する際に適した透析液を検討した。検討には Na₂CO₃ 法、NaCl 法（内液：塩化ナトリウム 2 g（10%塩化ナ

トリウム溶液 20 mL）、外液：蒸留水）、HCl 法、MeOH 法（内液：30%メタノール溶液 20 mL、外液：30%メタノール溶液）を用いた。食品試料には清涼飲料水を使用して、透析開始から 3、6、16、24、48 時間後の各成分の回収率を算出した。

3～48 時間後の各成分の回収結果を図 1 に示した。NaCl 法、HCl 法においては、透析開始後 16 時間ですべての成分で回収率が 80%以上となり透析外液中に十分に溶出していることが確認できた。MeOH 法においては、CY の溶出が遅く、48 時間において他の方法がほぼ 100%溶出していたのに対して 80%程度しか溶出しなかった。Na₂CO₃ 法においては、NEM と ADM の回収率が常時 80%以下でばらつきも大きかった。NEM と ADM は強酸性やアルカリ性で不安定なアスパルテムを由来とするジペプチド型甘味料であり⁶⁾、透析液がアルカリ性である Na₂CO₃ 法においては透析液中で不安定になり、一

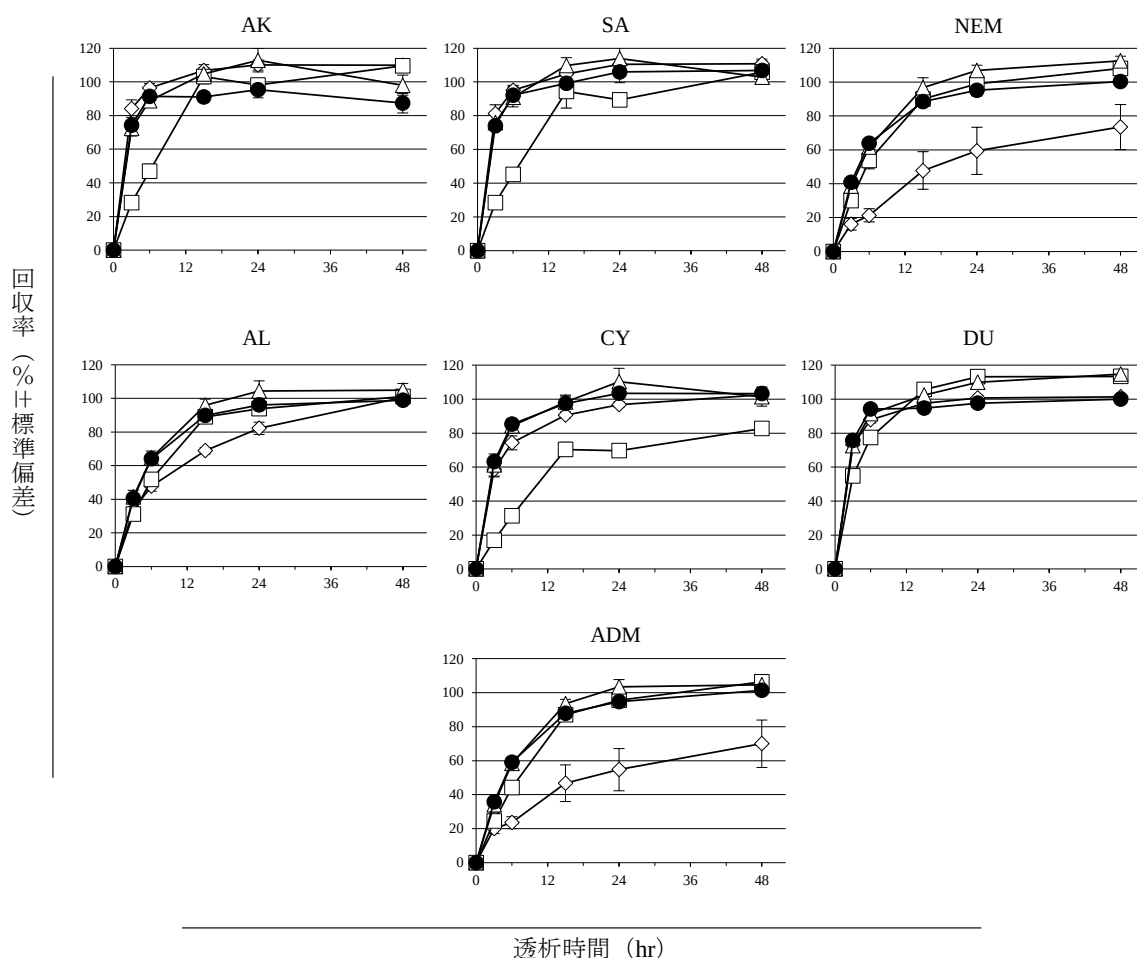


図 1 異なる透析液における清涼飲料水へ添加した 7 種甘味料の回収率の経時的変化
(●: NaCl 法、△: HCl 法、□: MeOH 法、◇: Na₂CO₃ 法、 $n=5$)

部分解されていることが考えられる。

NaCl 法と HCl 法を詳細に比較するため、16、24 時間後の回収結果を表 2 に示した。NaCl 法と HCl 法共に 24 時間後の回収率が高い傾向にあり、ほぼ同様の結果となった。従って、透析溶液作成の簡単な NaCl 法を採用し以降の検討に用いた。通常、塩酸は微生物の繁殖を抑えるために透析液に用いられるが、本法では 10℃ で透析を行うため、塩酸を使用しなくても 24 時間程度では微生物が繁殖する可能性は低いと判断した。

3. 透析時における透析内液への塩添加量の検討

甘味料の透析においては、内液に塩化ナトリウムを添加する場合、過去には 2.5%溶液が用いられていたが、AK と SA において 10%溶液を用いたところ、回収率が向上した¹¹⁾ことから現在は 10%溶液が用いられている。今回の検討においては、500 mL ガラスビーカーを使用して透析を行っており、攪拌子と透析膜との接触を防ぐために長い透析膜を使用するのが難しい。そのため、内液として添加する液量を少なくする必要がある。そこで、操作性の改善のため、かつ塩化ナトリウムによる LC/MS への影響を少なくするために添加する塩化ナトリウム量

と溶液量の検討を行った。透析内液に塩化ナトリウム 2 g (10%塩化ナトリウム溶液 20 mL)、塩化ナトリウム 1 g (10%塩化ナトリウム溶液 10 mL)、塩化ナトリウム 0.5 g (5%塩化ナトリウム溶液 10 mL)、塩化ナトリウム 0.25 g (5%塩化ナトリウム溶液 5 mL)、外液には蒸留水を用いて 24 時間透析を行った。また、透析膜に封をする際に空気を入れないために、添加する内液量が少ない場合には適量の蒸留水を透析内液に添加した。そのため、添加する塩化ナトリウム量に着目して評価を行った。食品試料には操作性のいい清涼飲料水と操作性が悪く透析の平衡に時間がかかり膨潤性のあるクッキーを用いた。

各塩化ナトリウム添加量における回収率を表 3 に示す。どの塩化ナトリウム量・透析内液量においても回収率は 91~120%の範囲内であり、大きな差は見られなかった。低塩化ナトリウム添加量における回収率が低いと報告¹¹⁾のある AK、SA においても回収率の低下は見られなかった。公定法⁹⁾では時々揺り動かしながら透析するのに対して、今回は攪拌子を用いて常時攪拌されていることから回収率が向上していると考えられる。また、透析内液量が少ない場合においては、透析膜を通して透析外液が流入してくるため、透析内液量の変化が回収率に大きな影響を与えなかったことが考えられる。従って、内液に塩化ナトリウム 0.25 g (5%塩化ナトリウム溶液 5 mL) を用いて以降の検討を行った。

4. 添加回収試験

甘味料が使用されていない 5 種類の食品試料を用いて添加回収試験を行った。0.002 g/kg と 0.02 g/kg になるように混合標準溶液を食品に添加して試験を行った。

結果を表 4 に示す。いずれの成分もすべての食品試料において、二段階の添加濃度ともに回収率は 81~117%の範囲内であり、相対標準偏差も 8.9%以下とばらつきも小さかったため、本法の有効性が示された。

また、本法における 7 種類の甘味料の定量下限値は 0.001 g/kg であった。これは、指定外甘味料 CY 分析の公定法¹²⁾の定量下限値 0.005 g/kg を下回り、指定甘味料の中で最も低い使用基準値である SA の 0.10 g/kg 未満 (菓子) を測定することができる十分な検出感度であると考えられる。

表 2 各透析時間における各甘味料の回収率

成分	透析時間 (hr)	NaCl 法	HCl 法
AK	16	91 (3.2)	105 (5.5)
	24	95 (4.9)	113 (7.0)
SA	16	99 (4.6)	110 (4.6)
	24	106 (6.4)	114 (8.1)
NEM	16	89 (1.0)	97 (5.8)
	24	95 (3.3)	107 (3.2)
AL	16	90 (1.6)	96 (3.7)
	24	96 (3.1)	105 (5.9)
CY	16	97 (4.9)	98 (3.6)
	24	103 (5.2)	110 (7.9)
DU	16	95 (1.1)	102 (3.5)
	24	98 (2.5)	110 (3.6)
ADM	16	88 (1.0)	94 (2.6)
	24	95 (0.8)	103 (4.3)

回収率(%) (相対標準偏差(%)) (n = 5)

表3 透析内液への各塩化ナトリウム添加量における各甘味料の回収率

成分	試料	塩化ナトリウム量 (g)			
		2	1	0.5	0.25
AK	清涼飲料水	92 (2.1)	98 (2.3)	101 (2.1)	104 (1.1)
	クッキー	99 (3.0)	99 (3.0)	103 (3.1)	108 (1.5)
SA	清涼飲料水	98 (2.9)	103 (1.1)	103 (1.4)	105 (0.3)
	クッキー	110 (1.5)	114 (1.2)	109 (2.3)	114 (3.5)
NEM	清涼飲料水	117 (2.0)	120 (2.2)	116 (1.9)	116 (2.0)
	クッキー	112 (3.9)	114 (2.6)	102 (2.1)	105 (3.2)
AL	清涼飲料水	97 (2.4)	98 (1.1)	98 (3.2)	98 (1.5)
	クッキー	98 (1.8)	103 (1.9)	100 (3.1)	105 (4.3)
CY	清涼飲料水	101 (2.2)	100 (2.5)	100 (1.9)	100 (2.8)
	クッキー	103 (1.9)	104 (2.0)	103 (3.0)	103 (2.3)
DU	清涼飲料水	103 (0.4)	104 (2.2)	105 (2.7)	106 (1.5)
	クッキー	99 (1.9)	102 (2.0)	98 (2.1)	99 (3.3)
ADM	清涼飲料水	110 (1.7)	110 (3.7)	106 (3.7)	108 (2.3)
	クッキー	101 (1.8)	104 (2.1)	91 (2.6)	97 (5.2)

回収率(%) (相対標準偏差(%)) (n = 5)

表4 添加回収試験結果

成分	添加濃度 (g/kg)	清涼飲料水	クッキー	イチゴジャム	漬物	煮豆
AK	0.002	90 (4.4)	94 (3.2)	100 (5.0)	90 (5.2)	104 (3.3)
	0.02	104 (1.1)	108 (1.4)	115 (1.2)	117 (2.1)	107 (3.0)
SA	0.002	100 (6.0)	108 (6.3)	110 (2.4)	100 (3.7)	116 (3.5)
	0.02	105 (2.0)	114 (3.0)	114 (1.1)	115 (3.1)	112 (2.7)
NEM	0.002	103 (3.6)	105 (4.4)	85 (2.2)	90 (8.7)	91 (2.9)
	0.02	116 (1.7)	105 (3.1)	97 (2.0)	96 (2.2)	93 (4.1)
AL	0.002	102 (3.2)	108 (3.0)	88 (1.3)	81 (2.5)	85 (4.2)
	0.02	98 (1.5)	105 (4.1)	94 (1.9)	99 (1.0)	91 (2.6)
CY	0.002	100 (3.7)	105 (3.5)	94 (3.7)	90 (2.9)	104 (2.5)
	0.02	100 (2.8)	103 (2.3)	100 (1.6)	104 (3.5)	98 (2.9)
DU	0.002	105 (2.3)	103 (2.9)	82 (8.9)	98 (2.1)	108 (3.2)
	0.02	106 (1.5)	99 (3.3)	103 (0.4)	109 (2.2)	108 (1.7)
ADM	0.002	105 (2.4)	102 (5.1)	83 (3.6)	87 (3.9)	86 (3.0)
	0.02	108 (2.1)	97 (5.4)	94 (3.2)	81 (3.3)	90 (1.7)

回収率(%) (相対標準偏差(%)) (n = 5)

ま と め

7種類の甘味料のLC/MSによる分析において、抽出のための透析液について検討を行った。透析内液に塩化ナトリウム 0.25 g (5%塩化ナトリウム溶液 5 mL)、透析外液に蒸留水を用いて 10°C 下で 24 時間常時攪拌させて透析することで、良好な回収率が得られた。また、食品試料 5 種への添加回収試験の結果はすべての成分で良好であった。本法は、1) 微生物の繁殖抑制を目的として低温で透析を行っていること、2) 内液は塩化ナトリウム溶液、外液は精製水を使用するため試薬調製が簡単なこと、3) 固相精製を使用せず分析できることを特徴としており、従来の方法と比較して簡便に食品中の甘味料一斉分析でき、日常的な検査への寄与が期待される。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 小林美紀, 寺田久屋, 中島正博. HPLC および LC-MS/MS による加工食品中の超高甘味度甘味料アドバンテーム定量法. *食品衛生学雑誌* 2015; **56**(1): 14-18.
- 2) 澤崎加奈恵, 平井知里, 山岸浩. 透析および固相抽出による食品中の保存料および甘味料の分析. *福井県衛生環境研究センター年報* 2015; **14**: 40-44.
- 3) 松本ひろ子, 平田恵子, 坂牧成恵, 萩野賀世, 牛山博文. サイクラミン酸, ズルチンの HPLC による定量及び LC/MS/MS による確認と 8 種甘味料の系統的分析. *東京都健康安全研究センター研究年報* 2008; **59**: 129-135.
- 4) 鶴田小百合, 坂本智徳, 赤木浩一. 固相抽出—LC-MS/MS 法による食品中の甘味料 12 種および保存料 9 種の一斉分析. *食品衛生学雑誌* 2012; **54**(3): 204-212.
- 5) 厚生省生活衛生局食品化学課. 第2版 食品中の食品添加物分析法 2000. 社団法人日本食品衛生協会; 2000. 142-145.
- 6) 日本薬学会編. 衛生試験法・注解 2020. 金原出版; 2020. 383-403.
- 7) 新矢将尚, 寺谷清香, 山口之彦. 透析-固相抽出

-LC-MS/MS 法による食品中の人工甘味料の一斉分析. *大阪健康安全基盤研究所研究年報* 2020; **4**: 61-69.

- 8) 佐藤環, 小木曾俊孝, 新谷依子, 堀就英, 梶原淳睦. 飲料中の指定外甘味料ズルチンの HPLC による定量試験法及び LC-qTOF/MS による簡便かつ迅速な確認試験法の検討. *福岡県保健環境研究所年報* 2017; **44**: 77-81.
- 9) 田原正一, 山本純代, 山嶋裕季子, 宮川弘之, 植松洋子, 門間公夫. 食品中の甘味料分析における迅速な改良透析法の開発 (第2報). *食品衛生学雑誌* 2017; **58**(3): 124-131.
- 10) 山口瑞香, 尾花裕孝. LC-MS によるサイクラミン酸分析法の検討. *大阪府立公衛研究所報* 2011; **49**: 7-10.
- 11) 小林千種, 中里光男, 牛山博文, 川合由華, 立石恭也, 安田和男. HPLC による食品中の合成甘味料の一斉分析法. *食品衛生学雑誌* 1999; **40**(2): 166-171.
- 12) 平成 15 年 8 月 29 日付厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発第 0829009 号, サイクラミン酸に係る試験法について, 2003.

Simultaneous analysis of seven artificial sweeteners in foods by dialysis and LC/MS

Yusuke TOKUNAGA and Masanao SHINYA

A simultaneous analysis was performed for seven sweeteners (acesulfame K, saccharin Na, neotame, advantame, Na cyclamate, alitame, dulcin) in various foods by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) after dialysis. All sweeteners were extracted by dialyzing for 24 hours at 10°C with 5 mL of 5% NaCl (0.25 g NaCl) as the inner dialysate under constant stirring with a stirring device. The results of spike recovery tests using soft drink, cookie, strawberry jam, pickles, and boiled beans showed satisfactory recovery within the range of 81–117%, and the relative standard deviations were <8.9%.

Key words : dialysis, LC/MS, sweetener

食品中の亜硝酸根検査法の妥当性評価

野村千枝, 栗津 薫, 紀 雅美, 新矢将尚

亜硝酸根の検査法において、これまでガラス製のメスフラスコの汚染と試験溶液の濁りを防ぐために試料をホモジナイズ後に残渣を入れずに定容していた。今回、ディスポーザブル遠心管を用いて、残渣ごと定容することにした。検査方法について、3種類の食品を用いて「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に準拠した妥当性評価試験を行ったところ、良好な結果が得られた。

キーワード：食品、亜硝酸根、比色法、妥当性評価

亜硝酸ナトリウムは食肉製品や魚卵等に発色剤の用途で使用が認められている発色剤である。使用基準は亜硝酸根（亜硝酸イオン NO_2^- ）としての最大残存量で、いくらやすじこ、たらこでは 0.0050 g/kg 以下、魚肉ソーセージおよび魚肉ハムでは 0.050 g/kg 、食肉製品では 0.070 g/kg 以下と定められている¹⁾。

食品衛生検査指針²⁾（以下指針）では、食品中の亜硝酸根分析は、弱アルカリ条件下で抽出し、除タンパク処理後、ジアゾ化による発色を利用した比色法が記載されている。当所においても、指針に記載された亜硝酸根定量法を基にして著者らが一部改良を加えた検査法^{3,4)}を実施してきた。従来の検査において、ガラス製のメスフラスコの汚染と試験溶液の濁りを防ぐため、ろ液を定容していた。今回、ガラス製のメスフラスコに替えてディスポーザブル遠心管を用いて、指針²⁾と同様に残渣ごと定容することにした。また 5A と 5C ろ紙を重ねてろ過を行い試験液の濁りを防ぐことにした。

我が国では、食品中の食品添加物を対象とした検査法に対する妥当性評価の指針がないことから、本法について「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁵⁾（以下ガイドライン）に基づく妥当性評価試験を行ったところ良好な結果が得られたので報告する。

実 験 方 法

1. 試料

亜硝酸根（発色剤）の使用表示のないたらこ、魚肉ソーセージ、ベーコンを用いた。

2. 試薬および標準溶液

標準品は試薬特級の亜硝酸ナトリウム（富士フィルム和光純薬製）を用いた。ろ紙は定量ろ紙 No.5A および No.5C（アドバンテック製）をヒダ折りにして用いた。水は Elix または Milli-Q 製造装置（メルク製）により精製したものを用いた。0.5%水酸化ナトリウム水溶液、9%酢酸亜鉛水溶液、0.5%スルファニルアミドの 50%塩酸溶液、0.12%ナフチルエチレンジアミン水溶液はいずれも試薬特級の試薬を用いて調製した。

(1)標準原液

亜硝酸ナトリウム 150 mg を正確に量り水に溶解して 100 mL とした（亜硝酸根として $1,000 \mu\text{g/mL}$ を含む）。これを標準原液とした。

(2)標準溶液

標準原液を適宜水で希釈して $0.5 \mu\text{g/mL}$ 標準溶液を調製した。この $1\sim 20 \text{ mL}$ を検量線作成に用いた。

(3)添加用標準溶液

魚肉ソーセージ添加用 ($250 \mu\text{g/mL}$)：標準原液を 25 mL 採り水で 100 mL に定容した。

たらこ添加用 (25 µg/mL) : 上記 250 µg/mL 標準溶液を 10 mL 採り水で 100 mL に定容した。
ベーコン添加用 (350 µg/mL) : 亜硝酸ナトリウム 52.5 mg を正確に量り水に溶解して 100 mL とした。

3. 器具および装置

遠心管は容量 50 mL のポリプロピレン (PP) 製 (IWAKI 製) を用いた。フードプロセッサーは MK-K61 (パナソニック製) を用いた。高速ホモジナイザーはポリトロン PT10 (KINEMATICA 製) を使用し、シャフトは PT10S を用いた。高速冷却遠心機は、KUBOTA5922 (久保田製作所製) を使用し、ローターは RA-410M3 を用いた。恒温振とう槽は BW100 (ヤマト科学製) を用いた。分光光度計は UV-3600 (島津製作所製) を用いた。

4. 試験溶液の調製

操作フローを図に示した。均質化した試料 2.5 g を遠心管に量り、約 80℃ の温水 20 mL を加え、ホモジナイズした。シャフトに付着した残渣は温水約 2.5 mL を用いて 5 回洗浄し、洗液を遠心管にあわせた。さらに 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 5 mL および 9% 酢酸亜鉛水溶液 5 mL を加えてよく振り混ぜた後、時々振り混ぜながら 80℃ の水浴中で 15 分間加温した。次に氷中で 30 分間冷却した後、水で定容した。4℃ で 20 分間、遠心分離 (5,000 rpm) した。上清をろ紙 (No.5A の下に No.5C を重ねたもの) で遠心管にろ過し、試験溶液とした。

5. 発色操作

試験溶液 (たらこは 10 mL、魚肉ソーセージとベーコンは 2 mL) を 25 mL 容のメスフラスコに正確に採取し、0.5% スルファニルアミドの 50% 塩酸溶液 1 mL を加えよく混和した。次に、0.12% ナフチルエチレンジアミン水溶液 1 mL を加えてよく混和した。これに水を加えて正確に 25 mL とした後、室温で 20 分間静置した。

同時に 0.5 µg/mL 標準溶液を 25 mL 容のメスフラスコに 1、2、5、10、15、20 mL 正確に採取し同様の操作を行い、検量線を作成した。

6. 定量

静置後、分光光度計を用いて波長 540 nm の吸

光度を測定し、予め作成した検量線より亜硝酸根濃度を求めた。試料 2.5 g を採取し本法に従い試料液 20 mL を発色させた場合の定量下限値は 0.0005 g/kg である。

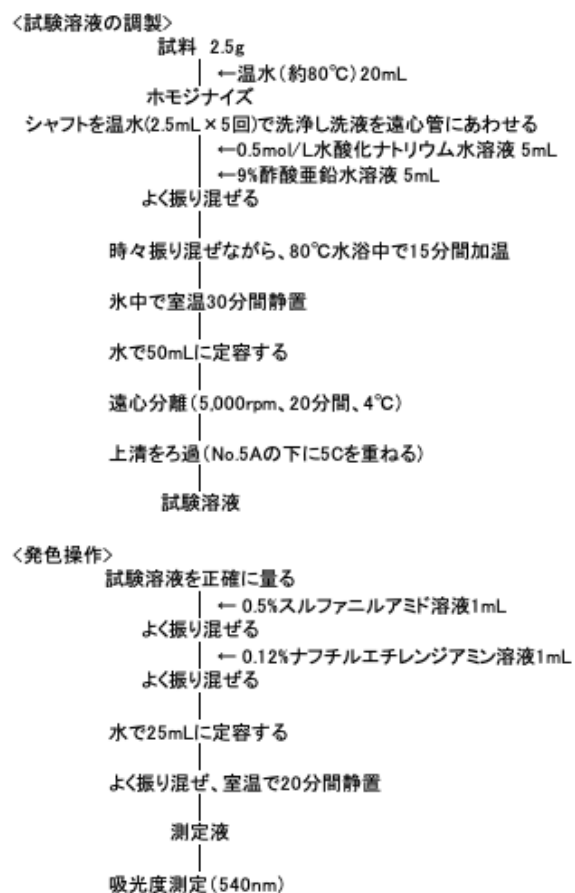


図 操作フロー

7. 妥当性確認

食品添加物の分析法は、「食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号) の第 2 添加物 通則 8¹⁾ において、「規定の方法に代わる方法で、それが規定の方法以上の精度のある場合には、その方法を用いることができる。ただし、その結果について疑いのある場合には、規定の方法で最終判定を行う。」と定められているため、公定法以外で検査を実施することが可能であるが、妥当性評価の手法については示されていない。そこで、食品添加物と検査の目的や分析対象の性質も比較的近い農薬等の妥当性評価手法 (ガイドライン)⁵⁾ に準拠し、妥当性評価を行った。本法について、たらこ、魚肉ソーセージ、ベーコンを

用いた。添加回収試験は基準値濃度（たらこは 0.005 g/kg、魚肉ソーセージは 0.05 g/kg、ベーコンは 0.07 g/kg）を添加した。試料 2.5 g に添加用標準溶液（たらこは 25 µg/mL、魚肉ソーセージは 250 µg/mL、ベーコンは 350 µg/mL）0.5 mL を添加し、30 分間静置したものを用いた。同時に標準を添加しない試料（ブランク試料）の分析も行った。分析者 2 名が、1 日 1 回（2 併行）、3 日間の枝分かれ実験を行い、真度、併行精度および室内精度を評価した。

結 果 お よ び 考 察

1. 試験溶液の調製

ガラス製のメスフラスコを用いた定容では、試料の種類によっては、容器の内壁が白濁し、洗浄が困難となる場合があった。ディスポーザブルの遠心管を使用することにより、容器の汚染を考慮する必要がなくなり、指針²⁾と同様に残渣ごと定容が可能となった。

また、ろ過において、No.5A ろ紙のみを使用した場合、一部の魚卵製品のブランク試料において定量下限値を超えて検出することがあった（無添加いくら 0.0065 g/kg など）。しかし、No.5C ろ紙を重ねて使用することにより妨害物質が除去され定量下限値未満となった。そこで本法では No.5A の下に No.5C のろ紙を重ねてろ過を行うこととした。

2. 妥当性評価試験

7. 妥当性確認方法に従い妥当性評価試験を行った。

(1)検量線

5. 発色操作および 6. 定量に従い検量線を作成した。分析者 2 名が 3 日間で各 1 回、計 6 回作

成した検量線の決定係数 (R^2) は 0.9998~1.0000 であった。

(2)選択性

ブランク試料を本法に従って分析したところ、定量下限値 (0.0005 g/kg) を超えて検出しないことを確認した。

(3)真度、併行精度および室内精度

表に示すとおり、ガイドラインの目標値（添加濃度 0.1 µg/g のとき：真度 70~120%、併行精度 <10%、室内精度 <15%）を満たす良好な結果が得られた。検査に適応可能と考える。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 食品、添加物等の規格基準. 昭和 34 年 12 月 28 日付厚生省告示第 370 号
- 2) 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針食品添加物編. 日本食品衛生協会; 2003; 142-148.
- 3) 栗津薫, 北川幹也, 尾花裕孝, 田中之雄. ジアゾ化法による食品中の亜硝酸根定量法の検討. 大阪府立公衛研所報 2007; **45**: 47-52.
- 4) 野村千枝, 吉光真人, 阿久津和彦, 尾花裕孝. 食品中亜硝酸根の小スケール迅速分析法の検討. 大阪府立公衛研所報 2009; **47**: 17-20.
- 5) 平成 22 年 12 月 24 日付厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食安発 1224 第 1 号

表 妥当性評価結果

試料	添加濃度 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 RSD(%)	室内精度 RSD(%)
たらこ	0.005	92	1.0	1.5
魚肉ソーセージ	0.050	99	1.0	1.0
ベーコン	0.070	96	1.1	2.3

Results of validity study of a nitrite inspection method for food

Chie NOMURA, Kaoru AWAZU, Masami KI and Masanao SHINYA

In the test method used to detect nitrite in food at our laboratory, the test solution has been prepared after removing the residue of sample homogenization in order to prevent turbidity of the test solution. However, this method was problematic due to low recovery rates. In the present study, as a result of a modification in which the test solution was prepared without removing the residue, the recovery rate was improved. Good results were obtained in a validation test of the present method with three types of food in accordance with the “Guidelines for the validation of analytical methods for testing agricultural chemical residues in food.”

Key words : food, nitrite, colorimetric method, validation study

畜水産物中の有機塩素系農薬分析法の改良と妥当性評価

國頭茉莉, 山口瑞香, 栗津 薫, 永吉晴奈, 福井直樹, 新矢将尚

畜水産物中に残留する有機塩素系農薬の分析法を検討した。試料からの抽出はヘキサン/アセトン混液で2回繰り返し、精製には酸化ジルコニウムを化学結合させたシリカゲルおよびエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムを用いた。測定にはガスクロマトグラフ-タンデム質量分析計(GC-MS/MS)を使用した。牛乳、牛肉、豚肉、鶏肉および魚(鮭)を試料として添加回収試験を行ったところ、魚試料中の一成分を除き、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：畜水産物、有機塩素系農薬、ガスクロマトグラフ-タンデム質量分析計、妥当性評価

有機塩素系農薬である BHC(α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC)、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル(ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシサイド)、DDT(4,4'-DDT、4,4'-DDE、4,4'-DDD、2,4'-DDT)、クロルデン(*cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、オキシクロルデン)、ヘキサクロロベンゼンは難分解性のため自然環境中に残留し、生物に様々な影響を及ぼしていることが明らかになっている。そのため、これらの大部分が「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs 条約)において規制されている。それに伴い、これらの化学物質は我が国でも「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」において第一種特定化学物質に指定されており、製造や輸入が原則禁止され、また食品中の残留基準が設定されている。当所では従来食肉、牛乳試料中の分析を行ってきた。しかし、従来法¹⁾では内標準物質の一つである ^{13}C -アルドリンの回収率が40%近傍となることが度々見受けられた。妥当性評価ガイドライン²⁾では、サロゲートを使用した場合には、サロゲートの回収率が40%以上であることが求められている。分析時には常にサロゲートの回収率が40%以上となるよう分析法の改良が求められた。

そこで今回、従来法の改良を行った。すなわち、試料からの溶媒による抽出回数を1回から2回に増やし、アセトニトリル/ヘキサン分配工程を大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学1課

廃止し、精製には酸化ジルコニウムを化学結合させたシリカゲルとエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラム(PSA)を採用した。これにより良好な結果が得られたので報告する。

実 験 方 法

1. 試料および試薬等

(1)試料：市販の牛乳、牛肉、豚肉、鶏肉、鮭を用いた。

(2)標準品：BHC類は富士フイルム和光純薬工業(株)製、安定同位体(^{13}C)で標識された ^{13}C - δ -BHC、 ^{13}C -2,4'-DDEおよび ^{13}C -アルドリンは、Cambridge Isotope Laboratory社製、その他の標準品(アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシサイド、4,4'-DDT、4,4'-DDE、4,4'-DDD、2,4'-DDT、*cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、オキシクロルデン、ヘキサクロロベンゼン)はDr.Ehrenstorfer社製を用いた。

(3)精製用固相：酸化ジルコニウムを化学結合させたシリカゲルを使用する酸化ジルコニウム剤には、以下の①～③を使用した。いずれもSigma-Aldrich社製を用いた。

①Z-Sep分散固相：HybridSPE-Phospholipid dSPE 500 mg

②Z-Sep固相抽出カラム：HybridSPE Phospholipid 500 mg/6 mL

③Z-Sep/C₁₈分散固相：Supel QuE Z-sep/Discovery DSC-18 dSPE 120 mg/300 mg

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

(4)試薬等：残留農薬試験用アセトン、ヘキサン、無水硫酸ナトリウム、アセトニトリルは富士フイルム和光純薬工業(株)製を使用した。

2. 装置および測定条件

(1)装置

高速ホモジナイザーは KINEMATICA 社製ポリトロン PT3100、遠心機は日立工機(株)製 himac CF7D2、エバポレーターは東京理化工機(株)製 DPE-2130、GC-MS/MS は Agilent 社製 7010GC-MS/MS、高速振とう器は東京理科器械(株)製 CM-1000 を使用した。

(2)GC-MS/MS 測定条件

分析カラム：VF5-MS(30 m×0.25 mm. 膜厚 0.25 μm)(Agilent 社製)

昇温：50°C(1 min)-25°C/min-120°C-10°C/min-280°C(9 min)

キャリアーガス：ヘリウム

流量：1.5 mL/min

注入量：1 μL または 0.5 μL

イオン化モード：EI

測定モード：選択反応モニタリング(SRM)

イオン源温度：280°C

モニターイオン：化合物ごとの条件は表 1 に示した。

3. 試験溶液の調製

(1)抽出

牛肉、豚肉、鶏肉および鮭の筋肉試料は細切後、フードプロセッサーで均一化し、牛乳はそのまま試験に供した。試料 5 g を 50 mL 容遠沈管に秤取し、内標準物質(50 ng)およびヘキサン/アセトン混液(2:1)15 mL を加えて高速ホモジナイザーで 30 秒以上混合粉碎した(試験品が牛乳の場合は 5 分間振とう混合)後、これを 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を、無水硫酸ナトリウムを半分程度充填したフィルターローでろ過し 100 mL 容ナス型フラスコに捕集した。さらに残渣にヘキサン/アセトン混液(2:1)15 mL を加えて高速振とう器で 5 分間振とうし、これを 3,000 rpm で 5 分

表 1 SRM トランジションおよび内標準物質

	トランジション1(定量)		トランジション2(定性)		内標準物質
	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	
α-BHC	181	145	219	183	¹³ C-δ-BHC
β-BHC	181	145	219	183	¹³ C-δ-BHC
γ-BHC	181	145	219	183	¹³ C-δ-BHC
δ-BHC	181	145	219	183	¹³ C-δ-BHC
Heptachlor	272	237	274	239	¹³ C-δ-BHC
Heptachlor epoxide A	217	182	253	218	¹³ C-2,4'-DDE
Heptachlor epoxide B	353	263	355	265	¹³ C-2,4'-DDE
Aldrin	263	193	257	222	¹³ C-Aldrin
Dieldrin	277	206	279	243	¹³ C-2,4'-DDE
Endrin	263	193	265	230	¹³ C-2,4'-DDE
4,4'-DDE	246	176	248	176	¹³ C-2,4'-DDE
4,4'-DDD	235	165	237	165	¹³ C-δ-BHC
2,4'-DDT	235	165	237	165	¹³ C-2,4'-DDE
4,4'-DDT	235	165	237	165	¹³ C-2,4'-DDE
cis-Chlordane	375	266	373	266	¹³ C-2,4'-DDE
trans-Chlordane	375	266	373	266	¹³ C-2,4'-DDE
Oxy-chlordane	185	149	187	151	¹³ C-2,4'-DDE
HCB	284	249	284	214	¹³ C-δ-BHC
¹³ C-δ-BHC	187	151	225	189	-
¹³ C-2,4'-DDE	258	188	260	188	-
¹³ C-Aldrin	270	200	305	270	-

間遠心分離した。上清を 1 回目と同様にろ過し、ナス型フラスコに捕集して 1 回目のろ液と合わせた。ろ液をロータリーエバポレーターおよび窒素吹付を用いて溶媒留去し、アセトニトリルで 10 mL に定容した(抽出液)。

(2)酸化ジルコニウム剤による精製

抽出液 10 mL のうち 6 mL(試料 3 g 相当)を、酸化ジルコニウム剤 500 mg をあらかじめ分注した遠沈管に採取し、5 分間振とう後 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清 4 mL(試料 2 g 相当)をナス型フラスコに採取しロータリーエバポレーターおよび窒素吹付を用いて溶媒留去した。溶媒留去後ヘキサン/アセトン混液(1:1)2 mL に再溶解した(酸化ジルコニウム精製液)。

(3)PSA による精製

ヘキサン/アセトン混液(1:1)10 mL でコンディショニングした PSA ミニカラム(500 mg)に、酸化ジルコニウム精製液全量を負荷し、さらにヘキサン/アセトン混液(1:1)20 mL を注入し、ナス型フラスコに溶出液を全量採取した。溶出液をロータリーエバポレーターで 2 mL 以下に濃縮し、ヘキサン/アセトン混液(1:1)で 2 mL に定容したものを GC-MS/MS 用の試験溶液(試料 1 g/mL 相当)とした。

4. 検量線の作成

内標準物質(¹³C-δ-BHC、¹³C-2,4'-DDE および ¹³C-

アルドリン)を含むマトリックス入り標準溶液を試料ごとに調製した。各標準溶液は、ブランク試料から調製した試験溶液に各農薬を 0.001～6 ppm になるように添加し、いずれの濃度においても、内標準物質を各 0.01 ppm 含むように調製した。定量は、添加濃度にあわせて、マトリックス入り標準溶液による内標準法(検量線 4 点以上)により実施した。

5. 酸化ジルコニウム剤を用いた精製の検討

分散固相の Z-Sep と Z-Sep/C₁₈ を用いて標準品および内標準物質の回収率の比較を行った。標準品と内標準物質を各 0.01 ppm 含むよう調製したアセトニトリル溶液 10 mL を各分散固相と混合し 5 分間振とう後、3000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清 2 mL をろ過して N₂ 吹付でヘキサンに溶媒を置換したものを試験液とし、GC-MS/MS で測定した。Z-Sep の分散固相と固相抽出カラムの比較については、カレイを試料とし、前述の試験溶液の調製の通りに操作を行った。

6. 抽出方法の検討

(1)抽出溶媒の検討

牛乳を試料として添加回収試験を行った。アセトニトリル 10 mL と QuEChERS 抽出塩(Restek 社)で抽出した。酸化ジルコニウム剤を用いた精製の工程で、分散固相の Z-Sep を使用する代わりに、固相抽出カラムの Z-Sep を使用したことを除いて、前述の試験溶液の調製の通りに操作を行った。

(2)抽出回数の検討

ヘキサン/アセトン混液(2:1)30 mL で 1 回抽出する方法と、ヘキサン/アセトン混液(2:1)15 mL で 2 回抽出する方法を比較した。抽出以降の工程は、6.(1)の検討同様に操作を行った。

7. 妥当性評価の実施

妥当性評価ガイドライン²⁾に従って実施した。

(1)牛乳および牛肉

分析者 5 名が 2 併行で 1 日間、枝分かれ試験を実施した。各試料(牛乳、牛肉)に 0.005 ppm および食品中に設定されている残留基準値となるよう標準溶液を添加(以降、基準値添加)した。

(2)豚肉、鶏肉および鮭

基準値添加では、分析者 5 名が 2 併行で 1 日間、

枝分かれ試験を実施した。0.005 ppm 添加では、分析者 1 名が 6 併行で 1 日間実施した。

結 果 お よ び 考 察

1. 分析法の改良

(1)酸化ジルコニウム剤を用いた検討

従来法の前処理では、脱脂を目的としてアセトニトリル/ヘキサン分配を行っていた。しかし、脂質と共に廃棄するヘキサン層にはアルドリンおよび ¹³C-アルドリンの一部が移行しており、これが回収率の低下の一因と推察された。そこで、アセトニトリル/ヘキサン分配の工程を省略し、酸化ジルコニウム剤と PSA ミニカラムの組合せに限定した精製方法の検討を行った。

分散固相による内標準物質の回収率の結果を表 2 に示した。いずれも回収率は 70%以上であり、Z-Sep での回収率は Z-Sep/C₁₈ よりも良好であった。Z-Sep/C₁₈ では内標準物質が吸着することで回収率が低下すると考えられるため、Z-Sep を採用することとした。

続いて、Z-Sep の分散固相と固相抽出カラムについて検討を行った。内標準物質の回収率の結果を表 3 に示した。Z-Sep の分散固相での回収率は固相抽出カラムより高いことから、分散固相を採用することとした。アセトニトリル/ヘキサン分配を省略し、酸化ジルコニウム剤(Z-Sep 分散固相)と PSA ミニカラムの組合せに限定した精製工程に改めることにより、内標準物質の回収率の低下を回避できる可能性が示唆された。また、今回改良した方法で作成したマトリックス検量線と

表 2 Z-Sep および Z-Sep/C₁₈ での回収率(%)

	Z-Sep	Z-Sep/C ₁₈
¹³ C- δ -BHC	89	73
¹³ C-2,4'-DDE	109	88
¹³ C-Aldrin	95	76

表 3 Z-Sep 分散固相および固相抽出カラムでの回収率(%)

	分散固相	固相抽出カラム
¹³ C- δ -BHC	96	82
¹³ C-2,4'-DDE	80	73
¹³ C-Aldrin	71	66

従来法のそれとを比較して、マトリックス効果に大きな差は見受けられなかった。そのため、アセトニトリル/ヘキサン分配を省略しても、脱脂に問題はないと考えられた。

(2)抽出方法の検討

牛乳を試料として、アセトニトリルとQuEChERS抽出塩またはヘキサン/アセトン混液(2:1)を用いて抽出した場合の内標準物質の回収率の結果を表4に示した。アセトニトリルとQuEChERS抽出塩による抽出方法では¹³C-アルドリンの回収率が47%と低い結果となった。この方法では内標準物質の回収率が改善されないことがわかったため、抽出溶媒は従来通り、通知の一斉試験法の抽出溶媒であるヘキサン/アセトン混液(2:1)を採用することとした。

次に、抽出溶媒を一定(30 mL)にして抽出回数を1回から2回に増やし、抽出率が向上するか検討した。ヘキサン/アセトン混液(2:1)30 mLで1回抽出した方法と15 mLで2回抽出した結果を比較した。表5に添加回収試験の結果を示した。すべての物質で同等か2回抽出の方が良好な結果が得られた。また、1回抽出では回収率が79%に留まった4,4'-DDTにおいても、2回抽出にすることで87%に向上した。また、内標準物質の回収率

表4 内標準物質の回収率(%)

	回収率(%)	
	アセトニトリル/QuEChERS抽出塩	ヘキサン/アセトン混液
¹³ C- δ -BHC	74	107
¹³ C-2,4'-DDE	53	106
¹³ C-Aldrin	47	106

表5 各農薬の回収率(%)

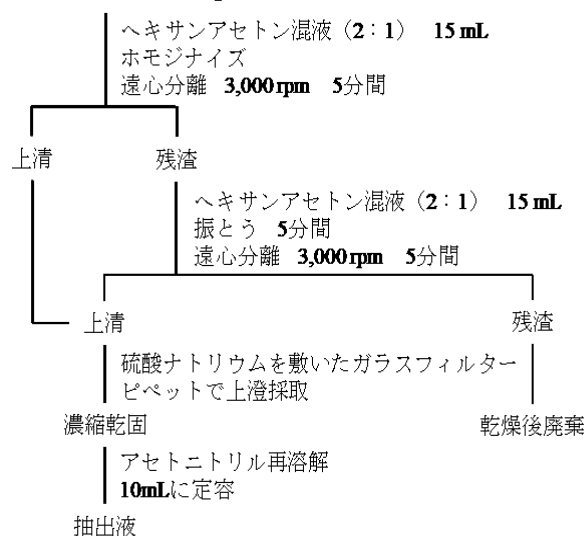
	回収率(%)		
	アセトニトリル/QuEChERS抽出塩	ヘキサン/アセトン混液 1回抽出	ヘキサン/アセトン混液 2回抽出
α -BHC	89	95	101
β -BHC	94	94	101
γ -BHC	90	94	99
δ -BHC	92	94	99
Heptachlor	96	91	101
Heptachlor epoxide A	116	96	102
Heptachlor epoxide B	116	95	103
Aldrin	97	95	101
Dieldrin	114	97	104
Endrin	102	102	102
4,4'-DDE	87	96	102
4,4'-DDD	77	98	104
2,4'-DDT	87	89	96
4,4'-DDT	82	79	87
cis-Chlordane	-	98	103
trans-Chlordane	-	97	103
Oxy-chlordane	-	95	100
HCB	-	91	93

も概ね100%であった。これらの結果、ヘキサン/アセトン混液(2:1)15 mLで2回抽出する方法を採用した。

以上の検討結果から、ヘキサン/アセトン混液による2回抽出を行った後、精製には酸化ジルコニウム剤(Z-Sep分散固相)およびPSAミニカラムを活用した方法を構築した。構築した前処理スキームを図1に示した。この方法を用いて、妥当性評価を実施することとした。

<抽出操作>

試験用検体の秤量 [5g]



<精製>

定容した抽出液 6mL

Z-sep dsPE CLEAN-UP TUBE 500mg
振とう 5分間
遠心分離 3,000rpm 5分間

上澄 4mL

濃縮乾固
ヘキサンアセトン混液 (1:1) 2mL再溶解

PSAカラム精製

ヘキサンアセトン混液 (1:1) 10mL コンディショニング
(試料液負荷+ヘキサンアセトン混液 (1:1) 20mL溶出)
全量採取

濃縮2mL定容

試験液

図1 前処理スキーム

2. 妥当性評価

妥当性評価結果を表 6 および表 7 に示した。HCB 以外の農薬(17 成分)についてはいずれの添加濃度においても、真度、併行精度、室内精度ともにガイドラインの目標値を満たす良好な結果が得られた。牛乳、牛肉、豚肉および鶏肉に関しては、今回検討した農薬(18 成分)全てで真度、併行精度、室内精度ともにガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。しかし、鮭に関しては

0.005 ppm および基準値濃度(0.1 ppm)の双方の添加濃度において、HCB の回収率が 50%台と目標値を満たさない結果となった。HCB の回収率は、他の内部標準物質で補正して算出した場合においても同程度であった。

さらに、内標準物質の回収率の結果を表 8 に示した。いずれの結果においても、目標値の 40%を超える結果で、鮭の一部(基準値添加の ^{13}C -アルドリン)を除いて、50%以上に改善することがで

表 6 妥当性評価の結果(0.005 ppm 添加)

	牛乳			牛肉			豚肉		鶏肉		魚(鮭)	
	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	室内精度	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度
α -BHC	95	3.3	3.3	96	3.0	3.9	100	1.7	106	1.4	100	1.6
β -BHC	96	2.8	3.0	94	4.2	5.9	100	2.3	104	1.3	100	1.1
γ -BHC	94	2.5	2.8	97	2.5	3.3	100	1.4	105	1.2	101	1.6
δ -BHC	96	3.3	3.3	97	3.2	3.3	100	2.3	103	1.6	97	1.5
Heptachlor	95	5.0	5.9	94	2.0	4.8	102	1.0	104	1.5	98	2.4
Heptachlor epoxide A	94	3.9	7.1	107	4.1	6.2	102	2.5	105	1.5	115	1.2
Heptachlor epoxide B	97	5.3	5.5	106	3.0	5.8	101	2.0	106	1.8	115	1.8
Aldrin	96	2.3	3.9	96	3.4	4.7	98	0.8	102	2.3	96	1.8
Dieldrin	96	6.1	7.4	101	5.1	7.6	104	3.6	106	2.9	111	3.3
Endrin	92	3.5	7.2	112	5.2	5.2	102	1.7	108	1.4	103	3.6
4,4'-DDE	96	6.9	6.9	91	2.9	5.4	100	1.7	105	1.4	98	3.7
4,4'-DDD	91	4.3	6.8	94	5.4	5.4	98	3.0	99	1.1	79	3.9
2,4'-DDT	97	2.5	6.1	96	3.9	5.5	99	2.5	98	2.9	82	3.5
4,4'-DDT	103	4.0	7.1	90	5.7	7.2	101	4.9	93	3.4	83	6.9
cis-Chlordane	97	3.5	3.8	100	4.6	6.2	101	2.7	106	1.4	101	1.9
trans-Chlordane	97	3.8	4.0	100	3.4	5.5	100	1.4	104	1.1	101	3.1
Oxy-chlordane	94	3.0	5.3	100	5.4	10.1	100	2.5	100	2.1	103	4.2
HCB	87	3.0	4.8	75	4.3	4.3	94	3.2	104	1.9	52	9.8

*真度・併行精度・室内精度の単位:%

表 7 妥当性評価の結果(基準値添加)

	牛乳				牛肉				豚肉				鶏肉				魚(鮭)			
	添加濃度	真度	併行精度	室内精度	添加濃度	真度	併行精度	室内精度	添加濃度	真度	併行精度	室内精度	添加濃度	真度	併行精度	室内精度	添加濃度	真度	併行精度	室内精度
α -BHC	0.01	96	2.1	3.1	0.01	100	1.4	1.8	0.01	105	2.1	2.3	0.01	102	1.6	1.6	0.01	103	2.0	2.5
β -BHC	0.01	100	2.4	2.4	0.01	100	1.1	1.7	0.01	106	1.4	1.5	0.01	101	2.3	2.8	0.01	101	1.2	7.5
γ -BHC	0.01	95	2.5	2.8	0.02	102	1.1	1.3	0.02	108	1.6	2.1	0.7	104	0.5	1.3	1	103	2.4	3.7
δ -BHC	0.01	101	1.8	2.1	0.01	101	0.7	1.8	0.01	106	1.7	1.7	0.01	102	1.9	1.9	0.01	103	1.0	2.2
Heptachlor	0.006	90	3.2	4.0	0.01	102	3.3	3.4	0.01	112	2.7	4.2	0.01	104	1.1	2.0	0.01	104	1.6	1.9
Heptachlor epoxide A	0.006	104	2.8	3.4	0.01	104	2.2	3.9	0.01	108	3.5	6.5	0.01	105	0.7	1.5	0.01	110	2.1	2.1
Heptachlor epoxide B	0.006	105	2.6	3.5	0.01	106	2.2	2.2	0.01	108	3.7	4.9	0.01	107	1.1	1.4	0.01	116	1.3	1.3
Aldrin	0.006	99	2.7	2.9	0.01	101	1.3	2.1	0.01	105	2.3	3.0	0.01	102	1.2	1.3	0.01	104	2.1	3.8
Dieldrin	0.006	106	3.2	5.2	0.01	103	2.6	2.6	0.01	110	2.7	4.2	0.01	105	2.9	2.9	0.01	111	2.0	2.7
Endrin	0.01	109	2.8	5.8	0.05	101	2.3	3.1	0.05	108	3.7	3.8	0.05	103	1.6	1.6	0.01	108	1.2	1.8
4,4'-DDE	0.02	107	4.2	6.8	1	109	2.9	2.9	1	111	2.8	4.5	0.3	109	1.7	2.2	3	91	4.3	4.3
4,4'-DDD	0.02	114	2.6	3.5	1	103	3.4	5.1	1	104	5.0	6.1	0.3	102	2.5	5.6	3	90	2.9	4.8
2,4'-DDT	0.02	97	1.5	10.8	1	99	3.7	7.6	1	104	7.4	8.4	0.3	98	2.3	5.4	3	96	2.7	5.7
4,4'-DDT	0.02	83	1.8	1.9	1	93	6.2	11.3	1	103	9.6	9.9	0.3	94	3.5	5.1	3	95	3.3	6.8
cis-Chlordane	0.002	108	3.8	5.7	0.08	105	2.3	2.3	0.08	110	3.0	5.1	0.08	107	0.8	1.6	0.05	108	1.4	1.5
trans-Chlordane	0.002	106	3.4	4.8	0.08	104	1.5	1.5	0.08	108	3.3	4.4	0.08	105	0.8	1.3	0.05	109	1.8	1.8
Oxy-chlordane	0.002	83	3.0	6.5	0.08	104	2.0	2.0	0.08	109	3.2	4.8	0.08	106	0.3	0.9	0.05	110	2.0	2.0
HCB	0.01	88	2.1	5.7	0.2	99	1.9	1.9	0.2	98	4.2	5.5	0.2	103	0.8	1.5	0.1	54	10.4	10.4

*添加濃度の単位:ppm、真度・併行精度・室内精度の単位:%

表 8 妥当性評価時の内標準物質の回収率(%)

	牛乳		牛肉		豚肉		鶏肉		魚(鮭)	
	0.005ppm	基準値添加	0.005ppm	基準値添加	0.005ppm	基準値添加	0.005ppm	基準値添加	0.005ppm	基準値添加
¹³ C- δ -BHC	80	64	75	74	85	78	66	69	94	72
¹³ C-2,4'-DDE	78	64	68	71	84	74	66	67	63	53
¹³ C-Aldrin	75	60	62	70	83	74	66	67	53	43

きた。

魚(鮭)については HCB の回収率が低いので、他の魚種においても同様の傾向が確認されるかどうか、今後さらなる検討を行い改善が必要と考えられる。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

ま と め

GC-MS/MS を用いた畜水産物中の有機塩素系農薬一斉分析法について、ヘキサン/アセトン混液による 2 回抽出を行った後、精製に酸化ジルコニウム剤(Z-Sep 分散固相)および PSA ミニカラムを活用した方法を構築した。牛乳、牛肉、豚肉、鶏肉および鮭を対象に妥当性評価を実施した結果、鮭の HCB を除き妥当性評価ガイドラインの要求を満たした。従来法で問題となっていた内標準物質の回収率について改善することができた。

- 1) 柿本健作, 永吉晴奈, 山口瑞香, 吉田優子, 徳永佑亮, 北川陽子, 小西良昌, 梶村計志. 畜産物中の有機塩素系農薬の新規分析法の確立. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2017;1: 63-66.
- 2) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知. 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について.平成 22 年厚生労働省食安発 1224 第 1 号.

