

ISSN 0285-5801

ANNUAL REPORT
OF
OSAKA CITY INSTITUTE
OF PUBLIC HEALTH
AND
ENVIRONMENTAL SCIENCES

平成 28 年度

大阪市立環境科学研究所報告
調 査 ・ 研 究 年 報

《第79集》

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

大阪市立環境科学研究所センター

目 次

調査・研究報告

報文・研究ノート・技術報告

2016 - 2017 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行

入谷展弘・他 1

2016-2017 シーズンは、大阪市で胃腸炎 125 事例(83.9%)がノロウイルス(NoV)陽性であった。検出された NoV 株を遺伝子型別したところ、GII.2 が最も多く(69.6%)、次いで GII.17(10.4%)であった。GII.2 事例は 11 月～12 月に低年齢層の施設を中心に多発した。

アイスクリーム製造施設の *Listeria monocytogenes* 汚染状況

中村寛海・他 5

大阪市内のアイスクリーム製造施設 3 施設から採取した 89 検体および市販のアイスクリーム類 17 検体、計 106 検体についてリステリア汚染状況を調べた。その結果、全ての検体からリステリア属菌は検出されなかった。アイスクリーム類は食品衛生法で成分規格が定められていることから、製造者の衛生管理意識が高い食品であると考えられた。

2016/17 シーズンの季節性インフルエンザウイルス分離状況 - 大阪市

久保英幸・他 11

2016/17 シーズンの大阪市内におけるインフルエンザは、流行開始時期は 2016 年 11 月上・中旬、流行ピークは 2017 年 1 月下旬となった。この状況は、全国においても同様に認められた。分離されたインフルエンザウイルスは、AH3 が 90.7%を占めて主流となり、シーズン全般を通して分離された。また、AH3 が流行の主流となったのは、2014/15 シーズン以来 2 年ぶりのことであり、これは全国においても同様であった。

LC-MS/MS による植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討

村上太郎・他 17

本研究では液体クロマトグラフ質量分析装置による植物毒の迅速一斉分析法の検討を行った。分離条件の最適化によって、13 種の植物毒を 1 測定 10 分間での迅速な分離が可能となった。尿とカレーから抽出した 13 種の植物毒は 50-200%の回収率を満たしており、食中毒発生の際には迅速な対応が可能である。

水蒸気蒸留 固相抽出 HPLC 法による加工食品中の保存料の含有量調査

新矢将尚・他 23

水蒸気蒸留 固相抽出 HPLC 法による保存料 4 成分(安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、プロピオン酸)の一斉分析法を、加工食品の分析に適用した。いずれの保存料についても、本法では加工食品の種類を問わず良好な回収率が得られ、また通知法による分析結果と比較しても良好な相関関係が認められたことから、本法は通知法と同等に有効であることが示された。

大阪市内河川における人工甘味料の分布状況

山口之彦・他 29

大阪市内河川の20か所より採水し、5種類の人工甘味料(AS)について既法を改良した一斉分析法を用いASの濃度を測定した。アセスルファム、サッカリンおよびスクラロースが検出され、それらの濃度範囲はそれぞれ、0.1-5.6、<0.01-1.1、0.13-3.9 µg/Lであった。濃度の高い地点の上流には、大阪市および大阪府の下水処理場があり、河川水中のASの起源の一つとして、下水処理場が考えられた。

大阪市内河川における降水量と大腸菌群数の関係

大島 詔・他 35

大阪市内河川における21地点で2000年4月から2015年3月までの期間に観測された大腸菌群数を重回帰モデルにより解析した。モデル式には観測の当日から7日前までの日ごとの降水量を含む全11変量を用いた。解析により大腸菌群数の数は前日降水量の影響を強く受けていることがわかり、前日の3 mm、10 mmの降水量は大腸菌群数をそれぞれ1.4~2.0倍、2.0~10.3倍に押し上げることがわかった。線形予測により2020年と2027年の大腸菌群数を比較したところ、1000 MPN/dLを超過する地点の数は12地点から10地点となり、5000 MPN/dLを超過する地点数は3のままで変わらなかった。今後、大阪市内河川の大腸菌群数は徐々に減少していくものと予想された。

土壌または底質中の鉛と希土類を測定できる分析法の開発

加田平賢史・他 43

土壌や底質試料中の鉛と希土類を抽出する手法を検討した。王水を用いた分解法では鉛が完全に抽出できず、硝酸とフッ化水素酸、過酸化水素水の混酸を用いた分解法では、希土類の回収率が低かった。王水抽出と混酸抽出を結合した逐次抽出法では、鉛、希土類ともに抽出することができ、回収率はほぼ100%であった。

2016年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物

中村寛海・他 49

2016年に食中毒、有症苦情などで当研究所に搬入された検体106件のうち、81件で下痢原性微生物が検出された。全国的な傾向と同様、ノロウイルス(38件)とカンピロバクター(36件)の検出が多く、これらを原因とする食中毒を予防するための対策が望まれる。

学位論文概要

ダイオキシン類を中心とする残留性有機汚染物質(POPs)の環境動態と発生源の解析に関する環境化学的研究

先山孝則 55

他紙発表及び学会発表要旨

59

調 查 · 研 究 報 告

2016 - 2017 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行

入谷展弘¹⁾、上林大起^{1),2)}、改田厚¹⁾、阿部仁一郎¹⁾、
山元誠司¹⁾、久保英幸¹⁾、平井有紀¹⁾、野田衛³⁾、小笠原準¹⁾

Epidemic of noroviruses in Osaka City, Japan during 2016 - 2017 season

Nobuhiro IRITANI¹⁾, Daiki KANBAYASHI^{1),2)}, Atsushi KAIDA¹⁾, Niichiro ABE¹⁾,
Seiji P. YAMAMOTO¹⁾, Hideyuki KUBO¹⁾, Yuki HIRAI¹⁾, Mamoru NODA³⁾ and Jun OGASAWARA¹⁾

Abstract

During the period from September 2016 to June 2017 (2016 - 2017 season), norovirus was detected as the cause of 125 gastroenteritis outbreaks (83.9 %) in Osaka City, Japan. The most common genotype in that season was GII.2 (87 outbreaks, 69.6 %), followed by GII.17 (13 outbreaks, 10.4 %) and GII.4 (9 outbreaks, 7.2 %). The GII.2 outbreaks peaked in November - December 2016. Of the 87 GII.2 outbreaks, 76 (87.4 %) were attributed person-to-person contact and the places were mainly in nursery and primary schools (74 outbreaks), indicating that GII.2 strains were prevalent in children during 2016 - 2017 season.

Key words: Norovirus, Outbreak, GII.2, 2016 - 2017 season

I 緒 言

ノロウイルス(NoV)は乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層のヒトに感染し、急性胃腸炎を引き起こす。NoV による胃腸炎は一年を通して発生し、秋から冬に大きく流行する。ヒト NoV はゲノム遺伝子配列の解析から Genogroup I (GI), GII および GIV の 3 種類の遺伝子グループに分類され、GI および GII が毎年流行している[1,2]。GI と GII には、さらに複数の遺伝子型が存在しており[3]、GII.4 に分類される NoV の新しい亜型が世界的な感染拡大と流行を周期的に起こしていることが明らかにされている[4]。2014 - 2015 シーズンには日本や中国などアジアを中心に、非常に稀な遺伝子型であった GII.17 の流行が認められた[5-8]。一方で、他の遺伝子型が流行することも報告されている[9-12]。

このように多くの種類の遺伝子型の NoV が流行している現状を踏まえ、当研究所では、大阪市における NoV 流行実態を把握するために検出された NoV 株の遺伝子型別を行い、流行解析を実施している[9,10]。今回、2016 - 2017 シーズンに大阪市で検出された NoV 株について分子疫学的解析を実施した。

II 材料と方法

1) 検査材料

2016 年 9 月～2017 年 6 月までの期間(2016 - 2017 シーズン)に大阪市立環境科学研究所(2017 年 4 月以降は大阪健康安全基盤研究所天王寺センター)に搬入された非細菌性胃腸炎 149 事例(患者糞便 545 検体)を対象とした。

2) NoV の検出および遺伝子型別

糞便材料の処理は既報の方法に準じて行った[10]。ウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて QIAcube (QIAGEN) で行った。NoV 遺伝子の検出は、リアルタイム RT-PCR 法を用いて Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック)で行った[13,14]。

リアルタイム RT-PCR 法で陽性となった検体は、既報[15]のプライマーペアを用いて、GeneAmp PCR System 9700 (サーモフィッシャーサイエンティフィック)または Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (サーモフィッシャーサイエンティフィック)で Capsid N/S 領域の遺伝子を

1) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka Institute of Public Health, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター
〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69
Osaka Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

3) 国立医薬品食品衛生研究所
〒210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-26
National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 210-9501, Japan

増幅した。特異的遺伝子断片の増幅が認められた検体はダイレクトシーケンス法により、Applied Biosystems 3130または 3500 ジェネティックアナライザ（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて塩基配列を決定した。NoVの遺伝子型別はNorovirus Genotyping Tool Version 2.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool/#/>)を用いて行った。

III 結果

NoV は 149 事例中 125 事例(83.9%)、患者糞便材料 545 検体中 391 検体(71.7%)から検出され、NoV 事例の 71.2%は 11 月(43 事例)および 12 月(46 事例)に発生していた(図 1)。NoV 陽性 125 事例のうち、ヒト-ヒト感染が疑われた(PP)事例は、少なくとも 97 事例(77.6%)認められた。主な原因施設は保育所(69 事例)および小学校(23 事例)であり、他は高齢者施設(2 事例)、社会福祉施設(1 事例)、その他(2 事例)であった。カキ以外の食品が原因として疑われた事例は 12 事例(9.6%)であった。カキの喫食が関連していた事例は 2 事例(1.6%)あり、12 月および 1 月の発生であった。

検出された NoV の遺伝子型は少なくとも 9 種類(GI: 3 種類、GII: 6 種類)に分類された。GII.2(複数検出事例を含めて 87 事例、69.6%)が最も多く、次いで GII.17(複数検出事例を含めて 13 事例、10.4%)であった(表 1)。GII.4 は 9 事例(7.2%)と例年に比べて少なかった。

シーズンで最初の NoV GII.2 事例は 2016 年 10 月に保育所で発生した。その後、11 月(34 事例)および 12 月(37 事例)の 2 か月間に集中して発生し、3 月まで認められた。NoV GII.2 事例の中で、87.4%(76/87 事例)

が PP 事例であり、主に子どもが関連する施設(保育所 53 事例、小学校 21 事例)において発生していた(図 2)。これらの発生施設は大阪市 24 区中 22 区にわたり、1 区あたり 1~8 施設の発生であり、地理的・時間的な偏りはなかった。疫学調査においても各事例間の関連性は認められなかった。また、NoV GII.2 事例のうち、カキ以外の食品が原因として疑われた事例は 4 事例、カキの喫食が関連していた事例は 2 事例であった。

Capsid N/S 領域の塩基配列(282 塩基)の比較から、2016 - 2017 シーズンに検出された GII.2 株の中で、83 事例から検出された株は互いに非常に近縁であり(塩基配列相同性 97.1%)、同時期に国内他地域で検出された株(GenBank 番号 LC279238)やドイツ(KY357454)[16]、中国(KY421122)[17]、台湾(KY477345)[18]で流行していた株とも非常に近縁であった(97.8%)。他の 4 事例から検出された GII.2 株は同じ塩基配列であり、83 事例の GII.2 株との塩基配列相同性は 95.7%~97.1%とやや低かった。

IV 考察

2016 年は大阪府における定点あたりの感染性胃腸炎患者報告数は第 50 週(21.25)でピークとなり、2006 年以来 10 年ぶりにピーク値が 20 を超えた[19]。全国的にも第 50 週(20.96)をピークとした患者発生状況で定点あたり 20 を超え、過去 10 年間で 2006 年第 50 週(22.81)に次ぐ高い値であった[20]。全国の感染性胃腸炎患者(主に小児科定点)の病原体検出状況から、2016 年秋から冬に流行していたのは主に NoV GII.2 であり[21,22]、他の地域からも流行の報告がある[23,24]。

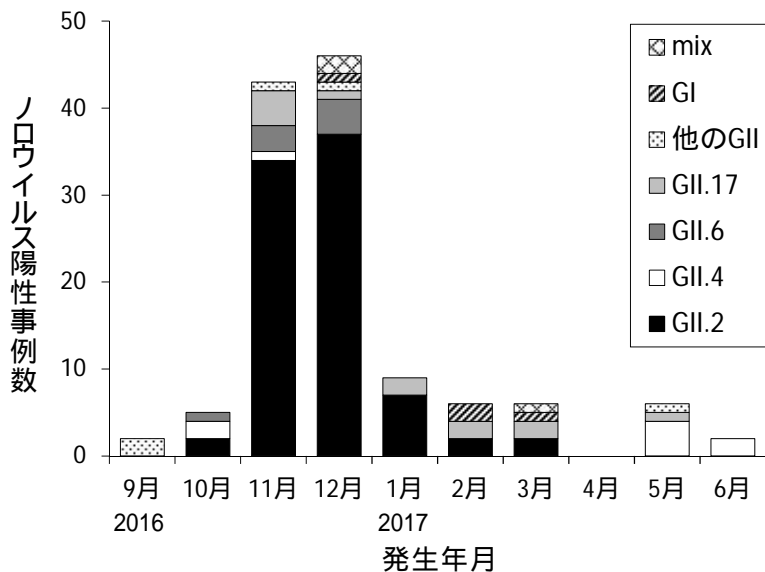


図1 月別ノロウイルス陽性事例数

表 1 2016 - 2017 シーズンに検出されたノロウイルスの遺伝子型(2016年9月~2017年6月)

Genogroup	遺伝子型	事例数
GI	GI.4	2
	GI.6	2
GII	GII.2	84
	GII.3	4
	GII.4	9
	GII.6	8
	GII.7	1
	GII.17	12
mix *		3
合計		125

*: 複数の遺伝子型が検出された事例
(GII.2/GII.17, GI.2/GII.2, GI.6/GII.2)

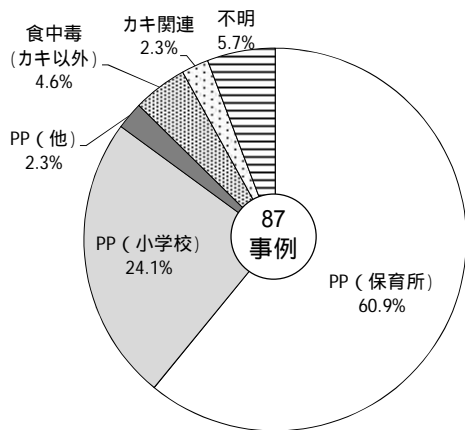


図 2 ノロウイルス GII.2 による事例の推定原因および発生施設

したがって、この NoV GII.2 流行は全国的なものであり、過去と比較しても大きな規模であったと考えられた。さらにアジア[17,18]やヨーロッパ[16]においても流行の報告があり、NoV GII.2 は同時期に海外でも広く流行していたことが確認されている。

各地域で検出された GII.2 株の遺伝子の相同性から、流行株は遺伝的に互いに非常に近縁なウイルスであった。また、流行株は GII.P16-GII.2 に分類されることが報告されており、過去に検出された GII.P16-GII.2 と遺伝的に異なることも明らかにされている[16-18,25]。これは流行株の抗原性や病原性が過去の株と異なっている可能性を示しており、感染が広がった原因の一つであると考えられた。大阪市で検出された GII.2 株のうち、非常に近縁であった 83 事例から検出された株は、遺伝子の比較から GII.P16-GII.2 であったと推測された。

大阪市では 2004 年春から NoV GII.2 の検出数が増加しており[9]、流行も確認されている[10,26]。しかしながら 2012 - 2013 シーズンから 2015 - 2016 シーズンまでの過去 4 シーズンについては、NoV GII.2 事例の発生数が 0~5 事例と非常に少なかった。感染の機会がほとんどなくなったことによって NoV GII.2 に対する免疫を持たない集団が低年齢層において増加していたと考えられ、今回低年齢層を中心に大きく流行した原因の一つであったことが示唆された。

最近の NoV 流行解析結果から GII.4 以外の遺伝子型であっても、GII.17 や GII.2 のように新たな変異株が出現すれば大きく流行することが示された。NoV の遺伝子型の変化や変異株の出現は流行の規模に大きく影響するため、NoV 感染症の流行予測と予防対策には継続した流行の監視と遺伝子型別による解析が重要である。

V まとめ

・2016 年 11 月および 12 月に大阪市において NoV GII.2 による集団胃腸炎が低年齢層の施設を中心に多発した。

・2016 - 2017 シーズンの NoV GII.2 流行は大阪市だけでなく全国的なものであり、海外においても認められた。

謝辞 本研究に御協力いただいた大阪市保健所感染症対策課、健康局生活衛生課、各区保健センターおよび食品衛生監視員の方々に深謝いたします。

(本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」(平成 28 年度)において実施した。)

参考文献

- 1) Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of “Norwalk-like viruses”. *J Infect Dis* 2000; **181** (Suppl 2): 336-348.
- 2) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, *et al.* Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002; **299**: 225-239.
- 3) 片山和彦, 木村博一. ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型(2015年改訂版). 病原微生物検出情報(IASR) 2015/9/8 掲載
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/id/778-disease-based/na/norovirus/idsc/iasr-news/5913-pr4274.html>)
- 4) Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinje J, Lee BE, Pang XL, *et al.* Norovirus illness is a global problem:

- Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis* 2009; **200**: 802-812.
- 5) Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, *et al.* Genetic analysis of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill* 2015; **20**(26): pii=21173.
 - 6) Lu J, Sun L, Fang L, Yang F, Mo Y, Lao J, *et al.* Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China. *Emerg Infect Dis* 2015; **21**: 1240-1242.
 - 7) de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkiz AT, Hewitt J, Bucardo F, *et al.* Emergence of a novel GII.17 norovirus-End of the GII.4 era? *Euro Surveill* 2015; **20** (26): pii=21178.
 - 8) 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 上林大起, 久保英幸, 野田衛. 2014-2015 シーズンに流行したノロウイルス GII.17 について. *食品衛生研究* 2015; **65**: 7-15.
 - 9) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Goto K, Ogura H, *et al.* Molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, from 1996-1997 through 2008-2009. *J Med Virol* 2010; **82**: 2097-2105.
 - 10) Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K, *et al.* Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol* 2012; **84**: 517-525.
 - 11) Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, Leenen I, van der Poel W, van Duynhoven Y. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J Infect Dis* 2000; **181** (Suppl 2): S262-269.
 - 12) Lewis DC, Hale A, Jiang X, Eglin R, Brown DW. Epidemiology of Mexico virus, a small round-structured virus in Yorkshire, United Kingdom, between January 1992 and March 1995. *J Infect Dis* 1997; **175**: 951-954.
 - 13) Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, *et al.* Genotyping of Norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan. *Microbiol Immunol* 2005; **49**: 275-283.
 - 14) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, *et al.* Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1548-1557.
 - 15) 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 西尾治, 後藤薫, 他. 市販生食用カキにおけるノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染調査 (2006-2007 ~ 2009-2010 シーズン). *大阪市立環科研報告* 2010; **72**: 7-12.
 - 16) Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, Eis-Hübinger AM, Hofma J, Zimmermann O, *et al.* Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. *Euro Surveill* 2017; **22**(4): pii=30447.
 - 17) Ao Y, Wang J, Ling H, He Y, Dong X, Wang X, *et al.* Norovirus GII.P16/GII.2-associated gastroenteritis, China, 2016. *Emerg Infect Dis* 2017; **23**: 1172-1175.
 - 18) Liu LT, Kuo TY, Wu CY, Liao WT, Hall AJ, Wu FT. Recombinant GII.P16-GII.2 norovirus, Taiwan, 2016. *Emerg Infect Dis* 2017; **23**: 1180-1183.
 - 19) 大阪府感染症発生動向調査委員会. 感染症発生動向調査事業報告書 第 35 報 2016(平成 28)年版 (2017)
 - 20) 国立感染症研究所感染症疫学センター. 注目すべき感染症「感染性胃腸炎」. 感染症発生動向調査感染症週報 (IDWR) 2017; 19: 7-8.
 - 21) 国立感染症研究所. ノロウイルス等検出状況. 病原微生物検出情報 (IASR), https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/noro/160920/noro1_170706.gif
 - 22) 国立感染症研究所. ノロウイルス等検出状況. 病原微生物検出情報 (IASR), https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/noro/160920/norogm1617_170706.gif
 - 23) 植木洋, 小泉光, 菅原直子, 佐々木美江, 渡邊節. 宮城県内で流行しているノロウイルス (NoV) の遺伝子型について. 病原微生物検出情報 (IASR) 2017; **38**: 17-18.
 - 24) 坂本美砂子, 山崎恵美, 西川和佳子, 三枝真奈美, 都竹豊茂, 山本一重. 2016 年 9 ~ 11 月のノロウイルス感染集団発生事例について - 千葉市. 病原微生物検出情報 (IASR) 2017; **38**: 18-19.
 - 25) 松島勇紀, 石川真理子, 清水智美, 駒根綾子, 清水英明, 松尾千秋, 他. 茨城県と川崎における 2016/17 シーズンに検出されたヒトノロウイルス GII.P16-GII.2 の分子疫学. 病原微生物検出情報 (IASR) 2017; **38**: 19-20.
 - 26) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, *et al.* Epidemic of genotype GII.2 noroviruses during spring 2004 in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2406-2409.
- (WEB サイトの内容は 2017 年 7 月 20 日に確認した)

アイスクリーム製造施設の *Listeria monocytogenes* 汚染状況中村寛海¹⁾、西康之²⁾、清水順子²⁾、山本雅由²⁾、宮木行雄²⁾、黒岡伸夫²⁾、小笠原準¹⁾*Listeria monocytogenes* contamination in ice cream processing plantsHiromi NAKAMURA¹⁾, Yasuyuki NISHI²⁾, Junko SHIMIZU²⁾,
Masayoshi YAMAMOTO²⁾, Yukio MIYAKI²⁾, Nobuo KUROOKA²⁾, and Jun OGASAWARA¹⁾

Abstract

Listeria monocytogenes (LM) cause human listeriosis via variety of foods. Listeriosis is opportunistic infection: healthy group will rarely be affected, while sensitive group, pregnant women, new-born babies, immunocompromised host, and elderlies are easily affected to cause septicemia, meningitis, or meningoencephalitis. Foodborne listeriosis outbreaks have been reported often in advanced countries. A listeriosis outbreak caused by ice cream occurred in the United States in 2015, when 3 of a total of 10 patients were reported to be dead. The relatively long shelf-life of ice cream products, once contaminated by LM, possibly increase the chance of infection. In this study we investigated LM contamination of ice cream processing plant and ice cream products commercially available in Osaka City. As a result, none of the total of 106 samples (89 swab or related samples from 3 plants and 17 products from markets) detected LM nor *Listeria* spp. However, spike and recovery tests revealed that milk fat- and/or milk solid-rich ice cream products tended to retain LM for more than 6 weeks. This result insisted the importance of meticulous management for factory environment, considering the relatively long shelf-life of the ice cream products in the market and the fact that trace amount of LM can cause severe listeriosis to high-risk group.

Key words: *Listeria monocytogenes*, ice cream, processing plant, contamination

I 緒言

Listeria monocytogenes (LM)は食品を介してヒトにリステリア症を引き起こす。リステリア症は日和見感染症であり、健康な成人には生菌を大量に摂取(10⁷ cfu 以上)した場合に胃腸炎症状を呈する程度であるが、妊婦、新生児、免疫抑制者、HIV 患者、高齢者など感受性の高いグループには少量の菌摂取で感染し、敗血症や髄膜炎、髄膜脳炎などの重篤な症状を呈することから、致死率が高い[1]。リステリア症は、主に先進国において集団事例が毎年のように発生している[2]。Scallan らは、米国ではリステリア症で毎年1,455名が入院し、255名(15.9%)が死亡すると推計するとともに、その99%は食品が媒介していると報告している[3]。乳製品は、LMによる食品媒介集団事例に最も関連性の高い食品群として認識されており[4]、リステリア症が食品媒介感染症として認識されるようになった1980年代から現在に至るまでリステリア症の原因食品として数多く報告されている[2,5]。2015年に米国で発生したアイスクリームによるリステリア症事例

は、患者10名のうち3名が死亡した[6]。本事例は異なる州に存在する2つの病院で低濃度のLMに汚染されたアイスクリームを原料として調製されたミルクシェーキを食べたことが原因とされている[7,8]。当該製造施設において製造されたアイスクリーム2,320検体についてLM検査を実施した結果、2,307検体(99%)から本菌が検出された。LMの汚染菌量は低く、検出されたアイスクリームの92%は<20 MPN/g(0.15~7.1 MPN/g)であった[8]。アイスクリームは賞味期限の表示を省略することができるため、市場に流通する期間が長く、製品が一度LM汚染をうけるとこれらと接触する機会も多くなる。このため、たとえ汚染が低濃度であっても、米国の事例のように高齢者や基礎疾患のある患者が喫食することでリステリア症を発症し、死に至る可能性もある。わが国においても、今後、アイスクリームなどの乳製品を原因とする重篤な食品媒介リステリア症の集団発生が懸念される。

リステリア症事例における汚染源の検討結果や食品由来株の解析結果から、本菌は原材料から持ち込まれ

1) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka Institute of Public Health, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 大阪市保健所食品衛生監視課
〒545-0051 大阪市阿倍野区旭町 1-2-7-1000
Food Hygiene Supervision Department, Osaka City Health Center, 1-2-7-1000, Asahi-cho, Abeno-ku, Osaka, 545-0051, Japan

るというよりはむしろ製造・加工工程で食品を汚染すると考えられている[2,9-11]。

そこで、本調査研究では、大阪市内のアイスクリーム製造施設および市販のアイスクリーム類等(アイスクリーム、アイスマイル、ラクトアイス、氷菓)の LM 汚染状況を調べることを目的として、施設内から採取したふきとり水およびアイスクリーム製品等から LM の検出を試みた。また、アイスクリーム類等における冷凍保管中の LM の消長についても検討したので報告する。

II 材料及び方法

1) 調査期間

平成 28 年 6～9 月の間に大阪市内のアイスクリーム製造施設 3 施設(施設 A、施設 B および施設 C)に調査協力を依頼し、立入り調査を実施した。

2) 材料

施設 A からふきとり水 26 検体、洗浄水等 2 検体および製品(半製品を含む)3 検体、施設 B からふきとり水 26 検体と製品 2 検体、施設 C からふきとり水 27 検体と製品 3 検体の計ふきとり水 79 検体および洗浄水等 2 検体、施設から採取したアイスクリーム製品および半製品が 8 検体、市販のアイスクリーム類等 17 検体の合計 106 検体を細菌検査に供した。

3) LM 検査法

ふきとり水の採取には、Pro-Media SWAB TEST ST-25BPW(エルメックス)を使用した。スワブの先をよくしごき、緩衝ペプトン水(BPW)中に分散させた後に、5 mL をスタマッカー袋に量りとり、9 倍量のハーフフレーザー培地(OXOID)を加えて 50 g とした。アイスクリーム製品および半製品はスタマッカー袋に 25 g を量りとり、9 倍量のハーフフレーザー培地を加えて 250 g とし、1 分間スタマッカー処理を行った。ハーフフレーザー培地は 30 ± 1 で 24 ± 3 時間培養した。培養後、一白金耳を ALOA 寒天平板培地(Merck)に塗抹するとともに 0.1 mL を 10 mL のフレーザー培地(OXOID)に移植した。ALOA 寒天平板培地は 37 で 24 ± 3 時間、フレーザー培地は 37 で 48 ± 3 時間培養した。フレーザー培地は培養後の培養液一白金耳を ALOA 寒天平板培地に塗抹し、 37 で 24 ± 3 時間培養した。寒天平板上にコロニーの発育が見られないサンプルについてはさらに 24 時間培養し、判定した。ALOA 寒天平板培地上で青色を呈した周囲に混濁帯が見られるコロニーを 5 つ釣菌して SIM 培地(日水製薬)に穿刺し、 25 で 18～24 時間培養した。SIM 培地上でリステリア属に特徴的な運動性(umbrella motility)を示し、エスクリン加水分解試験陽性でグルコース陽性(ガス非産生)であればリステリア属陽性とした。リステリア属陽性と判定された菌株について、

ヒツジ血液寒天培地上での溶血の有無、 β -リジンディスク(Remel 社)を用いた CAMP テスト、ラムノース、キシロース、マンニットの利用能を調べた。その結果、溶血性の確認、CAMP テスト陽性、ラムノース陽性、キシロースおよびマンニット陰性であれば LM と同定した。LM と確定された菌株は、単離した後に DNA を抽出し、PCR により *hlyA* および 16S rRNA 遺伝子の保有[12]の有無を調べた。

4) LM 菌数測定法

製造施設から採取した製品および半製品について、LM の菌数測定を ISO11290-2 に準拠して実施した。すなわち、アイスクリーム 25 g をスタマッカー袋に量りとり、9 倍量の BPW を加えて 250 g とし、1 分間スタマッカー処理を行い、 20 ± 2 で 1 時間 ± 5 分インキュベートした。インキュベート後、1 mL を 3 枚の ALOA 培地にコンラージし、 37 ± 1 で 24 ± 3 時間培養した。寒天平板上にコロニーの発育が見られないサンプルについてはさらに 24 時間培養し、最終判定した。培養後、ALOA 寒天平板培地上で青色を呈した周囲に混濁帯が見られるコロニーを全てカウントして 1 mL あるいは 1 g あたりのリステリア菌数を測定するとともに、5 コロニーについて 3) の LM 検査法に従って LM の確認試験を実施した。

5) 生菌数、大腸菌群数および大腸菌数の測定

ふきとり水からの大腸菌群数および大腸菌数の測定は、3) LM 検査法で調製したふきとり水(BPW)を、施設から採取した製品および半製品は 4) LM 菌数測定法で調製した BPW を、適宜 9 mL の BPW で希釈した後に各 1 mL を 2 枚の滅菌シャーレに無菌的に分注し、あらかじめ溶解後 50 に保温しておいたクロモアガーECC 培地(関東化学)で混釈した。市販のアイスクリーム類等は BPW でなく滅菌生理食塩水で希釈し、大腸菌群の測定にはデソキシコレート寒天培地(日水製薬)を用いて混釈、重層した。製造施設から採取した製品および半製品と市販のアイスクリーム類等のみ、生菌数の測定を標準寒天培地(日水製薬)により同様にして行った。すなわち、固化後、標準寒天培地は 35 ± 1 で 48 ± 3 時間、デソキシコレート培地は 35 ± 1 で 20 ± 2 時間、クロモアガーECC 培地は 37 ± 1 で 24 ± 3 時間培養した。培養後、標準寒天培地に発育したコロニーをカウントして生菌数とした。デソキシコレート培地およびクロモアガーECC 培地上に発育した赤色コロニーを大腸菌群数としてカウントし、クロモアガーECC 培地上に発育した青色コロニーを大腸菌数とした。

6) リステリア添加回収実験

添加回収実験には標準菌株 2 株 (ATCC7644 株および ATCC19115 株) と当所で食品あるいは食品製造施設から分離した 3 株 (20-6, C50, C84) の計 5 株を混合して使用した (表 1)。これらの菌株の由来および血清型については表 1 に示した。添加食品には LM を含むリステリア属菌が陰性であることが確認された市販のアイスクリーム類等を使用した (表 2)。これらをアイスクリーム、アイスマイルク、ラクトアイス、氷菓の 4 種類に分類した。すなわち、表 2 中、アイスクリームとして K48 の 1 検体、アイスマイルクとして K35, K39, K40 の 3 検体、ラクトアイスとして K33, K43, K44 の 3 検体、氷菓として K36, K47 の 2 検体を種類毎に混合して 100g とし、添加回収実験に供した。添加する LM 5 株はそれぞれ BHI 寒天平板培地 (日本 BD) に塗抹して 37 °C で一晚培養後 1 コロニーを 3 mL の BHI 培地 (日本 BD) に移植し、37 °C で一晚培養した。一方、-20 °C に保管しておいたアイスクリーム類等を解冻して 2 つの滅菌カップに各 100 g ずつ小分けし、完全に融解させてから BHI 培養液の 10² あるいは 10⁸ 希釈液 0.5 mL (5 株の培養液を各 100 μL ずつ) を接種してよくふり混ぜて -20 °C に設定された冷凍庫に移して 6 週間

後まで保管した。添加菌数の算出は以下の通りで実施した。すなわち、各培養液 100 μL を 900 μL の滅菌生理食塩水で希釈して 10⁵、10⁶ および 10⁷ 希釈液の各 100 μL を 2 枚の BHI 寒天平板培地に塗抹し、37 °C で 48 時間培養後、発育した集落を数えた。その結果、添加菌数は食品 1 g あたり 0.08 cfu (低濃度接種検体) および 8.9 × 10⁴ cfu (高濃度接種検体) と算出された。3 週間後および 6 週間後にサンプルを冷凍庫から取り出し、新しいストマッカー袋に無菌的に 25 g を秤量後 9 倍量の滅菌生理食塩水を加えて 250 g とし、1 分間ストマッカー処理を行い、食品の 10 倍希釈液を作製した。10 倍希釈液 1 mL を 9 mL の滅菌生理食塩水で希釈して 100 倍希釈液を、同様に 1000 倍希釈液を調製した。希釈液を各 2 枚の ALOA 寒天平板培地にコンラージ塗抹した。低濃度接種検体については、6 週間後に 25 g を秤量後 9 倍量の TSBYE 培地 (OXOID) を加えて 250 g とし、1 分間ストマッカー処理を行い、30 °C で一晚培養後、2 枚の ALOA 寒天平板に塗抹し、上述の方法によって、リステリアの有無を調べた。

III 結果

表 1 添加回収試験に使用した *Listeria monocytogenes* 菌株

菌株名	由来	血清型
ATCC7644	標準菌株	1/2c
ATCC19115	標準菌株	4b
C50	食品 (辛子明太子)	1/2a
C84	食品 (たらこ)	1/2b
20 - 6	スモークサーモン製造施設 (大型スライサー刃)	1/2a

表 2 アイスクリーム類等細菌検査結果

No.	環科研 No.	検体の分類	分類	生菌数	大腸菌群	リステリア ^{*1}
1	K32	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
2	K33	食品	ラクトアイス	1.5 × 10 ³ cfu/g	陰性	陰性
3	K34	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
4	K35	食品	アイスマイルク	<10 cfu/g	陰性	陰性
5	K36	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
6	K37	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
7	K38	食品	アイスマイルク	<10 cfu/g	陰性	陰性
8	K39	食品	アイスマイルク	<10 cfu/g	陰性	陰性
9	K40	食品	アイスマイルク	<10 cfu/g	陰性	陰性
10	K41	食品	アイスマイルク	1.5 × 10 ³ cfu/g	陰性	陰性
11	K42	食品	アイスクリーム	3.5 × 10 ³ cfu/g	陰性	陰性
12	K43	食品	ラクトアイス	<10 cfu/g	陰性	陰性
13	K44	食品	ラクトアイス	<10 cfu/g	陰性	陰性
14	K45	食品	ラクトアイス	5.5 × 10 ³ cfu/g	陰性	陰性
15	K46	食品	ラクトアイス	6.9 × 10 ² cfu/g	陰性	陰性
16	K47	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
17	K48	食品	アイスクリーム	1.0 × 10 ³ cfu/g	陰性	陰性

*1 リステリア・モノサイトゲネスを含むリステリア属菌

表 3 にアイスクリーム製造施設から採取した検体についての細菌検査結果を示した。施設内から採取したふきとり水 79 検体、洗浄水等 2 検体、アイスクリーム製品および半製品 8 検体は全て LM を含むリステリア属菌が陰性であった。ふきとり水および洗浄水等 81 検体のうち 10 検体から大腸菌群が検出された。検出された検体の内訳は、厨房の床面、排水溝 (内側)、二槽シンク (排水口部分)、二槽シンク (下部の棚部分)、ディッシャー洗浄水、フリーザー前部分の床面、フリーザー機器側面下部の表面、フリーザー前面の洗浄水受け皿、スポンジ、冷凍チャンバー内部ビニールカーテン (入口の結露部分) であった。これらのうち、大腸菌群数が 10 cfu/mL を超えたのは、厨房床面 (2.0 × 10³ cfu/mL)、二槽シンク (排水口部分) (1.5 × 10³ cfu/mL)、スポンジ (3.0 × 10⁷ cfu/mL) の 3 検体のみであり、これらはいずれも製品と直接接することのない場所であった。製品および半製品の大腸菌群および大腸菌は陰性であり、生菌数は 3.0 × 10¹ ~ 1.9 × 10² cfu/g であった。

市販のアイスクリーム類等 17 検体 (アイスクリームが 2 検体、アイスマイルクが 5 検体、ラクトアイスが 5 検体、氷菓が 5 検体) は全て LM を含むリステリア属菌および大腸菌群が陰性であった。生菌数は 1 g あたり 10 cfu 未満 ~ 6.9 × 10² cfu の間であった (表 2)。