Improvement and validation of a method for the analysis of organochlorine pesticides in livestock and fishery products by GC-MS/MS

Mari KUNITOU, Mizuka YAMAGUCHI, Kaoru AWAZU, Haruna NAGAYOSHI, Naoki FUKUI
and Masanao SHINYA

A method for the analysis of organochlorine pesticides in livestock, fishery products, and milk using GC-MS/MS was improved. Pesticides were extracted twice with acetone/hexane, and purified by Z-Sep and an ethylenediamine-*N*-propyl bonded silica column. The method was validated according to the method validation guidelines of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; recovery tests were performed on beef, pork, chicken, salmon and milk by spike of 18 organochlorine pesticides at a concentration of 0.01 ppm. The trueness of the method for 17 organochlorine pesticides in all commodities was 70-120% with satisfactory repeatability and within-run reproducibility. This method could be applicable for the analysis of organochlorine pesticides in a variety of livestock, fishery products and milk.

Key words : animal livestock and fishery product, organochlorine pesticide, GC-MS/MS, validation study

畜産物中のホルモン剤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

牛乳、牛肉および豚肉中の残留ホルモン剤の一斉分析法の妥当性評価を行った。抽出には QuEChERS 法、精製には分散固相および固相抽出遠心カラムを使用し、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)にて測定を行った。添加回収試験の結果、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)、ホルモン剤、分散固相、固相抽出遠心カラム、妥当性評価

当所では以前より牛乳および牛肉中の残留ホルモン剤の分析を行っており、一斉分析法を用いてきた。既報¹⁾の報告以降、いくつかのホルモン剤で残留基準値が見直され、基準値が引き下げられた。そのため従来の方法では基準値が定量下限値を下回り分析が不可能となった。しかし、LC-MS/MS を更新したことより検出感度が向上した。そこで感度不足となったホルモン剤の分析ができるよう方法を検討した。この方法を用いて、ホルモン剤分析法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: 市販の牛乳、牛肉および豚肉を用いた。
- (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ホルモン剤を用いた。Betamethasone、Clenbuterol hydrochloride、Dexamethasone、Hydrocortisone、Melengestrol acetate、Ractopamine は富士フィルム和光純薬(株)製、Chlormadinone acetate は関東化学(株)製、Megestrol acetate は MP Biomedicals 社製を用いた。
- (3) 試薬等: QuEChERS 抽出塩は RESTEK 社製 Q-sep QuEChERS 抽出塩 EN 法 15662(硫酸マグネシウム 4 g、塩化ナトリウム 1 g、クエン酸三ナトリウム 1 g、クエン酸二ナトリウム 1.5 水和物 0.5

g、以下 Q-sep 塩)、分散固相チューブは Merck 社製 Z-Sep/C18 dSPE CLEAN-UP TUBE、固相抽出遠心カラムは GL Science 社製 MonoSpin L NH₂、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ン、LC/MS 用アセトニトリルおよびぎ酸、試薬特級ぎ酸およびジメチルスルホキシド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(東京理化工機(株)製)、遠心エバポレーターは CYE-3110 型(東京理化工機(株)製)、LC-MS/MS は AQUITY UPLC I-Class PLUS / 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℃、流速: 0.2 mL/min、注入量: 1 μL、移動相: A 液; 0.1%ぎ酸水溶液 B 液; アセトニトリル、グラジエント条件; B%: 5-40%(0-12 min), 40-90%(12-15 min), 90%(15-17 min)、イオン化モード: ESI(+/-)、測定モード: SRM、イオン源温度: 150℃、コーンガス(窒

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

素)流量：200 L/h、脱溶媒ガス(窒素)温度および流量：600℃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 測定条件

Compound	mode +/-	Precursor ion (m/z)	Product ion1 (m/z)	Product ion2 (m/z)	Retention time (min)
α-trenbolone	+	271	253	199	12.4
β-trenbolone	+	271	199	253	11.8
betamethazone	-	437	361	307	11.1
chlormadinone acetate	+	405	309	345	15.3
clenbuterol	+	277	203	168	5.8
clostebol	+	323	143	131	14.6
dexamethasone	-	437	361	307	11.3
hydrocortisone	+	363	121	327	9.7
megestrol acetate	+	385	224	267	15.2
melengestrol acetate	+	397	337	279	15.3
methylprednisolone	-	419	343	309	11.0
prednisolone	-	405	329	295	9.6
ractopamine	+	302	164	284	4.9
zeranol	-	321	277	303	13.2

3. 試験溶液の調製

(1) 抽出:筋肉試料は細切均一化し、牛乳はそのまま試験に供した。試料 5 g を 50 mL 遠沈管に計り採り、0.5 %ぎ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリルを 10 mL 加え、高速ホモジナイザーで混合粉砕した。QuEChERS 抽出塩を加えて 1 分間激しく振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を新しい 50 mL 遠沈管に分取した。ここにヘキサン 4 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: 分散固相チューブに抽出液 6 mL を加え、高速振とう器で約 5 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を採取した。この上清 2 mL を、固相抽出遠心カラムを付けた 15 mL 遠沈管に負荷し、3,000 rpm で約 5 分間遠心分離した。ここに 0.5 %ぎ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリル 1 mL を加え、同様に遠心分離した。固相抽出遠心カラムを外してジメチルスルホキシドを 25 μL 加え、遠心エバポレーターで濃縮した。これに 20%アセトニトリル溶液を加えて 1 mL とし、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、0.02~20 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」²⁾に基づき、牛乳および牛肉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。豚肉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 0.00005、0.0005、0.01 μg/g となるよう標準溶液を添加し、上記方法にて実施した。

結 果 及 び 考 察

1. 測定条件の検討

2017 年の報告¹⁾の後、いくつかのホルモン剤について、残留基準値の改正が行われた。これによって、従来の方法では基準値濃度の分析ができなくなった。そこで、2020 年に質量分析計を Waters 社製の Xevo TQ-S から Xevo TQ-XS への更新を機に残留基準値が分析できる方法を検討した。

まず、定量下限の確認のために複数のホルモン剤の標準溶液を測定した。その結果、既報の対象物質に加え、ベタメタゾン、酢酸クロルマジノン、クレンプテロール、酢酸メグステロールおよびラクトパミンが基準値付近まで測定できることが分かった。

また、ベタメタゾンとデキサメタゾンは異性体であるため LC 条件での分離が必要であった。過去の報告³⁾を参考に移動相をアセトニトリルとした。以上の検討の結果、14 種類のホルモン剤について、残留基準値濃度の測定が可能となった。

2. 試験法の検討

ホルモン剤は残留基準値が低いものが多く、試験溶液を希釈して分析することが難しい。そこで、近年農薬分析に多く活用されている QuEChERS 法を検討した。抽出法は既報の抽出溶媒を参考にぎ酸または酢酸含有ヘキサン飽和アセトニトリルを用い、QuEChERS 抽出塩は Q-sep 塩または塩化ナトリウム 1 g と無水硫酸ナトリウム 4 g を比較した。豚肉を試料として添加回収試験をした結果、対象物質は全てアセトニトリル相に抽出されたが、酢酸よりぎ酸、塩化ナトリウムと無水硫酸ナトリウムより Q-sep 塩の方が良好な回収率であった(表 2)。そのため、ぎ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリルおよび Q-sep 塩を使用することとした。

精製方法については、Merk 社製 Supel QuE Z-

表 2 抽出方法の比較

Compound	ぎ酸+ Q-Sep塩	ぎ酸+ Na ₂ SO ₄ ・NaCl	酢酸+ Q-Sep塩	酢酸+ Na ₂ SO ₄ ・NaCl
α-trenbolone	93	94	90	96
β-trenbolone	92	93	91	97
betamethazone	91	96	86	98
chlormadinone acetate	83	86	84	73
clenbuterol	84	89	85	91
clostebol	87	88	86	82
dexamethasone	94	96	89	99
hydrocortisone	89	86	81	90
megesterol acetate	82	83	83	70
melengesterol acetate	80	82	82	67
methylprednisolone	85	89	81	93
prednisolone	86	86	77	91
ractopamine	71	71	72	69
zeranol	97	100	95	101

回収率(%)

-Sep を使用していたが、一部の物質で回収率が低下する傾向があった。そこで、脱脂ができる他の分散固相を検討した。豚肉を試料として Z-Sep と Z-Sep/C18 で比較したところ、クレンプテロール、メチルプレドニゾロンおよびプレドニゾロンの回収率が改善した(表 3)。しかし、試料由来の濁りと着色が十分に除去できなかったため、合成抗菌剤の分析で使用しているアミノプロピルカラムを通過させることにより、着色を除去することとした⁴⁾。

表 3 Z-Sep と Z-Sep/C18 の比較

Compound	Z-Sep	Z-Sep/C18
α-trenbolone	98	96
β-trenbolone	92	96
betamethazone	76	98
chlormadinone acetate	86	93
clenbuterol	62	82
clostebol	88	92
dexamethasone	82	94
megesterol acetate	90	96
melengesterol acetate	80	89
methylprednisolone	68	94
prednisolone	66	89
ractopamine	47	68
zeranol	96	105

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。牛乳、牛肉および豚肉について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、58～116%であった(表 4)。牛肉および豚肉で保持時間が長い物質においてマトリックスによるイオン化抑制効果が大きいことが分かった。これらの物質は添加回収率が低下する

ことがあり、マトリックスの影響を軽減するさらなる検討が必要と考えられた。

表 4 検量線の傾き比(%)

Compound	milk	beef	pork
α-trenbolone	96	91	95
β-trenbolone	96	89	92
betamethazone	98	113	102
chlormadinone acetate	80	75	66
clenbuterol	88	98	98
clostebol	84	86	72
dexamethasone	95	113	97
hydrocortisone	94	116	92
megesterol acetate	80	65	66
melengesterol acetate	81	68	58
methylprednisolone	98	112	99
prednisolone	95	101	96
ractopamine	78	93	90
zeranol	93	80	94

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 5 に示した。真度が 72～113%、併行精度が 11%以下、室内精度が 11%以下であり、概ね良好な結果であった。

ま と め

LC-MS/MS を使用した畜水産物中のホルモン剤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考えられた。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 永吉晴奈, 柿本健作, 山口瑞香, 内田耕太郎, 吉田優子, 梶村計志. 新規脂質除去剤による分散固相抽出法を用いたホルモン剤分析法の構築と妥当性評価. 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所年報 2017; 1: 57-62.
- 2) 平成 22 年厚生労働省食安発 1224 第 1 号
- 3) 山口貴弘, 柿本健作, 永吉晴奈, 山口瑞香, 尾花裕孝. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2011; 49: 20-23.
- 4) 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. 地方独立行政

表 5 妥当性評価結果

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

MRLs:Maximum Residue Limits of Agricultural Chemicals in Foods
 ND:Not detected, is placed as MRL
 UL:Uniform limit, is set at 0.01 ppm

Validation study of an analytical method for the detection of hormones in livestock products

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

A method for simultaneously analyzing hormones in livestock products was validated. The QuEChERS method is used for extraction, and dispersed solid-phase and solid-phase extraction spin centrifuge columns are used for purification. Measurements were performed with a liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). As a result of the recovery test, the target values of the validity evaluation guidelines were satisfied.

Key words : LC-MS/MS, hormones, dispersed solid-phase, solid-phase extraction spin centrifuge column, validation study

大阪市で発生した牛乳の苦情事例について

北口大毅, 岸 映里, 中村実沙子, 昌山 敦, 宮本伊織, 水口智晴, 平田祥太郎, 柿本幸子,
仲谷 正, 尾崎麻子, 高取 聡

令和3年度に牛乳に関する苦情事例が発生した。本事例は学校給食において提供された牛乳が異味異臭を呈し、喫食した一部の児童が腹痛等の体調不良を訴えたものである。苦情品および当該牛乳供給事業者において製造した牛乳を試料とし、pH、ナトリウム、牛乳の成分規格試験を行い、原因究明を行った。さらに、製造ラインの洗浄に使用されている洗浄剤を用いて模擬試験を行った。その結果、洗浄ラインの洗浄剤として使用されているアルカリ性洗浄剤が牛乳に混入した可能性が示された。

キーワード： 苦情、牛乳、異味異臭、洗浄剤

大阪市における食品への異物混入や苦情相談は大阪市保健所および各保健福祉センターに届けられ、その内容により検査が必要と認められた場合には当研究所に搬入され原因究明のための検査が行われる。これらの原因を究明することは、今後の事故防止対策を行ううえで非常に重要である。著者らが所属する食品化学2課では理化学検査を行っており、その中で令和3年度に対応した牛乳の苦情事例について報告する。牛乳に関する異物苦情、食中毒事例に関して、過去に「令和3年富山市内の小・中学校等で発生した給食で提供された牛乳を原因とする食中毒事例¹⁾」がある。富山市内の小中学校等において、学校給食で提供された牛乳を原因食品とする食中毒が発生し、調査の結果、機器の不調による殺菌の不足が原因と判明した。本事例は、牛乳中に下痢原性大腸菌が増殖したことによる集団食中毒事例と断定され、患者数は1896名に上った。以上の例のように学校給食における異物苦情、食中毒による有症事例は、大人数かつ広範囲に及ぶ可能性が高い。

令和3年12月8日、大阪市内の小・中・支援学校の学校給食において提供された牛乳に異味異臭があり、一部の児童が腹痛等の体調不良を訴えたとの報告が大阪市教育委員会事務局にあった。大阪市保健所による調査が行われ、原因究明のために当研究所に試料が搬入された。苦情品試料につ

いて、微生物検査を行った結果、食中毒菌は陰性であった。理化学検査のうち、pHを測定したところ強アルカリ性(pH約11)を示したことから、pHの測定に加えて牛乳の規格試験等を実施し、原因究明を行った。

本牛乳の製造業者では、生乳タンクと製造ラインにおいて、Cleaning In Place (CIP) 洗浄が実施されていた。CIP洗浄とは、定置洗浄と訳され、ここでは製造設備に洗浄機能が組み込まれており、製造設備を解体せずに内部を洗浄することが可能である。本洗浄システムを用いて、アルカリ性洗浄剤と酸性洗浄剤の粉末を装置に投入し、自動的に溶解、その後希釈処理されラインの洗浄が行われている。洗浄工程は、アルカリ洗浄、酸洗浄、浄水洗浄、温水洗浄、残存確認の順で行われる。洗浄剤の残存は、フェノールフタレインを用いてpHを指標に確認され、pHが正常であれば生乳タンクや製造ラインに洗浄剤が残存しないと判断される。そのため、洗浄工程における洗浄剤の残存確認の不備等や製造工程における操作ミスにより、牛乳に洗浄剤が混入した可能性が考えられた。そこで、当該牛乳供給事業者において製造ラインの洗浄に使用している洗浄剤が牛乳に混入した可能性を検証するために、模擬試験も併せて実施した。

大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学2課

本論文では、今般の苦情事例における理化学検査および洗浄剤を用いた模擬試験の結果について報告する。

調 査 方 法

1. 試料

苦情品および苦情品を製造した当該牛乳供給事業者において、苦情品が製造された時間およびその前後に同ラインで製造された牛乳のうち、表1に示した15試料を試験に供した(内容量は全て200 mL)。また、製造ラインの洗浄に用いられている4種類の洗浄剤(アルカリ性洗浄剤 A または B および酸性洗浄剤 C または D) も、当該牛乳供給事業者から併せて入手した。なお、アルカリ性洗浄剤 A は、水酸化ナトリウム(約80%)および他成分(約20%)から成り、アルカリ性洗浄剤 B は、水酸化ナトリウム(約100%)から成る。また、酸性洗浄剤 C は、有機硝酸化合物から成り、酸性洗浄剤 D は、酢酸等から成る(詳細および一部配合率は省略)。対照品として、別事業者において製造された牛乳を入手した。

2. 試薬等

超純水: 超純水製造装置で18.2 MΩ/cm²まで精製したもの

pH 試験紙: アドバンテック東洋(株)製

標準緩衝液(pH メーター校正用): pH4.01、pH6.86、pH9.18、ナカライテスク(株)製

ナトリウム(Na)標準溶液: 1000 μg/mL、関東化学(株)製

塩酸: 有害金属測定用、富士フイルム和光純薬(株)製

硫酸: 検乳用、米山薬品工業(株)製

水酸化ナトリウム: 特級、富士フイルム和光純薬(株)製

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: 容量分析用、富士フイルム和光純薬(株)製

1%フェノールフタレイン: 中和滴定用、富士フイルム和光純薬(株)製

3-メチル-1-ブタノール(イソアミルアルコール): 富士フイルム和光純薬(株)製

海砂: 富士フイルム和光純薬(株)製

3. 装置および器具

天秤: ME204T/00、メトラー・トレド(株)社製
超純水製造装置: Milli-Q IQ7003、メルクミリポア社製

pH メーター: F52S、堀場製作所製

誘導結合プラズマ発光分析装置(ICP-OES): SPECTROBLUE TI、SPECTRO 社製

遠心分離機: H-155、コクサン(株)製

恒温乾燥機: DRYING OVEN、SANYO(株)製

メンブランフィルター: DISMIC、親水性 PTFE、φ25 mm、0.45 μm、アドバンテック東洋(株)製

ゲルベル乳脂計: 柴田科学(株)製、アズワン(株)製、Cherry 社製

比重計: 日本計量器工業(株)製

4. pH の測定法

食品衛生検査指針²⁾を一部変更した方法により測定した。すなわち、試料10 g をコニカルビーカーに採取し、脱気した炭酸ガスを含まない超純水10 mL を加えて希釈後、pH メーターで測定した。なお、洗浄剤や水酸化ナトリウム溶液等のpH は pH 試験紙を用いて測定した。

5. Na の定量法

消費者庁より示された方法³⁾を一部変更した方法により測定した。すなわち、試料0.10 g を50 mL 容プラスチックチューブに採取し、1%塩酸溶液で50 mL に定容した。よく混合したのち、1%塩酸溶液を用いて4倍に希釈した。メンブランフィルターでろ過したものを ICP-OES 用の試験溶液とした。ICP-OES における測定波長は589.5 nm とした。なお、対照の牛乳を用いて添加回収試験を行った。添加濃度は牛乳から検出される Na の約10倍である400 mg/100 g に設定し、試料0.10 g に1000 μg/mL の Na 標準溶液を0.4 mL (各400 μg) 加えて実施した。

6. 牛乳の成分規格試験

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の方法⁴⁾により試験した。

すなわち、酸度は、試料10 g をコニカルビーカーに採取し、脱気した超純水10 mL を加えて希釈後、フェノールフタレイン溶液を、0.5 mL 添加した。

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定し、微紅色が30秒間消失しない点を終点とした。

乳脂肪分は、ゲルベル乳脂計に硫酸10 mL を注

入し、試料 11 mL を層積後 3-メチル-1-ブタノールを 1 mL 添加した。ゴム栓を装着し、静かに転倒混和し、65 °C で 15 分間静置後、65 °C で 1000 rpm の条件で遠心分離した。5 分間静置後、析出した脂肪層の度数を読み取った。

無脂乳固形分は、乳固形分の値から乳脂肪分の値を差し引いて求めた。具体的には次の操作による。フタ付きアルミ製秤量皿に海砂 10 g を入れ、フタを開いた状態で 100 °C で 1 時間乾燥させ、デシケーター内で 1 時間放冷後、秤量した (W0)。秤量後、試料を 2.75 g 採取して精秤した後 (W1)、100 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター内で 1 時間放冷し、精秤した。この操作を恒量 (W2) になるまで繰り返した。次の計算式から乳固形分を算出した。

$$\text{乳固形分 (\%)} = (W2 - W0) / W1 \times 100$$

得られた乳固形分の値から、乳脂肪分の値を差し引いて無脂乳固形分とした。

比重は、常温にした試料 200 mL をメスシリンダーに採取し、比重計を浮かべ、比重計度数と試料液温を計測した。

7. 官能試験

透明プラスチック製容器内の試料に対して、色調・性状・臭気を確認した。流動性の低下は、容器を手で振とうした際における、試料が壁面から流れ落ちる様子について、対照の牛乳との比較から視覚的に判断した。

8. 牛乳と洗浄剤を混和した際の模擬試験

苦情品の状況を再現するために模擬試験を行った。模擬試験では対照の牛乳に 1% もしくは 5% 洗浄剤溶液、1% もしくは 5% 水酸化ナトリウム溶液または 1% 塩酸溶液を添加した。1% および 5% 洗浄剤溶液は、粉末の洗浄剤 1 g もしくは 5 g をそれぞれ超純水 100 mL に溶解して調製した。模擬試験試料については、適宜、上記試験を実施した。

結 果 お よ び 考 察

1. 苦情品等の牛乳の試験結果

初めに性状の異常 (異臭およびヨーグルト状の固化・流動性の低下) を認める試料について、腐敗しているか確認するため、牛乳の成分規格試験の酸度の測定を試みた。その結果、指示薬のフェノールフタレイン溶液を試料に添加した段階で赤紫色を示

した。この状況では、試料は既にアルカリ性であることを示唆しており、滴定が不可能のため酸度が測定不能となった。当該試料の pH を pH メーターで確認したところ、pH は 11.5 と一般的な牛乳の pH (6.5~6.7) ⁵⁾ と比較して、明らかなアルカリ性を示した。そのため、牛乳にアルカリ性物質が混入した可能性が考えられた。製造所では、水酸化ナトリウムを含む複数のアルカリ性の洗浄剤を使用しており、これらには Na が含まれることから、pH と Na 含有量を測定し、官能試験は全ての試料について実施した。牛乳の成分規格試験は、複数の未開封品を入手したサンプル No. 2、3、6~15 について実施した。

表 1 に性状の異常を認める試料 (サンプル No.6~12) を含む、一連の試料 (サンプル No.1~15) の検査結果を示した。一連の試料は、同一の製造ラインで充填されており、充填時間の順に No.1 から No.15 としている (試料は検査用として入手できたものであり、その結果として、試料から読み取ることができる充填時間の間隔は製造時の充填時間の間隔ではない)。表では、pH、Na、牛乳の成分規格の検査結果に加えて異味異臭や凝固等の性状異常の有無についても示した。なお、一般的な牛乳における pH は 6.5~6.75)、Na 含有量は 41 mg/100 g (日本食品標準成分表 2020 年版 ⁶⁾) であり、Na について添加回収試験を行った結果 (n=3) は、回収率は 99.3%、相対標準偏差は 0.84% と良好であった。牛乳の成分規格は、基準値が無脂肪固形分 8.0 % 以上、乳脂肪分 3.0 % 以上、比重 1.028 以上、酸度 0.18 % 以下と定められている。

サンプル No.6~12 において、pH がアルカリ性かつ Na 含有量が高値を示した。特に、サンプル No.7~9 における pH は、11.9~12.2 と極めて高い値であり、Na 含有量も、257~345 mg/100 g と一般的な牛乳の 6 倍以上の値であった。牛乳の成分規格試験は、サンプル No.7 において、規格をいずれも満たさず、無脂肪固形分 7.1 % (規格 : 8.0 % 以上)、乳脂肪分 2.7 % (規格 : 3.0 % 以上)、比重 1.023 (規格 : 1.028 以上) であった。サンプル No.7 の試料はアルカリ性であるため、酸度試験においてフェノールフタレイン溶液を加えた時点で紅色を示し、測定不能であった。サンプル No.6 および 8~12 においても同様にアルカリ性を示し、酸度は、測定不能であった。すなわち、サンプル No.6~12 のサンプルにおいて、牛乳の成分規格のすべてを満たしきるものはな

かった。なお、サンプル No.7 および 8 は、充填時間が同一であるが、異なるパックである。当該サンプル間では pH および Na 含有量に差があることから、アルカリ性物質は牛乳にやや不均一に混入した状態で充填されている可能性もあると考えられた。これら pH が高値でかつ、Na 含有量 100 mg/100 g 以上を示したサンプル No. 6~12 は、いずれも官能試験において異臭が確認され、ほとんどのサンプルで性状異常も確認された。具体的には、魚臭様の異臭が確認されたものや、黄色への変色が確認されたものがみられた。

これら pH に高値が認められたサンプル No.6~12 は Na 含有量も高値を示すことから、牛乳に Na を含むアルカリ性物質が混入した可能性が示唆された。加えて、異臭、性状異常が確認されたことから、異臭および性状異常は、混入したアルカリ性物質により生じた可能性が考えられた。なお、異常を示したサンプル No.6~12 は、13 時 34 分から 13 時 52 分の間に充填されたものであり、この間に限りアルカリ性物質が混入した可能性が考えられた。

表 1 牛乳の検査結果一覧

サンプル No.	充填時間	pH	Na含有量* (mg/100 g)	成分規格**				性状異常の有無 (異味異臭、凝固等)
				無脂肪 固形分 (%)	乳脂肪分 (%)	比重	酸度 (乳酸として) (%)	
				規格： 8.0%以上	規格： 3.0%以上	規格： 1.028以上	規格： 0.18%以下	
1	12:02	6.9	37	—	—	—	—	特に異常は認められず
2	12:26	7.0	33	8.8	4.0	1.032	0.09	特に異常は認められず
3	13:13	6.9	32	—	—	—	0.06	特に異常は認められず
4	13:15	7.0	40	—	—	—	—	特に異常は認められず
5	13:32	7.0	40	—	—	—	—	特に異常は認められず
6	13:34	10.8	114	—	<u>2.8</u>	—	測定不能	有（異臭、性状異常）
7	13:45	12.2	334	<u>7.1</u>	<u>2.7</u>	<u>1.023</u>	測定不能	有（異臭、性状異常）
8	13:45	11.9	257	—	—	—	測定不能	有（異臭、性状異常）
9	13:47	12.2	345	—	<u>2.8</u>	—	測定不能	有（異臭、性状異常）
10	13:50	11.5	221	—	—	—	測定不能	有（異臭（魚臭様）、ヨーグルト状）
11	13:51	10.3	129	—	3.6	—	測定不能	有（異臭、液色：黄）
12	13:52	9.8	102	8.4	3.7	1.032	測定不能	有（異臭）
13	13:54	7.6	62	—	—	—	0.03	特に異常は認められず
14	14:00	7.1	33	—	—	—	0.09	特に異常は認められず
15	14:25	6.9	43	8.8	4.1	1.032	0.09	特に異常は認められず

*日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）：41 mg/100 g

**規格を満たさなかったものについて下線（太字）で示した

2. 牛乳と洗浄剤を混和した際の模擬試験

(1) pH、Na および官能検査

上記のとおり、苦情品等の牛乳の試験において一部の牛乳が高い pH および Na 含有量を示した。模擬試験における牛乳に添加する洗浄剤の量は、苦情品等から検出された Na の最大量を参考にした。すなわち、今回試験した苦情品等において、最も高い Na 含有量を示したのはサンプル No.9 の 345 mg/100 g であった。牛乳に元々含まれている Na (41 mg/100 g) を差し引くと約 300 mg/100 g の Na が混入したことになる。これは、アルカリ性洗浄剤の主成分である水酸化ナトリウムとして 522 mg/100 g 相当となり、牛乳 1 mL あたり水酸化ナトリウムが 5220 μ g 混入したことになる(牛乳の比重を 1.0 とする)。

模擬試験では、製造ラインの洗浄には 1%洗浄剤溶液を使用することを想定した。1%洗浄剤溶液であれば、上記の Na 量に基づいて勘案すると牛乳 5 mL に対する 1%洗浄剤溶液の添加量は 2.6 mL 相当となる。そこで、模擬試験ではアルカリ性洗浄剤および水酸化ナトリウムについては牛乳 5 mL に対して 1%洗浄剤溶液および 1%水酸化ナトリウム溶液を 0.5、1.0、2.0 mL 添加して模擬試験を行った。また、当該牛乳事業者では製造ラインをアルカリ洗浄の後、酸洗浄が行われている。苦情品は、アルカリ性であることから酸性洗浄剤の混入を疑う状況ではないが、参考として、酸性洗浄剤が混入した場合についても模擬試験を行った。試験では、牛乳 5 mL に 1%酸性洗浄剤溶液または 1%塩酸溶液を 2.0 mL 添加した。

牛乳と各洗浄剤溶液の混和直後の測定および官能検査の結果を表 2 に示した。アルカリ性洗浄剤 A および B の 1%溶液、また水酸化ナトリウムの 1%溶液のいずれも、その pH は 14 であった。一方、酸性洗浄剤の 1%溶液では、C の pH は 1、D の pH は 3 であり、1%塩酸溶液の pH は 1 であった。牛乳 5 mL に洗浄剤 A、B の 1%溶液を 2.0 mL 混合した際の液性は、pH がそれぞれ 11.9 および 12.0 であり、1%水酸化ナトリウム溶液と混合した場合 (pH11.7) と同等の結果が得られた。Na 含有量に関しても、洗浄剤 A、B の 1%溶液を混合した際に共に 196 mg/100g であり、1%水酸化ナトリウム溶液と混合した場合 (199 mg/100 g) と同等の結果が得られた。加えて、アルカリ性洗浄剤溶液および水酸化ナトリウム溶液を混合した牛乳の全てにおい

て、魚臭が確認された。官能検査については、混和翌日以降も継続し、そこでは、牛乳 5 mL に対して水酸化ナトリウム、洗浄剤 A もしくは洗浄剤 B の各 1 %溶液 2.0 mL を加えた試料において、対照の牛乳と比較して流動性の低下が認められた。洗浄剤 C もしくは洗浄剤 D の各 1 %溶液 2.0 mL を加えた試料においては、洗浄剤 D で酢のような臭いが認められたが、流動性の低下は認められなかった。なお、1%塩酸溶液を添加した場合は、一部に固化(だまの生成)が認められたが、アルカリ性洗浄剤溶液を添加した際の流動性の低下とは異なるものであった。

模擬試験において、牛乳にアルカリ性洗浄剤 A、B の 1%溶液を添加した際の pH および Na 含有量は、牛乳に 1%水酸化ナトリウム溶液を添加した結果と同等であったこと、本試験に用いたアルカリ性洗浄剤 A、B は、共に水酸化ナトリウムが主成分とするものであり、これらアルカリ性洗浄剤溶液および水酸化ナトリウム溶液を添加した牛乳は、全て魚臭を呈したことにより、実際の苦情品と同様の現象が再現された。以上の結果から、本苦情品において、製造ラインの洗浄に使用されているアルカリ性洗浄剤が牛乳に混入した可能性が考えられた。

(2) 乳脂肪分

苦情品等の牛乳の試験において一部の牛乳の乳脂肪分が低かったことから、洗浄剤が牛乳に混入した場合に乳脂肪分に影響を及ぼした可能性を検証するために、別途、模擬試験を実施した。上記の「2 (1) pH、Na および官能検査」においては 1%洗浄剤溶液を用いて模擬試験を行ったが、その後、当該牛乳供給事業者において約 5%の洗浄剤溶液が用いられていたことが判明したことから、1%および 5%洗浄剤溶液を用いて模擬試験を行った。洗浄剤溶液の添加量は、上記と同様に検出された Na 含有量に準じて、牛乳 100 mL に対して 1%洗浄剤溶液の場合は 40 および 60 mL とし、5%洗浄剤溶液の場合は 8 および 12 mL とした。なお、試験はアルカリ性洗浄剤溶液および水酸化ナトリウム溶液についてのみ行い、対照品として同量の超純水を用いた。なお、1%洗浄剤溶液 40 mL および 5%洗浄剤溶液 8 mL が「2 (1) pH、Na および官能検査」において牛乳 5 mL に対して 2.0 mL 添加した水酸化ナトリウム量に相当する。

結果を表 3 に示す。アルカリ性洗浄剤 A、B や水酸化ナトリウムの 1%および 5%溶液と牛乳を混合

表 2 牛乳と洗浄剤溶液を混和した際の模擬試験結果（pH および Na 含有量）

液性	洗浄剤等*	水酸化ナトリウム含有量（%） （SDS等による）	pH**	牛乳との混和時			性状異常の有無 （異味異臭、凝固等）
				混合量 （mL；牛乳5mLに対し）	pH	Na含有量 （mg/100 g）	
アルカリ性	洗浄剤A	80	14	2.0	11.9	196	やや魚臭
				1.0	11.0	130	やや魚臭
				0.5	9.6	86	やや魚臭
	洗浄剤B	100	14	2.0	12.0	196	やや魚臭
				1.0	11.1	138	やや魚臭
				0.5	9.7	88	やや魚臭
	水酸化ナトリウム	97	14	2.0	11.7	199	やや魚臭
				1.0	11.0	128	やや魚臭
				0.5	9.6	87	やや魚臭
酸性	洗浄剤C	0	1	2.0	5.7	28	特徴なし
	洗浄剤D	0	3	2.0	6.1	28	酢のような匂い
	塩酸	0	1	2.0	2.1	28	少しだまができる
超純水		0	7	2.0	6.8	28	変化なし

*1%溶液を用いた（超純水を除く）

**pH 試験紙により測定

表 3 牛乳と洗浄剤溶液を混和した際の模擬試験結果（乳脂肪分および pH）

液性	洗浄剤等	混合量 (mL/牛乳100 mLに対し)		希釈率 (%)		乳脂肪分の理論値 (%)		乳脂肪分の実測値 (%) *			
								混合直後		24時間後	
		5%溶液	1%溶液	5%溶液	1%溶液	5%溶液	1%溶液	5%溶液	1%溶液	5%溶液	1%溶液
アルカリ性	洗浄剤A	12	60	89	63	3.6	2.5	—	2.6 (12.1)	—	2.7 (12.0)
		8	40	93	71	3.7	2.9	3.8 (11.7)	3.0 (11.7)	3.9 (11.6)	3.1 (11.6)
	洗浄剤B	12	60	89	63	3.6	2.5	—	—	—	—
		8	40	93	71	3.7	2.9	3.9 (11.8)	—	3.8 (11.7)	—
	水酸化ナトリウム	12	60	89	63	3.8	2.6	—	—	—	—
		8	40	93	71	3.7	2.9	3.8 (11.8)	3.0 (11.8)	3.8 (11.7)	3.1 (11.7)
超純水		12	60	89	63	3.6	2.5	—	2.7 (6.9)	—	2.6 (7.0)
		8	40	93	71	3.7	2.9	3.9 (6.8)	2.9 (6.9)	3.9 (7.0)	3.0 (6.9)
牛乳 (対照品)		0	0	100	100	4.0	4.0	4.2 (6.8)	4.2 (6.8)	4.2 (6.9)	4.2 (6.9)

—：試験を実施せず

*括弧内に pH を示した

した結果、対照品の牛乳と比較して全ての試料で乳脂肪分の低下が認められた。例として、アルカリ性洗浄剤 A の 1 %溶液を 40 mL 添加した際、乳脂肪分は 4.2 %から 3.0 %、60 mL 添加した際は 4.2 %から 2.6 %へ低下した。また、5 %溶液を 8 mL 添加した際、乳脂肪分は 4.2 %から 3.8 %に低下した。しかし、洗浄剤溶液と同量の超純水を加えたものと比較したところ、洗浄剤溶液の結果と差は認められなかった。洗浄剤 B や水酸化ナトリウムの 1%および 5%溶液を添加した際も、洗浄剤 A 溶液と同様に乳脂肪分の低下を認めたが、超純水と混合したものとの差は見られなかった。すなわち、乳脂肪分の低下は、アルカリ性洗浄剤の作用に由来するものではなく、洗浄剤溶液の混入による体積の増加（希釈）

によるものと推察された。

これを検証するために、牛乳の乳脂肪分を 4.0 %と仮定し、洗浄剤 A、B および水酸化ナトリウム各溶液や、超純水をそれぞれの添加量で混合した際の希釈率から、単純に希釈の際の乳脂肪分の理論値を試算した。その結果を表 3 に合わせて示した。試算した乳脂肪分の理論値は、実測値とよく近似した。すなわち、確認された乳脂肪分の低下は、アルカリ性洗浄剤との混合により乳脂肪分が変性、分解等に起因しておらず、単純に希釈により乳脂肪分が低下したと考えられた。

さらに、牛乳とアルカリ性洗浄剤の混合による乳脂肪分および性状の変化の検証のため、牛乳が製造されてから児童に提供されるまでの時間（概ね 1 日）

が経過していることを考慮して、牛乳とアルカリ性洗剤溶液および水酸化ナトリウム溶液を混合した後、24 時間経過したサンプルについても同様に乳脂肪分を測定した。その結果、混合直後に測定した数値との差は認められなかった。これより、アルカリ性洗剤と牛乳の混合後 24 時間において、乳脂肪分の低下は、乳脂肪分の分解・変性に起因しないことが考えられた。

苦情品において認められた乳脂肪分の低下は、酸度の異常、Na の高値あるいは異臭・性状異常とは異なり、アルカリ性洗剤の成分に特異的な現象でなく、牛乳に溶液が混入したことによる体積の増加（希釈）によるものであると考えられる。すなわち、苦情品では希釈による乳脂肪分の低下が認められたことから、アルカリ性洗剤は、溶液として製品に混入した可能性が示唆された。

ま と め

本件の苦情事例において、異味異臭および性状異常が認められた試料では、pH の高値が認められ、牛乳の成分規格に対しては酸度の異常（測定不能）が認められた。当該苦情品では、pH の高値と関連して Na 含有量においても高値が認められた。製造所では牛乳の製造ラインの洗浄にアルカリ性洗剤を使用しており、これらはいずれも Na を高度に含むことから、苦情品においては、アルカリ性洗剤が一過性に混入したと推察された。これを検証するための模擬実験では、苦情品と同様の現象を再現することができた。

謝 辞

本調査にあたり、大阪市健康局生活衛生課、食品衛生監視課および大阪市保健所監視事務所のご協力を受けたことを記し、深謝申し上げます。

利 益 相 反

本事例の調査にあたって開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 厚生労働省.富山市内の学校給食で発生した集

団食中毒について.

<https://www.mhlw.go.jp/content/12401000/000925048.pdf>

- 2) 日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針<理化学編>2005.
- 3) 消費者庁. 食品表示基準について（消食表第139号 平成27年3月30日）、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/assets/food_labeling_cms201_220330_12.pdf
- 4) 厚生省. 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の方法（厚生省令第52号 昭和26年12月27日）
- 5) 野口洋介. 牛乳と調理. 調理科学 1977; 10(2): 53-61.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/cookeryscience1968/10/2/10_53/_pdf/-char/ja
- 6) 文部科学省. 食品成分データベース、日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）
https://fooddb.mext.go.jp/details/details.pl?ITEM_NO=13_13003_7

WEB サイトの内容は 2022 年 6 月 10 日に確認した。

Complaint Case Report on Milk in Osaka City

Daiki KITAGUCHI, Eri KISHI, Misako NAKAMURA, Atsushi MASAYAMA, Iori MIYAMOTO,
Chiharu MIZUGUCHI, Shotaro HIRATA, Sachiko KAKIMOTO, Tadashi NAKATANI,
Asako OZAKI and Satoshi TAKATORI

A case involving the contamination of milk with alkaline detergent was investigated. The milk was served for school lunches. The pH of milk which showed unusual conditions (odor, taste, color and decline in liquidity) was >9.8 . The acidity of milk notified by “Ministerial Ordinance Concerning Compositional Standards, etc. for Milk and Milk Products” in Japan could not be examined in these milk. The sodium concentration of the milk was >102 mg/100 mL which is at least 2.5-fold higher than that of normal milk (41 mg/100 mL). Alkaline detergents used for the maintenance of the production system contain sodium hydroxide. Thus, the unusual conditions (pH and sodium content) of the milk may have been caused by contamination with alkaline detergent(s). Model studies of contamination of milk with these alkaline detergents were also conducted and the results supported the hypothesis.

Key words: complaint, milk, off-flavor, detergent

フォトダイオードアレイ検出器付き HPLC を用いた

牛の多様な食用部分を対象とした抗寄生虫薬一斉分析法の検討

平田祥太郎^{a,b}, 昌山 敦^a, 仲谷 正^a, 星 英之^b, 高取 聡^a

本研究ではフォトダイオードアレイ検出器付き HPLC を用いて、牛の多様な食用部分を対象とした抗寄生虫薬一斉分析法を検討した。抗寄生虫薬はアセトニトリル-メタノール混液および EDTA 含有クエン酸リン酸緩衝液(マッキルベン緩衝液)で抽出した。試料由来の夾雑成分についてはアセトニトリル/ヘキサン分配および固相カラム精製により除去した。溶媒を除去し、40%アセトニトリル溶液で溶解して試験溶液を調製した。HPLC 条件については分離カラムとして Inertsil ODS-3(3.0×150 mm、粒子径 3.0 μm)、移動相としてトリフルオロ酢酸およびアセトニトリルによるグラジエント溶出を採用した。この条件において、抗寄生虫薬 16 成分を良好に分析可能であった。評価対象の抗寄生虫薬を含まない畜産物試料から試験溶液を調製したところ、測定を妨害する夾雑ピークは確認されなかった。加えて、添加回収試験では牛の多様な食用部分において良好な真度/併行精度を示した。本法は、広く普及しているフォトダイオードアレイ検出器付き HPLC で実施できることから多くの検査機関での適用が期待できる。

キーワード：畜産物、抗寄生虫薬、残留分析、高速液体クロマトグラフィー、フォトダイオードアレイ検出器

家畜感染症の予防・治療を目的として動物用医薬品が家畜に投与されている¹⁾。我が国においては、家畜感染症の中でも寄生虫(原虫、吸虫、線虫および外部寄生虫)による疾患が多く発生しており、これを予防・治療するためにアンプロリウム等の抗寄生虫薬が投与されている¹⁾。一方、抗寄生虫薬が過度に残留した食品を摂取した場合、健康危害が懸念される。このため食品に残留する抗寄生虫薬についても、食品衛生法においてポジティブリスト制度に基づき各基準が設けられており、地方衛生研究所等の検査機関では基準値適合性の検査が実施されている²⁾。

厚生労働省からは牛の筋肉や肝臓等を対象とした抗寄生虫薬の一斉分析法が通知されており、LC-MS/MS を用いた手法が多い^{3,4)}。しかしながら、検査機関においては LC-MS/MS は保守費用を含めて高額であることから、設置台数に制約がある。そのため、汎用性の高いフォトダイオードア

レイ検出器付き HPLC(以下 HPLC-PDA)を用いた抗寄生虫薬の一斉分析法は検査する上で有用である。

HPLC-PDA を用いた抗寄生虫薬の一斉分析法としては「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 II(畜水産物)³⁾」等の一部成分が対象とされている程度である。また、これまでの分析法は筋肉や肝臓のみの限られた畜産物を対象としている^{3,5)}。我が国の食文化において筋肉や肝臓以外の畜産物についても摂食量が多い。例えば牛の舌(タン)や第一胃(ミノ)は食されることが多いが、これらを対象にした抗寄生虫薬一斉分析法は見受けられない。

そこで本研究では、HPLC-PDA を用いて牛の多様な食用部分を対象に抗寄生虫薬一斉分析法を検討した。抗寄生虫薬としては畜産業で汎用されている物質を選択した。試験溶液調製法については、著者らが以前確立した抗菌性物質分析法⁶⁾を基に検討を行った。これは食品から対象物質をアセトニトリル/メタノール混液およびマッキルベン緩衝液で抽

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学2課

b 大阪公立大学現代システム科学研究科

出し、抽出液をアセトニトリル/ヘキサン分配および固相カラムによって精製し、HPLC-PDA で測定する方法である。これは汎用性の高い分析法であり、多くの検査機関で実施可能な手法である。検討の結果、牛の畜産物(筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、舌、心臓、第一胃、尻尾)を対象に抗寄生虫薬 16 成分の一斉分析法を確立できたので報告する。

実験方法

1. 試料

大阪市内で販売されていた牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、舌、心臓、第一胃、尻尾を用いた。筋肉の場合は可能な限り脂肪層を除き、脂肪の場合は可能な限り筋肉層を除いた。試料はいずれもフードプロセッサで細切均一化し、使用時まで -30°C で凍結保存した。

2. 試薬等

標準品：抗原虫薬、抗吸虫薬、抗線虫薬、外部寄生虫駆除剤の中から、牛の養畜において使用される物質を選定した。高速液体クロマトグラフ用あるいは残留農薬試験用のアンプロリウム、チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾール、クロピドール、スルファチアゾール、スルファジミジン、モランテル、オクスフェンダゾール、フェンベンダゾール、フェバンテル、ニトロキシニル、ケト-トリクラベンダゾール、トリクラベンダゾール、デコキネート、ペルメトリン、メトプレンを富士フイルム和光純薬工業株式会社から購入した。

標準原液：各標準品をメタノールに溶解して $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ に調製し、標準原液とした。混合標準溶液を調製する際には、各標準原液を混合した後、40%アセトニトリル溶液で $2.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ になるように希釈した。これを適宜 40%アセトニトリル溶液で希釈し、添加回収試験および検量線の作成に用いた。

試薬等：n-ヘキサン、アセトニトリル、メタノール、クエン酸一水和物、リン酸二ナトリウム十二水和物は富士フイルム和光純薬工業株式会社製を用いた。EDTA 二ナトリウム二水和物はナカライテスク株式会社製を用いた。

除タンパク抽出溶媒：アセトニトリルとメタノールを 1 : 1 の割合で混合したものを用いた。

EDTA 含有マッキルベン緩衝液：EDTA 二ナトリウム二水和物 1.86 g に第 1 液 307 mL と第 2 液

193 mL を混和したものを加えて溶かした。第 1 液としてクエン酸一水和物 21.0 g を超純水に溶かして $1,000\text{ mL}$ とした溶液、第 2 液としてリン酸二ナトリウム十二水和物 71.6 g を超純水に溶かして $1,000\text{ mL}$ とした溶液を作成した。

飽和 EDTA 溶液：超純水に EDTA 二ナトリウム二水和物を飽和状態になるまで溶解させ、一晚静置後、上澄みを用いた。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム：ジーエルサイエンス社製の InertSep PLS-2($265\text{ mg}/20\text{ mL}$)を用いた。

セラミックホモジナイザー：Agilent Technologies 社製の 50 mL 遠心管用セラミックホモジナイザーを用いた。

3. 装置

振とう機：HMV-1000W(東京理化器械株式会社製)

遠心分離機およびローター：himacCR22F および R12A5(日立工機株式会社製)

HPLC-PDA：1260 Infinity II LC- Diode Array Detector HS(Agilent Technologies 社製)

4. 測定条件

カラム：Inertsil® ODS-3、 $3.0\times 150\text{ mm}$ 、 $3.0\text{ }\mu\text{m}$ (ジーエルサイエンス社製)

カラム温度： 40°C

移動相：(A)0.05%トリフルオロ酢酸、(B)アセトニトリル

グラジエント条件：(B)1%→100%(35 min、リニア)→100%(5 min、保持)

流速： 0.3 mL/min

注入量： $40\text{ }\mu\text{L}$

測定波長： 260 nm 、 275 nm および 300 nm

5. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は既報に準じて実施した⁹⁾。

均一化した試料 5.0 g をポリプロピレン(PP)製遠心管に採取し、セラミックホモジナイザーを加えた。除タンパク抽出溶媒を 20 mL 添加し、振とう機で混和(縦振り 300 rpm 、5 分間、以下同様)した。遠心分離($8,000\text{ rpm}$ 、10 分間、以下同様)後、除タンパク抽出溶媒層を別の PP 製遠心管に分取した。除タンパク抽出溶媒層にはアセトニトリル飽和ヘキサンを 20 mL 添加し、振とう機で混和した。遠心分離

後、ヘキサン層(上層)を除去した。

抽出後の残渣について、EDTA 含有マッキルベン緩衝液を 20 mL 添加し、振とう機で混和した。遠心分離後、液層を PP 製遠心管に分取した。その後、残渣について EDTA 含有マッキルベン緩衝液を 15 mL 添加し、振とう機で混和した。遠心分離後、液層を先に分取した抽出液と合わせた。この EDTA 含有マッキルベン緩衝液による抽出液全量にアセトニトリル飽和ヘキサンを 15 mL 添加し、振とう機で混和した。遠心分離後、ヘキサン層(上層)を除去した。

ヘキサン層除去後の抽出液(下層)を InertSep PLS-2(メタノール 10 mL、超純水 10 mL、飽和 EDTA 溶液 10 mL でコンディショニング済み)に負荷した。超純水 20 mL で洗浄した後、メタノール 10 mL で溶出し、先に調製した脱脂済みの除タンパク抽出溶媒層と混和した。この混和液をナス型フラスコに回収し、減圧濃縮した。濃縮液をメタノールで 10 mL(試料 0.5 g/mL 相当)に定容した。この溶液 10 mL のうち 2 mL を試験管に採取し、窒素気流下で乾固後、40%アセトニトリル溶液で 0.5 mL に正確に定容した(試料 2.0 g/mL 相当)。

6. 検量線の作成

各抗寄生虫薬について 0.02-2.0 µg/mL の範囲で標準溶液を調製し、クロマトグラムのピーク面積より検量線を作成した。

7. 分析法の性能評価

(1)選択性および定量下限

ブランク試験溶液(試料 2.0 g/mL 相当)から測定を妨害する夾雑ピークの有無を確認した。ブランク試験溶液に標準溶液を添加して作成したマトリクス標準溶液から定量下限(µg/g)を評価した。マトリクス標準溶液(0.01、0.02、0.05、0.1 µg/g)において、各抗寄生虫薬のピークのシグナルノイズ比を評価し、その値が 10 以上となった濃度を各定量下限と規定した。

(2)添加回収試験

対象抗寄生虫薬の残留基準を表 1 に示した。残留基準が 0.1 ppm 以上であるため、0.1 µg/g を添加濃度とした。試料 5.0 g に 1.0 µg/mL 混合標準溶液を 0.5 mL 添加後、30 分間放置してから操作を開始した。添加試料(n=3)について分析を行い、平均回収率(真度)(%)と併行精度(%)を求め、真度が 70%以上

120%以下かつ併行精度が 10%以下を良好と判定した。

表 1 対象抗寄生虫薬の残留基準

抗寄生虫薬	牛における残留基準(ppm) ¹⁾				
	筋肉	脂肪	肝臓	腎臓	その他食用部分
アンブロリウム	0.5	2	0.5	0.5	0.5
チアベンダゾール ²⁾	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
5-ヒドロキシチアベンダゾール ²⁾					
クロビドール	0.2	0.2	2	3	2
スルファチアゾール	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
スルファジミジン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
モランテル	0.1	0.1	0.8	0.2	0.8
オクスフェンダゾール ³⁾					
フェンベンダゾール ³⁾	0.1	0.1	0.5	0.1	3
フェバンテル ³⁾					
ニトロキシニル	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5
トリクラベンダゾール ⁴⁾	0.3	0.1	0.9	0.4	0.9
ケト-トリクラベンダゾール ⁴⁾					
デコネート	1	2	2	2	2
ベルメトリン	1	1	0.1	0.1	0.1
メトプレン	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1

¹⁾2022 年 9 月 1 日時点における残留基準

²⁾チアベンダゾール及び 5-ヒドロキシチアベンダゾールの和

³⁾オクスフェンダゾール、フェンベンダゾール及びフェバンテルの和

⁴⁾トリクラベンダゾール及び酸性条件下でケト-トリクラベンダゾールに変換される代謝物をトリクラベンダゾールに換算したものの和

結 果 お よ び 考 察

1. 測定条件の検討

(1)HPLC 条件および保持時間

対象物質を良好に分離できる HPLC 条件を検討した。本研究では厚生労働省から過去に通知されていた「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I(畜水産物)¹⁾」の条件を準用した。これはカラムにオクタデシルシリル(ODS)カラムを採用し、移動相としてアセトニトリルおよび 0.05%トリフルオロ酢酸をグラジエント溶出する条件である。この条件は動物用医薬品とその一部代謝物を含む 107 成分を分離可能な手法であり、本研究で対象としている抗寄生虫薬の一部(チアベンダゾール等)も含まれ

ている。そのため、本研究の対象 16 成分の分離にも適するのではないかと考えた。また、既報^{1,3,5,7)}での測定波長を参考に本法の測定波長は 260、275、300 nm の 3 波長を選択した。本条件を用いて、ピーク分離および保持時間の評価を行った結果、各測定波長における対象成分ピークはそれぞれ分離しており、保持時間が 40 分以内であることが確認された(図 1 および表 2)。また全ての測定波長において各成分のピークと隣接ピークとの分離度を評価したところ、一部の成分間 (5-ヒドロキシチアベンダゾールとクロピドール間等) では幾らか重なりはあるものの、分離度は 1.0 以上であった。これらの結果より適切に定量が可能であることが確認された。

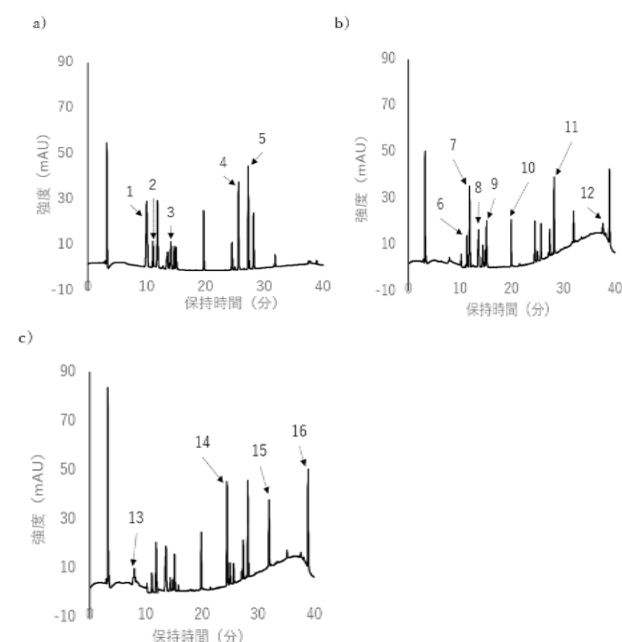


図 1 0.1 µg/mL 混合標準溶液のクロマトグラム

a)測定波長 300 nm

b)測定波長 275 nm

c)測定波長 260 nm

数字は対象物質のピークを示している。

1 : チアベンダゾール、2 : 5-ヒドロキシチアベンダゾール、3 : モランテル、4 : ケト-トリクラベンダゾール、5 : トリクラベンダゾール、6 : クロピドール、7 : スルファチアゾール、8 : スルファジミジン、9 : オクスフェンダゾール、10 : フェンベンダゾール、11 : フェバンテル、12 : ペルメトリン、13 : アンブロリウム、14 : ニトロキシニル、15 : デコキネート、16 : メトプレン

表 2 測定波長、保持時間、検量線の直線性

抗寄生虫薬	測定波長(nm)	保持時間(分)	検量線の直線係数(r^2)
アンブロリウム	260	8.0	0.99
チアベンダゾール	300	10.3	1.00
5-ヒドロキシチアベンダゾール	300	11.1	0.99
クロピドール	275	11.3	1.00
スルファチアゾール	275	11.9	1.00
スルファジミジン	275	13.6	1.00
モランテル	300	14.2	1.00
オクスフェンダゾール	275	15.0	1.00
フェンベンダゾール	275	19.7	1.00
フェバンテル	275	28.2	1.00
ニトロキシニル	260	24.5	1.00
トリクラベンダゾール	300	27.3	1.00
ケト-トリクラベンダゾール	300	25.6	1.00
デコキネート	260	31.9	0.99
ペルメトリン	275	37.7	1.00
メトプレン	260	39.1	0.99

(2)検量線の直線性

各抗寄生虫薬の検量線を作成したところ、16 成分全てにおいて 0.02-2.0 µg/mL の範囲で良好な直線性 ($r^2 \geq 0.99$) が得られた(表 2)。

2. 試験溶液調製法の検討

これまで、著者らは豚肉等を対象に抗菌性物質分析法を報告してきた(以下、既存法)⁶⁾。既存法は様々な物理化学的性状の抗菌性物質を抽出できるため、抗寄生虫薬 16 成分の抽出にも準用可能ではないかと考え、その可否を検証した。

(1)選択性の評価

既存法で調製した試験溶液を用いて測定を妨害する夾雑ピークの有無を評価した。図 2 に代表的なクロマトグラムとして測定波長 300 nm における筋肉ブランク試料、筋肉を用いたマトリクス標準溶液、肝臓ブランク試料、舌ブランク試料、尻尾ブランク試料のクロマトグラムを示した。各クロマトグラムを評価すると、一部畜産物由来の夾雑ピークが認められたが、対象成分の測定を妨害する夾雑ピークは認められなかった。心臓、脂肪、第一胃、腎臓においても同様に評価を行ったところ、対象成分の測定を妨害する夾雑ピークは認められなかった。また、

測定波長 275 nm および 260 nm においても同様に評価を行ったところ、対象成分の測定を妨害する夾雑ピークは認められなかった。これらの結果から、既存法は十分な選択性を有していることが示された。

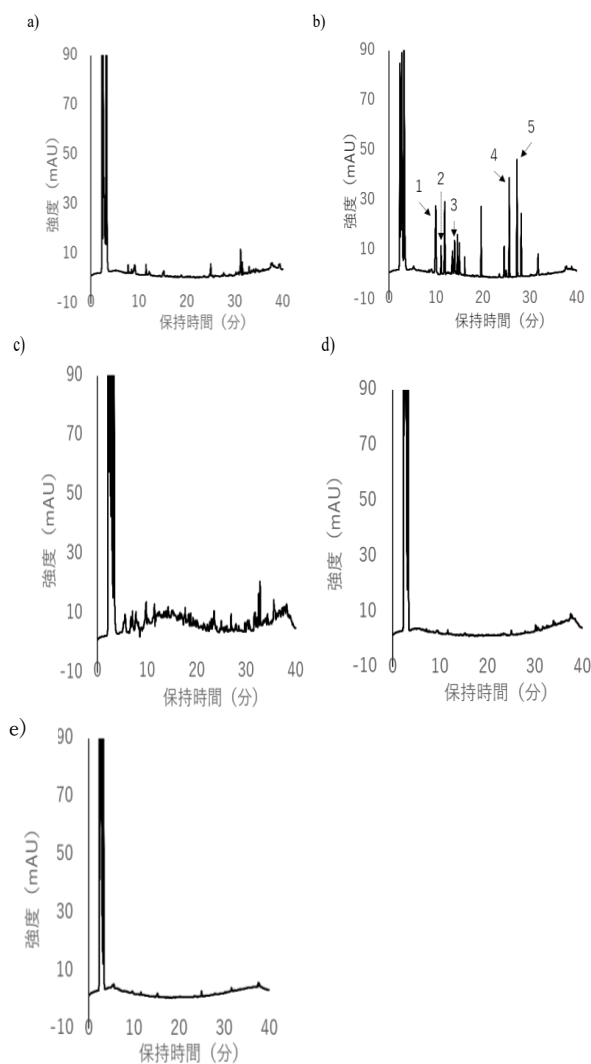


図2 畜産物クロマトグラム（測定波長 300 nm）

a)筋肉ブランク試料

b)筋肉マトリクス 0.1 µg/mL 標準溶液

c)肝臓ブランク試料

d)舌ブランク試料

e)尻尾ブランク試料

*クロマトグラム中の数字は測定波長 300 nm における対象物質のピークを示している。

1: チアベンダゾール、2: 5-ヒドロキシチアベンダゾール、3: モランテル、4: ケト-トリクラベンダゾール、5: トリクラベンダゾール

(2)定量下限の評価

既存法で調製したブランク試験溶液と標準溶液を混合してマトリクス標準溶液を調製し、定量下限を評価した(表 3)。

アンプロリウムやクロピドール等の単独で残留基準が設定されている抗寄生虫薬については、定量下限が残留基準を下回っている必要がある。評価したところ、いずれの成分も定量下限が残留基準以下であることが確認された。「チアベンダゾールおよび5-ヒドロキシチアベンダゾール」については、両物質の和で残留基準が設定されており、少なくともその 1/2 に相当する定量下限(0.05 µg/g)が必要である。両物質の定量下限は 0.05 µg/g 以下であり、基準適合性を判定するために必要な定量下限を有していることが確認された。「オクスフェンダゾール、フェバンテルおよびフェンベンダゾール」については、三物質の和で残留基準が設定されており、少なくともその 1/3 に相当する定量下限(0.03 µg/g)が必要である。両物質の定量下限は 0.03 µg/g 以下であり、基準適合性を判定するために必要な定量下限を有していることが確認された

表3 定量下限の評価結果

抗寄生虫薬	定量下限(µg/g)							
	筋肉	脂肪	肝臓	腎臓	舌	心臓	第一胃	尻尾
アンプロリウム	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
チアベンダゾール	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
5-ヒドロキシチアベンダゾール	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
クロピドール	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
スルファチアゾール	0.02	0.02	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
スルファジミジン	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02
モランテル	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
オクスフェンダゾール	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
フェンベンダゾール	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01
フェバンテル	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
ニトロキシニル	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
トリクラベンダゾール	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
ケト-トリクラベンダゾール	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
デコキネート	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
ベルメトリン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
メトプレン	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

以上より、既存法は基準適合性を判定するために必要な定量下限を有していることが示された。

(3)添加回収試験による真度/併行精度の評価

添加回収試験(添加濃度 0.1 µg/g、n=3)の結果を表 4 および表 5 に示した。いずれの抗寄生虫薬においても真度(%)は 70-120%の範囲内であり、併行精度(%)については 10%以下であった。これらの結果から、既存法は良好な真度/併行精度を有していることが示された。

表 4 添加回収試験(筋肉、脂肪、肝臓、腎臓)

抗寄生虫薬	筋肉		脂肪		肝臓		腎臓	
	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)
アンブロリウム	96	9	94	6	102	4	87	6
チアベンダゾール	99	6	78	4	97	6	90	6
5-ヒドロキシチアベンダゾール	90	9	82	8	105	6	85	7
クロピドール	72	3	73	9	113	7	109	5
スルファチアゾール	76	8	90	5	95	9	102	9
スルファジミン	98	4	99	6	88	7	76	6
モランテル	84	6	91	3	89	4	85	4
オクスフェンダゾール	113	5	106	9	82	4	79	3
フェンベンダゾール	92	9	111	5	87	5	103	3
フェバンテル	88	4	98	3	87	2	72	5
ニトロキシニル	93	3	101	3	82	2	79	4
トリクラベンダゾール	87	4	89	6	72	6	74	3
ケトトリクラベンダゾール	77	4	90	6	72	5	74	7
デコキネート	94	7	85	7	97	9	78	1
ベルメトリン	90	9	83	8	107	5	90	6
メトプレニ	77	7	80	9	107	1	105	6

添加濃度0.1 µg/g、試行数n=3

表5 添加回収試験(その他食用部分)

抗寄生虫薬	舌		心臓		第一胃		尻尾	
	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)
アンブロリウム	100	7	89	7	96	4	96	8
チアベンダゾール	78	3	93	9	86	3	72	7
5-ヒドロキシチアベンダゾール	101	4	83	5	83	3	103	1
クロピドール	98	6	77	4	84	8	84	8
スルファチアゾール	96	7	74	3	92	4	88	9
スルファジミン	78	6	79	2	90	2	79	5
モランテル	86	5	72	5	74	6	104	3
オクスフェンダゾール	94	4	87	8	73	3	104	9
フェンベンダゾール	111	2	97	4	71	5	108	3
フェバンテル	72	2	79	4	74	4	90	4
ニトロキシニル	80	2	93	8	83	8	100	3
トリクラベンダゾール	73	3	71	7	74	5	86	4
ケトトリクラベンダゾール	78	3	72	4	75	4	96	4
デコキネート	105	5	85	8	100	6	112	2
ベルメトリン	87	8	91	7	104	7	112	5
メトプレニ	100	5	78	8	72	3	80	3

添加濃度0.1 µg/g、試行数n=3

考 察

本研究ではHPLC-PDAを用いて牛の多様な食用部分を対象に抗寄生虫薬16成分の一斉分析法を検討した。検討により以下の結果を得た。

1. 一般的なODSカラムと移動相としてアセトニトリルおよび0.05%トリフルオロ酢酸の組み合わせにより、HPLC-PDAで抗寄生虫薬16成分の分析条件を確立した。
2. 本法は基準適合性を判定するために必要な選択性/定量下限を有しており、良好な真度/併行精度を有していた。

本法は筋肉や肝臓だけでなく、心臓や第一胃等の幅広い畜産物の残留抗寄生虫薬検査に適用可能であると考えられた。本法は簡便な操作および汎用的分析機器を用いて十分な感度と精度が得られる分析法であり、検査機関における日常的な検査の中で十分運用できるものと考えられた。

なお、トリクラベンダゾールの残留基準は「トリクラベンダゾール及び酸性条件下でケト-トリクラベンダゾールに変換される代謝物をトリクラベンダゾールに換算したものの和」と規定されていることから、トリクラベンダゾールが検出された場合は別途、通知法に基づいて確認が必要である。本研究では牛の畜産物を対象としたが、今後は鶏卵や魚介類といった他の畜水産物を対象に本法の有効性を検討していく予定である。分析が困難な畜水産物や抗寄生虫薬が確認された場合は、他の試験法^{7, 8)}で示される抽出法や精製法との比較を行い、分析法を更に改良していく必要がある。

謝 辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 20K23248(研究代表者：平田祥太郎)および大阪市健康局(令和3年度乳肉衛生関係特別調査研究)による助成を受け実施された。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Horie, M. Development of analytical methods for

- residual veterinary drugs in food. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)* 2010; **51**: 363-372.
- 2) Murayama, M. The Japanese regulation on residual veterinary drugs and feed additives in foodstuffs. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)* 2010; **51**: 360-362.
- 3) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知 “食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について” 平成 17 年 11 月 29 日、食安発第 1129002 号.
- 4) Yamaguchi, M., Kakimoto, K., Yamaguchi, T., Obana, H. Simultaneous determination of polyether antibiotics and macrolide anthelmintics in livestock products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)* 2011; **52**: 281-286.
- 5) Takeba, K., Fujinuma, K., Sakamoto, M., Jimbo, K., Oka, H., Ito, Y., Nakazawa, H. Determination of benzimidazole anthelmintics in livestock foods by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)* 2003; **44**: 246-252.
- 6) Hirata, S., Masayama, A., Nakatani, T., Hoshi, H., Takatori, S. Determination of residual antibacterial substances in processed foods manufactured from livestock and marine products using HPLC. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)* 2021; **28**: 138-145.
- 7) Kawasaki, M., Ono, T., Murayama, M., Toyoda, M., Uchiyama, S. Determination of thiabendazole and 5-hydroxythiabendazole in livestock foods by HPLC-UV. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)* 1999; **40**: 481-487.
- 8) Ishii, R., Horie, M., Hoshino, Y., Nakazawa, H. Simultaneous determination of residual anthelmintic agents in liver and fat tissues by HPLC with fluorescence detection. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)* 1997; **38**: 42-45.

**Simultaneous determination of residual anthelmintics in cattle livestock products
using HPLC with a photo-diode array detector**

Shotaro HIRATA^{a,b}, Astushi MASAYAMA^a, Tadashi NAKATANI^a, Hidenobu HOSHI^b and Satoshi TAKATORI^a

A rapid and easy method for simultaneous determination of anthelmintics in cattle livestock products using a high-performance liquid chromatograph with a photo-diode array detector (HPLC-PDA) has been developed. Residual anthelmintics were extracted with a mixture of acetonitrile/methanol and McIlvaine buffer containing EDTA. The impurities including lipids were removed from the extract by an acetonitrile-hexane partition and a solid-phase column. After removal of the solvent, the extract was resolved in 40% acetonitrile solution and analyzed using HPLC-PDA. These anthelmintics were separated on Inertsil ODS-3 column (3.0 mm i.d.×150 mm, 5 µm) with a gradient system with 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile as the mobile phase. No interfering peak was found on the chromatograms of cattle livestock products. Recovery tests of 16 anthelmintics from livestock products were performed, and all substances exhibited acceptable recovery (70-120%) with low relative standard deviations. This method could be useful for the simultaneous determination of residual anthelmintics in cattle livestock products.

Keywords: cattle livestock products, anthelmintics, residual analysis, high-performance liquid chromatograph, photodiode array detector

^a Osaka Institute of Public Health, Division of Hygienic Chemistry

^b Osaka Metropolitan University, Graduate School of Sustainable System Sciences

畜水産物中における残留動物用医薬品一斉分析法の検討

昌山敦, 平田祥太郎, 高取聡

残留動物用医薬品の分析において、対象化合物の様々な性質を網羅するために有機性抽出液と水性抽出液を合わせて試料溶液を調製することは一斉分析法として非常に有効である。今回我々は従来法の改良を目的とし、従来法における抽出液の一部を利用することで操作工程の迅速化を可能とした。また、試料溶液の調製法を改良するに伴い、分析対象化合物の追加を検討した。測定は液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使用し、試料には基準値相当濃度 (基本濃度 $0.01 \mu\text{g/g}$) を添加し回収試験を実施した。様々なマトリクスを有する 10 試料全てに対して、60 化合物が妥当性評価ガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。

キーワード：残留動物用医薬品、一斉分析法、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

我々は畜水産物中の残留動物用医薬品分析において、厚生労働省通知の「HPLC による動物用医薬品の一斉分析法 III (畜水産物)」¹⁾、厚生労働省通知の個別試験法「オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法 (畜水産物)」²⁾、および山口らの方法³⁾を参考にした一斉分析法の確立に取り組み⁴⁾、行政検査に活用してきた (従来法)。

今回、従来法からの操作時間短縮、および分析対象化合物の追加を目的とした新規分析法を検討するため、添加回収試験を実施した。基準値相当濃度 (基本濃度 $0.01 \mu\text{g/g}$) を添加した添加回収試験を行い、平成 22 年 12 月に通知された試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正^{5,6)}に基づき分析法の評価を行ったので報告する。

実 験 方 法

1. 試料および試薬等

(1) 試料：大阪市内に流通するサーモン、ヒラメ、エビ、アサリ、牛肉、豚肉、鶏肉、牛肝臓、牛腎臓、牛乳を用いた。牛肉、豚肉および鶏肉はいずれも脂肪をできるだけ取り除いた筋肉部を試料とした。

(2) 標準品：混合標準溶液として、林純薬工業(株)製食品分析用動物薬混合標準溶液 PL 動物薬

LC/MS Mix1 (サルファ剤+葉酸拮抗剤)、PL 動物薬 LC/MS Mix2 (キノロン剤) を使用した。個々の標準品は富士フイルム和光純薬(株)製、あるいは関東化学(株)製を使用した。

(3) 試薬等：アセトニトリル (LC/MS 用または残留農薬・PCB 試験用)、メタノール (LC/MS 用または残留農薬・PCB 試験用)、ギ酸 (LC/MS 用)、クエン酸一水和物 (特級)、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 (特級) は富士フイルム和光純薬(株)製を使用した。エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 二ナトリウム二水和物 (特級) はナカライテスク(株)製を使用した。ろ過助剤はメルク (株) 製ハイフロスーパーセルを使用した。固相抽出カラムには GL サイエンス(株)製 InertSep PLS-2 265 mg/20 mL を使用した。メンブランフィルターはアドバンテック東洋(株)製 DISMIC (親水性 PTFE、13 mm、孔径 $0.2 \mu\text{m}$) を使用した。

(4) 試液：EDTA 含有クエン酸緩衝液は、EDTA 二ナトリウム二水和物 3.72 g、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 27.63 g、クエン酸一水和物 12.89 g を蒸留水で溶解して 1,000 mL に定容した。飽和 EDTA 溶液は、EDTA 二ナトリウム二水和物を飽和状態になるまで蒸留水で溶解し、上澄みを用いた。

2. 装置および測定条件

(1) 装置振とう機は東京理化社製 MV-1100、遠心機は日立工機(株)製 CR22F、LC-MS/MS は SCIEX 社製 QTRAP4500、分析カラムは GL サイエンス社製 InertSustain C18 HP (3 μ m、2.1 $\times$ 150 mm) を使用した。

(2) LC-MS/MS 測定条件

移動相：0.01% ギ酸水溶液 (A)、0.01% ギ酸含有アセトニトリル溶液 (B)

溶出条件 (B%)：5% (0-1 min)、5-25% (1-3 min)、25-30% (3-7 min)、30-50% (7-10 min)、50-95% (10-

13 min)、95% (13-16 min)、5% (16-16.2 min)

流速：0.2 mL/min

カラム温度：40°C

注入量：5 μ L

イオン化モード：ESI (+/-)

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

イオン源電圧：4500 V および -4500 V

イオン源温度：550°C

各化合物の測定条件は表 1 に示した。

表 1 各化合物の MS/MS パラメーター

No.	Compounds	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z) *1	Declustering Potential (V) *2	Collision Energy (eV) *1,2	Collision Exit Potential (V) *1,2
1	5-Hydroxythiabendazole	5.7	218.0	191.0 (146.9)	86	35 (45)	8 (12)
2	5-Propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine	5.9	240.0	132.9 (197.9)	56	39 (27)	10 (14)
3	Amoxicillin	4.5	366.0	114.0 (348.9)	41	27 (13)	10 (6)
4	Ampicillin	5.7	350.0	106.0 (159.9)	61	21 (17)	8 (12)
5	Benzylpenicillin	11.4	335.0	160.0 (176.2)	6	17 (21)	12 (8)
6	Cefalexin	5.7	348.0	158.0 (106.0)	46	13 (43)	8 (8)
7	Cefalonium	6.0	459.0	336.9 (151.9)	41	15 (27)	16 (8)
8	Cephapirin	5.4	424.0	292.0 (123.9)	26	21 (65)	12 (10)
9	Cefazolin	6.3	455.0	322.9 (155.9)	56	15 (23)	14 (8)
10	Chlortetracycline	8.0	479.2	443.9 (154.0)	71	31 (37)	18 (8)
11	Ciprofloxacin	6.1	331.9	288.0 (245.1)	56	25 (33)	12 (10)
12	Cloxacillin	13.0	436.1	277.0 (159.8)	76	21 (19)	10 (10)
13	Danofloxacin	6.2	358.0	314.0 (340.2)	86	25 (33)	14 (12)
14	Diaveridine	5.9	261.0	122.9 (80.9)	61	31 (55)	10 (8)
15	Dicloxacillin	13.5	470.0	159.9 (310.7)	76	19 (21)	12 (16)
16	Difloxacin	7.2	400.1	355.9 (298.9)	66	27 (39)	12 (16)
17	Doxycycline	8.3	445.1	428.2 (410.0)	26	27 (35)	12 (18)
18	Enrofloxacin	6.4	360.1	315.9 (245.0)	71	27 (37)	10 (10)
19	Erythromycin	10.9	734.4	576.2 (158.0)	26	27 (37)	14 (14)
20	Ethopabate	10.9	238.0	206.0 (136.0)	11	15 (37)	8 (10)
21	Fenbendazole	13.4	300.0	159.0 (267.9)	1	47 (31)	12 (12)
22	Florfenicol	9.5	355.7	184.9 (119.0)	-75	-26 (-44)	-5 (-7)
23	Flubendazole	12.5	313.9	282.0 (122.9)	26	31 (47)	12 (10)
24	Flumequine	12.4	262.0	202.0 (244.0)	66	45 (25)	6 (6)
25	Hydrocortisone	11.1	363.1	121.0 (90.9)	86	31 (85)	12 (8)
26	Josamycin	12.6	828.4	109.1 (174.1)	16	79 (41)	10 (14)
27	Kitasamycin	11.9	772.4	109.0 (173.9)	1	77 (41)	10 (12)
28	Levamisole	5.9	205.0	178.0 (90.9)	71	29 (53)	10 (8)
29	Lincomycin	5.7	407.2	125.9 (359.1)	51	35 (25)	10 (16)
30	Marbofloxacin	5.9	363.2	72.1 (345.3)	81	43 (25)	6 (6)
31	Mecillinam	6.2	326.0	167.0 (139.1)	56	31 (41)	12 (12)
32	Miloxacin	10.2	263.9	214.9 (231.0)	16	33 (29)	12 (10)
33	Mirosamycin	10.4	728.3	158.0 (115.9)	126	33 (67)	12 (10)
34	Nafcillin	13.2	415.2	199.1 (171.0)	56	19 (49)	8 (14)
35	Nalidixic acid	12.2	233.0	186.9 (158.9)	51	35 (43)	10 (12)

表 1 各化合物の MS/MS パラメーター (続き)

No.	Compounds	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z) ^{*1}	Declustering Potential (V) ^{*2}	Collision Energy (eV) ^{*1, 2}	Collision Exit Potential (V) ^{*1, 2}
36	Neospiramycin(II)	5.7	350.2	160.1 (174.0)	71	17 (21)	12 (12)
37	Norfloxacin	6.0	319.9	276.1 (233.0)	101	25 (33)	12 (14)
38	Ofloxacin	6.0	362.4	318.0 (261.0)	86	27 (37)	14 (14)
39	Oleandomycin	10.4	688.3	544.2 (158.0)	86	25 (35)	14 (8)
40	Orbifloxacin	6.6	396.0	352.1 (294.8)	61	25 (33)	16 (12)
41	Ormetoprim	6.2	275.0	123.0 (81.0)	11	33 (59)	12 (8)
42	Oxacillin	12.6	402.0	159.9 (243.1)	66	21 (19)	12 (10)
43	Oxfendazole sulfone	11.6	331.9	299.9 (158.9)	86	33 (51)	12 (12)
44	Oxolinic acid	10.4	262.1	244.1 (216.1)	70	25 (37)	6 (6)
45	Oxytetracycline	6.2	461.1	426.0 (200.9)	76	27 (47)	14 (8)
46	Phenoxymethylpenicillin	12.1	350.9	160.0 (114.0)	71	17 (45)	10 (8)
47	Pirlimycin	7.4	411.1	112.0 (363.0)	86	33 (25)	10 (16)
48	Piromidic acid	13.1	288.9	243.0 (200.9)	51	41 (53)	12 (14)
49	Praziquantel	13.5	313.0	203.0 (83.0)	61	23 (39)	14 (8)
50	Pyrantel	6.4	207.0	150.0 (136.0)	16	39 (41)	8 (10)
51	Pyrimethamine	8.6	249.1	177.0 (198.0)	76	39 (53)	12 (14)
52	Ractopamine	6.2	302.0	106.9 (120.9)	16	51 (31)	10 (10)
53	Sarafloxacin	7.0	386.1	342.0 (299.0)	61	25 (41)	14 (16)
54	Spiramycin(II)	6.8	422.3	174.1 (101.0)	61	27 (21)	12 (10)
55	Sulfabenzamide	11.0	277.0	155.9 (91.9)	51	17 (37)	12 (8)
56	Sulfabromomethazine	12.6	357.0	263.8 (155.9)	81	27 (27)	12 (8)
57	Sulfacetamide	6.0	215.0	156.0 (91.9)	51	19 (31)	12 (8)
58	Sulfachlorpyridazine	8.8	284.9	155.9 (91.9)	71	21 (39)	12 (8)
59	Sulfadiazine	6.2	251.0	155.9 (108.0)	6	29 (39)	4 (8)
60	Sulfadimethoxine	11.2	310.9	155.9 (107.9)	76	27 (37)	10 (10)
61	Sulfadimidine	7.5	278.9	124.0 (186.0)	46	29 (23)	10 (10)
62	Sulfadoxine	9.4	310.9	155.9 (107.9)	76	27 (37)	12 (8)
63	Sulfaethoxypyridazine	9.6	294.8	155.9 (91.9)	1	25 (41)	10 (10)
64	Sulfamerazine	6.9	264.9	155.9 (108.0)	66	23 (35)	10 (8)
65	Sulfamethoxazole	9.5	253.9	156.0 (91.9)	51	23 (39)	8 (8)
66	Sulfamethoxypyridazine	7.5	280.9	156.0 (92.0)	71	23 (41)	8 (8)
67	Sulfamonomethoxine	8.2	280.9	155.9 (91.9)	66	23 (39)	10 (8)
68	Sulfamoyldapsone	8.0	327.9	108.0 (80.0)	21	27 (69)	10 (8)
69	Sulfantran	12.5	336.2	155.8 (293.9)	61	19 (17)	10 (22)
70	Sulfapyridine	6.6	250.2	155.9 (92.0)	66	23 (37)	12 (8)
71	Sulfaquinoxaline	11.2	301.0	156.2 (92.3)	66	27 (51)	6 (6)
72	Sulfathiazole	6.3	255.9	156.0 (92.0)	46	21 (35)	12 (8)
73	Sulfatroxazole	9.7	268.0	155.8 (92.0)	116	23 (39)	12 (8)
74	Sulfisomidine	5.8	278.9	124.0 (185.9)	61	29 (23)	10 (12)
75	Sulfisozole	7.9	240.0	155.9 (91.9)	46	21 (35)	12 (8)
76	Tetracycline	6.5	445.2	409.9 (154.0)	16	27 (35)	18 (10)
77	Thiabendazole	6.5	201.9	174.9 (130.9)	31	35 (45)	12 (12)
78	Thiamphenicol	6.9	353.7	184.8 (289.8)	-75	-28 (-18)	-9 (-11)
79	Tiamulin	11.8	494.3	192.0 (119.0)	31	27 (57)	8 (10)
80	Trimethoprim	6.0	290.9	230.0 (260.9)	61	33 (35)	10 (10)
81	Tulathromycin	5.7	403.8	577.3 (72.0)	66	21 (59)	14 (8)
82	Tylosin	11.3	916.5	173.9 (772.1)	61	45 (43)	14 (18)
83	Valnemulin	12.3	565.2	263.0 (164)	16	23 (43)	10 (12)

*1 括弧内の数値は参照イオンの条件

*2 数値が正の場合は ESI(+), 負の場合は ESI(-) のイオン化モードで測定

3. 測定溶液の調製

(1) 抽出および精製：試料 5 g を 50 mL 容のポリプロピレン (PP) 製遠沈管に秤量し、アセトニトリル-メタノール (1:1) 溶液 18 mL (牛乳は 23 mL)、およびセラミックホモジナイザー 1 個を加えた。5 分間振とうした後、8,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を別の遠沈管に分取し、アセトニトリル-メタノール (1:1) 溶液にて 20 mL (牛乳は 30 mL) に定容した (有機性抽出液)。

残渣に EDTA 含有クエン酸緩衝液 15 mL を加え、5 分間振とうした後、8,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清は別の遠沈管に分取した (上清①)。再度、残渣に EDTA 含有クエン酸緩衝液 8 mL を加え、5 分間振とうした後、8,000 rpm で 10 分間遠心分離した (上清②)。上清①と②を合わせ、EDTA 含有クエン酸緩衝液で 25 mL に定容した (水性抽出液)。ろ過助剤 0.5 g を積層したフィルター付きシリンジにて水性抽出液 10 mL をろ過した後、固相カラム InertSep PLS-2 265 mg/20 mL に通液 (固相カラムを通過した液は廃棄) し、メタノール 10 mL で溶出した。

固相カラムの溶出液に有機性抽出液 8 mL (牛乳は 12 mL)、およびアセトニトリル飽和ヘキサン 20 mL を加えた。5 分間振とう後、8,000 rpm で 10 分間遠心分離し、ヘキサン層 (上層) を除去した。下層をメタノールで 20 mL (牛乳は 30 mL) に定容した。

試験溶液 1 mL (牛乳は 1.5 mL) を窒素気流下で濃縮乾固し、20%アセトニトリル溶液 1 mL で溶解後、メンブレンフィルターでろ過したものを測定溶液 (試料 0.1 g/mL 相当) とした。魚介類および食肉に対する測定溶液の調製法を図 1 に示した。

4. 検量線の作成

定量値は、測定化合物のピーク面積からマトリクス検量線法により算出した。マトリクス入り標準溶液は試料毎に調製した。添加試料と同様に抽出および精製したブランク溶液に標準溶液を添加し、0.2-2.0 ng/mL の濃度範囲で 3 点以上を調製した。

結 果 お よ び 考 察

従来法⁴⁾では、測定溶液の調製に抽出液の全量 (試料 5 g 相当) を使用していたことから、固相精

製後の濃縮工程に長時間を要していた。また、最終段階の測定溶液中の試料濃度は、基準値が 0.01 µg/g を下回る一部のホルモン剤等を測定するために 1 g/mL とされていたことから、LC-MS/MS に対する負荷も大きいと考えられた。これらを解消するため、本法では、抽出工程において、有機性抽出液および水性抽出液のそれぞれを一旦定容して、その一部 (試料 2 g 相当) に減じて以後の精製工程に活用した。さらに最終段階の測定溶液中の試料濃度を 0.1 g/mL とすることで濃縮工程を大幅に簡略化した。一方で、液体試料である牛乳の場合、試料 5 g に対して抽出用溶液 18 mL では有機性抽出液として 20 mL に定容することが困難なため、抽出液量を増やした。これに伴い、最終段階で濃縮する液量は牛乳のみ 1.5 mL とした。本法は、ホルモン剤等の一部は測定が不可能となったが、LC-MS/MS に対する負荷を軽減しつつ、より迅速な方法として確立された。

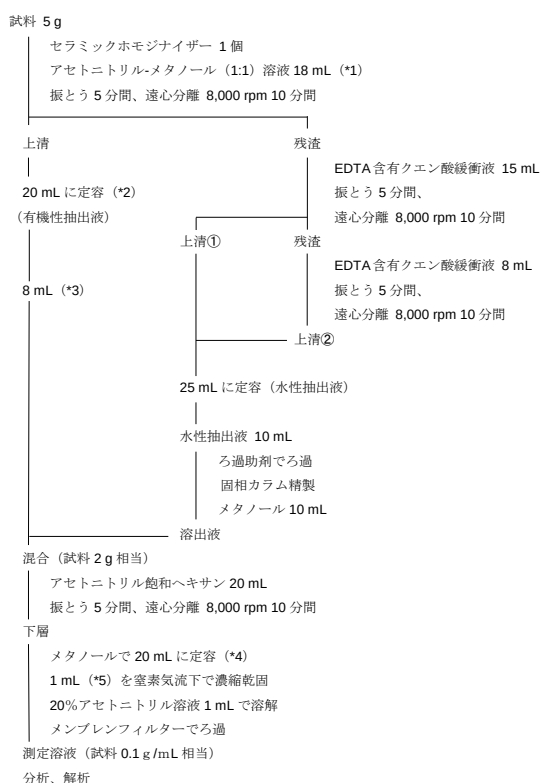


図 1 測定溶液の調整方法

牛乳では (*1) 23 mL、(*2) 30 mL、(*3) 12 mL、(*4) 30 mL、(*5) 1.5 mL で実施した

表 2 魚介類における添加回収試験結果

No.	化合物名	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	サーモン			ヒラメ			エビ			アサリ		
			真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
1	5-Hydroxythiabendazole	0.01	58	5	8	91	2	7	83	7	7	91	8	10
2	5-Propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine	0.01	88	3	9	91	5	6	89	6	12	90	6	9
3	Amoxicillin	0.01	68	9	11	65	9	12	69	6	12	79	10	14
4	Ampicillin	0.01	72	6	14	71	5	7	75	5	8	84	7	8
5	Benzylpenicillin	0.01	84	5	11	87	6	8	85	8	8	94	4	4
6	Cefalexin	0.01	53	10	43	58	12	24	76	12	24	87	5	12
7	Cefalonium	0.01	34	42	103	49	20	54	65	14	17	79	8	14
8	Cephapirin	0.01	82	5	16	82	6	14	87	6	7	92	8	11
9	Cefazolin	0.01	73	10	43	72	12	18	81	10	16	94	15	15
10	Chlortetracycline	0.01	21	26	107	68	10	14	69	15	16	72	12	16
11	Ciprofloxacin	0.01	86	6	15	86	3	15	82	10	14	79	15	15
12	Cloxacillin	0.01	79	4	17	84	6	8	76	10	12	91	8	10
13	Danofloxacin	0.01	90	11	15	94	12	13	98	11	17	90	12	17
14	Daiverdine	0.01	88	6	10	89	7	7	87	8	8	93	6	7
15	Dicloxacillin	0.01	67	10	12	86	8	9	68	6	10	89	3	9
16	Difloxacin	0.01	90	6	9	97	3	8	96	5	9	96	10	10
17	Doxycycline	0.01	47	24	40	92	9	14	75	7	7	68	7	14
18	Enofloxacin	0.01	92	8	14	100	2	6	93	6	9	97	10	10
19	Erythromycin	0.01	91	4	7	92	6	7	91	7	7	92	6	7
20	Ethopabate	0.01	93	5	8	97	3	6	88	5	5	97	8	8
21	Fenbendazole	0.01	78	2	7	81	4	5	77	5	5	84	6	9
22	Florfenicol	0.01	87	7	11	96	9	15	93	3	5	97	11	11
23	Flubendazole	0.01	86	4	9	87	4	4	84	5	5	90	6	8
24	Flumequine	0.01	93	2	9	89	4	4	87	5	5	92	7	8
25	Hydrocortisone	0.01	76	10	21	94	6	8	92	12	14	96	19	19
26	Josamycin	0.01	96	5	7	89	3	8	85	9	10	95	7	13
27	Klidasamycin	0.01	80	47	15	47	12	19	82	9	20	84	7	11
28	Levamisole	0.01	78	5	16	75	6	8	73	6	12	88	6	8
29	Lincomycin	0.01	92	6	10	93	7	7	88	3	6	94	5	8
30	Marbofloxacin	0.01	93	8	14	98	4	11	94	17	17	98	12	12
31	Mecillinam	0.01	71	6	18	74	5	11	75	11	18	89	9	9
32	Miloxacin	0.01	55	8	29	60	5	28	66	7	11	86	7	10
33	Mirosamycin	0.01	89	4	7	94	5	5	84	7	10	93	7	7
34	Nafticillin	0.005	77	5	11	84	5	5	75	8	9	91	7	7
35	Nalidixic acid	0.01	91	4	8	90	3	7	86	6	6	91	6	6
36	Neospramycin(II)	0.01	81	9	17	49	10	23	74	15	40	102	9	20
37	Norfloxacin	0.01	87	8	15	89	2	6	88	9	14	83	10	10
38	Ofloxacin	0.01	94	5	16	102	6	6	96	5	8	94	5	6
39	Oleandomycin	0.01	92	7	15	94	6	7	86	5	6	93	9	9
40	Orbifloxacin	0.01	88	9	9	90	5	6	83	5	11	90	6	6
41	Ormetoprim	0.01	87	4	13	90	6	6	86	5	8	90	6	9
42	Oxacillin	0.01	83	6	13	87	8	8	80	3	6	90	4	4
43	Oxfendazole sulfone	0.01	98	6	12	100	14	19	86	22	22	91	23	43