LM を含むリステリア属菌陰性のアイスクリーム類等を、アイスクリーム、アイスマイルク、ラクトアイス、

表3 アイスクリーム製造施設の細菌検査結果

施設	No.	環科研No.	検体の分類	検体名	生菌数	大腸菌群数	大腸菌数	リステリア ³	リステリア菌数	
					(cfu/ml) ^{*1}	(cfu/ml) ^{*1}	(cfu/ml) ^{*1}			
A	1	K1	ふきとり	厨房 作業台	ND ²	0	0	陰性	ND ²	
	2	K2	ふきとり	厨房 床面	ND	2.0×10 ³	0	陰性	ND	
	3	K3	ふきとり	厨房 アイスパルク容器(合成樹脂製)(内側)	ND	0	0	陰性	ND	
	4	K4	ふきとり	厨房 パステライザー(右)取り出し口	ND	0	0	陰性	ND	
	5	K5	ふきとり	厨房 パステライザー(真ん中)取り出し口	ND	0	0	陰性	ND	
	6	K6	ふきとり	厨房 パステライザー(左)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
	7	K7	ふきとり	厨房 パステライザー(左)取り出し口	ND	0	0	陰性	ND	
	8	K8	ふきとり	厨房 パステライザー(真ん中)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
	9	K9	ふきとり	厨房 パステライザー(右)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
	10	K10	ふきとり	厨房 パステライザー(右)機器上部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
	11	K11	その他	厨房 フリーザー(左)原料投入口の水	0	0	0	陰性	ND	
	12	K12	ふきとり	厨房 フリーザー(左)受け皿	ND	0	0	陰性	ND	
	13	K13	ふきとり	厨房 ステンレスカップ(5L)内側	ND	0	0	陰性	ND	
	14	K14	ふきとり	厨房 排水溝(内側)	ND	3.5	0	陰性	ND	
	15	K15	ふきとり	厨房 排水溝(格子部分)	ND	0	0	陰性	ND	
	16	K16	ふきとり	厨房 二槽シンク(シンク正面の上部)	ND	0	0	陰性	ND	
	17	K17	ふきとり	厨房 二槽シンク(排水口部分)	ND	1.5×10	0	陰性	ND	
	18	K18	ふきとり	厨房 電子はかり 表面	ND	0	0	陰性	ND	
	19	K19	ふきとり	厨房 二槽シンク(下部の棚部分)	ND	2.5	0	陰性	ND	
	20	K20	ふきとり	厨房 4枚庫冷凍冷蔵庫(左上冷蔵庫部分)(扉内側+棚)	ND	0	0	陰性	ND	
	21	K21	ふきとり	厨房 4枚庫冷凍冷蔵庫(右上冷蔵庫部分)(扉内側+棚)	ND	0	0	陰性	ND	
	22	K22	ふきとり	厨房 4枚庫冷凍冷蔵庫(左下冷蔵庫部分)(棚)	ND	0	0	陰性	ND	
	23	K23	食品	アイスマルク(半製品・凍結前)	1.1×10 ² cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
	24	K24	ふきとり	盛付室 黄色トレイ内側(製造所内使用分)	ND	0	0	陰性	ND	
	25	K25	ふきとり	盛付室 盛付作業台	ND	0	0	陰性	ND	
	26	K26	ふきとり	盛付室 アイスパルク容器(ステンレス製)(内側)(使用后)	ND	0	0	陰性	ND	
	27	K27	その他	ディッシャー洗浄用水(使用中)	1.1×10 ³	2.5	0	陰性	ND	
	28	K28	ふきとり	盛付室 床面	ND	0	0	陰性	ND	
	29	K29	ふきとり	盛付室 4枚庫冷凍冷蔵庫(左上部分)(棚)	ND	0	0	陰性	ND	
	30	K30	食品	アイスマルク(製品)	1.9×10 ² cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
	31	K31	食品	アイスマルク(製品)	1.8×10 ² cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
	B	1	K49	ふきとり	床面:フリーザー(冷蔵チャンパー前)前部分	ND ²	0	0	陰性	ND ²
		2	K50	ふきとり	床面:フリーザー(左)前部分	ND	10	0	陰性	ND
3		K51	ふきとり	フリーザー(左)取出口下のステンレス板	ND	0	0	陰性	ND	
4		K52	ふきとり	フリーザー(右)扉部分の横	ND	0	0	陰性	ND	
5		K53	ふきとり	フリーザー(左)機器正面の表面	ND	0	0	陰性	ND	
6		K54	ふきとり	アイスパルク容器(合成樹脂製)(内側)	ND	0	0	陰性	ND	
7		K55	ふきとり	フリーザー(右)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
8		K56	ふきとり	作業台(中央)の下部棚	ND	0	0	陰性	ND	
9		K57	ふきとり	フリーザー(右)機器側面下部の表面	ND	1.5	0	陰性	ND	
10		K58	ふきとり	フリーザー(左)扉部分の蝶番	ND	0	0	陰性	ND	
11		K59	ふきとり	パステライザー(真ん中)下部の取出口	ND	0	0	陰性	ND	
12		K60	ふきとり	パステライザー(真ん中)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
13		K61	ふきとり	パステライザー(真ん中)蓋内側	ND	0	0	陰性	ND	
14		K62	ふきとり	パステライザー(真ん中)機器側面の表面	ND	0	0	陰性	ND	
15		K63	ふきとり	冷蔵チャンパー取手	ND	0	0	陰性	ND	
16		K64	ふきとり	冷蔵チャンパー内 冷蔵室 床面	ND	0	0	陰性	ND	
17		K65	ふきとり	冷蔵チャンパー内 合成樹脂製扉重内部	ND	0	0	陰性	ND	
18		K66	ふきとり	冷蔵チャンパー内 冷蔵室 床面	ND	0	0	陰性	ND	
19		K67	ふきとり	(ガスコンロ横)二槽シンク(左)オーバーフロー口部分	ND	0	0	陰性	ND	
20		K68	ふきとり	(ガスコンロ横)二槽シンク(右)オーバーフロー口部分	ND	0	0	陰性	ND	
21		K69	ふきとり	(ガスコンロ横)二槽シンク 下部棚	ND	0	0	陰性	ND	
22		K70	ふきとり	作業台(中央)の表面	ND	0	0	陰性	ND	
23		K71	ふきとり	ごみ箱(丸型) 底部分	ND	0	0	陰性	ND	
24		K72	ふきとり	台車(砂糖)の車輪部分	ND	0	0	陰性	ND	
25		K73	食品	製品(8月17日製造 アイスクリーム)	1.1×10 ² cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
26		K74	ふきとり	冷蔵チャンパー前床面(扉左側:踏み台部分)	ND	0	0	陰性	ND	
27		K75	ふきとり	冷蔵チャンパー前床面(扉右側:タイルの目地)	ND	0	0	陰性	ND	
28		K76	食品	製品(8月29日製造 アイスクリーム)	4.5×10 ² cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
C	1	K77	ふきとり	床面:フリーザー前部分	ND ²	0	0	陰性	ND ²	
	2	K78	ふきとり	受け皿(白色)内部:フリーザー取出口の蓋の洗浄水の受け皿	ND	0	0	陰性	ND	
	3	K79	ふきとり	受け皿(緑色)内部:フリーザー前面の洗浄水の受け皿	ND	0.5	0	陰性	ND	
	4	K80	ふきとり	パステライザー出口	ND	0	0	陰性	ND	
	5	K81	ふきとり	受け皿(白色)内部:パステライザー前面の洗浄水の受け皿	ND	0	0	陰性	ND	
	6	K82	ふきとり	プラスチックケース(青色)側面:パステライザー前床面に置かれているもの	ND	0	0	陰性	ND	
	7	K83	ふきとり	パステライザー側面:二槽シンク側	ND	0	0	陰性	ND	
	8	K84	ふきとり	パステライザー パネル部分と上面部分の隙間	ND	0	0	陰性	ND	
	9	K85	ふきとり	パステライザー 上面	ND	0	0	陰性	ND	
	10	K86	ふきとり	パステライザー 側面と前面接合部の隙間	ND	0	0	陰性	ND	
	11	K87	ふきとり	フリーザー側面:パステライザー側	0	0	0	陰性	ND	
	12	K88	ふきとり	二槽シンク(右側)内部	ND	0	0	陰性	ND	
	13	K89	ふきとり	床面:二槽シンク下部	ND	0	0	陰性	ND	
	14	K90	ふきとり	作業台	ND	0	0	陰性	ND	
	15	K91	ふきとり	台下冷蔵庫(作業台横)内部	ND	0	0	陰性	ND	
	16	K92	ふきとり	冷凍ショーケース 側面のゴムパッキン	ND	0	0	陰性	ND	
	17	K93	ふきとり	冷凍ショーケース 蓋部分のゴムパッキン	ND	0	0	陰性	ND	
	18	K94	ふきとり	車輪:作業台下部の車輪付グラニュー糖保管箱	ND	0	0	陰性	ND	
	19	K95	ふきとり	台下冷蔵庫(作業台横)側面排気口	ND	0	0	陰性	ND	
	20	K96	ふきとり	台下冷蔵庫(手洗機)内部	ND	0	0	陰性	ND	
	21	K97	ふきとり	台下冷蔵庫(手洗機)天板	ND	0	0	陰性	ND	
	22	K98	ふきとり	スポンジ(9月12日)	ND	3.0×10 ⁷	0	陰性	ND	
	23	K99	ふきとり	二槽シンク(右側)排水口	ND	0	0	陰性	ND	
	24	K100	ふきとり	砥石の底面:側面:二槽シンク(右側)上部に置かれていたもの	ND	0	0	陰性	ND	
	25	K101	ふきとり	給湯配管接続部:二槽シンクの壁側	ND	0	0	陰性	ND	
	26	K102	ふきとり	床面:冷蔵チャンパー内部	ND	0	0	陰性	ND	
	27	K103	ふきとり	ビニールカーテン(入口の結露部分):冷蔵チャンパー内部	1.1×10 ³	2.5	0	陰性	ND	
28	K104	食品	製品(9月5日製造 水菓)	3.0×10 ² cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g		
29	K105	食品	製品(9月19日製造 アイスマルク)	9.0×10 ² cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g		
30	K106	食品	製品(9月19日製造 ラクトアイス)	1.0×10 ² cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g		

*1 食品以外 *2 ND: Not Done *3 リステリア・モノサイトゲネスを含むリステリア属菌

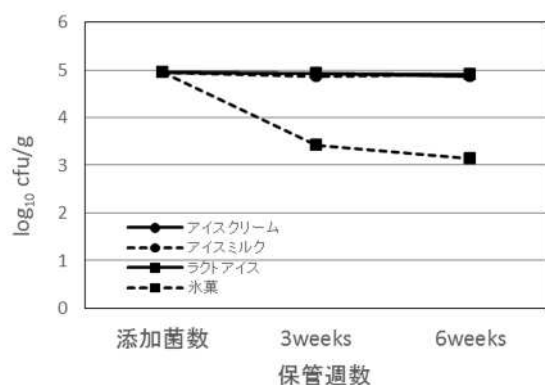


図 1 アイスクリーム類等中での *Listeria monocytogenes* の消長

氷菓の 4 種類に分類し、5 種類の LM を添加して -20 に保管して 3 週間後、6 週間後の LM の消長を調べた。その結果、高濃度 (1 g あたり 8.9×10^4 cfu) 接種したアイスクリーム、アイスマルク、ラクトアイスの LM 菌数は 6 週間後、1 g あたり 7.2×10^4 cfu、 7.9×10^4 cfu、 8.1×10^4 cfu となり、ほとんど菌数の変化は見られなかった (図 1)。

これに対し、氷菓は 6 週間後 1 g あたり 1.4×10^3 cfu となり、他の 3 種類のアイスクリーム類に比べて約 2 オーダー低い結果となった。低濃度 (1 g あたり 0.08 cfu) 接種では、いずれのアイスクリーム類等からも LM は回収できなかった (10 cfu/g 未満)。

IV 考察

大阪市内のアイスクリーム製造施設および市販のアイスクリーム類等の LM 汚染調査を行った。その結果、施設から採取したふきとり水や半製品、市販のアイスクリーム類等を含む製品において、全ての検体から LM を含むリステリア属菌は検出されなかった。平成 26 年に実施した浅漬製造施設の LM 汚染調査では、製造施設から採取した検体のうち 1 施設では 24 検体のうち 8 検体から、別の 1 施設でも 33 検体のうち 1 検体から LM が検出された [13]。漬物は「漬物の衛生規範」[14]に基づいて衛生管理がなされているのに対し、アイスクリーム類、氷菓は食品衛生法で成分規格が定められており、生菌数、大腸菌群の検出で規格基準違反となることから、製造者の衛生管理の意識が高く、製造施設内は厳密に衛生管理が行われているものと推察された。食品の LM 汚染は製造工程中に起こると考えられている [2,9-11]。また、製造施設内では LM は低温で水分が多く、有機物の汚れが存在するところから検出される [15]。今回の調査で LM が検出されなかった一つの要因としては、製造施設内の床、特に冷蔵庫において水たまりなどがなく床が乾燥していたことが考えられる。

市販のアイスクリーム類等に LM を添加して -20 で 6 週間まで保管し、その消長を調べた。その結果、氷菓のみ 3 週間後に約 2 オーダーの LM 菌数の低下が見られた。アイスクリーム、アイスマルク、ラクトアイスでは 6 週間後も菌数の変化は見られなかった。Palumbo ら [16] は、牛ひき肉、七面鳥ひき肉、フランクフルト、コーン缶詰、アイスクリームおよびトマトスープに LM を添加して冷凍し、-18 で保管して生残を調べた。その結果、トマトスープのみで LM が減少した。本報告では、他の食品は全て pH が 5.8 以上であったのに対して、トマトスープのみが pH4.7 と低かったこと、また選択培地上の LM の発育が顕著に低かったことから、トマトスープ中で冷凍された LM が損傷していると推察している。我々が実施した添加回収試験で使用した氷菓にはミカンが含まれており、簡易試験紙で pH を調べたところ約 4 であった。アイスクリーム、アイスマルク、ラクトアイスは約 7 であった。LM が増殖可能な最低 pH は 4.4 とされている [9]、これは食品中でなく培地中での検討結果である。乳脂肪分、乳固形分の少ない食品中では低い pH で冷凍されることにより、LM は損傷を受けると考えられる。氷菓以外のアイスクリーム類では 6 週間後も LM 菌数の低下は見られなかった。また、低濃度接種 (0.08 cfu/g) のアイスクリーム類等も、ラクトアイス以外は増菌培養により LM が検出されたことから、これらの食品中で LM は死滅せずに生残していることが確認された。ラクトアイスの増菌培養で LM が検出されなかったのは、選択性のない増菌培地を使用したためにラクトアイス中にわずかに存在する他の細菌の影響で LM がマスクされてしまったことが原因と考えられる。

大阪市内のアイスクリーム製造施設 3 施設の LM 汚染調査を実施した結果、採取したすべての検体から LM は検出されなかった。また、市販のアイスクリーム類等からも LM は検出されなかった。アイスクリーム類等への LM の添加実験の結果、氷菓を除くこれらの食品中で冷凍保管中に菌数の低下は見られなかった。アイスクリームは賞味期限の表示を省略することができるため、市場に流通する期間が長く、製品が一度 LM 汚染をうけるとこれらと接触する機会も多くなる。そのため、低濃度の汚染であってもリステリア症を引き起こすリスクがあると考えられることから、製造者はアイスクリーム類等を LM に汚染させないよう製造環境に細心の注意を払う必要がある。

(本研究は、平成 28 年度健康局生活衛生課特別調査研究「既製食品の汚染源追究調査」として実施されたものである。)

謝辞 本研究の遂行にあたり、アイスクリーム類およびふきとり材料からの細菌検査に関して後藤薫博士、平山

照雄氏、平井有紀氏、瀧野薫氏に大変お世話になりました。ここに深謝致します。

参考文献

- 1) 光山正雄. 8. リステリア症集団発生. 化学療法の領域 2012; **28**(6): 1288-1296.
- 2) 中村寛海. 食品媒介リステリア症と食品製造施設のリステリア汚染 リステリアの施設定着株を取り巻く話題 . 日本食品微生物学会雑誌 2015; **32**(1): 1-11.
- 3) Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., *et al.* Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 2011; **17**: 7-15.
- 4) Greig J. D, Ravel A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology* 2009; **130**: 77-87.
- 5) Norton, D. M., and Burden, C. R. Foodborne listeriosis. : *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E.T. and Marth, E.H. (eds), p. 305-356, CRC Press, Boca Raton (2007).
- 6) Centers for disease control and prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to Blue Bell creameries products (final update). <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html>
- 7) Chen, Y., Allard, E., Wooten, A., Hur, M., Sheth, I., *et al.* Recovery and growth potential of *Listeria monocytogenes* in temperature abused milkshakes prepared from naturally contaminated ice cream linked to a listeriosis outbreak. *Frontiers in Microbiology* 2016; **7**: 764.
- 8) Chen, Y., Burall, L. S., Macarasin, D., Pouillot, R., Strain, E., *et al.* Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ice cream linked to a listeriosis outbreak in the United States. *Journal of Food Protection* 2016; **79**: 1828-1832.
- 9) 食品安全委員会. 微生物・ウイルス評価書 食品中のリステリア・モノサイトゲネス.(2013年5月)
- 10) Tompkin, R.B.. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection* 2002; **65**: 709-725.
- 11) Wesley, I. V.: Listeriosis in Animals.: *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E.T. and Marth, E.H. (eds), p. 55-84, CRC Press, Boca Raton (2007).
- 12) Aznar, R., Alarcon. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers. *Systematic and Applied Microbiology* 2002; **25**: 109-119.
- 13) 大阪市立環境科学研究所 調査研究課 微生物保健グループ. 既製食品の汚染源追究調査 浅漬製造施設のリステリア汚染調査 . 平成 26 年度特別調査研究報告書.(2014)
- 14) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: 漬物の衛生規範の改正等について . 食安監発 1213 第 2 号 (平成 25 年 12 月 13 日)
- 15) Kornacki, J. L., Gurtler, J. B. Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities.: *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E.T. and Marth, E.H. (eds), p. 681-766, CRC Press, Boca Raton (2007).
- 16) Palumbo, S. A., and Williams, A. C. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiology* 1991; **8**: 63-68.

(WEB サイトの内容は 2017 年 4 月 3 日に確認した)

2016/17 シーズンの季節性インフルエンザウイルス分離状況 - 大阪市

久保英幸¹⁾、改田厚¹⁾、上林大起^{1),2)}、平井有紀¹⁾、入谷展弘¹⁾、山元誠司¹⁾、小笠原準¹⁾

Seasonal Influenza Viruses Isolated in Osaka City, 2016/17 Influenza Season

Hideyuki KUBO¹⁾, Atsushi KAIDA¹⁾, Daiki KANBAYASHI^{1),2)}, Yuki HIRAI¹⁾,
Nobuhiro IRITANI¹⁾, Seiji P YAMAMOTO¹⁾, and Jun OGASAWARA¹⁾

Abstract

The 2016/17 influenza season in Osaka City began early to mid in November, 2016, and peaked late in January, 2017. These situations were also reported in all regions in Japan. Subtype AH3 dominated 90.7 % in isolated strains, and was recognized through this season. The dominance of AH3 was also recognized in all regions in Japan, and seen after 2014/15 influenza season including in Osaka City. For the public health concerns, it is important to understand the latest influenza activity and the virus circulation.

Key words: seasonal influenza viruses, subtype AH3, predominance

I 緒言

季節性インフルエンザウイルスは、毎年冬期に世界的規模での流行が認められるインフルエンザ様疾患(インフルエンザ)の主要な原因ウイルスで、本疾患の流行によるヒトへの健康被害およびそれに伴う経済活動損失への影響は、多大なものとなっている。インフルエンザの流行の規模や持続期間は、国・地域および毎年の流行シーズンによって、それぞれ異なっている。本ウイルス感染が原因と推測される死亡者の発生は、全世界で毎年数十万人規模に達していることから、インフルエンザは現在においても最重要感染症の一つに位置付けられている[1,2]。ヒトの季節性インフルエンザウイルスは A および B 型に分類され、A 型には A(H1N1)pdm2009 (AH1pdm)および A(H3N2) (AH3)の 2 亜型が、B 型には Yamagata (B/Yamagata) および Victoria (B/Victoria) の 2 系統が存在している[3,4]。これらの型・亜型のうち、主流となるものはシーズン毎にランダムに異なることから、次シーズンの主流となる季節性インフルエンザウイルスの型・亜型を予測することは、現在のところ不可能とされている[3-8]。

インフルエンザウイルスの特徴の一つとして、ウイルス粒子の主要タンパク質である赤血球凝集素タンパク質(HA タンパク質)の抗原変異が、容易に、かつ迅速に生

じることが報告されている。この現象のため、これまでにワクチン接種またはインフルエンザウイルス感染によって、体内で産生された抗インフルエンザウイルス中和抗体の効果が消失してしまう。世界的規模でのインフルエンザの発生・流行が毎年繰り返して出現しているのは、この理由によるとされている[9]。季節性インフルエンザウイルスの感染予防および軽症化には、インフルエンザワクチンの接種が最も有効とされ、流行シーズン開始前の秋から初冬における当ワクチン接種の勧奨が、毎年実施されている[3,4,10]。しかし、流行するインフルエンザウイルスの型・亜型の予測は不可能であることから、当シーズンの流行予測の段階で選定したワクチンとして使用する該当ウイルス株の抗原性が、実際の流行株のものに一致するか否かによって、毎年の接種ワクチンの予防効果に相違が生じている。インフルエンザウイルスの抗原性状の変異・進化に関しては、数十年にわたる研究が継続実施されている現在においても、未解明の部分が多く存在している[11]。

医療機関を受診する推計インフルエンザ患者数は、日本においては毎年 1500 万人前後となることから、インフルエンザは特に重要視をしなければならない疾患である[12,13]。インフルエンザの発生および流行状況を監視し、さらに流行中のインフルエンザウイルスの性状を迅速に把握することは、その予防および流行抑制を目

1) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka Institute of Public Health, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター
〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69
Osaka Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

的とする公衆衛生行政においては、非常に重要なことである。2016/17 シーズンに、大阪市感染症発生動向調査事業などに供与されたインフルエンザ患者検体を用いて、インフルエンザウイルスの分離・同定試験を実施し、得られた結果について関連行政機関への情報還元を行うとともに、分離インフルエンザウイルスに関する性状解析を実施した。

II 実験

1) 季節性インフルエンザウイルスの分離

大阪市感染症発生動向調査事業およびインフルエンザ集団発生(学級閉鎖)事例検査に供与されたインフルエンザ患者検体(咽頭ぬぐい液、鼻汁またはうがい液)を、イヌ腎上皮細胞由来の MDCK 細胞に接種した後、温度を 35℃、CO₂ 濃度を 5.0 % に設定したインキュベーター(エスベック)内での培養を行った。細胞培養液には、0.25 % トリプシン(ライフテクノロジーズ)および 0.2 % BSA(シグマ)を添加した MEM 培地(ライフテクノロジーズ)を使用した。細胞変性効果(CPE)の出現観察を最長 2 週間行い、この観察期間内に CPE の認められた場合をインフルエンザウイルス分離陽性と判定し、培養上清を採集してウイルス株保存液とした。

2) 分離株の型・亜型同定

各ウイルス株保存液および 0.75 % モルモット血球(日本バイオテスト研究所)を用いて赤血球凝集(HA)試験を行い、HA 価を測定した。得られた HA 価に基づいて各保存液を一定濃度に希釈し、この希釈液および国立感染症研究所から分与された『2016/17 シーズンインフルエンザウイルス(A/H1pdm09、A/H3、B)同定用キット』を用いて赤血球凝集阻止(HI)試験を実施し、分離株の型・亜型の同定および HI 価の測定を行った[14]。また、HI 試験を行うために必要な HA 価を示さなかった

分離株に対しては、ウイルス株保存液を滅菌蒸留水で 50 倍に希釈した液 5 μl を用いてリアルタイム RT-PCR を実施し、型・亜型の同定を行った[14,15]。

3) 分離 AH1pdm 株に対するオセルタミビル耐性化検索

AH1pdm と同定された分離株に対して、抗インフルエンザ薬のオセルタミビルに対する耐性化(ORV)検索を行った[16]。

III 結果

1) 2016/17 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス株の型・亜型

本シーズンに大阪市内で採取されたインフルエンザ患者の検体数は 227 となり、昨シーズンの 1.2 倍となった[17]。最初の検体は、正確には本シーズン前となるが、2016 年 7 月 31 日に海外渡航歴のない市内在住者から採取されたものであった。8~10 月の採取検体数は、それぞれ 2、1 および 6 となった。11~1 月の検体数は、それぞれ 27、54 および 68 となり、1 月が採取検体数のピークとなった。その後の 2~5 月までの検体数は、それぞれ 32、29、4 および 3 となった。本シーズンの大阪市内におけるインフルエンザ発生状況については、1~2 月のほぼ全期間で患者報告数が警報値を超え、2017 年第 4 週(1 月下旬)が患者報告数のピークとなった。その後 2 月下旬~3 月上旬(第 9 週)に定点あたりの患者数は 10 人未満となったが、5 月上旬(第 18 週)までの患者報告数は 1 人以上で推移した[18]。本シーズンに分離陽性となったインフルエンザウイルスの株数は 140 で、昨シーズンの 1.3 倍となった[17]。各月の分離株数は、2016 年 7 月に 1 株、9 月に 1 株、その後 10~5 月までは、それぞれ 2、18、33、40、22、19、3、および 1 株であった(表 1)。各月に分離されたインフルエンザウイルス

表 1 2016/17 シーズンのインフルエンザウイルス月別採取検体数および分離陽性数 - 大阪市

	検体採取月										計	
	2016.7	8	9	10	11	12	2017.1	2	3	4		5
採取検体数	1	2	1	6	27	54	68	32	29	4	3	227
分離陽性数	1	0	1	2	18	33	40	22	19	3	1	140

表 2 2016/17 シーズンに分離されたインフルエンザウイルスの月別各型・亜型数 - 大阪市

型・亜型	検体採取月*										計
	2016.7	9	10	11	12	2017.1	2	3	4	5	
AH1pdm	-	-	1	-	1	2	-	4	-	-	8
AH3	1	1	1	18	31	37	22	13	2	1	127
B(Yamagata 系統)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
B(Victoria 系統)	-	-	-	-	-	1	-	2	1	-	4

*: インフルエンザウイルス分離陽性について記載

の各型・亜型数を表 2 に示した。各型・亜型の分離数は、AH1pdm が 8 株(5.7 %)、AH3 が 127 株(90.7 %)、B/Yamagata が 1 株(0.7 %)、および B/Victoria が 4 株(2.9 %)であった。各型・亜型が分離された月は、AH1pdm が 10~3 月、AH3 が 7~5 月、B/Yamagata が 12 月、および B/Victoria が 1~4 月であった。このうち、AH3 に関しては、8 月を除く各月において、それぞれ 1、1、18、31、37、22、13、2、および 1 株が分離され、ピークは検体数と同様に 1 月であった。

2) 各分離インフルエンザウイルス株の HA 価

2016/17 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス株に対して、0.75 % モルモット血球を用いた HA 試験を行い、各株の HA 価を測定した。分離 AH1pdm 株のうち、6 株(75.0 %)が 16 以上の HA 価を示し、2 株(25.0 %)が 8 の HA 価を示した(表 3)。分離 AH3 株のうち、4 株(3.1 %)が 16 の HA 価を示し、これらの検体が採取された月は、9、2 および 3 月であった。また、120 株(94.5 %)が 8 以下の HA 価を示した。なお、4 および 5 月に分離された 3 株については、モルモット血球未入手のため HA 試験を実施しなかった(表 4)。12 月に分離された B/Yamagata 1 株の HA 価は 32 であった(表 5)。分離 B/Victoria 株の HA 価は、64 が 3 株および 128 が 1 株であった(表 6)。

3) 各分離インフルエンザウイルス株の HI 価

16 以上の HA 価を示した各株に対しては、『2016/17 シーズンインフルエンザウイルス (AH1pdm09、AH3、B) 同定用キット』を用いて、引き続き HI 試験を実施して各 HI 価を測定した。本試験対象となった 6 株の AH1pdm の HI 価は、80 が 5 株、160 が 1 株であった。また、AH1pdm コントロール抗原(同定キットに同梱され、ワク

チン株を不活化したもの)での HI 価は 160 であった(表 7)。分離 AH3 株のうち、HA 価 16 を示した 4 株について HI 試験を実施した。これらの HI 価は、80、160、320 および 1,280 がそれぞれ 1 株となった。また、AH3 コントロール抗原での HI 価は 10,240 であった(表 8)。分離された 1 株の B/Yamagata の HI 価は、80 であった。また、このコントロール抗原のものは 160 となった(表 9)。分離された 4 株の B/Victoria の HI 価は、80 が 3 株および 160 が 1 株となり、このコントロール抗原での HI 価は 80 となった(表 10)。

4) リアルタイム RT-PCR を用いた分離株の亜型同定

HI 試験の実施に必要な 16 以上の HA 価を示さなかった 122 の分離株および HA 試験未実施の 3 株について、AH1pdm および AH3 に対するリアルタイム RT-PCR を実施した結果、2 株が AH1pdm および 123 株が AH3 と同定された(表 7、8)。

5) 分離 AH1pdm 株に対するオセルタミビル耐性化検査

本シーズンに分離された 8 株の AH1pdm に対して、ノイラミニダーゼタンパク質の 275 番目のアミノ酸についての検索を行った結果、全株のものがヒスチジンであったことから、オセルタミビル感受性株、すなわち ORV 株ではないことが明らかとなった(表 11)。なお、全国において検出された AH1pdm 株の ORV 出現率は 1.1 % (182 株中 2 株)であり、これらの ORV 株はオセルタミビルおよびペラムビルに耐性、ザナミビルおよびラニナミビルに感受性を示した(2017 年 7 月 5 日現在)[19]。

IV 考察

2016/17 シーズンの大阪市内におけるインフルエンザ

表 3 分離 AH1pdm 株の各 HA 価を示した株数

HA 価	検体採取月*				計
	2016.10	12	2017.1	3	
8	-	1	1	-	2
16	1	-	-	4	5
64	-	-	1	-	1

*: AH1pdm 分離陽性について記載

表 4 分離 AH3 株の各 HA 価を示した株数

HA 価	検体採取月*										計
	2016.7	9	10	11	12	2017.1	2	3	4	5	
<2	-	-	1	16	28	14	13	4	-	-	76
2	-	-	-	1	2	11	4	2	-	-	20
4	-	-	-	1	1	10	2	5	-	-	19
8	1	-	-	-	-	2	1	1	-	-	5
16	-	1	-	-	-	-	2	1	-	-	4
ND**	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	3

*: AH3 分離陽性について記載

** : モルモット血球未入手のため実施せず

表 5 分離 B/Yamagata 株の HA 価

HA 価	検体採取月*	
	2016.12	
32	1	1

*: B/Yamagata 分離陽性について記載

表 6 分離 B/Victoria 株の各 HA 価を示した株数

HA 価	検体採取月*			計
	2017.1	3	4	
64	1	1	1	3
128	-	1	-	1

*: B/Victoria 分離陽性について記載

表 7 分離 AH1pdm 株の各 HI 価を示した株数

HI 価	検体採取月*				計
	2016.10	12	2017.1	3	
80	1	-	-	4	5
160	-	-	1	-	1
試験対象外**	-	1	1	-	2

コントロール抗原に対する HI 価:160

*: HI 試験実施可能株の採取された月のみ記載

** : HA 価が 8 以下の株数

表 8 分離 AH3 株の各 HI 価を示した株数

HI 価	検体採取月*										計
	2016.7	9	10	11	12	2017.1	2	3	4	5	
80	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
160	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
320	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
1,280	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
試験対象外**	1	-	2	18	31	36	20	12	2	1	123

コントロール抗原に対する HI 価:10,240

*: HI 試験実施可能株の採取された月のみ記載

** : HA 価が 8 以下または HA 試験未実施の株数

表 9 分離 B/Yamagata 株の

HI 価	HI 価	
	検体採取月*	
	2016.12	
80	1	1

コントロール抗原に対する HI 価:160

*: HI 試験実施可能株の採取された月のみ記載

表 10 分離 B/Victoria 株の各 HI 価を示した株数

HI 価	検体採取月*			計
	2017.1	3	4	
80	1	1	1	3
160	-	1	-	1

コントロール抗原に対する HI 価:80

*: HI 試験実施可能株の採取された月のみ記載

表 11 分離 AH1pdm 株のオセルタミビル耐性化検索結果

	検査対象株	感受性株	耐性株
該当数	8	8	0

患者数の増加は、11 月上・中旬(2016 年第 45・46 週)から認められ始めたが、これは昨シーズンに比べて約 2 ヶ月早く、また、2014/15 シーズンに比べて約 1 ヶ月遅い流行開始となった。流行のピークは 1 月下旬(2017 年第 4 週)となり、昨シーズンに比べて約半月早く、また、2014/15 シーズンに比べて約 1 ヶ月遅かった[17,20]。全国における今シーズンの流行状況は、流行開始が 11

月中旬(2016 年第 46 週)、流行のピークは 1 月下旬(2017 年第 4 週)となり、大阪市の場合とほぼ同様であった[21]。

今シーズンに大阪市内で分離・同定されたインフルエンザウイルスは、AH3 が全分離株の 90.7 % を占めて主流となり、シーズン全般を通して分離された(表 2)。AH3 が流行の主流となったのは、2014/15 シーズン以来 2 年ぶりのことであり、これは全国においても同様であった[20,21]。また、過去 4 シーズンのインフルエンザウイルスの流行状況は、2013/14 が混合流行(AH1pdm、AH3、B/Yamagata および B/Victoria が同時に分離された)、2014/15 が AH3 主流、2015/16 が混合流行、および今

シーズンが AH3 主流となり、混合および AH3 主流の交互流行が、全国的に認められている[6-8,17,20-22]。この交互流行の出現が今後も継続して認められるのか否か、インフルエンザウイルスの流行状況に、引き続き注意が必要である。

分離されたインフルエンザウイルスのうち、HI 試験を実施するために必要な HA 価を示さなかった株については、リアルタイム RT-PCR 法を用いての型・亜型同定を実施しなければならない。今シーズンにおいては、AH1pdm の 2 株および AH3 の 120 株(さらに HA 試験未実施の 3 株)に対して、リアルタイム RT-PCR 法による同定を実施した(表 7, 8)。分離された AH1pdm 株が様々な HA 価を示すことは、これまでも認められている[17,20,22]。また、最近分離された AH3 株の大半の HA 価は、HI 試験を実施するのに必要な価を示さないことが報告されている。これは、該当株のレセプター結合部位近傍に、糖鎖が負荷されていることが原因とされている[23]。各シーズンに分離された季節性インフルエンザウイルスの各型・亜型株に対して、HA タンパク質の抗原性状および遺伝子の進化系統樹解析が実施されている。これらの結果から、特に AH3 においては、各シーズン分離株の抗原性状および遺伝子(サブクレード)に相違の認められることが報告されている[5-8,21]。AH3 の HA タンパク質遺伝子の系統樹解析結果から、2012/13 シーズンの AH3 株は、クレード 3C に分類された。2013/14 シーズンには、さらに 3C.2a、3C.3a および 3C.3b の新たなサブクレードの集団形成が認められた。2015/16 シーズンに分離された AH3 株はサブクレード 3C.2a が主流で、また、さらなるサブクレード 3C.2a1 の派生が認められた。2016/17 シーズンは、3C.2a が主流となり、また、3C.2a1 の増加傾向が認められた[5-8,21]。この様に、流行する AH3 株の HA タンパク質の遺伝子サブクレードは、各シーズンにおいてほぼ確実に変化を示し、また、サブクレード 3C.2a に分類される株が、低 HA 価を示すことが明らかとなっている[23]。今シーズンに大阪市内で分離され、HA 試験を実施した 120 株の AH3 のうち、4 株は HI 試験の実施に十分な HA 価 16 を示した(表 4)。なお、直近 3 シーズンにおいて HI 試験で同定可能となった AH3 分離株、すなわち 16 以上の HA 価を示した株の割合は、2014/15 が 19.6%、2015/16 が 0%、および 2016/17 が 3.2% (HA 試験未実施株を除く)であった[17,20]。今後分離される AH3 株の性状および HA タンパク質の遺伝子クレードについて、どのような変化が認められていくのか、引き続き注意が必要である。

2016(平成 28)年 4 月 1 日付けで、感染症発生動向調査事業実施要項の一部の改正が適用され、インフルエンザの検体採取が法的に定められた。これによって、インフルエンザの流行期(流行シーズン)および非流行期における自治体単位での採取検体数が明文化された

[24]。この法改正の影響を受けて、今シーズンの検体数は昨シーズンの 1.2 倍となり[17]、また、これまでほとんどインフルエンザ疑患者(海外渡航帰国者を除く)検体の採取・搬入がなかった 7 月において、今シーズンでは検体の搬入が実施されることになったものと思われた。

季節性インフルエンザウイルスは、南北両半球の諸地域において、毎年冬季に世界的規模での流行を引き起こし、その流行状況に関しては、世界保健機関を始めとする関係諸機関が、インターネットなどを介して最新情報を公開している[25-27]。これらの情報を利用して、世界各地におけるインフルエンザウイルスの発生・流行状況を把握することは、インフルエンザに対する行政施策を実施する機関において、非常に有意義となる。2016/17 シーズンの北半球各地域において、流行の主流となったインフルエンザウイルスの型・亜型は、以下の通り報告されている。北アメリカ:AH3、中央アメリカ:AH1pdm および AH3、ヨーロッパ:AH3、西アジア:AH3 および B 型、東アジア:AH3、南アジア:AH3、東南アジア:AH3[28]。また、南半球各地域・国の 2016 シーズン(5~10 月)において、おもに流行したインフルエンザウイルスの型・亜型は、以下の通り報告されている。南アメリカ温帯地域:AH1pdm、南アメリカ熱帯地域:AH1pdm、中央アメリカおよびカリブ海諸国:AH1pdm、南アフリカ:全種類の混合流行、オーストラリア:AH3、ニュージーランド:AH3[2]。流行および患者発生数の規模から、世界における最重要感染症の一つとされる季節性インフルエンザウイルスの流行状況を迅速・的確に把握し、さらにそれに関する情報提供および啓発を行うことは、今後も公衆衛生行政上最重要であるものと思われる。

V 結論

2016/17 シーズンの大阪市内におけるインフルエンザは、流行開始時期は 2016 年 11 月上・中旬、流行ピークは 2017 年 1 月下旬となった。この状況は、全国においても同様に認められた。分離されたインフルエンザウイルスは、AH3 が 90.7% を占めて主流となり、シーズン全般を通して分離された。また、AH3 が流行の主流となったのは、2014/15 シーズン以来 2 年ぶりのことであり、これは全国においても同様であった。

インフルエンザウイルスに関する最新の流行状況を把握し、その情報提供および啓発を行うことは、公衆衛生上重要なことである。

謝辞 本研究における臨床検体の採取および諸連絡などに関しまして、ご協力をいただきました関連諸機関の皆様、深謝いたします。

参考文献

- 1) Tafalla M, Buijssen M, Geets R, Vonk Noordegraaf-S M. A comprehensive review of the epidemiology and disease burden of influenza B in 9 European countries. *Hum Vaccin Immunother* 2016; **12**: 993-1002.
- 2) World Health Organization. Review of the 2016 influenza season in the southern hemisphere. *Wkly Epidemiol Rec* 2016; **91**: 611-622.
- 3) World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec* 2016; **91**: 121-132.
- 4) World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017-2018 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec* 2017; **92**: 117-128.
- 5) 国立感染症研究所、独立行政法人製品評価技術基盤機構、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ. 2012/13 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. *病原微生物検出情報* 2013; **34**: 328-334.
- 6) 国立感染症研究所、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ. 2013/14 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. *病原微生物検出情報* 2014; **35**: 254-258.
- 7) 国立感染症研究所、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ. 2014/15 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. *病原微生物検出情報* 2015; **36**: 202-207.
- 8) 国立感染症研究所、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ. 2015/16 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. *病原微生物検出情報* 2016; **37**: 214-219.
- 9) Xu R, Ekiert D C, Krause J C, Hai R, Crowe Jr J E, Wilson I A. Structural basis of pre-existing immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* 2010; **328**: 357-360.
- 10) Uyeki T M. Preventing and controlling influenza with available interventions. *New Eng J Med* 2014; **370**: 789-791.
- 11) Tricco A C, Chit A, Soobiah C, Hallett D, Meier G, Chen M H, et al. Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 2013; **11**: 153.
- 12) 国立感染症研究所. <特集> インフルエンザ 2014/15 シーズン. *病原微生物検出情報* 2015; **36**: 199-201.
- 13) 国立感染症研究所. <特集> インフルエンザ 2015/16 シーズン. *病原微生物検出情報* 2016; **37**: 211-213.
- 14) 国立感染症研究所. インフルエンザ診断マニュアル (平成 26 年 9 月 第 3 版). 東京:国立感染症研究所;2014.
- 15) 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター. AH3 分離株の遺伝子検査の簡便化とコスト削減に関する情報提供. 2015(平成 27)年 3 月 5 日.
- 16) 国立感染症研究所. A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール (2011 年 8 月 ver.2). 東京:国立感染症研究所;2011.
- 17) 久保英幸、上林大起、改田厚、入谷展弘、平井有紀、山元誠司、他. 2015/16 シーズンに大阪市で分離された季節性インフルエンザウイルス. *大阪市立環科研報告* 2016; **78**: 7-12.
- 18) 大阪市. H28-H29 大阪市インフルエンザ発生状況 <http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/page/0000101070.html>
- 19) 国立感染症研究所. 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2017 年 06 月 30 日. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/influ-resist.html>
- 20) 久保英幸、改田厚、入谷展弘、山元誠司、西尾孝之. 2014/15 シーズンの大阪市における季節性インフルエンザウイルスの分離状況. *大阪市立環科研報告* 2015; **77**: 7-11.
- 21) 国立感染症研究所、厚生労働省結核感染症課. 今冬のインフルエンザについて(2016/17 シーズン) 2017(平成 29)年 6 月 19 日.
- 22) 久保英幸、改田厚、入谷展弘、山元誠司、長谷篤、西尾孝之. 2013/14 シーズンに大阪市内で分離された季節性インフルエンザウイルス. *大阪市立環科研報告* 2014; **76**: 1-6.
- 23) 国立感染症研究所. 平成 28 年度(2016/17 シーズン)インフルエンザワクチン株の選定経過. *病原微生物検出情報* 2016; **37**: 225-227.
- 24) 厚生労働省. 感染症発生動向調査事業実施要項の一部改正について. 平成 27 年 11 月 9 日(健発 1109 第 3 号).
- 25) World Health Organization. Influenza. <http://www.who.int/influenza/en/>
- 26) Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data. News. <http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#3ca1fe>
- 27) 国立感染症研究所感染症疫学センター. インフルエンザ. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/a/flu.html>
- 28) World Health Organization. Influenza updates. http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/en/

(WEB サイトの内容は 2017 年 7 月 5 日に確認した)

LC-MS/MS による植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討

村上太郎、紀雅美、山口之彦、昌山敦、山野哲夫

Simultaneous analysis of phytotoxins by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Taro MURAKAMI, Masami KI, Yukihiro YAMAGUCHI, Atsushi MASAYAMA,
and Tetsuo YAMANO

Abstract

A rapid and sensitive LC-MS/MS method was developed for the quantitative determination of 13 phytotoxins. The analysis was performed by a multimode ODS column using a mixture of methanol and water containing 10 mmol/L ammonium formate and an electrospray ionization mass spectrometer. The chromatographic total run time was 10 min and the limits of determination of 13 phytotoxins were 20 ng/mL, respectively. The recovery and repeatability of phytotoxins in urine was ranged from 68-152% and 1.7-24% using an Oasis HLB SPE column. The recovery and repeatability of phytotoxins in curry was ranged from 65-107% and 0.3-24% by Autoprep MF-S. The present method with acceptable analytical performance can be helpful for evaluating the determination of phytotoxins in food poisoning incidents.