表 2 魚介類における添加回収試験結果 (続き)

No.	化合物名	添加濃度 (µg/g)			サーモン			ヒラメ			エビ			アサリ		
		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
44	Oxolinic acid	0.01	92	7	8	3	4	91	3	4	87	7	9	90	6	7
45	Oxytetracycline	0.01	78	5	16	9	12	86	9	12	80	14	14	74	7	9
46	Phenoxymethylpenicillin	0.01	85	7	14	3	4	86	3	4	85	10	12	97	7	7
47	Primycin	0.01	86	7	11	5	8	80	5	8	82	6	11	95	10	10
48	Promidic acid	0.01	87	5	7	2	4	84	2	4	81	4	6	88	8	9
49	Praziquantel	0.01	80	4	7	2	5	89	2	5	77	5	7	93	6	7
50	Pyrantel	0.01	90	9	14	5	7	93	5	4	83	4	6	94	4	7
51	Pyrimethamine	0.01	83	5	11	1	6	84	1	6	85	4	6	95	5	6
52	Ractopamine	0.01	88	4	8	3	7	86	3	7	79	7	10	93	9	9
53	Saraloxacin	0.01	83	6	17	3	6	86	3	6	83	8	10	83	7	9
54	Spiramycin(II)	0.01	86	14	16	13	14	74	13	14	87	11	29	95	7	14
55	Sulfabenzamide	0.01	85	4	6	3	7	88	3	7	85	7	7	88	4	4
56	Sulfabromomethazine	0.01	77	11	11	7	9	82	7	9	77	7	10	83	7	11
57	Sulfacetamide	0.01	82	8	16	7	7	88	7	7	89	5	18	91	4	8
58	Sulfachlorpyridazine	0.01	83	2	10	2	4	87	2	4	89	6	8	87	7	7
59	Sulfadiazine	0.01	86	16	18	4	7	91	4	7	86	11	20	94	7	7
60	Sulfadimethoxine	0.01	86	3	4	4	5	89	4	5	87	4	6	85	4	7
61	Sulfadimidine	0.01	91	7	12	5	5	95	5	5	89	6	11	92	7	8
62	Sulfadoxine	0.01	91	7	10	2	4	88	2	4	88	9	9	91	6	7
63	Sulfathioxypyridazine	0.01	84	4	8	4	5	83	4	5	88	10	10	83	7	8
64	Sulfamerazine	0.01	90	2	7	7	7	92	7	7	85	6	11	88	4	7
65	Sulfamethoxazole	0.01	87	6	9	5	7	84	5	7	92	6	8	89	6	6
66	Sulfamethoxypyridazine	0.01	86	5	9	4	7	87	4	7	85	5	7	86	6	6
67	Sulfamonomethoxine	0.01	91	6	9	5	6	92	5	6	87	8	11	89	6	7
68	Sulfamoyldapsone	0.01	83	2	8	10	10	87	10	10	86	6	10	86	11	11
69	Sulfantran	0.01	91	10	17	21	21	86	21	21	93	15	20	98	8	10
70	Sulfapyridine	0.01	88	6	6	8	9	91	8	9	89	3	9	92	5	6
71	Sulfaquinoxaline	0.01	83	4	5	4	6	86	4	6	83	4	8	83	10	10
72	Sulfathiazole	0.01	84	6	10	5	6	87	5	6	86	3	13	87	5	5
73	Sulfatinoxazole	0.01	97	14	16	26	39	78	26	39	93	13	25	96	15	17
74	Sulfisomidine	0.01	88	6	13	4	7	92	4	7	92	6	7	93	4	6
75	Sulfisozole	0.01	85	5	7	5	7	85	5	7	86	6	6	91	6	7
76	Tetracycline	0.01	78	7	16	5	8	87	5	8	84	6	6	78	9	13
77	Thiabendazole	0.01	80	9	11	5	5	91	5	5	83	3	8	92	6	6
78	Thiamphenicol	0.01	94	8	11	7	12	94	7	12	90	8	11	96	9	9
79	Tianulin	0.01	93	6	10	4	6	94	4	6	89	7	9	97	7	9
80	Trinethoprim	0.01	88	12	13	4	5	94	4	5	86	4	9	91	6	6
81	Tulathromycin	0.01	86	15	22	14	27	78	14	27	81	13	20	111	11	18
82	Tylosin	0.01	76	10	13	12	13	61	12	13	85	17	19	87	8	14
83	Valnemulin	0.01	94	4	13	4	5	94	4	5	94	6	8	89	4	10

妥当性評価ガイドラインの目標値 (真度 70～120%、併行精度 (RSD%) 25%未満、室内精度 (RSD%) 30%未満) を満たさない値に下線を引いた

表 3 食肉における添加回収試験結果

No.	化合物名	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	牛肉			豚肉			牛肝臓			牛腎臓		
			真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)
1	5-Hydroxythiabendazole	0.01	42	7	15	52	73	5	89	10	12	95	12	12
2	5-Propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine	0.01	95	3	11	100	96	5	97	13	14	101	8	13
3	Amoxicillin	0.01	64	7	22	89	83	5	64	5	18	71	6	9
4	Ampicillin	0.01	70	7	20	85	74	6	74	12	17	86	9	10
5	Benzylpenicillin	0.01	90	7	8	96	96	5	90	8	9	95	3	10
6	Cefalexin	0.01	72	6	17	82	77	4	84	13	18	94	16	31
7	Cefalonium	0.01	79	10	13	93	77	9	82	10	25	84	6	38
8	Ceflupirin	0.01	90	7	15	91	93	5	86	15	35	87	-	-
9	Cefazolin	0.01	87	10	15	81	88	16	74	11	23	78	15	15
10	Chlortetracycline	0.01	58	7	9	65	70	8	47	12	18	63	13	16
11	Ciprofloxacin	0.01	92	4	9	93	91	9	82	6	10	101	4	5
12	Cloxacillin	0.01	85	8	16	87	91	4	74	17	12	87	7	16
13	Danofloxacin	0.01	99	12	17	103	103	8	96	15	17	99	14	8
14	Diaveridine	0.01	94	7	12	95	96	6	98	7	7	97	8	8
15	Dicloxacillin	0.01	79	10	17	80	91	6	74	6	7	87	8	6
16	Difloxacin	0.01	94	5	14	98	100	4	94	3	4	98	2	6
17	Doxycycline	0.01	75	6	12	79	82	8	57	3	11	83	7	8
18	Erofloxacin	0.01	94	7	13	100	98	6	94	3	7	97	6	11
19	Erythromycin	0.01	94	6	8	99	99	3	91	7	12	98	11	11
20	Enrofloxacin	0.01	98	4	10	100	99	2	86	15	28	100	4	4
21	Flubendazole	0.01	82	5	11	101	86	3	80	3	4	86	2	5
22	Florfenicol	0.01	97	6	14	104	102	5	102	5	6	-	-	-
23	Flumequine	0.01	88	5	7	91	89	3	84	4	5	90	5	5
24	Hydrocortisone	0.01	96	5	8	98	92	7	92	1	5	95	6	6
25	Hydrocortisone	0.01	88	18	27	98	96	7	91	15	15	110	18	28
26	Josamycin	0.01	92	7	7	86	74	6	87	8	30	95	9	29
27	Kitasamycin	0.01	85	8	8	85	65	2	86	20	22	104	22	61
28	Levamisole	0.01	88	7	12	91	91	4	96	7	8	97	9	11
29	Lincomycin	0.01	92	5	11	101	99	2	90	4	11	99	13	13
30	Marbofloxacin	0.01	88	6	13	100	104	5	104	9	12	105	3	9
31	Mecillinam	0.01	92	6	14	92	89	8	88	8	8	76	8	15
32	Miloxacin	0.01	58	7	22	79	71	8	84	3	10	83	3	7
33	Mirosamycin	0.01	99	8	11	99	85	4	71	9	12	102	7	15
34	Nafcillin	0.01	82	8	15	89	92	3	78	3	6	89	6	6
35	Nalidixic acid	0.005	94	4	8	96	92	5	87	4	4	92	5	5
36	Neospiramycin(II)	0.01	98	5	19	81	90	5	94	10	34	129	15	48
37	Norfloxacin	0.01	94	7	14	95	100	5	94	3	7	99	4	10
38	Ofloxacin	0.01	102	4	11	102	99	2	102	7	8	104	8	8
39	Oleandomycin	0.01	100	8	9	102	97	6	99	12	12	99	8	8
40	Orbifloxacin	0.01	95	8	12	99	96	4	95	6	7	97	5	9
41	Ormetoprim	0.01	94	8	12	98	92	4	85	4	7	97	6	6
42	Oxacillin	0.01	88	8	10	92	92	5	84	7	8	91	5	5
43	Oxifendazole sulfone	0.01	105	12	13	86	102	9	94	20	21	94	26	35

表 3 食肉における添加回収試験結果 (続き)

No.	化合物名	添加濃度 (µg/g)	牛肉			豚肉			鶏肉			牛肝臓			牛腎臓		
			真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)
44	Oxolinic acid	0.01	96	5	12	98	4	4	95	4	4	90	4	6	95	4	4
45	Oxytetracycline	0.01	83	7	11	86	6	7	90	5	5	76	7	20	88	9	12
46	Phenoxymethylpenicillin	0.01	91	8	8	93	4	5	90	6	7	83	3	9	86	11	11
47	Prilimycin	0.01	96	8	12	93	4	8	93	5	6	84	7	9	91	7	11
48	Pirimidic acid	0.01	88	5	10	94	5	4	89	2	7	80	3	7	89	4	4
49	Praziquantel	0.01	86	8	18	85	4	5	94	3	4	78	2	6	90	3	5
50	Pyrantel	0.01	92	2	15	96	2	7	93	3	6	79	3	10	79	8	8
51	Pyrimethamine	0.01	90	4	13	93	3	5	95	3	8	81	7	8	90	8	8
52	Ractopamine	0.01	93	6	11	98	5	6	96	5	6	85	4	7	93	7	11
53	Saraloxacin	0.01	80	9	26	90	4	4	95	2	7	85	8	10	100	5	8
54	Spiramycin(II)	0.01	90	7	19	87	4	10	92	9	17	92	8	44	113	23	56
55	Sulfabenzamide	0.01	74	4	9	89	5	5	92	3	4	82	4	9	93	5	5
56	Sulfabromomethazine	0.01	83	8	12	85	5	5	90	6	13	75	9	11	87	3	5
57	Sulfacetamide	0.01	88	8	13	97	10	10	93	6	6	76	5	5	99	10	10
58	Sulfachloromethazine	0.01	80	7	9	91	6	6	96	8	8	72	5	5	95	6	6
59	Sulfadiazine	0.01	90	9	13	96	2	7	97	5	7	75	4	16	97	8	12
60	Sulfadimethoxine	0.01	90	2	12	93	4	4	99	4	7	81	9	13	95	7	7
61	Sulfadimidine	0.01	84	9	12	95	4	5	99	4	5	77	3	6	96	5	5
62	Sulfadoxine	0.01	87	7	18	93	2	8	94	4	6	83	9	9	94	3	7
63	Sulfathioxypridazine	0.01	89	6	12	96	7	5	98	5	6	80	9	11	93	5	5
64	Sulfamerazine	0.01	87	6	8	95	4	5	95	5	5	81	5	5	95	3	4
65	Sulfamethoxazole	0.01	86	6	8	94	4	5	97	4	5	77	11	11	95	4	6
66	Sulfamethoxypridazine	0.01	88	4	8	95	2	4	92	5	5	81	5	5	95	6	6
67	Sulfanonomethoxine	0.01	88	4	14	94	6	7	96	8	8	79	10	12	93	7	7
68	Sulfanoyldapsone	0.01	92	5	16	96	7	12	91	10	10	84	7	9	94	10	11
69	Sulfantran	0.01	85	5	14	93	6	7	97	5	5	78	12	12	91	4	7
70	Sulfapyridine	0.01	84	6	10	84	4	8	88	6	6	73	6	6	92	9	9
71	Sulfaquinoxaline	0.01	82	11	12	93	2	9	93	5	5	74	6	11	95	4	9
72	Sulfathiazole	0.01	89	13	15	98	11	18	95	16	16	83	20	23	101	30	30
73	Sulfaroxazole	0.01	85	10	12	98	3	3	98	4	6	81	11	14	100	6	9
74	Sulfisomidine	0.01	86	5	13	93	7	7	94	6	7	77	5	7	93	6	6
75	Sulfisozole	0.01	86	7	11	90	3	11	93	5	8	71	7	8	86	6	12
76	Tetracycline	0.01	86	5	14	97	2	4	96	5	5	87	4	5	95	7	7
77	Thiabendazole	0.01	100	6	9	102	8	8	104	4	6	-	-	-	-	-	-
78	Thiamphenicol	0.01	91	5	11	96	4	4	97	4	4	92	6	6	99	4	4
79	Thiamulin	0.01	96	5	11	98	4	4	97	4	4	94	15	15	101	7	7
80	Trimethoprim	0.01	95	5	12	96	2	3	98	4	4	96	20	37	98	15	15
81	Tulathromycin	0.01	125	14	19	100	7	10	100	17	17	94	14	34	116	10	35
82	Tylosin	0.01	86	7	18	78	8	8	75	12	16	88	14	10	116	10	10
83	Valnemulin	0.01	96	4	5	97	3	4	97	5	9	95	5	5	97	3	8

妥当性評価ガイドラインの目標値 (真度 70～120%、併行精度 (RSD%) 25%未満、室内精度 (RSD%) 30%未満) を満たさない値に下線を引いた

表 4 牛乳における添加回収試験結果

No.	化合物名	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	牛乳		
			真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
1	5-Hydroxythiabendazole	0.01	99	4	4
2	5-Propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine	0.01	98	4	4
3	Amoxicillin	0.004	96	3	6
4	Ampicillin	0.01	96	4	4
5	Benzylpenicillin	0.004	91	4	9
6	Cefalexin	0.01	76	6	14
7	Cefalonium	0.01	<u>43</u>	22	<u>46</u>
8	Cephapirin	0.01	89	4	5
9	Cefazolin	0.01	80	14	16
10	Chlortetracycline	0.01	88	9	9
11	Ciprofloxacin	0.01	83	7	8
12	Cloxacillin	0.01	95	8	8
13	Danofloxacin	0.01	84	10	10
14	Diaveridine	0.01	92	4	5
15	Dicloxacillin	0.01	95	4	5
16	Difloxacin	0.01	97	3	6
17	Doxycycline	0.01	95	5	8
18	Enrofloxacin	0.01	97	2	5
19	Erythromycin	0.01	88	5	11
20	Ethopabate	0.01	96	4	6
21	Fenbendazole	0.01	92	5	5
22	Florfenicol	0.01	100	4	5
23	Flubendazole	0.01	95	2	3
24	Flumequine	0.01	96	2	3
25	Hydrocortisone	0.01	90	7	7
26	Josamycin	0.01	99	3	8
27	Kitasamycin	0.01	88	4	10
28	Levamisole	0.01	97	3	3
29	Lincomycin	0.01	95	5	6
30	Marbofloxacin	0.01	84	4	6
31	Mecillinam	0.01	91	4	6
32	Miloxacin	0.01	<u>31</u>	11	<u>54</u>
33	Mirosamycin	0.01	79	5	7
34	Nafcillin	0.005	94	6	7
35	Nalidixic acid	0.01	95	3	7
36	Neospiramycin(II)	0.01	94	3	8
37	Norfloxacin	0.01	82	6	7
38	Ofloxacin	0.01	94	8	11
39	Oleandomycin	0.01	80	7	16
40	Orbifloxacin	0.01	93	4	4
41	Ormetoprim	0.01	92	4	8
42	Oxacillin	0.01	95	5	8
43	Oxfendazole sulfone	0.01	99	<u>33</u>	<u>33</u>

表 4 牛乳における添加回収試験結果（続き）

No.	化合物名	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	牛乳		
			真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
44	Oxolinic acid	0.01	92	4	6
45	Oxytetracycline	0.01	96	4	10
46	Phenoxymethylpenicillin	0.01	95	7	7
47	Pirlimycin	0.01	85	3	4
48	Piromidic acid	0.01	94	5	5
49	Praziquantel	0.01	94	2	4
50	Pyrantel	0.01	88	6	6
51	Pyrimethamine	0.01	93	6	6
52	Ractopamine	0.01	89	6	7
53	Sarafloxacin	0.01	86	5	6
54	Spiramycin(II)	0.01	95	6	10
55	Sulfabenzamide	0.01	84	10	10
56	Sulfabromomethazine	0.01	88	6	10
57	Sulfacetamide	0.01	96	4	6
58	Sulfachlorpyridazine	0.01	91	8	8
59	Sulfadiazine	0.01	93	9	9
60	Sulfadimethoxine	0.01	89	6	6
61	Sulfadimidine	0.01	93	6	6
62	Sulfadoxine	0.01	97	1	5
63	Sulfaethoxyipyridazine	0.01	84	7	11
64	Sulfamerazine	0.01	93	4	5
65	Sulfamethoxazole	0.01	96	3	5
66	Sulfamethoxyipyridazine	0.01	86	3	7
67	Sulfamonomethoxine	0.01	98	6	8
68	Sulfamoyldapsone	0.01	99	8	8
69	Sulfantran	0.01	93	7	7
70	Sulfapyridine	0.01	85	5	5
71	Sulfaquinoxaline	0.01	90	3	3
72	Sulfathiazole	0.01	95	9	9
73	Sulfatroxazole	0.01	98	7	11
74	Sulfisomidine	0.01	93	6	6
75	Sulfisozole	0.01	99	6	7
76	Tetracycline	0.01	90	6	6
77	Thiabendazole	0.01	97	3	5
78	Thiamphenicol	0.01	101	4	6
79	Tiamulin	0.01	95	4	6
80	Trimethoprim	0.01	94	5	6
81	Tulathromycin	0.01	45	21	32
82	Tylosin	0.01	80	12	12
83	Valnemulin	0.01	100	4	7

妥当性評価ガイドラインの目標値（真度 70～120%、併行精度（RSD%）25%未満、室内精度（RSD%）30%未満）を満たさない値に下線を引いた

本法を用いて、妥当性評価ガイドライン^{5,6)}に従い、分析者1名が2併行で5日間、あるいは分析者2名が2併行で3日間、枝分かれ試験を実施した。様々なマトリクスによる影響を調べるため、試料は魚介類としてサーモン、ヒラメ、エビ、アサリ、食肉として牛肉、豚肉、鶏肉、牛肝臓、牛腎臓、乳として牛乳を使用した。

各試料には 0.004–0.01 µg/g となるよう標準溶液を添加し、添加回収試験による分析法の評価を行った。添加濃度は試料および化合物の基準値から判断した。83 化合物（抗生物質 30、合成抗菌剤 42、寄生虫駆除剤 9、ホルモン剤 2）に対して真度（回収率）、併行精度、室内精度の評価を行い、得られた結果を表 2、表 3、表 4 に示した。

妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした化合物を試料別で比較したところ、最も多かったアサリで 81 化合物、最も少なかった牛肝臓で 67 化合物であった（表 5）。マトリクスの異なる試料では真度に大きく影響を受ける化合物があり、アモキシシリンは牛乳では良好な結果を得た一方、魚介類や食肉では真度が 70%未満であり、目標値を満たすことができなかった。タイロシンは、ヒラメのみが真度 70%を満たすことができず、サーモンとヒラメにもマトリクスの影響に若干差異のあることが示唆された。牛肝臓や牛腎臓では著しく測定感度が低下して測定不能となる化合物もあった。

牛肉などでは基準値として「オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの総和」が求められるが、本法ではアサリ、鶏肉、牛乳を除く試料においてクロルテトラサイクリンの真度は 70%未満であった。他にも、複数化合物あるいは代謝物との合算値により基準値判定をする化合物（オクスフェンダゾール、フルベンダゾール、ツラスロマイシンなど）に対して課題は残っており、こうした化合物には必要に応じて個別分析法を含めた対応が求められる。

様々な試料を用いた本法では、10 試料全てにおいて 60 化合物が妥当性評価ガイドラインの目標値（真度、併行精度、室内精度）を満たす結果が得られた。本法に適さない化合物が一部存在するものの、多成分一斉分析法として非常に有効であることが示唆された。

表 5 試料別の妥当性確認に適合した化合物数

試料	抗生物質	合成 抗菌剤	寄生虫 駆除剤など	合計
魚介類				
サーモン	23	41	10	74
ヒラメ	23	40	11	74
エビ	25	41	11	77
アサリ	29	42	10	81
牛肉	27	41	10	78
豚肉	26	42	9	77
鶏肉	26	42	11	79
牛肝臓	18	38	11	67
牛腎臓	22	39	10	71
牛乳	28	41	10	79

ま と め

LC-MS/MS を用いた畜産物中の残留動物用医薬品一斉分析法の検討を行った。様々なマトリクスを有する試料で添加回収試験を行った結果、10 試料全てにおいて 60 化合物が真度、併行精度、室内精度において妥当性評価ガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。本法が多成分一斉分析法として有効であることを示唆した。

利 益 相 反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 厚生労働省. LC/MS による農薬等の一斉試験法 III（畜水産物）.
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000203685.pdf>
- 2) 厚生労働省. オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法.
<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-038.html>
- 3) 山口貴弘, 柿本健作, 永吉晴奈, 山口瑞香, 起橋雅浩, 梶村計志, 山本容正. 分散固相および固相カートリッジカラムを用いた LC-MS/MS による食肉中の動物用医薬品一斉分析法. 日本食品衛生学雑誌 2013 ; 54 (4) : 290-297.
- 4) 上村聖子, 先山孝則, 浅川大地, 山野哲夫. 有機溶媒および緩衝液を用いた二段階抽出による畜水産物中の残留動物用医薬品一斉試験法. 第 112 回日本食品衛生学会要旨集 2016
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて. 平成 19 年 11 月 15 日食安発 1115001 号

- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について. 平成 22 年 12 月 24 日 食安発 1224 第 1 号
WEB サイトの内容は 2022 年 8 月 3 日に確認した。

Simultaneous analysis of veterinary drugs in seafood, livestock products and milk

Atsushi MASAYAMA, Shotaro HIRATA, and Satoshi TAKATORI

A method for the determination of veterinary drugs in various foods using LC-MS/MS was developed by improving our former method. Samples were extracted consecutively using acetonitrile/methanol (1:1; v/v) and EDTA-McIlvaine buffer. The latter extract was processed with a styrene-divinylbenzene polymer gel column. Aliquots of the two extracts were combined and washed with hexane-saturated acetonitrile to remove lipids. After solvent removal, the extract was reconstituted with 20% of acetonitrile containing aqueous solution as a test solution and analyzed by LC-MS/MS. The method was validated according to the method validation guidelines of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Recovery tests were performed on 10 kinds of foods, including seafood, livestock and milk, by fortification of 83 veterinary drugs at concentrations 0.004-0.01 µg/g. The trueness of the method for 60 veterinary drugs in all 10 commodities was 70-120%, with satisfactory repeatability and within-run reproducibility. This method could be applicable for the determination of veterinary drugs in various types of seafood, livestock and milk.

Key words : veterinary drugs, simultaneous analysis, LC-MS/MS

公衆浴場の浴槽水等における過マンガン酸カリウム消費量 および TOC の関係

安達史恵^a, 小池真生子^a, 枝川亜希子^a, 足立伸一^b

公衆浴場における水質基準は、令和元年 9 月 19 日生食発 0919 第 8 号厚生労働省通知により、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」が改正され、有機物の指標が「過マンガン酸カリウム消費量 (KMnO₄ 消費量)」から「TOC または KMnO₄ 消費量」に変更された。そこで、大阪府内公衆浴場浴槽水および遊泳場採暖槽水について KMnO₄ 消費量および TOC を測定し、その関係性について解析した。

また、KMnO₄ 消費量の測定において、高濃度の遊離残留塩素が影響を与えていることが示唆されたため、遊離残留塩素の影響について模擬試料を用いて検討を行った。その結果、遊離残留塩素が高濃度の検体では、KMnO₄ 消費量の測定値が実際より低値となることが明らかとなった。

遊離残留塩素の影響を考慮し、現在の公衆浴場における浴槽水の KMnO₄ 消費量の基準値である 25 mg/L に相当する TOC を算出すると 15 mg/L となり、基準値である 8 mg/L と大きく乖離していた。そのため、今後有機物の基準として TOC を用いると、基準値を超過する施設が増加することが予想された。これらのことから TOC の基準に関しては、KMnO₄ 消費量における基準との乖離を小さくするよう再考する余地があると考えられた。

キーワード：公衆浴場、過マンガン酸カリウム (KMnO₄) 消費量、全有機炭素 (TOC) の量

わが国においては、水中の有機物濃度の指標として、過マンガン酸カリウム消費量 (以下、KMnO₄ 消費量) が用いられてきた。しかし、水中に存在する還元性のある無機物質の影響や、有機物質の形態により消費量が異なること、また、分析者の手技により誤差が生じやすい分析法であること等が指摘されていた。そのため、平成 15 年の水道水質基準の見直しに際し、新たな指標として精度、感度が高い「有機物 (全有機炭素 (TOC) の量)」(以下 TOC) が導入された。一方、公衆浴場における水質基準においては、令和元年 9 月 19 日生食発 0919 第 8 号厚生労働省通知により、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」が改正され、有機物の指標は「TOC または KMnO₄ 消費量」に変更された¹⁾。しかし、学校環境衛生基準をはじめとする各遊泳用プールにおける有機物の指標は、現在も KMnO₄ 消費量が用いられている。

大阪府においては、公衆浴場における水質基準に TOC が導入されたことを受け、大阪府公衆浴場法施行細則を一部改正し、有機物の指標として KMnO₄ 消費量を TOC に変更し、令和 2 年 4 月 1 日から施行されている²⁾。また府内中核市においても、同様の対応がなされている³⁾。今回、府内中核市における公衆浴場浴槽水等について KMnO₄ 消費量および TOC を同時に測定し、その関係について解析した。

これまでの当所における KMnO₄ 消費量の測定において、硫酸酸性下で過マンガン酸カリウム溶液を加え 5 分煮沸後、当量のシュウ酸ナトリウムを加えた後も脱色せず、測定不能となる検体が年に数件あり、今回の調査においても 6 件あった。KMnO₄ 消費量 KMnO₄ 消費量の測定原理は酸化還元反応であるため、種々の物質に影響を受け、塩化物イオンにより正の妨害、塩素酸、臭素酸により負の妨害を受

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 日本建築衛生管理教育センター

けることが報告されている⁴⁾。しかし、塩素酸、臭素酸が KMnO_4 消費量に影響を与えるほど高濃度ではない場合においても脱色せず、測定不能となる検体があった。そこで、その原因について検討したところ、いずれの検体も遊離残留塩素が高値であったことから、その影響が疑われた。そのため、 KMnO_4 消費量に与える遊離残留塩素の影響について検討した。さらに、遊離残留塩素の影響を考慮して調査結果を再解析し、現在の TOC の基準値について考察した。

方 法

1. 分析

(1) 試薬

試薬は全て株式会社富士フイルム和光純薬製を使用した。0.002 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液および 0.005 mol/L シュウ酸ナトリウム溶液は容量分析用、硝酸銀は COD 測定用、サリチル酸、ピルビン酸、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウムおよび硫酸は試薬特級を用いた。また、塩素酸は塩素酸イオン標準液 (JCSS)、臭素酸は臭素酸イオン標準液 (JCSS) を使用した。フタル酸水素カリウムは容量分析用標準物質を使用した。

(2) 分析装置

TOC 装置は島津製作所製 TOC-Vcsh、液体クロマトグラフは島津製作所製 Nexera、質量分析計は ABSciex 3200 Qtrap、イオンクロマトグラフはメトローム社製 761 Compact IC を用いた。

(3) 分析方法

KMnO_4 消費量の検査方法は水質管理目標設定項目の検査方法、目標 22 の滴定法とした。TOC の検査方法は告示法の別表第 30 の全有機炭素計測定法、塩素酸および臭素酸の検査方法はそれぞれ告示法の別表第 13 イオンクロマトグラフ (陰イオン) による一斉分析法および別表第 32 液体クロマトグラフ-質量分析法とした。残留塩素の検査方法は水道法施行規則第十七条第二項の規定に基づき厚生労働大臣が定める遊離残留塩素及び結合残留塩素の検査方法、別表第 1 のジエチル-p-フェニレンジアミン法とした。

2. 調査方法

(1) 調査

調査は令和元年度に大阪府内の公衆浴場浴槽水、遊泳場採暖槽水の 80 施設を対象に実施した。公衆浴場における水質基準等に関する指針には、「塩素化イソシアヌル酸又はその塩を用いて消毒している等の理由により有機物 (全有機炭素 (TOC) の量) の測定結果を適用することが不適切と考えられる場合は、過マンガン酸カリウム消費量の測定で、25 mg/L 以下であることとする。」、また「温泉水又は井戸水を使用するものであるため、この基準により難しく、かつ、衛生上危害を生じるおそれがないときは、水質基準の一部又は全部を適用しないことができる」とも記載されている。そこで、調査対象 80 施設のうち、消毒剤にイソシアヌル酸等を用いている施設および薬湯の施設は TOC および KMnO_4 消費量が正確に測定できていない恐れがあるため、除外して解析した。

(2) KMnO_4 消費量に及ぼす臭素酸、塩素酸の影響

模擬試料の有機物質としてサリチル酸を用い、浴槽水の KMnO_4 消費量の基準である 25 mg/L 付近となるように調製した。その模擬試料を用いて、臭素酸、塩素酸を段階的に添加し、 KMnO_4 消費量を測定し、その影響を調べた。

(3) 塩素添加実験

塩素として、プールで汎用されているジクロロイソシアヌル酸を用い、遊離残留塩素が 0~20 mg/L となるよう模擬試料に段階的に添加し、 KMnO_4 消費量を測定し、その影響を調べた。また同様の実験を有機物質としてピルビン酸を用いて実施した。

(4) アミン添加実験

遊離残留塩素の影響除去のために、遊離残留塩素と無機アミン類を反応させ結合残留塩素とした後、模擬試料を測定した。添加量は、理論上の必要な添加量を求めた後、遊離残留塩素が結合残留塩素に完全に変換されるよう、やや過量に設定した。無機アミン類として硫酸アンモニウム、アンモニア水、塩化アンモニウムを用いた。

(5) 再解析

塩素添加実験結果から算出した残留塩素による KMnO_4 消費量の減少率を用いて、調査結果の KMnO_4 消費量を再計算し、 KMnO_4 消費量と TOC の関係について解析した。

結 果 お よ び 考 察

1. 調査結果

イソシアヌル酸等および薬湯の試料のデータを除いた 69 施設のうち、さらに KMnO_4 消費量および TOC のいずれかが定量下限値以下あるいは測定不能であったデータを除いた 60 施設の KMnO_4 消費量および TOC の関係を図 1 に示した。検定の結果 $p < 0.05$ で有意となり、相関係数は 0.56 で、 KMnO_4 消費量および TOC に相関が見られた。

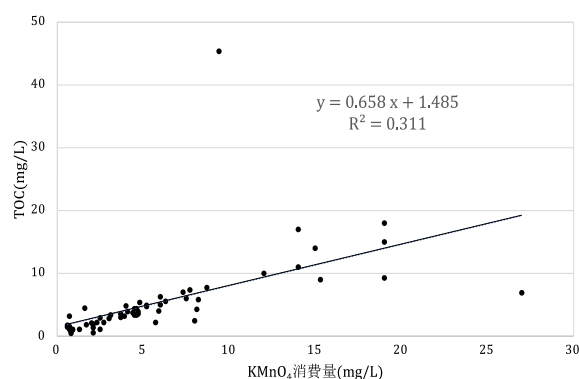


図 1 KMnO_4 消費量および TOC の関係(n=60)

2. 測定不能検体の原因の検討

(1) 臭素酸、塩素酸の影響

消毒剤である次亜塩素酸ナトリウム溶液は非常に不安定で、分解する過程で、亜塩素酸ナトリウムおよび塩素酸ナトリウムを生成する。また、製造時の不純物として臭素酸が含まれている。そのため、浴槽水等には原水として使用された水道水および消毒剤由来の塩素酸および臭素酸が含まれることがあると考えられるが、水道水質基準と同様な基準は規定されていない。しかし、維持管理によっては高濃度となることもあり、 KMnO_4 消費量の測定値に大きく影響を与えると考えられる。そこで、本調

表 1 測定不能検体の概要

検体NO.	種別	遊離残留塩素濃度(mg/L)	TOC(mg/L)	ClO_3^- (mg/L)	BrO_3^- (mg/L)
1	浴槽水	50	44	5.5	0.021
2	浴槽水	12	1.7	6.9	0.010
3	浴槽水	16	8.1	5.3	0.027
4	浴槽水(薬湯)	50	1.1	1.6	0.004
5	浴槽水	24	3.2	0.8	<0.001
6	浴槽水(温泉)	10	0.8	6.1	0.51

査で脱色しなかった 6 検体について、塩素酸、臭素酸の濃度を測定した。検体の概要および測定結果を表 1 に示した。

塩素酸および臭素酸の水道水質基準はそれぞれ 0.6 mg/L および 0.01 mg/L であるが、塩素酸は全ての検体で、臭素酸は 6 検体中 3 検体で水質基準を上回っていた。

次に、塩素酸、臭素酸が KMnO_4 消費量の測定値に与える影響について、模擬試料を用いて検討した。模擬試料に塩素酸、臭素酸を段階的に添加した際の KMnO_4 消費量の減少率を図 2 に示した。塩素酸においては添加濃度 10 mg/L までは影響がなく、15 mg/L で 8%、50 mg/L で 17%の減少率となった。一方、臭素酸は 0.1 mg/L から影響があり、1 mg/L で 11%、5 mg/L で 40%の影響があった。以上より、塩素酸と比較して臭素酸は低濃度で KMnO_4 消費量の測定値に大きく影響を与えることが明らかとなった。この傾向は吉川らの報告⁴⁾と同様であった。実試料では多種の有機物が含まれているため、本結果から得られたデータとは多少ずれると予想はされるが、測定不能となった 6 検体において、塩素酸はすべて 10 mg/L 未満であったため、塩素酸の影響を受けたとは考えにくい。一方、臭素酸は検体 NO.6 において 0.51 mg/L 検出され、約 7%程度負の影響を受けたと考えられたが、その他の検体は、0.1

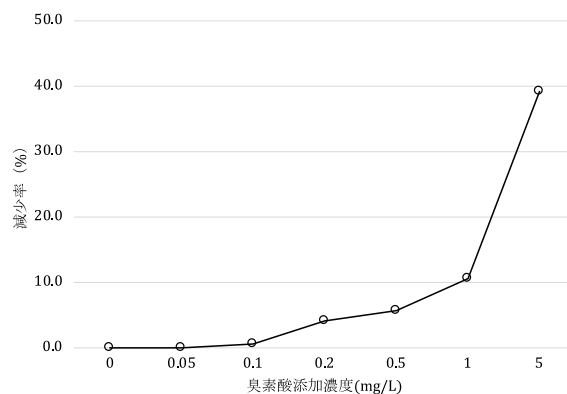
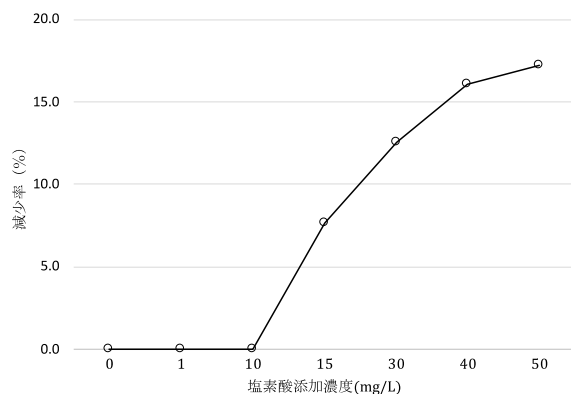


図 2 塩素酸および臭素酸添加による KMnO_4 消費量の減少率

mg/L 未満であり、ほとんど影響を受けていないと考えられた。一方、TOC と KMnO_4 消費量が一定の相関があるとする、検体 NO. 1, 3, 5 については TOC が 3 mg/L 以上であったため、ある程度の有機物量があったと考えられた。しかし、シュウ酸ナトリウム溶液を添加しても脱色せず、測定不能となった原因として、塩素酸および臭素酸以外の影響が考えられた。測定不能となった 6 検体の全てにおいて、遊離残留塩素濃度が 10 mg/L 以上と高濃度であったことから、残留塩素の影響が疑われた。

(2) 塩素添加実験

模擬試料に段階的に塩素を添加した結果を図 3 に示した。遊離残留塩素 0 mg/L と比較し、1 mg/L では KMnO_4 消費量は 8%、10 mg/L では 60%減少し、15 mg/L では 88%まで減少した。さらに 20 mg/L では、シュウ酸ナトリウムを加えても脱色せず測定不能となった。この原因として、加熱後も遊離残留塩素が残り、酸化剤としてシュウ酸ナトリウムを消費してしまうことにより、未反応の過マンガン酸カリウムが残留してしまうためと考えられた。したがって、遊離残留塩素が高濃度になると、その影響により KMnO_4 消費量の測定値がかなり低値となる可能性が示唆された。本調査において KMnO_4 消費量が測定できなかった 6 検体は、遊離残留塩素が 10 mg/L 以上と高濃度であったため (表 1)、その影響を大きく受けたと考えられた。また有機物としてピルビン酸を用いた場合も、同様の結果となった (図 4)。

(3) アミン添加実験

次に、 KMnO_4 消費量の測定に影響を与えているのが遊離残留塩素であることを確認するため、遊離残留塩素の除去を目的とし、アミン添加実験を実施

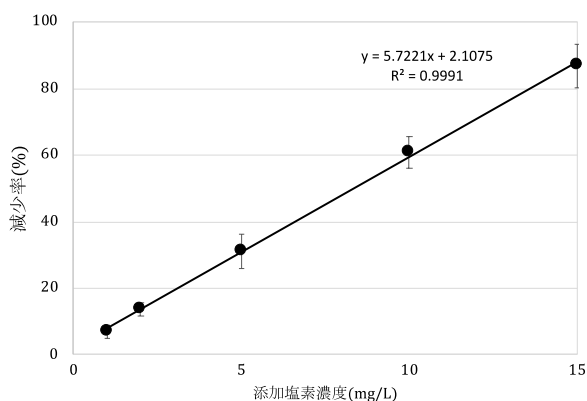


図 3 塩素添加による KMnO_4 消費量の減少率 (サリチル酸)

した。すなわち、アミンとして無機アミン類である硫酸アンモニウム、アンモニア水、塩化アンモニウムを、塩素を添加した模擬試料に段階的に添加し、遊離塩素を結合塩素とした後、 KMnO_4 消費量を測定した。その結果、硫酸アンモニウムおよびアンモニア水においては、塩素添加による KMnO_4 消費量の減少を除去できるものの、添加量を増加させると KMnO_4 消費量がさらに増加した。また、その増加分は添加量と比例していなかった。

一方、塩化アンモニウムを用いた場合においては、添加量を増加させると KMnO_4 消費量が増加したが、その増加は添加量と比例していた。これは、塩化アンモニウム中の塩化物イオンが KMnO_4 消費量に影響を与えているためと考えられた。そこで、添加した塩化アンモニウム中の塩化物イオンの妨害を除くため、当量の硝酸銀を添加し測定した。その結果、遊離残留塩素による KMnO_4 消費量の減少は、塩化アンモニウムを添加することで除去可能であり、さらに、添加した塩化アンモニウム中の塩化物イオンに伴う KMnO_4 消費量の増加を硝酸銀の添加により除去可能であった。すなわち、試料に塩化アンモニウムと硝酸銀を適量添加することで、遊離残留塩素の濃度によらず、ほぼ一定の KMnO_4 消費量が得られた (図 5)。

以上のことから、 KMnO_4 消費量の測定に影響を与えているのは遊離残留塩素であり、遊離残留塩素が高濃度である試料の KMnO_4 消費量は、実際より低値となることが明らかとなった。

3. データ再解析

2.(2)塩素添加実験で算出した残留塩素による減少率 (サリチル酸) を用いて、減少前の KMnO_4 消

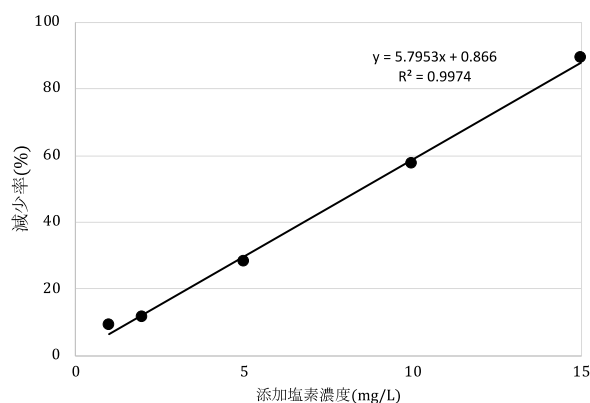


図 4 塩素添加による KMnO_4 消費量の減少率 (ピルビン酸)

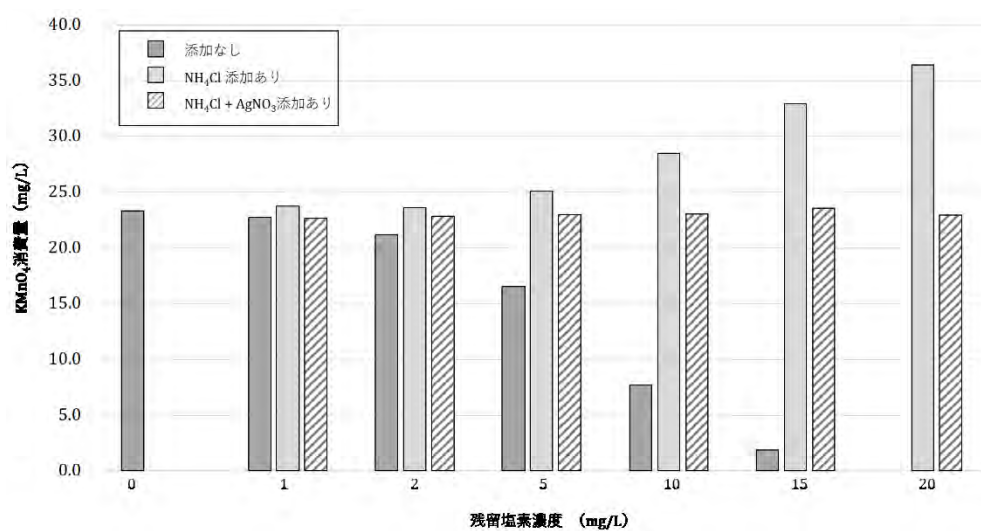


図5 塩化アンモニウムおよび硝酸銀添加による KMnO_4 消費量の変化

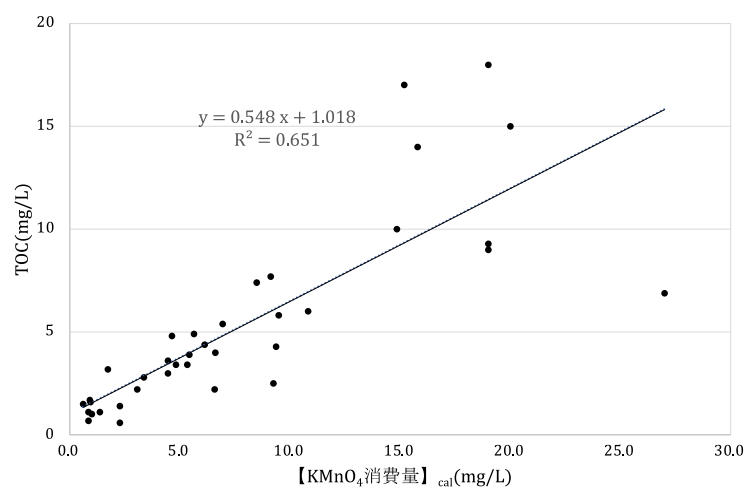


図6 【 KMnO_4 消費量】_{cal} および TOC の関係 (浴槽水) (n=37)

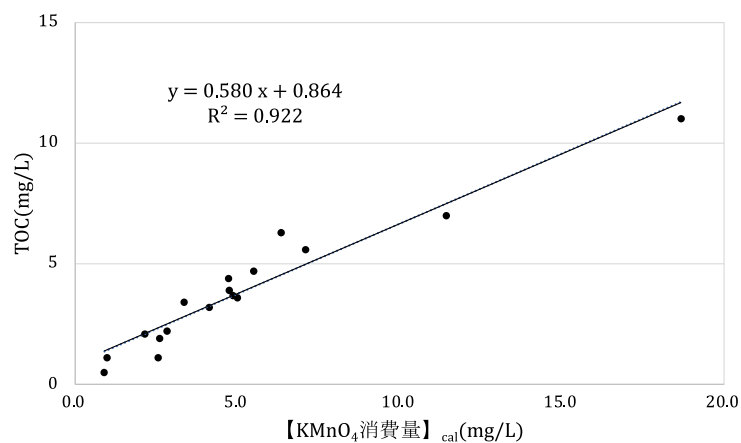


図7 【 KMnO_4 消費量】_{cal} および TOC の関係 (採暖槽水) (n=17)

費量として【KMnO₄消費量】_{cal}を求め、その値を用いて TOC との関係を検証した（図 6）。ただし、より正確に検証するため、KMnO₄ 消費量の測定前に残留塩素を測定した浴槽水 37 検査値のみを用いた。その結果、相関係数は 0.81 となり、【KMnO₄消費量】_{cal}および TOC には高い相関が見られた。

遊離残留塩素の影響を考慮しなかった場合（図 1）と考慮した場合（図 6）について、KMnO₄ 消費量の基準である 25 mg/L に対し、それぞれの回帰式から TOC を算出した。その結果、それぞれ 18, 15 mg/L となり、いずれにおいても、現在の基準である 8 mg/L と大きく差が見られた。調査結果では、TOC 8 mg/L とした場合、対象とした浴槽水の検体（薬湯、消毒剤がイソシアヌル酸である検体を除く）のうち、8 検体が基準超過となり、KMnO₄ 消費量の超過件数 1 と比較し大きな乖離がみられた。一方、図 6 の回帰式から算出した 15 mg/L とした場合、超過件数は 4 となった。したがって、現在の TOC の基準である 8 mg/L は、KMnO₄ 消費量の基準値と比較し、やや厳しい基準であると考えられた。他の報告においても、公衆浴場の浴槽水等の TOC および KMnO₄ 消費量を測定し、基準超過件数を比較しているが、本研究と同様に KMnO₄ 消費量と比較し、TOC の超過件数が多い結果となっている^{4,5)}。

一方、TOC が未導入である遊泳場採暖槽水において、残留塩素を考慮した KMnO₄ 消費量の計算値と TOC の関係を求めたところ、相関係数は 0.98 となり、かなり高い相関が見られた（図 7）。また、遊泳場水の KMnO₄ 消費量の基準である 12 mg/L に対応する TOC を回帰式から算出すると 8 mg/L となった。本調査結果で、両値を超過しているのはいずれ TOC の基準である 8 mg/L は、KMnO₄ 消費も 1 検体であり、この値を採用すると KMnO₄ 消費量と TOC で乖離のない結果となると考えられた。

以上のことから、今後、有機物の基準として TOC を用いると、基準値を超過する施設が増加することが予想される。TOC の基準に関しては KMnO₄ 消費量における基準と乖離を小さくするよう再考の余地があると考えられた。

ま と め

KMnO₄ 消費量の測定における遊離残留塩素の影響について検討を行った。その結果、遊離残留塩素が高濃度になると、KMnO₄ 消費量の測定値が実際

より低値となることが明らかとなった。KMnO₄ 消費量の検査においては、遊離残留塩素濃度が 10 mg/L 以上の高値であることは稀ではあるが、濃度を正確に把握し、その影響を事前に周知し、適切な維持管理を促す必要があると考えられた。

また、KMnO₄ 消費量と TOC の結果を比較したところ、高い相関が見られた。しかし、現在の公衆浴場における浴槽水の KMnO₄ 消費量の基準値である 25 mg/L に相当する TOC を回帰式から算出すると、基準である 8 mg/L と大きく乖離していた。そのため、今後有機物の基準として TOC を採用すると、基準値を超過する施設が増加することが予想された。これらのことから、TOC の基準に関しては KMnO₄ 消費量における基準との乖離を小さくするよう再検討する余地があると考えられた。

謝 辞

本研究の一部は「府内中核市における公衆浴場浴槽水、遊泳場採暖槽水レジオネラ属菌調査」により実施されたものである。調査にご協力いただいた関係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) 厚生労働省. 令和元年9月19日付け生食発0919第8号公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について.
<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000555445.pdf>
- 2) 大阪府. 大阪府公衆浴場法施行細則及び大阪府旅館業法施行細則の一部を改正する規則.
<https://www.pref.osaka.lg.jp/attach/1611/00355259/yokusousui-kensa.pdf>.
- 3) 枚方市. 枚方市公衆浴場法施行細則及び枚方市旅館業法施行細則の一部を改正する規則.
<https://www.city.hirakata.osaka.jp/cmsfiles/contents/0000029/29230/022020.pdf>
- 4) 吉川循江, 田中礼子, 日高利夫. 遊泳用プール水における過マンガン酸カリウム消費量に与える塩素酸イオン及び臭素酸イオンの影響. 分析化

学 2010; 59 (4): 335-340.