Key words: simultaneous analysis, phytotoxin, food poisoning, LC-MS/MS, multimode ODS column

I 緒言

高等植物の植物性自然毒(植物毒)による食中毒は、平成元年から平成 22 年の 22 年間に 287 件の事例が発生し、1,546 名の患者が報告されている[1]。植物毒による食中毒は、摂取状況によって重篤な症状を起こす場合があり、トリカブト、イヌサフランおよびグロリオサによる食中毒では死亡事例も報告されている[1]。このため、植物毒による食中毒が起こった際には迅速に原因物質を特定することによって、早急に対応を行う必要がある。

近年、液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS/MS)による植物毒などの自然毒の一斉分析法が報告されており、尿や有毒植物などの自然毒の分析に応用されている[2, 3]。本研究では LC-MS/MS による植物毒の迅速一斉分析法の検討を行い、本分析法が尿と油脂や香辛料を多く含む植物毒の抽出が困難だと想定される加工食品のカレー中の植物毒の分析に適応できるかを確認した。

II 方法

1) 分析対象(植物毒)

過去に食中毒事例が報告されている植物毒のうち、本研究ではトリカブトに含有するアコニチン、メサコニチンおよびヒパコニチン、スイセンに含有するガランタミン、チョウセンアサガオに含有するアトロピンおよびスコポラミン、イヌサフランおよびグロリオサに含有するコルヒチンとデメコルシン、キダチタバコに含有するアナバシンとニコチン、パイケイソウに含有するベトラミン、シクロパミンおよびジェルピンの合計 13 種の植物毒を分析対象とした。

2) 試薬および器具

(1) 標準品

植物毒標準品はそれぞれ以下に示す試薬会社から入手した。

アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチン、ガランタミン、アトロピン、スコポラミン、コルヒチン、デメコルシン：和光純薬工業製、アナバシン、ニコチン：Sigma-Aldrich 製、ベトラミン、ジェルピン：Merck 製、シクロパミン：フナコシ製

(2) 精製用カラム

Oasis HLB: Waters 社製 (60 mg/3 cc、粒径 30 μm)、
Autoprep MF-S: 昭和電工社製 (500 mg/1 mL)、
MycoSpin™ 400 Multitoxin: Romer Labs 社製

(3) 分析カラム

Scherzo SM-C18: Imtakt 社製 (内径 3 mm、長さ 50 mm および 150 mm、粒子径 3 μm)

(4) 移動相

移動相は 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液を 10 mmol/L となるように HPLC 用の蒸留水で希釈して使用した。移動相用のメタノールは HPLC 用のものを使用した。

(5) 試薬

抽出用のメタノールと蒸留水は HPLC 用のものを使用した。

(6) 器材・器具

振とう機 MW-4R: 宮本理研社製
遠心機 himac CR21G: 日立工機社製
微量遠心機 himac CF15R: 日立工機社製
ミルサー 800DG: 岩谷産業製
ボルテックスミキサー VORTEX-GENIE 2: エムエス機器社製

シリンジフィルター DISMIC®-25HP: ADVANTEC 社製 (PTFE 製、孔径 0.2 μm)

3) 装置と測定条件

使用した装置と測定条件を表 1 に示す。植物毒は ODS による逆相分離に加えてアニオン交換とカチオン交換能を有するマルチモード ODS カラムの Scherzo SM-C18 によって分離した。

4) イオン化条件の検討

各植物毒標準品をメタノールで 10 μg/mL となるように希釈し、イオン化条件の検討用の標準液として使用した。各標準液を FIA (フローインジェクションアナリシス) で注入し、植物毒のマスペクトルを確認後、Corn Voltage (CV) と Collision Energy (CE) の条件を最適化した。

5) 分離条件の検討

植物毒の分離条件は、久野らの有毒植物中の植物毒の分析法[3]を参考に移動相を A: 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液、B: メタノールとして、グラジエントによる分離を行った。Scherzo SM-C18 について、2 種類の異なる長さのカラム (150 mm および 50 mm) ごとに、ACQUITY UPLC Columns Calculator ソフトウェアによって、流速とグラジエント条件を最適化した (表 1)。

最適化した条件により、13 種の植物毒標準品の分析を行い、各植物毒の定量範囲の確認を行った。

表1. 分析装置と測定条件

液体クロマトグラフ	Waters社製ACQUITY UPLC	
カラム	Imtakt社製Scherzo SM-C18 (2.1 mm I.D., 3 μm)	
カラム温度	40 °C	
移動相	A 10 mmol/Lギ酸アンモニウム B メタノール	
分離条件		
① カラム長 150 mm	A 85% (0-2 min.)→10% (32-47 min.)	流速0.2 mL/min.
② カラム長 50 mm	A 85% (0-1.0 min.)→10% (6.6-9.5 min.)	流速0.35 mL/min.
質量分析装置	Waters社製Xevo™ TQ	
イオン化	ESI positive	
測定モード	SRM (Selective Reaction Monitoring)	
Ionspray voltage	3.0 kV	
Ion source temp.	350 °C	

6) 添加回収試験

添加回収試験用の尿は LGC Standards 社より入手した。尿 1mL に各植物毒を 100 ng/mL となるように添加したものを試料とした。添加回収試験用の加工食品には、市販のレトルトカレーをミルサーによって均質化したものを使用した。均質化したカレー 1 g に各植物毒を 10 µg/g となるように添加したものを試料とした。試料は 3 併行で抽出し、添加した植物毒標準品の濃度に対する回収率の平均値と相対標準偏差 (RSD) を評価した。

本分析は、食中毒事例が起こった際に迅速に植物毒を検出することを目的とするため、加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法の性能評価基準を参考に回収率の目標値を 50-200%、併行精度の目標値を RSD として 30% 以内にそれぞれ設定した[4]。

7) 抽出

(1) 尿

Oasis HLB をメタノール 5 mL、蒸留水 5 mL でコンディショニング後、尿 1 mL を負荷し、10 %メタノール 5 mL で洗浄後、メタノール 1 mL で溶出した。抽出液はシリンジフィルターでろ過後、適宜メタノールで希釈して測定を行った。

(2) 加工食品

試料 1 g にメタノール 20 mL を加え、30 分間振とう抽出後、10 分間遠心分離 (7,000 rpm, 4 °C) を行い、上清をシリンジフィルターでろ過したものを抽出原液とした。

抽出原液は次に示すように、各カラムでそれぞれ精製後に分析した。Oasis HLB をメタノール 5 mL、蒸留水 5 mL でコンディショニング後、抽出原液 1 mL を負荷し、10 %メタノール 5 mL で洗浄後、メタノール 1 mL で溶出した。Autoprep MF-S に抽出原液を 1.2 mL 負荷し、自然落下で溶出した試料溶液を回収した。

Mycospin 400 に抽出原液を 1 mL 負荷した後、Vortex でカラムを混合後に、2 分間の遠心分離 (10,000 rpm, 4 °C) によって溶出した試料溶液を回収した。精製後の試料溶液は適宜メタノールで希釈して測定を行った。

III 結果と考察

1) イオン化条件の検討

全ての植物毒において、ポジティブモードでプロトン付加分子 $[M + H]^+$ が観測されたため、これをプリカーサーイオンとした。また、最も感度が高いプロダクトイオンを定量用に設定した (表 2)。

表2. LC-MS/MSによる各植物毒の測定条件

標準品	Monoisotopic (Da)	Precursor ions (<i>m/z</i>)	Productions (<i>m/z</i>)	CV (V)	CE (V)
① Nicotine	162.2	163.2	130.1	30	20
② Anabasine	162.2	163.2	80.0	30	20
③ Galanthamine	287.4	288.1	231.0	30	20
④ Scopolamine	303.4	304.2	156.0	30	20
⑤ Atropine	289.4	290.1	124.0	40	20
⑥ Colchicine	399.4	400.1	310.0	30	30
⑦ Demecolcine	371.4	372.2	310.1	30	20
⑧ Mesaconitine	631.3	632.3	104.9	50	60
⑨ Aconitine	654.3	646.3	104.9	60	60
⑩ Hyapaconitine	615.3	616.3	104.9	50	60
⑪ Veratramine	409.6	410.5	84.0	50	30
⑫ Jervine	425.6	426.6	114.0	50	30
⑬ Cyclopamine	411.6	412.6	114.0	50	30

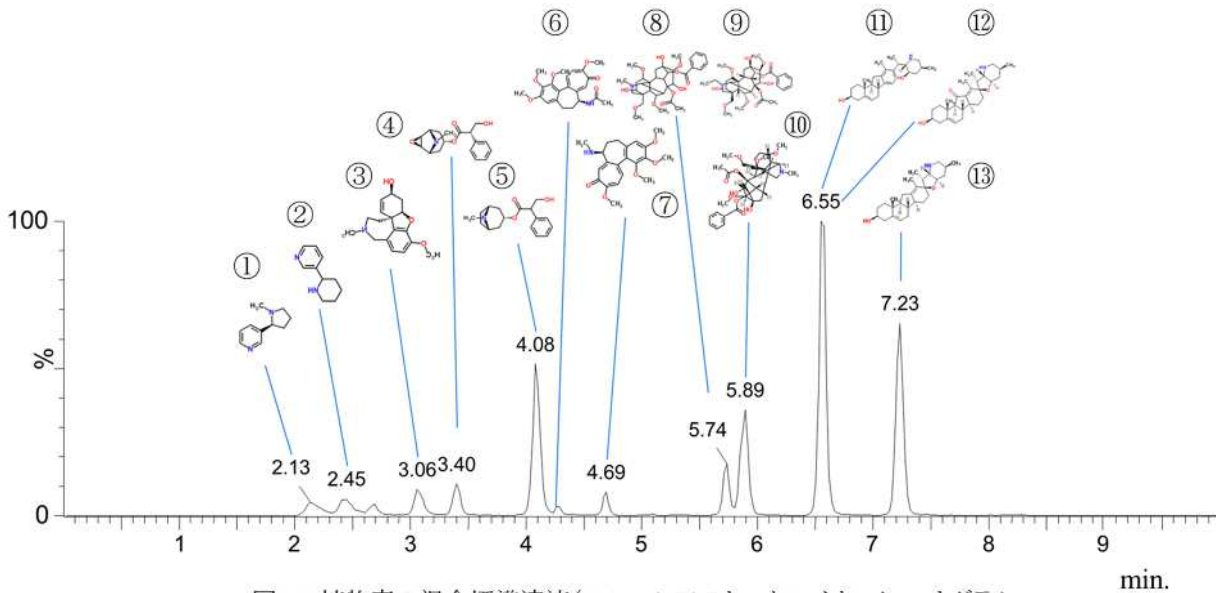


図1 13植物毒の混合標準溶液(100 ng/mL)のトータルイオンクロマトグラム
* 各植物毒と定量条件は表2に示す。

2) 最適化した分離条件による植物毒の分離の確認

最適化した分離条件で 13 種の植物毒標準品について測定を行ったところ、迅速分析用の分離条件では 1 測定 10 分以内で分離が可能となった。図 1 には 13 種の植物毒の 100 ng/mL 混合標準液を分析した時のトータルイオンクロマトグラムと構造を示す。

迅速分析用の分離条件ではいずれの植物毒も 20-500 ng/mL の範囲で直線性を示し、従来の分離条件での定量下限(定量下限:20 ng/mL)や直線性の範囲の差異は確認されなかった。

3) 尿からの植物毒の検出

立野らによる健康者の尿での添加回収試験における報告[2]を参考に、各植物毒を尿 1 mL あたり 100 ng になるように添加し、添加回収試験を実施した。尿を Oasis HLB によって精製後に分析した時の各植物毒の回収率と標準偏差を図 2 に示す。今回検討を行った 13 種の植物毒の回収率の範囲は 68-152 % であり、いずれも目標とした 50-200% の回収率を満たした。各植物毒の RSD の範囲は 1.7-24 % であり、目標とした 30 % 以内の RSD を満たした。

LC-MS/MS による尿中の植物毒の分析は、山辺らによって尿中のアトロピンとスコポラミンの迅速定量についての検討が行われている[5]。この検討の中では、尿を Oasis HLB で精製後に陰イオン交換カラムの BondElut DEA (Agilent 社製)により精製することによって、スコポラミンの回収率が向上すること

が報告されている。また、小西らによるチョウセンアサガオの喫食による食中毒事例における尿中のヒヨスチアミンとアトロピンの検出事例でも尿を Oasis HLB で精製後に、陰イオン交換カラムの Inert-Sep SlimJ PSA (GL Science 社製)で精製することで良好な回収率が得られることが報告されている[6]。このように塩基性化合物であるアトロピンやスコポラミンなどの化合物では陰イオン交換カラムで精製を行うことによって、回収率と精度の向上が期待される。小西らの報告では、チョウセンアサガオの喫食による食中毒における中毒患者の尿から 170-670 ng/mL のスコポラミンが検出されたことが報告されている[6]。検討した迅速分析法では尿中の 100 ng/mL のスコ

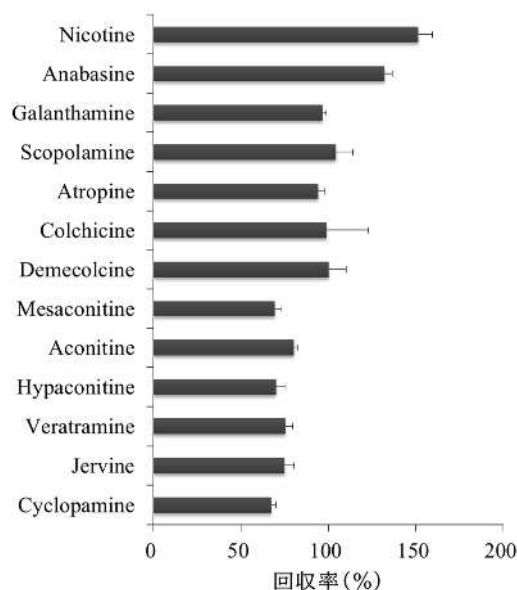


図2 尿から抽出した植物毒の回収率

*尿に添加した各植物毒(100 ng/mL)に対する回収率の平均値と標準偏差(n=3)

ポラミンが検出可能であったため、チョウセンアサガオの喫食による食中毒が起こった際には検出可能であると考えられる。また、グロリオサによる食中毒事例では尿中から 1.5 mg/L のコルヒチンが検出されている[7]。尿中のコルヒチン濃度は 1,500 ng/mL と換算されるため、食中毒が発生した際には迅速一斉分析法で検出することが可能である。

4) 加工食品(カレー)からの検出

加工食品での添加回収試験では、久野らによる有毒植物中の植物毒含有量の結果を参考に[3]、各植物毒をカレー 1 g あたり 10 µg 含むように添加した試料を用いて検討を行った。試料をメタノールで振とう抽出した抽出原液をメタノールで希釈し、測定を行ったところ、分離条件の前半に溶出されるニコチンとアナバシンが検出されなかった。これらの植物毒はカレー中の油脂や香辛料などのマトリクスが共存したことによって、イオン化抑制を受けていると推定されたため、抽出原液を各精製カラムで精製後に測定を行った。精製後の植物毒の回収率の平均値と標準偏差を図 3 に示す。Oasis HLB による精製後にはアナバシンが検出されなかった。Mycospin 400 による精製後の回収率の範囲は 54-113% であり、目標と

した 50-200 % の回収率を満たした。しかしながら、*RSD* の範囲は 2.5-33.9 % であり、コルヒチンとジェルビンの併行精度が目標とした 30% 以内の *RSD* を満たさなかった。Mycospin 400 はゼアラレノン、トリコテセン系カビ毒、アフラトキシン、オクラトキシン、フモニシンを対象とするスピン型多機能カラムであり、家畜用飼料用のトウモロコシ中のカビ毒の検出に適用されている[8]。本カラムはカレー中のコルヒチンとジェルビン以外の植物毒 11 種を精製する際に適用可能であることが確認された。

Autoprep MF-S で精製した植物毒の回収率と *RSD* の範囲はそれぞれ 65-107 % と 0.3-24 % であり、目標とした回収率と *RSD* を満たした。Autoprep MF-S はアフラトキシンを対象とするイムノクロマト測定用クリーンアップ多機能カートリッジとして販売されているが、本カラムもカレーから植物毒を精製する際にも適用可能であることが確認された。

カレーから抽出した植物毒の精製を検討した 3 種のカラムの中では、Autoprep MF-S のみが目標とした回収率と *RSD* を満たしたため、油脂や香辛料などの複雑なマトリクスから 13 種の植物毒を精製する際には Autoprep MF-S が有効であると考えられる。

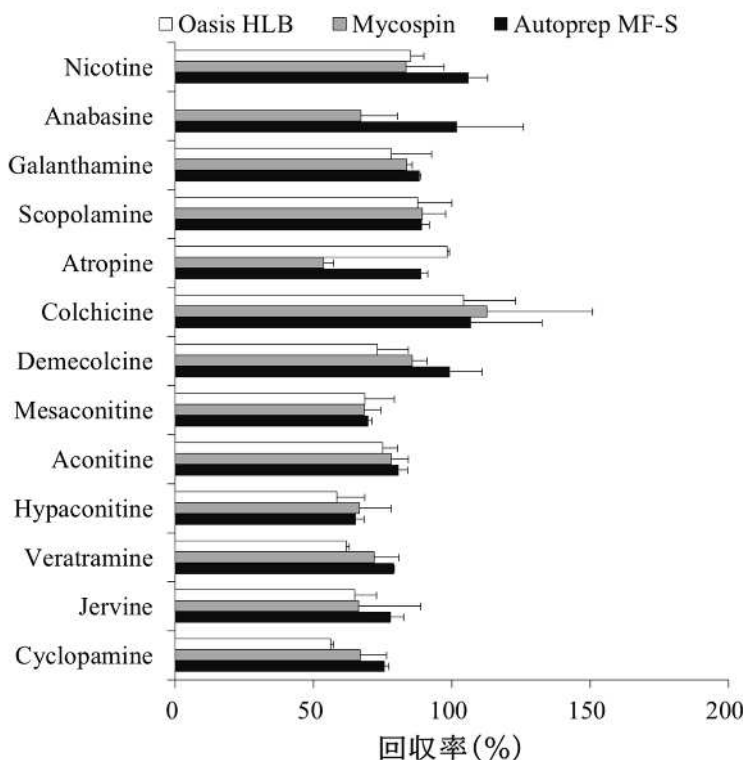


図3 カレーから抽出した植物毒の回収率

*1 カレーに添加した各植物毒(10 µg/g)に対する回収率の平均値と標準偏差(n=3)

5) 野草茶中のスコポラミンおよびアトロピンによる食中毒事例への応用

本分析法は大阪市内で発生した野草茶中のスコポラミンおよびアトロピンによる食中毒事例の中でも応用が可能であった[9]。この事例では事前に札幌市で同様の食中毒が報告されていたため[10]、植物毒の同定が比較的容易であった。

しかしながら、植物毒による食中毒事例では原因の特定が困難な場合も想定される。このため、今後は本分析法で分析可能な植物毒と対象となる加工食品の範囲を確認することによって、植物毒による食中毒発生の際には迅速な対応が可能となると考える。そして、有毒植物による食中毒事例では混入した有毒植物の量とその有毒植物中の植物毒の含有量によって、残品に含まれる植物毒の量が変化すると推定される。また、加熱などの調理加工による影響によっても植物毒の残存量は変化すると推定される。実際に有毒植物による食中毒が起こった際には、本分析法で植物毒を迅速に検出した後に、検出された植物毒と混入した試料マトリクスによって抽出液の精製法やマトリクス検量線などの定量法を検討することによって、より精確に原因となった食品中の植物毒を定量できると考える。

IV まとめ

13種の植物毒をUPLCによる分離条件の最適化によって、1測定10分間での迅速なスクリーニングが可能となった。検討を行った迅速分析法は尿とカレー中の13種の植物毒で目標とした50-200%の回収率と30%以内のRSDを満たしていた。検討を行った植物毒の迅速一斉分析は試料の前処理から測定まで1時間程度で分析ができるため、食中毒事例の際には迅速な対応が可能であると考えられる。

謝辞 植物毒の分離条件の検討にあたり、インタクト(株)から助言を戴きましたことを深謝いたします。本分析法の抽出条件の検討にあたり、元和歌山県環境衛生センターの久野恵子様から有毒植物の試料を提供して戴きましたことを深謝いたします。

参考文献

- 1) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福 肇, 森川 馨. わが国における自然毒による食中毒事例の傾向(平成元年~22年). 食品衛生学雑誌 2012; 53: 105-120.
- 2) 立野幸治, 藤原美智子, 三浦泉. LC/MS/MSによる尿中植物性自然毒一斉分析手法の検討. 山口県環境保健センター所報 2009; 52: 54-57.
- 3) 久野恵子, 高井靖智, 橋爪崇, 山東英幸. 健康機器管理に対応した自然毒一斉分析法の検討—有毒植物および毒きのこ19成分—. 第48回全国衛生化学技術協議会年会講演集 2011: 41-42.
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課. 加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について. 事務連絡, 平成25年3月26日.
- 5) 山辺真一, 肥塚加奈江, 山本 淳, 石井 学, 今中雅章. LC/MS/MSによる尿中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量. 岡山県環境保健センター年報 2008; 32: 141-143.
- 6) 小西友彦, 赤木浩一, 畑野和広. LC/MS/MSによるヒト血清・尿中のヒヨスチアミンおよびスコポラミンの分析. 食品衛生学雑誌 2008; 49: 266-271.
- 7) 宅間範雄, 荒尾真砂, 古田和美, 麻岡文代, 川田常人, 福永和俊. グロリオサによる食中毒事例 - LC/MS/MSによるコルヒチンの分析 -. 高知衛研報 2008; 54: 42-45.
- 8) Dagnac T, Latorre A, Fernández Lorenzo B, and Llompart M. Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2016; 33:1850-63.
- 9) 紀雅美, 仲谷正, 山口之彦, 昌山敦, 角谷直哉, 村上太郎, 清水充. 大阪市内で発生した自然毒による食中毒事例への対応について. 大阪市立環科研報告 2014; 76: 19-23.
- 10) 細木伸泰, 滝川香織, 小金澤望, 牧里江, 宮本啓二, 宮田淳. 野草茶からのスコポラミン検出事例について. 札幌市衛研年報 2013; 40: 48-54.

水蒸気蒸留 固相抽出 HPLC 法による加工食品中の保存料の含有量調査

新矢将尚、油谷藍子、工藤鮎子、山口之彦、山野哲夫

Survey of preservatives content in processed foods by HPLC after steam distillation and solid-phase extraction

Masanao SHINYA, Aiko YUTANI, Ayuko KUDO, Yukihiko YAMAGUCHI and Tetsuo YAMANO

Abstract

A simultaneous analysis method of four preservatives (benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid and propionic acid) by high performance liquid chromatography (HPLC) after steam distillation and solid-phase extraction was applied to analysis of processed foods. The present method showed that good recovery rates of all target preservatives were obtained regardless of the type of processed foods with high precision of analysis. A very small amount of benzoic acid, regarded as occurring naturally, was detected from cake, cheese, jam, pickled food, processed meat and processed seafood. Especially from natural cheese, benzoic acid was frequently detected, but its daily intake was estimated at only 1/10,000 of acceptable daily intake, and accordingly, it had no impact on food safety and human health. Sorbic acid and propionic acid were detected from samples labeled as containing them. Dehydroacetic acid was not detected from any sample. Comparison of the analytical results between the present method and the official method with respect to the samples labeled as containing sorbic acid indicated a very good correlation, consequently the present method was as effective as the official method.

Key words: preservatives, processed food, steam distillation, solid-phase extraction, HPLC

I はじめに

わが国では人口減少局面を迎え、単身世帯の増加や生鮮食品の高騰などにより、食料支出において加工食品の占める割合が年々増大しており、その傾向は将来も継続すると見込まれている[1]。加工食品にはその品質を保持するために、さまざまな食品添加物が使用されており、食品の腐敗や変敗の原因となる微生物の増殖を抑制するためには、保存料が使用される。

わが国で許可されている保存料は、安息香酸(ナトリウム塩を含む)、ソルビン酸(カリウム塩またはカルシウム塩を含む)、デヒドロ酢酸ナトリウム、プロピオン酸(カルシウム塩またはナトリウム塩を含む)および安息香酸エステル類であり、それぞれ食品ごとに使用基準が定められている。安息香酸エステル類を除く保存料は酸型であり pH の低い食品、特に液体食品で効果が高く、酸味料を添加して pH を下げている食品もみられる[2]。

これらの保存料は微量ながら天然にも存在し、安息香酸は乳製品の原料中に含まれる馬尿酸の分解[3,4]や、植物中に含まれる安息香酸誘導体の加水分解[5]により生成され、これらを原料とする加工食品で検出される報

告例は多い[6-11]。また、ソルビン酸は元来バラ科のナナカマドに由来しており、プロピオン酸は種々の微生物の代謝産物としてチーズなど発酵食品に含まれる[12]ほか、魚介類・肉類にも含まれる[13]。

このように、天然由来の保存料成分がしばしば報告されていることから、食品から検出された場合には、添加されたものか天然成分として含有されていたものかの判別が困難であり、行政上しばしば問題となる。また、保存料の 1 日摂取量も多く見積もられることになるため、食生活の安全と市民の健康維持に関しても、食品中の保存料含有量を正しく把握しておくことは重要である。

一方、食品中の保存料の検査方法は、通知法[14]において、安息香酸、ソルビン酸およびデヒドロ酢酸と、プロピオン酸とでは、条件が全く異なっているため、同時に分析することはできない。そのため、著者らはこれら 4 成分を同時に分析できる方法を開発し、チーズにおいてそれらの分析妥当性を確認した[15]。今回、チーズ以外の加工食品においても、本法の有効性を確認し、加工食品中の保存料含有量を調査したので報告する。

II 実験方法

1) 試料

平成 28 年 6 月～12 月に大阪市内で市販された加工食品で、リンゴジュース(2 検体)、バター(1 検体)、洋菓子(3 検体)、ナチュラルチーズ(12 検体)、ジャム(5 検体)、マーガリン(2 検体)、しょうゆ漬(2 検体)、酢漬(10 検体)、キムチ(3 検体)、食肉製品(30 検体)、魚介乾製品(6 検体)、魚介くん製品(1 検体)、魚肉ねり製品(13 検体)、その他魚介加工品(2 検体)を用いた。

2) 試薬・資材

(1) 標準溶液

安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸(いずれも関東化学(株)製、食品分析用)については、各 500 mg をメタノールに溶解してそれぞれ 50 mL に定容したものを標準原液(各 10,000 µg/mL)とし、適宜蒸留水で希釈して用いた。また、プロピオン酸標準溶液には、プロピオン酸ナトリウム(関東化学(株)製、カルボン酸分析計用)325 mg を蒸留水に溶解して 25 mL としたものを標準原液(プロピオン酸として 10,000 µg/mL)とし、適宜希釈して用いた。

(2) 水蒸気蒸留添加液

15% 酒石酸溶液:L(+)-酒石酸(試薬特級)150 g を蒸留水に溶解して 1,000 mL とした。

(3) 固相抽出用カートリッジカラム

強陰イオン交換型である MEGA Bond Elut SAX(充填量 1,000 mg、基材:シリカゲル、Agilent 社製)において、あらかじめメタノール 5 mL および蒸留水 10 mL で順次洗浄し、0.8 M NaF 溶液(フッ化ナトリウム 3.36 g を蒸留水に溶かして 100 mL にしたもの)10 mL を通液して F 置換したものをを用いた。

(4) HPLC 用移動相

200 mM リン酸緩衝液(pH4.0):リン酸(85%、試薬特級)0.178 mL とリン酸二水素カリウム(試薬特級)26.864 g を蒸留水に溶かして 1,000 mL とした。これを用時蒸留水で 10 倍に希釈して用いた。蒸留水およびアセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用を用いた。

3) 装置

(1) 水蒸気蒸留装置

宮本理研工業(株)製 STC-3D を用いた。

(2) HPLC

Waters 社製 e2695 Alliance システムおよび e2998(フオートダイオードアレー検出器)を用いた。測定条件を Table 1 に示す。

Table 1 HPLC condition.

Column	Inertsil ODS-3 (4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 µm)
Mobile phase	Solvent A: 20mM Phosphate buffer (pH4.0) Solvent B: Acetonitrile
Gradient profile	A:B = 94:6 (0 min) 74:26 (0-5 min, linear gradient) 74:26 (5-25 min)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	40
Detection	230 nm (BA, SoA, DhA), 210 nm (PA)
Injection volume	40 µL

BA: benzoic acid. SoA: sorbic acid. DhA: dehydroacetic acid. PA: propionic acid.

4) 試験溶液の調製

前報[15]と同じ方法で行った。すなわち、試料 6 g を蒸留フラスコに秤り取り、蒸留水 100 mL、15 % 酒石酸溶液 10 mL、塩化ナトリウム 60 g を加え(発泡する場合はさらにシリコン樹脂数滴を加える)、毎分 10 mL の留出速度で水蒸気蒸留を行った。留液はあらかじめ蒸留水 15 mL を加えたメスシリンダー中に捕集し、300 mL になるまで蒸留した。次に、留液の 25 mL を分取して固相カートリッジに負荷した後、5 % 塩化ナトリウム含有 0.01 mol/L 塩酸 5 mL で溶出し、孔径 0.45 µm のメンブレンフィルタに通したものを HPLC 用試験溶液とした。

III 結果および考察

1) 添加回収試験

前報[15]では、チーズにおいて添加回収試験を行い、良好な回収率と分析精度が得られた。本法が他の加工食品においても有効であるかを検証するために、リンゴジュース、バター、ケーキ、イチゴジャム、マーガリン、ソーセージ、カマボコにおいて、添加回収試験を行った。いずれの保存料も定量下限値未満と確認された試料に、あらためて標準を添加して分析し回収率を求めた。添加量は前報と同様に、定量下限(安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸は各 0.001 g/kg、プロピオン酸は 0.1 g/kg)の 2 倍濃度になるよう、それぞれ添加したものを低濃度試料とした。また、使用基準の 1/2 濃度になるよう、それぞれ添加したものを、高濃度試料とした。高濃度試料に関しては、リンゴジュースでは菓子製造用果汁の基準を適用した。バターでは安息香酸およびソルビン酸の基準がないためマーガリンの基準を代用した。ケーキ(洋菓子)では植物性油脂が使用されていたことから、安息香酸、ソルビン酸およびデヒドロ酢酸についてマーガリンの基準を代用した。イチゴジャムでは安息香酸について菓子製造用果汁ペーストの基準をあてはめた。

添加回収試験の結果を Table 2 に示す。いずれの回収率も同一の試料を併行して 3 回分析した平均値を示している。安息香酸については、高濃度試料の回収率

Table 2 Recoveries of preservatives added to processed foods.

Type of food	Benzoic acid			Sorbic acid			Dehydroacetic acid			Propionic acid		
	Added (g/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Added (g/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Added (g/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Added (g/kg)	Recovery (%)	CV (%)
Apple juice	0.002	107	1.2	0.002	91.4	2.9	0.002	95.9	2.5	0.2	98.0	1.4
	0.5	95.0	3.1	0.5	92.1	2.9	—	—	—	—	—	—
Butter	0.002	101	1.1	0.002	93.7	2.8	0.002	100	1.8	0.2	100	2.8
	0.5	94.7	0.8	0.5	93.8	0.2	0.25	93.8	0.2	—	—	—
Cake	0.002	100	2.1	0.002	86.4	1.5	0.002	96.3	3.9	0.2	99.5	2.9
	0.5	92.7	2.0	0.5	88.3	2.1	0.25	90.4	3.0	1.25	92.0	2.3
Strawberry jam	0.002	102	1.3	0.002	94.5	2.5	0.002	100	2.0	0.2	106	3.4
	0.5	95.0	3.4	0.5	93.1	0.7	—	—	—	—	—	—
Margarin	0.002	105	2.4	0.002	84.6	3.0	0.002	95.7	0.6	0.2	98.0	1.7
	0.5	91.8	2.3	0.5	92.4	0.5	0.25	89.8	2.2	—	—	—
Processed meat (Sausage)	0.002	101	1.3	0.002	88.5	2.5	0.002	94.7	1.4	0.2	97.3	2.5
	—	—	—	1	92.4	0.3	—	—	—	—	—	—
Steamed fish paste (Kamaboko)	0.002	105	0.8	0.002	92.6	0.8	0.002	96.2	2.3	0.2	98.7	1.9
	—	—	—	1	89.0	2.0	—	—	—	—	—	—

Each recovery represents the mean of three trials. CV : coefficient of variation.

はいずれの食品においても 91.8 ~ 95.0 % と良好であり、変動係数も 0.8 ~ 3.4 % とばらつきは小さかった。低濃度試料の回収率は 100 ~ 107 % と高濃度試料に比べて若干高かったが、天然由来の痕跡量が上乘せされるためと考えられた。変動係数は 0.8 ~ 2.4 % と高濃度試料と同様にばらつきが小さかった。

ソルビン酸については、高濃度試料の回収率は 88.3 ~ 93.8%、変動係数は 0.2 ~ 2.9 % であり、安息香酸と同様に良好であった。低濃度試料では、回収率は 84.6 ~ 94.5%、変動係数は 0.8 ~ 3.0 % であり、高濃度試料と同等であった。

デヒドロ酢酸については、高濃度試料では回収率が 89.8 ~ 93.8 %、変動係数が 0.2 ~ 3.0 % であり、低濃度試料では回収率が 94.7 ~ 100 %、変動係数が 0.6 ~ 3.9 % であった。

プロピオン酸については、高濃度試料はケーキで行っていないが、回収率は 92.0 %、変動係数は 2.3 % であった。低濃度試料の回収率は 97.3 ~ 106 %、変動係数が 1.4 ~ 3.4 % であった。

前回で報告したナチュラルチーズの回収率および変動係数は、いずれの保存料も今回と同レベルであり、本法は加工食品の種類を問わず回収率、分析精度ともきわめて良好であることが示された。

2) 試料中の保存料含有量

(1) 食品毎の含有量

対象とした 14 種類 92 検体の加工食品中の保存料含有量を測定した。それぞれの保存料について、食品毎の検出頻度と含有量の範囲および使用基準を Table 3 に示す。なお、デヒドロ酢酸はいずれの検体からも検出されなかった。

洋菓子では、1 検体にプロピオン酸カルシウムとソルビン酸カリウムの使用表示があり、測定結果はそれぞれ

0.6g/kg と 0.088 g/kg であった。安息香酸は 2 検体で検出され、0.004 g/kg と 0.008 g/kg であった。それらの洋菓子には果実・果皮加工品が使用されており、かんきつ類では果実より果皮の方が安息香酸の含有量が高い[6]ため、果皮の使用量が安息香酸含有量に影響すると考えられた。

ナチュラルチーズでは、安息香酸は 12 検体中 10 検体で検出され、その含有量は 0.001 ~ 0.037 g/kg (平均 0.011 g/kg) であった。既往の調査では、0.002 ~ 0.041 g/kg (平均 0.011 g/kg) [3]、0.004 ~ 0.024 g/kg (平均 0.011 g/kg) [7]、0.0001 ~ 0.040 g/kg (平均 0.008 g/kg) [11] と報告されており、今回の結果はこれらと同程度であった。ソルビン酸は使用表示のあった 1 検体から検出された。

ジャムでは、安息香酸がイチゴジャム 2 検体から検出され、その平均値は 0.006 g/kg であった。ジャム・マーマレード類ではクランベリー加工品で高い値の安息香酸が検出されている[6]が、それを除くと 0.01 g/kg 以下であり[6, 11]、既往の調査結果と同程度であったと言える。

漬物では、しょうゆ漬と酢漬からは安息香酸が検出されず、キムチから 1 検体のみ検出された (0.001 g/kg)。ソルビン酸は、使用表示のあった 4 検体から検出された。

食肉製品では、安息香酸が 30 検体中 6 検体で検出されたが、その含有量は 0.001 ~ 0.003 g/kg (平均 0.001 g/kg) であり、既往の調査結果[10]と同程度であった。ソルビン酸は、使用表示のあった 9 検体から検出された。

魚介加工品のうち、乾製品 1 検体 (0.005 g/kg)、くん製品 1 検体 (0.001 g/kg) から安息香酸が検出され、かまぼこ等の魚肉ねり製品からは検出されなかった。ソルビン酸は、使用表示のあった 8 検体から検出された。

リンゴジュース、バター、マーガリンおよびその他魚介加工品からは、いずれの保存料も検出されなかった。

Table 3 Range of content and detection frequency of preservatives in processed foods.

Type of food	No. of sample	Benzoic acid			Sorbic acid			Dehydroacetic acid			Propionic acid		
		Detection frequency	Range of content (g/kg)	Criteria for use (g/kg)	Detection frequency	Range of content (g/kg)	Criteria for use (g/kg)	Detection frequency	Range of content (g/kg)	Criteria for use (g/kg)	Detection frequency	Range of content (g/kg)	Criteria for use (g/kg)
Apple juice	2	0	<0.001	0.6 (1.0*)	0	<0.001	— (1.0*)	0	<0.001	—	0	<0.1	—
Butter	1	0	<0.001	—	0	<0.001	—	0	<0.001	0.50	0	<0.1	—
Cake	3	2	<0.001-0.008	—	2	<0.001-0.088	—	0	<0.001	—	1	<0.1-0.6	2.5
Cheese	12	10	<0.001-0.037	—	1	<0.001-1.8	3.0	0	<0.001	0.50	0	<0.1	3.0
Jam	5	2	<0.001-0.007	—	0	<0.001	1.0	0	<0.001	—	0	<0.1	—
Margarin	2	0	<0.001	1.0	0	<0.001	1.0	0	<0.001	0.50	0	<0.1	—
Pickled food (in soy sauce)	2	0	<0.001	—	2	0.16-0.17	1.0	0	<0.001	—	0	<0.1	—
Pickled food (in vinegar)	10	0	<0.001	—	2	<0.001-0.099	0.50	0	<0.001	—	0	<0.1	—
Pickled food (Kimchi)	3	1	<0.001-0.001	—	0	<0.001	—	0	<0.001	—	0	<0.1	—
Processed meat	30	6	<0.001-0.003	—	9	<0.001-1.3	2.0	0	<0.001	—	0	<0.1	—
Processed seafood (dried)	6	1	<0.001-0.005	—	3	<0.001-0.21	1.0	0	<0.001	—	0	<0.1	—
Processed seafood (smoked)	1	1	0.001	—	1	0.56	1.5	0	<0.001	—	0	<0.1	—
Processed seafood (others)	2	0	<0.001	—	0	<0.001	—	0	<0.001	—	0	<0.1	—
Steamed fish paste	13	0	<0.001	—	4	<0.001-0.90	2.0	0	<0.001	—	0	<0.1	—

* Criterion for fruit juice to use for the production of the cake.

(2) 保存料毎の摂取量

安息香酸は 5 mg/kg 以下は天然由来とされ[2]、本調査で 0.005 g/kg を超えたのは、洋菓子 1 検体、チーズ 5 検体、ジャム 1 検体であった。意図的あるいは過失による混入は考えにくい、洋菓子とジャムは原料に果実・果皮加工品が含まれていたことから、安息香酸誘導体に起因したと考えられた。水蒸気蒸留法では、食品に含まれる結合型の安息香酸が蒸留中に一部加水分解されて遊離するために多く見積られる[9]ことも一因と推察される。ナチュラルチーズには天然由来の安息香酸が一定量含有されていることは本調査でも明らかであり、その摂取量を見積もった。平成 23～27 年の国民健康・栄養調査結果[16]によれば、チーズの 1 人 1 日摂取量は 2.6～3.3 g (平均 2.8 g) であり、本調査での平均含有量 (0.011g/kg) を乗じると、チーズによる安息香酸の 1 人 1 日摂取量は 0.031 mg となる。安息香酸のヒトの 1 日摂取許容量 (ADI) は 0～5 mg/kg bw [17] であるので、体重 60 kg のヒトであれば 300 mg が摂取許容量の上限となり、チーズによる天然由来の摂取量はその 1/10000 に過ぎず、食品の安全性や健康に対する懸念はないと考えられる。

ソルビン酸は洋菓子の 1 検体を除いて使用表示があった検体から検出され、全て基準値未満の含有量であった。使用表示のなかった洋菓子から検出されたソルビン酸含有量は 0.002 g/kg であり、通知法によれば定量

下限未満となるが、本法では通知法より 1 桁下まで定量できることから、微量のソルビン酸が検出された。この検体には果実・果皮加工品が使用されており、原料のキャリーオーバーにあたるのか、製造工程で混入されたのか不明であるが、ナナカマド以外でもクラウドベリーに微量のソルビン酸が含有されるという報告[18]もあり、原料に果実・果皮を含む場合には留意が必要であろう。

プロピオン酸は本調査では使用表示のあった洋菓子 1 検体からのみ検出された。プロピオン酸は肉類・魚介類を筆頭に広く検出されている[8]が、報告値は mg/kg オーダーである。本法や通知法では定量下限が 0.1 g/kg と他の保存料と比べて高いため、検出できなかった可能性はあるが、プロピオン酸の ADI は制限されていない[19]ため、微量の含有量では健康や安全性への懸念はないと考えられる。

3) 通知法との比較

ソルビン酸の使用表示のあった陽性試料 22 検体 (チーズ 1 検体、漬物 4 検体、食肉製品 9 検体、魚介乾製品 3 検体、魚介くん製品 1 検体、魚肉ねり製品 4 検体) について、通知法と本法のそれぞれにおける結果を比較した。それぞれの分析値をプロットした散布図を Fig.1 に示す。いずれの方法も分析結果の濃度範囲は 0.10～1.8 g/kg であり、回帰直線の傾きはほぼ 1、相関係数もほぼ 1 であったことから、本法において固相抽出による

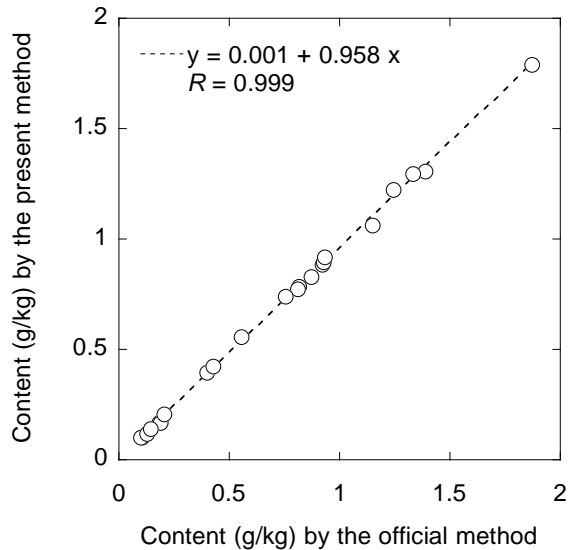


Fig.1 Correlation between sorbic acid content analyzed by the official method and that by the present method in positive samples.

捕集・回収が完全に機能していることが示された。安息香酸、デヒドロ酢酸、プロピオン酸については、陽性試料がほとんどなかったため確認できなかったが、いずれもソルビン酸と同等以上の回収率が得られていることから、いずれの保存料についても、本法はさまざまな食品マトリックスにおいて通知法と同等に有効であると考えられた。

IV まとめ

前報で検討した水蒸気蒸留 固相抽出 HPLC 法による保存料 4 成分(安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、プロピオン酸)の一斉分析法を、14 種類 92 検体の加工食品に適用した。

いずれの保存料についても、本法は加工食品の種類を問わず良好な回収率が得られ、精度良く分析できることが示された。

安息香酸はいずれも使用表示はなかったが、洋菓子、ナチュラルチーズ、ジャム、漬物(キムチ)、食肉製品、魚介加工品から微量検出された。特にチーズにおいて検出頻度が高く、天然由来と考えられたが、その摂取量を見積もると ADI の 1/10000 に過ぎず、食品の安全性や健康に対する懸念はないと考えられた。

ソルビン酸およびプロピオン酸は、使用表示のあった検体から検出された。デヒドロ酢酸は、いずれの検体からも検出されなかった。

ソルビン酸の使用表示のあった検体について、本法と通知法の分析結果を比較したところ、きわめて良好な相関関係が認められたことから、本法は通知法と同等に有効であることが示された。

(本調査の一部は、平成 28 年度健康局生活衛生課からの依頼検査として実施したものである。)

参考文献

- 1) 農林水産政策研究所. 人口減少局面における食料消費の将来推計.
http://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/kikaku/buka/i/H26/pdf/140627_03_01kai.pdf
- 2) 細貝祐太郎, 松本昌雄監修. 食品安全性セミナー2 食品添加物. 中央法規出版; 2001. 181-187.
- 3) 栗崎純一, 笹子謙治, 津郷友吉, 山内邦男. チーズにおける安息香酸の生成について. 食品衛生学雑誌 1973; **14**: 25-30.
- 4) 慶田雅洋. チーズ中の安息香酸の自然含量について(とくにホエイチーズを中心に). 食品衛生研究 1981; **31**: 291-300.
- 5) 小川俊次郎, 鈴木英世, 外海泰秀, 伊藤誉志男, 慶田雅洋. 輸入高麗人参茶およびしなちく中の安息香酸の由来とその分析法について. 食品衛生学雑誌 1980; **21**: 301-306.
- 6) 永山敏廣, 西島基弘, 安田和男, 斉藤和夫, 上村尚, 井部明広, 牛山博文, 永山美智子, 直井家壽太. 果実及び果実加工品中の安息香酸. 食品衛生学雑誌 1983; **24**: 411-422.
- 7) 永山敏廣, 西島基弘, 安田和男, 斉藤和夫, 上村尚, 井部明広, 牛山博文, 直井家壽太, 二島太一郎. 農産食品及び各種加工食品中の安息香酸. 食品衛生学雑誌 1986; **27**: 316-325.
- 8) 辻澄子, 四方田千佳子, 柴田正, 一色賢司, 神蔵美枝子, 西島基弘, 林弘道, 深澤喜延, 黒田弘之, 後藤宗彦, 坂部美雄, 佐々木清司, 大内格之, 三島靖子, 大城善昇, 森口裕, 内山壽紀, 城照雄, 伊藤誉志男. 天然にも存在する化学的合成食品添加物の日本人の 1 日摂取量. 食品衛生学雑誌 1995; **36**: 428-441.
- 9) 久保田浩樹, 大槻崇, 原貴彦, 平川佳則, 飯塚太由, 田中麻紀子, 岩村真実, 佐藤恭子, 河村葉子. 果実, 種実, 香辛料およびその加工食品に存在する安息香酸並びにソルビン酸含有量の調査. 日本食品化学学会誌 2010; **17**: 54-61.
- 10) 柴田正, 辻澄子. 天然にも存在する添加物. 食品衛生研究 1997; **47**(7): 29-67.
- 11) 国立医薬品食品衛生研究所. 食品添加物含有量データベース. <http://www.nihs.go.jp/dfa/food-db/food-index.html>
- 12) 谷村顕雄, 棚元憲一監修. 第 8 版食品添加物公定書解説書. 廣川書店; 2007. D1459-D1463.

- 13) 玉城宏幸, 山城興博, 城間博正, 玉那覇康二, 大城善昇. 食品添加物の一日摂取量調査研究-生鮮食品からのプロピオン酸及びアンモニアの摂取量について. 沖縄県衛生環境研究所報 1997; **31**: 93-96.
- 14) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長. 「食品中の食品添加物分析法」の改正について(別添 2). 食安基発 0528 第 3 号; 2010.
- 15) 新矢将尚, 山口之彦, 山野哲夫. HPLC による食品中の保存料の一斉分析法の検討. 大阪市立環科研報告 2016; **78**: 43-49.
- 16) 厚生労働省. 国民健康・栄養調査. http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kenkou_eiyou_chousa.html
- 17) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives: fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO technical report series; 913). World Health Organization; 2002. 112.
- 18) P. Baardseth, H. Russwurm. Content of some organic acids in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Food Chemistry* 1978; **3**: 43-46.
- 19) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO technical report series; 884). World Health Organization; 1999. 35.

(WEB サイトの内容は 2017 年 7 月 31 日に確認した)

大阪市内河川における人工甘味料の分布状況

山口之彦¹⁾、山本敦史²⁾、角谷直哉¹⁾

Distribution of artificial sweeteners in rivers throughout Osaka City

Yukihiko YAMAGUCHI¹⁾, Atsushi YAMAMOTO²⁾ and Naoya KAKUTANI¹⁾

Abstract

A simultaneous analysis method of five sweeteners (acesulfame : ACE, saccharin : SAC, aspartame : APM, cyclamate : CYC, sucralose : SUC) by high performance liquid chromatograph with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) after solid phase extraction (SPE) was applied to water samples from rivers throughout Osaka City. The present method was modified with respect to two points of previous method. The elute solvent in SPE was modified from methanol to 60 % methanol-distilled water. The ion mode of APM and SUC in LC-MS/MS was modified from negative mode to positive mode. The detection limit of APM and SUC was enhanced tenfold after method modification.

The water samples were collected in twenty points from rivers throughout Osaka City. Three sweeteners (ACE, SAC and SUC) were detected in water from almost all sampling points. Concentration ranges of ACE, SAC and SUC were 0.1-5.6, <0.01-1.1 and 0.13-3.9 µg/L, respectively. High concentrations were detected at downstream sites of the sewage plants operated by Osaka City and Osaka Prefecture.

Key words: artificial sweetener, river water, Osaka City, acesulfame, sucralose

I 緒言

人工甘味料(artificial sweetener, AS)は、食品添加物であり、食品衛生法において、使用が認められている[1]。AS の甘味は通常の糖と比較して数百倍高いことから少量の使用で食品に十分な甘味を持たせることができる。また、低カロリーであることからダイエットをうたう食品によく使用されている。低カロリーであることは人の体内でエネルギーに変換されないことを意味している。実際、アセスルファム(acesulfame, ACE)、サッカリン(saccharin, SAC)およびスクラロース(sucralose, SUC)は、体内で代謝されず、90%以上がそのまま体外へ排泄される[2]。大阪市を例にすると、下水道処理人口普及率が99.9%であることから[3]、排泄されたASのほとんどが下水処理場へ運ばれると考えられる。下水処理場におけるASの処理率は、低い報告があり[4]、ASを含んだ放流水が河川水へ放出されていることが考えられる。実際、神奈川県全域の河川および多摩川でACEおよびSUCが検出されたことが報告されている[5,6]。

また、このようなASの保存性の高さを利用して、地下水脈の流動機構の推定[7]や下水道由来の地下水汚染

の調査[8]などがある。

今回対象としたASはACE、SAC、サイクラミン酸(cyclamate, CYC)、アスパルテーム(aspartame, APM)およびSUCの5種類である。CYCは、以前使用されていたが、発がん性が疑われたため、現在、国内での使用は禁止されている。しかし、わが国において以前使用していたものがいまだに地下水に検出される報告[8]もあることから対象とした。

環境水からのAS一斉分析は、主に固相カートリッジに試料水を通水してASを吸着させる固相抽出法を用いるのが一般的である。また、食品からの分析においても水抽出した試料の抽出液を精製するために固相カートリッジを用いる方法があり、両者ともに手法としては同じである。そのため、食品分野で使用されている方法を水試料の分析に応用することは可能であると考えられる。これらの方法で使用されている固相カートリッジは、HLB[5,6,9]、C₁₈[10,11,12]、アルミナ[12]およびStrata X[12]など多種にわたっているが、主に環境水で用いられているのはHLB[5,6,9]であった。次に前処理操作においては、ACE、SACおよびCYCは環境水中でイオン化しているため、pHを酸性側に調整したのち[6-8]、また

1) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka Institute of Public Health, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 公立鳥取環境大学環境学部
〒689-1111 鳥取市若葉台北一丁目 1 番 1 号
Tottori University of Environmental Studies, 1-1-1 Wakabadaikita, Tottori 689-1111, Japan

はイオンペア剤を添加したのちに[5,10]、固相カートリッジに負荷している方法が多い。測定においては、高速液体クロマトグラフ(HPLC)が主に用いられる。ASの一斉分析法を考えた場合、SUCが、UV吸収、蛍光を持たず、HPLC-RIに感度を持っていることから松本らは[14]抽出液を分けて、それぞれのASに最適な検出器を用いた分析法を構築している。ASすべてに感度を示すのは質量分析計(MS)であることから最近ではASの一斉分析にはLC-MSおよびLC-MS/MSの適用がなされている[5-11]。

本研究では、既存の様々な分析方法を踏まえて、若干の検討および改良を加えた分析方法を構築した。改良法を用いて大阪市内河川の河川水におけるASの濃度を測定し、濃度レベル、分布等を把握し、その起源を推測した。

II 試料と方法

1) 試薬および機材

AS標準品：ACE、SAC、APMおよびSUCはそれぞれアセスルファミカリウム、サッカリンナトリウム二水和物、アスパルテムおよびスクラロースとして和光純薬より入手した。CYCは、シクロヘキシルスルファミン酸ナトリウムとして関東化学より入手した。

AS標準溶液：それぞれの標準品から精製水を用いて1000 μ g/Lの水溶液を個別に作成した。これらを混合、希釈し、1 μ g/Lの混合水溶液を作成した。

AS検量線用標準溶液：AS混合水溶液を精製水で段階的に希釈し、0.0001-1 μ g/mLの範囲で5点以上の検量線用標準水溶液を作成した。

メタノール：高速液体クロマトグラフ用を用いた。

60%メタノール水溶液：メタノール60mLを精製水で100mLとした。

塩酸：精密分析用(35%)を用いた。

20%塩酸：塩酸4mLを精製水で7mLにした。

ギ酸 - 特級試薬を用いた。

0.1%ギ酸：ギ酸0.5mLを精製水で500mLにした。

固相カートリッジ：HLBはWaters社製 Oasis HLB Plusを用いた。C18およびPS-2はWaters社製 SepPak Plusを用いた。

精製水：蒸留水製造装置(ヤマト科学社製 Autostill WG 220)を用いて蒸留したものを用いた。

マニホールド：スペルコ社製を用いた。

2) 装置

コンセントレーター - Waters社製を用いた。

LC/MS/MS - ABSciex社製のAPI2000およびWaters社製のXevo TQを用いた。

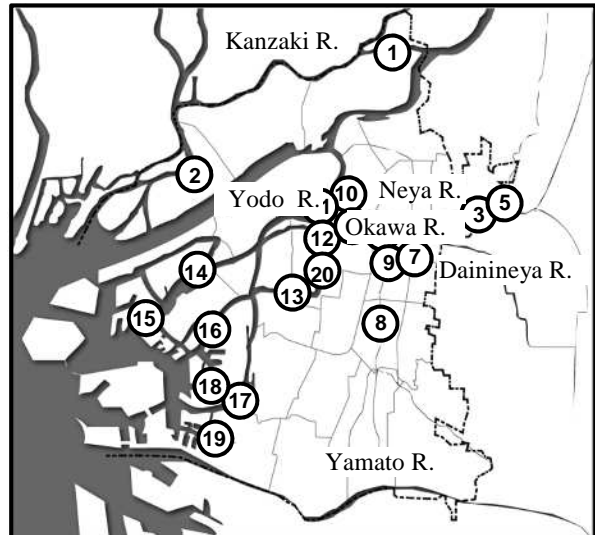


Fig.1 Sampling Points in Rivers throughout Osaka City

1. Komatsu Br.
2. Chifune Br.
3. Imazu Br.
4. Kyobashi Br.
5. Tokuei Br.
6. Shimoshiromi Br.
7. Tennouden Br.
8. Minamibenten Br.
9. Shiromi Br.
10. Sakuranomiya Br.
11. Tenjin Br. (R)
12. Tenjin Br. (L)
13. Daikoku Br.
14. Kasugade Br.
15. Tenpozanwatashi
16. Jinbeiwatashi
17. Senbonmatsuwatashi
18. Funamachiwatashi
19. Down Stream of Suminoeohashi Br.
20. Honmachi Br.

3) 試料採取

大阪市内河川の20ヶ所(Fig. 1)で2015年7月に採取した。

4) 試験溶液の調整

河川水100mLに20%塩酸溶液を0.5mL添加し、振り混ぜ、あらかじめメタノール5mLおよび蒸留水5mLでコンディショニングしたHLB固相カートリッジにコンセントレーターを用いて10mL/分で酸性に調整した河川水全量を通水した。通水後、固相カートリッジをマニホールドで10分間通気し、乾燥させた。乾燥後、60%メタノール水溶液4mLで溶出した。溶出液は窒素気流下で2mLまで濃縮し、試験溶液とした。

5) LC/MS/MSの測定条件

測定は主にXevo TQを用いた。測定条件を以下に示す。

分離用カラムは関東化学製 Mightysil RP18 GP 2.1mm \times 150mm 粒径5 μ mを用いた。移動相はA:0.1%ギ酸、B:メタノールを用いA/B 70/30(5分)-35分-30/70-0/100(5分)-70/30(10分)でグラジエントを行った。流速は0.2mL/分、カラム温度は40 $^{\circ}$ C、注入量5 μ Lで行った。

イオン源は ESI を用い、イオン源温度は 300 とした。イオンモードは、ACE、SAC、CYC はネガティブ、APM、SUC はポジティブモードを用いた。MRM は、ACE: 162>78, 82, SAC: 182>106, 42, CYC: 178>80, APM: 295>180, 120, SUC: 419>239, 221 を用いた。

6) 分析法の検討

固相カートリッジ、溶出溶媒、LC/MS/MS の条件について検討を行った。

(1) 固相カートリッジの検討

既法では、主に HLB 固相カートリッジを使用しているが[5,6,9]、他の固相カートリッジ(C₁₈、PS-2)についても検討した。

検討に用いた方法は、精製水 100 mL に 2.5 µg/mL となるように対象の AS を添加し、ギ酸で pH2 に調整したのちにメタノール 5 mL、精製水 5 mL でコンディショニングした上述の 3 種の固相カートリッジに通水した。それぞれの固相カートリッジはメタノール 4 mL で溶出し、LC/MS/MS を用いて回収率を求めた。試験は、それぞれの固相カートリッジに対して 3 連で行った。

(2) 溶出時のメタノールの割合

固相カートリッジからの溶出溶媒として、メタノールを使用している報告[5,6]が多いが、一方でアセトニトリルと精製水の混合液を用いる報告[8]もある。AS は、極性が高いことから溶出溶媒に精製水を混合することで極性の低い夾雑物の混入を少なくできるメリットがある。そこで、メタノール - 精製水混合溶液を検討した。

精製水 10 mL に 1 µg/mL となるように対象の AS を添加し、0.1 % 塩酸溶液にした後、HLB 固相カートリッジに通水させた。溶出液のメタノール割合を 10-100 % まで 10 % 刻みで割合を変え、溶出させ、回収率を求めた。

(3) LC/MS/MS 条件検討

既法の多くは対象とした AS のプレカーサーイオン(MI)として、負イオンを使用している。この場合、SUC の検出下限は、他の AS の 10-100 倍程度高い。そこで、SUC の検出下限を低くする条件を検討した。

(4) 回収試験

分析法の検討後、作成した 4) に示す分析法を用いて、精製水および河川水を用いて添加回収試験を行った。河川水については汚染度の高い St.3 と低い St.10 の異なる 2 地点を用いた。添加量は精製水で 0.2 µg、河川水では、予備試験において ACE、SAC、SUC が検出されたため、回収試験が成立するように 5 µg とした。試験は 3 連で行った。

III 結果と考察

1) 分析方法の検討

(1) 固相カートリッジの検討

対象とした 5 種類の AS について、3 種類の固相抽出カートリッジを用いた回収試験の結果を Table 1 に示す。

C₁₈ は、ACE、SAC、CYC で他のカートリッジより回収率が、低い傾向にあった。C₁₈ は他のカートリッジがポリマーを基材にしているのに対して、シリカゲルを基材にしていることに起因していると考えられた。

PS-2 および HLB は、APM および SUC の回収率においては良好であった。他の 3 種については、18-63% であった。SAC については PS-2 で最も高い回収率を示した。

Table 1 Recoveries(%) of Five Sweeteners by using Three Different Solid Phase Cartridges

	HLB	C ₁₈	PS-2
ACE	39.7±6.6	2.3±0.3	34.0±4.7
SAC	18.2±0.4	8.7±1.2	58.5±5.6
CYC	62.8±8.0	6.0±0.4	56.6±5.5
APM	117.4±13.3	103.6±7.8	139.9±13.9
SUC	72.5±8.0	57.3±3.9	86.0±7.0

(2) 溶出時のメタノールの割合

溶出溶媒のメタノールの割合を 10-100 % で 10 % ごとに变化させた場合の AS の溶出率の変化を Fig.2 に示している。

ACE および CYC はメタノールの割合が 30 % ですでに 90 % 以上の溶出率を示した。これに対して SAC、APM および SUC における 30 % メタノールでの溶出率は、それぞれ 44 %、64 % および 30 % であった。これは水の割合が多い溶媒に対する溶解性の違いによるものである。対象とした AS が、100 % 溶出するためには、メタノールが 50 % 以上必要であった。そのため、溶出溶媒は 60 % メタノール水溶液を用い、溶媒量は、4 mL とした。

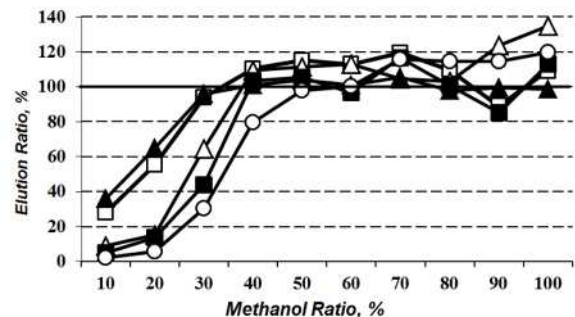


Fig.2 Effect of Methanol Ratio on Elution Ratio of five Sweeteners from HLB Cartridge
:ACE :SAC :CYC :APM :SUC

(3) LC/MS/MS 条件検討

SUC の検出下限が他の人工甘味料と比較して高いことから、LS/MS/MS 条件を見直した。これまで、対象の AS についてネガティブモードで行っていたが、SUC および APM はポジティブモードで検出されることから、ポジティブモードで条件検討を行った。

APM は m/z 295($[M+H]^+$) m/z 120 で感度が得られた。SUC はプロトン付加分子イオン $[M+H]^+$ で、感度が得られなかったが、Na 付加イオンである m/z 419 ($[M+Na]^+$)からプロダクトイオン(M3) m/z 239 が得られた。一般に Na 付加体では、M3として Na^+ の 23 のみが優位に生成されることが多いが、SUC では、 m/z 239 と Na^+ 以外のイオンが優位に生成した。この MRM は Xevo TQ および API2000 とともに採取できたことから機器特有のものではないと考えられた。Table 2 に対象とした AS の M1、M3、検量線範囲等を示す。ここに示すように APM および SUC のポジティブモードはネガティブモードと比較して検量線範囲の下限が 10 倍低くなっているが、検量線範囲は狭くなっている。ポジティブモードで検出下限が低くなることから、この条件を使用することとした。

Table 2 LC/MS/MS Acquisition Parameters in MRM Mode

	IM	M1	M3	CV	CE	Range μg/mL
ACE	(-)	162*1	82	24	16	0.0001-1
SAC	(-)	182*1	106	36	20	0.0005-1
CYC	(-)	178*1	80	40	20	0.0001-1
APM	(-)	293*1	261	24	10	0.002-1
	(+)	295*2	120	20	30	0.0001-0.05
SUC	(-)	395*1	359	26	14	0.01-1
	(+)	419*3	239	30	20	0.001-0.1

IM: Ionization Mode CV: Core Voltage
 CE: Collision Energy
 Range: Range of Concentration in Calibration Curve
 *1: $[M-H]^-$ *2: $[M+H]^+$ *3: $[M+Na]^+$

(4) 回収試験

回収試験の結果を Table 3 に示す。

Table 3 Recoveries(%) of Five Sweeteners from Distilled and River Water

	Distilled Water	River Water St.3	River Water St.10
ACE	78.0±1.0	90.7±4.5	83.8±2.0
SAC	54.5±8.5	71.6±3.1	71.7±1.4
CYC	68.3±4.7	3.6±0.5	68.5±2.8
APM	73.2±4.0	78.8±5.6	85.6±2.9
SUC	90.7±6.8	57.2±2.9	63.3±3.5

精製水における平均回収率($n=3$)は、ACE、APM および SUC で、78 %、73 %、91 % と 70 % 以上で良好だっ

たのに対し、SAC、CYC で 54 %、68 % と前者より低い傾向にあった。

AS の河川水における回収率をみると、St.3 で低い傾向があり、汚染度と関連しているものと考えられる。St.3 の CYC の回収率が極端に低い理由については不明である。

2) 大阪市内河川における AS 濃度

大阪市内河川において、対象とした 5 種類の人工甘味料のうち ACE、SAC および SUC がほぼ全採取地点検出された。Table 4 に河川域および汽水域での濃度範囲を示す。

Table 4 Concentration Ranges(μg/L) of ACE, SAC and SUC in River and Estuary in Osaka City

	ACE	SAC	SUC
River	0.10~5.6	<0.01~0.47	0.13~3.9
Estuary	0.11~5.4	0.021~1.1	0.14~2.3

これらの濃度レベルは、神奈川県内の河川水[6]および多摩川[6]のものと同様であった。

Table 4 に示すように ACE および SUC は河川域および汽水域で大きな差が認められなかった。通常、水溶解度は塩分濃度が高くなると低下する。河川水と海水が混合する汽水域においても水溶解度が低くなり、海水による希釈以上に濃度が低下することが考えられる。これらのことから、今回みられた河川水および汽水域での濃度差は ACE および SUC の水溶解度が塩分濃度に左右されないほど高いことに起因していると考えられる。また、これらのことから ACE、SAC および SUC は、海まで到達していることは容易に推測できる。

3) 大阪市内河川における分布

ACE および SUC の大阪市内河川における濃度分布を Fig.3 に示す。これらの起源として下水処理場が考えられることから、大阪市の下水処理場()および大阪府近傍に位置する大阪府の下水処理場()の位置を濃度分布とともに Fig.3 に示した。

ACE および SUC とともに寝屋川、第二寝屋川で濃度が高く、大川で濃度が低くなっている。大川は淀川から分岐しており、淀川の水と同じと考えられる。このことより淀川における ACE および SUC の濃度は低いと考えられる。また、河口域の濃度は寝屋川、第二寝屋川の濃度より低い傾向を示した。ACE に対する SUC の濃度比(ACE/SUC)は、0.77-2.3 であり、20 地点中 14 地点が 1 以上、つまり、ACE の濃度が高い地点であった。神奈川県内の河川水における ACE/SUC は、すべて 1 以上[5]であり、大阪市内河川の結果とは異なった。

ACE および SUC の濃度分布と大阪府、大阪市の下水処理場の位置をみると、濃度の高い採取地点の上流には下水処理場が位置していた。また、下水処理場の

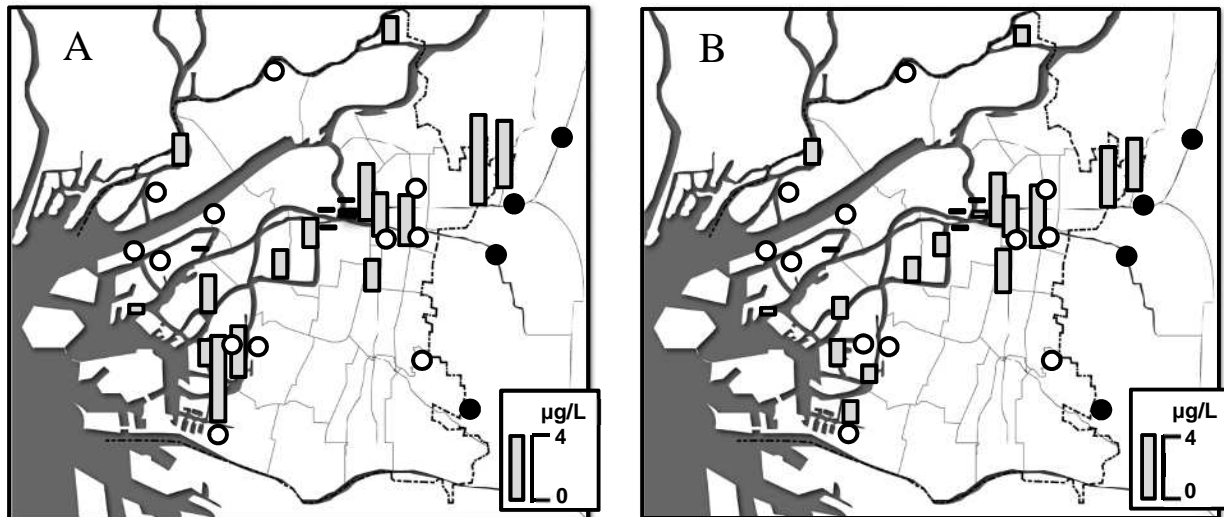


Fig. 3 Distribution of ACE(A) and SUC(B) in Rivers throughout Osaka City.

○ : Sewage Plant Operated by Osaka City

● : Sewage Plant Operated by Osaka Prefecture

放流水に AS が検出されている報告があること[6,8]から、大阪市内河川に検出された AS の起源の一つとして下水処理場があげられるものと考えられる。

IV まとめ

5 種類の AS について、河川水からの一斉分析法を既法をもとに改良した。改良点は、溶出溶媒および LC/MS/MS 測定条件の変更であった。溶出溶媒は、メタノールから 60%メタノール水溶液に変更した。非極性の物質の溶出を抑えることが可能となった。LC/MS/MS 測定条件は APM および SUC のイオンモードをネガティブからポジティブに変更した。これらの定量下限が 1/10 となった。

大阪市内河川の 20 か所より採水し、改良法を用いて、AS の濃度を測定した。ACE、SAC および SUC が検出され、それらの濃度範囲はそれぞれ、0.1-5.6、< 0.01-1.1、0.13-3.9 µg/L であった。濃度の高い地点の上流には、大阪市および大阪府の下水処理場があり、河川水中の AS の起源の一つとして、下水処理場が考えられた。

参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ. http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuten/
- 2) 斎藤雅文, 堀由美子, 中島啓. 人工甘味料と糖代謝-2000 年以降の臨床研究から-. 日本栄養・食糧学会誌 2013; **66**: 69-75.
- 3) 大阪市下水道局ホームページ. <http://www.city.osaka.lg.jp/kensetsu/>
- 4) M. Scheurer, H. J. Brabch and F. T. Lange. Analysis and Occurrence of Seven Artificial Sweeteners in German Waste Water and Surface Water and in Soil Aquifer Treatment(SAT). Anal. Bioanal. Chem. 2009; **394**: 1585-1594
- 5) 長谷川敦子. LC/MS による環境水中の人工甘味料の分析. 神奈川県環境科学センター研究報告 2010; **33**: 58-62.
- 6) 今井志保, 川中洋平, 石井善昭. 多摩川河川水および水処理施設からの放流水における人工甘味料の存在状況の調査. 第 24 回環境化学討論会要旨集 2015
- 7) 中田晴彦, 折式田崇仁, 細野高啓, 利部慎, 小野昌彦, 徳永貴大, 嶋田純. 地下水中の合成甘味料をトレーサーとした熊本地域の水流機構の推定と人為影響評価の可能性. 第 59 回日本地球化学年会要旨集 2012; **326-327**.
- 8) 磯貝早耶, 高田秀重, 藤澤美晴. 合成甘味料の高密度分析による下水由来の地下水汚染の実態把握. 第 24 回環境化学討論会要旨集 2015
- 9) B. Subedi and K. Kannan. Fate of Artificial Sweeteners in Wastewater Treatment Plants in New York State, U.S.A. *Environmental Science and Technology* 2014; **48**: 13668-13674.
- 10) 小山政道, 吉田和郎, 内堀伸健, 和田伊知郎, 秋山和幸, 佐々木珠美. LC/MS による食品中の 9 種甘味料の一斉分析法. 食品衛生学会誌 2005; **46**: 72-78.
- 11) 畑野和弘, 中尾朱美. LC/MS による食品中のスクラロースの測定. 食品衛生学雑誌 2002; **43**: 267-272.

- 12) 岸弘子, 川名清子. イオン交換クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーによる食品中のスクラロースの分析. 食品衛生学雑誌 2001; **42**: 133-138.
- 13) 山辺智子, 竹村学, 河口裕香, 木村佳樹, 西口真平, 北田善三. 誘導体化法を用いた HPLC による食品中のスクラロースの分析. 日本食品化学学会誌 2012; **19**: 54-58.
- 14) 松本ひろ子, 平田恵子, 坂牧成恵, 萩野賀世, 牛山博文. サイクラミン酸、ズルチンの HPLC による定量及び LC/MS/MS による確認と 8 種甘味料の系統的分析. 化学生物総合管理 2010; **6**: 25-35.

(WEB サイトの内容は 2017 年 8 月 1 日に確認した)

大阪市内河川における降水量と大腸菌群数の関係

大島 詔¹⁾、北野雅昭²⁾

Relationship between precipitation amounts and the number of coliform group bacteria in urban rivers in Osaka city

Akira OSHIMA¹⁾ and Masaaki KITANO²⁾

Abstract

The numbers of coliform group bacteria, which have been observed from April 2000 to March 2015 at 21 points in urban rivers of Osaka city, Japan, were analyzed with the multi regression model. Eleven independent variables, including daily precipitation from 0 to 7 days, were introduced to the model. It showed the numbers of the bacteria were affected strong by log-transformed precipitation of the previous day, and they increased by 1.4 to 3.0 and 2.0 to 10.3 times by 3 mm and 10 mm of precipitation respectively. According to linear prediction, numbers of points exceeding 1000 MPN/dL and 5000 MPN/dL of the bacteria will change from 12 to 10, and 3 to 3 from 2020 to 2027 in the conditions of no precipitation and in spring or autumn. The numbers of bacteria in these urban city rivers were expected to be decreased gradually although not rapidly.

Key words: number of coliform group bacteria, precipitation of the previous day, multi regression model, linear prediction

I 緒言

公共用水域の水質汚濁にかかる環境基準のうち、生活環境の保全に関する項目については、河川では AA から E までの類型指定が行われ、それぞれに水質基準が定められている。大腸菌群数では、AA、A、B の各類型に対し、日間平均値でそれぞれ 50、1000、5000 MPN/dL 以下とされている。全国的に生物学的酸素要求量をはじめとする多くの水質項目がほぼ水質基準値を達成しているのとは対照的に、大腸菌群数については、例えば 2015 年度の達成率が 35.2% のように達成状況は悪い[1]。これは、公共用水域における大腸菌群の定義が、ブリアントグリーン存在下で乳糖を分解しガスを産生することのできる細菌群とされていることに原因があり、測定の対象とすべき温血動物の腸管由来細菌に加え、土壌など自然界由来の細菌も網羅的に計測されてしまうためである[2]。測定対象を温血動物由来の細菌群のみとするために水質規準項目を大腸菌群から大腸菌へ切り替える動きが環境省内で見られるが[3]、その実施時期は未定である。当面は問題を抱えながらも大腸菌群数による評価が継続する。

一方、大阪市では、国内的には早くから下水道が整

備されてきた都市であるため、ごく一部の地域を除き合流式下水道である。合流式下水道は域内における雨水を含む排水の全量が流入するので、処理能力を超える降水があると一部の下水は処理が追いつかず公共用水域に越流するため、河川水における大腸菌群数を増加させることがある。ほかにも河川に対する人間活動の影響が大きい都市域では、指標の妥当性について問題を内含する大腸菌群数であっても人為的な汚染を評価する指標としては有効であると考えられる。

そこで本研究では、合流式下水道であることで影響を受けがちな大阪市内河川において大腸菌群数を重回帰モデルにより解析することで、水温や年変動の影響をなるべく除去したうえで、大腸菌群数に対する日ごとの降水量の影響について考察した。また、得られた重回帰モデルより線形予測により 3 年後の 2020 年と 10 年後の 2027 年における大腸菌群数の将来予測をし、今後の推移について検討を行った。

II 方法

1) 測定地点

大腸菌群数は、大阪市内にある公共用水域定点観測地点のうち、2000 年 4 月以降に D 類型以上であった

1) 大阪市立環境科学研究センター
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka City Research Center of Environmental Science, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 千里金蘭大学
〒565-0873 吹田市藤白台 5-25-1
Senri Kinran University, 5-25-1 Fujishirodai, Suita City 565-0873, Japan

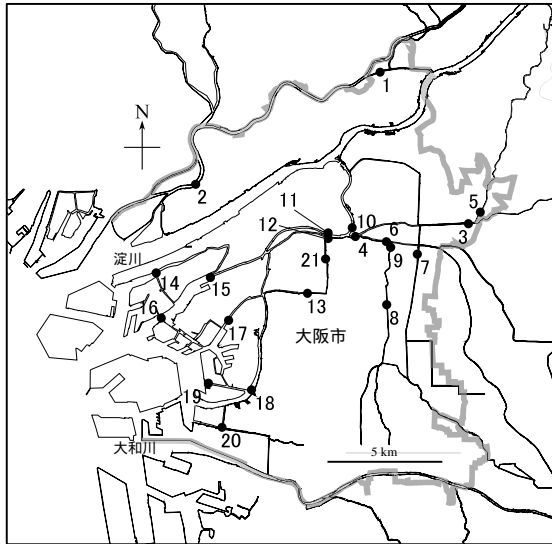


図1 調査地点図

淀川ならびに大和川を除く 21 地点を測定した。観測地点は図 1 中で黒点および地点番号で示し、地点番号と地点名、河川水系および河川名、2000 年 4 月から 2015 年 3 月までの各期間における類型指定状況、大腸菌群数の計測を開始した年月ならびに期間を通じた測定数は表 1 で示した。以降、各地点は地点番号で表すこととする。

2) 大腸菌群数の測定方法

各地点における大腸菌群数は BGLB による最確数法で測定した[4]。各希釈段階は 10 の整数乗倍とし、それぞれ BGLB 培地を分注した 5 本の試験管に希釈試料を接種し、 36.0 ± 1.0 で 48 ± 3 時間培養した後に

希釈段階ごとにガス産生の見られた陽性管数を記録し、最確数表と照合し最確数 (MPN/dL) を得た。

3) 各地点の水温の平年値と偏差の計算

水温は 1 年 1 サイクルの周期性を示すが、任意の日における水温は日光や降水など気象の影響を受け、平年値 (以下 WT とする) から上下する。すなわち、ある日に観測された水温は、その日における WT と、そこからの偏差 (以下 $diff$ とする) に分解することができる。このうち WT をサインカーブで近似されるとすると、大腸菌群を計測した日 θ における WT は式 1 で記述される。

$$WT = \beta + A \cdot \sin(\theta + \alpha) \quad (式 1)$$

ここで β は切片、 A は WT の振幅であり、 α は 1 月 1 日と水温の極小日との位相である。なお、 θ ならびに α は 1 月 1 日からの経過日数から 1 を引き、その年の日数で除し、360 を乗じた値、すなわち度 ($^\circ$) とする。

水温の実測値をもとに各係数を求めるために、式 1 を

$$WT = \beta + \alpha_1 \sin \theta + \alpha_2 \cos \theta \quad (式 2)$$

に変形し、最小二乗法により α_1 ならびに α_2 を求めてから式 1 中の A と α とに変換した。 $diff$ は水温の実測値と WT の差となる。以降の重回帰モデルの構築時には実測された水温を WT と $diff$ に分解して与えた。

4) 重回帰モデルの構築

降水量などの影響を評価するため、地点ごとに大腸菌群数を従属変数とする重回帰モデルの構築を試みた。独立変数の候補としたのは、大腸菌群数を計測した当日より 7 日前までの日ごとの降水量、水温の実測値を分解して得られた WT と $diff$ 、測定年の 11 変数とした。これらのうち、当日より 7 日前までの日ごとの降水量につ

表 1 調査を行った地点の番号、名称ならびに河川名、期間ごとの類型指定

地点番号	地点名	水系	河川名	類型指定			大腸菌群数	
				期間	2000.4~ 2002.3	2002.4~ 2009.3	2009.4~ 2015.3	測定開始 年月
1	小松橋	神崎川	神崎川	B	B	B	2000.4	60
2	千船橋	神崎川	神崎川	B	B	B	2000.4	172
3	今津橋	寝屋川	寝屋川	E	D	D	2002.4	60
4	京橋	寝屋川	寝屋川	E	D	D	2002.4	60
5	徳栄橋	寝屋川	古川	E	D	D	2002.4	63
6	城見橋	寝屋川	平野川	E	D	D	2002.4	63
7	天王田大橋	寝屋川	平野川分水路	E	D	D	2002.4	63
8	南弁天橋	寝屋川	平野川	E	D	D	2002.4	63
9	下城見橋	寝屋川	第二寝屋川	E	D	D	2002.4	63
10	桜宮橋	市内河川	大川	C	B	B	2000.4	159
11	天神橋(右)	市内河川	堂島川	C	B	B	2000.4	159
12	天神橋(左)	市内河川	土佐堀川	C	C	C	2000.4	63
13	大黒橋	市内河川	道頓堀川	C	B	B	2000.4	159
14	北港大橋下流700m	市内河川	正連寺川	C	C	B	2000.4	103
15	春日出橋	市内河川	六軒家川	C	B	B	2000.4	159
16	天保山渡	市内河川	安治川	C	B	B	2000.4	159
17	甚兵衛渡	市内河川	尻無川	C	C	B	2000.4	103
18	千本松渡	市内河川	木津川	C	C	B	2000.4	103
19	船町渡	市内河川	木津川運河	C	C	B	2000.4	103
20	住之江大橋下流1100m	市内河川	住吉川	C	C	B	2000.4	103
21	本町橋	市内河川	東横堀川	指定なし	B	B	2002.4	103

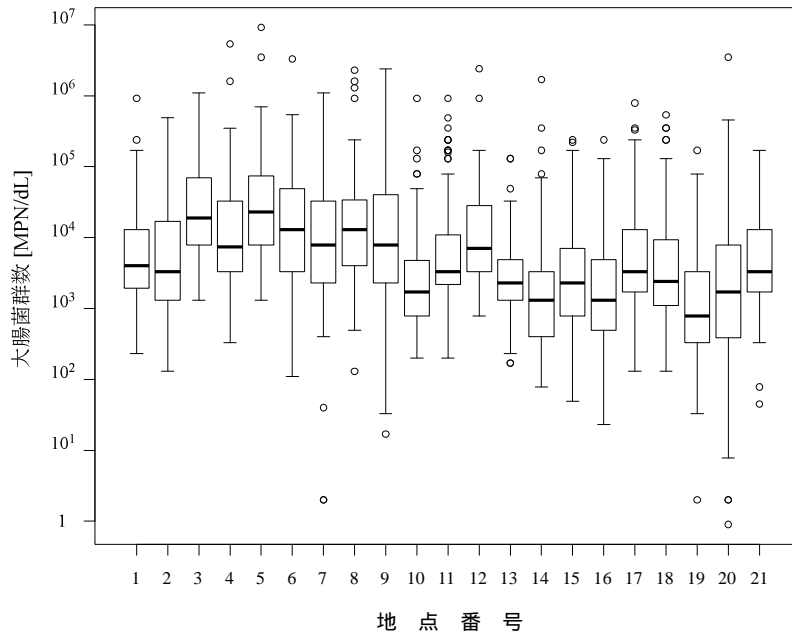


図2 各地点において観測された大腸菌群数

いては、気象庁大阪管区气象台が観測した、観測地:大阪の値[5]とし、各日の降水量は1を加えたうえで自然対数変換した(以下、各日の降水量は $day0, day1, day2, \dots, day7$ とする)。測定年は、重回帰モデルの切片が2000年1月1日における大腸菌群数の期待値となるように同日からの経過年数とし、月および日も反映したものとした。例えば、2005年7月1日は5.499となる。以下、測定日は YR とする。