- 5) 福田彩香, 八木正博, 向井健悟. 公衆浴場水における基準項目の変更及びその影響. *神戸市環境保健研究所報* 2020; 48: 69-70.
- 6) 大島詔. 公衆浴場等の浴槽水における過マンガン酸カリウム消費量と全有機炭素量の関係について. *水環境学会誌* 2021; 44 (6): 175-178.

WEB サイトの内容は 2022 年 6 月 12 日に確認した。

Relationship between potassium permanganate consumption and TOC in bath water from public bathhouses

Fumie ADACHI^a, Maoko KOIKE^a, Akiko EDAGAWA^a and Shin-ichi ADACHI^b

In the water quality standards for public bathhouses, the "Guidelines for Water Quality Standards in Public Bathhouses" were revised by the Ministry of Health, Labor and Welfare, and the indicator of organic substances was changed to "total organic carbons (TOC) or potassium permanganate consumption (KMnO₄ consumption)". Therefore, we measured both KMnO₄ consumption and TOC in bath water from public bathhouses in Osaka, and analyzed their relationship.

Since it was suggested that high concentrations of free residual chlorine had an influence on the measurement of KMnO₄ consumption, the influence of free residual chlorine was examined using simulated samples. As a result, it was revealed that the measured value of KMnO₄ consumption was lower than the actual value in the sample with a high concentration of free residual chlorine.

Considering the influence of free residual chlorine, the TOC corresponding to 25 mg/L, the current standard value for KMnO₄ consumption in public bathhouses, was calculated and found to deviate significantly from the standard value of 8 mg/L. Thus, if TOC is applied as a standard for organic substances, more facilities are expected to exceed the standard. Therefore, there is room to reconsider the standard for TOC so that it does not deviate from the standard for KMnO₄ consumption.

Key words : KMnO₄ consumption, total organic carbons, public bathhouses

^a Osaka Institute of Public Health

^b Japan Architectural Health and Management Education Center

水質検査における外部精度管理（2020 年度）

－セレン及びその化合物－

安達史恵^a, 中島孝江^b

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水道事業者、保健所及び公的研究機関を対象に、セレン及びその化合物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、20 検査値中 2 検査値が真値に対する誤差率及び z スコアの許容範囲を超過した。この機関を対象に定量精度に関するフォローアップ調査を行ったところ、分析機器の性能が低下及び前処理時の操作ミスが定量値に影響を及ぼしたことが示唆された。

キーワード：水道水、セレン及びその化合物、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、保健所及び公的研究機関（以下、水道事業者等）を対象に外部精度管理を実施している¹⁻⁷⁾。

2020 年度の対象項目は、無機項目として「セレン及びその化合物」を選定した。セレンは古くからガラス、窯業で使用されてきたが、その他に、赤色顔料の原料、有機化学合成の酸化剤、触媒等さまざまな用途に使用されている⁸⁾。近年では、光伝導性（光があたると電気を通しやすくなる性質）を利用し、カメラの他、コピー機の感光ドラム、太陽電池等にも使用されている⁹⁾。セレンは、自然水中に含まれることがあるが、その多くは鉱山排水、工場排水などの混入によるものである。

ヒトにおいて、セレンは微量必須元素であり、体内で生成する有害な過酸化物の代謝に関与している。穀物、肉、海産物などの食品に多く含まれており⁸⁾、通常の食生活では欠乏することはないが、病气により栄養剤を長期投与されている場合に、セレン欠乏となることがあり、心筋症、不整脈等を引き起こす³⁾。一方、過剰となっても、胃腸障害、神経

障害等を起こすことが報告されている。また、職業上の暴露により、気管支炎、高熱、嘔吐などがみられることもある¹⁰⁾。

日本においては、セレンを含有する工場排水等による水道水源の汚染はほとんどなく、基準は定めないこととされていたが、海外においてセレンへの関心が高かったことから、導入の検討が行われ、昭和 53 年に指導基準値 0.01 mg/L が設定された。その後、1992 年に水質基準項目に定められ、前述の 0.01 mg/L がそのまま基準値となっている⁸⁾。

前回の大阪府の外部精度管理から 10 年以上経過したため、今回の対象項目とした。

方 法

1. 参加機関

本研究に参加した水道事業者等は 20 機関であった。その内訳は水道事業者 18 機関、保健所 1 機関及び公的研究機関 1 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 40 L をポリタンク

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課 元研究員

に採水した。硝酸（1.42）（富士フイルム和光純薬、超微量分析用）を濃度が1%となるよう添加後、セレン標準液（富士フイルム和光純薬 1008 mg/L、保証期限 2021 年 9 月、ロット番号 KCJ5512）を 2000 倍希釈した溶液を 280 mL 添加し、よく攪拌した。1L のポリエチレン製容器に分注して冷蔵保存し、9 月 30 日に（地独）大阪健康安全基盤研究所上水試験室において各検査実施機関に配付した。なお、精製水中のセレン及びその化合物は 0.0005 mg/L 未満であった。

(2) 検査方法および報告方法

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」（以下、告示法）のフレームレス原子吸光光度計による一斉分析法、誘導結合プラズマ質量分析装置による一斉分析法（以下、ICP-MS 法）、水素化物発生－原子吸光光度法及び水素化物発生－誘導結合プラズマ発光分光分析法とした¹¹⁾。配付試料については前処理を含めて 5 回の測定を行い、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データやチャート等と合わせて提出することとした。各検査実施機関から送付された「外部精度管理結果報告書」を取りまとめた後、検査結果及び検査方法等に関する評価を実施した。そして、「外れ値」に該当した機関に対してフォローアップ調査を実施した。

(3) 評価の検証方法

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

検査結果は「真値」に対する誤差率（以下、誤差率）及び 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¹²⁾を行い、棄却された検査値を除いた検査値から平均を求め、これを「真値」とした。誤差率は、(1) の式から算出し、±10%以内を許容範囲とした。

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

z スコアは四分位数法¹³⁾で算出し、z スコアの絶対値 3 未満を許容範囲とした。誤差率及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セレン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¹⁴⁾。なお、変動係数、誤差率及び z スコアについては、検査値を計算過程で丸めずに算出した。

結 果 お よ び 考 察

1. 精度管理試料の均一性及び安定性

外部精度管理用配付試料の均一性を確認するため、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。得られた測定結果を元に一元配置分散分析を行った。その結果、p 値は 0.82 で試料間の変動は有意とならず、均一性に問題がないことが確認された。また、配付後 1、5、8、14、21 日目に、試料 1 本につき 5 回測定した結果を図 1 に示した。平均値の変動係数は 2.9%となり、外部精度管理配付用試料の安定性に問題はないと判断した。

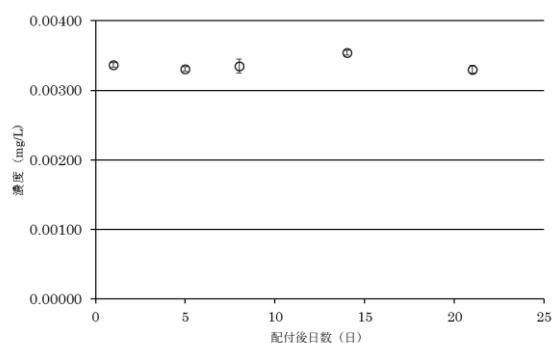


図 1 精度管理試料の安定性（n=5、平均±標準偏差）

2. 分析方法

すべての参加機関が ICP-MS 法を用いていた。

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 20 機関から報告された各検査値、変動係数、誤差率及び z スコアを表 1 に、検査値のヒストグラムを図 2 に示した。

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（表 1）、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、

表1 検査値の概要

機関番号	検査方法	検査値 (平均値) (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
A-1*	ICP-MS	0.00293	2.19	-13.86	-3.69
A-2	ICP-MS	0.00310	3.33	-8.91	-2.38
A-3	ICP-MS	0.00325	1.81	-4.44	-1.19
A-4	ICP-MS	0.00330	2.21	-2.97	-0.80
A-5	ICP-MS	0.00331	0.84	-2.56	-0.69
A-6	ICP-MS	0.00332	1.91	-2.44	-0.66
A-7	ICP-MS	0.00334	0.78	-1.62	-0.44
A-8	ICP-MS	0.00335	2.58	-1.44	-0.40
A-9	ICP-MS	0.00338	1.11	-0.56	-0.16
A-10	ICP-MS	0.00339	2.72	-0.15	-0.05
A-11	ICP-MS	0.00341	1.46	0.26	0.05
A-12	ICP-MS	0.00345	0.78	1.62	0.41
A-13	ICP-MS	0.00346	0.70	1.91	0.49
A-14	ICP-MS	0.00347	0.61	2.09	0.54
A-15	ICP-MS	0.00348	1.38	2.44	0.63
A-16	ICP-MS	0.00351	1.93	3.15	0.82
A-17	ICP-MS	0.00351	1.09	3.32	0.87
A-18	ICP-MS	0.00353	1.07	3.97	1.04
A-19	ICP-MS	0.00357	0.83	5.09	1.33
A-20*	ICP-MS	0.00391	2.02	15.09	3.98
平均値		0.00340			
最大値		0.00391			
最小値		0.00293			
標準偏差		0.00019			
変動係数(%)		5.7			
n		20			

真値：0.00340 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（外れ値）

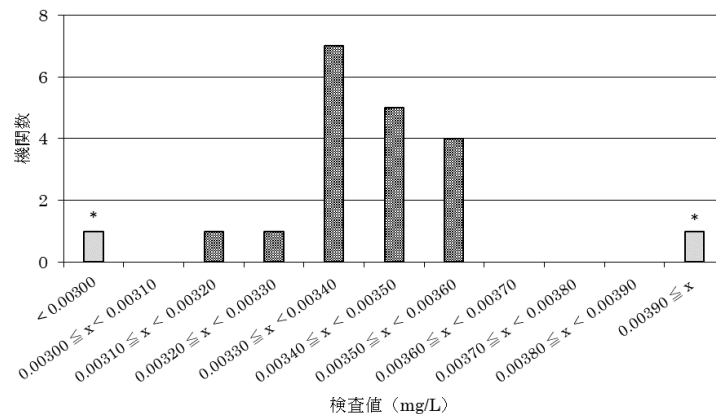


図2 検査値の度数分布図(*外れ値)

棄却された機関はなかったため、20 検査値を平均した 0.00340 mg/L を「真値」とした。「真値」に対する誤差率の許容範囲を越えたのは 2 機関（A-1、A-20）であった。次に、Z スコアを求めた結果、Z スコアの範囲は -3.69～3.98 となり、許容範囲を越えたのは 2 機関（A-1、A-20）であった。

誤差率と Z スコアとの両方の許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当する機関は 2 機関（A-1、A-20）であった。したがって、誤差率及び Z スコアの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に該当する機関は 2 機関で、全体の 10.0%（2/20）となった。

(2) フォローアップ調査

「外れ値」となった2機関（A-1、A-20）に対して原因究明のフォローアップ調査を行った。

① 機関 A-1

機関 A-1 は、検査値は 0.00293 mg/L、 z スコアは -3.69、「真値」に対する誤差率は-13.86%であった。提出された資料からは、特に外れ値の原因となる点はみられなかった。検査担当者に問い合わせたところ、精度管理結果返却後、原因究明をすでに実施済みであった。分析機器メーカーと相談後、以下 a～c を実施し、精度管理試料を再測定したところ、検査値が 0.00343 mg/L ($n=5$) となり、精度管理時の真値 (0.00340 mg/L) に対する誤差率は 0.91%と良好な値となった。

- a. ICP-MS の部品（スキマーコーン、スキマーコーンインサート、サンプルコーン、ネプライザー及び試料導入ポンプチューブ）を新品に交換
- b. トーチ他、ガラス器具を精製水で洗浄
- c. 機器調整（マス校正、検出器セットアップ）

以上、機関 A-1 においては精度管理実施時に、機器のいずれかの部品あるいは検出器に不具合が生じ、セレンの濃度が正確に測定できない状態であったと推測された。分析機器については、自らあるいはメーカーによる保守点検等を行い、その性能が維持されていることを定期的に確認することが必要である。

② 機関 A-20

機関 A-20 は、検査値は 0.00391 mg/L、 z スコアは 3.98、「真値」に対する誤差率は 15.09%であった。提出された資料からは、特に外れ値の原因となる点はみられなかった。検査担当者に問い合わせたところ、今回の精度管理時においては、検量線用の標準液を SOP に記載されている混合標準溶液を用いずに、セレン標準液を用いて調製したとのことであった。しかし、同じ試料を混合標準溶液で作成した検量線で定量しても、同様に高い値であったことを確認していた。したがって、標準溶液に問題はないと考えられた。器具等の不具合が考えられたため、マイクロピペット等の点検を実施したが、問題はなかった。また、残りの精度管理試料を再度測定してみたところ、0.00334 mg/L ($n=1$) となり、精度管理時の値 (0.00391 mg/L) は再現できないとのことであった。さらに、装置の安定性を確認するため、同じ試料を数日間測定したが、併行精度に問題はなかった。

以上、今回の外れ値の原因を究明するには至らず、精度管理時の試料の前処理で何らかのミスが起こり、高値となったと推測するにとどまった。

(3) 全体的な留意点

① 検量線及び空試験

告示法では別表に記載された濃度範囲内でブランク試料を含めない 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¹⁾。今回参加したすべての機関は検量点を 4 点以上用いて検量線を作成していた。しかし、告示及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が、A-10 では検量線の点に 0 mg/L を用いていた。また、すべての機関は 1 次式を用いて検量線を算出しており、原点強制通過を行った機関は存在せず、決定係数 (R^2) の範囲は 0.9990～1.0000 であった。

告示法では金属類の一斉分析においては、元素ごとの濃度範囲が提示され、検量線はその範囲を超えてはならないとしている。ICP-MS 法のセレン及びその化合物の濃度範囲は 0.0004～0.1 mg/L で上限は 0.1 であるが、この値を超えている機関はなく、すべての機関において適切な濃度範囲で検量線の濃度設定が行われていた。また、参加したすべての機関が空試験を実施しており、検量線の下限值以下であることを確認していた。

② 前処理及び標準液

ICP-MS 法における告示法には「検水を採り、試料採取のときに加えた量を含めて硝酸を検水 100 mL に対して 1mL の割合となるように加え、静かに加熱する。液量が検水 100 mL に対して 90 mL の割合以下になったら加熱をやめ、更に精製水を加えて一定量とし、これを試験溶液とする。」とある。加熱を実施していない機関が 1 機関 (A-7) あった。A-7 においては、SOP が未整備の状態であり、加熱に関する記載もなかった。ICP-MS による金属類の一斉分析においては、対象とする金属によって、酸による加熱分解を行わないと正確に測定できないため、告示法通りに酸添加後の加熱が必要である。A-7 においては SOP を早急に整備する必要がある。告示法では、標準原液、標準液または混合標準液は原体から自己調製したもの、もしくは計量法（平成 4 年法律第 51 号）第 136 条若しくは第 144 条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書が添付され、かつ、告示法の標準原液と同濃度のもの又は告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度

のものの使用が認められている。なお、告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものは開封後速やかに使用することとし、開封後保存したものを使用してはならないとされている¹¹⁾。ただし、別表第6のICP-MS法においては、標準溶液等は冷暗所に保存可能である。今回、すべての機関で認証付きの市販標準原液もしくは混合標準液を使用しており、そ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 妥当性評価

水道水質検査における妥当性ガイドラインは、平成29年10月に改正され、検量線及び添加試料の評価を行うことが求められている¹⁵⁾。本調査では機関A-7を除くすべての機関で妥当性評価を実施していた。妥当性評価は、検査精度を客観的に評価できる方法であり、検査結果の信頼性に繋がるものであるため、未実施の機関は早急に実施すべきである。

評価方法として、4機関において精製水を用いて評価を行っていた。ガイドラインにおいては、添加を行う水の種類として、原則として検査を行う水道水等とし、検査対象物質を含まない水道水等を得ることが困難な場合は精製水等を用いてよいとされている。今回の対象物質は、水道水中の常在成分には該当しないため、可能な限り水道水で行うことが望ましい。

ま と め

令和2年度大阪府水道水質検査外部精度管理として、セレン及びその化合物の検査結果を「真値」に対する誤差率 $\pm 10\%$ 以内と z スコア ± 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20機関の検査値のうち、変動係数が10%を超えた機関は存在しなかった。「真値」に対する誤差率 $\pm 10\%$ を超えたのは2機関であった。また、 z スコア ± 3 以上となったのは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、10.0% (2/20) 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) 告示法に基づいたSOPを作成する。
- (2) 妥当性試験を実施し、SOPの検査精度を確認し

ておく。

- (3) 分析機器については、保守点検等を行いその性能を維持すること。
- (4) 内部精度管理等を定期的に行い、精度の確認を行うこと。

謝 辞

本研究は「令和2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) 吉田仁, 木村明生. 水質検査における外部精度管理 (2015 年度) -銅及びその化合物-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2017; 1: 15-33.
- 2) 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.
- 3) 小泉義彦. 水質検査における外部精度管理 (2017 年度) -ベンゼン-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2019; 3: 75-82.
- 4) 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.
- 5) 小泉義彦. 水質検査における外部精度管理 (2018 年度) -テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレン-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2020; 4: 82-92.
- 6) 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.
- 7) 吉田仁, 安達史恵. 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-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2021; 5: 59-65.
- 8) 上水試験方法 解説編 2001 年版. 日本水道協会; 2001. 409-412.
- 9) 厚生労働省. 水質基準の見直しにおける検討概要基 06 セレン.

<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k06.pdf>

- 10) 日本臨床栄養学会. セレン欠乏症の診療指針 2016.

<http://www.jscn.gr.jp/pdf/selen2016.pdf>

- 11) 厚生労働省. 「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」(平成 15 年 7 月 22 日付け厚生労働省告示第 261 号〔最終改正 令和 2 年 3 月 25 日厚生労働省告示 95 号〕).
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000922364.pdf>

- 12) JIS Z8402-2. 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度)-第 2 部: 標準測定方法の併行精度及び再現性を求めるための基本的な方法. 日本規格協会; 1999. 7-27.

- 13) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験(1). *環境と測定技術* 2000; 27(2): 51-56.

- 14) 厚生労働省. 「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について 水質基準項目の測定精度(平成 15 年 10 月 10 日健水発第 1010001 号〔最終改正 令和 3 年 3 月 26 日〕) 厚生労働省健康局水道課長通知 別添 5.
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000615932.pdf>

- 15) 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について」(平成 24 年 9 月 6 日付け健水発 0906 第 1~4 号〔最終改正 平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 第 1~4 号〕).
https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000181618_2.pdf

WEB サイトの内容は 2022 年 5 月 6 日に確認した。

Results of external quality control for the analytical method for the measurement of selenium in tap water, performed in Osaka Prefecture in 2020

Fumie ADACHI^a and Takae NAKAJIMA^b

In order to improve the accuracy of water quality measurements, we implemented external quality control for the analytical method for the measurement of selenium in tap water with water supply utilities, public health centers, and public research institutes in Osaka Prefecture. As a result, 2 of 20 examination values were evaluated as outliers. Therefore, we executed follow-up surveys for these utilities. The results suggested that the test values were affected by poor performance of instruments, due to anomalies in components, and operational errors.

Key words : tap water, external quality, selenium, follow-up survey

^a Osaka Institute of Public Health

^b former researcher at Osaka Institute of Public Health

水質検査における外部精度管理（2020 年度）

-陰イオン界面活性剤-

安達史恵^a, 中島孝江^b

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水道事業者、保健所及び公的研究機関を対象に、陰イオン界面活性剤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、16 検査値中 1 検査値が真値に対する誤差率及び z スコアの許容範囲を超過した。この機関を対象に定量精度に関するフォローアップ調査を行ったところ、検量線作成用の標準液濃度が設定値より低くなっていたことが定量値に影響を及ぼしたと示唆された。

キーワード：水道水、陰イオン界面活性剤、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、保健所及び公的研究機関（以下、水道事業者等）を対象に外部精度管理を実施している¹⁾⁷⁾。

2020 年度の対象項目は、有機項目として「陰イオン界面活性剤」を選定した。陰イオン界面活性剤は、水溶液中でイオン解離してアニオン部分が界面活性を示す物質であり、カルボン酸塩（石鹸）、側鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（ABS）、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）、硫酸エステル塩、リン酸エステル塩がある⁸⁾⁹⁾。主な用途は石けん、洗剤、シャンプー等の洗浄剤である。1950 年代から洗濯機の普及により合成洗剤の主成分であった ABS の使用が急速に増加したが、初期の ABS は生分解性が悪かったため、浄水場での泡問題や環境への影響が懸念された。しかし、1965 年より生分解性の良い LAS に切り換えられ、ABS は現在ではほとんど使用されていない¹⁰⁾。2016 年の陰イオン界面活性剤の販売量は約 30 万トンとなっている¹¹⁾。水道水中の陰イオン界面活性剤は、主に工場排水、家庭下水などの混入に由来し⁸⁾、発泡の原因となる。

水質基準項目としては、1966 年に陰イオン活性剤として追加され、泡立ち抑制の観点から基準値は 0.5 mg/L と定められた。1978 年に項目名が陰イオン界面活性剤に変更され、1992 年に泡立ちの抑制を確実にするために基準値が 0.2 mg/L に強化され、現在に至っている。試験方法については、メチレンブルー法が用いられていたが、妨害物質が多く、測定される物質がすべて陰イオン界面活性剤であるとは限らないため、2003 年に C10~C14 の LAS のみを測定できる固相抽出—高速液体クロマトグラフ法に変更された¹²⁾。

方 法

1. 参加機関

本研究に参加した水道事業者等は 16 機関であった。その内訳は水道事業者 13 機関、保健所 1 機関及び公的研究機関 2 機関であった。

2. 実施方法

(1) 精度管理試料の調製方法

2020 年 9 月 9 日～17 日にかけて精製水約 120 L をステンレス製タンクに採水した精製水中の陰イ

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課 元研究員

オン界面活性剤は 0.002 mg/L 未満であった。9 月 28 日にデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (C10-LAS) 標準液 (富士フィルム和光純薬 : 1000 mg/L) を 3.0 mL、ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (C11-LAS) 標準液 (富士フィルム和光純薬 : 1000 mg/L) を 3.5 mL、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (C12-LAS) 標準液 (富士フィルム和光純薬 : 1000 mg/L) を 4.0 mL、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (C13-LAS) 標準液 (富士フィルム和光純薬 : 1000 mg/L) を 4.3 mL、テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (C14-LAS) 標準液 (富士フィルム和光純薬 : 1000 mg/L) を 4.3 mL 添加して攪拌した (調製設定濃度 C10-LAS : 0.0250 mg/L、C11-LAS : 0.0292 mg/L、C12-LAS : 0.0333 mg/L、C13-LAS : 0.0358 mg/L、C14-LAS : 0.0358 mg/L)。3L のガラス容器に分注して冷蔵保存し、9 月 30 日に (地独) 大阪健康安全基盤研究所 上水試験室において各検査実施機関に配付した。

(2) 試料の測定方法

検査方法は「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」(以下、告示法) の固相抽出—高速液体クロマトグラフ法とした¹³⁾。配付試料については前処理を含めて 5 回の測定を行い、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データやチャート等と合わせて提出することとした。各検査実施機関から送付された「外部精度管理結果報告書」を取りまとめた後、検査結果及び検査方法等に関する評価を実施した。そして、「外れ値」に該当した機関に対してフォローアップ調査を実施した。

(3) 評価の検証方法

はじめに、各機関内で測定された精度管理試料の 5 つの測定値の変動係数が 20% を超過した機関は評価対象外とした。検査結果は「真値」に対する誤差率 (以下、誤差率) 及び z スコアで評価を行い、両方の評価方法において許容範囲を超過した検査値を「外れ値」とした。「真値」は、各機関からの検査値を用いて、有意水準を 5% として Grubbs の棄却検定¹⁴⁾を行い、棄却された検査値を除いた検査値から平均を求め、これを「真値」とした。誤差率は、(1) の式から算出し、 $\pm 20\%$ 以内を許容範囲とした。

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

z スコアは四分位数法¹⁵⁾で算出し、 z スコアの評価基準で $3 \leq |z|$ は不満足であるため、絶対値 3 未満を許容範囲とした。変動係数及び誤差率の許容範囲を 20% とした根拠は、水質基準項目の測定精度における陰イオン界面活性剤の変動係数の目標が 20% であるためである¹⁶⁾。なお、変動係数、誤差率及び z スコアについては、検査値を計算過程で丸めずに算出した。

結 果 お よ び 考 察

1. 精度管理試料の均一性及び安定性

外部精度管理用配付試料の均一性を確認するため、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。得られた測定結果を元に一元配置分散分析を行った。その結果、 p 値はすべて 0.05 以上 (C10-LAS : $p=0.20$ 、C11-LAS : $p=0.15$ 、C12-LAS : $p=0.21$ 、C13-LAS : $p=0.26$ 、C14-LAS : $p=0.29$ 、C10~C14-LAS 合計 : $p=0.22$) で、試料間の変動は有意とならず、均一性に問題がないことを確認した。また、配付日および配付後 1、2、5、8、14、22 日目に試料 1 本につき 5 回測定した結果を図 1 に示す。各測定日の平均値の変動係数は C10-LAS が 1.22%、C11-LAS が 0.96%、C12-LAS が 1.29%、C13-LAS が 1.09%、C14-LAS が 1.06%、C10~C14-LAS 合計が 1.09% であり、ばらつきは小さかった。また、近似直線の傾きはいずれもほぼ 0 となり、外部精度管理用配付試料の安定性に問題はないと判断した。

2. 分析方法

すべての参加機関が固相抽出—高速液体クロマトグラフ法を用いていた。

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 16 機関から報告された C10-LAS、C11-LAS、C12-LAS、C13-LAS、C14-LAS 及び C10~C14-LAS 合計の各検査値、変動係数、誤差率及び z スコアを表 1~6 に、検査値のヒストグラムを図 2~7 に示した。

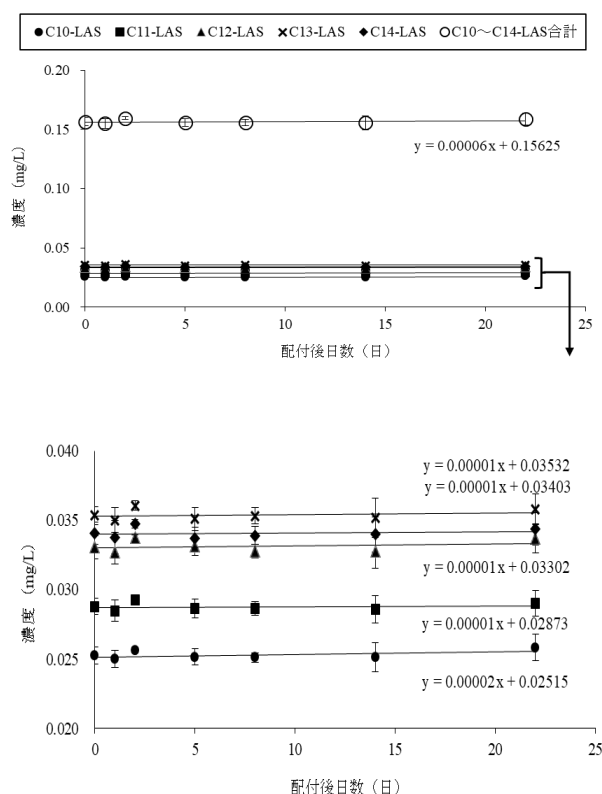


図1 精度管理試料の安定性 (n=5、平均±標準偏差)

① C10-LAS

機関内変動係数が 20%を超過した検査値は存在しなかったため (表 1)、すべての検査値を評価対象とした。「真値」を算出するため、検査値を有意水準 5%で Grubbs の棄却検定を行った。その結果、1 検査値 (B-16) が棄却され、残りの 15 検査値を平均した 0.0269 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を越えたのは 1 機関 (B-16) であり、誤差率は 22.87%であった。次に、16 検査値を用いて z スコアを求めた結果、その範囲は-1.92~4.12 となり、許容範囲を超えたのは 1 機関 (B-16) であり、 z スコアは 4.12 であった。

誤差率と z スコアとの両方の許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」に該当する機関は 1 機関 (B-16) であった。

② C11-LAS

機関内変動係数が 20%を超過した検査値は存在しなかったため (表 2)、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、棄却された検査値はなかったため、すべての検査値を平均した 0.0305 mg/L を「真値」とした。誤差率

の許容範囲を越えた機関はなかった。次に、16 検査値を用いて z スコアを求めた結果、その範囲は-1.71~2.96 となり、 z スコアが許容範囲を超えた機関はなかった。したがって、「外れ値」に該当する機関はなかった。

③ C12-LAS

機関内変動係数が 20%を超過した検査値は存在しなかったため (表 3)、すべての検査値を評価対象とした。「真値」を算出するため、検査値を有意水準 5%で Grubbs の棄却検定を行った。その結果、1 検査値 (B-16) が棄却され、残りの 15 検査値を平均した 0.0347 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を越えたのは 1 機関 (B-16) であり、誤差率は 21.42%であった。次に、16 検査値を用いて z スコアを求めた結果、その範囲は-2.02~3.23 となり、許容範囲を超えたのは 1 機関 (B-16) であり、 z スコアは 3.23 であった。したがって、「外れ値」に該当する機関は 1 機関 (B-16) であった。

④ C13-LAS

機関内変動係数が 20%を超過した検査値は存在しなかったため (表 4)、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、棄却された検査値はなかったため、すべての検査値を平均した 0.0365 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を越えた機関はなかった。次に、16 検査値を用いて z スコアを求めた結果、その範囲は-2.24~2.58 となり、許容範囲を超えた機関はなかった。したがって、「外れ値」に該当する機関はなかった。

⑤ C14-LAS

機関内変動係数が 20%を超過した検査値は存在しなかったため (表 5)、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、棄却された検査値はなかったため、すべての検査値を平均した 0.0338 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を越えた機関はなかった。次に、16 検査値を用いて z スコアを求めた結果、その範囲は-1.63~1.44 となり、許容範囲を超えた機関はなかった。したがって、「外れ値」に該当する機関はなかった。

⑥ C10~C14-LAS 合計

機関内変動係数が 20%を超過した検査値は存在しなかったが (表 6)、機関 B-16 は C10-LAS と C12-

表1 検査値の概要 (C10-LAS)

機関番号	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*
B-1	0.0239	2.36	-11.14	-1.92
B-2	0.0254	5.58	-5.48	-0.92
B-3	0.0259	4.08	-3.70	-0.60
B-8	0.0260	2.18	-3.25	-0.52
B-4	0.0261	2.03	-2.80	-0.44
B-7	0.0264	3.16	-1.76	-0.26
B-9	0.0265	2.22	-1.46	-0.20
B-5	0.0266	0.57	-0.87	-0.10
B-11	0.0269	4.86	0.25	0.10
B-6	0.0270	2.20	0.32	0.11
B-10	0.0279	1.59	3.75	0.72
B-12	0.0281	1.75	4.64	0.88
B-13	0.0282	3.00	4.79	0.91
B-14	0.0287	4.45	6.65	1.24
B-15	0.0296	6.77	10.07	1.84
B-16**	0.0330	1.54	22.87	4.12
平均値	0.0273			
最大値	0.0330			
最小値	0.0239			
標準偏差	0.0021			
変動係数 (%)	7.58			
n	16			

真値：0.0269 mg/L

*：検査値(n=5の平均値)を丸めずに算出

**：真値に対する誤差率が±20%を超え、zスコアの絶対値が3以上の機関

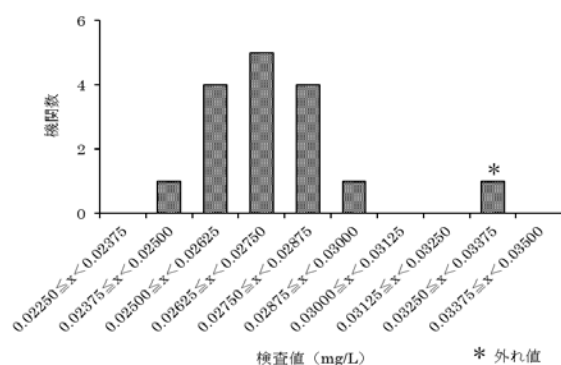


図2 検査値の度数分布図 (C10-LAS)

表2 検査値の概要 (C11-LAS)

機関番号	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*
B-1	0.0270	2.34	-11.41	-1.71
B-2	0.0275	4.63	-9.64	-1.42
B-3	0.0286	2.93	-6.16	-0.85
B-4	0.0289	2.51	-5.04	-0.67
B-8	0.0292	3.02	-4.06	-0.50
B-9	0.0298	3.67	-2.29	-0.21
B-6	0.0300	2.96	-1.44	-0.07
B-7	0.0300	3.36	-1.44	-0.07
B-5	0.0303	0.23	-0.58	0.07
B-11	0.0308	4.66	0.99	0.33
B-10	0.0309	1.81	1.26	0.37
B-12	0.0315	1.80	3.49	0.74
B-14	0.0320	3.80	5.06	1.00
B-13	0.0323	2.58	6.11	1.17
B-15	0.0330	6.69	8.21	1.52
B-16	0.0356	2.31	16.94	2.96
平均値	0.0305			
最大値	0.0356			
最小値	0.0270			
標準偏差	0.0021			
変動係数 (%)	7.05			
n	16			

真値：0.0305 mg/L

*：検査値(n=5の平均値)を丸めずに算出

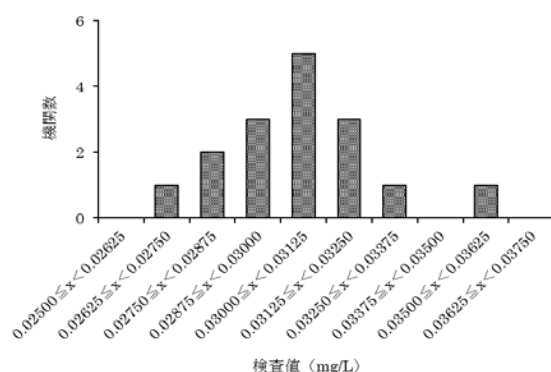


図3 検査値の度数分布図 (C11-LAS)

表3 検査値の概要 (C12-LAS)

機関番号	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*
B-1	0.0309	2.38	-10.89	-2.02
B-2	0.0319	4.65	-8.13	-1.57
B-3	0.0327	3.60	-5.88	-1.20
B-4	0.0328	3.35	-5.59	-1.15
B-8	0.0337	3.08	-2.83	-0.71
B-5	0.0347	0.77	-0.12	-0.27
B-10	0.0351	1.93	0.97	-0.09
B-9	0.0352	4.50	1.32	-0.03
B-7	0.0353	2.68	1.72	0.03
B-11	0.0354	4.47	1.95	0.07
B-6	0.0354	4.45	1.95	0.07
B-12	0.0363	1.80	4.54	0.49
B-14	0.0366	3.91	5.52	0.65
B-13	0.0372	2.69	7.25	0.93
B-15	0.0376	6.72	8.23	1.09
B-16**	0.0422	2.59	21.42	3.23
平均値	0.0352			
最大値	0.0422			
最小値	0.0309			
標準偏差	0.0026			
変動係数 (%)	7.53			
n	16			

真値：0.0347 mg/L

*：検査値(n=5の平均値)を丸めずに算出

**：真値に対する誤差率が±20%を超え、zスコアの絶対値が3以上の機関

表4 検査値の概要 (C13-LAS)

機関番号	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*
B-1	0.0318	2.48	-13.03	-2.24
B-3	0.0331	3.83	-9.30	-1.60
B-2	0.0338	3.72	-7.50	-1.30
B-4	0.0338	4.34	-7.39	-1.28
B-5	0.0355	1.96	-2.85	-0.50
B-6	0.0359	2.04	-1.81	-0.33
B-10	0.0364	2.11	-0.49	-0.10
B-8	0.0366	3.46	0.05	-0.01
B-7	0.0366	3.16	0.16	0.01
B-12	0.0377	4.26	3.23	0.53
B-14	0.0379	4.62	3.72	0.62
B-11	0.0379	4.03	3.83	0.63
B-9	0.0381	4.93	4.27	0.71
B-13	0.0384	3.36	4.98	0.83
B-15	0.0390	7.08	6.84	1.15
B-16	0.0421	3.63	15.27	2.58
平均値	0.0365			
最大値	0.0421			
最小値	0.0318			
標準偏差	0.0026			
変動係数 (%)	7.03			
n	16			

真値：0.0365 mg/L

*：検査値(n=5の平均値)を丸めずに算出

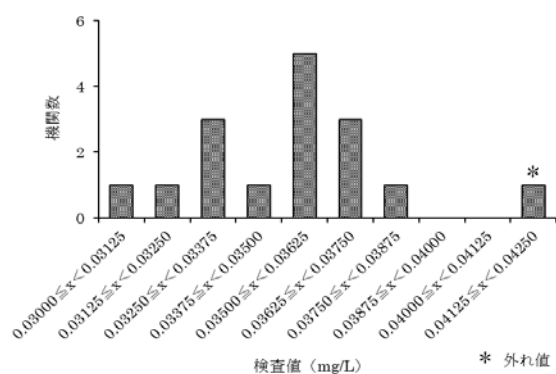


図4 検査値の度数分布図 (C12-LAS)

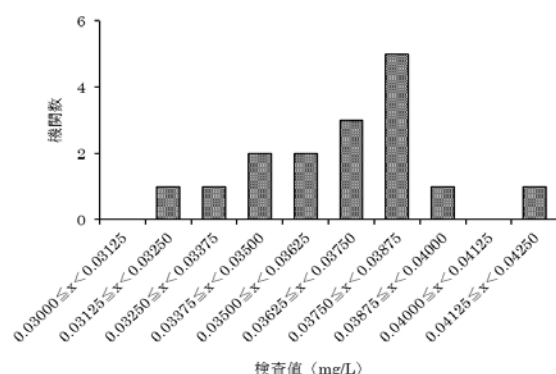


図5 検査値の度数分布図 (C13-LAS)

表5 検査値の概要 (C14-LAS)

機関番号	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*
B-1	0.0288	2.82	-14.87	-1.63
B-4	0.0313	3.93	-7.29	-0.73
B-6	0.0319	2.36	-5.57	-0.53
B-3	0.0320	3.65	-5.22	-0.49
B-2	0.0321	4.95	-5.04	-0.47
B-5	0.0322	1.09	-4.57	-0.41
B-10	0.0332	2.42	-1.84	-0.09
B-7	0.0332	4.83	-1.72	-0.07
B-9	0.0336	2.76	-0.48	0.07
B-13	0.0340	3.40	0.76	0.22
B-12	0.0349	7.84	3.31	0.52
B-14	0.0357	3.24	5.79	0.82
B-15	0.0364	7.82	7.81	1.06
B-16	0.0365	1.93	8.04	1.08
B-11	0.0371	3.87	9.82	1.29
B-8	0.0375	7.82	11.06	1.44
平均値	0.0338			
最大値	0.0375			
最小値	0.0288			
標準偏差	0.0024			
変動係数 (%)	7.19			
n	16			

真値：0.0338 mg/L

*：検査値(n=5の平均値)を丸めずに算出

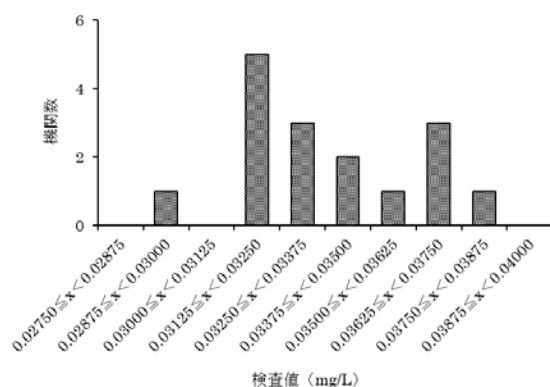


図6 検査値の度数分布図 (C14-LAS)

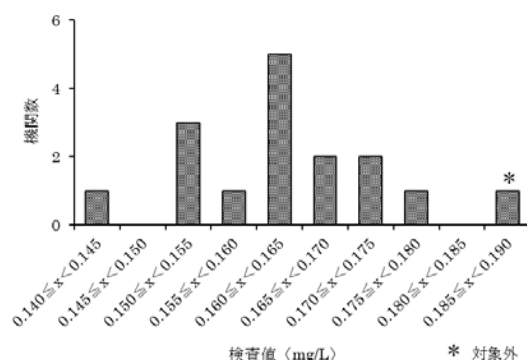
表6 検査値の概要 (C10～C14-LAS の合計)

機関番号	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*
B-1	0.142	2.46	-11.85	-2.29
B-2	0.151	4.24	-6.67	-1.37
B-3	0.152	3.56	-5.68	-1.19
B-4	0.153	3.19	-5.26	-1.11
B-5	0.159	0.92	-1.32	-0.41
B-6	0.160	2.75	-0.82	-0.32
B-7	0.162	3.25	0.04	-0.17
B-8	0.163	2.80	0.97	0.00
B-9	0.163	3.47	1.03	0.01
B-10	0.163	1.92	1.13	0.03
B-11	0.168	4.30	4.12	0.56
B-12	0.169	2.73	4.38	0.61
B-13	0.170	2.75	5.35	0.78
B-14	0.171	3.95	5.86	0.87
B-15	0.176	7.02	8.73	1.39
B-16**	0.189	2.14	-	-
平均値	0.163			
最大値	0.189			
最小値	0.142			
標準偏差	0.011			
変動係数 (%)	6.79			
n	16			

真値：0.161 mg/L

*：検査値(n=5の平均値)を丸めずに算出

**：C10-LASとC12-LASが外れ値であったため評価の対象外とした機関

図7 検査値の度数分布図
(C10～C14-LAS 合計)

LAS が「外れ値」であったので評価の対象外とし、残りの 15 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、棄却された検査値はなかったため、15 検査値を平均した 0.161 mg/L を「真値」とした。誤差率の許容範囲を越えた機関はなかった。次に、15 検査値を用いて $\bar{x}$ スコアを求めた結果、その範囲は -2.29 ~ 1.39 となり、許容範囲を超えた機関はなかった。したがって、「外れ値」に該当する機関はなかった。