大腸菌群数は右に裾を引く分布傾向にあったので、自然対数変換したうえで重回帰モデルの従属変数とした(以下、自然対数変換後の大腸菌群数を $coli$ とする)。ただし降水量の場合とは異なり、対数変換時に1は加えていない。この処理により各地点における大腸菌群数はおおむね正規分布に近い分布となった。

以上、11独立変数と1従属変数からなる重回帰モデル式は式3で示される。

$$\begin{aligned}
 coli = & \beta_0 + \beta_1 day0 + \beta_2 day1 + \beta_3 day2 + \beta_4 day3 \\
 & + \beta_5 day4 + \beta_6 day5 + \beta_7 day6 + \beta_8 day7 \\
 & + \beta_9 WT + \beta_{10} diff + \beta_{11} YR \quad (式3)
 \end{aligned}$$

最小二乗法により切片 β_0 ならびに β_1 から β_{11} までの各係数を地点ごとに決定した後、モデルの解釈を簡便なものとし、予測性を向上させるため、赤池情報基準(Akaike's Information Criteria, AIC)の値が最少となるようにステップワイズ変数減少法により独立変数を減数させ、各地点の最終的な重回帰モデルとした。

5) 重回帰モデルに基づく将来予測

得られた最終的な重回帰モデルをもとに、線形予測により2020年と2027年における各地点の大腸菌群数を求めた。計算は、水温が最低となる冬季、平均値とな

る春季および秋季、最高となる夏季とし、当日ならびに2日以上前には降水がなく、前日にそれぞれ0 mm、3 mm、10 mmの降水があった場合の全9パターンとした。なお、 YR は同年であっても季節により異なる値を取るのので、各水温条件に対応するものとし、春季および秋季における大腸菌群数は個別の計算結果の平均とした。重回帰モデルの構築と将来予測に関する一連の計算には統計学的処理ソフトウェアであるR ver.3.2.3[6]を用いた。

III 結果

1) 測定された大腸菌群数

各地点において測定された大腸菌群数を箱ひげ図により図2で示す。箱の下端と上端は第1四分位数($1Q$)と第3四分位数($3Q$)であり、箱の中央線は中央値($2Q$)を示す。ひげの下端は $1Q - 1.5 \times (3Q - 1Q)$ 、ひげの上端は $3Q + 1.5 \times (3Q - 1Q)$ で計算される最小値および最大値であり、最小値、最大値からの外れ値は白丸で示した。

寝屋川水系に属する地点3から9、および同水系の影響を強く受ける地点12の中央値は $7.5 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^4$ MPN/dLの範囲にあり、それ以外の地点における中央値 $7.9 \times 10^2 \sim 4.1 \times 10^3$ MPN/dLと比べて値が大きく、これら地点では大腸菌群数が多かった。また、地点2、3を除くと外れ値が測定されているが、その多くは四分位数から予想される最大値の上方にプロットされた。

2) 水温の平年値に関する式

各地点において水温の平年値 WT を求める式のパラメータを表2で示す。最小二乗法による回帰係数は最小でも地点4の0.872であることからすべての地点で高

表 2 水温の平年値を与える式のパラメータ

	地点番号																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
回帰分析の結果																					
β	18.9	19.3	20.4	19.5	19.7	21.1	21.9	20.2	20.7	18.0	18.5	18.9	18.1	19.2	18.9	18.7	19.1	19.5	19.6	21.0	18.2
$\sin\theta$ の係数 α_1	-5.2	-5.1	-4.5	-4.6	-4.9	-4.5	-4.1	-4.7	-5.2	-5.5	-5.4	-5.4	-5.5	-6.2	-5.7	-6.1	-5.8	-5.7	-5.9	-5.1	-5.5
$\cos\theta$ の係数 α_2	-9.0	-7.7	-7.4	-8.2	-7.8	-7.2	-6.8	-8.1	-7.5	-9.0	-8.7	-8.7	-8.5	-6.4	-8.2	-7.2	-7.6	-7.4	-7.6	-6.7	-8.6
r^2	0.946	0.946	0.944	0.872	0.941	0.947	0.914	0.932	0.912	0.962	0.957	0.956	0.965	0.944	0.949	0.952	0.958	0.948	0.939	0.929	0.968
変換後の係数																					
A	10.4	9.2	8.6	9.4	9.2	8.5	7.9	9.4	9.2	10.5	10.2	10.2	10.1	8.9	10.0	9.4	9.6	9.3	9.6	8.4	10.2
α [°]	-59.8	-56.4	-58.5	-60.6	-57.9	-58.0	-59.0	-59.7	-55.2	-58.7	-57.9	-58.0	-57.2	-46.3	-55.3	-50.0	-53.0	-52.4	-52.3	-52.4	-57.5
極小となる日 [月/日]	3/2	2/27	3/1	3/3	2/28	2/28	3/1	3/2	2/25	3/1	2/28	2/28	2/27	2/16	2/26	2/20	2/23	2/23	2/23	2/23	2/28
極小時の水温 [°C]	8.5	10.0	11.8	10.1	10.5	12.6	14.1	10.8	11.6	7.5	8.2	8.6	7.9	10.2	8.9	9.2	9.5	10.2	10.0	12.6	8.0
極大となる日 [月/日]	9/1	8/28	8/30	9/1	8/30	8/30	8/31	9/1	8/27	8/31	8/30	8/30	8/29	8/18	8/27	8/22	8/25	8/24	8/24	8/24	8/29
極大時の水温 [°C]	29.3	28.5	29.0	28.9	29.0	29.6	29.8	29.5	29.9	28.6	28.7	29.1	28.2	28.1	28.9	28.1	28.7	28.8	29.2	29.4	28.4

い相関を示した。以降に続く重回帰モデルには大腸菌群数を計測した日における水温を、 WT と $diff$ に分離して投入した。

3) 重回帰モデルに投入予定の独立変数と大腸菌群数との相関

表 3 は $day0$ から $day7$ 、 WT 、 $diff$ ならびに YR と $coli$ 間における相関係数を地点ごとに示したものであり、太字のものは相関分析により危険率 5% 水準で有意であったことを意味する。比較のため、対数変換をしていない当日から 7 日前の降水量と水温の実測値についても $coli$ との相関係数を求めた。 $day1$ について、大腸菌群数との間で有意な相関関係を示したのは地点 20 を除く全地点であり、相関係数を対数変換しなかった場合と比較しても $day1$ でより大きくなった。 $day2$ は、対数変換することで有意な相関を示した地点数は、しなかった場合の 8 から 10 へと増加し、地点 21 以外は対数変換することで相関係数も大きくなった。ただし $day0$ は、有意な相関を示す地点数は、しなかった場合の 5 から対数変換後の 3 へと減少し、地点 14 以外は相関係数も小さくなった。3 日前から 7 日前の降水量については対数変換の有無に関わらず有意な相関関係を示す地点は少なかった。

水温は、実測値では全 21 地点のうち 2 地点で有意な相関が見られたが、 WT ならびに $diff$ へ分離することで、いずれか、あるいは両方が有意な相関を示す地点数は 7 地点まで増加した。 YR は、21 地点中 8 地点で大腸菌群数と有意な負の相関が見られた。

重回帰モデルの構築に先立ち、共線性をもつ独立変数を排除するために投入予定の全 11 独立変数間の相関係数を比較した。最小は地点 9 の $day2$ と $diff$ 間で見られた -0.371、最大は地点 20 の $diff$ と YR 間における 0.368 であり、重回帰モデルに投入しようとした独立変数間の相関は強くはなく、重回帰モデルには全 11 変数を独立変数として投入することとした。

4) 重回帰モデルとステップワイズ減少法による最適化

地点毎に全独立変数を投入した重回帰モデルを作成し、そこから AIC に基づくステップワイズ減少法により

独立変数の削減を行った。各地点におけるステップワイズ減少法適用後の重回帰モデルについて、採用された独立変数の回帰係数、自由度調整済み回帰係数 ($adj.r^2$)、第 1、第 2 自由度 ($df1$ 、 $df2$)、 F 値と回帰モデルの有意確率について表 4 で示す。表中、回帰係数にアンダーラインのあるものは偏回帰係数の検定によって危険率 5% 水準で有意であるとされたことを意味し、空白欄はステップワイズ減少法により脱落した独立変数であることを示す。

各地点の重回帰モデルは、すべて有意なモデルとされたが、地点 3、4、6、7、10 では $adj.r^2$ が 0.250 以下であり、妥当性に乏しいモデルとなった。降水に関しては全地点で $day1$ が独立変数として採用され、さらに地点 3 と 9 以外では $day0$ 、 $day2$ 、 $day3$ のうち 1 つ以上が独立変数として採用された。各地点において採用された独立変数間の回帰係数の大きさを比較すると、ほとんどの地点で $day1$ にかかる係数が最大となり、0.303 ~ 1.011 の範囲にあった。これは前日に 3 mm の降水を観測した場合、大腸菌群数は 1.4 ~ 3.0 倍に増加し、10 mm の降水であれば 2.0 ~ 10.4 倍となることを意味する。一方、地点 5 および 20 では $day0$ の係数が最大となり、地点 10 では $day2$ の係数が最大となった。これらの地点では、同じ量であっても、測定当日や 2 日前の降水量が、前日の降水量よりも大腸菌群数の数に強く影響することが示された。

一方、 WT と $diff$ に分割された水温に関しては 14 地点で、 YR については 16 地点でそれぞれ有意な独立変数として採用されたに過ぎず、また、同地点のもので比較しても、それらの回帰係数が $day0$ から $day7$ にかかる回帰係数よりも絶対値が大きくなるものはほとんど見られなかった。

5) 重回帰モデルの線形予測に基づく将来予測

重回帰モデルの線形予測に基づき、将来の 2020 年と 2027 年における各地点の大腸菌群数を計算し、結果については各類型の基準値にならない、 ≤ 50 MPN/dL、 ≤ 1000 MPN/dL、 ≤ 5000 MPN/dL、 > 5000 MPN/dL をそれぞれ AA、A、B、C に分類して表 5 に示した。中には

表 3 大腸菌群数と独立変数との相関係数

項目	地点番号																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
day0	0.018	0.228	0.137	0.159	0.204	0.014	-0.065	0.039	-0.045	0.069	0.144	0.255	0.036	0.357	0.225	0.122	0.063	0.016	-0.007	0.259	0.072
day1	0.276	0.429	0.292	0.360	0.293	0.356	0.354	0.509	0.381	0.253	0.458	0.339	0.286	0.516	0.507	0.576	0.496	0.399	0.460	0.460	0.342
day2	-0.033	0.315	0.160	0.195	0.160	0.246	0.237	0.169	0.120	0.302	0.268	0.280	0.226	0.065	0.273	0.341	0.428	0.486	0.504	-0.004	0.411
day3	-0.191	0.144	-0.054	-0.029	0.009	-0.048	0.013	-0.049	-0.029	0.205	0.220	0.018	0.164	0.068	0.005	0.145	0.252	0.241	0.223	-0.030	0.305
day4	-0.055	0.132	-0.060	-0.040	-0.073	0.051	-0.033	0.041	0.117	0.103	0.112	-0.079	0.029	-0.091	-0.002	0.089	0.071	0.028	0.081	0.231	0.043
day5	0.158	0.025	0.036	0.150	-0.016	0.119	0.087	0.099	0.133	0.073	0.108	0.247	0.129	-0.132	-0.001	0.016	0.040	0.040	-0.003	0.147	0.089
day6	0.157	-0.034	-0.018	0.171	0.070	0.072	-0.026	0.028	0.196	0.175	0.093	0.262	0.145	0.038	0.092	0.072	0.021	0.046	-0.038	0.021	0.148
day7	0.226	-0.067	-0.080	-0.051	-0.089	0.109	-0.073	0.135	-0.032	0.078	0.048	-0.022	0.022	0.054	-0.039	0.015	-0.112	-0.097	-0.206	-0.020	-0.080
WT	0.352	0.245	0.233	0.029	0.266	0.225	0.127	0.128	0.075	0.231	0.245	0.055	0.340	-0.017	0.158	0.146	0.116	0.251	0.006	0.292	0.051
diff	-0.037	-0.022	-0.123	0.094	-0.142	-0.112	-0.200	-0.304	-0.376	-0.134	0.037	-0.033	0.106	0.087	0.010	-0.034	-0.023	-0.088	-0.025	-0.140	-0.099
YR	-0.600	-0.203	-0.165	-0.095	-0.303	-0.154	-0.005	-0.335	-0.337	-0.217	-0.212	-0.215	-0.263	0.205	-0.282	-0.217	-0.269	-0.141	-0.117	0.009	-0.272
当日の降水量	-0.010	0.193	0.186	0.296	0.282	0.153	0.042	0.155	-0.012	0.095	0.138	0.372	-0.044	0.330	0.179	0.106	0.097	0.072	0.034	0.277	0.120
1日前の降水量	0.213	0.410	0.167	0.310	0.207	0.283	0.255	0.347	0.311	0.231	0.365	0.200	0.264	0.456	0.445	0.532	0.392	0.348	0.427	0.162	0.240
2日前の降水量	-0.027	0.253	0.126	0.064	0.104	0.255	0.181	0.145	0.062	0.240	0.212	0.221	0.205	0.078	0.252	0.293	0.311	0.406	0.463	0.004	0.411
3日前の降水量	-0.146	0.109	-0.064	-0.032	0.025	-0.098	0.036	-0.035	-0.018	0.217	0.201	-0.018	0.206	0.058	0.015	0.127	0.194	0.170	0.206	-0.024	0.215
4日前の降水量	-0.049	0.100	-0.052	0.002	-0.024	0.070	-0.059	0.016	0.157	0.126	0.056	-0.042	-0.048	-0.064	0.035	0.060	0.058	0.034	0.035	0.210	-0.006
5日前の降水量	0.272	0.063	0.018	0.142	0.003	0.154	0.111	0.132	0.163	0.150	0.150	0.312	0.204	-0.062	0.047	0.078	0.084	0.107	0.048	0.107	0.136
6日前の降水量	0.270	0.009	0.024	0.244	0.105	0.111	0.023	0.079	0.282	0.185	0.095	0.363	0.158	0.031	0.110	0.096	0.036	0.086	0.004	0.017	0.177
7日前の降水量	0.136	-0.034	-0.108	-0.068	-0.080	0.056	0.000	0.126	-0.036	0.103	0.060	-0.032	-0.001	0.031	-0.047	0.039	-0.088	-0.079	-0.169	0.009	-0.073
水温	0.334	0.233	0.197	0.061	0.223	0.193	0.063	0.045	-0.039	0.201	0.247	0.047	0.354	0.004	0.157	0.135	0.109	0.224	0.000	0.243	0.033

表 4 各地点におけるステップワイズ減少法適用後の重回帰モデルの係数および各種統計量

	地点番号																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
独立変数																					
β	8.805	7.158	8.832	8.445	8.668	7.805	8.247	9.643	9.423	7.056	7.485	8.811	7.129	5.999	7.268	6.785	8.280	5.881	6.121	3.013	8.164
day0		0.617			0.577						0.341	0.480			0.414	0.218	0.286	0.305		1.201	0.269
day1	0.433	0.719	0.476	0.804	0.415	0.711	0.934	1.009	0.933	0.331	0.714	0.498	0.303	0.997	0.824	1.011	0.966	0.845	0.982	0.584	0.486
day2	0.292	0.640		0.294	0.350	0.436	0.402	0.312		0.337	0.336	0.450	0.236		0.405	0.467	0.511	0.650	0.745		0.426
day3	-0.259									0.169	0.255			0.120	0.191			0.307	0.275		0.333
day4		0.275																		0.216	0.526
day5												0.206		0.153	-0.176					0.381	0.141
day6	0.224			0.418					0.377	0.180		0.374									0.150
day7		-0.169					0.332														
WT	0.060	0.046	0.051		0.081	0.076				0.032	0.039		0.053		0.026	0.022		0.067		0.129	
diff	0.209	0.121		0.150						-0.344	0.119		0.111						-0.138		-0.252
YR	-0.244	-0.075			-0.120	-0.083			-0.131	-0.138	-0.071	-0.068	-0.074	-0.078	0.088	-0.086	-0.057	-0.077		0.075	-0.078
各種統計量																					
r^2	0.594	0.401	0.133	0.233	0.334	0.244	0.160	0.390	0.359	0.250	0.391	0.370	0.305	0.402	0.402	0.447	0.450	0.433	0.411	0.311	0.403
adj r^2	0.540	0.372	0.103	0.177	0.276	0.192	0.132	0.348	0.314	0.221	0.359	0.314	0.273	0.372	0.382	0.429	0.422	0.398	0.393	0.260	0.359
F-value	10.88	13.64	4.38	4.18	5.72	4.68	5.71	9.27	8.11	8.45	12.04	6.69	9.48	13.07	20.57	24.73	15.89	12.24	22.99	6.12	9.17
degree of freedom (df1,df2)	(7,52)	(8,163)	(2,57)	(4,55)	(5,57)	(4,58)	(2,60)	(4,58)	(4,58)	(6,152)	(8,150)	(5,57)	(7,151)	(5,97)	(5,153)	(5,153)	(5,97)	(6,96)	(3,99)	(7,95)	(7,95)
	***	***	*	**	***	**	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

地点 3 などのように 2020 年、2027 年ともに C とされた所や地点 7 などのように 2020 年と 2027 年で予測が共通した所も見られたが、半数以上の地点では前日降水量の増加、あるいは冬季から夏季にかけて水温が上昇することで大腸菌群数は増加し、A から B、B から C への変化が見られるとされた。水温を 1 年のうちで最も平均的な春・秋季、前日に降水がないとした場合、1000 MPN/dL、5000 MPN/dL を超える地点数は、2020 年では 21 地点中それぞれ 12 地点、3 地点となった。同様に 2027 年では 10 地点、3 地点となり、大阪市内河川において大腸菌群数は緩い低下傾向にあるものと予測された。なお、参考として 2007 年における実測値とモデル計算値について比較した。実測値の平均値は各月の大腸菌群数を対数変換したうえで求め、前述の AA から C の基準に当てはめて表示したが、地点 9、17、21 の 3 地点以外は実測値とモデル計算値は同じカテゴリーに分類される結果と、ほぼ良好な当てはまりとなった。

IV 考察

時系列データの解析は、例えば季節変動を除去したうえで大気中に排出される二酸化炭素濃度の長期

的なトレンドを解析するといった具合に、自己回帰和分移動平均モデル (ARIMA; AutoRegressive Integrated Moving Average model) などを用い、季節変動成分、トレンド成分、ノイズ成分の 3 成分に分離させた上で検討されることがある[7]。同様に大腸菌群数の変動も時系列データとして 3 成分に分解し、このうちノイズ成分を取りだして降水量との関係を考察すれば十分と思われるが、ARIMA では 1 季節サイクル(1 年)における測定数は常に固定であることが条件であるので、今回のように年によって測定回数異なるケースへの適用は不可である。本研究では重回帰モデルを用いた解析を行ったが、今回は ARIMA モデルの考え方にない、季節変動成分を WT で、長期的なトレンド成分を YR で取り除いたうえで大腸菌群数と降水量 (day0, day1, ..., day7) との関係の解明を試みた。この方法については、特にトレンド成分に相当する YR が直線で近似されてしまうために必ずしも最適なものとはいえない。しかしながらモデル適用条件を満たした地点 2 において ARIMA による解析を平行して実施し、降水量とノイズ成分との対応関係について回帰分析を行ったが、有意な相関関係は見られず、仮に全地点で ARIMA による解析が可能であったとして

表 5 大腸菌群数の将来予測結果

年	季節	前日降水量 [mm/日]	地点番号																						
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
2020	冬季	0	A	A	C	C	B	B	B	B	B	A	A	B	C	B	A	A	A	A	A	A	A		
		3	A	A	C	C	B	B	B	B	A	A	B	B	C	B	A	A	A	A	B	A	B	A	
		10	A	B	C	C	C	B	B	B	A	A	B	B	C	B	A	A	B	B	A	C	A	A	
	春・秋季	0	A	B	C	C	B	B	C	B	B	A	B	B	C	C	A	B	B	B	B	B	B	B	
		3	A	B	C	C	B	C	C	B	B	A	B	B	C	C	B	B	B	B	B	C	B	B	
		10	A	B	C	C	C	C	C	B	B	B	B	B	C	C	B	B	B	C	B	C	C	B	
	夏季	0	A	B	C	C	B	C	C	C	C	A	B	C	C	C	B	B	C	B	C	B	B	B	
		3	A	B	C	C	C	C	C	C	C	B	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	B	
		10	A	C	C	C	C	C	C	C	C	B	C	C	C	C	B	C	C	C	C	C	C	B	
2027	冬季	0	AA	A	C	C	A	A	B	A	A	A	A	B	C	B	A	A	A	A	A	A	B	A	
		3	AA	A	C	C	B	B	B	A	A	A	A	B	C	B	A	A	A	B	A	B	A	B	A
		10	AA	A	C	C	B	B	B	A	A	A	B	B	C	B	A	A	A	A	B	A	C	A	A
	春・秋季	0	AA	A	C	C	A	B	C	B	B	A	B	B	C	C	A	A	B	B	B	B	B	A	
		3	AA	B	C	C	B	B	C	B	A	A	B	B	C	C	A	A	B	B	B	B	C	A	
		10	AA	B	C	C	B	C	C	B	A	A	B	B	C	C	A	B	B	C	B	C	B	A	
	夏季	0	AA	B	C	C	B	B	C	B	B	A	B	B	C	C	B	B	B	B	B	C	C	B	
		3	AA	B	C	C	B	C	C	B	B	A	B	B	C	C	B	B	B	B	C	C	C	B	
		10	A	B	C	C	C	C	C	B	B	B	C	B	C	C	B	B	C	C	C	C	C	B	
参考	2007年計算値の平均	C	C	C	C	C	C	C	C	A	B	C	C	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B		
	2007年実測値の平均	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	C	C	B	B	B	B	C	B	B	A	C	C		

* AA:≤50 MPN/dL、A:≤1000MPN/dL、B:≤5000MPN/dL、C:>5000MPN/dL

も降水との関係を解析できなかった可能性もあり、一定の結果が得られた重回帰モデルによる今回の解析は有用であるものと思われる。

重回帰モデルに投入した降水量は対数変換した値とした。予備的に *coli* と降水量との相関について検討したところ、対数変換しなかった場合よりも対数変換した場合で相関係数が高くなったためである(表 3)。このことは降水量と大腸菌群数との関係は直線的ではなく、むしろ降水量の増大とともに大腸菌群数の増加率は減速するといった対数関数的な増加特性を反映するものであろう。こうした増加特性は、降水による下水処理場からの越流や地面からのフラッシュアウトによる河川水中の大腸菌群数増加と、降水量増大に伴う希釈効果のバランスに関係するものと考えられ、降水と大腸菌群の排出パターンについては古川ら(2015)も同様の指摘をしている[8]。

ステップワイズ減少法適用後の重回帰モデルでは、 $adj.r^2$ は多くの地点で 0.25 より大であったが、この値が 0.25、すなわち相関係数の絶対値が 0.5 を下回る地点が寝屋川水系を中心に見られた。もともと寝屋川水系に属する地点 3~9、およびこの水系の影響を強く受ける下流側の地点 12 は他の水系と比較して大腸菌群数が高く検出される傾向にあり、最大値も極めて高い(図 2)。これは流域人口に対して河川水量が少なく、人為的な影響が強く及ぶためである。従って、寝屋川水系は大腸菌群数と降水量との間に明瞭な関係があり、しかも重回帰モデルにおいても高い相関関係が見られると予想していたが、結果は異なった。寝屋川水系は大阪市の上流地域の影響も強く受け、河川の流路を横切るように運河もあることから水の流れが複雑であり、大腸菌群数は様々な要因に左右されると思われる、今回用いたのとは異なるアプローチでの解析が必要とされるであろう。

重回帰モデルに採用された独立変数に着目すると、地点 20 を除く全地点で前日の降水量 *day1* が有意な独

立変数として採用され、さらに多くの地点で *day0* や *day2* も有意な説明変数とされた。採用された独立変数の回帰係数を比較すると、*day1* では全地点の平均が 0.707 であるのに対し、*day0* および *day2* ではそれぞれ 0.444、0.417 であり、同量の降水であっても当日あるいは 2 日前の降水よりも前日の降水が大腸菌群数に対しより強く影響することが示唆された。前日降水量である *day1* が最も強い影響を及ぼすのは、当日に降水があったとしても降水が下水処理施設などを経て河川に到達するまでのタイムラグがあることや、河川に流入した大腸菌群が河川全体に拡散するまでに一定の時間を要するためと考えられる。鯉淵ら(2005)は東京のお台場における大腸菌数について、当日降水量よりも約 3 日前までの降水量の影響を強く受ける特徴について報告しており、やはり採水地点まで細菌が到達するのに時間を要するためとしている[9]。ただし、地点 5 ならびに地点 20 では *day1* よりも *day0* の回帰係数が大きくなった。地点 5 は河川水量が非常に少なく、その上流における集水域の面積も少なく、地点 20 では下水放流口の直下であり、かつ潮流の速い大阪湾に面していることから水の交換が早く、翌日まで大腸菌群数が維持されないため、それぞれ当日降水量の影響がより強く反映される理由であろう。一方、地点 10 では *day1* よりも *day2* の回帰係数が大きいが、この地点は広大な集水域を抱える淀川からの河川水が流れるため、上流部より排出される大腸菌群の影響がより長時間にわたり影響し続けるためと考えられる。比較的広い集水域を有する点で同等の条件にある地点 2 においても *day2* の回帰係数が 0.597 であり、*day1* の 0.769 に近接しているのも、上流部の影響が長時間にわたる特徴を反映したものであると思われる。

線形予測による 2020 年と 2027 年の大腸菌群数の計算値に関し、重回帰モデルに *YR* が説明変数として採用されなかった、あるいは回帰係数が正となった地点 3、4、

7、13、14、18、19を除くと、水温ならびに降水条件に関わらず2020年と比較して2027年では大腸菌群数の予測値は多くの地点で減少が期待される結果となった。また、地点1では2027年に<50 MPN/dLとなる可能性も示された。一方で地点3、4、13では水温や降水の条件に関わらず2027年においても5000 MPN/dLを下回ることはないとされた。地点13では大腸菌群数増加の原因は下水道処理施設へ行かずに直接河川に混入する雨水であることがわかっており、越流水対策は2015年に完了している[10]。今回の重回帰モデルにはその越流水対策の効果が反映されていないため、将来の大腸菌群数は予測結果とは異なると予想される。また、その上流である地点21もこの越流水対策の恩恵を受ける地点であるために、今後は予測値よりも大腸菌群数が減少すると考えられる。なお、地点3と4は重回帰モデルの $adj.r^2$ が低く、そもそもモデルの妥当性に問題があった地点であり、前述の通り寝屋川水系の大腸菌群数として別のアプローチで解析したほうが望ましいとされる地点である。

以上をまとめると、結論は以下の3点に要約される

- ・大阪市内河川では降水量が大腸菌群数を決定する主たる要因であった。
- ・おおむね2日前までの降水量が大腸菌群数を増加させる要因とされたが、とりわけ前日の降水量に最も影響される地点が多かった。
- ・一部の地点を除き10年後の2027年には大腸菌群数はある程度減少しているものと予想される。

参考文献

- 1) 環境省 水・大気環境局. 平成27年度公共用水域水質測定結果. <http://www.env.go.jp/water/suiiki/>

- 2) 芦立德厚: 水質環境基準項目としての大腸菌群の評価. 用水と廃水 1988; **30**(3): 229-238.
- 3) 環境省: 中央環境審議会水環境部会(第20回)議事録. <http://www.env.go.jp/council/09water/y090-20a.html>, 2009
- 4) 社団法人日本工業用水協会, 財団法人日本規格協会: JIS K0350-20-10:2001 用水・排水中の大腸菌群試験方法., 2001
- 5) 気象庁. 過去の気象データ検索. http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php?prec_no=62&block_no=47772&year=&month=&day=&view=
- 6) R Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015
- 7) Sun, Lynyan, Wang, Muhong: Global warming and global dioxide emission: An empirical study. *Journal of Environmental Management* 1996; **46**(4): 327-343.
- 8) 古川隼士, 野中尋史, 平岡透, 高見徹, 亀野辰三: 大分川におけるふん便性汚染に関する細菌学的調査. 水環境学会誌 2015; **38**(6): 173-180.
- 9) 鯉淵幸生, 小野澤恵一, 中村格之, 原本英二, 片山浩之, 古米弘明, 佐藤慎司, 岡安章夫, 磯部雅彦: 東京湾お台場海浜公園における雨天時合流式下水道越流水の影響調査. 海岸工学論文集 2005; **52**: 886-890.
- 10) 谷口正典: 大阪市下水道事業について. 水坤 2017; **53**: 38-41.

(WEB サイトの内容は2017年7月21日に確認した)

土壌または底質中の鉛と希土類を測定できる分析法の開発

加田平賢史¹⁾、森脇洋²⁾、山崎秀夫³⁾

Development of analysis for lead and rare earth elements in soil and sediments

Kenshi KATAHIRA¹⁾, Hiroshi MORIWAKI²⁾ and Hideo YAMAZAKI³⁾

Abstract

Method for extracting lead and rare earth elements in soil and sediments was examined. Aqua regia could extract rare earth elements (lanthanum, cerium and samarium) in soil and sediments, but could not extract lead inside particles of soil. Mixed acid of nitric acid, hydrofluoric acid and hydrogen peroxide solution could extract lead inside particles of soil, but had low recovery rates for rare earth elements. Because variations of concentrations of rare earth elements extracted by mixed acid were large, rare earth elements seemed not to be extracted stably without aqua regia. Sequential extraction method which combined mixed acid extraction with aqua regia extraction could extract rare earth elements and lead simultaneously, and their recovery rates were almost 100 %.

Key words: lead, rare earth elements, sequential extraction method, soil, sediment

I はじめに

産業活動や商業活動等の人為的活動に伴い、様々な物質が環境中に放出されている。その中でも、鉛は融点が低く、軟らかく加工しやすいこと、また水に溶けずに腐食にくいことから、古くから種々の用途に使用されており、例えば自動車利用による大気環境中への鉛の放出[1-3]や、さらには大気経路による外国からの鉛汚染[4]などが報告されている。一方、近年では先端産業分野において、蛍光材料、触媒、光学ガラス、セラミックス、磁石などの機能性材料に希土類が広く使われており[5]、環境中への放出が懸念される。

環境中に放出された汚染物質は、周辺または遠方に運ばれて降下する。陸圏に降下した場合には、汚染物質は土壌に保持され、長期にわたる汚染となる。水圏に降下した場合は、汚染物質が再度移動する可能性もあるが、最終的には底質(堆積物)に保持される。そのため、土壌や底質には、過去から現在までの様々な発生源から負荷された汚染物質が蓄積されていると考えられる。

そこで本研究では、環境中への鉛および希土類の放出状況を把握することを目的として、土壌または底質試

料を対象とし、鉛と希土類を抽出できる分析法の開発を目指した。

環境試料中の希土類元素の分析法としては、大気中に浮遊している 2.5 μm 以下の粒子 (PM2.5) 中の構成成分を求めるために、環境省ではフッ化水素酸を用いた分解法を推奨[6]している。同法では鉛と希土類を同時に分析しており、土壌や底質試料中の鉛と希土類の分析に適用できる可能性がある。また、プリント基板からの希土類の抽出に王水が用いられている例[7]があることから、土壌、底質試料中の希土類を王水により抽出できる可能性が示唆される。ただしタンタルやモリブデン、タングステンは王水では抽出できておらず[7]、また金属元素と希土類元素との化学的性質の差は大きい[8]ため、王水で鉛が抽出できるかを確認する必要がある。

土壌や底質試料中の鉛と希土類をともに抽出できる手法は確立されていないため、本研究では上記の王水を用いた分析法やフッ化水素酸を用いた分析法が土壌と底質試料に適用可能かを確かめるとともに、両分析法を組み合わせた逐次抽出法を提案し、その有効性について検討した。希土類としては、PM2.5 の分析でも対象

1) 大阪市立環境科学研究センター
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka City Research Center of Environmental Science, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 信州大学繊維学部応用生物科学科
〒386-8567 長野県上田市常田 3-15-1
Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda 386-8567, Japan

3) 近畿大学理工学部生命科学科
〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1
Department of Life Science, School of Science and Engineering, Kindai University, Higashiosaka 577-8502, Japan

となっているランタン(La)、セリウム(Ce)、サマリウム(Sm)を対象とした。

II 分析方法

1) 試料

独立行政法人産業技術総合研究所が提供する火成岩である JG-1 と、アメリカ国立標準技術研究所(National Institute of Standards & Technology)が提供する無機物質分析用の海底堆積物である SRM2702 を分析に供した。それぞれの標準試料中の鉛(Pb)と希土類の認証値を表 1 に示す。なお、SRM2702 中のサマリウムの認証値は公表されていない。

2) 王水抽出法

標準試料 0.5 g に硝酸(有害金属測定用)2.5 mL、塩酸(有害金属測定用)7.5 mL を加え、表 2 に示す条件でマイクロウェーブサンプル分解装置(パーキンエルマージャパン製 MDS-2000)を作動させた。その後テフロンピーカーに移し入れ、ホットプレート上で加熱した。液量が少なくなったら 10 mL にメスアップし、上澄み液を ICP 質量分析計(ICP-MS、サーモフィッシャーサイエンティフィック製 X シリーズ II)で鉛、ランタン、セリウム、サマリウムを測定した。ICP-MS の測定条件は、高周波出力: 1.4 kW、プラズマガス流量: Ar 13.0 L/min、補助ガス流量: Ar 0.8 L/min、キャリアーガス流量: Ar 1.0 L/min、ペリスタルティックポンプ回転速度: 15 rpm、測定数: 3 points/peak、積分時間: 0.3 sec/point である。

3) 混酸分解法

PM2.5 の分解法[6]を適用した。標準試料 0.5 g に硝酸 5 mL、フッ化水素酸(超微量分析用)2 mL、過酸化水素水(特級)1 mL を加え、表 2 に示す動作条件でマイクロウェーブサンプル分解装置を作動させた。その後テフロンピーカーに移し入れ、ホットプレート上で加熱した。液量が少なくなったら 10 mL にメスアップし、上澄み液を ICP-MS で鉛、ランタン、セリウム、サマリウムを測定した。

4) 逐次抽出法

王水抽出の後に混酸分解を行う手法である。標準試料 0.5 g に硝酸 2.5 mL、塩酸 7.5 mL を加え、表 2 に示す動作条件でマイクロウェーブサンプル分解装置を作動させた。その後テフロンピーカーに移し入れ、ホットプレート上で加熱した。液量が少なくな

くなったら 10 mL にメスアップし検液 R を得た。分析のフロー図を図 1 に示す。検液 F と R について ICP-MS で鉛、ランタン、セリウム、サマリウムを測定した。

III 結果と考察

1) 回収率

(1) 王水抽出法

標準試料に王水抽出法を適用した結果を表 3 に示す。表より、王水抽出法ではランタン、セリウム、サマリウムを抽出できたが、鉛については JG-1 で回収率が平均 12%と低かった。

(2) 混酸分解法

標準試料に混酸分解法を適用した結果を表 4 に示す。表より、王水抽出法では JG-1 での鉛の回収率が低かったが、混酸分解法では回収率が JG-1 で平均 89%、SRM2702 で平均 93%と高く、鉛を抽出できていた。

しかし、ランタン、セリウム、サマリウムの回収率が低く、最大でも 50%であった。また SRM2702 では、実験によっては濃度が 10 倍以上も異なる場合が見られており、混酸分解法ではランタン、セリウム、サマリウムを安定して抽出することができないことがわかった。希土類を抽出するには王水を用いる必要があると考えられた。

表1 本研究で用いた標準試料の認証値

標準試料	認証値 (mg/kg)			
	Pb	La	Ce	Sm
JG-1	25.4	22.4	45.8	4.62
SRM2702	132.8	73.5	123.4	-

表2 マイクロウェーブサンプル分解装置の作動条件

処理時間(分)	2	1	6	6	10	3
出力(W)	250	0	250	400	650	400

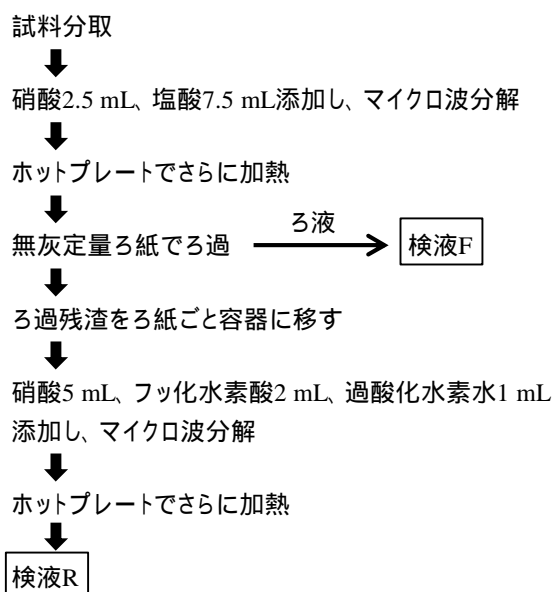


図1 逐次抽出法のフロー図

表3 王水抽出法による測定値と回収率

JG-1(火成岩)								
	Pb		La		Ce		Sm	
	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率
認証値	25.4	-	22.4	-	45.8	-	4.62	-
実験1	2.46	9.7	16.9	75	35.6	78	3.98	86
実験2	2.70	11	19.5	87	40.9	89	4.27	92
実験3	4.12	16	18.4	82	39.0	85	4.36	94
実験4	3.83	15	19.8	88	42.0	92	4.44	96
実験5	1.74	6.9	20.9	93	43.8	96	4.72	102
平均	2.97	12	19.1	85	40.3	88	4.35	94
標準偏差	0.99	3.9	1.5	6.7	3.1	6.8	0.27	5.8

SRM2702(Inorganics in marine sediment)								
	Pb		La		Ce		Sm	
	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率
認証値	132.8	-	73.5	-	123.4	-	-	-
実験1	115	86	72.9	99	124	101	9.32	-
実験2	117	88	67.6	92	113	92	9.35	-
実験3	108	81	74.4	101	126	102	8.65	-
実験4	112	84	69.1	94	116	94	8.62	-
実験5	115	86	73.1	99	122	99	8.90	-
平均	113	85	71.4	97	120	98	8.97	-
標準偏差	3.4	2.6	2.9	3.9	5.8	4.7	0.35	-

* 濃度の単位はmg/kg、回収率は認証値に対する濃度の割合で単位は%

表4 混酸分解法による測定値と回収率

JG-1(火成岩)								
	Pb		La		Ce		Sm	
	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率
認証値	25.4	-	22.4	-	45.8	-	4.62	-
実験1	23.5	93	1.01	4.5	15.2	33	0.422	9.1
実験2	21.7	86	2.83	13	16.7	37	0.598	13
実験3	21.5	85	1.14	5.1	13.0	28	0.411	8.9
実験4	24.0	95	1.10	4.9	22.9	50	0.475	10
実験5	21.9	86	3.26	15	12.5	27	0.578	13
平均	22.5	89	1.87	8.3	16.1	35	0.497	11
標準偏差	1.2	4.5	1.1	4.8	4.2	9.1	0.087	1.9

SRM2702(Inorganics in marine sediment)								
	Pb		La		Ce		Sm	
	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率
認証値	132.8	-	73.5	-	123.4	-	-	-
実験1	135	102	6.31	8.6	56.6	46	2.49	-
実験2	123	93	0.573	0.78	4.32	3.5	0.286	-
実験3	122	92	0.605	0.82	4.84	3.9	0.296	-
実験4	118	89	3.35	4.6	22.9	19	1.52	-
実験5	121	91	0.290	0.39	1.54	1.2	0.148	-
平均	124	93	2.23	3.0	18.0	15	0.948	-
標準偏差	6.5	4.9	2.6	3.5	23	19	1.0	-

* 濃度の単位はmg/kg、回収率は認証値に対する濃度の割合で単位は%

表5 逐次抽出法による測定値と回収率

		JG-1(火成岩)							
		Pb		La		Ce		Sm	
		濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率
認証値		25.4	-	22.4	-	45.8	-	4.62	-
実験1	検液F	3.42	13	16.2	72	29.0	63	3.91	85
	検液R	23.4	92	0.152	0.68	1.03	2.2	0.0771	1.7
実験2	検液F	3.58	14	22.5	100	41.2	90	4.84	105
	検液R	21.9	86	0.148	0.66	0.387	0.85	0.0376	0.81
実験3	検液F	3.38	13	22.4	100	40.3	88	4.94	107
	検液R	22.2	88	0.065	0.29	0.215	0.47	0.0255	0.55
実験4	検液F	3.30	13	24.3	109	43.0	94	4.89	106
	検液R	22.8	90	0.070	0.31	0.259	0.57	0.0341	0.74
実験5	検液F	3.65	14	23.9	107	42.9	94	5.21	113
	検液R	22.6	89	0.126	0.56	0.418	0.91	0.0304	0.66
平均	検液F	3.47	14	21.9	98	39.3	86	4.76	103
	検液R	22.6	89	0.112	0.50	0.462	1.0	0.0409	0.89
標準偏差	検液F	0.13	0.50	2.9	13	5.2	11	0.44	9.6
	検液R	0.53	2.1	0.038	0.17	0.29	0.64	0.019	0.40