以上より、機関 B-16 が C10-LAS と C12-LAS で外れ値となったのみで、各機関は概ね精度良く水質検査が実施できていると考えられた。

(2) フォローアップ調査

C10-LAS と C12-LAS が「外れ値」に該当した機関 B-16 に対して、原因追及のためにフォローアップ調査を行った。

機関 B-16 は C10-LAS の検査値は 0.0330 mg/L、誤差率は 22.87%、 $\bar{x}$ スコアは 4.12、C12-LAS の検査値 0.0422 mg/L、誤差率は 21.42%、 $\bar{x}$ スコアは 3.23 であった。「外れ値」に該当しなかった C11-LAS、C13-LAS、C14-LAS の誤差率もそれぞれ 16.94%、15.27%、8.04% と高い傾向であった。

この機関では検量線用標準液の調製に、マイクロピペットを使用していたが、チップとしてガラス製の自製チップを用いていた。そこで、採取量の正確性が危惧されたので確認を行った。メタノールと精製水について設定量 10 μ L と 100 μ L の重量を 5 回秤量し、密度で除して採取量を求め、平均値の設定量に対する比率を求めたところ、10 μ L では精製水 103%、メタノール 90%、100 μ L では精製水 99%、メタノール 94% となり、メタノールで採取量が少ない結果となった。同様の確認を市販のポリプロピレン製チップを用いて行ったところ、設定量 100 μ L で精製水 100%、メタノール 100% となり、採取量は適正であった。したがって、マイクロピペットの操作には問題はなく、メタノール採取量の低下は自製のガラスチップの使用が原因であると考えられた。また、検量線用標準液の調製時に、10 ~ 100 μ L を 2 mL にする工程があった。この時の希釈率は最大 200 倍と大きい上、調製量が 2 mL と少ないため、正確な調製ができていない可能性があると考えられた。そこで、チップは市販のポリプロピレン製を用い、調製量を 10 mL、採取量を 100 μ L 以上とし、希釈率が最大 100 倍となるよう標準液調製工程を

変更し、再度測定を行った。

変更した方法で調製した標準液を用いて測定した検査値は C10-LAS が 0.0280 mg/L、C11-LAS が 0.0311 mg/L、C12-LAS が 0.0351 mg/L、C13-LAS が 0.0358 mg/L、C14-LAS が 0.0320 mg/L、C10-LAS ~ C14-LAS 合計が 0.162 mg/L で「真値」に対する誤差率は、C10-LAS が 4.24%、C11-LAS が 2.00%、C12-LAS が 1.05%、C13-LAS が -2.00%、C14-LAS が -5.23%、C10 ~ C14-LAS 合計が 0.32% と、すべて 20% 以下で良好な結果となった。

以上、「外れ値」の原因は、マイクロピペットで不適切なチップを使用していたことにより、検量線用標準液の濃度が設定より低くなったことであると考えられた。マイクロピペットの使用時には使用溶媒を用いて採取量を確認することが必要である。

(3) 全体的な留意点

① 検量線及び空試験

告示法では別表に記載された濃度範囲内でブランク試料を含めない 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¹³⁾。今回参加したすべての機関は検量点を 4 点以上用いて検量線を作成していた。また、すべての機関は 1 次式を用いて検量線を作成しており、原点強制通過を行った機関は存在せず、決定係数 (R^2) の範囲は、0.9970 ~ 1.0000 であった。

検量線作成用標準液の調製方法について、告示法では調製量は 100 mL となっているが、200 mL が 1 機関、100 mL が 1 機関、20 mL が 2 機関、10 mL が 10 機関、2 mL が 2 機関であった。また、標準液調製時に 100 倍を超える希釈倍率を用いている機関が 8 機関あり、これについては濃度が不正確になる可能性が高くなるので 100 倍以内にすることが望ましい。また、標準液調製時の採取量が 100 μ L 未満の機関が 8 機関あり、メタノールを採取する場合は精製水と比較して不正確になる可能性が高いので、100 μ L 以上にすることが望ましい。

一方、精製水に標準溶液を添加し、試料と同様の操作を行い、検量線を作成した機関が 1 機関あった。この機関は妥当性評価¹⁷⁾は実施していたが告示法と異なる方法であるため、告示法に従った方法で行うべきである。

また、SOP の設定濃度と異なる濃度の検量点で実施している機関があったが、検査は SOP に従って実施する必要がある。参加したすべての機関が空試験を実施しており、検量線の下限值以下であること

を確認していた。

② 前処理及び標準液

告示法¹³⁾に規定される検水量(500 mL)と異なる検水量(100 mL)の機関が1機関あり、この機関では告示法に従った検水量で実施すべきである。

また、固相抽出後の固相の乾燥について、告示法に記載はないが、乾燥を実施した機関が9機関あった。乾燥有と乾燥無の検査値の平均値は、C10-LASが0.0263 mg/Lと0.0285 mg/L、C11-LASが0.0295 mg/Lと0.0318 mg/L、C12-LASが0.0340 mg/Lと0.0367 mg/L、C13-LASが0.0354 mg/Lと0.0380 mg/L、C14-LASが0.0326 mg/Lと0.0353 mg/L、C10～C14-LAS合計が0.158 mg/Lと0.170 mg/Lで、いずれも乾燥無が高値であった。平均値の有意差検定(t検定)のp値はC10-LASが0.0248、C11-LASが0.0294、C12-LASが0.0412、C13-LASが0.0335、C14-LASが0.0167、C10～C14-LAS合計が0.0174で、いずれも0.05未満で有意な差が認められた。

しかしながら、前述の有意差が乾燥工程の有無によるものかは同一機関での乾燥工程の有無による検証が必要である。そこで、乾燥工程の有無で検査値に差が生じるかどうか当所で確認を行った。固相抽出後の乾燥無は、ガラス製注射器による空気30 mLの注入による脱水のみ、乾燥有はさらに窒素通気20分とし、同一試料各5回の分析を行った。乾燥有と乾燥無の検査値の平均値は、C10-LASが0.0251 mg/Lと0.0249 mg/L、C11-LASが0.0289 mg/Lと0.0286 mg/L、C12-LASが0.0335 mg/Lと0.0330 mg/L、C13-LASが0.0359 mg/Lと0.0355 mg/L、C14-LASが0.0343 mg/Lと0.0340 mg/L、C10～C14-LAS合計が0.158 mg/Lと0.156 mg/Lで、平均値の有意差検定(t検定)のp値はC10-LASが0.4355、C11-LASが0.3800、C12-LASが0.1834、C13-LASが0.3807、C14-LASが0.3190、C10～C14-LAS合計が0.3012で、いずれも0.05以上で有意な差があるとはいえない結果であった。このことから乾燥工程の有無による検査結果への影響はなかったと考えられるが、検査は告示法に従い、乾燥工程無しで実施すべきである。

告示法では、標準原液、標準液または混合標準液は原体から自己調製したもの、もしくは計量法(平成4年法律第51号)第136条若しくは第144条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書が添付され、かつ、告示法の標準原液と同濃度のもの又は告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃

度のものの使用が認められている。なお、告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものは開封後速やかに使用することとし、開封後保存したものを使用してはならない¹³⁾。今回、すべての機関で市販の標準原液を使用していたが、陰イオン界面活性剤は認証付きの製品が市販されていないので、認証付きの標準原液を使用している機関はなかった。標準原液は、すべての機関で保証期限内のものであり、開封してから使用までの期間は、当日が12機関、1週間未満、6か月未満、1年未満、1年以上が各1機関であった。標準原液は保証期限内の使用が認められているが、アンプルの場合、開封後の保存には密閉性等に注意が必要である。

③ 妥当性評価

水道水質検査における妥当性ガイドラインは、平成29年10月に改正され、検量線及び添加試料の評価を行うことが求められている¹⁷⁾。今回、他機関の機器を用いて精度管理試料を分析した機関B-13が妥当性評価を実施していなかったが、当該機関では通常行っている分析法で実施する必要がある。

ま と め

令和2年度大阪府水道水質検査外部精度管理として、陰イオン界面活性剤の検査結果を「真値」に対する誤差率 $\pm 20\%$ と z スコア ± 3 を許容範囲とする2つの方法で評価を行った。報告された16機関の検査値のうち、変動係数が20%を超えた機関は存在しなかった。「真値」に対する誤差率 $\pm 20\%$ を超えたのはC10-LASとC12-LASの各1機関で、同一機関であった。また、 z スコア ± 3 以上はC10-LASとC12-LASの各1機関で同一機関であった。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C10-LASとC12-LASの各1機関で同一機関であった。「外れ値」の存在率は、6.3%(1/16)であった。C10-LASとC12-LASで「外れ値」となった1機関はC10～C14-LAS合計では評価の対象外とした。

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) 告示法に基づいたSOPを作成する。
- (2) 分析操作はSOPから逸脱しないようにする。
- (3) 妥当性試験を実施し、SOPの検査精度を確認しておく。
- (4) マイクロピペットを使用する場合、使用溶媒

を用いて採取量の確認を行う。

- (5) 誤差を防ぐため、マイクロピペットでの採取量は100 μ L以上にし、調製時の希釈倍率は100倍以内にします。

謝 辞

本研究は「令和2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) 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) 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.
- 3) 小泉義彦. 水質検査における外部精度管理 (2017 年度) -ベンゼン-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2019; 3: 75-82.
- 4) 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.
- 5) 小泉義彦. 水質検査における外部精度管理 (2018 年度) -テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレン-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2020; 4: 82-92.
- 6) 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.
- 7) 吉田仁, 安達史恵. 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-. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2021; 5:59-65
- 8) 上水試験方法 IV. 有機物編 2011 年版. 日本水道協会; 2011. 135-140.
- 9) 厚生労働省 HP. 水質基準の見直しにおける検討概要.
<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/sui>

[do/kijun/dl/k39.pdf](https://www.mhlw.go.jp/kijun/dl/k39.pdf)

- 10) 水道水質ハンドブック. 日本水道新聞社; 1994. 64-66
 - 11) 日本界面活性剤工業会 HP. 界面活性剤工業の歩みと現状.
<https://jp-surfactant.jp/surfactant/history/index.html>
 - 12) 上水試験方法 VII. 資料編 2011 年版. 日本水道協会; 2011. 88-90.
 - 13) 厚生労働省. 「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」(平成 15 年 7 月 22 日付け厚生労働省告示第 261 号〔最終改正 令和 2 年 3 月 25 日厚生労働省告示 95 号〕).
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000922364.pdf>
 - 14) JIS Z8402-2. 測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度) -第 2 部: 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的方法. 日本規格協会; 1999. 7-27.
 - 15) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験 (1). 環境と測定技術 2000; 27(2): 51-56.
 - 16) 厚生労働省. 「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について」水質基準項目の測定精度 (平成 15 年 10 月 10 日健水発第 1010001 号〔最終改正 令和 3 年 3 月 26 日〕) 厚生労働省健康局水道課長通知 別添 5.
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000615932.pdf>
 - 17) 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について」(平成 24 年 9 月 6 日付け健水発 0906 第 1~4 号〔最終改正 平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 第 1~4 号〕).
https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000181618_2.pdf
- WEB サイトの内容は 2021 年 7 月 30 日に確認した。

Results of external quality control for the analytical method for the measurement of anionic surfactant in tap water, performed in Osaka Prefecture in 2020

Fumie ADACHI^a and Takae NAKAJIMA^b

In order to improve the accuracy of water quality measurements, we implemented external quality control for the analytical method for the measurement of anionic surfactant in tap water with water supply utilities, public health centers and public research institutes in Osaka Prefecture. As a result, 1 of 16 examination values was evaluated as an outlier. Therefore, we executed a follow-up survey for this utility. The result suggested that the process of preparing the standard solution affected the test value.

Key words : tap water, external quality, anionic surfactant, follow-up survey

^a Osaka Institute of Public Health

^b former researcher at Osaka Institute of Public Health

水質検査における定量精度に影響を及ぼす因子の解明（2021 年度）

—大阪府建築物飲料水水質検査業—

長谷川有紀^a, 中島孝江^b, 小泉義彦^a

当所では、大阪府知事登録を受けている「建築物飲料水水質検査業」の事業者に向けて、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として、外部精度管理を実施している。2021 年度は対象項目として、「シアン化物イオン及び塩化シアン」および「クロロホルム」を選定した。参加機関数は、シアン化物イオン及び塩化シアンでは 13 機関、クロロホルムでは 16 機関であった。各参加機関から報告された検査値を「真値」に対する誤差率および Z スコアの 2 つの方法で評価をした。その結果、シアン化物イオン及び塩化シアンにおいては 1 機関、クロロホルムにおいても 1 機関が外れ値となった。外れ値となった機関に対して、フォローアップ調査を行ったところ、コンタミネーションに注意し、告示法および妥当性評価ガイドラインに準拠した濃度範囲および検量点数の検量線を作成すること、標準液の調製時において適切な器具を使用することが重要であることがわかった。

キーワード：水道水、シアン化物イオン及び塩化シアン、クロロホルム、外部精度管理、建築物飲料水水質検査業

当所では、2015 年度より一般社団法人 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いる¹⁻⁶⁾。目的は、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であり、「建築物における衛生的環境の確保に関する法律」第 12 条の 2 第 1 項に規定の「建築物飲料水水質検査業」の大阪府知事登録を受けている事業者を対象としている。2021 年度は対象項目として、「シアン化物イオン及び塩化シアン」および「クロロホルム」を選定した。

シアン化物イオン及び塩化シアンは、水道水中にはほとんど含まれていないが、メッキ工場、選鉱精錬所などからの排水流入によって含まれることがある⁷⁾。塩化シアンは、塩素処理をすると生成され、さらにアンモニウムイオン、有機前駆体と残留塩素の反応によって生成される⁷⁾。通常の浄水方法（塩素による酸化処理）のほか、逆浸透、イオン交換膜により除去が可能である⁷⁾。毒性評価において、ラットでの試験（National Toxicology Program (1993)）

のシアンとしての無毒性量 4.5 mg/kg/day を用い、耐容 1 日摂取量 4.5 µg/kg/day が求められ、飲料水に対する寄与率を 10%、体重 50 kg のヒトが 1 日 2 L 飲むと仮定して、シアンの評価値は 0.01 mg/L と算出されている⁷⁾。

クロロホルムは、医薬品、溶剤、有機合成の原料などとして用いられる⁸⁾。水道水中のクロロホルムは、水中のフミン質等の有機物質と消毒剤の塩素が反応して生成される、トリハロメタンの主要構成物質である⁹⁾。浄水処理において、クロロホルムはエアレーションにより除去可能である。また、その前駆物質は、凝集沈殿およびろ過、膜ろ過、オゾン処理、活性炭処理等により除去される⁹⁾。毒性について、クロロホルムは International Agency for Research on Cancer (IARC) により、Group2B（ヒトに対する発がん性があるかもしれない）に分類されている¹⁰⁾。水道水質基準値は、TDI=12.9 µg/kg/day に対する飲料水の寄与率を 20%とし、体重 50kg のヒトが 1 日 2L 飲むと仮定

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課 元研究員

して、0.06 mg/L 以下と定められている⁸⁾。

方 法

1. 参加機関

(1) シアン化物イオン及び塩化シアン

本外部精度管理に 13 機関が参加した。

(2) クロロホルム

本外部精度管理に 16 機関が参加した。

2. 実施方法

(1) 精度管理試料の調製方法

① シアン化物イオン及び塩化シアン

シアン化カリウム（富士フイルム和光純薬：試薬特級、ロット番号 AWP6748）2.51g を精製水に溶かしてシアン化物イオン標準原液（980 mg/L）を調製した。さらに、試料調製用にシアン混合標準液（シアン化物イオン 0.196 mg/L、塩化シアン 0.098 mg/L）を調製した。シアン化物イオン標準原液およびシアン混合標準液の調製方法は、「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 4 年 3 月 31 日厚生労働省告示第 134 号〕）⁹⁾（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（別表第 12）に準拠した。

2021 年 9 月 27 日に精製水約 16 L をポリタンクに採水し、そこにリン酸緩衝液（1 mol/L）を 160 mL 添加し攪拌した。ポリタンクから 1 L 採水した後、シアン混合標準液を 300 mL 採り、ポリタンクに添加して攪拌した後、250 mL のガラス製瓶に満水となるように分注した（設定濃度：シアン化物イオン 0.00380 mg/L、塩化シアン 0.00190 mg/L）。

② クロロホルム

2021 年 9 月 27 日にステンレス製タンクに精製水約 60 L を採水し、塩酸（和光純薬工業：有害金属測定用）27 mL およびクロロホルム標準液（富士フイルム和光純薬：水質試験用 1000 mg/L、保証期限 2023 年 10 月末、ロット番号 ESG1079）を 1.8 mL 添加し、攪拌した。500 mL ガラス製瓶に分注した（設定濃度：0.0300 mg/L）ものを精度管理試料とした。

精度管理試料は、2021 年 9 月 28 日に各参加機関にチルド便にて送付した。

(2) 精度管理試料の均一性及び安定性

「シアン化物イオン及び塩化シアン」および「ク

ロロホルム」の測定方法は、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（別表第 12）およびパージ・トラップーガスクロマトグラフィー質量分析計による一斉分析法（別表第 14）を用いた¹¹⁾。精度管理試料の対象物質濃度の均一性の確認をするため、精度管理試料を分注順に等間隔で 5 本抜き取り、試料 1 本につき 2 回測定を行った。また、安定性を確認するため、試料 1 本につき 5 回測定した。測定日は、シアン化物イオン及び塩化シアンについては配付日、配付後 1、2、5、9、15 日目、クロロホルムについては配付日、配付後 2、5、7、14 日目とした。

(3) 参加機関による精度管理試料の検査方法

シアン化物イオン及び塩化シアンについては、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-PC 法）（別表第 12）とした¹¹⁾。クロロホルムについては、告示法のパージ・トラップーガスクロマトグラフィー質量分析計による一斉分析法（PT 法）（別表第 14）、ヘッドスペースーガスクロマトグラフィー質量分析計による一斉分析法（HS 法）（別表第 15）とした¹¹⁾。

1 試料について 5 回測定した値を平均し、有効数字 3 桁としたものを検査値とした。「外部精度管理検査結果報告書」に検査値および測定条件等の記入、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。

(4) 評価の検証方法およびフォローアップ

各参加機関から報告された検査値の評価を行った。参加機関が報告した検査値（n=5）の変動係数は、シアン化物イオン及び塩化シアンについては 10%、クロロホルムについては 20% を許容範囲とし、許容範囲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、検査値を「真値」に対する誤差率（誤差率）および Z スコアの 2 つの方法で評価をした。

「真値」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¹²⁾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たものである。誤差率は、(a) の式から算出し、真値に対してシアン化物イオン及び塩化シアンは±10% 以内、クロロホルムは±20% 以内を許容範囲とした。

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

Z スコアは、四分位数法¹³⁾で算出し、絶対値 3 未満を許容範囲とした。

誤差率およびZスコアの2つの方法を用いて、2つとも許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価した。評価の対象外および外れ値となった機関については、報告書及び分析チャート等から原因を追究し、ヒアリングの実施、再測定の実施等によりフォローアップ調査を行った。

結 果 お よ び 考 察

1. 精度管理試料の均一性及び安定性

(1) 均一性

精度管理試料を調製した日に、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回測定を行った。その測定結果を元に一元配置分散分析を行ったところ、試料間の変動はp値が0.05以上で有意とはならず（シアン化物イオン：p=0.07、塩化シアン：p=0.14、シアン化物イオン及び塩化シアン：p=0.11、クロロホルム：p=0.28）均一性に問題ないことを確認した。標準液添加前の精製水に存在するシアン化物イオン及び塩化シアンは、いずれも定量下限値0.0005 mg/L未満であり、試料調製用の精製水として問題ないと判断した。また、クロロホルムも定量下限値0.0001 mg/L未満であり、試料調製用の精製水として問題ないことを確認した。

(2) 安定性

シアン化物イオン及び塩化シアンでは試料配布後15日目までの6回分、クロロホルムでは試料配布後14日目までの5回分、試料1本につき5回測定をおこなった。5回の測定値を平均し、その平均値から近似直線および変動係数を求めた（図1、図2）。シアン化物イオン及び塩化シアン、クロロホルムにおける近似直線の傾きは、ほぼ0となり、精度管理試料の安定性に問題ないと判断した。変動係数についてもシアン化物イオンが0.48%、塩化シアンが2.53%、シアン化物イオン及び塩化シアンが1.05%であったため、安定性に問題ないことが確認された。また、クロロホルムにおいて、変動係数は1.51%であったため、安定性に問題ないことが確認された。

2. 参加機関の分析方法

① シアン化物イオン及び塩化シアン

参加した13機関全てがIC-PC法を用いていた。

② クロロホルム

参加した16機関のうち5機関がPT法、11機関

がHS法を用いていた。

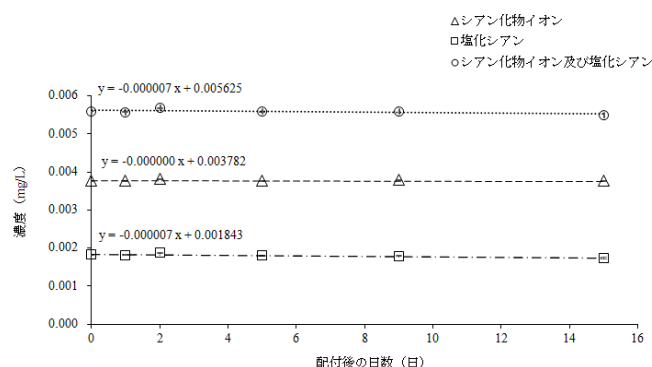


図1 シアン化物イオン及び塩化シアンの安定

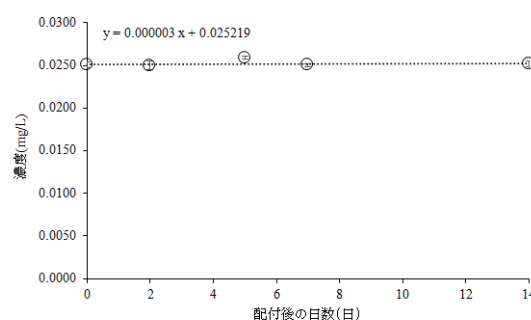


図2 クロロホルムの安定性

3. 外部精度管理結果の検証

(1) 誤差率、Zスコア及び「外れ値」

① シアン化物イオン

各参加機関のシアン化物イオンの検査値、変動係数、誤差率およびZスコアを表1に示す。変動係数が10%を超えた機関は1機関（A-1）存在し、評価の対象外とした。1機関を除いた12機関の検査値を用いて、Grubbsの棄却検定により棄却された機関は存在しなかった。次に、12検査値を用いて、真値、誤差率およびZスコアの評価を行った。真値は、0.00386 mg/Lとなり、誤差率の範囲は-14.85～17.61%、Zスコアの範囲は、-1.79～2.72であった。誤差率の許容範囲を超えた機関は4機関（A-2、A-5、A-11、A-13）、Zスコアの許容範囲を超えた機関は存在しなかった。

上記の結果より、評価の対象外となったのは1機関（A-1）であり、外れ値に該当する機関は存在しなかった。

② 塩化シアン

各参加機関の塩化シアンの検査値、変動係数、誤差率およびZスコアを表2に示す。変動係数が10%を超えた機関は存在しなかった。13機関の検査値

を用いて、真値、誤差率および Z スコアの評価を行った。真値は、Grubbs の棄却検定により棄却された 1 機関 (A-1) を除いて算出され、0.00178 mg/L となった。誤差率の範囲は-20.64~68.49%、Z スコアの範囲は、-1.65~4.92 であった。誤差率の許容範囲を超えた機関は 5 機関 (A-1、A-3、A-4、A-9、A-12)、Z スコアの許容範囲を超えた機関は 1 機関 (A-1) であった。

上記の結果より、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」に該当したのは 1 機関 (A-1) であった。

③ シアン化物イオン及び塩化シアン

各参加機関のシアン化物イオン及び塩化シアンの検査値、変動係数、誤差率および Z スコアを表 3 に示す。シアン化物イオンにおいて評価の対象外であった機関 A-1 を評価の対象外とし、12 機関の検査値を用いて評価を行った。1 機関を除いた 12 機関の検査値を用いて、真値、誤差率および Z スコアの評価を行った。Grubbs の棄却検定により棄却された機関は存在しなかった。真値は、0.00564 mg/L となり、誤差率の範囲は-13.17~14.50%、Z スコアの範囲は、-1.52~1.74 であった。誤差率の許容範囲を超えた機関は 2 機関 (A-2、A-13)、Z スコアの許容範囲を超えた機関は存在しなかった。

上記の結果より、1 機関 (A-1) が評価の対象外となった。また、誤差率および Z スコアの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に該当する機関は存在しなかった。よって、機関 A-1 に対してフォローアップ調査を行った。

④ クロロホルム

各参加機関のクロロホルムの検査値、変動係数、誤差率および Z スコアを表 4 に示す。変動係数が 20%を超えた機関は存在しなかった。16 機関の検査値を用いて、真値、誤差率および Z スコアの評価を行った。真値は、Grubbs の棄却検定により棄却された 1 機関 (B-16) を除いて算出し、0.0267 mg/L となった。誤差率の範囲は-21.98~292.35%、Z スコアの範囲は、-2.49~30.32 であった。誤差率の許容範囲を超えた機関は 3 機関 (B-1、B-15、B-16)、Z スコアの許容範囲を超えた機関は 1 機関 (B-16) であった。

上記の結果より、誤差率と 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 (B-16) であった。外れ値となった機関 B-16 に対して、フォローアップ調査を行った。

表 1. 各参加機関から報告されたシアン化物イオンの検査値の概要

機関番号	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する誤差率(%)	Z スコア
A-1 [#]	0.000703	26.31	-	-
A-2*	0.00328	2.07	-14.85	-1.79
A-5*	0.00340	1.71	-11.89	-1.38
A-6	0.00366	0.15	-5.20	-0.45
A-9	0.00367	2.09	-4.74	-0.39
A-3	0.00371	1.07	-3.85	-0.27
A-7	0.00376	0.73	-2.51	-0.08
A-4	0.00380	0.61	-1.37	0.08
A-8	0.00388	1.53	0.71	0.37
A-12	0.00404	0.64	4.86	0.94
A-10	0.00404	3.12	4.86	0.94
A-11*	0.00449	2.35	16.37	2.54
A-13*	0.00454	0.30	17.61	2.72
平均値	0.00361			
最大値	0.00454			
最小値	0.000703			
標準偏差	0.00095			
変動係数 (%)	26.2			
n	13			

真値：0.00386 mg/L (評価の対象外の機関を除いた平均)

#：変動係数が 10%を超えたため、評価の対象外となった機関

*：真値に対する誤差率が±10%を超えた機関

表 2. 各参加機関から報告された塩化シアンの検査値の概要

機関番号	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する誤差率(%)	Z スコア
A-3*	0.00141	3.11	-20.64	-1.65
A-4*	0.00153	0.80	-14.13	-1.17
A-11	0.00160	0.84	-9.97	-0.86
A-2	0.00161	0.81	-9.52	-0.83
A-6	0.00177	1.26	-0.65	-0.17
A-8	0.00179	0.61	0.58	-0.08
A-7	0.00181	0.99	1.70	0.00
A-10	0.00190	7.23	6.53	0.36
A-13	0.00192	2.05	7.76	0.45
A-5	0.00194	5.35	8.77	0.52
A-9*	0.00203	1.92	13.83	0.89
A-12*	0.00206	1.26	15.73	1.03
A-1***	0.00300	5.15	68.49	4.92
平均値	0.00188			
最大値	0.00300			
最小値	0.00141			
標準偏差	0.00039			
変動係数 (%)	20.8			
n	13			

真値：0.00178 mg/L (Grubbs 棄却検定で棄却された機関を除いた平均)

*：Grubbs 棄却検定で棄却された機関

*：真値に対する誤差率が±10%を超えた機関

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

表 3. 各参加機関から報告されたシアン化物イオン及び
塩化シアンを検査値の概要

機関番号	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率(%)	Z スコア
A-1 [#]	0.00371	6.30	-	-
A-2*	0.00490	1.30	-13.17	-1.52
A-3	0.00512	1.34	-9.16	-1.05
A-4	0.00533	0.62	-5.40	-0.61
A-5	0.00534	1.73	-5.36	-0.60
A-6	0.00543	0.40	-3.77	-0.41
A-7	0.00557	0.64	-1.18	-0.11
A-8	0.00568	1.22	0.67	0.11
A-9	0.00570	1.00	1.13	0.16
A-10	0.00594	4.31	5.39	0.67
A-11	0.00609	1.60	8.05	0.98
A-12	0.00611	0.68	8.29	1.01
A-13*	0.00646	0.55	14.50	1.74
平均値	0.00549	12.5		
最大値	0.00646			
最小値	0.00371			
標準偏差	0.00069			
変動係数 (%)	12.5			
n	13			

真値：0.00564 mg/L（評価の対象外の機関を除いた平均）

#：シアン化物イオンが評価の対象外、塩化シアンが外れ値であったため評価の対象外とした機関

*：真値に対する誤差率が±10%を超えた機関

表 4. 各参加機関から報告されたクロロホルムの検査値の概要

機関番号	検査方法	検査値 (mg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率(%)	Z スコア
B-1 ⁺	HS 法	0.0208	6.08	-21.98	-2.49
B-2	HS 法	0.0222	2.86	-16.88	-1.96
B-3	HS 法	0.0223	3.59	-16.28	-1.90
B-4	PT 法	0.0231	2.74	-13.20	-1.58
B-5	HS 法	0.0257	1.82	-3.75	-0.59
B-6	HS 法	0.0260	1.98	-2.63	-0.47
B-7	PT 法	0.0263	1.57	-1.35	-0.34
B-8	PT 法	0.0267	0.79	0.15	-0.18
B-9	HS 法	0.0276	1.19	3.68	0.18
B-10	HS 法	0.0279	2.34	4.73	0.29
B-11	HS 法	0.0280	2.34	4.88	0.31
B-12	PT 法	0.0280	1.95	4.95	0.32
B-13	PT 法	0.0300	1.49	12.38	1.09
B-14	HS 法	0.0317	3.96	18.75	1.76
B-15*	HS 法	0.0337	10.13	26.56	2.57
B-16 ⁺ **	HS 法	0.105	2.30	292.35	30.32
平均値	0.0315				
最大値					
最小値					
標準偏差					
変動係数 (%)					
n					

真値：0.0267mg/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）

(2) フォローアップ調査

① シアン化物イオン及び塩化シアン

機関 A-1 の検査値は、シアン化物イオンが 0.000703 mg/L、塩化シアンが 0.00300 mg/L、シアン化物イオン及び塩化シアンが 0.00371 mg/L であった。

シアン化物イオンの検査値が真値と比べて非常に低く、塩化シアンの誤差率は 68.49% と高かった。シアン化物イオン及び塩化シアンの濃度に対する塩化シアンの濃度の比率を計算すると、機関 A-1（81%）以外は約 30% であった。また、塩化シアンにおいて、機関 A-1 は 13 機関のうち最大であった。これらの結果は、機関 A-1 のシアン化物イオンが塩素化された結果を反映していると考えられた。この原因として、前処理過程で塩素化剤が試料へ混入したことにより、シアン化物イオンが塩化シアンになったためであると推測された。機関 A-1 は、標準原液および検量線の作成に改善すべき点があったが、まず試料への混入がないように測定をできるようにすることを優先し、外れ値の原因を究明することとした。塩素化剤が試料に混入する可能性があるのは、試料を測定用バイアルに入れる時であると仮定した。そこで、機関 A-1 には、バイアルを精製水でよく洗浄した後乾燥してから使用し、操作中の塩素化剤のコンタミネーションに注意して再測定を行うよう依頼した。再測定する試料は新たに当所で調製し、機関 A-1 および当所において同日に測定した。再測定の結果、シアン化物イオン、塩化シアン、シアン化物イオン及び塩化シアンの濃度は、0.00410 mg/L、0.00382 mg/L、0.00792 mg/L となり、当所で測定した値（0.00318 mg/L、0.00301 mg/L、0.00619 mg/L）を真値と仮定した場合、誤差率はそれぞれ 28.93%、26.91%、27.95% であった。シアン化物イオンは評価の対象外とならず、塩化シアンの誤差率は小さくなり、塩素化剤の混入は疑われる結果とはならず、改善が認められた。しかし、誤差率はいずれも 10% を超えているため、さらに改善が必要と考えられた。

そこで、次の 5 点についての変更および再々測定を依頼した。（Ⅰ）原体から自己調製した標準原液の濃度を測定せずに使用していたため、当所で使用していた濃度測定済みの標準原液を使用、（Ⅱ）標準溶液調製用の容器をバイアルから 100 mL メスフラスコに変更、（Ⅲ）計量器をマイクロピペットからホールピペットに変更、（Ⅳ）検量線の検量点を

3 点から 4 点に変更、(V) 検量点濃度間の公比を最大 16.75 から 4 以内に變更、とした。上記の 5 点を変更した方法で、機関 A-1 が行った再々測定の結果、シアン化物イオン、塩化シアン、シアン化物イオン及び塩化シアンの濃度は、0.00368 mg/L、0.00343 mg/L、0.00711 mg/L となり、同日に当所で測定した値 (0.00319 mg/L、0.00290 mg/L、0.00609 mg/L) を真値と仮定した場合、誤差率はそれぞれ 15.36%、18.28%、16.75%であった。誤差率は、再測定の結果より改善した。

今回のフォローアップでは、塩素化剤の混入に注意して操作することが、より良い検査結果を得るために重要であることが確認された。注意点として、器具を十分に洗浄することおよび塩素化剤と試料の取り扱う場所と時間を分けることが有効であると考えられる。また、適切な標準原液を使用すること、標準液を正確に調製すること、検量点数は 4 点以上とすること、告示法に準拠した適切な検量線を作成することが、より良い検査結果を得るために重要である。

② クロロホルム

機関 B-16 は、HS 法を用いており、検査値は 0.105 mg/L、誤差率は 292.35%、Z スコアは 30.32 であった。

当所において、機関 B-16 が提出した資料を精査したところ、検量線の最大濃度が告示法の濃度範囲 (0.0001~0.1 mg/L) より 10 倍高く、検量点数が 0 mg/L を除いて 4 点未満であり、検量線の各濃度点の公比が 4 以内ではなかった。さらに、標準原液の希釈時にバイアルを用いて定容していたことが原因であると考えられた。そこで、再測定における注意点として、(I) 検量線の濃度を告示法の濃度範囲内にする、(II) 検量点数は 0 mg/L を含めずに 4 点以上とする、(III) 検量線の各濃度点の公比を 4 以内にする、(IV) 標準原液の定容はホールピペットおよびメスフラスコを用いることを、機関 B-16 に依頼した。再測定用試料は、当所で新たに調製した。機関 B-16 の再測定日と同日に、当所でも測定を実施した。その結果、クロロホルムの濃度は 0.0324 mg/L、当所で測定した値 (0.0376 mg/L) を真値と仮定した場合、誤差率は-13.78%となり、再測定によって改善が認められた。

フォローアップにおいて、告示法および水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン¹⁴⁾ (妥当性評価ガイドライン) に準拠した濃度範囲および検量点

数の検量線を作成すること、標準液の調製時において適切な器具を使用することが重要であることが確認された。

4. 全体的な留意点

(1) SOP および妥当性評価

① シアン化物イオン及び塩化シアン

SOP の不備について、次のとおり確認された。

- ・精製水を含む試薬類および器具・装置の規格等の記載が不十分な機関：12 機関
- ・試料の採取および保存に関する記載がなかった、あるいは不十分な機関：6 機関
- ・試験開始までの時間が記載されていなかった機関：3 機関
- ・試料の前処理について記載がなかった、あるいは不十分な機関：6 機関
- ・試料保存用緩衝液は 2010 年にリン酸緩衝液に変更されたが、変更前の酒石酸ナトリウム緩衝液を使用していた機関：1 機関
- ・標準液の調製方法はすべての機関が記載していたが、調製時の冷却や反応時間等が不十分な機関：8 機関
- ・検量線の濃度と点数について、点数及び濃度が不適切な機関：1 機関
- ・空試験に関する記載がなかった、あるいは不十分な機関：8 機関
- ・連続試験を実施する場合の措置に関する記載がなかった機関：1 機関
- ・濃度計算において、試料に添加するリン酸緩衝液による濃度補正について記載していなかった機関：8 機関
- ・定量下限値についての記載がなかった機関：5 機関

妥当性評価については、検量線の妥当性評価を実施していなかった機関が 4 機関、添加試料の妥当性評価を実施していなかった機関が 6 機関、水道水での添加試料の妥当性評価を実施していなかった機関が 1 機関存在した。

② クロロホルム

SOP の不備について、次のとおり確認された。

- ・フロー図のみ等で SOP の体をなしていない未整備の機関：3 機関
- ・試薬のメーカー名、規格等の記載がなかった、あるいは不十分な機関：8 機関
- ・精製水について製造に使用した装置名、製品名も

しくは規格等の記載がなかった、あるいは不十分な機関：13 機関

- ・試料の採取及び保存について記載がなかった、あるいは不十分な機関：8 機関
 - ・試験開始までの時間が 24 時間以内と記載していなかった機関：1 機関
 - ・空試験について記載がなかった、あるいは不十分な機関：7 機関
 - ・連続試験を実施する場合の措置について記載がなかった、あるいは記載に不備があった機関：4 機関
 - ・定量下限値について記載がなかった機関：8 機関
- 妥当性評価において、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 9 機関存在した。

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 通りに行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。妥当性評価は、SOP に従って行い、自社の検査法の精度を客観的に評価できるものであるため、検査結果の信頼性に繋がるものである。未実施の機関においては、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

① シアン化物イオン及び塩化シアン

告示法では検査開始までの時間は 24 時間以内と定められている¹¹⁾が、3 機関が 24 時間を超えて検査を開始していた。

② クロロホルム

告示法では検査開始までの時間は 24 時間以内と定められている¹¹⁾が、3 機関が 24 時間を超えて検査を開始していた。3 機関のうち 1 機関が、シアン化物イオン及び塩化シアンにおいて検査開始時間が遅れた機関と同じ機関であった。

24 時間を超えて検査をした機関は、通常業務の都合により、24 時間以内に開始できなかった可能性が考えられる。しかし、通常の検査において、速やかに分析できない場合は告示法に従い、冷暗所に保存し、24 時間以内に前処理しなければならない。また、SOP に検査開始までの時間を明記し、それに従って検査をする必要がある。

(3) 検量線

告示法では、シアン化物イオン及び塩化シアン、およびクロロホルムの濃度範囲は、0.001～0.1 mg/L および 0.0001～0.1 mg/L である¹¹⁾。告示法および

妥当性評価ガイドラインにおいて、検量線はそれぞれの濃度範囲内で、ブランク試料を含めず 4 点以上の標準液を用いて作成するように記載されている^{11) 14)}。また、検量線の各濃度点の公比を原則 4 以内としている¹⁴⁾。

① シアン化物イオン及び塩化シアン

すべての機関において、検量線が濃度範囲を逸脱することなく、検量線の範囲外で測定した機関もなかった。

改善が必要な内容とその機関数は次のとおりであった。

- ・原点を強制的に通過させていた機関：1 機関
- ・0 mg/L を検量点としていた機関：1 機関
- ・0 mg/L を除いた検量点数が 4 点未満だった機関：1 機関
- ・検量点の公比が 4 以内でなかった機関：1 機関

② クロロホルム

すべての機関において、検量線を強制的に原点通過させている機関はなかった。

改善が必要な内容とその機関数は次のとおりであった。

- ・検量点に 0 mg/L を使用していた機関：1 機関
- ・検量線の範囲が告示の濃度範囲から逸脱していた機関：1 機関
- ・検量点数が告示と異なる（4 点未満）機関：1 機関
- ・検量点間の公比が 4 以内ではなかった機関：1 機関

(4) 前処理

① シアン化物イオン及び塩化シアン

告示法では、「検水をメンブランフィルターろ過装置でろ過し、初めのろ液約 10ml は捨て、次のろ液を試験溶液とする。」と記載されている¹¹⁾。また、メンブランフィルターの孔径は、約 0.2 μm と規定されている¹¹⁾。3 機関がメンブランフィルターでろ過していなかったため、改善が必要である。

② クロロホルム

告示法において、PT 法による測定では「検水をパージ容器に採り、内部標準液を試験溶液の内部標準物質濃度がフルオロベンゼン又は 4-ブロモフルオロベンゼンがおおむね 0.005～0.5 mg/L 及び 1,4-ジオキサン-d8 がおおむね 0.004～0.4 mg/L となるよう一定量注入する。」と記載されている¹¹⁾。PT 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。

HS 法では、告示法において「バイアルに塩化ナトリウムを検水量 10 mL に対して 3g を入れた後、検水をバイアル容量に対して 0.40～0.85 となるように採り、内部標準液を試験溶液の内部標準物質濃度がフルオロベンゼン又は 4-ブロモフルオロベンゼンがおおむね 0.0025～0.25 mg/L 及び 1,4-ジオキサン-d8 がおおむね 0.002～0.2 mg/L となるよう一定量注入する。直ちにポリテトラフルオロエチレンシート、セプタム、アルミキャップをのせ、アルミキャップ締め器で密閉する。次いで、バイアルを振り混ぜた後、恒温槽で 30 分間以上加温し、これを試験溶液とする。」と記載されている¹¹⁾。加温時間が 30 分未満であった機関が 2 機関、加温条件の記載がなかった機関が 1 機関存在した。加温は、告示法を遵守した上で検査をする必要がある。

(5) 空試験

① シアン化物イオン及び塩化シアン

告示法では精製水 100 mL につきリン酸緩衝液 (1 mol/L) を 1 mL 加え、検水と同様の方法により空試験を実施することとなっている¹¹⁾。また、その値が検量線の濃度範囲の下限値を下回ることを確認する必要がある¹¹⁾。空試験が未実施の機関はなく、すべての機関が検量線の下限値を下回ることを確認した。

② クロロホルム

告示法では、精製水を検水と同様の方法により空試験を実施することとなっており、検量線の濃度範囲の下限値を下回ることを確認する必要がある¹¹⁾。参加機関の中で、空試験を実施していなかった機関は存在しなかった。しかし、空試験が検量線の下限値未満であることを確認できなかった機関が 1 機関存在した。空試験は告示法において必要となる試験のため、今後の検査においても必ず実施する必要がある。

(6) 標準液

告示法では、標準原液、標準液または混合標準液は原体から自己調製したもの、もしくは計量法 (平成 4 年法律第 51 号) 第 136 条若しくは第 144 条の規定に基づく証明書又はこれらに相当する証明書が添付され、かつ、告示法の標準原液と同濃度のもの又は告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものの使用が認められている。なお、告示法の標準液若しくは混合標準液と同濃度のものは開封後速やかに使用することとし、開封後保存したものを使用してはならない¹¹⁾。

① シアン化物イオン及び塩化シアン

本精度管理では、原体から標準原液を調製した機関が 2 機関であった。そのうちの 1 機関はシアン化物イオン濃度の測定を実施しておらず、他の 1 機関は濃度測定の時期が 1 年以上前であった。標準原液を自己調製する場合、使用時に滴定による濃度測定を実施する必要がある。また、市販の標準原液を使用した機関は 11 機関であったが、1 機関が値付け証明書の付いていないものを使用していた。市販の標準原液を使用する場合は値付け証明書が付いている必要がある。シアン混合標準液を使用していた機関は 2 機関であった。

② クロロホルム

参加した全機関が、市販品の標準原液を使用していた。市販標準原液を 1 回限りの使用にしていなかった機関が 2 機関存在した。告示法と同じ標準原液の濃度のものは除き、市販標準原液を開封後に保存したものを使用してはいけないため、1 回限りの使用にすることが必要である。さらに、標準液を都度調製していなかった機関が 1 機関、値付け証明書がついていなかった機関が 2 機関存在した。標準液は、使用の都度調製する必要がある、市販の標準原液を使用する場合は値付け証明書が付いている必要がある。

(7) 内部標準液

クロロホルム測定時の PT 法及び HS 法ではどちらも内部標準物質を用いることとなっている。告示法では、「内部標準原液をメチルアルコールで 4～400 倍に薄めたもの。この溶液は、使用の都度調製する。」と記載されている¹¹⁾。内部標準物質を使用していなかった機関が 1 機関、内部標準液を都度調製していなかった機関が 2 機関存在した。告示法通り、内部標準物質を使用し、使用の都度調製する必要がある。

ま と め

2021 年度において、大阪府知事登録を受けている建築物飲料水水質検査業の事業者を対象とした外部精度管理を実施した。対象項目は、「シアン化物イオン及び塩化シアン」および「クロロホルム」とした。参加機関から報告された検査結果を「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。

1. シアン化物イオン及び塩化シアン

本外部精度管理に 13 機関が参加した。シアン化物イオンにおいて変動係数が 10%を超えていたため、1 機関 (A-1) を評価の対象外とした。1 機関 (A-1) を除いた 12 機関の検査値を用いて、Grubbs の棄却検定により棄却された検査値はなかった。12 機関の検査値を平均した真値は、0.00564 mg/L となり、誤差率の範囲は-13.17~14.50%、Z スコアの範囲は、-1.52~1.74 であった。誤差率の許容範囲を超えた機関は 2 機関、Z スコアの許容範囲を超えた機関は存在しなかった。外れ値となった機関は存在せず、評価の対象外となったのは機関 A-1 であった。機関 A-1 に対して、外れ値の原因究明を行った結果、検査精度を向上するうえで次の留意点が考えられた。

- 1) 塩素化剤の混入に注意して操作する。
- 2) 適切な標準原液を使用する。
- 3) 標準液を正確に調製する。
- 4) 告示法に準拠した検量線濃度範囲内で検量点数は 4 点以上、公比 4 以内など適切な検量線を作成する。
- 5) 告示法に準拠した SOP を整備する。
- 6) 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。
- 7) 妥当性評価の試験を実施する。

2. クロロホルム

本外部精度管理に 16 機関が参加した。変動係数が 20%を超えた機関は存在しなかったが、Grubbs の棄却検定により 1 機関 (B-16) が棄却された。1 機関 (B-16) を除いた 15 機関の検査値を用いて真値を算出したところ、0.0267 mg/L となった。誤差率の範囲は-21.98~292.35%、Z スコアの範囲は、-2.49~30.32 であった。誤差率の許容範囲を超えた機関は 3 機関、Z スコアの許容範囲を超えた機関は 1 機関であった。外れ値となった機関 B-16 に対して、外れ値の原因究明を行った結果、検査精度を向上するうえで次の留意点が考えられた。

- 1) 適切な濃度範囲および検量点数の検量線を作成する。
- 2) 標準液の調製時において、適切な器具を使用する。
- 3) 告示法に準拠した SOP を整備する。
- 4) 検量線の調製および前処理方法は告示法を遵守し、SOP から逸脱しないようにする。

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。研究実施にあたりご協力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) 吉田仁, 中島孝江, 長谷川有紀, 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 (2020 年度) —大阪府建築物飲料水水質検査業 (臭素酸) —. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2021; 5: 66-72.
- 6) 長谷川有紀, 吉田仁, 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 (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) —. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 2021; 5: 73-79.

- 7) 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/k09.pdf>
- 8) 日本水道協会. 水道用語辞典 (第2版). 日本水道協会; 2003 年. 216.
- 9) 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/k22.pdf>
- 10) 日本水道協会. 上水試験方法 2020 年版I.総説・資料編. 日本水道協会; 2021. 231.
- 11) 厚生労働省. 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法 (平成 15 年 7 月 22 日厚生労働省告示第 261 号[最終改正令和 4 年 3 月 31 日厚生労働省告示第 134 号]). <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000922364.pdf>
- 12) 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方法). 日本規格協会; 1999. 309-310.
- 13) 藤井賢三. 試験所認定制度における技能試験 (1). 環境と測定技術 2000; 27: 51-56.
- 14) 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

WEB サイトの内容は 2022 年 6 月 6 日に確認した。

**Elucidation of factors affecting quantitative accuracy in water quality measurements,
performed in Osaka Prefecture in 2021**

Yuki HASEGAWA^a, Takae NAKAJIMA^b and Yoshihiko KOIZUMI^a

We conducted external quality control as commissioned research from the Osaka Building Maintenance Association. This external quality control was carried out for the purpose of suggesting improvements to the analytical method and extracting factors that affect the quantitative accuracy in water quality measurements. In 2021, cyanide ion and cyanogen chloride and chloroform were selected as object substances. The test values of each participating institution were evaluated by two methods: the error rate and the Z score. The two institutions exceeded the error rate of $\pm 20\%$, and was out of the Z score (≥ 3). This suggests the importance of paying attentions to contamination, and to creating a calibration curve in accordance with the adequacy evaluation guidelines, and notification law.

Key words : tap water, cyanide ion and cyanogen chloride, chloroform, external quality control

a Osaka Institute of Public Health

b former researcher at Osaka Institute of Public Health

大阪府における環境および食品中放射能調査（令和 3 年度報告）

小泉義彦^a, 肥塚利江^a, 大山正幸^a, 小池真生子^a, 山口進康^a

令和 3 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 3 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、ガンマ線核種分析、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}Cs)、セシウム 137 (^{137}Cs)、ヨウ素 131 (^{131}I)、カリウム 40 (^{40}K) 等]を行い、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 5 検体について、精度管理（標準試料法による分析比較）を行った。

本報告では、令和 3 年度に実施した上記の放射能調査結果を、過去の測定結果との比較も含め報告する。

実 験 方 法

試料の採取、処理および測定は、「環境放射能水準調査委託実施計画書（令和 3 年度）」に基づいて

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

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 cm²)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(U_3O_8 : 日本アイソトープ協会製、35.3 dps)を用いた。測定は試料採取から 6 時間後に行った。測定時間は、比較試料 5 分、降水試料 30 分とした。

2. ガンマ線核種分析

(1) 測定試料

① 大気浮遊じん：当所本館北側駐車場に設置したハイボリウム・エアサンプラー(柴田科学株式会社製、HV-1000R)を用いて、ろ紙(東洋濾紙、HE-40T)

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	84
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	雨水・ちり	大阪市東成区 当所本館南側屋上	毎月	12
	上水	原水 蛇口水	守口市大庭町 大阪府庭窪浄水場 大阪市東成区 当所本館1F	年1回(令和3年6月) 年1回(令和3年6月)	1 1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(令和3年7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(令和3年7月)	1
	土壌	0～5cm 5～20cm	大阪市中央区 大阪城公園内 大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(令和3年7月) 年1回(令和3年7月)	1 1
	野菜	タマネギ(生産地) キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町 大阪府泉南郡熊取町	年1回(令和3年6月) 年1回(令和3年12月)	1 1
	分析比較試料 (標準試料法)	模擬牛乳	(公財) 日本分析センターで調製	年1回(令和3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3年8月)	3
		粉末試料	(公財) 日本分析センターで調製	年1回(令和3年8月)	1
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	365
			茨木市大住町 茨木保健所	毎日/年間	365
			寝屋川市八坂町 寝屋川保健所	毎日/年間	365
			東大阪市西岩田 東大阪市環境衛生検査センター	毎日/年間	365
			富田林市寿町 富田林保健所	毎日/年間	365
			泉佐野市羽倉崎 市立佐野中学校	毎日/年間	365

上に大気浮遊じんを捕集した。毎月3回、午前10時から翌日の午前10時までの24時間捕集を行った。3ヶ月分のろ紙試料(測定に供した吸引量:約10000m³)をカッターで円形(直径50mm)に切り取り、ポリプロピレン製容器(U-8容器)に詰め測定用試料とした。

② 降下物(雨水・ちり):当所本館南側屋上(地上約15m)に設置した水盤(表面積5000cm²)に降下した雨水およびちりを1ヶ月間採取し、採取した試料全量を、上水自動濃縮装置(柴田理化器械製)を用いて蒸発濃縮させた。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固させた後、残留物をU-8容器に移し測定用試料とした。

③ 上水:原水(淀川河川水)は大阪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メッシュのふるいに通し、U-8容器に移して測定用試料とした(試料採取場所、時期および測定数は表1を参照)。

⑤ 海水、土壌、海底土:海水は2Lをマリネリ容器(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メッシュのふるいに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 精度管理用分析比較試料:(公財)日本分析センターが調製した分析比較試料である「模擬牛乳」(¹³¹I、¹³⁷Csおよび⁴⁰Kを添加したイオン交換水)、「模擬土壌」(ガンマ線放出核種を添加したアルミナ)および「粉末試料」(環境試料をもとに調製した固体試料)について、「模擬牛乳」(1試料)はマリネリ容器(2L容)に容器の標線まで入れ、模擬土壌(U-8容器:3試料)はU-8容器のまま、「粉末

試料」(1 試料)は U-8 容器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付与値と比較し評価を行った。評価は、当所(分析機関)の分析値と付与値およびそれらの拡張不確かさ(U)から En 数を算出し、 $|En| \leq 1$ を満足とした。なお、En 数は下記の式により求められる。

$$En \text{ 数} = \frac{(\text{分析値}_{\text{分析機関}} - \text{付与値})}{\sqrt{U_{\text{分析機関}}^2 + U_{\text{付与値}}^2}}$$

(2) 測定方法

あらかじめエネルギーの異なる核種を含んだ標準線源を用いてエネルギー校正および検出効率校正を行ったゲルマニウム半導体検出器(キャンベラ製、GC2018)を用い、試料中の核種より放出されるガンマ線量を測定した。測定時間は 80000 秒とした。得られた計測結果をバックグラウンド補正した後、エネルギー補正および検出効率補正を行ない、測定試料中の核種(^{134}Cs 、 ^{137}Cs 、 ^{131}I および ^{40}K 等)の定性定量分析を行った。

3. 空間放射線量率測定

モニタリングポスト(NaI シンチレーション式、エネルギー補償型、アロカ製 MAR-22 型)による空間放射線量率の測定は、当所、茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、泉佐野市に設置した 6 基(地上 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。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¹⁾。

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、84 試料中 15 例から検出されたが、異常値は検出されなかった。

2. 核種分析

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

(1) ^{134}Cs および ^{137}Cs : 今年度も例年同様、 ^{137}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。その他の試料では例年同様 ^{137}Cs の検出はなかった。 ^{134}Cs は、例年同様どの試料からも検出されなかった。

(2) ^{131}I : ^{131}I は、上水原水試料から微量(2.2 mBq/L)検出された。他の環境試料および食品試料からは検出されなかった。上水中の ^{131}I については、原水が平成元年度から、蛇口水が平成 2 年度から検出されており、そのレベルも過去の値(原水: ND ~ 4.9、蛇口水: ND ~ 1.4 mBq/L)²⁾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³⁾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}I による府民への健康影響については、既報³⁾でも論じたように、そのレベルは飲食物摂取制限の基準⁴⁾(飲料水中の放射性ヨウ素: 300 Bq/kg)の 10 万分の 1 程度の低値であり、問題はないと考えられる。

(3) ^{40}K : 天然放射性核種である ^{40}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) 環境試料の放射能測定における精度管理: (公財)日本分析センターの報告書によると、当所の分析結果は付与値とよく一致しており、かつ、En 数の絶対値も「1」以下であることから、ガンマ線核種分析の精度は確保されていることが認められた。

3. 空間放射線量率

モニタリングポストによる空間放射線量率調査結果(1 時間平均値に基づく変動範囲を 1 月毎にまとめたもの)を表 4-1 から表 4-6 に示す。令和 3 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、61~100 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 1m 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。なお、モニタリングポストから約 10m の距離で建設工事が行われているが、構造物の外観が目視できる前(令和 3 年 4 月~令和 3 年 11 月)と後(令和 3 年 12 月~令和 4 年 3 月)の間で数値の違いは認めなかった。また、表 4-2 から表 4-6 に示したその他の地上 1m 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 52~82 nGy/h、寝屋川市(表

4-3) が 63～94 nGy/h、東大阪市（表 4-4）が 73～112 nGy/h、富田林市（表 4-5）が 58～83 nGy/h および泉佐野市（表 4-6）が 47～96 nGy/h の範囲であった。すべての地点で、最高値は、過去 3 年間に観測した値の範囲内であった。

表 2 降水中全ベータ放射能測定結果

年 月	降水量 mm	件数 (検出数)	濃度 Bq/L	月間降下量 MBq/km ²
令和3年 4月	224	6 (1)	ND～0.46	1.3
令和3年 5月	337	12 (0)	ND	ND
令和3年 6月	126	8 (2)	ND～0.78	3.8
令和3年 7月	302	9 (1)	ND～0.33	33.6
令和3年 8月	332	11 (1)	ND～1.01	3.4
令和3年 9月	173	9 (1)	ND～0.24	2.9
令和3年 10月	66	5 (2)	ND～0.67	2.1
令和3年 11月	80	7 (3)	ND～0.31	6.8
令和3年 12月	98	5 (1)	ND～0.36	2.1
令和4年 1月	22	2 (0)	ND	ND
令和4年 2月	18	2 (0)	ND	ND
令和4年 3月	94	8 (3)	ND～0.62	7.1
令和3年度	1872	84 (15)	ND～1.01	63.1
過去3年間の値				
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
令和 2年度	1581	76 (17)	ND～1.26	76.6

ND: 計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

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

試料	採取年月日	単位	¹³⁴ Cs	¹³⁷ Cs	¹³¹ I	⁴⁰ K
大気浮遊じん						
令和3年 4月～6月	R3.4.5 ～R3.6.16	mBq/m ³	ND	ND	ND	ND
7月～9月	R3.7.5 ～R3.9.22	〃	ND	ND	ND	ND
10月～12月	R3.10.4 ～R3.12.14	〃	ND	ND	ND	ND
令和4年 1月～3月	R4.1.5 ～R4.3.17	〃	ND	ND	ND	ND
令和3年度		mBq/m ³	ND	ND	ND	ND
過去3年間の値		mBq/m ³	ND	ND	ND	ND～0.14
降下物						
令和3年 4月	R3.3.31 ～R3.5.6	MBq/km ²	ND	ND	ND	1.0±0.21
5月	R3.5.6 ～R3.6.1	〃	ND	ND	ND	1.0±0.20
6月	R3.6.1 ～R3.7.1	〃	ND	ND	ND	ND
7月	R3.7.1 ～R3.8.2	〃	ND	ND	ND	ND
8月	R3.8.2 ～R3.8.31	〃	ND	ND	ND	ND
9月	R3.8.31 ～R3.9.30	〃	ND	ND	ND	ND
10月	R3.9.30 ～R3.11.1	〃	ND	ND	ND	ND
11月	R3.11.1 ～R3.12.1	〃	ND	ND	ND	ND
12月	R3.12.1 ～R4.1.4	〃	ND	ND	ND	ND
令和4年 1月	R4.1.4 ～R4.2.1	〃	ND	ND	ND	ND
2月	R4.2.1 ～R4.3.1	〃	ND	ND	ND	ND
3月	R4.3.1 ～R4.3.31	〃	ND	ND	ND	ND
令和3年度		MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.0
過去3年間の値		MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～1.4
上水・原水	R3.6.7	mBq/L	ND	ND	2.2±0.15	63±2.3
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND～1.1	62～79
上水・蛇口水	R3.6.16	mBq/L	ND	ND	ND	89±2.7
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND～0.68	80～94
海水	R3.7.1	Bq/L	ND	ND	ND	6.0±0.42
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	3.9～5.2
海底土	R3.7.1	Bq/kg dry	ND	2.5±0.25	ND	610±11
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	1.5～1.8	ND	620～650
土壌	R3.7.15	Bq/kg dry	ND	0.91±0.20	ND	610±10
0～5cm層		(MBq/km ²)	(ND)	(41±8.9)	(ND)	(27000±460)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	ND～1.3	ND	640～680
		(MBq/km ²)	(ND)	(ND～73)	(ND)	(32000～38000)
土壌	R3.7.15	Bq/kg dry	ND	ND	ND	660±10
5～20cm層		(MBq/km ²)	(ND)	(ND)	(ND)	(96000±1500)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	0.8～0.9	ND	680～710
		(MBq/km ²)	(ND)	(120～150)	(ND)	110000～120000
農産物 タマネギ	R3.6.11	Bq/kg生	ND	ND	ND	42±0.33
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	44～53
農産物 キャベツ	R3.12.10	Bq/kg生	ND	ND	ND	63±0.42
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	63～68

ND：計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

表4-1 大阪市 大阪健康安全基盤研究所：地上1 m

測 定 年 月		測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：大阪市)		
			最高値	最低値	平均値
令和 3年	4月	30	76	62	64
	5月	31	84	61	64
	6月	30	91	62	64
	7月	31	88	62	64
	8月	31	81	62	64
	9月	30	84	62	64
	10月	31	82	61	64
	11月	30	100	63	64
	12月	31	92	62	64
令和 4年	1月	31	82	62	64
	2月	28	74	63	65
	3月	31	89	63	65
令和 3年度		365	100	61	64
過去3年間の値					
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		366	104	62	71
令和 2年度		355*	105	61	66

*：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1 m

測 定 年 月		測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：茨木市)		
			最高値	最低値	平均値
令和 3年	4月	30	65	53	55
	5月	31	73	52	55
	6月	30	82	53	56
	7月	31	74	52	55
	8月	31	70	52	55
	9月	30	73	53	55
	10月	31	68	54	57
	11月	30	81	55	56
	12月	31	78	53	56
令和 4年	1月	31	76	53	55
	2月	28	63	54	55
	3月	31	76	53	55
令和 3年度		365	82	52	55
過去3年間の値					
平成30年度		365	86	52	57
平成31年度		366	77	52	57
令和 2年度		363*	84	52	56

*：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1 m

測 定 年 月		測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：寝屋川市)		
			最高値	最低値	平均値
令和 3年	4月	30	75	64	66
	5月	31	86	63	66
	6月	30	94	64	66
	7月	31	81	63	65
	8月	31	78	63	65
	9月	30	83	63	65
	10月	31	79	64	66
	11月	30	92	64	66
	12月	31	92	64	66
令和 4年	1月	31	94	63	65
	2月	28	74	64	66
	3月	31	88	64	66
令和 3年度		365	94	63	65
過去3年間の値					
平成30年度		365	98	68	71
平成31年度		366	90	62	67
令和 2年度		361*	102	63	66

*：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1 m

測 定 年 月		測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：東大阪市)			
			最高値	最低値	平均値	
令和 3年	4月	30	87	74	77	
	5月	31	98	74	77	
	6月	30	107	73	77	
	7月	31	102	73	76	
	8月	31	89	73	76	
	9月	30	97	74	76	
	10月	31	102	75	77	
	11月	30	112	75	77	
	12月	31	102	75	77	
	令和 4年	1月	31	97	74	76
		2月	28	86	75	76
		3月	31	102	73	76
令和 3年度		365	112	73	77	
過去3年間の値						
平成30年度		365	108	72	77	
平成31年度		366	105	73	77	
令和 2年度		356*	115	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1 m

測 定 年 月		測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：富田林市)			
			最高値	最低値	平均値	
令和 3年	4月	30	67	59	60	
	5月	31	68	58	60	
	6月	30	70	59	60	
	7月	31	69	58	60	
	8月	31	66	58	60	
	9月	30	73	58	60	
	10月	31	73	58	60	
	11月	30	80	59	60	
	12月	31	76	59	60	
	令和 4年	1月	31	79	59	60
		2月	28	72	59	60
		3月	31	83	59	60
令和 3年度		365	83	58	60	
過去3年間の値						
平成30年度		365	90	60	62	
平成31年度		366	85	60	62	
令和 2年度		359*	91	59	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1 m

測 定 年 月		測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地：泉佐野市)		
			最高値	最低値	平均値
令和 3年	4月	30	69	48	50
	5月	31	73	47	50
	6月	30	69	48	50
	7月	31	67	47	50
	8月	31	61	47	49
	9月	30	70	47	50
	10月	31	79	48	50
	11月	30	96	48	50
	12月	31	79	48	50
令和 4年	1月	31	84	48	50
	2月	28	64	49	50
	3月	31	83	48	50
令和 3年度		365	96	47	50
過去3年間の値					
平成30年度		365	91	48	51
平成31年度		366	77	48	51
令和 2年度		362*	98	48	51

*：令和 3年 1月機器更新のため欠測

ま と め

ガンマ線核種分析により人工放射性核種である ^{131}I および ^{137}Cs が検出された。医学利用等に由来すると考えられる ^{131}I は上水（原水および蛇口水）に極低レベルで検出された。 ^{137}Cs は土壌や海底土から例年同様検出されたが、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、すべてのモニタリングポストで、観測値は過去3年間に観測した値の範囲内であった。

謝 辞

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

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3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>
- 2) 肥塚利江, 東恵美子, 足立伸一. 大阪府における環境及び食品中放射能調査（平成25年度報告）. 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告. 2014; **52**: 67-74.
- 3) 田村幸子, 渡辺功, 布浦雅子. 大阪府における環境および食品中放射能調査 —平成元年4月～平成2年3月—. 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告 公衆衛生編. 1990; **28**: 165-170.
https://www.chieiken.gr.jp/chieiken/osk_PDF/j271e

1.pdf

- 4) 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, 令和4年4月6日一部改正).

<https://www.nsr.go.jp/data/000387310.pdf>

WEB サイトの内容は2022年6月6日に確認した。

Survey of environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2021 Report)

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

We investigated environmental and food radioactivity in Osaka Prefecture by commission from the Nuclear Regulatory Agency in fiscal year 2021. The gross beta radioactivity in precipitation and the gamma ray radiation nuclides 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, ¹³¹I, was detected in source water at extremely low levels, as it had been in the past. ¹³⁷Cs, an artificial radionuclide, was also detected in soil and sea sediment at low levels, as it had been 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

^a Osaka Institute of Public Health

Phenomenological and mechanistic models for predicting early transmission data of COVID-19

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

Mathematical Biosciences and Engineering, 19, 2043-2055 (2022)

doi: 10.3934/mbe.2022096

現象的モデルである①Richardsモデル及び②Susceptible-Infected-Recovered (SIR) モデルの流行曲線近似解(SIR近似解モデル)、強力な介入である都市封鎖の効果を反映した機構的モデル(③指数関数モデル及び④SIRモデル)を用いて中国での新型コロナウイルス感染症の報告数を当てはめ、予測精度についてモデル間の比較を行った。中華人民共和国の流行データを用いた本研究において、都市封鎖の効果のみを考慮した機構的モデルは、現象的モデルに比べ二乗平均平方根誤差(予測精度を示す指標であり、値が小さいほど高い予測精度を示す)が小さく、高い予測精度を示した。

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 京都大学大学院医学研究科

c 北海道大学大学院医学研究院

現象的モデル及び機構的モデルを用いた新型コロナウイルス感染症の流行初期における予測

Relationship between biochemical markers and measles viral load in patients with immunologically naive cases and secondary vaccine failure

T. KURATA^a, D. KANBAYASHI^a, J. KOMANO^b, and K. MOTOMURA^a

Microbiology and Immunology, 65(7), 265 - 272 (2021)

麻疹患者では血清中の乳酸脱水素酵素 (LDH: lactate dehydrogenase) が有意に増加することが知られているが、その評価は入院症例が中心の典型麻疹を対象とした検討に基づいており、入院を要しない麻疹症例および Secondary Vaccine Failure (SVF) による修飾麻疹症例では検討されていない。そこで近年国内の麻疹患者に多くみられる SVF と免疫学的に naive な典型麻疹患者における LDH の動態と麻疹ウイルス特異的 IgG 抗体および麻疹ウイルスゲノム量との相関を検討した。対象は核酸検査で麻疹ウイルスが検出された麻疹患者 38 名で、SVF の選定は麻疹特異的 IgG 抗体価が有症時に確認され、抗体の結合力 (Relative Avidity Index) が 60%以上とした。他の疾患による影響を評価するため AST (Aspartate Aminotransferase), ALT (Alanine Aminotransferase), CRP (C-reactive protein) の 4 項目も合わせて検討した。AST, ALT は naive 群の方が SVF 群よりも有意に高かったが、それぞれ約 85%以上の検体で正常値の範囲内であり、肝機能障害の可能性は低いと考えられた。CRP は 75%以上の検体で基準値より高かったが、両群において統計学的な差はなかった。ウイルスゲノム量は naive 群で有意に高く、麻疹特異的 IgG 抗体価は SVF 群で有意に高かった。麻疹ウイルスゲノムコピー数は、麻疹特異的 IgG 濃度 (Pearson's product-moment correlation coefficient, -0.562 ; $p < 0.001$) および LDH 値 (Spearman's correlation coefficient, 0.36 ; $p < 0.05$) と有意な相関を示した。したがって、血清 LDH 値は、典型麻疹患者と SVF 患者を区別するための補助的な指標となり得ると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所

b 大阪医科薬科大学

修飾麻疹患者と典型麻疹患者における血液生化学マーカーとウイルス量の関係性

大阪府内における麻疹特異的抗体の保有状況と
麻疹発生動向倉田貴子^a, 上林大起^b, 森治代^b, 本村和嗣^c

病原微生物検出情報, 42(9), 184-185 (2021)

現在、大阪府内の MR ワクチンの第 1 期接種率は概ね 95%に達しているが、第 2 期接種率は 2006 年の制度開始当初 (89%) から年々上昇しており、2008 年以降 90%以上が維持されている。

この状況を受けて、毎年実施されている感染症流行予測調査事業麻疹 PA 抗体価調査では、大阪府内の健常人の麻疹抗体陽性率 (PA 抗体価 $\geq$ 16 倍) は定期 2 回接種導入以降、2 歳以上の全ての年齢群で 95%以上が達成、維持されている。しかし、抗体保有者における幾何平均抗体価は 2 回接種導入前 (2003~2006 年) より麻疹排除後 (2015~2020 年) で低下しており、特に 10 歳以上の全ての年齢区分で有意な低下がみられた。

大阪府内の麻疹患者数は、全数把握が開始された 2008 年に 392 人が報告されて以降、大きく減少し、2015 年には日本国内からの麻疹排除が達成された。しかし達成以降も、府内での麻疹患者数は増減を繰り返しており、海外からの輸入症例や、ワクチン接種歴を有し典型的な臨床症状を見ない成人修飾麻疹患者の占める割合が増加している。特に修飾麻疹の割合は、麻疹排除達成前は 0~38%で推移していたが、排除後は 44~100%で推移しており、顕著な増加が見られた。これらの状況は、麻疹患者数の減少に伴い、野生株麻疹ウイルスによるブースター効果が得られなくなったことによる、ワクチン獲得免疫の減弱が原因として考えられている。修飾麻疹患者はウイルス排泄量が少なく感染伝播リスクは低い、感受性者への伝播は報告されており、今後も修飾麻疹、典型麻疹にかかわらず、麻疹患者発生時の現場対応は継続する必要があると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所企画部精度管理室

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

c 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部

Measles epidemiology and seroprevalence in Osaka prefecture

Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of
enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroups O157,
O26, and O111 based on a *de novo* look-up table
constructed by regression analysisY. WAKABAYASHI^a, T. HARADA^a, T. KAWAI^a, Y.
TAKAHASHI^a, N. UMEKAWA^a, H. IZUMIYA^b and K.
KAWATSU^aFoodborne Pathogens and Disease, 18(9), 647-654
(2021)

Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA ; 反復配列多型解析法) は腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分子疫学的型別手法として広く活用されている。しかし、複数の検査室で得られた結果を比較する際の信頼性確保が課題である。我々は、MLVA の結果判定に必要な調整済み変換表を新規作成する方法を考案した。この方法では、各検査室で 24 株の所内標準株の MLVA を実施し、その電気泳動データの回帰分析結果に基づいて変換表を作成する。本研究では、回帰分析に 95%あるいは 99%予測区間を採用した。51 株の EHEC O157 について MLVA を実施したところ、回帰分析に 99%予測区間を採用した場合、作成した変換表を用いて 46 株のリピート数を正確に決定でき、33 株のリピート数を決定できた 95%予測区間を採用した場合よりも優れていた。リピート数を決定できなかった 5 株については、電気泳動サイズが変換表の範囲外ではあったものの、外挿あるいは変換表の近似値からリピート数を推定できた。本方法は従来の非調整の変換表を用いる方法よりも、より正確な MLVA 判定結果を得ることができた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 国立感染症研究所細菌第一部

回帰分析によって新規構築した変換表に基づく腸管出血性大腸菌血清群 O157, O26, O111 の反復配列多型解析法

Proposal of a novel selective enrichment broth, NCT-mTSB, for isolation of *Escherichia albertii* from poultry samples

Y. WAKABAYASHI^a, K. SETO^{b,c}, M. KANKI^a, T. HARADA^a and K. KAWATSU^a

Journal of Applied Microbiology, 132(3), 2121-2130 (2022)

Escherichia albertii は人に食中毒あるいは水系感染症を引き起こす新興の下痢症起因菌である。しかし、本菌の選択的増菌培地はこれまでに報告されていない。そこで、基礎培地や選択剤の種類、培養条件等を検討することで、*E. albertii* の選択的増菌培地の開発を目指した。本研究では、ノボバイオシンセフェキシムー亜テルル酸カリウム添加変法トリプトソイブロス (NCT-mTSB) を新規の選択的増菌培地として開発した。NCT-mTSB は本研究で供試したすべての *E. albertii* 株の発育を支持したが、大腸菌と赤痢菌を除く腸内細菌目細菌の発育を抑制した。また、大腸菌と赤痢菌の一部の菌株は 44°C で発育が抑制されたが、*E. albertii* の発育は抑制されなかった。キシロースーラムノース添加 deoxycholate hydrogen sulphide 培地 (XR-DH) と NCT-mTSB を併用した場合、鶏肉 1 g あたり少なくとも 1 CFU の *E. albertii* が存在する場合に、本菌を分離できた。また、NCT-mTSB を用いた増菌培養法は、緩衝ペプトン水、変法 EC 培地、あるいはノボバイオシン添加 mTSB を用いた方法よりも有意に *E. albertii* 分離陽性率が高かった。我々が知る限り、これは鶏肉から *E. albertii* を分離するための選択的増菌培地に関する初めての報告である。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 大阪健康安全基盤研究所企画部精度管理室

c 国立感染症研究所 (現所属)

鶏肉からの *Escherichia albertii* 分離のための新規の選択的増菌培地 (NCT-mTSB) の提案

Isolation and characterization of *Staphylococcus argenteus* strains from retail foods and slaughterhouses in Japan

Y. WAKABAYASHI^{a,b}, K. TAKEMOTO^c, S. IWASAKI^c, T. YAJIMA^c, A. KIDO^c, A. YAMAUCHI^c, K. KUROIWA^c, Y. KUMAI^c, S. YOSHIHARA^d, H. TOKUMOTO^d, K. KAWATSU^a, M. YASUGI^b and M. MIYAKE^b

International Journal of Food Microbiology, 363, 109503 (2022)

Staphylococcus argenteus は、近年分類学的な位置付けが確立された *S. aureus* complex の新種であり、ブドウ球菌食中毒の原因菌になることが知られている。しかし、本菌が食品を汚染する経路は明らかにされていない。本研究では、日本の市販生鮮食品および食鳥処理場における *S. argenteus* の分布状況を調査した。市販食品 642 検体を調査したところ、鶏肉 151 検体中 21 検体 (13.9%) から *S. argenteus* が分離されたが、豚肉、牛肉、魚介類、野菜類からは分離されなかった。Multi locus sequence typing の結果、21 株は 4 つの sequence type (ST) に型別され、これらは *spa*-typing によってさらに 14 種類の *spa* 型に型別された。大阪府内の 2 か所の食鳥処理場で、本菌の汚染状況を調査したところ、1 か所の処理場から 14 株の *S. argenteus* が分離された。*S. argenteus* は複数の検体採取日に分離された。このうち 13 株は同じ ST かつ同じ *spa* 型であった。分離株の全ゲノム配列を解読したところ、13 株のコアゲノム上に検出された一塩基変異 (SNV) の数は、0~17 個であった。さらに、鶏肉から分離した 1 株と食鳥処理場由来株の間で検出されたコアゲノム SNV は最大で 15 個であり、遺伝的に極めて近縁であった。これらの結果は、*S. argenteus* が食鳥処理場に一定期間定着していること、そして、鶏肉は食鳥処理場内で *S. argenteus* に汚染される可能性があることを示唆している。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 大阪府立大学生命環境科学研究科

c 大阪府食鳥検査センター

d 大阪府立大学理学系研究科

日本の食品および食鳥処理場からの *Staphylococcus argenteus* の分離と分離菌株の性状解析

Analysis of the complete genome sequences of *Clostridium perfringens* strains harbouring the binary enterotoxin BEC gene and comparative genomics of pCP13-like family plasmids

K. UEDA^a, K. KAWAHARA^a, N. KIMOTO^a, Y. YAMAGUCHI^a, K. YAMADA^b, H. OKI^c, T. YOSHIDA^a, S. MATSUDA^c, Y. MATSUMOTO^c, D. MOTOOKA^c, K. KAWATSU^d, T. IIDA^{c,e}, S. NAKAMURA^{c,e}, T. OHKUBO^a and S. YONOGI^{c,d}.

BMC Genomics, 23, 226 (2022)

<https://doi.org/10.1186/s12864-022-08453-4>

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)が産生する2成分エンテロトキシン BEC は2014年に当所等から同定を報告した食中毒の原因毒素である。これまでに BEC 遺伝子保有菌は本邦と英国から分離が報告されており、2018年には愛知県において本菌による新たな食中毒事例が確認された。一方で、英国株の他に次世代シーケンサーによる解析はなされていない。本論文では本菌を分子疫学的に詳細に解析するために、国内で分離された5株の BEC 遺伝子保有菌の完全ゲノムを解読して、英国株とともに比較ゲノム解析を実施した。

英国株を含む6株の BEC 遺伝子は、2019年に新たに実験室的に接合伝達性が確認された pCP13 ファミリープラスミドにコードされており、これら6株のプラスミドはほとんど同様であった。また、染色体とプラスミドそれぞれについて詳細な SNP 解析を実施し、自然環境下でも水平伝搬していることを世界で初めて示した。さらに、pCP13 ファミリープラスミドはこれまで3.3% (7/211株)のウエルシュ菌のみで確認されていたが、26.9% (58/216株)のウエルシュ菌が保有する一般的な接合伝達性プラスミドであることを明らかにして、病原プラスミドとして注視する必要性を提言した。

a 大阪大学大学院薬学研究科

b 愛知県衛生研究所

c 大阪大学微生物病研究所

d 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

e 大阪大学感染症総合教育研究拠点

2成分エンテロトキシン BEC 遺伝子保有ウエルシュ菌の完全ゲノム解析と pCP13 ファミリープラスミドに関する比較ゲノム解析

環境水から高頻度に分離された IS1151 プラスミド型エンテロトキシン (CPE) 遺伝子保有ウエルシュ菌の人口集中地区への局在

下中晶子^{a,b}, 余野木伸哉^a, 川津健太郎^a, 枝川亜希子^c

日本防菌防黴学会誌, 49(8), 369-374 (2021)

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) の一部はエンテロトキシン (CPE) を産生し、食中毒や感染症の原因となる。CPE 遺伝子保有ウエルシュ菌はヒトの糞便検体から分離されることが多いが、人口分布との関連を調査した報告はこれまでにない。本研究では環境水 (大阪府内17箇所の河川水等33試料) から嫌気性芽胞菌を分離しその菌種を同定した。ウエルシュ菌と同定された菌について CPE 遺伝子の保有とその存在部位を調べた。さらに、地理情報システムを用いて採水場所の周囲人口を算出し、人口分布と CPE 遺伝子保有株との関連性を調査した。

上水試験方法のハンドフォード改良寒天培地法によって、嫌気性芽胞菌は1503株検出され、427株について菌種同定した。このうち94.8%がウエルシュ菌であった。その他の菌種として *C. baratii*/*C. sardiniense* が21株 (4.9%)、*C. subterminale*/*C. sulfidigenes* が1株 (0.2%) 分離された。CPE 遺伝子保有ウエルシュ菌は10箇所19試料から62株分離され、その96.8%はプラスミド上 IS1151 配列の上流に CPE 遺伝子が存在していた (IS1151 型)。IS1151 型の CPE 遺伝子保有ウエルシュ菌が検出された10箇所は、採水場所から半径1km内の人口が9,000人を超える都市的地域であった。

本研究では IS1151 型の CPE 遺伝子保有ウエルシュ菌が大阪府に位置する流域の異なる河川や湖沼に広く分布することを明らかにした。IS1151 型の菌は都市的地域に局在することを明らかにし、都市活動によって拡散することが示唆された。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

b 大阪府泉佐野保健所検査課 (現所属)

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

IS1151-cpe-positive *Clostridium perfringens* frequently isolated from environmental surface water samples and localized in urban areas in Osaka, Japan

Global trends in norovirus genotype distribution among children with acute gastroenteritis

JL CANNON^a, MC CHAN^b, S GIRI^c, N SAKON^d,
J VINJÉ^a, (他 16 名)Emerging Infectious Diseases, 27(5), 1438-1445 (2021)
<https://doi.org/10.3201/eid2705.204756>

ノロウイルスは、世界中の成人及び小児における急性胃腸炎の主要な原因である。NoroSurv は 5 歳未満の急性胃腸炎を発症した小児を対象としたノロウイルスサーベイランスのためのグローバルネットワークである。6 大陸 16 カ国の参加者は標準化されたプロトコルを用いてジェノタイプとポリメラーゼタイプの両方のタイピング（デュアルタイプ）を行った。2016 年から 2020 年の間に 1,325 の配列データが NoroSurv のウェブポータルに集約された。提出された配列の 50%以上が GII.4 Sydney[P16]株または GII.4 Sydney[P31]株であった。その他の一般的な遺伝子型は GII.2[P16]、GII.3[P12]、GII.6[P7]、GI.3[P3]であった。これまでにポリメラーゼタイプの報告が少なかった GII.3 や GII.20 を含む 22 のジェノタイプにおいて 36 のデュアルタイプが検出され、ノロウイルスの多様性が示された。NoroSurv で取得したサーベイランスデータにより、世界中の小児急性胃腸炎に関連するノロウイルスの動向をほぼリアルタイムで監視することが可能となった。

感染性胃腸炎の発生動向の変化

左近直美

臨床と微生物, 49(2), 137-143 (2022)

特集タイトル「新型コロナウイルス感染症の流行でその他の感染症の発生動向はどう変化したか？」において、感染性胃腸炎の発生動向について報告した。

小児を中心とした感染性胃腸炎の発生数は 2020 年 9 週目以降例年に比して低値が続き、例年患者報告数が増加する冬季においても流行ピークは観察されなかった。しかし、2021 年 10 月以降は増加傾向にある。ウイルス性の食中毒についても緊急事態宣言の影響による飲食店利用の減少と連動する形で発生数が減少した。コロナ対策が感染性胃腸炎の流行抑制に一定の効果があつたほか、緊急事態宣言の発令時期がノロウイルスの流行期と重なったことも大きな要因と考えられた。

a 米国疾病対策センター

b 香港中文大学

c クリスチャン医科大学ベッロール

d 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

他 15 機関

小児の急性胃腸炎におけるノロウイルス遺伝子型の世界動向

大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

Impact of COVID-19 on infectious gastroenteritis

A longitudinal study on respiratory viral infection for healthy volunteers

S. MORIKAWA^a, M. OTSUKA^{a,b}, T. YUMISASHI^a and K. MOTOMURA^c

Health Science Reports, 4(4), e413 (2021)

<https://doi.org/10.1002/hsr2.413>

背景：呼吸器ウイルス感染症の感染経路は、飛沫感染が主要であることから、不顕性もしくは症状の軽度な感染者の行動に伴って流行が拡大すると考えられる。成人は小児に比較して行動範囲が広いため、他の地域へのウイルスの持ち込みを担っている可能性が高い。そこで、2017年の45週から2018年の12週まで、11人の対象者から毎週うがい液を採取し、リアルタイムPCR法を用いた呼吸器ウイルスの網羅的検出を行った。併せて健康状態の聞き取り、不顕性感染の重要度について検討した。

結果：合計226検体を検査した。全員から何らかの呼吸器ウイルスが検出された。それぞれのウイルス検出数は1～9回であった。226検体のうち34検体（15.0%）から36ウイルスが検出された（2検体は二重感染であった）。ウイルス検出前後の1週間に本人が無症状であったのは11検体であった。4人はライノウイルス（RV）の持続感染と考えられた。無症候性の条件下で、パレコウイルス、C群RV11型、コロナウイルス229E、およびアデノウイルスがそれぞれ1検体、1検体、2検体、および3検体から検出された。

結論：健康成人を対象に20週間連続して毎週うがい液を採取し、症状と検出ウイルスとの関連をみた。その結果、健康な（無症候性の）成人でもウイルス感染により呼吸器ウイルスを拡散させたり、長期間にわたってウイルスを排出する事が明らかとなった。このように無症状の呼吸器ウイルス感染者は、ヒト集団のウイルス循環に重要な役割を果たしていると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

b 大阪公立大学大学院医学研究科公衆衛生学

c 大阪健康安全基盤研究所公衆衛生部

健康ボランティアにおける呼吸器ウイルス感染実態に関する縦断研究

Influence of prior influenza vaccination on current influenza vaccine effectiveness in children aged 1 to 5 years

K. MATSUMOTO^a, W. FUKUSHIMA^{a,b}, S. MORIKAWA^c, M. FUJIOKA^d, T. MATSUSHITA^e, M. KUBOTA^f, Y. YAGI^g（他13名）

Vaccines, 9(12), 1447 (2021)

<https://doi.org/10.3390/vaccines9121447>

背景：毎年のインフルエンザワクチン接種は、インフルエンザの罹患および関連死を防ぐために使用される重要な戦略だが、一部の研究では、現在のワクチン有効性（VE）に対する過去のワクチン接種による悪影響が報告されている。

方法：2016/17 および 2017/18 インフルエンザシーズン中に国内の9つの外来診療所に来院した1～5歳の小児を対象に、テストネガティブデザインを使用して、現シーズンのVEと前シーズンのワクチン接種歴との関連を評価した。

結果：799例の症例と1196例の対照を分析した。被験者の年齢の中央値は3歳、男性の割合は54%であった。今シーズンのワクチン1回および2回接種のVEは、以前のワクチン接種状況に関係なく有意であった。インフルエンザの亜型/系統によって層別化した場合でも、結果に差はなかった。

結論：過去のインフルエンザワクチンの接種は、1～5歳の小児における現在のVEを減弱させず、毎年のワクチン接種戦略を否定するものではなかった。

a 大阪公立大学大学院医学研究科公衆衛生学

b 大阪公立大学大学院医学研究科感染症科学研究センター

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

d ふじおか小児科

e 松下こどもクリニック

f くぼたこどもクリニック

g 八木小児科

1～5歳の小児における現在のインフルエンザワクチンの有効性に対する過去のインフルエンザワクチン接種の影響

Clinical perspectives of *Treponema pallidum* subsp. *Endemicum* infection in adults, particularly men who have sex with men in the Kansai area, Japan: A case series

K. SHINOHARA^{a,b}, K. FURUBAYASHI^c, Y. KOJIMA^d, H. MORI^e, J. KOMANO^f and T. KAWAHATA^e

Journal of Infection and Chemotherapy, 28(3), 444-450 (2022)

<https://doi.org/10.1016/J.JIAC.2021.11.012>

我々は推定感染時期に渡航歴のない5名の日本人MSM（男性と性交する男性）の梅毒患者から、風土病トレポネーマ症の一つである「ベジエル」の病原体 *Treponema pallidum* subsp. *Endemicum* (TEN) を、東アジア・太平洋地域で初めて検出し報告した (Takuya Kawahata et al., *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1581–1582 (2019).)。

今回、これらの症例シリーズの横断研究と、ベジエルについての文献レビューを行なった。検出された菌株のほとんどが、マクロライド耐性を示すといわれている23S rDNAのA2058G変異を持っていた。また、TENの元々の流行地域である乾燥した国や地域では接触や食器の共用が感染の原因とされているのに対し、今回の症例シリーズも含め、先進国への輸入事例においては、性行為による感染が強く疑われた。

この論文は、ベジエルについての重要な臨床的洞察を提供し、先進国ではめったに同定されないこの疾患の臨床的検出に貢献する。

High production of *egc2*-related staphylococcal enterotoxins caused a food poisoning outbreak

K. UMEDA^a, HK. ONO^b, T. WADA^c, D. MOTOOKA^d, S. NAKAMURA^d, H. NAKAMURA^a and DL. HU^b.

International Journal of Food Microbiology, 357, 109366 (2021)

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) によって食品中に産生されたブドウ球菌エンテロトキシン (Staphylococcal enterotoxins ; SEs) は、嘔吐を主症状とするブドウ球菌食中毒を引き起こす。近年、我々を含む複数のグループは、エンテロトキシン遺伝子クラスター2 (*egc2*) にコードされた新型 SEs 遺伝子群 (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *selu*) が関与する食中毒事例を報告してきた。しかし新型 SEs の産生を証明した報告はこれまでにない。

今回、我々は感度および特異性に優れたサンドイッチ ELISA 法を用いて、2016年に大阪市内で発生したブドウ球菌食中毒事例由来菌株8株の新型 SEs 産生性および、食品残品7検体中に含まれる新型 SEs 量を測定した。食中毒事例由来菌株はすべてきわめて高い新型 SEs 産生性を示し、食品残品の1つである寿司 (ちらし寿司) からは、ブドウ球菌食中毒を引き起こすのに十分な量の新型 SEs が検出された。さらに、代表株1株の全ゲノム解析を実施した結果、本株の *egc2* 周辺の遺伝子構造は、Sequence Type 45 に属する菌に特異的な構造をもつことが分かった。

本研究は、実際に発生した食中毒事例を用いて、*egc2* に関連する新型 SEs の高産生および食中毒起因性を証明した初めての報告である。

a 京都大学大学院医学研究科

b 京都市立病院

c そねざき古林診療所

d 大阪健康安全基盤研究所企画部研究企画課

e 大阪健康安全基盤研究所微生物部ウイルス課

f 大阪医科薬科大学

梅毒トレポネーマ亜種エンデミカムの、成人、特に関西地方の男性とセックスする男性の感染における臨床的観点：症例シリーズでの検討

a 大阪健康安全基盤研究所

b 北里大学獣医学部

c 大阪市立大学生生活科学部

d 大阪大学微生物病研究所

egc2 関連・新型エンテロトキシンの高産生により食中毒事例が発生した

大阪市立小学校での「生き物さがし」事業により
確認された昆虫類

秋田耕佑^a, 桝元慶子^{a,b}, 中谷憲一^b, 山崎一夫^c

大阪市立環境科学研究センター報告, 4, 31-42 (2021)

大阪市において、2018 年～2020 年に 81 校の小学校の校庭で、小学生に対する環境教育の一環として昆虫相の調査を行った。その結果、410 種が記録され、そのうち 4 種（アキアカネ、ナツアカネ、セスジイトトンボ、ウスアオリング）が大阪府における保護上重要な野生生物（大阪府版レッドリスト）に掲載されていた。また、31 種は外来種であった。とくに移動性が高いチョウ目（ヒロヘリアオイラガ、ナミアゲハ、ヤマトシジミなど）とハチ目（とくにトビイロシワアリ、トビイロケアリ、ハリブトシリアゲアリなどのアリ科）が高頻度で観察された。小学校内の緑化区域はさまざまな昆虫類にとって好適な生息場所を提供する一方で、外来種の繁殖場所にもなることを示していた。

a 大阪市立環境科学研究センター

b 大阪市エコボランティア

c 大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課

Insect fauna found by the environmental education program of biodiversity at elementary schools in Osaka City

Microfluidic rapid quantification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium collected from chicken meat using immunomagnetic separation after formaldehyde treatment

Y. TOKUNAGA^a, Y. WAKABAYASHI^b, S. YONOGI^b, M. SAITO^c and N. YAMAGUCHI^d

International Journal of Food Science & Technology, 56(10), 5402-5408 (2021)

食中毒原因菌の迅速検出にはリアルタイム PCR 法等が開発されているが、結果を得るまで半日を要する。一方、マイクロ流路デバイスは幅・深さ数十 μm の微小流路を刻んだ小型デバイスであり、簡単な操作で細菌を培養することなく 1~2 時間で検出ができる。そこで本研究では、免疫磁気分離法とマイクロ流路システムを用いて、食品中の危害細菌の高精度な迅速モニタリング法の構築を図った。

汚染された食品中の細菌を迅速かつ効果的にマイクロ流路デバイスを用いてモニタリングするためには、複雑な食品マトリックス中の菌の分離が重要となる。今回は、鶏肉中からサルモネラ属菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) を回収するために、免疫磁気分離の効果を高めるために、ホルムアルデヒド処理を行った。

回収したサルモネラ属菌を蛍光顕微鏡で計測した結果、約 77% の菌を効率的に回収できた。回収したサルモネラ属菌をマイクロ流路デバイスで測定した結果、鶏肉由来夾雑物による測定系への影響は少なく、サルモネラ属菌数を定量できた。また、回収液を濃縮することにより $3.3 \times 10^3 \text{ cells/g}$ から $1.2 \times 10^6 \text{ cells/g}$ の範囲で高精度に定量可能であった ($R^2 = 0.993$)。これらの結果より、免疫磁気分離とマイクロ流路デバイスを併せて用いることで、食品中の危害細菌を 3~4 時間で簡便に検出可能であり、衛生管理に有用であることが示された。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

b 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

c 大阪産業技術研究所

d 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

ホルムアルデヒド処理後の免疫磁気分離法とマイクロ流路を用いた鶏肉中の *Salmonella enterica* serovar Typhimurium の迅速定量

Detection of gamma-irradiated red peppers using a combination of 5,6-dihydrothymidine and thymidine as irradiation indicator