		SRM2702(Inorganics in marine sediment)							
		Pb		La		Ce		Sm	
		濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率	濃度	回収率
認証値		132.8	-	73.5	-	123.4	-	-	-
実験1	検液F	123	93	85.0	116	138	112	12.5	-
	検液R	5.54	4.2	2.11	2.9	2.65	2.1	0.350	-
実験2	検液F	70.6	53	49.4	67	79.7	65	7.28	-
	検液R	42.7	32	1.08	1.5	6.87	5.6	0.425	-
実験3	検液F	97.2	73	66.6	91	109	88	8.79	-
	検液R	22.5	17	0.226	0.31	5.11	4.1	0.113	-
実験4	検液F	113	85	76.8	105	126	102	10.2	-
	検液R	7.52	5.7	7.35	10	9.62	7.8	0.646	-
実験5	検液F	111	83	77.2	105	128	103	10.1	-
	検液R	8.52	6.4	1.75	2.4	6.15	5.0	0.322	-
平均	検液F	103	78	71.0	97	116	94	9.77	-
	検液R	17.4	13	2.50	3.4	6.08	4.9	0.371	-
標準偏差	検液F	18	14	12	17	20	17	1.7	-
	検液R	14	11	2.5	3.4	2.3	1.8	0.17	-

*濃度の単位はmg/kg、回収率は認証値に対する濃度の割合で単位は%

(3) 逐次抽出法

標準試料に逐次抽出法を適用した結果を表5に示す。なお、ブランク試験を行い、ろ紙を分解することによる鉛と希土類の濃度増加がないことを確認した。表より、検液FとRの回収率を合計すると鉛、希土類ともに100%に近くなり、十分抽出できていることがわかる。なおSRM2702の実験2の検液Fではランタンとセリウムの回収率が他の実験に比べて低くなっているが、原因は不明である。

特にJG-1では、王水抽出による検液Fでは鉛の回収率が14%と低いが、その後の混酸分解による検液Rでは89%となっており、試料中に残存する鉛を抽出で

きていた。また、ランタン、セリウム、サマリウムは混酸分解による検液Rでは0.50~4.9%と低い回収率であるが、その前段階の王水抽出による検液Fで86~103%の回収率が得られており、十分抽出できていた。以上のことから、鉛とランタン、セリウム、サマリウムを同時に抽出するには、逐次抽出法が有効であることがわかった。

2) JG-1の鉛の回収率について

SRM2702の鉛については、王水抽出法、混酸分解法ともに90%程度の高い回収率が得られており、両分析法で鉛を抽出できることがわかった。しかしJG-1の鉛については、混酸分解法では89%と高い回収率が得ら

れたのに対し、王水抽出法では回収率が 12 %と低かった。両分析法の違いは、混酸分解法では試料の粒子も分解できる点である。そのため、JG-1 では粒子内部にも鉛が多く存在しており、王水抽出法では抽出されなかったが、混酸分解法では粒子が分解され内部の鉛が抽出されたと推測される。これは、SRM2702 に逐次抽出法を行った結果において、王水抽出による検液 F では 78 %と王水抽出法の 85 %とほぼ同じ高い回収率が得られているが、その後の混酸分解による検液 R ではさらに 13 %の回収率が得られていることから、試料の粒子内部の鉛が抽出されていると考えられる。

3) SRM2702 中のサマリウム濃度の推定

SRM2702 中のサマリウム濃度は、認証値が公表されていない。そのため、本研究では SRM2702 中のサマリウム濃度を測定したが、回収率は求められなかった。5 回の実験による SRM2702 のサマリウムの抽出合計濃度を平均すると、10.1 mg/kg であった。

逐次抽出法を行った結果では、ランタン、セリウムについてはほぼ 100 %に近い回収率が得られており、また JG-1 ではサマリウムも 100 %に近い回収率であった。希土類元素は互いに化学的性質がよく似ている[8]ことから、SRM2702 に逐次抽出法を行った結果は、100 %に近い回収率が得られている可能性がある。

なお地殻存在度[9]は、ランタンが 22 mg/kg、セリウムが 43 mg/kg、サマリウムが 4.0 mg/kg であり、元素の存在比率を求めると、ランタン/サマリウム比は 5.5、セリウム/サマリウム比は 10.75 となる。今回分析に用いた SRM2702 は海底堆積物であり、地殻存在度とは比較できないが、仮に元素の比率が同じだと仮定して SRM2702 中のランタン、セリウムの認証値からサマリウム濃度を算定すると、ランタン/サマリウム比 5.5 では 13.4 mg/kg、セリウム/サマリウム比 10.75 では 11.5 mg/kg となり、本研究での推測値 10.1 mg/kg とはそれほど大きな差にならない。これはあくまで推測にすぎないため、今後サマリウムの認証値が公表され、本研究でのサマリウム濃度の推定の妥当性が検証できることを期待する。

IV おわりに

本研究では、鉛に加え希土類であるランタン、セリウム、サマリウムを同時に分析できる手法を検討した。その結果、希土類は王水分解法により抽出が可能であったが、同時に鉛を抽出するには本研究で提案する逐次抽出法を行う必要があることがわかった。逐次抽出法において、ろ紙を分解することによる鉛と希土類の濃度増加は認められなかった。今回は鉛とランタン、セリウム、サマリウムのみを対象としたが、今後はその他の金属についても検討を行い、手法に適宜修正を加えることで、環境中

への汚染物質の放出状況を網羅的に把握できる分析法の開発を進めていきたい。

またこの逐次抽出法では、試料の粒子内部に存在する鉛は検液 F では抽出されず、次段階の検液 R 中に回収される。環境中に放出された人為活動由来の鉛は土壌や底質の粒子内部には取り込まれないため、検液 R で抽出される鉛は自然由来の鉛である可能性が考えられる。今後、鉛の由来を推定できる鉛同位体比分析[10]を行ってこの仮説の妥当性を検討する等により、新たな研究の進展が期待される。

謝辞 本研究は、JSPS 科研費 JP24310014 の助成を受けて行いました。

参考文献

- 1) Martin Novak, Simon Emmanuel, Melanie A. Vile, Yigal Erel, Alain Veron, Tomas Paces, et al. Origin of Lead in Eight Central European Peat Bogs Determined from Isotope Ratios, Strengths, and Operation Times of Regional Pollution Sources. *Environmental Science & Technology* 2003; **37**(3): 437-445.
- 2) W. Shoty, D. Weiss, M. Heisterkamp, A. K. Cheburkin, P. G. Appleby, F. C. Adams. New Peat Bog Record of Atmospheric Lead Pollution in Switzerland: Pb Concentrations, Enrichment Factors, Isotopic Composition, and Organolead Species. *Environmental Science & Technology* 2002; **36**: 3893-3900.
- 3) Aberg G, Stray H, Pacyna J M, Skjelkvale B L. The origin of atmospheric lead in Oslo, Norway, studied with the use of isotopic ratios. *Atmospheric Environment* 1999; **33**(20): 3335-3344.
- 4) Yigal Erel, Tamar Axelrod, Alain Veron, Yitzak Mahrer, Petros Katsafados, Uri Dayan. Transboundary Atmospheric Lead Pollution. *Environmental Science & Technology* 2002; **36**(15): 3230-3233.
- 5) 高橋徹, 富田恵一, 作田庸一, 高野明富. 廃蛍光管からの希土類元素の分離回収 (第 1 報). 北海道立工業試験場報告 1994; **293**: 7-13.
- 6) 環境省. 無機元素測定法. 大気中微小粒子状物質 (PM_{2.5})成分測定マニュアル 2012.
- 7) 林正男, 日下部正和, 中野忠, 岩崎英二, 宇都宮彬. プリント基板中の金属及び臭素含有量分析のための試料分解法. 日本環境衛生センター所報 2010; **37**: 63-70.
- 8) 足立吟也編著. 希土類の科学. (株)化学同人; 1999. 184-202.
- 9) 足立吟也編著. 希土類の科学. (株)化学同人; 1999. 22-33.

- 10) 加田平賢史, 森脇洋, 山本攻, 鶴保謙四郎, 新矢将尚. ICP-MS を用いた土壤中鉛の同位体比分析における最適な分析条件の検討. 生活衛生 2005; **49**(5): 297-304.

技術報告**2016 年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物**

中村寛海¹⁾、後藤 薫¹⁾、梅田 薫¹⁾、山本香織¹⁾、入谷展弘¹⁾、阿部仁一郎¹⁾、久保英幸¹⁾、改田 厚¹⁾、上林大起^{1),2)}、山元誠司¹⁾、平山照雄¹⁾、平井有紀¹⁾、山崎一夫¹⁾、長谷 篤¹⁾、小笠原準¹⁾

**Enteric Pathogens Detected during Investigation of Food Poisoning Outbreaks
in Osaka City in 2016**

Hiromi NAKAMURA¹⁾, Kaoru GOTO¹⁾, Kaoru UMEDA¹⁾, Kaori YAMAMOTO¹⁾, Nobuhiro IRITANI¹⁾, Niichiro ABE¹⁾, Hideyuki KUBO¹⁾, Atsushi KAIDA¹⁾, Daiki KANBAYASHI^{1),2)}, Seiji P YAMAMOTO¹⁾, Teruo HIRAYAMA¹⁾, Yuki HIRAI¹⁾, Kazuo YAMAZAKI¹⁾, Atsushi HASE¹⁾, and Jun OGASAWARA¹⁾

Abstract

A total of 106 incidents of suspected food-borne infectious diseases or food-hygienic problems were investigated in Osaka city in 2016. Enteropathogenic microorganisms were detected as causative agents in 81 incidents (76.4 %), *Norovirus* in 38 incidents, *Campylobacter jejuni/coli* in 36 incidents (detected with either *Norovirus* or *Salmonella* Infantis in 2 cases), enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in 2 incidents, *Salmonella* Enteritidis in 2 incidents, *Staphylococcus aureus* in 1 incident, *Clostridium perfringens* in 1 incident, and *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* in 1 incident. In recent years, *Norovirus* and *Campylobacter jejuni/coli* were major causative agent of food poisoning outbreaks in Osaka City like a nationwide tendency.

Key words: enteric pathogen, food-borne infection, food poisoning, epidemiology

I 緒言

2015 年の大阪市の食中毒事件数は 53 件、患者数 473 名だったのが、2016 年にはそれぞれ 46 件、494 名と事件数は若干減少したものの、患者数は増加している。食中毒事件 46 件の内訳はカンピロバクターが 28 件 (61.0%)、ノロウイルスが 14 件 (30.4%)、ウェルシュ菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸管出血性大腸菌 O157 によるものがそれぞれ 1 件であった[1]。46 件のうち 42 件 (91.3%) がカンピロバクターあるいはノロウイルスによるものであり、これらの微生物による事件数が昨年よりもさらに増加し、食中毒事件数の 9 割以上を占めている[1]。

本調査は、大阪市内で食中毒が疑われ当研究所に検体が搬入された事件についてまとめ、その原因病原体と疫学情報を基に感染源を明らかにすることで、本市における食品衛生行政の向上に役立てることを目的としている。なお、赤痢菌、コレラ菌、パラチフス A 菌、チフス菌および腸管出血性大腸菌の三類感染症患者検出状況については感染症発生動向調査事業報告書に別途まとめた[2]。

II 材料と方法**1) 検体**

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

2) 下痢原性細菌の検出

対象菌種と使用した培地は、昨年度の本報告と同様である[3,4]。細菌は分離後、常法に従って生化学性状を確認し、菌種を同定した。また、血清型別を必要とする細菌については、各種の型別用免疫血清 (デンカ生研) を用いて血清型別試験を行った。

3) 毒素産生性試験および病原遺伝子の検出

下痢原性細菌分離後、必要とされる場合には毒素産生性試験、病原遺伝子の検出を行った。毒素産生性試験は各種毒素産生用培地および市販の毒素検出用キット (デンカ生研) を用いて行い、病原遺伝子の検出は遺伝子増幅法 (PCR 法) により行った[4]。

1) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka Institute of Public Health, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター
〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69
Osaka Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

表1 検出された下痢原性微生物と食中毒の疑いで調査された事件の概要

事件番号 ¹⁾	食中番号 ²⁾	発生日	患者数/ 摂食者数	検出微生物	陽性数/ 被験者数	原因施設 ³⁾	原因食品 ⁴⁾
1		12月31日	3/7	Norovirus (GII)	3/3	飲食店 焼肉店	焼肉
2		12月29日	19/46	Norovirus (GII)	6/19	飲食店 居酒屋	
3		1月10日	2/7	Norovirus (GII)	2/2	飲食店	もつ鍋
4	1	1月8日	20/41	Norovirus (GII)	0/0	飲食店 大衆酒場	不明(一品料理)
5		1月15日	2/16	Norovirus (GII)/C. jejuni	1/2	飲食店 居酒屋	
6		1月13日	1/不明	C. jejuni	1/1	飲食店	鶏タタキ
7		1月14日	4/10	C. jejuni	4/4	飲食店 居酒屋	鶏尽くしコース(生鶏肉含む)
8		1月22日	2/25	Norovirus (GII)	2/2	仕出し屋	仕出し弁当
9	3	1月23日	3/3	Norovirus (GII)	2/2	飲食店 その他料理	生カキ(一品料理)
10	4	1月26日	3/6	C. jejuni	2/2	飲食店 めん類食堂	鶏のタタキ(ラーメン)
11	5	1月31日	7/34	Norovirus (GII)	1/1	老健施設 集団給食	不明(1月29日に提供された食事)
12		2月3日	16/34	Norovirus (GI)	2/3	宿泊施設(ホテル)/ 飲食店:(大分県、福岡県)	不明(2月2日夕食 or 2月3日朝食)
14		2月11日	4/4	Norovirus (GII)	1/1	飲食店	生カキ含むカキ料理
15	6	2月7日	9/13	C. jejuni	8/9	飲食店 焼鳥屋	鶏刺身盛合せ、 白レバーのサラダ(コース料理)
16		2月11日	2/2	Norovirus (GI/GII)	1/2	飲食店 フランス料理店	蒸カキ含む料理
17		2月25日	15/30	C.perfringens (cpe 遺伝子保有)・S.aureus	1/1	大学学内食堂	23日昼食～25日朝食
18	7	2月28日	9/11	Norovirus (GII)	6/6	飲食店 寿司屋	にぎり寿司(一品料理)
19		3月1日	14-15/20	Norovirus (GII)	6/6	社員食堂(加熱配膳のみ)	2/29, 3/1 昼食
20	8	3月3日	12/21	Norovirus (GII)	3/5	飲食店 大衆酒場	コース料理
21		3月3日	34/51	C. jejuni	3/3	宿泊施設	合宿中の提供料理(朝昼夕食)
23	9	3月7日	8/10	Norovirus (GII)	1/1	飲食店 大衆酒場	コース料理
26		3月6日	12/23	Norovirus (GII)	4/5	飲食店 海鮮料理店	不明(一品料理)
27		3月28日	12/16	C. jejuni	1/1	飲食店 鶏料理店	鶏タタキ含む料理
28		4月3日	3/7	C. jejuni	1/1	飲食店 焼鳥屋	鶏つくり、鶏タタキ等
29		4月2日	3/4	C. jejuni	1/1	飲食店 居酒屋 (その他の共通食もあり)	鶏刺身含む料理
30	11	4月2日	6/10	C. jejuni	1/2	飲食店 焼鳥屋	鶏串焼き(ささみ)
31		4月7日	5/77	C. jejuni	4/10	宿泊施設等	不明(4月4日～4月7日の食事:ロー ルキャベツ、蒸し鶏、豚コース焼き)
32	12	4月12日	23/39	Norovirus (GII)	7/9	飲食店 ホテル	不明(コース料理)
34		4月1日	8/9	C. jejuni	1/2	飲食店 居酒屋	不明
36		4月4日	5/18	C. jejuni	1/2	飲食店 鳥料理店	鶏刺身、タタキなど
37		4月17日	37/67	Norovirus (GII)	5/7	結婚式場	不明
38		4月19日	5/5	C. jejuni	1/2	神戸市内飲食店	鶏刺身含む
40	13	4月26日	2/4	C. jejuni / coli	2/3	飲食店 焼鳥屋	地鶏のササミ炙り焼、 レバー(焼鳥)
41	14	4月30日	8/12	Norovirus (GII)	0/0	飲食店 日本料理	不明(コース料理)
43	15	5月14日	26/81	C.perfringens Hobbs 1型 (cpe 遺伝子保有)	3/10	飲食店 中華レストラン	不明(一品料理)
44	16	5月21日	15/53	S. aureus (seg, sei, sem, sen, seo, selu 遺伝子保有)	7/10	老人施設 集団給食	不明(5月21日の昼食)
45		5月23日	4/8	Norovirus (GII)	1/1	不明	不明
48	18	6月9日	10/15	C. jejuni	7/8	飲食店 焼鳥屋	鶏肝の炙り
49	19	6月14日	10/13	Norovirus (GII)	3/4	飲食店 日本料理	不明(コース料理または一品料理)
50	17	6月6日	3/5	C. jejuni	3/3	飲食店 焼鳥屋	地鶏の造り盛合せ、鶏のにぎり、 肥鳥のユッケ
52	20	6月22日	8/16	C. jejuni	1/1	飲食店 焼鳥屋	鶏肉の刺身(ささみ、 むねたき、心臓)
53	21	6月25日	7/9	C. jejuni	7/7	飲食店 焼鳥屋	鶏刺身 5種盛り

1) 検体搬入時に付けられた番号。 2) 食中毒と判断され厚生労働省に届出された事件につけられた番号。太字で示す。

3) 食中毒と判断されなかった事件は推定原因施設を示す。 4) 食中毒と判断されなかった事件は推定原因食品を示す。

5) 患者の平均体温(未確認は+)。 6) 陽性数/被験者数あるいは陽性数/被験食品数

7) 調査開始当初は別事件と考えられたが、後に同一の食中毒事件であることが判明した。事件数としては個々にカウントした。

2016年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物

事件番号 ¹⁾	潜伏時間(hr)	下痢	腹痛	発熱 ⁵⁾	嘔気	嘔吐	その他	備考(調理者検便等) ⁶⁾
1	48	+		+	+			富山県事例
2	26-48	+		+		+		調理人 <i>Norovirus</i> :0/10
3	26.5-43.5	+	+	37.3 - 38.1	+	+		調理人 <i>Norovirus</i> :0/4
4	24-48	+		+		+	頭痛、悪寒、嘔気	調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:1/2
5	40	+			+			調理人 <i>Norovirus</i> :0/4
6	59	+	+	+				滋賀県事例
7	40-96	+	+	+				
8		+				+		尼崎市事例
9	27	+		39	+	+		
10		+	+	38.8			悪寒、頭痛	医療機関入院1名より <i>Campylobacter</i> 検出
11	45				+	+		調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:1/2
12	24-48	+	+	+		+		大分県、福岡県事例
14	35	+	+	39	+		悪寒	京都市事例
15	75-166	+	+	+		+	悪寒	
16	35.5	+	+	37.4-39.3		+	頭痛、悪寒、嘔気	
17		+	+		+		頭痛、倦怠感	尼崎市事例
18	30	+	+			+		調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:1/4
19	26-51	+		38.8		+	頭痛、悪寒、嘔気	調理人 <i>Norovirus</i> :0/1
20		+				+		調理人 <i>Norovirus</i> :0/2
21		+	+	+			頭痛、嘔気、裏急後重	高知市事例 患者1/3名から <i>S. aureus</i> 検出、 患者1/3名から <i>C. perfringens</i> と <i>S. aureus</i> 検出
23	29	+	+	37.5	+	+	頭痛、悪寒、倦怠感	調理人 <i>Norovirus</i> (GII) 検出:2/5
26	~24	+	+			+		神戸市事例
27	平均54 (11-124)	+	+	+	不明	不明	不明	尼崎市事例
28	68.5	+	+	+	+	+	頭痛、脱力感、倦怠感	
29	54	+	+	+	+	+	頭痛、悪寒、倦怠感	
30	25-103	+	+	+	+		倦怠感、頭痛	
31		+		+				他府県事例
32	15.5-40.5	+	+	+	+	+	頭痛	調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:1/4
34	15-111	+	+	+	+	+	頭痛	
36	52-108	+	+	+	+		倦怠感	下痢は水様便10回
37	23.5-63.5	+	+	+	+	+	頭痛、倦怠感	感染症の可能性
38	43	+	+	+				神戸市事例
40	35.5-53.5	+	+	+	+		悪寒、倦怠感	
41	22-40	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:2/7
43	3.5-36.5	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感	
44	2.5-4.6	+			+	+		A~E型エンテロトキシン非産生、コアグラーゼVII型 検食(残品)7/7検体から <i>S.aureus</i> 検出、 調理人手指ふきとり水2/7検体から <i>S.aureus</i> 検出、 施設ふきとり水1/14検体から <i>S.aureus</i> 検出、 全て <i>seg, sei, sem, sen, seo, selu</i> 遺伝子保有
45	2	+	+	+	+	+		
48	45.25-109.25	+	+	+	+		悪寒、倦怠感、頭痛	
49	25-58	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:2/4
50	39-71.5	+	+	37.5				
52	38.5-83	+	+	+	+		悪寒、倦怠感、頭痛	
53	14.7-46.5	+	+	38.6-39	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	患者2/7名からは <i>Salmonella</i> Manhattan (O6,8:d:1,5)も同時検出

(次ページに続く)

表 1 検出された下痢原性微生物と食中毒の疑いで調査された事件の概要(前ページからの続き)

事件番号 ¹⁾	食中番号 ²⁾	発生日	患者数/ 摂食者数	検出微生物	陽性数/ 被験有症者数	原因施設 ³⁾	原因食品 ⁴⁾
54		6月26日	3/4	<i>C. jejuni</i> / <i>S. Infantis</i>	2/3	飲食店 焼鳥屋	鶏コック
55	23	6月25日	11/12	<i>C. jejuni</i>	6/9	飲食店 その他料理	鶏造りの盛合せ(もも、むね、ささみ、肝、ハート、砂ずり)
56	24	6月27日	7/15	<i>C. jejuni</i>	3/7	飲食店 その他料理	鶏のタタキ
57		6月27日	7/8	<i>C. jejuni</i>	1/6	飲食店 居酒屋	刺し身、鶏コック
61		7月9日	13/26	EHEC O157:H7 (<i>stx1, stx2</i> 遺伝子保有)	8/9	滋賀県・焼き肉店	ツアー旅行食事
64		7月30日	77/197	Norovirus (GII)	6/10	飲食店 旅館	不明(旅館が提供した食事)
65	25	8月13日	4/4	EHEC O157	0/1	飲食店 焼肉屋	不明(一品料理)
67		8月18日	27/46	<i>C. jejuni</i>	1/3	飲食店	8月17日夕食又は18日朝食
68, 71 ⁷⁾	26	8月21日	82/255	<i>S. Enteritidis</i>	8/9	飲食店 弁当屋	不明(仕出し弁当)
69		8月21日	3/11	<i>C. jejuni</i>	1/2	飲食店 居酒屋	焼き鳥、生鶏肉
72	29	9月15日	5/19	<i>C. coli</i>	4/5	飲食店 焼鳥屋	焼鳥(一品料理)
73	31	9月24日	19/21	Norovirus (GII)	1/4	飲食店 中華料理	不明(コース料理)
74	30	9月22日	7/14	<i>C. jejuni</i>	2/2	飲食店 焼鳥屋	鳥の刺身(ささみ、肝、ずり、こころ)(コース料理)
76		10月1日	5/5	<i>C. jejuni</i>	1/1	飲食店 焼鳥屋	焼鳥、つくねおろしポン酢など
78		10月11日	5/5	<i>C. jejuni</i>	1/1	飲食店 鳥料理屋	原因施設で提供された食事
80	34	10月22日	8/15	<i>C. jejuni</i>	2/2	飲食店 大衆酒場	鶏ささみ造り、鶏ささみ湯引き(コース料理)
83	35	10月30日	6/9	<i>C. jejuni</i>	1/1	飲食店 焼鳥屋	鶏刺し盛り合わせ(もも、むね、ささみ)(一品料理)
84	37	11月3日	6/21	<i>C. jejuni</i> / <i>coli</i>	3/3	飲食店 大衆酒場	鶏ももタタキ(コース料理)
85		11月6日	7/25	Norovirus (GII)	1/1	飲食店	不明
86	39	11月9日	4/4	<i>C. jejuni</i>	4/4	飲食店 大衆酒場	地鶏造り盛り合わせ(一品料理)
87		11月14日	17/18	Norovirus (GII)	2/3	飲食店 レストラン	不明
88		11月14日	4/4	Norovirus (GII)	1/1	飲食店	不明
90, 91 ⁷⁾	40	11月24日	21/33	Norovirus (GII)	9/10	飲食店 寿司屋	不明(コース料理又は定食)
92		11月25日	19/28	Norovirus (GII)	11/11	飲食店 レストラン	不明
93	42	12月2日	3/4	Norovirus (GI/GII)	2/2	飲食店 レストラン	不明(コース料理)
94		12月2日	10/18	Norovirus (GII)	2/2	飲食店	鍋コース
95		12月1日	3/3	<i>C. jejuni</i>	1/1	飲食店 焼鳥屋	鶏造り
96	43	12月3日	5/8	<i>C. jejuni</i> / <i>coli</i>	1/1	飲食店 焼鳥屋	焼鳥(レバー、ささみ白焼き)(コース料理)
97	44	12月4日	29/51	Norovirus (GII)	10/13	飲食店 レストラン	不明(コース料理等)
98		12月10日	15/42	Norovirus (GII)	2/2	飲食店(忘年会)	原因施設で提供された食事
99		-	49/138	Norovirus (GII)	2/2	飲食店(結婚式)	コース料理
100		12月10日	20/36	Norovirus (GII)	1/1	飲食店	不明
101		12月18日	12/21	Norovirus (GI)	2/4	飲食店 大衆酒場	鶏タタキなど
102		12月17日	17/46	Norovirus (GII)	3/4	飲食店 レストラン(中華)	コース料理
104	45	12月20日	9/10	Norovirus (GII)	5/10	飲食店 大衆酒場	不明(一品料理)
105	46	12月25日	4/7	<i>C. jejuni</i>	1/2	飲食店 焼鳥屋	鶏肉の刺身(もも、むね、ささみ、肝、ずり、こころ)(一品料理)
106		12月28日	33/42	Norovirus (GII)	4/5		不明

1) 検体搬入時に付けられた番号。 2) 食中毒と判断され厚生労働省に届出された事件につけられた番号、太字で示す。

3) 食中毒と判断されなかった事件は推定原因施設を示す。 4) 食中毒と判断されなかった事件は推定原因食品を示す。

5) 患者の平均体温(未確認は+)。 6) 陽性数/被験調理者数あるいは陽性数/被験食品数

7) 調査開始当初は別事件と考えられたが、後に同一の食中毒事件であることが判明した。事件数としては個々にカウントした。

2016年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物

事件番号 ¹⁾	潜伏時間 (hr)	下痢	腹痛	発熱 ⁵⁾	嘔気	嘔吐	その他	備考(調理者検便等) ⁶⁾
54	45-52	+	+	+			悪寒、倦怠感、頭痛	患者3名のうち1名から <i>C. jejuni</i> 、1名から <i>Salmonella</i> Infantis (O7:r:1,5)を検出
55	12-73	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	
56	52-100	+	+	37-40	+		悪寒、倦怠感、頭痛	
57	23-146	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	嘔吐は1回1名
61	32-128	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感	滋賀県事例 EHEC陽性患者8名のうち1名は <i>stx2</i> 遺伝子陽性の O157:H7 も同時検出、2名から <i>C. jejuni</i> を同時検出
64	50	+	+	38	+	+		高山市事例
65	65-132	+	+	38	+	+	悪寒、裏急後重	大阪府で患者発生届 EHEC O157:ふきとり水 0/7、調理人 0/2
67	—	+		+			頭痛	和歌山県事例
68, 71 ⁷⁾	67	+	+	38	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	調理人 <i>S. Enteritidis</i> :0/14、食品 0/9、 ふきとり水 0/10
69	38-62	+	+	37.4-38.7	+		悪寒、倦怠感、頭痛	
72	31.5-159.5	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	
73	21.5-55	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:1/8
74	37-85.5	+	+	+	+		悪寒、倦怠感、頭痛	
76	103	+	+			+	悪寒、頭痛	
78	64	+	+	+		+	頭痛	
80	22-52	+	+	+		+	悪寒、倦怠感、頭痛	
83	40-83	+	+	+	+		悪寒、倦怠感、頭痛	
84	40.5-84.5	+	+	38-39	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	
85	—	+	+	+	+	+		和歌山市事例
86	35.5-45	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	
87	26.5-30.5	+	+	+	+	+		神戸市事例(感染症の可能性) 患者3/3名から <i>E. coli</i> O6 検出 (病原因子遺伝子は検査未実施)
88	29	+	+	+				高知県事例
90, 91 ⁷⁾	33	+	+	37.5-39	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	患者1/10名から <i>C. jejuni</i> を同時検出 調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:1/2
92	5.5-101	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	患者3/11名から <i>S. aureus</i> を同時検出
93	33-36	+	+	+	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	奈良市患者より <i>Norovirus</i> (GI/GII)検出 調理人 <i>Norovirus</i> :0/3
94	28-54	+	+	38.8	+	+		
95	66-125.5	+	+		+		悪寒、倦怠感	
96	41-91	+	+	39-39.5	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	
97	15.5-76.5	+	+	37.2-38.5	+	+		調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:1/4 患者5名と調理人1名の遺伝子型一致 (GII.6)
98	—	+	+	+		+	寒気、頭痛	東大阪市事例
99	—	+	+	+	+	+		東京都事例
100	2-59	+	+	37-39	+	+	頭痛、関節痛	神戸市事例
101	11.5-53.5	+	+	37-39.4	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	調理人 <i>Norovirus</i> :0/4
102	17-51	+	+	+	+	+		
104	23.5-41.5	+	+	37.5-38	+	+	悪寒、倦怠感、頭痛	調理人 <i>Norovirus</i> (GII)検出:1/3
105	54-69	+	+	+	+		悪寒、倦怠感、頭痛	
106		+		+		+		奈良県事例

4) ウイルスの検出

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

5) クドア・セプテンブククターの検出

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

III 結果と考察

1) 食中毒事件数の内訳

2016 年に食中毒、有症苦情などで当研究所に検体が搬入された事件は合計 106 件であった。検査数は、患者および調理人の便および吐物 507 検体、食品、ふき取りなどが 71 検体で、計 578 検体あった。106 件中 81 件(76.4%)から下痢原性微生物が検出された(表 1)。

2) 検出病原体

下痢原性微生物が検出された 81 件の内訳は、ノロウイルスが検出されたものが 38 件、カンピロバクター 36 件(うち、ノロウイルス、サルモネラのいずれかが同時に検出された事例が 2 件)、腸管出血性大腸菌 O157 2 件、サルモネラ 2 件、ウェルシュ菌 1 件、黄色ブドウ球菌 1 件、ウェルシュ菌と黄色ブドウ球菌が同時に検出された事例が 1 件であった。

2005 年以降、検出される下痢原性微生物としては、ノロウイルスおよびカンピロバクターが最も多くなっており、2016 年は 81 件のうちこれらの合計で 74 件(91.4%)となり、2015 年の 91 件中 78 件(85.7%)を上回った。カンピロバクターは 36 件から検出され、2015 年の 34 件より若干増加した。36 件のうち、*C. jejuni* のみが検出される事例が多く、32 件(うち 2 件はそれぞれノロウイルス、サルモネラとの同時検出事例)、*C. jejuni* と *C. coli* が両方検出される事例が 3 件、*C. coli* のみ検出が 1 件であった。ノロウイルスは 2015 年の 44 件から若干減少したものの 38 件において検出され、本調査において検出される下痢原性微生物として最も多い傾向は 2001 年以降依然として変わっていない。遺伝子型は Genogroup II(GII)が主流であり、GII のみが 35 件(うち 1 件はカンピロバクターと同時検出事例)、GII と Genogroup I(GI)との同時検出が 2 件、GI のみ検出が 2 件あった。

IV まとめ

2016 年に食中毒、有症苦情などで当研究所に検体が搬入された 106 件(578 検体)について下痢原性微生物の検出を行った。その結果、全国的な傾向と同様、ノ

ロウイルスとカンピロバクターの検出が多かった。大阪市内においては、カンピロバクター検出事例数の増加傾向が認められることから、これらを原因とする食中毒を予防するための対策が望まれる。

謝辞 本調査にあたり疫学情報の収集にご協力いただきました大阪市健康局生活衛生課の方々、大阪市保健所食品衛生監視員の方々、大阪市保健所感染症対策課の方々および甚大なるご協力をいただきました大阪市立環境科学研究所調査研究課企画グループの方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) 大阪市健康局. 平成 28 年大阪市食品衛生監視指導計画の実施結果概要.
- 2) 大阪府. 感染症発生動向調査事業報告書 第 35 報 (平成 28 年版)2017
- 3) 中村寛海、後藤 薫、山本香織、入谷展弘、阿部仁一郎、他. 2015 年に大阪市内の食中毒原因調査において検出された下痢原性微生物. 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 2016; **78**: 13-20.
- 4) 中村寛海、勢戸祥介、長谷 篤、西川禎一、北瀬照代、他. 1998 年に大阪市内の食中毒原因調査において明らかにされた下痢原性微生物. 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 1999; **61**: 51-57.
- 5) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, S.B., et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; **41**: 1548-1557.
- 6) 入谷展弘、勢戸祥介、春木孝祐、西尾 治、久保英幸、村上 司、他. リアルタイム PCR 法を用いた Norwalk virus 検出法の評価. 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 2002; **64**: 6-10.
- 7) Oka, T., Katayama, K., Hansman, H. S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F.T., et al. Detection of human Sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 2006; **78**: 1347-1353.
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知. 食安監発 0711 第 1 号. *Kudoa septempunctata* の検査法について(暫定版). 2011

学 位 论 文 概 要

学位論文概要

ダイオキシン類を中心とする残留性有機汚染物質 (POPs) の
環境動態と発生源の解析に関する環境化学的研究

先山孝則

Environmental chemistry study on environmental dynamics and source analysis
of persistent organic pollutants (POPs) including dioxins

Takanori SAKIYAMA

I 緒言

今日の我々の便利な生活は、高度に発達した科学技術や産業体系により生産される数多くの化学物質に支えられている。しかし、このような近代以降の急激な工業化は、大量消費・大量廃棄の社会システムを生み出し、自然環境の破壊や化学物質によるヒトの健康や生態系に対する悪影響といった深刻な環境問題を引き起こしてきた。

このような背景の中、筆者は、産業活動が活発で人口密度が極めて高い大阪市などの都市域を中心に、ダイオキシン類をはじめとする POPs に関する様々な環境調査を行政施策の一環として行ってきた。そこで本論文では、これまでの都市域でのダイオキシン類調査で得られた結果から汚染実態や環境動態を解析するとともに、発生源解析による汚染要因の推定など、これまでの行政施策に活用されてきた知見や手法を整理し、新たな問題が発生した場合に迅速な対策に活用できるよう環境化学的な観点から研究成果をまとめた。また、POPs の環境中での変成やダイオキシン類の新たな発生源の可能性、新規 POPs 候補物質の汚染実態など、潜在的な化学物質問題に備えた研究成果についてもまとめた。

II 大阪市におけるダイオキシン類の
汚染実態把握に関する研究

筆者らが実施した大阪市の行政調査の結果を活用し、不明点が多かった都市域におけるダイオキシン類汚染の実態とその特徴について解析した。

大阪市では、ダイオキシン類汚染が大きな社会問題として注目され始めた 1990 年代後半から、市内の汚染実態把握のための調査を開始した。またその後、ダイオキシン類対策特別措置法による常時監視調査を実施し、詳細な汚染の実態や経時変化を明らかにしてきた。

まず、土壌環境調査により、土壌中のダイオキシン類の地理的濃度分布は、発生源の位置や土地利用状況とは関係なく、その成分組成から燃烧系発生源と PCB 製

剤からの影響を広く受けていることなどが明らかとなった。そして、水環境調査により、水質中のダイオキシン類濃度が河川上流部で高く、下流ほど濃度が低くなる分布傾向を示すことが分かった。一方、底質濃度は、汽水域で高く、河川上流部や河川河口・港湾域では低い傾向があった(図 1)。このことから、大阪市域の水環境中のダイオキシン類は河川水を介して流下し、汽水域で塩素イ

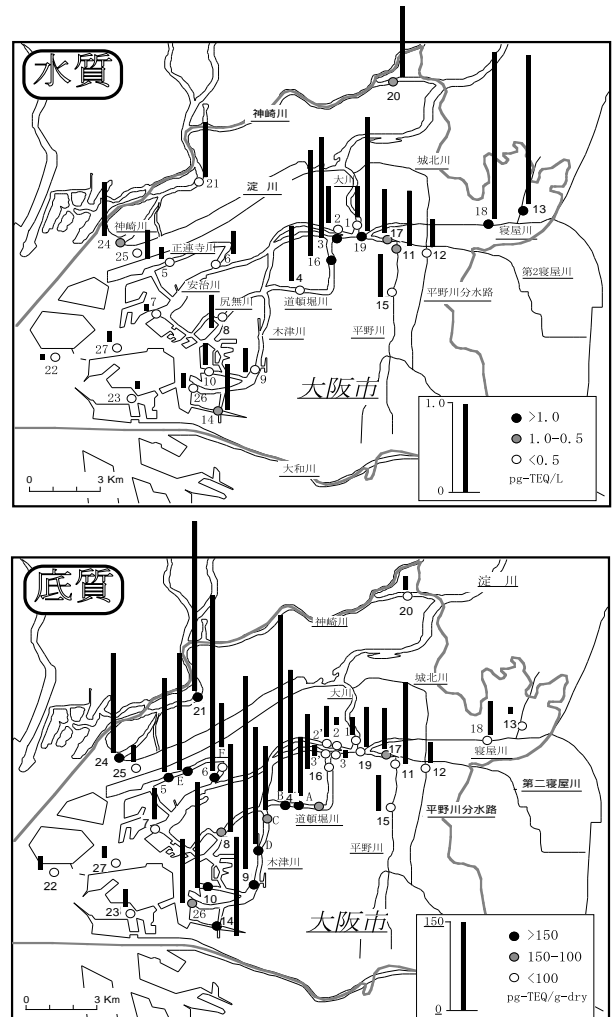


図 1. 大阪市内の水質および底質中ダイオキシン類の濃度分布 (2000-2002 年度調査の平均濃度)

オン濃度上昇により懸濁物に吸着する割合が増加するとともに、流速低下により底質に沈降することで水質濃度が低下すると考えられた。一方底質では、ダイオキシン類が吸着した懸濁物が堆積するため、汽水域において濃度が上昇すると推察された。

さらに、これまでの常時監視調査地点における水環境モニタリング調査の結果から、大阪市域のダイオキシン類濃度は2000年から2011年にかけて概ね減少傾向にあり、発生源対策の効果が現れつつあることが確認された。

III ダイオキシン類の環境動態に関する研究

大阪市やその周辺で実施した広域的な大気および水域のモニタリング調査の結果に基づき、ダイオキシン類の環境動態について詳細に解析・考察した。

大阪市内で実施した植物を指標とした大気モニタリング調査では、植物が長期的な大気汚染レベルの変化を把握するのに有効な媒体であるとともに、大気中のガス態のダイオキシン類を蓄積していることが明らかとなった。

そして、大阪湾から太平洋に至る海域の調査から、水質と底質のダイオキシン類濃度は、外洋に至る過程とともに減少する傾向があり、特に底質は大阪湾の湾奥から東部で濃度が高くなる分布を示すことが分かった。また、大阪湾中央部で大量の水質試料を採取し、溶存態と懸

濁態のダイオキシン類に分けて分析した結果、毒性当量(TEQ)ベースで80%が懸濁態に存在していることが明らかとなった。したがって、陸域からの流入したダイオキシン類は、粒子とともに沿岸部近くで沈降する傾向が強く、湾外へは拡散しにくいことが推察された。

さらに底質に移行・残留したダイオキシン類が、底層食物連鎖を通して生物に蓄積される過程について、石川県七尾湾をモデル水域として調査し、その生物濃縮性を評価した。この調査では、水生生物の胃内容物や体内の窒素同位体比(^{15}N)を用いて各生物の栄養段階を推定するとともに、それら生物種に蓄積しているダイオキシン類の濃度との相関を解析した。その結果、底層食物連鎖においては、ほとんどのダイオキシン類異性体が濃縮されず、コプラナーPCBs(Co-PCBs)のみが濃縮されることが判明した(図2)。したがって、底質から水生生物へのダイオキシン類の移行は限定的であり、水域へのダイオキシン類負荷の低減が魚介類汚染の防止と改善につながることを示唆された。

IV ダイオキシン類の発生源解析手法の確立と測定データの精度管理に関する研究

ダイオキシン類の異性体組成情報を活用した発生源解析や測定データの精度管理に関する応用研究にも取り組んだ。

まず、主なダイオキシン類発生源の一つとして知られる水田除草剤クロルニトロフェン(CNP)中の詳細なダイオキシン類異性体組成を調査した。未開封製品を分析した結果、原料に由来する83種のダイオキシン類異性体が確認されたが、最も毒性の強い2,3,7,8-TeCDDは検出されなかった。また、濃度や成分組成は製品製造年代で変化し、原料純度向上と製造工程改良など努力が窺えた。

次に、大阪市内の常時監視調査において、水質でダイオキシン類濃度が高い傾向にあった市内河川上流域で詳細調査を行い、濃度分布や成分組成から汚染要因の推定を行った。その結果、成分組成を用いたクラスター分析により、高い水質濃度と周辺底質の関連性が明らかとなり、汚染箇所の絞り込みのための情報を得ることができた。さらに発生源の異性体組成情報に基づき、ケミカルマスバランス法を用いて各地点の水質・底質に対する汚染要因(廃棄物焼却炉、製造炉、農薬、PCB製剤)の寄与率を解析した結果、高濃度水域では廃棄物焼却炉の寄与率が大きく、低濃度水域では農薬の寄与率が大きいことが明らかとなった(図3)。

そして、これらの発生源解析や環境調査で集積したダイオキシン類の成分組成情報に関する知見を活用し、新たな環境測定データの精度管理手法を考案した。本手法は国土交通省の精度管理マニュアルに採用された。

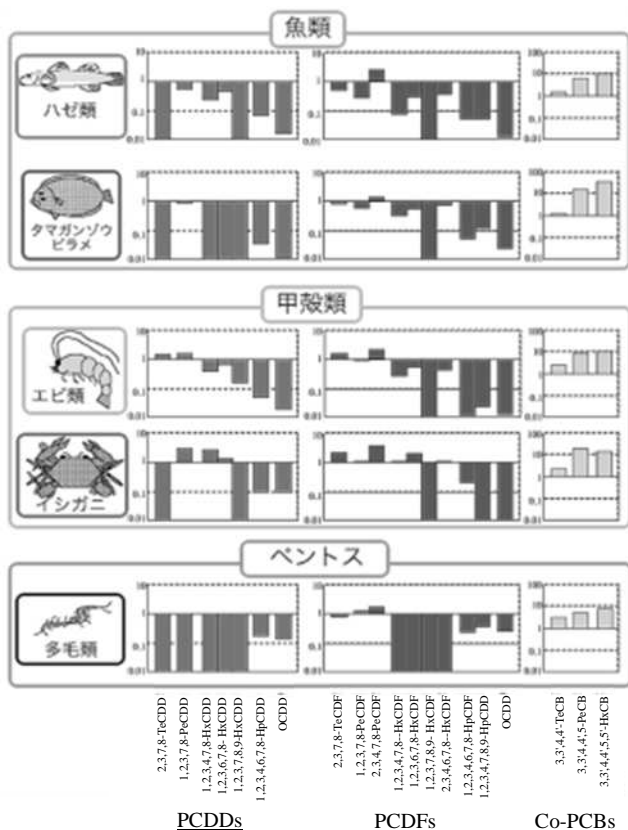


図2. 主な生物種におけるダイオキシン類異性体別の底質に対する濃縮率(倍)

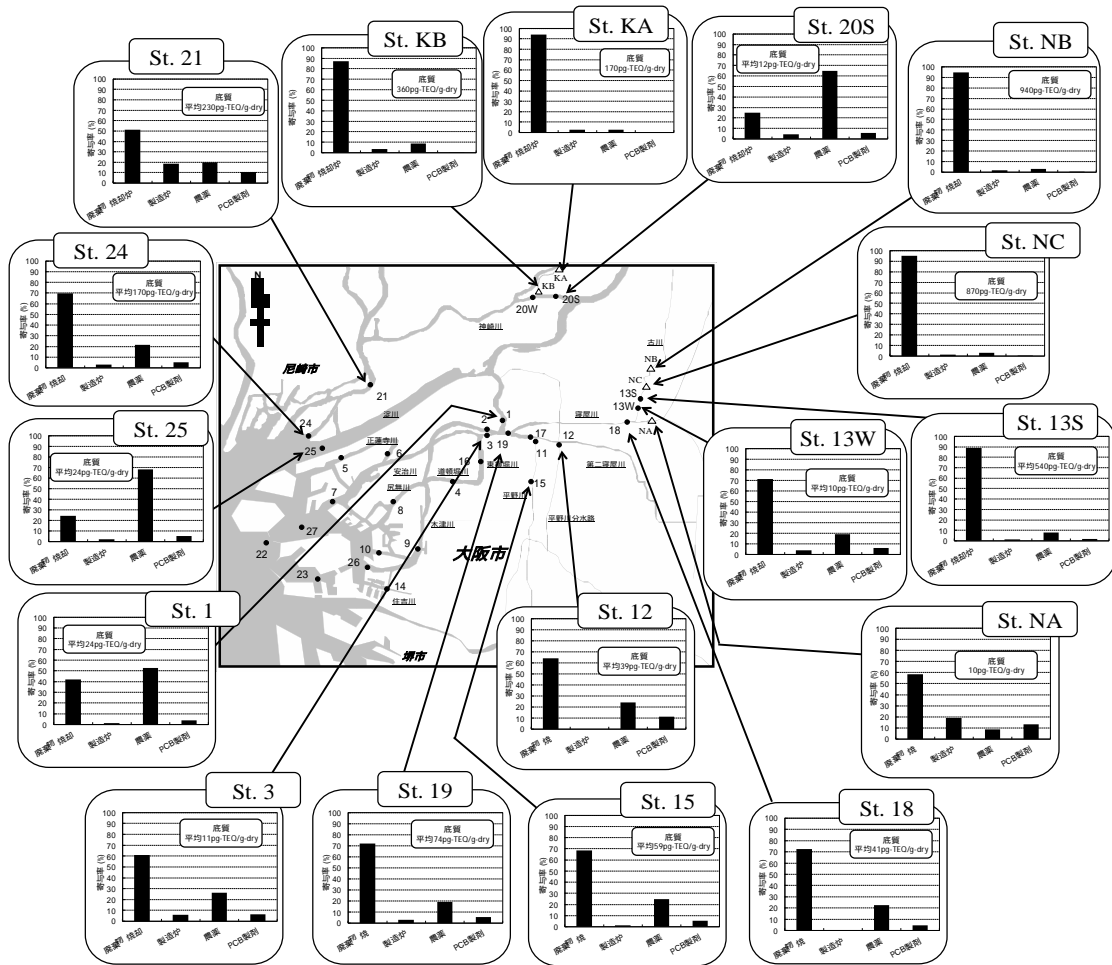


図 3. 大阪市内河川流域のダイオキシン類(TEQ)への発生源寄与率(底質)

V 環境中での POPs の変成と新規 POPs 候補物質の環境動態に関する研究

将来問題となり得る潜在的な化学物質汚染を明らかにするための調査研究を実施した。

まず、環境中での PCB の変成について着目し、甲状腺ホルモンかく乱性が指摘される水酸化 PCB(OH-PCB) について、大阪市域の底質と水生生物で調査した。その結果、試料から OH-PCB と考えられる多くのピークが検出された。全てのピークを同定することはできなかったが、フラグメントイオンから環境中の OH-PCB の多くは 3 位または 4 位に OH 基を持つ成分であると推定された。また、底質から検出された OH-PCB 濃度は、平均 24ng/g-dry で、PCB 濃度の平均 5.2% に相当した。また、OH-PCB の同族体は、低塩化物の比率がやや高いものの、PCB とよく似た組成を示し、環境中での PCB の変成には微生物の関与が推察された。

次に、ダイオキシン類の前駆物質と類似した化学構造を持つ有機リン系殺虫剤クロルピリホスの熱分解生成を GC/MS を用いて調査した。その結果、2,3,7,8-TeCDD 類似物質の生成が示唆され、DR-CALUX 法による毒性評価でその生成物がダイオキシン様の毒性を有すること

が示された。よって、クロルピリホス含有廃棄物の処理時にリスクが増加する可能性が危惧された。

さらに、新規 POPs 候補とみられる塩素系難燃剤 Dechlorane Plus(DP)について、高分解能 GC/MS を用いて DP を他の有機塩素系 POPs と同時に測定する方法を確立し、関西地域の環境調査を実施した。その結果、底質・土壌・ダスト・植物などの環境媒体から広く DP が検出され、その汚染実態が日本で初めて確認された。

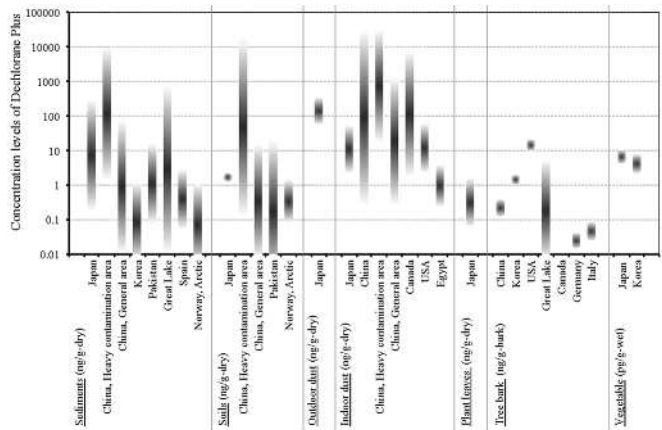


図 4. 様々な環境媒体中の DP 濃度の比較

本調査で検出された底質中の DP 濃度は、世界中の他地域と比べて高く、その他の媒体では同程度であった(図 4)。また、屋内ダストに比べて屋外試料で DP 濃度が高いことから、国内の DP 汚染源は屋外に存在すると予想された。

VI 総括

本論文でまとめたダイオキシン類に関する研究成果は、行政による環境対策に活用され、住民の健康リスク低減に貢献してきた。また、学術的にもこれまで情報が欠落していたダイオキシン類の環境動態や汚染要因の詳細を明らかにするなど新規性の高い成果をあげることができた。そして、筆者らが確立したデータ精度管理や発生源解析に関する手法は、ダイオキシン類の測定や起源推定に関する有用なツールとして実際の行政・研究機関において活用されており、関連業界においてもその成果は高く評価されている。さらに、環境中での変成による POPs のリスク増加や新たな POPs による汚染拡大など、潜在的な化学物質による環境汚染の進行を指摘した点も、今後の環境化学の発展に寄与する先駆的な成果といえる。

謝辞 本論文を作成するにあたり、終始ご丁寧なご指導とご助言を賜りました愛媛大学大学院 連合農学研究科 環境計測学研究室の高橋 真 准教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、愛媛大学農学部に在籍中から今日まで、きめ細かな研究指導を施して頂きつつ、この分野の研究の魅力と必要性を説いて導いて頂いた元愛媛大学農学部の立川 涼 教授、脇本忠明 教授、松田宗明 助手に心より感謝いたします。

そして、大阪市に奉職後、様々な研究の機会を与えて頂いた元大阪市立環境科学研究所の福嶋 実 博士(現 相愛大学非常勤講師)をはじめとする職員の皆さま、ならびに関西を中心に地域に密着した環境化学研究の道を切り開かれてきた経験に基づき、適確なアドバイスや協力を惜しみなく頂いた元兵庫県環境研究センターの中野 武 博士(現 大阪大学招聘教授)と元大阪府環境情報センターの奥村為男 博士には、改めて深く感謝いたします。さらに様々な形でご支援とご協力を頂いた大阪市をはじめとする国や地方の行政機関の方々、またこれまでの共同研究を通じてたいへん有意義な経験をさせていただいた各研究機関の関係者の皆さまに対しましては、ここで改めて厚く御礼申し上げます。

付記 本稿は、著者が愛媛大学において平成 29 年 2 月 21 日に博士(農学)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。

参考文献

- 1) 先山孝則, 福嶋 実. 水圏環境におけるダイオキシン類の汚染実態と挙動解明に関する研究. 大阪市立環科研報告 1998; **60**: 83-88.
- 2) Takanori Sakiyama, Minoru Fukushima, Takeshi Nakano. Isomerspecific Analysis of Diphenyl Ether Herbicide (CNP) for Mono- to Octa-CDD/F at Subppb Levels. *Organohalogen Compounds* 2001; **50**: 103-107.
- 3) 先山孝則, 角谷直哉, 山本敦史, 山本耕司, 森 義明, 福山丈二. 大阪市域の水環境中ダイオキシン類の特徴について. 大阪市立環科研報告 2005; **67**: 37-46.
- 4) 先山孝則. 水環境調査におけるダイオキシン類分析上の留意点. 水環境学会誌 2006; **29**(5): 243-248.
- 5) Sakiyama T, Yamamoto A, Kakutani N, Fukuyama J, Okumura T. Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the Aquatic Environment: Levels and Congener Profiles in Sediments from Osaka, Japan. *Organohalogen Compounds* 2007; **69**: 1380-1383.
- 6) 先山孝則, 中野 武. 高分解能 GC/MS 法を用いる環境中の塩素系難燃剤 Dechlorane Plus の分析. 分析化学. 2012; **61** (9): 745-754.
- 7) Sakiyama T, Weber R, Behnisch P, Nakano T. FORMATION OF THE PYRIDINE ANALOGUE OF 2,3,7,8-TCDD BY THERMAL TREATMENT OF CHLORPYRIFOS, CHLORPYRIFOS-METHYL AND THEIR MAJOR DEGRADATION PRODUCT 3,5,6-TRICHLORO-2-PYRIDINOL. *Organohalogen Compounds* 2012; **74**: 1441-1444.
- 8) Takanori Sakiyama, Yoshinori Fujimine, Takeshi Nakano. ENVIRONMENTAL LEVELS OF DECHLORANE PLUS IN JAPAN :HOW TO CONTROL THE ACCURACY OF ANALYSIS. *Organohalogen Compounds* 2012; **74**: 146-149.
- 9) 森脇 洋, 先山孝則, 矢本善也, Roland WEBER, Peter BEHNISCH, 荒川隆一, 中野 武. クロルピリホス熱反応生成物の LC/MS 及び GC/MS による分析. 分析化学 2013; **62**(10): 855-863.
- 10) 先山孝則, 中野 武. 我が国の塩素系難燃剤 Dechlorane Plus による汚染レベルについて. 環境化学 2016; **26**(2): 77-88.
- 11) 愛媛大学アーカイブ博士学位論文, https://www.ehime-u.ac.jp/data_paper/data_paper-53083/ (2017 年 6 月 1 日確認)

他紙発表及び学会発表要旨

報 文

- 1) Epidemics of GI.2 sapovirus in gastroenteritis outbreaks, during the 2012-2013 season in Osaka City, Japan

Nobuhiro Iritani, Seiji P. Yamamoto, Niichiro Abe, Hideyuki Kubo, (Tomoichiro Oka), Atsushi Kaida
Journal of Medical Virology 2016; **88**: 1187-1193.

2005年1月から2014年8月の期間に集団胃腸炎510事例中30事例からサポウイルスが検出された。サポウイルス胃腸炎事例が最も多発したのは2012-2013シーズンであり、主にGI.2型であることが明らかとなった。2012-2013シーズンに流行した株は同一または非常に近縁であり、全Capsid領域の遺伝子解析から2008年頃の株に由来していることが示唆された。

- 2) Stem-galling moths provide cetonine beetles with feeding sites via sap exudation of invasive alien plants

Kazuo Yamazaki, (Shinji Sugiura)

Entomological Science 2016; **19**: 142-146.

大阪市大和川でオオブタクサ(外来種)に形成されたスギヒメハマキ(外来種)の虫えいから、シラホシハナムグリ(在来種)が吸汁する行動を記録した。この行動は高温期に限られており、水分とミネラルの補給のためと考えられた。外来種間の相互作用が在来種に摂餌場所を提供した例である。

- 3) 大阪港湾部におけるアカハネオンブバツタの侵入時期について

山崎一夫, (高倉耕一, 今井長兵衛)

環動昆 2016; **27**: 17-20.

アカハネオンブバツタは2012年頃から大阪を中心に発見されるようになった外来種である。北港処分地における長年の調査から、本種の侵入が2008年にさかのぼること、近縁種のオンブバツタがほとんどいない環境で個体数を増加させていることを報告した。

- 4) Population dynamics, seasonality and aphid prey of *Cheilomenes sexmaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) in an urban park in central Japan

(Yasuko Kawakami), Kazuo Yamazaki, (Kazunori Ohashi)

European Journal of Entomology 2016; **113**: 192-199.

ダンダラテントウは過去100年間の気候温暖化により日本列島を北上した昆虫である。本種の個体群動態、季節活動、食物を長居公園での長期調査により明らかにした。植え込みなどに発生するアブラムシを摂食して年2~3化し、夏と冬は活動を休止していた。本調査から、本種が大阪の都市公園に定着して発生していることが示された。

- 5) Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from a hunting dog and its diphtheria toxin antibody titer

(Chihiro Katsukawa, Takako Komiya), Kaoru Umeda,

(Minami Goto, Tokuma Yanai, Motohide Takahashi, Akihiko Yamamoto, Masaaki Iwaki)

Microbiology and Immunology 2016; **60**(3): 177-186.

ジフテリア毒素産生性のコリネバクテリウム・ウルセランス(*C. ulcerans*)は、イヌ・ネコからヒトに感染し、ジフテリア様の症状を引き起こす動物由来感染症である。国内各地の猟犬の*C. ulcerans*保有状況を調査した結果、1頭から*C. ulcerans*を分離した。遺伝学的解析から、猟犬からの分離菌は国内の伴侶動物、ヒト患者から分離された*C. ulcerans*とは遺伝学的に一致せず、野生動物から分離された*C. ulcerans*と近縁であることが示唆された。

- 6) Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from a wild bird (ural owl) and its feed shrew-moles): comparison of molecular types with human isolates (Chihiro Katsukawa), Kaoru Umeda, (Ikuko Inamori, Yuka Kosono, Tomokazu Tanigawa, Takako Komiya, Masaaki Iwaki, Akihiko Yamamoto, Susumu Nakatsu)
BMC Research Notes 2016; **9**: 181.

ジフテリア毒素産生性のコリネバクテリウム・ウルセランス(*C. ulcerans*)は、イヌ・ネコからヒトに感染し、ジフテリア様の症状を引き起こす動物由来感染症である。*C. ulcerans*の野生動物(鳥類、ネズミ類)における分布状況を調査した。フクロウの咽頭ぬぐい液および、そのエサとなっているネズミ2匹から*C. ulcerans*を分離した。分離菌の遺伝子解析から、これらの菌株は極めて近縁であり、野生動物間で*C. ulcerans*が循環していることが示唆された。

- 7) Norovirus epidemics caused by new GI.2 chimera viruses in 2012-2014 in Japan

(Kazushi Motomura, Michitra Boonchan, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda), Nobuhiro Iritani (in the Norovirus Surveillance Group of Japan)

Infection Genetics and Evolution 2016; **42**: 49-52.

2012年5月から2014年3月の期間に検出された新しいノロウイルスGI.2変異株はGI.15とGI.2のリコンビナントであった。これは、構造タンパクと非構造タンパクの交換が一般的に起こり、新しい変異株が誕生していることを示唆している。

- 8) 食品あるいはその製造環境から分離されたグラム陰性桿菌の薬剤耐性状況

中村寛海, (安福 潔), 平山照雄, 平井有紀, (藤原佐美), 西尾孝之

日本食品微生物学会雑誌 2016; **33**(2): 61-68.

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)が欧米で拡散し、問題となっている。CREの中には食品の大腸菌群検査で検出される*Klebsiella*属、*Citrobacter*属、*Enterobacter*属等の細菌が含まれる。我々は、大阪市内の食品あるいはその製造施設から分離されたグラム陰性桿菌114株のカルバペネム耐性について調べた。その結果、1株(*Pseudomonas fluorescens*)のみがメロペネム耐性で、その他113株は本剤に感受性であり、カルバペネム-ゼ産生菌の出現頻度は低いと考えられた。6株がAmpC型β-ラクタマーゼ産生菌と考えられたが、いず

れもプラスミドとして獲得したものでなく、染色体性のβ-ラクタマーゼであると考えられた。*Rahnella aquatilis*の2株はいずれもCTX-M型の基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌であり、染色体性のRAHN-2遺伝子を保有していると考えられた。

9) 集団胃腸炎事例からのノロウイルスGII.P16-GII.4 Sydney_2012の検出—大阪市

入谷展弘, 上林大起, 改田厚, 阿部仁一郎, 中村寛海, 山元誠司, 久保英幸, 小笠原 準, (伯井紀隆, 森宏美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚, 土見日出夫, 喜多直哉, 伊藤大樹, 野田 衛)
病原微生物検出情報 2016; 37: 136-138.

2015-2016シーズンに大阪市内で発生した集団胃腸炎2事例から、これまで報告のないIRdRp領域の遺伝子型 (GII.P16) を持つノロウイルス (NoV) GII.4 Sydney_2012を検出した。両事例株の塩基配列を比較したところ、互いに非常に近縁であった。NoV事例の発生状況と検出されたNoVの遺伝子解析結果から、本キメラウイルスは子どもから成人までの幅広い年齢層に感染を起しているが、今のところ検出数は少ない状況であると考えられた。GII.4亜型の主流であるSydney_2012は出現から約4年が経過しており、新たな亜型の出現が危惧されている。今回認められたキメラウイルスもNoV GII.4の変化の一つであり、本株を含めてGII.4亜型の変化や動向を注意深く監視していく必要がある。

10) G2型のA群ロタウイルスによる感染性胃腸炎集団事例, 2016年—大阪市

山元誠司, 上林大起, 改田厚, 久保英幸, 入谷展弘, 小笠原準, (伯井紀隆, 森 宏美, 藤森良子, 澤野芳範, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚)
病原微生物検出情報 2016; 37: 139-140.

ロタウイルスA (RVA) は乳幼児の急性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、日本で検出されるRVAのVP7遺伝子型 (G型) はG1, G2, G3, G9が大部分を占めている。日本におけるG2型の検出例は少ないが、15歳以上の割合が多く、他の型とは異なる分布を示すことがわかっていて、2016年春季の大阪市では全年齢層でRVA胃腸炎集団事例が発生し、すべてG2型であった。また、集団事例だけでなく小児散発例においてもG2型の検出が最多であった。したがって、大阪市においてG2型による集団事例が全年齢層で続発したのは、G2型が比較的高い年齢層にも胃腸炎症状を惹起し得るという性質に加え、RVA流行のベースとなる乳幼児でG2型が優占することにより、他の年齢層のG2型への暴露機会が例年と比べて増加したことが要因の一つとして考えられた。

11) Caterpillar mimicry by plant galls as a visual defense against herbivores

Kazuo Yamazaki

Journal of Theoretical Biology 2016; 404: 10-14.

野外調査と文献調査によりチョウ目幼虫に外観が類似した虫えいを12種報告した。これらは幼虫に擬態する

ことにより、虫えいやその周囲の植物組織を他の植食者に食べられることを回避して適応度を高めている可能性があることを理論的に示した。

12) Comparison by multilocus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from food samples and human and animal faecal specimens

(Lili Wang), Hiromi Nakamura, (Eriko Kage-Nakadai, Yukiko Hara-Kudo, Yoshikazu Nishikawa)

Journal of Applied Microbiology 2017; 122: 268-278.

ヒトに下痢原性のある非典型的な腸管病原性大腸菌 (atypical enteropathogenic *Escherichia coli*; aEPEC) と家畜や健康なヒトから分離されるaEPEC菌株についてMLVA法による型別と薬剤感受性試験を行い、菌株の関連性について調べた。その結果、食品、家畜の糞便、ヒト由来aEPEC菌株142株は4つのクラスターからなる26のMLVAタイプを示した。薬剤感受性試験の結果、3剤以上に耐性を示したのは10株 (7 %) のみであった。ブタおよび食品由来株はヒトやウシ由来株よりも多様な薬剤耐性パターンを示した。養豚場はウシ農場よりも薬剤耐性菌の発生源となっている可能性が考えられた。4クラスター中1クラスターは、ヒト下痢症由来株とウシ由来株で構成されるものがあり、ヒトの保菌者由来株やその他の由来株とは異なっていた。以上より、ウシはヒトのaEPEC感染症のリザーバーとなっている可能性がある。

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

(Masumi Taguchi, Masaki Kanki, Yuko Yamaguchi, Hideichi Inamura, Yosuke Koganei, Tetsuya Sano), Hiromi Nakamura, (Hiroshi Asakura).

Journal of Food Protection 2017; 80(3): 467-475.

白菜の浅漬けによる腸管出血性大腸菌 (STEC) O157 集団食中毒事例に代表されるように、近年、非動物性の加工食品による健康被害事例が増加している。そこで我々は、55の製造施設で製造された浅漬け100検体について、STEC、*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* (LM) の汚染状況を調べた。その結果、STECおよび *Salmonella* sp. は検出されなかったが、5つの製造施設で製造された12検体の浅漬けからLMが検出された。これらのうちの2施設についてLM汚染調査を実施した結果、いずれの施設においても冷蔵室および包装室周辺からLMが検出され、各施設において分離されたLMの遺伝子型は製品由来LMの遺伝子型と一致していた。浅漬け製造において、冷蔵室および包装室の衛生管理を徹底することが製品汚染を防ぐために重要であると考えられる。

14) Scavenging behavior in leaf-feeding caterpillars (Shinji Sugiura), Kazuo Yamazaki

Journal of the Lepidopterists' Society 2017; 71(1): 59-61.

通常葉を摂食するチョウ目幼虫が、大発生時に他のチョウ目幼虫の死体を摂食することを報告した。幼虫に

とってタンパク質の補給の意義がある一方で、ウイルス病などに感染するリスクが考えられた。

15) Contents of Ag and other metals in food-contact plastics with nanosilver or Ag ion and their migration into food simulants

Asako Ozaki, Eri Kishi, Tomoko Ooshima, Atsushi Hase, (Yoko Kawamura)

Food Additives and Contaminants: Part A. 2016; **33**: 1490-1498.

大阪市内に流通するナノ銀抗菌剤使用表示のある合成樹脂製器具6試料と一般的な銀抗菌剤使用表示のある5試料の計11試料について、銀、亜鉛、ヒ素、鉛、カドミウムの材質含有量及びそれらの食品擬似溶媒への溶出量を調査した。全てのナノ銀抗菌剤製品から銀及び亜鉛が検出され、材質含有量はそれぞれ21~200 µg/g及び8.4~140 µg/gであった。一方、ヒ素、鉛、カドミウムは全試料において検出されなかった。食品擬似溶媒を用いた溶出試験では、銀及び亜鉛は4%酢酸への溶出量が最も高かったが、水や20%エタノールにも溶出がみられた。ナノ銀抗菌剤製品と銀抗菌剤製品の銀及び亜鉛の材質含有量ならびに食品擬似溶媒への溶出量及び溶出率を比較したところ、両者に大きな差は見られなかった。限外ろ過法によりナノ銀抗菌剤製品から溶出した銀の形態を検討した結果、4%酢酸に溶出した銀はイオン化していたが、水及び20%エタノールに溶出した銀はナノ粒子として存在していると考えられた。

16) キタマクラ (*Canthigaster rivulata*) 中のテトロドトキシン (TTX), および麻痺性貝毒 (PSTs) 成分の含有量と組成について

仲谷 正, (清水 充), 山野哲夫

食品衛生学雑誌 2016; **57**(2): 51-56.

和歌山県紀州灘沿岸部で採取されたキタマクラ2試料を皮、筋肉、内臓に分割し、各組織におけるテトロドトキシン (TTX), および麻痺性貝毒 (PSTs) 成分の含有量について調査した。TTXおよびPSTsの成分が、定量限界以上で検出された部位は、皮膚のみであり、筋肉と内臓部では、検出限界未満 (ND) または検出限界以上定量限界未満 (tr) であった。定量限界以上で検出されたPSTsの成分は、サキシトキシン, およびデカルボモイルサキシトキシンの2成分のみであった。両試料における皮中TTXの毒力は51, および59 MU/gで、PSTsの毒力は1.0, および2.8 MU/gであった。また全毒成分に対するTTXおよびPSTsのモル比 (mol%) は、TTXで98.2および96.0%あり、PSTs全成分で1.8, および4.0 mol%であった。キタマクラの毒の主成分は、TTXであるが、微量のPSTも含有していることが、今回の調査結果より判った。

17) ICP-MSによる食品中のミネラルおよび有害元素の一斉分析法の検討および妥当性評価

油谷藍子, 岸 映里, 尾崎麻子, 新矢将尚, 大嶋智子, 山野哲夫

食品衛生学雑誌 2016; **57**(2): 57-62.

ICP-MSを用いた食品中のミネラルおよび有害元素の

一斉分析法を検討した。試料溶液の調製にはマイクロウェーブを用いた。測定条件、内標準元素を測定対象元素ごとに検討したのち、「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に従い妥当性評価を行った。その結果、使用した3種の標準試料、「日本の食事」(国立環境研究所CRM No.27)、「玄米粉末」(国立環境研究所 CRM No.10-b)および「粉ミルク」(NIST SRM 1849 Infant/Adult Nutritional Formula)に含まれる18元素 (Na, Mg, P, Ca, K, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, SnおよびPb)について、玄米粉末中のNaを除く全ての元素で真度、併行精度および室内再現精度の性能パラメータが目標値を満たしていた。

18) LC-MS/MSを用いた野菜および果実中の残留農薬迅速一斉分析法の妥当性確認

(佐藤 環), 宮本伊織, 上村聖子, 仲谷 正, 角谷直哉, 山野哲夫

食品衛生学雑誌 2016; **57**(4): 107-115.

QuEChERS法と固相抽出法を組み合わせたSTQ法により、LC-MS/MSを用いた野菜および果実中の残留農薬迅速一斉分析法の妥当性確認を行った。厚生労働省通知の妥当性評価ガイドラインに従い、14種類の野菜および果実を対象として、一律基準濃度における残留農薬130成分の一斉分析法の妥当性確認を実施した。その結果、75~120成分の農薬がガイドラインの目標値 (真度:70~120%, 併行精度:25%未満, 室内精度:30%未満) を満たした。以上のことから、本試験法は残留農薬の迅速一斉分析法として有用であると考えられた。

19) HPLCによる乳幼児用粘土から溶出する着色料の分析

岸 映里, 尾崎麻子, 大嶋智子, 山野哲夫

食品衛生学雑誌 2016; **57**(5): 139-149.

代表的な乳幼児用玩具の1つである粘土を対象にHPLCを用いた着色料の試験法を確立し、実態調査を行った。試料は小麦粘土10品目、米粘土2品目、とうもろこし粘土2品目、紙粘土3品目および樹脂粘土3品目の計20品目とし、HPLCでは許可着色料12種類および指定外着色料25種類を測定した。その結果、6歳未満の乳幼児を対象とした粘土15品目のうち、小麦、米およびとうもろこし粘土 (計13品目) は食品衛生法に適合していることが確認されたが、紙粘土 (2品目) からは指定外着色料の溶出が認められた。また、食品衛生法規制対象外である対象年齢6歳以上の紙粘土や手芸用材料である樹脂粘土でも同様に測定対象外の着色料の溶出が示唆され、印刷インキやプラスチックなどに用いられる顔料が使用されていることが推測された。

20) ポリスチレン製器具・容器包装における揮発性物質試験の試験室間共同試験

(菌部博則, 六鹿元雄, 阿部 孝, 阿部智之, 阿部 裕, 大坂郁恵, 大野春香, 大野浩之, 大野雄一郎, 大畑昌輝), 尾崎麻子, (柿原芳輝, 小林 尚, 柴田 博, 関戸

晴子, 高坂典子, 竹中 佑, 但馬吉保, 田中 葵, 外岡大幸, 中西 徹, 野村千枝, 羽石奈穂子, 早川雅人, 疋田晃典, 松山重倫, 三浦俊彦, 山口未来, 渡辺一成, 穂山 浩)

食品衛生学雑誌 2016; 57(5): 169-178.

食品衛生法におけるポリスチレン製器具・容器包装の揮発性物質試験の性能を評価するため、ポリスチレン、アクリロニトリル・スチレン共重合樹脂、アクリロニトリル・ブタジエン・スチレン共重合樹脂のペレットを検体として試験室間共同試験を行った。当試験には21機関が参加し、3検体(各2測定)について規制対象であるスチレン、トルエン、エチルベンゼン、イソプロピルベンゼンおよびプロピルベンゼンの含有量をGC-FID、GC-MSおよびヘッドスペース(HS)-GCにより定量した。公定法(GC-FID)による併行精度(RSD_f)は1.0~2.6%、室間再現精度(RSD_R)は2.5~5.8%であり、その性能は目標値を満たしており、規格試験法として十分であった。GC-MSにおける RSD_f は1.4~7.8%、 RSD_R は4.9~13%であり、定量値は公定法とほぼ同じであった。HS-GCにおける RSD_f は2.0~2.6%、 RSD_R は3.3~6.9%であり、定量値は公定法とほぼ同じであった。そのため、これらは規格試験法の代替法として適用可能であった。

21) ナイロン製器具・容器包装におけるカプロラクタム試験の試験室間共同試験

(渡辺一成, 六鹿元雄, 阿部 孝, 阿部智之, 阿部 裕, 大坂郁恵, 大野春香, 大野浩之, 大野雄一郎, 尾崎麻子, (柿原芳輝, 小林 尚, 近藤貴英, 柴田 博, 城野克広, 関戸晴子, 菌部博則, 高坂典子, 但馬吉保, 田中葵, 田中秀幸, 中西 徹, 野村千枝, 羽石奈穂子, 早川雅人, 疋田晃典, 三浦俊彦, 山口未来, 佐藤恭子, 穂山 浩)

食品衛生学雑誌 2016; 57(6): 222-229.

食品衛生法ではナイロン製器具・容器包装からのカプロラクタムの溶出量が規制されている。そこで、公定法であるGC-FID法とその代替法であるGC-MS法の性能を評価するため、20機関で試験室間共同試験を行った。各試験機関は、濃度非明示の20%エタノール溶液(3検体、各2測定)中のカプロラクタムをGC-FIDまたはGC-MSにより定量した。公定法(GC-FIDを用いた絶対検量線による定量)における真度は96~97%、併行精度(RSD_f)は3.3~5.4%、室間再現精度(RSD_R)は4.0~6.7%であり、これらの値は目標値(真度:80~110%、 RSD_f :10%、 RSD_R :25%)を満たしていた。さらに、ヘプタラクタムを用いて内標準補正を行うといずれの性能パラメーターも向上した。GC-MS法では、絶対検量線法において一部の RSD_f が目標値の10%を超えた。しかし、内標準補正を行うと真度は94~96%、 RSD_f は2.0~4.4%、 RSD_R は7.0~9.4%であり、規格試験法の代替法として適用可能であった。

22) 都市感潮河川における亜鉛の分布と挙動 新矢将尚, 西尾孝之

水環境学会誌 2016; 39(3): 71-78.

下水処理水の流入や海水の遡上にともない複雑な水質挙動を示している淀川水系下流域において、亜鉛の存在形態、分布および挙動について解析した。全亜鉛の49~89%は溶存態であり、溶存態比率は下水処理水放流量の多い第二寝屋川と平野川分水路でとりわけ高く、80%を超えていた。一方、溶存態に占めるフリーイオン態の比率は下水処理水放流域で小さかった。亜鉛負荷量は大川と寝屋川水域で概ね全量が2:3、溶存態が1:2であり、寝屋川水域の寄与が大きかった。汽水域の安治川では上流側の負荷量から推計される亜鉛負荷量の87%(全量)、78%(溶存態)であり、鉄負荷量とともに減少していた。汽水域ではpHの上昇とともに溶存鉄の水酸化鉄共沈により、溶存態亜鉛が凝集し、水中負荷量が減少していたことが認められた。その一方で、汽水域の底泥に蓄積される亜鉛の再溶解はほとんど認められなかった。

23) 我が国の塩素系難燃剤Dechlorane Plusによる汚染レベルについて

先山孝則, (中野 武)

環境化学 2016; 26(2): 77-88.

Dechlorane Plus(DP)は、1960年代にMirexの代替え物質として開発された塩素系難燃剤で、2006年に環境中から検出されて以降、世界中で調査が実施されている。しかし、2011年時点で我が国には調査事例はなかったため、我々は日本のDP汚染の調査を開始した。その結果、底質、土壌、屋外沈着物、屋内ダスト、植物から、それぞれ0.24~230、1.7、74~270、2.9~42、0.082~1.2 ng/g-dry、野菜から5.5~8.0 pg/g-wetのDPが検出された。このことは、日本の様々な環境媒体がDPに汚染されていることを示していた。また、調査した底質のDP濃度は他地域より高く、その他の試料は他国と同じレベルであった。そして、屋外沈着物のDP濃度が屋内ダストより高いことから、DP給源は主に屋外にあると予想された。さらに、ほとんどの試料で低濃度ではあるがMirexも検出された。Mirexは日本で農薬として使用されたことがないため、これらは難燃剤として使用されたものかもしれない。DPのanti体比率(f_{anti})は、屋外試料より屋内ダストや植物、野菜でやや低く、ばらつきが大きかった。

24) 塩素系難燃剤デクロラン類の大気粉塵粒径分布の解明

(柿本健作), 東條俊樹, 先山孝則, (永吉晴奈, 小西良昌, 梶村計志, 中野 武, 畑 光彦, 古内正美, 唐 寧, 早川和一, 鳥羽 陽)

環境化学 2016; 26: 89-93.

大気粉塵(PM)中デクロラン類の粒径毎濃度分布を明らかにした。分析対象としたデクロラン類のうちデクロラン・プラス(DP)のみが検出された。10月に採取したPMに比べ1月に採取した試料では特に、2.5~1.0 μm 、1.0~0.5 μm 、0.5~0.1 μm の、大気中で長距離移動性を有する粒子においてPM濃度分布の上昇がみられ、DP濃度分布も2.5~1.0 μm において上昇がみられた。<0.1 μm の画分には他の画分に比較し高い濃度ではないも

のDPが存在していることが明らかとなった。PM_{0.1}大気サンプラーにて採取したPM中のDPは平均で68 %が2.5 μm以下の画分に存在し、13 %が0.1 μm以下の画分に存在することが明らかとなった。

25) 環境大気中デクロランプラスの高分解能MS(EIモード)及び低分解能MS(NCIモード)による分析方法の検討

(松本幸一郎, 梶 史生, 小田嶋優子, 鹿島勇治), 先山孝則, (中野 武)

環境化学 2016; 26: 95-102.

国内における環境大気中DP 濃度の把握を目的として、分析法を検討した。また、HRMS-EI 及びLRMS-NCI による測定方法について同一試料で比較した報告は無かったため、両測定方法について比較検討を行なった。本検討の結果、国内環境大気中からDP が初検出された。HRMS-EI 及びLRMS-NCI の二つの測定法の測定値に差は見られなかった。LRMS-NCI はHRMS-EI 以上に高感度であるが、ノイズや妨害に対するDP の選択性が低いため、低濃度試料の測定においては、精製操作が必要な場合があると考えられる。環境大気試料中のDP 濃度は湿度が高くなるにつれて高濃度となり、二重測定のばらつきが大きくなる傾向がみられた。DP測定値は、報告されている国外の環境大気濃度と同レベルであり、国内環境大気中のPOPs 等の濃度と比較では臭素系難燃剤よりも高濃度であった。検出されたDP の異性体組成比(f_{anti})は工業用DP に類似していたことから、製剤由来の汚染が示唆された。

26) PM_{2.5}自動測定機の維持管理のための空試験データの活用

板野泰之, (山神真紀子, 長谷川就一, 田子 博, 長田健太郎, 鈴木義浩, 秋山雅行, 山川和彦, 菅田誠治)

大気環境学会誌 2016; 51: 190-195.
PM_{2.5}自動測定機の維持管理のために定期的に実施されている空試験(ゼロガスに対する応答性試験)の結果を解析したところ、平均値は一定の範囲内におさまったが実施自治体や試験回により空試験の実施時間数や標準偏差が大きく異なることがわかった。そこで、空試験の実施時間数の違いを考慮し、平均値と標準偏差を評価管理する手法を検討し実際に試行した。

27) Increase in ozone due to the use of biodiesel fuel rather than diesel fuel

(Phan Quang Thanga, Yusuke Muto, Yasuaki Maeda, Nguyen Quang Trung), Yasuyuki Itano, (Norimichi Takenaka)

Environmental Pollution 2016; 216: 400-407.

ジャトロファおよび家庭排油から作成したディーゼル燃料、および市販のディーゼル燃料の排気ガスのオゾン生成能を比較した結果、前二者の排ガスにおいてより高いオゾン生成が認められた。また、ジャトロファから作成したディーゼル燃料排ガスの方が家庭排油のそれよりもわずかに高いオゾン生成能を示した。排ガスを大阪とベトナムの大気に注入した場合にはオゾン生成能が異

なることがわかった。

28) A Bayesian approach for estimating hexabromocyclododecane (HBCD) diastereomer compositions in water using data below limit of quantification

Makiko Ichihara, (Atsushi Yamamoto), Naoya Kakutani, (Miki Sudo, Koh-ichi Takakura)

Environmental Science and Pollution Research, 2017; 24(3): 2667-2674.