N. FUKUI^a, T. FUJIWARA^{a,c}, M. FURUTA^c,
and S. TAKATORI^b

Radiation Physics and Chemistry, 191, 109849 (2022)
<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2021.109849>

植物性食品のガンマ線照射履歴の検知法を開発した。植物性食品のモデル食品として赤唐辛子を使用した。粉末またはホモジナイズした赤唐辛子を、緩衝液中で proteinase K、RNase A および cellulase で分解し粗 DNA を得た。さらに固相抽出カラムを使用して粗 DNA を精製した。得られた DNA を酵素消化してヌクレオシドに分解した。試験液中のチミジン (dThd) およびその放射線分解生成物である (5S)-および (5R)-5,6-ジヒドロチミジン (DHdThd) をタンデム型質量分析計付き高速液体クロマトグラフ (LC-MS/MS) で測定し、dThd に対する total-DHdThd ((5S)-および (5R)-5,6-DHdThd の和) の比率 (total-DHdThd/dThd) を算出した。ガンマ線照射した赤唐辛子の total-DHdThd/dThd は、照射した線量の増加に伴い増加した。また、非照射の乾燥赤唐辛子は、極微量の total-DHdThd が検出された。これは、赤唐辛子の乾燥工程中に生成したと推定された。この乾燥工程中で生成した total-DHdThd/dThd は、約 1kGy で照射された乾燥赤唐辛子の 1/16~1/4 であり、照射履歴の判定を妨げるものではなかった。本法は、動物性食品に加え植物性食品にも適用できたことから、幅広い食品への適用が期待できる。

Enzyme-linked immunosorbent assay for pork determination in raw and heated meats: combination of monoclonal antibodies to denatured porcine myoglobin and sodium dodecyl sulfate extraction

T. YAMASAKI^a, Y. HIRAKAWA^b, K. MOMMA^b,
Y. MURAKAMI-YAMAGUCHI^c, S. KOTOURA^d,
S. MIYAKE^e and H. NARITA^{b,c}

ACS Food Science & Technology, 2(1), 136-142 (2022)

食肉偽装対策や原材料表示を監視するために食品中の豚肉量を測定するイムノアッセイがいくつか開発されているが、食品の調理・加工によるタンパク質の変性や抽出効率の低下の影響を受けるため、正確な測定が困難だった。本研究では、生肉および食肉加工品中の豚肉を測定するため、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いた抽出法と組み合わせたサンドイッチ ELISA を構築した。モノクローナル抗体の作製には、SDS で変性させた豚ミオグロビン (Mb) と豚 Mb のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドを免疫に用いた。構築したサンドイッチ ELISA は、牛 Mb、鶏 Mb、羊肉、ヤギ肉と交差反応せず、豚 Mb を定量的に測定できた。本法における豚 Mb の 50% 効果濃度は 90 ng/mL であり、牛肉と鶏肉に添加した豚 Mb の回収率は、生および添加後に加熱しても 94~158% であった。また本法は、牛肉に混入した 1% (w/w) の豚肉を生および混入後に加熱されても検出できた。また、脂肪の多いバラ肉を含むさまざまな部位の Mb を定量的に測定でき、HPLC で得られた測定値とも高い相関が得られた。構築したサンドイッチ ELISA は、食肉製品の認証や誤表示の防止への利用が期待できる。

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

c 大阪府立大学地域連携研究機構

赤唐辛子における 5,6-ジヒドロチミジンおよびチミジンを指標としたガンマ線照射履歴の検知

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

b 京都女子大学

c 京都栄養医療専門学校

d 丸大食品(株)中央研究所

e 麻布大学

生肉及び食肉加工品中の豚肉の測定に向けたサンドイッチ ELISA の構築

食品中のアフラトキシン定量分析における
改良法の妥当性評価

吉光真人^a, 内田耕太郎^a, 小阪田正和^a,
松井啓史^a, 上野亮^a, 藤原拓也^a,
阿久津和彦^b, 新矢将尚^a

食品衛生学雑誌, 63(1), 43-46 (2022)

食品中のアフラトキシン分析法として、平成 23 年 8 月 16 日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知（通知）に基づく分析法が定められている（以下、旧分析法）。本研究では、アフラトキシン分析法の操作性と分析性能を向上させるために、イムノアフィニティカラム（IAC）の種類と精製条件の最適化、および旧分析法から IAC 精製後の濃縮乾固の操作の省略を検討し、改良法の構築を目的とした。改良法を用いて、9 種類の試料にアフラトキシン B1、B2、G1、G2 の 4 種類を 2.5 ng/g の濃度で添加して添加回収試験を実施したところ、真度は 77.0～99.7%、室内精度および併行精度はそれぞれ、1.7～5.6%、0.9～3.6%となり、通知の目標値を達成した。また、旧分析法と比較して、改良法はアフラトキシン 4 種類の回収率が 4.3～10.5%向上し、前処理時間が約 1.5 時間短縮された。以上から、改良法は 9 種類の食品に適用可能で、食品中のアフラトキシン分析法として有用であると考えられた。

^a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 1 課

^b 大阪健康安全基盤研究所企画部精度管理室

Validation study on an improved quantitative method for aflatoxins in foods

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^a, M. YOSHIMITSU^b,
K. UCHIDA^b and K. KAJIMURA^c

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）の同時定量が可能な 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、鶏卵成分の分析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

Naturally oxidized olive oil promotes active cutaneous anaphylaxis and Th2 cytokine production

H. OGINO^a, T. OKUNO^a, K. MURANO^b and H. UENO^a

Biological and Pharmaceutical Bulletin, 44(6), 838-843 (2021)

酸化された油脂の過量摂取は、一部のアレルギー疾患を悪化させる可能性がある。我々は以前、酸化オリーブ油が、即時型アレルギー反応の一つである能動皮膚アナフィラキシー(ACA)を悪化させることを報告した。本研究は、ACA 時の T 細胞応答に及ぼす酸化オリーブ油の影響を明らかにするために行った。雌性 BALB/c マウスに、オボルブミン(OVA)/水酸化アルミニウムゲルを感作後、自然酸化オリーブ油を 2 日に 1 回、2 週間経口投与し、その後 OVA を耳介に皮内投与して ACA を惹起させた。酸化オリーブ油の投与は、新鮮なオリーブ油と比較して、OVA 感作 2 週間後の抗原特異的免疫グロブリン E (IgE) 抗体価が上昇し、ACA による血管透過性亢進が認められた。酸化オリーブ油投与マウスでは、リンパ節中ヘルパーT2 (Th2) サイトカインであるインターロイキン (IL) -4、-5、-6、-10 の mRNA 発現量が増加し、脾臓とリンパ節における cluster designation (CD) 3+CD4+細胞の割合も増加した。CD3+CD4+細胞では、IL-4 および Th2 のマスターレギュレーターである GATA-binding protein 3 (GATA3) の mRNA 発現量が、酸化オリーブ油投与群で高値を示し、抗原刺激による特異的な IL-4 産生も同様に促進された。このことから、酸化オリーブ油は、即時型アレルギー疾患において Th2 優位性を促進することにより、ACA を悪化させることが示唆された。

a 摂南大学薬学部

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課
自然酸化オリーブ油は、能動皮膚アナフィラキシーおよび Th2 サイトカイン産生を促進する

Circulation of fibrous microplastic (microfiber) in sewage and sewage sludge treatment processes

S. NAKAO^a, K. AKITA^a, A. OZAKI^b, K. MASUMOTO^c and T. OKUDA^d

Science of the Total Environment, 795, 148873 (2021)

下水処理工程におけるマイクロプラスチック（以下、MPs）の挙動は世界的に調査されているが、下水汚泥処理工程における MPs の挙動を明らかにした研究は少ない。下水中の MPs の多くは汚泥に移行するが、一部は汚泥処理工程から下水処理工程に返流水として戻る。そのため、下水処理場全体では、汚泥処理工程における対策により、MPs の除去率が向上する可能性がある。本研究では、下水処理工程および下水汚泥処理工程から得られた試料を過酸化水素によって有機物の分解を行った。下水試料中の粒子は目開き 20 μm のニッケルフィルターに捕集し、室温で乾燥させた後、顕微 FTIR で MPs を検出・同定した。なお、汚泥サンプルは過酸化水素で処理した後、5.3M NaI 溶液を用いて比重分離した。その後、単位体積当たりの MPs 濃度を算出し、下水と汚泥の流量を用いて MPs の負荷量を推定した。次に、下水処理場における 20 μm 以上の MPs の挙動を明らかにした。流入下水の MPs 負荷を 100%とした場合、12%の MPs が汚泥処理工程から返流水として下水処理工程に戻ることが確認された。このことから、MPs は下水処理と汚泥処理の各プロセスを循環していることが示された。返流水に含まれる MPs は主に汚泥濃縮工程からの排水であり、そのほとんどは繊維状のポリエチレンテレフタレート（繊維状 MPs、すなわちマイクロファイバー：MFs）であると考えられた。このことから、MFs は下水処理および汚泥処理工程を循環しており、MPs の除去率を高めるためには、汚泥処理工程で MFs を除去することが有効であることが示唆された。

a 大阪市立環境科学研究センター

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

c 大阪公立大学大学院工学研究科

d 龍谷大学先端理工学部環境生態工学課程

下水・下水汚泥処理工程における繊維状マイクロプラスチック（マイクロファイバー）の循環

HPLC を用いた畜水産物を主原料とした加工食品 中の残留抗菌性物質分析法の検討

平田祥太郎^{a,b}, 昌山 敦^a, 仲谷 正^a,
星 英之^b, 高取 聡^a

日本食品化学学会誌, 28(3), 138-145 (2021)

本研究ではフォトダイオードアレイ検出器付き HPLC (HPLC-PDA) を用いて畜水産物およびその加工食品を対象とした迅速かつ簡便な残留抗菌性物質分析法の検討を行った。

検討した分析法は以下の通りである。アセトニトリル/メタノール (1:1) 混液およびクエン酸リン酸緩衝液を用いて加工食品から抗菌性物質の抽出を行った。その後、抽出液中の脂質等をアセトニトリル/ヘキサン分配および固相カラムにより除去し、試験溶液を HPLC-PDA で分析した。

添加回収試験により分析法の性能評価をした結果、検討法は良好な真度/精度で加工食品中の 8 種抗菌性物質を分析可能であることが示された。これより、本法は簡便な抽出および精製だけで迅速に畜水産物を主原料とした加工食品中の残留抗菌性物質を評価することが可能であり、一次スクリーニング試験に有用な分析法と言える。

本法では試料量を比較的小量である 5 g でも分析可能であった。分析対象がある程度均質化された加工食品であるため、試料量を減じることで操作性を高めることが出来た。

本法では HPLC カラムにカラム長さ 50 mm、粒子径 1.8 μm の高速分析用カラムを用いることで、1 検体につき 10 分以内で分析値を得ることができた。これより、前処理から測定まで迅速で簡便な試験法を構築することができたと言える。

本研究では焼豚やさつま揚げ等の畜水産物を主原料とした加工食品を対象としたが、それら以外の加工食品には多くの形態があり含まれる成分も多様である。今後は魚介乾製品等の種々の加工食品を対象に本分析法の有効性を検討していく予定である。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

b 大阪府立大学人間社会システム科学研究科

Determination of residual antibacterial substances in processed foods manufactured from livestock and marine products using HPLC

Comparison between mouse bioassay and HILIC-MS/MS for quantification of paralytic shellfish toxin in Japanese basket clams and mussels caught off coastal Osaka Bay in Japan

T. NAKATANI^a, A. MASAYAMA^a,
K. KIYOTA^a, N. KAKUTANI^b,
Y. YAMAGUCHI^a and T. YAMANO^c

Food Additives & Contaminants: Part A, 38(11), 1969-1983 (2021)

麻痺性貝毒 (PSTs) に毒化されたシジミおよびイガイ中の PSTs の量について、マウス試験法および親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)-タンデム質量分析 (MS/MS) の両分析系により測定を行い、結果の比較を行った。その結果、両分析系間の相関係数 (r^2) は、シジミで 0.98 ($n=23$)、イガイで 0.99 ($n=18$) と高い相関を示した。

また PSTs の組成について解析したところ、シジミおよびイガイ中に含有する PSTs の成分は、主に C トキシン類 (C1 および C2) とゴニオトキシン類 (GTX1、GTX2、GTX3、および GTX4) であり、これらの成分により毒量の 80% 以上が占められていた。

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

c 大阪健康安全基盤研究所総務部管理課

麻痺性貝毒 (PSTs) に毒化されたシジミおよびイガイ中における毒量のマウス試験法および HILIC-MS/MS による分析結果の比較

The development of dual-function solid-phase method as extraction and a decomposition reaction media for the determination of a formaldehyde releaser, imidazolidinyl urea, in cosmetics

T. DOI^a, A. TAKEDA^a, A. ASADA^a,
K. KIYOTA^a, T. TAGAMI^a, and T. YAMANO^b

Analytica Chimica Acta, 1191, 338891 (2022)
[Outside Front Cover, Analytica Chimica Acta, 1191,
339464 (2022)]

イミダゾリジニルウレア(IU)はホルムアルデヒド遊離型防腐剤の一種であり、日本でも上限を定めて化粧品への使用が認められている。日本の化粧品基準におけるイミダゾリジニルウレアの名称はN,N''-メチレンビス [N'-(3-ヒドロキシメチル-2,5-ジオキソ-4-イミダゾリジニル)ウレア]とされており、海外でも同じ一般名が当該防腐剤に当てられている。この防腐剤は配合基準があるにもかかわらず、不安定であり定量分析が困難なことが知られている。そこで我々では、イミダゾリジニルウレアを分解物として定量する手法の開発を試みた。

イミダゾリジニルウレアを Sep-Pak NH2 20 cc Vac RC Cartridge (500 mg, Waters 製)の固相上で allantoin 及び(4-hydroxymethyl-2,5-dioxo-imidazolidine-4-yl)-urea (4-HU)の2化合物に分解することで、HPLC を用いて定量することが可能であった。添加回収試験では、回収率が若干低い試料もあったことから、多様な試料での検証が必要であると考えられた。IU は信頼できる定量法が無い防腐剤であり、本法は定量法開発の礎となりうると考えられる。

Human and rat microsomal metabolites of N-tert-butoxycarbonylmethamphetamine and its urinary metabolites in rat

H. KAKEHASHI^a, T. DOI^b, M. WADA^a, T. KAMATA^a,
N. SHIMA^a, A. MIYAKE^a, A. NITTA^a, R. ASAI^a, S.
FUJII^a, S. MATSUTA^a, K. SASAKI^a, H. KAMATA^a, H.
NISHIOKA^a, A. MIKI^a, H. HASEGAWA^c, and M.
KATAGI^a

Forensic Toxicology, 40(1), 75-87 (2022)

N-tert-Butoxycarbonylmethamphetamine (BocMA) はメタンフェタミンの誘導体であり、酸処理によりメタンフェタミンを生じるため、前駆体として乱用されるリスクがある。BocMA の代謝・排泄について明らかにするため、ミクロソームやラットを用いた代謝実験を実施することとした。

BocMA をミクロソーム(ヒト、ラット)とインキュベートし、経時的に試料を採取した。BocMA をラットに腹腔内投与し、72 時間後まで経時的に尿を採取した。液体クロマトグラフタンデム質量分析装置を用い、標準品と比較するなどして、代謝物の確認を実施した。

4OH-BocMA や Boc-norephedrine など、様々な代謝物がミクロソーム反応溶液から検出された。ラットの投与試験では、3 種類の水酸化代謝物のグルクロン酸抱合体が検出された。72 時間後まででは、投与した用量のわずか 0.3% 程度しか BocMA や代謝物が回収できなかった。ミクロソームによる実験、投与実験を通して、メタンフェタミンはいずれも検出されなかった。

代謝経路として、水酸化、カルボニル化、N-脱メチル化などが考えられた。BocMA や第 1 相代謝物は、尿からはほとんど検出されなかった。本研究の結果は、MA を検出した生体試料における、BocMA 摂取の可能性について理解する有用な情報であると考えられる。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

抽出・分解反応場として固相を用いた、化粧品中のホルムアルデヒド遊離型防腐剤イミダゾリジニルウレアの定量法開発

a 大阪府警科学捜査研究所化学研究室

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

c 神戸薬科大学衛生化学研究室

t-Boc メタンフェタミンの、ヒト・ラットマイクロソームおよびラット尿由来代謝物の解析

いわゆる健康食品中に含まれていたタダラフィル
及びタダラフィル類似物質の立体異性体の測定に
ついて

吹譚友秀^a, 山崎 翠^a, 高橋和長^a, 土井崇広^b,
川口正美^b, 榎本啓吾^a, 吉野宏毅^a, 内本勝也^a,
西村真紀^a

食品衛生学雑誌, 62(2), 65-72 (2021)

健康食品に含まれていたタダラフィルおよびタダ
ラフィル構造類似物質であるノルタダラフィルお
よびホモタダラフィルの立体配置を確認した。製品
はインターネットで購入し、タダラフィルを検出し
たはちみつ加工品 1 製品および錠剤 1 製品ならびに
ノルタダラフィルおよびホモタダラフィルを検出
した飴 1 製品を使用し、各製品から各成分を単離精
製した後、円二色性 (CD) 分散計を用いて CD を測
定した。その結果、各製品より単離精製した成分の
CD スペクトルは 6R,12aR 体標準品の CD スペクト
ルと一致したことから、製品に含まれていた成分は
6R,12aR 体であると確認された。タダラフィルは
6R,12aR 体が立体異性体の中で最もホスホジエス
テラーゼ 5 阻害作用が強いという報告があることから、
ノルタダラフィルおよびホモタダラフィルも作用
の強さを期待して、6R,12aR 体を製品に使用した可
能性がある。

Characterization of FRI carbapenemase-producing
Enterobacter spp. isolated from a hospital and the
environment in Osaka, Japan

F. ADACHI^a, T. SEKIZUKA^b, M. YAMATO^c, K.
FUKUOKA^c, N. YAMAGUCHI^a, M. KURODA^b and
R. KAWAHARA^d

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 76(11), 3061–
3062(2021)

FRI 型カルバペネマーゼはヨーロッパにおいて
Enterobacter 属菌で発見されたカルバペネマーゼで、
日本においても報告があるが稀である。我々は、大
阪府において、FRI カルバペネマーゼ産生株を環境
から 2 株、臨床から 1 株分離した。これらの 3 株に
ついて、詳細を明らかにするため、全ゲノム解析に
より、菌種および FRI 遺伝子の同定、その他の薬剤
耐性遺伝子の検索、プラスミドの解析を実施した。

解析の結果、2017 から 2018 年にかけて環境検体
および臨床検体から検出された FRI 様カルバペネ
マーゼ産生株のうち、1 株は FRI-4 カルバペネマー
ゼ産生 *E. asbriae* であったが、残りの 2 株は新型の
FRI-8 カルバペネマーゼ産生 *Enterobacter* sp.、FRI-9
カルバペネマーゼ産生 *E. asburiae* であり、*E.*
asburiae 2 株は異なる系統の株であった。複数の FRI
カルバペネマーゼが同一地域の環境および臨床か
ら検出されていることから、FRI 産生菌が潜在的に
存在している可能性が示唆された。

^a 千葉県衛生研究所医薬品研究室

^b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部医薬品課

The Configuration of Tadalafil and Tadalafil Analogues Found
in Dietary Supplements

^a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

^b 国立感染症研究所

^c りんくう総合医療センター

^d 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

大阪の病院および環境から分離された FRI カルバペネ
マーゼを産生する *Enterobacter* spp. の特性について

Microbial contamination of rubber ducks floating in
bathtubs of bathing facilities, and an evaluation of their
washing methods

A. EDAGAWA^a, N. MATSUDA^b, T. OGURA^c,
K. UEZONO^c, S. IZUMIYAMA^d and A. FUJII^b

Biocontrol Science, 26(4), 187-192 (2021)
<https://doi.org/10.4265/bio.26.187>

近年、多くの入浴施設で「アヒル風呂」と称した多数のゴム製アヒルを浴槽に浮かべるイベントが実施されている。これらゴム製アヒルの内部は水が溜まりやすい構造になっており、バイオフィーム（ぬめり）が発生しやすい。国外の調査では、ゴム製アヒル内部からレジオネラを含むヒトに病原性を有する細菌種が検出されている。

本研究では、営業中の入浴施設の浴槽から湯を機械室に引き入れ、かけ流し式の模擬浴槽を作成した。そこにゴム製アヒルを浮遊させて内部の微生物増殖を調べると共に、これらの洗浄方法について検討を行った。浮遊させたゴム製アヒルは、使用1日後に細菌類の増殖が確認され、5日目にはバイオフィームの定着が示唆された。洗浄法を検討した結果、次亜塩素酸ナトリウム、微弱酸性電解水、水道水のうち、次亜塩素酸ナトリウムが最も洗浄効果が高く、微弱酸性電解水はゴム製アヒルを一晩浸漬する洗浄方法で十分な効果が認められた。本研究において、ゴム製アヒルは適切に洗浄しないと細菌やアメーバの温床となり、バイオフィームが定着して微生物汚染が進むことが示された。

Estimating household exposure to pyrethroids and the
relative contribution of inhalation pathway in a sample of
Japanese children

T. YOSHIDA^a, M. MIMURA^a and N. SAKON^b

Environmental Science and Pollution Research, 28 (15),
19310-19324 (2021)
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-12060-9>

幾つかの合成ピレスロイド剤は、発がん性や生殖毒性を有することが疑われている。しかし、室内で殺虫剤や防虫剤として近年広く使用されているピレスロイド剤 トランスフルトリン、プロフルトリン、メトフルトリンの住宅における室内空気汚染や住民の曝露量についてはほとんど知られていない。本研究では、子どもにおける1日のピレスロイド剤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132名を対象とし、彼らの寝室内空気中の19種のピレスロイド剤の24時間平均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。

主なピレスロイド剤の1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）は以下のとおり推定された（中央値、ng/kg/d）。ビフェントリン：56、トランスフルトリン：22、メトフルトリン：11、プロフルトリン：0.86。また、これらの総摂取量に対する経気道（吸入）吸収量の割合（中央値、%）は、プロフルトリン15、トランスフルトリン14、メトフルトリン1、ビフェントリン0.1であった。トランスフルトリンは、室内空気汚染物質として最も着目すべきピレスロイド剤であると考えられた。本研究より、日本の子どもは、トランスフルトリン、メトフルトリン、プロフルトリンおよびビフェントリンに普遍的に曝露されていることが明らかになった。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 株式会社ヘルスビューティー

c 湘南喜彩湯乃市

d 国立感染症研究所寄生動物部

入浴施設の浴槽に浮かべて使用するゴム製アヒルの微生物汚染とその洗浄方法の検討

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

子どもにおける住宅内でのピレスロイド剤の曝露と室内空気質の寄与

Estimating household exposure to moth repellents *p*-dichlorobenzene and naphthalene and the relative contribution of inhalation pathway in a sample of Japanese children

T. YOSHIDA^a, M. MIMURA^a and N. SAKON^b

Science of the Total Environment, 783, 146988 (2021)
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146988>

住宅等室内環境中で主に防虫剤として使用される *p*-ジクロロベンゼ (DCB) とナフタレン (NP) は、共に、発がん性を有することが疑われている。本研究では、子どもにおけるすべての曝露経路を介した DCB および NP の 1 日総摂取量と総摂取量に及ぼす彼らの自宅室内空気質の影響について調査した。

6～15 歳の調査対象者からの起床直後の排尿試料と寝室の空気試料とを採取し、空气中 NP および DCB とそれらの尿中代謝物を測定した。各化合物の空气中濃度と対応する代謝物の尿中排泄量との間に有意な相関性が検出された。在宅中の子どもにおける吸入による DCB および NP の吸収量は、それぞれ 26、2.0 ng/kg/h (中央値) であり、1 日総摂取量は、それぞれ 2.4 および 0.90 µg/kg/d (中央値) と推定された。DCB および NP の総摂取量に対する吸入吸収量の割合 (中央値) は、それぞれ 30%、5% であった。これらの化合物の室内空气中濃度がそれぞれ各ガイドライン値の半分以上である住宅で暮らす子どもでは、主要な曝露経路は室内空気中からの吸入であると考えられた。DCB の室内濃度は、対象住宅の 22% で生涯過剰発がんリスクレベル 10^{-4} を超過し、住宅の 9% で 10^{-3} を超えた。

本調査結果より、DCB による日本の子どもの健康への悪影響を防ぐためには、住宅内空气中 DCB 濃度の更なる低減化が必要であることが示唆された。

^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
 子どもにおける住宅内での防虫剤 *p*-ジクロロベンゼンおよびナフタレンの曝露と室内空気質の寄与

水道水中におけるペルフルオロおよびポリフルオロアルキル化合物の分析法検討

高木総吉^a, 吉田 仁^a

水道協会雑誌, 90(6), 2-15 (2021)
https://doi.org/10.34566/jwwa.90.6_2

水道中の PFOS と PFOA を含むペルフルオロおよびポリフルオロアルキル化合物 (PFASs) を分析するために、標準品、容器、抽出固相および内部標準物質の検討を行った。

その結果、標準品の中には直鎖以外の化合物も含まれているものがあつた。プラスチック製の容器には炭素鎖の長い PFASs が吸着した。抽出用の固相は弱アニオン交換系の固相が最も種類の PFASs を回収できた。内部標準物質の使用により、前処理時の経路等への吸着による回収率の低下を補正できた。水道水を用いて妥当性評価を実施した結果、妥当性評価のガイドラインの目標を満たした。水道水に PFOS・PFOA 以外の PFASs も存在していることがわかった。

^a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

Development of an analytical method for per- and polyfluoroalkyl substances in drinking water

GC/MS ターゲットスクリーニング分析法の水道原水および浄水への適用

高木総吉^a, 長谷川有紀^a, 小池真生子^a,
吉田 仁^a, 安達史恵^a, 山口進康^a

環境科学会誌, 35(2), 49-58 (2022)

<https://doi.org/10.11353/sej.35.78>

迅速かつ網羅的に濃度把握が可能なターゲットスクリーニング分析法（スクリーニング分析法）の水質検査手法としての有用性を検証するために、169種の農薬について実際の水道原水および浄水試料を対象に、ガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）を用いたスクリーニング分析法を適用し、その定量精度を評価した。

その結果、標準検査法で得られた定量値との濃度比は 0.14~2.8 となり、検査対象の農薬類の絞り込みや、検出濃度のオーダーを把握するには十分適用できる定量精度を持つ方法であることが明らかとなった。また、分析装置が汚れている場合や検出器が劣化している場合、その定量値の誤差が大きい農薬があり、スクリーニング分析法を行う場合には装置の状態管理が重要であることがわかった。さらに、スクリーニング分析法で取得したデータをレトロスペクティブ分析することにより、データベースに登録されていない農薬類を同定・定量できることがわかった。

このことより、スクリーニング分析法は検査法として簡便に農薬類を測定できるだけでなく、そのデータを追加解析することにより、未知の化学物質の存在状況を把握することにも利用できることが明らかとなった。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課
Application of GC-MS target screening analysis for raw and drinking water samples

液体クロマトグラフィー質量分析による水道水中の陰イオン 6 種の一斉分析法の検討と妥当性評価

小林憲弘^a, 高木総吉^b, 木下輝昭^c, 仲野富美^d,
古川浩司^e, 粕谷智浩^f, 松巾宗平^g, 寺中郁夫^h,
山本 剛ⁱ, 米久保淳^j, 田中誠也^k, 丹羽宏之^l,
会田祐司^m, 高原玲華ⁿ, 齊藤香織^o, 五十嵐良明^a

水環境学会誌, 45(2), 51-66 (2022)

<https://doi.org/10.2965/jswe.45.51>

水道水質基準や目標値が設定されている 6 種類の陰イオンを一斉分析可能な LC/MS あるいは LC/MS/MS 分析条件を検討した。さらに、本研究で確立した分析条件が、様々な種類の水道水や機種に適用できるかどうか検証するために、15 機関で分析法のバリデーション試験を実施した。

水道水を用いた添加回収試験の結果、臭素酸、塩素酸、亜塩素酸、過塩素酸の 4 物質は、それぞれ 12 機関以上が良好な分析精度が得られたことから、本分析法は水道水に含まれるこれら 4 種類の陰イオンを高精度に一斉分析可能と考えられる。ただし、チオ硫酸ナトリウムによる亜塩素酸の分解が見られたことから、亜塩素酸を分析する場合には EDA で脱塩素処理を行う必要がある。

a 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生部第三室
b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課
c 東京都健康安全研究センター事業環境科学部
d 神奈川県衛生研究所理化学部
e 一般財団法人三重県環境保全事業団
f 一般財団法人千葉県薬剤師会検査センター
g 一般財団法人岐阜県公衆衛生検査センター
h 埼玉県企業局水質管理センター
i 米子市水道局水質管理課
j 日本ウォーターズ株式会社
k アジレント・テクノロジー株式会社
l 株式会社島津製作所
m 株式会社エービー・サイエックス
n ジーエルサイエンス株式会社
o サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
Development and validation of a simultaneous analytical method for six anions in drinking water by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS)

大阪府内浄水場の水道原水および浄水中における
イプフェンカルバゾンの存在実態

長谷川有紀^a, 小池真生子^a, 高木総吉^a, 吉田 仁^a,
安達史恵^a, 小泉義彦^a, 中島孝江^a, 竹中凜代^b,
山口進康^a

環境科学会誌, 35(2), 59-66 (2022)
<https://doi.org/10.11353/sesj.35.70>

大阪府内浄水場 10 地点を対象に、水道水質検査における要検討農薬類であるイプフェンカルバゾンの存在実態を固相抽出-液体クロマトグラフィー質量分析計による分析法を用いて調査した。その結果、水道原水中のイプフェンカルバゾンは、夏季において 6 地点から 0.0013~0.14 µg/L、冬季において 4 地点から 0.00077~0.0020 µg/L の範囲で検出された。水源別にみると表流水および伏流水から検出された。浄水中では夏季において 5 地点から 0.00066~0.086 µg/L の範囲で、冬季において 2 地点から 0.0014 µg/L および 0.0015 µg/L で検出された。イプフェンカルバゾンの検出濃度を厚生労働省が定める目標値 (2 µg/L) と比較した結果、目標値を超過した地点は存在しなかった。浄水場の水道原水および浄水中の検出濃度から除去率を算出したところ、本研究で対象とした高度浄水処理がイプフェンカルバゾンに対して有効であると考えられた。

高度浄水処理による臭化物 (臭化物イオン)
およびその消毒副生成物の処理特性

吉田 仁^a, 小泉義彦^a, 高木総吉^a, 安達史恵^a, 中
島孝江^a, 長谷川有紀^a, 小池真生子^a, 中村美沙希^b,
孝石 健^c, 高田裕志^c, 小田原光弘^b, 山口進康^a

水道協会雑誌, 91(2), 2-13 (2022)

臭化物 (臭化物イオン) およびその消毒副生成物の高度浄水処理による処理性を調べた。凝集沈殿処理によりトリハロメタン類およびハロ酢酸類生成能が減少したため、臭化物イオンによる消毒副生成物に対して一定の効果があることが示された。オゾンおよび粒状活性炭 (GAC) 処理では、ジブロモクロロメタン、ブロモホルム、総トリハロメタン、ジブロモクロロ酢酸、ジブロモ酢酸およびトリブロモ酢酸生成能が減少した。一方、臭化物イオン濃度は減少せず、臭化物イオンとオゾンとの反応で臭素酸が生成し、GAC では減少しなかった。臭化物イオンが高度浄水処理施設の水道水源に流入した際は、オゾン注入率の調整等の対策を講じる必要があると考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪府健康医療部生活衛生室環境衛生課

Ipfencarbazone in raw and finished water at water purification
plants in the Osaka Prefecture

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪広域水道企業団水質管理センター

c 大阪広域水道企業団庭久保浄水場

Advanced water treatment for the removal of bromide ions and
associated disinfection by-products

繊維製品に含まれる防炎加工剤のビス (2,3-ジブromoプロピル) ホスフェイト及びトリス (2,3-ジブromoプロピル) ホスフェイトの GC-MS 分析法

大嶋智子^a, 角谷直哉^b, 山口之彦^c, 河上強志^d

YAKUGAKU ZASSHI, 142 (3), 279-287 (2022)

<https://doi.org/10.1248/yakushi.21-00197>

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律 (昭和 48 年 10 月 12 日法律第 102 号) で規制される有機リン系防炎加工剤のトリス(2, 3-ジブromoプロピル)ホスフェイト (TDBPP) 及びそのビス体の BDBPP 化合物の分析法は、それぞれ 1978 年、1981 年に規制されて以降、40 年以上が経過しており、現在の分析水準と乖離している状況にある。そこで、現在汎用されている GC-MS による微量分析へ対応させると共に、発がん性のあるベンゼンから、より安全な酢酸エチルに使用溶剤を変更、さらに、発がん性や爆発性の恐れのある自家調製のメチル化試薬を、市販の安全性の高い試薬へ変更することで、分析者の健康影響に配慮した分析法を開発した。

その結果、検量線は BDBPP-Me 及び TDBPP いずれも 0.5-8.0 µg/mL の範囲で良好な直線性が得られた。検出限界は BDBPP-Me 0.05 µg/g 及び TDBPP 0.3µg/g となり、現行試験法の開発時の検出限界 (各 10 及び 8 µg/g) を充分下回った。サロゲート物質を定量に用いることで、素材の違いにかかわらず良好な添加回収試験結果が得られた。それを基に開発した試験法の妥当性を評価し、十分な真度、併行精度及び室内再現性が得られたことから、本試験法は家庭用品規制法における繊維製品中の BDBPP 化合物及び TDBPP の改正試験法案として有効であると考えられた。内部標準物質を用いた分析についても検討を行い、スクリーニング法として有用と推察された。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部

c 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学 2 課

d 国立医薬品食品衛生研究所

Analysis of flame retardants bis (2, 3-dibromopropyl) phosphate and tris (2,3-dibromopropyl) phosphate in textile products by GC-MS

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) における繊維製品中防虫加工剤試験法改定に係る検討

西以和貴^a, 上村仁^a, 大嶋智子^b, 菅谷なえ子^c, 印南佳織^d, 田畑佳世^e, 河上強志^f

YAKUGAKU ZASSHI, 141 (8), 1031-1040 (2021)

<https://doi.org/10.1248/yakushi.21-00058>

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律 (昭和 48 年 10 月 12 日法律第 102 号) において規制される繊維製品の防虫剤ディルドリン及び 4,6-ジクロル-7-(2,4,5-トリクロルフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール [4,6-dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethyl benzimidazole; DTTB] の分析法は、1978 年、1982 年に導入されてから約 40 年が経過しており、現在の分析技術水準との乖離が指摘されている。本研究では、先行研究において開発された効率性・安全性に優れた繊維製品中のディルドリン・DTTB 改良試験法の妥当性を複数機関によって検討した。

妥当性評価試験は、規制値及び規制値の 1/10 に調製された 2 試料、規制導入前に流通していた 3 試料を各機関で分析した。その結果、多くの機関で良好な真度、併行精度及び室間精度が得られ、開発した試験法の有効性が示された。過去に流通していた 3 試料の結果は、機関内及び機関間で分析値にばらつきは少なく、本法が有効であると考えられた。以上の結果から、本法は改正試験法として妥当であると考えられた。一方、1 機関で低値を示した。その一因は、GC-MS 分析におけるマトリックス効果によるものと考えられ、マトリックス効果対策に PEG を用いたところ、真度の改善が認められた。

a 神奈川県衛生研究所

b 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

c 横浜市衛生研究所

d 千葉県衛生研究所

e 堺市衛生研究所

f 国立医薬品食品衛生研究所

Examination of analytical method for mothproofing agents to revise the official methods based on "Act on the control of household products containing harmful substances"

医薬品製造施設を想定した室内環境における
微小粒子の滞留と換気による除去

味村真弓^a, 馬場貴志^b, 和田匡司^c, 古内正美^c,
那須正夫^d

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス,
52(8), 657-661 (2021)

細菌の室内環境中での滞留、沈降と換気による除去に関する基礎的知見を得るため、常温下、気流速度 0.1 m/s 以下の実験室内に設置した簡易チャンバー内において、粉碎した土壌を充填したプランターに送風機で送風し、発じんさせた後、滞留させ、換気を行った。その間、粒径情報を提供する光学式パーティクルカウンターを用いて、0.5～2、2～5、5～10、10～20、20～30 μm 、>30 μm の 6 段階の粒径について室内空間中の浮遊粒子数を連続測定した。5 m/s で送風直後は 0.5～30 μm 以上の全ての粒径で発じんが認められたが、5 μm を超える粒子は、短時間で経時的に粒子数が減少し、更にその減少速度は粒径が大きいほど速かった。一方、5 μm 以下の粒子は長時間にわたって空間中に滞留した。室内環境において、5 μm 以下の微小粒子を除去するためには、「気流」すなわち換気による制御が必要となる。

医薬品製造環境の空気清浄度は 0.5～5.0 μm 未満と 5.0 μm 以上の粒子数（個/ m^3 ）で規定されているが、パーティクルカウンターによるリアルタイムモニタリングに当たっては、粒径情報も得ることができる装置を用い、微小粒子数と粒径分布の関係を元に微生物汚染を推定することが可能になるものと考えられた。

a 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

b 株式会社エーイーエスラボ

c 金沢大学理工研究域地球社会基盤学系

d 大阪大谷大学大学院薬学研究科

Suspension of fine particles in air and their removal by
ventilation in an indoor environment as a model of a
pharmaceutical manufacturing facility

日本における *Staphylococcus argenteus* の分布状況調査と 分離菌株の性状解析

若林友騎

Isolation and characterization of *Staphylococcus argenteus* strains in Japan

Yuki Wakabayashi

I 緒言

Staphylococcus argenteus は、2015 年に正式に命名された *S. aureus* complex の新種である。*S. argenteus* は、皮膚軟部組織感染症や骨関節感染症、敗血症など多様な疾患を引き起こす病原細菌であり、日本を含む世界各国で臨床検体から分離されている。また、*S. argenteus* の一部の菌株は、ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) を産生し、食中毒の原因菌となることが知られている。これまでに、2010 年に東京都で、2014 年と 2015 年に大阪府で、2018 年に秋田県でそれぞれ *S. argenteus* による食中毒事例が発生している。いずれの事例からも B 型 SE 産生性の *S. argenteus* が分離されている。

ヒト臨床検体からの *S. argenteus* 検出例が数多く報告されている一方で、食品中や環境中における本菌の分布状況はほとんど明らかになっていない。本研究では、食品衛生学的観点から日本における本菌の汚染実態を調査し、分離菌株の性状を解析した。これによって、国内における本菌の分布状況を明らかにするとともに、国内分離株の遺伝学的な背景を明らかにすることを目指した。

II 日本における *S. argenteus* 分布状況調査

大阪府内で市販される食品 642 検体について *S. argenteus* の汚染状況を調査した。*S. argenteus* は鶏肉 151 検体中 21 検体 (13.9%) から分離されたが、その他の食品からは分離されなかった。大阪府内
大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

の 2 か所の食鳥処理場において、羽や糞便、施設拭取り検体など合計 357 検体を調査したところ、1 か所の食鳥処理場で採材した 14 検体から *S. argenteus* が分離された。食品および食鳥処理場から分離した 35 株の *S. argenteus* 株について全ゲノム配列を解読し、コアゲノム上の一塩基変異 (SNV) に基づく系統解析を実施したところ、食鳥処理場から分離した 13 株の間で検出された pairwise SNV は、17 SNV 以内であった。異なる採材時期に分離された菌株が互いに近縁なゲノムを有していたことから、食鳥処理場内に同一起源をもつ *S. argenteus* のクローンが、一定期間定着していたことが示唆された。さらに、市販鶏肉から分離した 1 株は、食鳥処理場分離株との pairwise SNV が最大で 15 SNV と、遺伝的に極めて近縁であったことから、鶏肉は食鳥処理場内で *S. argenteus* に汚染される可能性が考えられた。

続いて、調理人手指・調理環境拭取り検体、ならびに加工食品から分離されたコアグラゼ陽性ブドウ球菌 191 株の菌種を同定した。191 株中 14 株 (7.3%) が *S. argenteus*、残りの 177 株が *S. aureus* と同定された。14 株の *S. argenteus* の内訳は、9 株が手指由来、4 株が調理器具由来、1 株が食品由来であった。分離菌株の全ゲノム配列解析の結果、調理人手指と調理器具から分離された菌株が、同一クローンに由来することが示唆された。調理現場においては、調理人手指を介して、調理器具が *S. argenteus* に汚染されると考えられた。

最後に、大阪健康安全基盤研究所でこれまでに分離・保存したブドウ球菌株について、再同定試験を実施し、*S. argenteus* の分離実態について調査した。対象とした 1185 株中 67 株 (5.7%) が *S. argenteus* と同定された。

III 分離菌株の性状解析

保有する *S. argenteus* 95 株について、遺伝子型別、病原因子保有状況調査、ならびに薬剤感受性試験を実施した。95 株は、multilocus sequence typing によって 13 の sequence type (ST) に型別された。ST1223 が 31 株と最多で、次いで、ST2250 が 27 株、ST2854 が 16 株、ST5961 が 6 株、ST2198 が 5 株であった。タイや中国で実施された研究では、分離株に占める ST2250 の割合が高いことが報告されており、日本の *S. argenteus* 分離株は国外とは異なる遺伝子型分布である可能性が考えられた。B 型 SE 遺伝子が 95 株中 27 株 (28.4%) から検出されたのをはじめとして、複数の型の SE 遺伝子が多く多くの菌株で検出された。毒素性ショック症候群毒素-1 遺伝子が 1 株から検出されたが、Panton-Valentine Leukocidin 遺伝子を有する株は 1 株も検出されなかった。調査した 16 薬剤の 1 種類以上に耐性を示した株は 23 株で、分離株の 75.8%にあたる 72 株はすべての抗菌薬に感受性であった。国内で分離した *S. aureus* と比較して、*S. argenteus* は薬剤耐性株の割合が有意に低かった。また、国外で実施された調査結果と比較して、薬剤耐性 *S. argenteus* の割合が低く、国内の *S. argenteus* は薬剤耐性化が進んでいないことが明らかになった。

IV *S. argenteus* のパンゲノム解析

保有する 71 株の *S. argenteus* 国内分離株の全ゲノム配列を解読した。また、データベースから 415 株の *S. argenteus* の全ゲノム配列情報を取得し、合計 486 株の *S. argenteus* ゲノムに基づくパンゲノム解析を実施した。*S. argenteus* はオープンパンゲノムを有していたが、全遺伝子に占めるコア遺伝子の割合が平均約 71%と、他菌種と比較して高い割合であった。公共データベースである virulence factor database に登録されている *Staphylococcus* 属菌の病原因子遺伝子を対象として、各菌株の病原因子遺伝子保有状況を blast 検索したところ、細胞接着に関する遺伝子、菌体外酵素遺伝子、免疫逃避に関する遺伝子、分泌装

置に関する遺伝子、および鉄獲得に関する遺伝子は、すべての遺伝系統の株が共通に保有していた。*selx* を除く SE 遺伝子については、その多くが各遺伝系統に特徴的に検出されるアクセサリ遺伝子であり、可動性遺伝子上にコードされていた。ペニシリン耐性に寄与する *blaZ* 保有株からは、*blaZ* 非保有株と比較して、プラスミドレプリコンタイプ *rep5a* および *rep16* が有意に検出された。日本の分離株は国外分離株と比較して、*blaZ* 保有株の割合、ならびに *rep5a* および *rep16* 保有株の割合が有意に低かった。また、メチシリン耐性に寄与する *mecA* について、*in silico* で SCC*mec* 型別を実施したところ、複数の型の SCC*mec* が検出され、同じ SCC*mec* が遺伝系統をまたいで検出された。データベースからメタデータが取得できた株を比較したところ、SCC*mec* IVc を保有する株はすべてヨーロッパから分離されていた一方で、SCC*mec* Ia を保有する株は、すべてカナダの分離株であった。

V 結論

S. argenteus が鶏肉および食鳥処理場から分離された。また、調理従事者手指および調理器具から *S. argenteus* が分離された。全ゲノム配列解析の結果、鶏肉由来株と食鳥処理場由来株、ならびに、調理従事者手指由来株と調理器具由来株は、それぞれ互いに遺伝的に近縁であった。国内で分離した *S. argenteus* 株は、ST1223 や ST2250 など、国外でも分離されている系統と同じ遺伝系統に分類されたが、その検出割合が異なっていた。また、薬剤耐性の傾向も国外分離 *S. argenteus* 株とは異なっていた。パンゲノム解析の結果、多くの病原因子遺伝子がすべての *S. argenteus* 株で保存されていた。一方で、薬剤耐性遺伝子は、遺伝子系統とは無関係に検出され、*S. argenteus* が各国に拡散したのちに、独立して耐性遺伝子を獲得したと考えられた。

謝 辞

本論文作成にあたり、ご指導いただきました大阪公立大学大学院獣医学研究科三宅眞実教授に厚くお礼申し上げます。食鳥処理場におけるサンプリングには、熊井優子所長（研究当時）をはじめとする大阪府食鳥検査センターのみなさまに、食品衛生検査分離ブドウ球菌株の収集・保存については、久米田

裕子所長（研究当時）をはじめとする大阪食品衛生協会食品検査センターのみなさまにご協力いただきました。大阪健康安全基盤研究所の保存菌株調査では、細菌課の余野木伸哉主任研究員、微生物課の梅田薫主幹研究員にご協力をいただきました。本研究は、これらの検体および菌株なしには成り立たない研究であり、心より感謝申し上げます。また、全ゲノム配列解析にご協力くださいました大阪公立大学大学院理学系研究科の徳本勇人講師、吉原静恵助教、ならびに村松順子様に感謝申し上げます。最後に、本研究や日頃の業務について、ご指導・ご助言いただきました、大阪健康安全基盤研究所細菌課の皆様には感謝いたします。

（本稿は、著者が大阪府立大学大学院生命環境科学研究科において令和4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。）

Wakabayashi Y, Takemoto K, Iwasaki S, Yajima T, Kido A, Yamauchi A, Kuroiwa K, Kumai Y, Yoshihara S, Tokumoto H, Kawatsu K, Yasugi M, Miyake M. Isolation and characterization of *Staphylococcus argenteus* strains from retail foods and slaughterhouses in Japan. Int J Food Microbiol. 2022; 363: 109503.

編集委員

池森 亮
井原 隆
内田耕太郎
梅川奈央
改田祐子
中村暁彦
長谷川有紀
馬場 孝
昌山 敦
○森 治代
山中靖貴
(○編集委員長)

査読者

阿久津和彦
阿部仁一郎
上村聖子
入谷展弘
改田 厚
柿本幸子
河合高生
新矢将尚
高取 聡
田上貴臣
西尾孝之
福井直樹
昌山 敦
森川佐依子
山口之彦
山口瑞香
山元誠司
吉田俊明

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

研究年報 第6号 令和4年度

ISSN 2433-5819

(無断転載禁止)

令和5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3号

電話 06-6972-1321