定量下限以下の値(ND)を含む環境モニタリングデータの解析のために、「値の確率的な変動」を定量的に組み込んだ統計モデルを構築し、値の確率的な変動をベイズ信用区間(BCIs)として推定を行った。使用データとして、NDを含む水中の α -ヘキサブプロモシクロドデカン(α -HBCD)の異性体組成比を用いた。データ解析時に“ND”を無関係の値に置換するのを避けるために、NDを測定値で置換しベイズ推定を行った。また、 α -HBCD濃度がNDや定量下限付近の地点も、BCIsを明示した異性体組成比を推定することができた。本モデルを用いることにより、データ解析時にNDをゼロなどの値に置換する必要はなく、環境影響評価を行う際もNDを含む全データを解析に用いることができる。したがって、本モデルはNDを含む環境モニタリングデータの解析において幅広く適用可能な手法であると考えられた。

29) Simultaneous recovery of phosphorus and potassium as magnesium potassium phosphate from synthetic sewage sludge effluent

Satoshi Nakao, Takayuki Nishio, (Yoshinori Kanjo)

Environmental Technology, 2017; 38(19): 2416-2426.

下水汚泥分離液からのリンとカリウムの同時回収を目的として、合成下水汚泥分離液からリン酸マグネシウムカリウム(MPPまたはstruvite-(K)、MgKPO₄·6H₂O)の結晶物として回収する方法を室内実験で検討した。MPP生成の最適pHは11.5であった。また、リン濃度は最低3mmol/L必要で、K:P比も3以上必要であり、これらの条件を満たすと沈殿物中に高いリンとカリウムの含有率がみられた。MPPの結晶物は沈殿物をSEM-EDXおよびXRDで分析することにより確認した。MPPの結晶化が鉄とアルミニウムにより阻害されることが沈殿物のSEM-EDX分析によりわかった。沈殿物のカリウム含有率は、鉄が0.2 mmol/L、アルミニウムが0.05 mmol/L以上になると下がることを確認した。

著書・総説・解説・その他

1) 樹液に集まる蛾類とその調査

山崎一夫

昆虫と自然 2016; 51(6): 17-20.

蛾類の成虫には樹液をおもな食物としているものがある。早春から晩秋まで、さまざまな種が樹液に集まる。標準的な調査法を用いれば、群集生態学の材料や環境指標として利用できる。

2) 下水汚泥処理工程からのカリウム回収技術 ~ 肥料の三要素を下水処理場から回収する基礎研究 ~ 中尾賢志, 西尾孝之
再生と利用 2016; 153: 63-67.

リンとカリウムは世界的に偏在しており, 特にリンは各国が輸出規制をしていることから「枯渇資源」と呼ばれて久しい。また, カリウムも将来リンと同様「枯渇資源」と呼ばれる可能性がある。リンとカリウムは下水道に多く流入しており, 特にリンは海域や湖沼の富栄養化の原因になることから閉鎖性水域に排水する事業者への排出規制は厳しい。本稿では, 廃棄物である下水汚泥の処理工程からリン単独ではなくカリウムも同時回収することにより, 肥料の三大要素のうち二つをMPP(リン酸カリウムマグネシウム)として下水処理場から回収しようとする試みを紹介した。また, 現在広がりを見せている下水や下水汚泥分離液からのカリウム回収技術をレビューしつつ, 我々が行ってきたMPPおよび窒素も含むMAP(リン酸マグネシウムアンモニウム)の生成仕分けを行う技術的な解説を行った。

3) MS技術を応用した環境分野の研究動向 (松村千里, 中野 武), 東條俊樹, 市原真紀子, (西野貴裕, 山本敦史, 宮脇 崇)
水環境学会誌 2016; 39(12): 436-443.

近年, 環境分析においては代謝物も含めた多くの化学物質の極微量かつ高精度な分析が求められており, 質量分析計は環境中の微量化学物質の分析・研究において欠かせない技術となっている。本稿では農薬、PCB・ダイオキシン、難燃剤、有機フッ素化合物(PFASs)、パーソナルケア製品(PPCPs)、網羅的分析の各分野において, 論文を引用しながら最新の知見を紹介し, 論評している。

学会発表

1) 大阪市あいりん地域における結核菌伝播状況解析 (2006~2014)

山本香織, (和田崇之, 小向 潤), 長谷 篤, (松本健二, 下内 昭, 山本太郎)

第91回日本結核病学会総会, 金沢市 (2016.5.25-26)

大阪市のあいりん地域は結核罹患率が国内で最も高い地域である。本研究では, あいりん地域で2006年から2014年に分離された患者由来結核菌についてVNTR解析を行い, 地域内の結核菌遺伝的集団構造およびクラスター形成状況を調べた。本地域において北京型株新興型の検出率が高まってきていること, クラスター形成率が低下してきていることを示した。

2) DMAC法による加工食品中の総プロアントシアニジンの定量

村上太郎, 工藤鮎子, 清田恭平, 紀 雅美, 山野哲夫
日本食品化学学会第22回総会・学術大会, 高知市 (2016.6.2-3)

プロアントシアニジン(PAC)はフラバン-3-オールを基本骨格とする多種多様な構造のポリフェノールの重合体である。本研究ではPACとの特異的な結合により発色する4-Dimethylaminocinnamaldehyde(DMAC)を利用した定量法の分析条件を検討した。分析法の精度管理の結果, Epicatechin標準品は0.78-100 µg/mLで直線性を示し, 定量限界は2 µg/mLであった。また, 本分析法の室内再現精度のRSDは2.7 %であり, 良好な精度を示した。Plackett-Burman試験計画法(PB法)により分析条件の中では, 測定時の溶媒と塩酸の濃度が定量結果に及ぼす影響が大きかったことが確認された。DMAC法による加工食品中のPAC量は, チョコレート製品(160-6500 µg/g)、種実類(310-3400 µg/g)の範囲であり, 広範囲の濃度の食品で適用が可能であった。

3) 大阪市内河川における人工甘味料の濃度分布
山口之彦, (山本敦史), 角谷直哉

第25回環境化学討論会, 新潟市 (2016.6.8-10)

大阪市内河川における人工甘味料の実態調査を行った。既存の分析法を改良し, 回収率の向上とスクラロースの感度上昇を行った。アセスルファム, サッカリンおよびスクラロースが大阪市内河川ほぼ全域に検出された。濃度は, 数100 ng/Lから数 µg/Lのオーダーで検出された。これらの濃度分布は, 大阪市内の下水処理場の近辺で濃度が高くなっており, 下水処理場が人工甘味料の起源の一つと考えられた。

4) 大阪市域における最近18年間(1997~2014年度)での大気中ダイオキシン類濃度の推移

東條俊樹, 先山孝則

第25回環境化学討論会, 新潟市 (2016.6.8-10)

最近18年間の大阪市内における大気中DIOXINS濃度および組成の経年変化を明らかにするとともに, 発生源との関係について比較, 考察した。1997年度から2014年度にかけて継続して調査を実施している地点では, それぞれの濃度の推移に関しても1997年度に比べ大幅に低下し, その濃度の減少割合は93~98%(平均96%)の範囲であった。

5) Distribution of free-living amoebae and *Listeria monocytogenes* in food processing plants

Hiromi Nakamura, (Masumi Taguchi), Niichiro Abe, (Atsushi Iguchi, Keiji Yamaguchi), Takayuki Nishio, (Yoshikazu Nishikawa)

Problems of Listeriosis ISOPOL XIX, Paris, France (2016.6.14-17)

食品のリステリア汚染は原材料よりもむしろ製造・加工工程で引き起こされる。食品製造施設内で何年にもわたって同じ遺伝子型のLMが繰り返し検出されることがあり, これらは施設定着株と考えられている。我々は, 自由生活性アメーバ(FLA)に貪食されたLMがFLAと共生することで環境からのストレスに耐性を示し, 施設定着株として残存するという仮定のもと, 食品製造施設におけるLMとFLAの検出状況について調べた。81検体中LMが29検体, FLAが11検体から検出された。これらのうち3検体

からは両方検出された。施設から検出されたFLAは *Achanthamoeba genotype* T2, T4およびT11, *Hartmannella vermiformis*および*Naegleria* sp. であった。今後、LMのFLAファゴソーム内での生残、増殖を知るために、これらの共培養実験を実施したい。

6) 大阪市で検出されたエンテロウイルスD68型の分子疫学解析(2010~2015年)

改田 厚, (囃府寺美, 天羽清子, 塩見正司)

第57回日本臨床ウイルス学会, 郡山市 (2016.6.18-19)

エンテロウイルスD68型 (EV-D68)は、呼吸器感染症の原因ウイルスとして報告されているが検出報告は少ない。大阪市において、2010、2013年に続き、2015年もEV-D68の急激な検出増加を認めた。分子疫学解析を実施するため、2015年株の塩基配列解析、過去検出株との比較解析をおこなった。2015年1~12月に採取された呼吸器症状のある10歳未満の702検体について、エンテロウイルス検索、型別を実施した。その結果、16検体がEV-D68陽性であり、検出期間は、7~10月であった。月別陽性率の解析から、流行のピークは9月と推定された。大阪市で検出されたEV-D68株について、VP1領域を用いた系統樹解析をおこなった結果、2010、2013、2015年検出株は、検出年ごとにそれぞれ異なる3つの遺伝系統に分類された。2015年の大阪市では、2010、2013年とは異なる遺伝系統のEV-D68株が侵入したことが、検出増加の理由の1つであると考えられた。

7) ヒートアイランド対策の普及・啓発の取り組み事例

- 市街地における市民対象の熱環境測定実習 -

榎元慶子

日本ヒートアイランド学会 第11回全国大会, 広島市

(2016.7.9-10)

ヒートアイランド対策の市民への普及・啓発を目的とした事業に限定せず、街歩きや観察会などの際に、参加者への熱環境に関する意識を深めてもらうために、気温や放射温度の測定を組み込んだところ、自発的かつ継続的にデータを積み重ね、ヒートアイランド対策への関心も高まり、暑さを体感することで熱中症予防の知識も増した。その事例を紹介した。

8) 寝屋川流域の下水道整備による大阪市内河川の

窒素・リン負荷量の変化

中尾賢志, 西尾孝之

第53回下水道研究発表会, 名古屋市 (2016.7.26-28)

大阪市内中心部に流入する寝屋川流域河川について窒素とリンの負荷量を算出した。同時に寝屋川流域河川に放流する大阪府流域下水処理場および大阪市公共下水処理場からの窒素とリンの負荷量も計算した。河川中の窒素とリンの負荷量はほぼ下水処理場由来であると考えられ、第5次水質総量規制目標年度(平成16年度)前後の20年間で減少傾向にあった。また、寝屋川流域河川における窒素とリン負荷量の減少傾向として特徴的なのは、窒素とリンの減少率が同程度であったことである。解析の結果、大阪府流域下水処理場では窒素の

除去率が高く、大阪市公共下水処理場ではリンの除去率が高い時期があったことがわかった。

9) 日本における光化学オキシダント汚染の現状と課題

板野泰之

第57回大気環境学会年会 都市大気モニタリング分科会, 札幌市 (2016.9.7-9)

光化学オキシダントの原因物質であるVOCおよびNO_xの排出規制が進んだにもかかわらずオキシダント濃度が増加傾向にあるが、高濃度の出現状況に着目することで規制の効果を評価できることがわかった。また、オキシダント平均濃度の増加に対しては、NO_xの排出規制によりオゾンの分解が抑制される「NOタイトレーション効果」が関与していることがわかった。一方、未把握のVOC成分や植物由来のVOCがオキシダント生成に強く関与している可能性があることなど、新たな課題があることを示した。

10) 大阪湾圏域の干潟におけるマイクロプラスチック研究

—マイクロプラスチックに関する市民の意識—

中尾賢志, 尾崎麻子, 山崎一夫, 榎元慶子

平成28年度「瀬戸内海研究フォーラムin愛媛」, 松山市 (2016.9.8-9)

海岸への漂着プラスチックごみが紫外線や波浪によって微細化され5 mm未満になったものは「マイクロプラスチック」と呼ばれる。マイクロプラスチックはPOPs(残留性有機汚染物質)を吸着することからPOPsの「運び屋」とされており、マイクロプラスチックが食物網に入り込むと高次捕食者にいくにしたがってPOPsが濃縮され、最終的にはヒトへの影響が懸念される。また、一部の洗顔料や歯磨き粉に含まれるマイクロプラスチックの一種である「マイクロビーズ」も環境中に排出されれば同様の働きがあると考えられており、米国のいくつかの州ではマイクロビーズの生産が規制されつつある。本発表では、当研究所の大阪湾圏域の干潟におけるマイクロプラスチック研究の一環として、生活に身近なマイクロビーズについて市民がどういった意識をもっているかをアンケート方式で調査した結果を示すとともに、本研究所が行っている大阪湾圏域の干潟におけるマイクロプラスチック研究を紹介した。

11) Single genetic clades of Enterovirus D68 strains in 2010, 2013, and 2015 in Osaka City, Japan
Atsushi Kaida, Nobuhiro Iritani, Seiji P Yamamoto, Daiki Kanbayashi, Yuki Hirai, (Urara Kohdera, Masao Togawa, Kiyoko Amo, Masashi Shiomi, Toshinori Nishigaki, Tsutomu Kageyama), Hideyuki Kubo
19th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Lisbon, Portugal (2016.9.14-17)

エンテロウイルスD68型 (EV-D68)は、2010年に国内の呼吸器感染症患者から急激な検出増加が報告された。本研究では、2010年以降の呼吸器感染症検体におけるEV-D68の検索、陽性株の分子疫学解析を目的とした。2010年11月~2015年12月に呼吸器症状が認められた

10歳未満の2,215検体を対象とした(インフルエンザ診断例は除外)。リアルタイムRT-PCR法によりエンテロウイルスの遺伝子検査をおこない、陽性株については、VP4あるいはVP1領域の塩基配列を決定後、BLAST解析により型別を実施した。その結果、18検体(0.8%)がEV-D68陽性であり、2013, 2015年のみ検出が認められた。VP1領域の塩基配列が可能であった株を用いて、系統樹解析をおこなった結果、2013, 2015年の検出株は、2010年の検出株とはそれぞれ異なるクラスターを形成した。大阪市という限定された地域で、2010, 2013, 2015年に異なるクラスターのEV-D68株がそれぞれ検出されたことは、各クラスターの抗原性の違いや過去に流行したEV-D68に対する集団免疫の影響の可能性が考えられた。

12) 食品製造施設から分離された *Listeria monocytogenes* の遺伝子型の特徴と施設汚染要因の考察

中村寛海, (田口真澄, 井口 純, 西 康之, 安福 潔, 村井千里, 西川禎一), 小笠原準
第37回日本食品微生物学会学術総会, 東京都江戸川区 (2016.9.15-6)

Listeria monocytogenes (LM)は食品を介してヒトに重篤なリステリア症を引き起こす。リステリア症の99%は食品媒介性であり、食品のLM汚染は製造・加工工程でおこるとされている。本研究ではリステリア症の原因食品として最も重要なReady-to-eat (RTE)食品とその製造施設から分離されたLM菌株の遺伝子型について調べるとともに、施設のLM汚染要因について考察した。その結果、同一製造元の製品からは、その採取時期や種類にかかわらず、同一遺伝子型のLMが分離される傾向が認められ、さらに各製造施設においては、製品由来LMと同じ遺伝子型を示すLMが分離される傾向が認められた。2社の浅漬製造施設の比較を行った結果、製品からのLM検出率の低い施設は床水が製品のラインを汚染しないよう工夫がされており、衛生管理の違いによる差が明らかであった。

13) 国内で分離された腸管毒素原性大腸菌の特徴解析

(西井啓修, 勢戸和子, 原田哲也), 中村寛海, (加藤結子, 井口 純)
第37回日本食品微生物学会学術総会, 東京都江戸川区 (2016.9.15-6)

腸管毒素原性大腸菌(ETEC)は東南アジアやアフリカなどの発展途上国をはじめ世界中で流行しており、国内では海外渡航者から多く分離されている。一方、国内では海外渡航に関連しない集団および散発事例も発生している。本研究では、国内で分離されたETECの遺伝学的特徴について解析を実施した。その結果、近年の海外渡航者分離株と国内分離株の間では共通のO血清群が見られ、その一部はSequence Type (ST)も同一であることが確認された。また、2007年以前の株についても、海外と国内の分離株間で共通するO血清群が見られ、

その一部は同一STであった。以上より、海外渡航者分離株と同じ系統クローンが国内事例を引き起こしている可能性が示唆された。

14) 下水汚泥分離液からの回収を想定したMAPとMPPの生成仕分け

中尾賢志, 西尾孝之
第27回廃棄物資源循環学会研究発表会, 和歌山市 (2016.9.27-29)

日本における下水汚泥処理工程へのリン回収システムの導入は近年盛んになってきている。リンは世界的に偏在している元素であり、一部の国においてのみ採掘可能な状況であるので「枯渇資源」と位置づけられ「国家戦略的物質」となっている。下水汚泥処理工程でのリン回収システムの一つとしてリンとアンモニアをMAP(リン酸マグネシウムアンモニウム)という結晶で回収する方法があり、普及し始めている。また、カリウムも世界的に偏在していることから平成20年の世界的な肥料高騰時には我が国では入手難に陥った。近年、リンとカリウムを同時回収する方法として、MAPと類似の結晶であるMPP(リン酸マグネシウムカリウム)の晶析技術が研究されている。

MAPとMPPの生成は競合する可能性があり、それらにより明確な条件で生成を仕分ける知見は非常に少ない。本発表ではMAPとMPPを生成し分ける化学的条件の詳細を報告した。

15) 都市ごみ焼却工場の焼却主灰、めっき排水処理汚泥の熱しゃく減量が大きくなる要因の検討

酒井 護, 西谷隆司
平成28年度全国環境研協議会廃棄物資源循環学会年会併設研究発表会, 和歌山市 (2016.9.28)

都市ごみ焼却施設では、完全燃焼が達成されていても主灰の熱しゃく減量が大きくなる事例がある。工程で有機物を使用していないめっき工場での排水処理汚泥の熱しゃく減量が大きくなる事例がある。これらの要因について検討した結果、いずれの場合でも炭素分と水素分のモル比が10を超えていること、400程度に加熱することで熱しゃく減量の80%に相当する量が揮発していること、から金属塩の結晶水の重量が影響していると考えられた。そのため、都市ごみ焼却における不完全燃焼や埋立処分を行う汚泥の無機性を評価する際には、炭素分の測定など別の指標を併用することが必要になる場合があると考えられた。

16) 風疹市中流行株に対する監視の重要性 ～風疹の排除にむけて～

上林大起, 山元誠司, (倉田貴子, 加瀬哲男, 駒野 淳, 弓指孝博), 久保英幸, 改田 厚, 平井有紀, 入谷展弘, 西尾孝之, 小笠原準
平成28年度地研近畿支部ウイルス部会研究会, 和歌山市 (2016.9.30)

風疹ウイルス(RV)の市中流行の要因を理解する為、健常人の保有する中和抗体の流行株に対する交叉反

応性を調査し、近年の流行株に対して、健康人がどの程度有効な免疫を保有しているかを評価した。また、2015年度の大阪市感染症発生動向調査の中で、RV検査で使用するプライマー結合領域に検出感度低下に繋がる変異を持ったRVを検出したので報告した。

17) 畜水産食品における残留抗菌性物質濃度と微生物応答との相関性の確認

(高木葉留果, 系井 大, 花立敬祐, 小川俊彦, 加藤秀規, 徳田朋恵, 武藤光伸, 楨山 功), 上村聖子
第34回全国食肉衛生検査所協議会理化学部会総会・研修会, つくば市 (2016.10.7)

と畜検査時に精密検査となった獣畜については、残留抗菌性物質の有無を確認するため「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(改訂)」による検査を実施している。本研究では、分別推定法における検出限界濃度の確認と回収率の推定を行った。その結果、今回検討対象とした4薬剤(オキシテトラサイクリン、カナマイシン、タイロシン、ベンジルペニシリン)全てで、鶏筋肉における残留基準値以下の濃度で阻止円の形成が確認できた。回収率についてはタイロシンは約99%であったが、オキシテトラサイクリンおよびカナマイシンは40~50%、ベンジルペニシリンは20%と低いことが推測された。カナマイシンの検出限界濃度は0.3 ppmであったが、残留基準値は牛で0.04ppm、豚で0.1 ppmである。牛や豚においては分別推定法では残留基準値濃度のカナマイシンを検出することは難しいことが分かった。

18) 2015/16シーズンに大阪市内で流行したロタウイルスA(G2P[4]株)の遺伝子解析

山元誠司, 改田 厚, 上林大起, 久保英幸, 入谷展弘
第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌市 (2016.10.23-25)

11本に分節化した2重鎖RNAゲノムを有するロタウイルスA(RVA)は乳幼児における急性胃腸炎の主要な原因ウイルスである。2015/16シーズンの大阪市内では、これまで比較的検出割合が少なかった遺伝子型G2P[4]が集団発生事例および散発例にて優占したため、過去に大阪市内において検出されたG2P[4]株と比較解析を行った。その結果、2015/16シーズンのG2P[4]株は2010/11シーズンのそれらにより近縁であり、両シーズンの株はNSP1遺伝子を除く10分節で核酸配列の高い一致率(98.9%)を示した。大阪市内で検出されたすべてのG2P[4]株間でVP7蛋白質における抗原決定部位のアミノ酸に差異は認められなかった。

19) 手足口病流行へのコクサッキーウイルスA6の関与

上林大起, 改田 厚, 山元誠司, 久保英幸, 入谷展弘
第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌市 (2016.10.23-25)

手足口病は、手足や口腔粘膜の水疱性発疹を主徴とする疾患であり、患者の90%以上は乳幼児である。日本国内では2011年、2013年、2015年に大きな流行が確認された。2010年以前は、コクサッキーウイルス(CV)A16

やエンテロウイルス(EV)71が主な原因ウイルスであったが、2011年の流行ではCVA6が高率に検出された。近年の手足口病流行の要因を明らかにする為、2010年から2015年にかけての大阪市内の流行状況の調査並びにCVA6のVP1領域について過去に検出された株と比較解析を行った。

20) 麻疹ウイルス持続感染によるヒト絨毛膜細胞のmRNAの発現変動

(倉田貴子), 上林大起, (弓指孝博, 芳田 剛, 駒野 淳)
第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌市 (2016.10.23-25)

麻疹ウイルス持続感染成立の分子機構と感染が誘導する生理学的変化のメカニズムを明らかにする為、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

21) 大阪市内の40歳未満結核患者から分離された結核菌株の分子疫学解析

山本香織, (和田崇之, 小向 潤, 八木沙保理, 宇田瑛子, 清水直子, 齊藤和美, 青木理恵, 松本健二, 下内昭, 山本太郎)
第75回日本公衆衛生学会総会, 大阪市 (2016.10.26-28)

わが国の新登録患者のうちおよそ10%は40歳未満の若年者であり、これらの患者は最近数年内に結核菌に感染して発病するものが多いと考えられている。本研究では、大阪市内で2012-2014年の間に新登録となった40歳未満の患者から分離された結核菌について遺伝型別(VNTR型別)解析を用いて、分子疫学解析を行った。結果、若年者では近年北京新興型株の検出率が増加し、クラスター形成においても北京新興型が増加してきていることを示した。

22) 結核菌遺伝型別解析(VNTR)の一致から感染経路を推定できた事例

(八木沙保理, 松本健二, 小向 潤, 津田侑子, 田中成一, 齊藤和美, 清水直子, 富森由紀恵, 宇田瑛子, 青木理恵, 吉村高尚), 山本香織
第75回日本公衆衛生学会総会, 大阪市 (2016.10.26-28)

大阪市内で行っている結核菌分子疫学事業において、遺伝型別解析(VNTR型別)を行うことにより患者の感染経路を推定できた事例があったので報告した。

23) 結核患者情報は菌株の遺伝多型(VNTR型別)解析に基づく感染伝播源推定に影響を与えるか?

(和田崇之), 山本香織, (山本太郎, 阿彦忠之)
第75回日本公衆衛生学会総会, 大阪市 (2016.10.26-28)

本邦では結核菌の遺伝多型解析としてVNTR型別解析が用いられている。本解析法は偶然の型別一致や、過去の結核流行期に感染して高齢者で発症した場合などにおいて、患者間の関連可能性を区別出来ない可能性が指摘されている。一方で次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析にはコストや解析の難しさにおいて課

題がある。本発表ではVNTRサーベイランスにおいて、クラスタ形成株のゲノム比較による信頼性の検証を行うとともに、VNTRクラスタの信頼性を高めるための患者疫学情報の活用について検討したので報告する。

24) アレルギー物質検査を含む食品検査におけるPVP共存抽出法の適用性評価

村上太郎, 清田恭平, 工藤鮎子, 昌山 敦, 紀 雅美, 山野哲夫

第112回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市 (2016.10.27-28)

本報告では、プロアントシアニジン系ポリフェノールを含有する原材料を含む加工食品からのアレルギー物質の改良抽出法であるPVP共存抽出法(改良法)と従来のスクリーニング検査法(従来法)の同等性を評価した。アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドラインに倣って、改良法の性能を評価した。同等性評価の結果、小麦以外の検査では定量値の相関図から算出した近似直線の傾きは0.75-1.25の範囲内であり、ガイドラインに示された基準を満たした。このため、改良法は従来法と同様にアレルギー物質の検査に適用可能であることが示唆された。

25) オレンジアレルギーに対するサンドイッチELISA定量法の開発

清田恭平, (川津健太郎, 坂田淳子, 吉光真人, 阿久津和彦), 村上太郎, 紀 雅美, (梶村計志), 山野哲夫

第112回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市 (2016.10.27-28)

本研究では、サンドイッチELISAによるCit s 2定量法を開発した。定量範囲は2.5-40 ng/mLであった。ネーブルオレンジおよびオレンジジュースの各抽出物におけるrCit s 2の添加回収率は107~132%であり、プレート内とプレート間の変動係数は、それぞれ3.1~8.8%、4.4~11%であった。食品中のnCit s 2換算濃度は、生鮮ネーブルオレンジで26,400 ± 5,300 ng/gで、Cit s 2-ELISAは良好な真度、精度および感度を示し、Cit s 2定量法として妥当性が確認された。

26) 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

上村聖子, 先山孝則, 浅川大地, 山野哲夫
第112回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市 (2016.10.27-28)

テトラサイクリン系抗生物質を含む残留動物用医薬品一斉試験法の確立を目的とし、有機溶媒および緩衝液を用いた二段階抽出法を検討した。サケ、エビ、牛筋肉および牛乳(固形試料は凍結粉碎したもの)に対し、65化合物の添加回収試験を行った。試料はアセトニトリル/メタノールおよびEDTA含有クエン酸緩衝液で逐次抽出し、それぞれを精製後に合わせ、LC-MS/MSで測定した。いずれの食品でも8割以上の化合物について回収率が70~120%と良好な結果が得られた。本法により畜水産物中の多様な残留動物用医薬品を一斉に測定すること

が可能となった。

27) 食品用ラミネートフィルムに含まれる残留有機溶剤の分析

尾崎麻子, 岸 映里, 大嶋智子, 角谷直哉, (阿部 裕, 六鹿元雄), 山野哲夫

第112回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市 (2016.10.27-28)

ラミネートフィルム製の容器包装に残留する可能性がある有機溶剤30種類を対象にHS-GC-MSを用いた一斉分析法を検討するとともに、国内で市販されている製品中の残留量を測定した。GCカラムにVOCOLを用いることにより、良好なピーク分離が得られた。ヘッドスペース条件を検討した結果、各種接着剤を溶解することのできる*N,N*-ジメチルホルムアミドを溶媒として用い、80℃で30分間加熱することにより、良好に分析できることを確認した。ばらつきがやや大きかった3-メチル-3-メトキシブタノールを除き、添加回収率は93.0~103%、相対標準偏差は0.0~8.5%と非常に良好であった。本法を用いてラミネートフィルム製品42試料における残留量を測定した結果、2-プロパノール、酢酸エチル、ヘプタン、酢酸プロピル及びトルエンが6試料から検出された。

28) 器具・容器包装における蒸発残留物試験の試験室間共同試験(その1)

(大野浩之, 六鹿元雄, 阿部智之, 阿部 裕, 天野保希, 石原絹代, 大坂郁恵, 大野春香, 大野雄一郎), 尾崎麻子, (柿原芳輝, 小林 尚, 近藤貴英, 櫻木大志, 柴田 博, 城野克広, 関戸晴子, 高坂典子, 竹中 佑, 但馬吉保, 田中 葵, 田中秀幸, 中西 徹, 野村千枝, 羽石奈穂子, 早川雅人, 三浦俊彦, 山口未来, 渡辺一成, 佐藤恭子)

第112回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市 (2016.10.27-28)

蒸発残留物試験は器具・容器包装から食品擬似溶媒への不揮発性物質の総溶出量を求める試験である。これまでに試験室間共同試験は実施されておらず、真度や精度などの性能評価は行われていないことから、水性食品の浸出用液として規定されている水, 4%酢酸及び20%エタノールについて試験室間共同試験を行い、蒸発乾固の操作を水浴上で行った公定法とホットプレート上で行った公定法変法の結果を比較するとともに、それぞれの性能を評価した。その結果、蒸発残留物量と試験濃度がほぼ一致した検体では、公定法と公定法変法に明らかな差はみられず、すべての性能パラメーターの値は目標値を満たした。一方、蒸発残留物量と試験濃度が一致しなかった検体及び精確な試験濃度が不明であった検体についても公定法と公定法変法で明らかな差はみられなかったが、大部分の性能パラメーターの値が目標値を満たさなかった。

29) 器具・容器包装における蒸発残留物試験の試験室間共同試験(その2)

(大野浩之, 六鹿元雄, 阿部智之, 阿部 裕, 天野保希,

石原絹代, 大坂郁恵, 大野春香, 大野雄一郎, 尾崎麻子, 柿原芳輝, 小林 尚, 近藤貴英, 櫻木大志, 柴田 博, 城野克広, 関戸晴子, 高坂典子, 竹中 佑, 但馬吉保, 田中 葵, 田中秀幸, 中西 徹, 野村千枝, 羽石奈穂子, 早川雅人, 三浦俊彦, 山口未来, 渡辺一成, 佐藤恭子)

第112回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市 (2016.10.27-28)

蒸発残留物試験は器具・容器包装から食品擬似溶媒への不揮発性物質の総溶出量を求める試験である。これまでに試験室間共同試験は実施されておらず、真度や精度などの性能評価は行われていない。そこで前報に続き、油性食品の浸出用液として規定されているヘプタンや、欧米で油性食品の擬似溶媒として用いられているイソオクタン及び95 %エタノールについて試験室間共同試験を行い、それぞれの性能を評価した。その結果、蒸発残留物量と試験濃度がほぼ一致した検体では、真度、併行精度及び室間再現精度のすべての性能パラメーターの値が目標値を満たしたが、蒸発残留物量と試験濃度が一致しなかった検体及び精確な試験濃度が不明であった検体では、室間再現精度の値が大きく、目標値を満たさなかった。

30) 同一患者臨床検体から異なる型・亜型の季節性インフルエンザウイルスが重複して分離された例
久保英幸

第49回日本小児呼吸器学会, 富山市 (2016.10.28-29)

2013/14および2015/16シーズン中に、本市感染症発生動向調査事業に供与されたインフルエンザ疑患者検体からインフルエンザウイルスを分離し、その同定試験を行った結果、4例の患者検体から、それぞれAH1pdm、AH1pdmおよびAH3、AH3、AH3の各A亜型遺伝子が、B型各系統遺伝子とともに検出された。上記2シーズンにおけるインフルエンザウイルスの流行・検出状況は、ともに流行開始時からの各型・亜型の混合流行(検出)が認められた。この様な流行状況下においては、異なる型・亜型のインフルエンザウイルス重複感染例の発生を考慮する必要があるものと思われる。

31) 親水性相互作用クロマトグラフィーとポストカラム試薬を用いたアミノグリコシド系抗生物質の測定
浅川大地, 上村聖子, 先山孝則, 山野哲夫
日本食品衛生学会近畿地区勉強会, 大阪市 (2016.11.2)

アミノグリコシド系抗生物質は、親水性が高いため他の動物用医薬品類と同様の分析法では測定することが困難であった。そこで、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を利用したアミノグリコシド系抗生物質のLC-MS/MS測定方法を開発した。各種条件を比較して、HILIC分離条件や固相抽出による精製方法を最適化した。さらに、大気環境中の糖類の分析法を応用して、ポストカラム試薬を添加することでアミノグリコシド系抗生物質の感度を大幅に向上させた。

開発した測定方法を牛肉と牛乳に適用して妥当性評

価を行ったところ、アミノグリコシド系抗生物質5項目(6化合物)において良好な真度と精度が得られた。本研究の結果、食品中のアミノグリコシド系抗生物質を速やかに高感度で測定可能になった。

32) PVP共存抽出法のアレルギー物質を含む食品検査への応用

村上太郎, 清田恭平, 工藤鮎子, 昌山 敦, 紀 雅美, 山野哲夫

日本食品衛生学会近畿地区勉強会, 大阪市 (2016.11.2)

本報告では、プロアントシアニジン系ポリフェノール(PAC)を含有する原材料を含む加工食品からのアレルギー物質の改良抽出法であるPVP共存抽出法を市販の加工食品中の小麦タンパク質の検査に応用した。合計43試料の加工食品をPVP共存抽出法によって小麦タンパク質の分析を行ったところ、PACを含む食品では従来の抽出法で回収率の低下が確認されたが、PVP共存抽出法によって回収率が改善した。また、従来法では小麦タンパク質が検出されなかったチョコレート1試料から、PVP共存抽出法によって小麦タンパク質が検出された。

33) ヘッドスペースGC-MSによる食品用容器包装材料中の残留溶剤分析

尾崎麻子, 岸 映里, 大嶋智子, 角谷直哉, (阿部 裕, 六鹿元雄), 山野哲夫

日本食品衛生学会近畿地区勉強会, 大阪市 (2016.11.2)

ラミネートフィルム製の容器包装に残留する可能性がある有機溶剤30種類を対象にHS-GC-MSを用いた一斉分析法を検討するとともに、国内で市販されている製品中の残留量を測定した。GCカラムにVOCOLを用いることにより、良好なピーク分離が得られた。ヘッドスペース条件を検討した結果、各種接着剤を溶解することのできる*N,N*-ジメチルホルムアミドを溶媒として用い、80 °Cで30分間加熱することにより、良好に分析できることを確認した。ばらつきがやや大きかった3-メチル-3-メトキシブタノールを除き、添加回収率は93.0~103%、相対標準偏差は0.0~8.5%と非常に良好であった。本法を用いてラミネートフィルム製品42試料における残留量を測定した結果、2-プロパノール、酢酸エチル、ヘプタン、酢酸プロピル及びトルエンが6試料から検出された。

34) 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の妥当性確認

上村聖子, 先山孝則, 浅川大地, 山野哲夫
日本食品衛生学会近畿地区勉強会, 大阪市 (2016.11.2)

テトラサイクリン系抗生物質を含む残留動物用医薬品一斉試験法の確立を目的とし、有機溶媒および緩衝液を用いた二段階抽出法を検討した。動物用医薬品65化合物を対象とし、4種の食品(サケ、エビ、牛筋肉および牛乳(固形試料は凍結粉碎したもの))について、試験

法の妥当性確認を行った。試料はアセトニトリル/メタノールおよびEDTA含有クエン酸緩衝液で逐次抽出し、それぞれを精製後に合わせ、LC-MS/MSで測定した。65化合物のうち、サケでは60化合物、エビでは52化合物、牛筋肉では64化合物、牛乳では63化合物が妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。本法により畜水産物中の多様な残留動物用医薬品を一斉に測定することが可能になった。

35) サンドイッチELISAによる食品中のオレンジアレルギー定量法の開発

清田恭平, (川津健太郎, 坂田淳子, 吉光真人, 阿久津和彦), 村上太郎, 紀雅美, (梶村計志), 山野哲夫
日本食品衛生学会近畿地区勉強会, 大阪市
(2016.11.2)

本研究では、オレンジの主要アレルギーとされるCit s 2に対するモノクローナル抗体を用いて、サンドイッチELISAによるCit s 2定量法を開発した。本法の特異性評価では、ネーブルオレンジに陽性反応を示す一方で、清見オレンジ、ブラッドオレンジ、パプリカに交差反応を示した。また、本法は良好な真度、精度および感度を示し、Cit s 2定量法として妥当性が確認された。本法を用いて、Cit s 2を定量したところ、生鮮ネーブルオレンジで $26,400 \pm 5,300$ ng/g、オレンジ加工食品では生鮮品の1/10以下の濃度または不検出であり、低い濃度レベルであった。

36) Determination of elements and residual solvents in laminated films used for food packaging

Asako Ozaki, Eri Kishi, Tomoko Ooshima, Naoya Kakutani, (Yutaka Abe, Motoh Mutsuga), Tetsuo Yamano
ILSI 6th International Symposium on Food Packaging, Barcelona, Spain (2016.11.16-18)

性質の異なる2種類以上のプラスチックや紙、アルミ箔を貼り合わせ、短所を補い長所を高めたラミネートフィルムは、食品用の容器包装材として広く使用されている。これらに添加剤や接着剤として使用された金属類や溶剤が残留する可能性があることから、日本で入手した食品用ラミネートフィルムについて金属類及び溶媒の含有量を測定した。金属類25種類を定量した結果、ポリエチレンテレフタレート層を有する試料からアンチモンが検出され、アルミニウム層を有する試料からは鉄、バナジウム、銅、鉛が検出された。また、残留溶媒30化合物を定量した結果、2-プロパノール、酢酸エチル、酢酸プロピル、ヘプタン及びトルエンが検出されたが、ラミネートフィルムの材質の違いによる有機溶剤の検出傾向に違いは見られなかった。

37) Multielement analysis in polyethylene terephthalate (PET) bottles used for beverages in Japan

Eri Kishi, Asako Ozaki, Tomoko Ooshima, (Yutaka Abe, Motoh Mutsuga), Tetsuo Yamano
ILSI 6th International Symposium on Food Packaging, Barcelona, Spain (2016.11.16-18)

ペットボトルは清涼飲料用容器等として多く使用されているが、ペットボトルには製造時に使用された触媒や添加剤として金属類が含有されている可能性がある。そこで、日本で使用されている清涼飲料用ペットボトル16試料について、マイクロウェーブ分解装置および誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いて34元素の含有量を測定した。その結果、触媒として使用されているアンチモン(Sb)、ゲルマニウム(Ge)およびチタンのほか、安定剤として使用されることがあるリン、色味調整のために添加されることがあるコバルトが検出された。また、食品擬似溶媒(4%酢酸)を用いて25、40および60で10~90日間の溶出試験を行い、これらの溶出量を調べたところ、SbおよびGeが微量検出されたが、いずれの溶出条件においても、食品衛生法の規格基準である $0.05 \mu\text{g/mL}$ および $0.1 \mu\text{g/mL}$ を下回っていた。

38) 家庭用エアゾル製品中のメタノール分析における疑義事例への対応

大嶋智子, 角谷直哉, 岸 映里, 尾崎麻子, 山野哲夫
第53回全国衛生化学技術協議会年会, 青森市
(2016.11.17-18)

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づいて行う家庭用エアゾル製品中のメタノール分析に際しては、製品開発によって種々の溶剤が使用されるため、メタノールの含有判定が困難な事例が散見される。そこで、前処理に蒸留工程を省き、長いカラムを使用することで分離良好な簡易分析法を報告した。

39) 天然繊維のみから構成された繊維製品中のアゾ色素由来の特定芳香族アミン等の分析対応について

大嶋智子, 角谷直哉, 山野哲夫
第53回全国衛生化学技術協議会年会, 青森市
(2016.11.17-18)

今年度より特定芳香族アミンを容易に生成するアゾ染料について家庭用品の規制がはじまった。そこで、天然繊維を素材とする繊維製品中の特定芳香族アミン24物質およびアニリン、1,4-フェニレンジアミンの分解生成2物質を含む測定対象26物質について、法に基づく前処理を行い、GC-MS分析が可能なことを確認した。実態調査を行った繊維製品9試料中4試料からアニリン、4-クロロアニリン、2-ナフチルアミンが $0.62 \sim 5.7 \mu\text{g/g}$ 検出されたが、いずれも基準値の $30 \mu\text{g/g}$ を超過するものはなかった。

40) LC-MS/MSを用いたドモイ酸の分析について

仲谷 正, 紀 雅美, 村上太郎, 清田恭平, 山野哲夫
第53回全国衛生化学技術協議会年会, 青森市
(2016.11.17-18)

UHPLC-MS/MS法によるドモイ酸(domoiic acid, DA)迅速分析法の検討を行った。イガイ、カニの内臓およびイガイ加工品を試料とした場合、50%MeOHで抽出した抽出液を希釈することにより、またイワシの場合、抽出液を陰イオン交換樹脂ミニカラムで精製を加えることによってマトリクス効果や夾雑物の影響を受けることな

くDAの定量が可能であった。また各試料に対する添加回収試験の結果は回収率で85～110%、変動係数で1.2～11%の範囲となり、全般的に良好な結果が得られたため、今回検討した各試験法は、DAの分析に適用可能と考えられた。また二枚貝におけるDAの汚染実態調査を行ったところ、16試料中3試料より微量のDAが検出された。これらの汚染レベルは農林水産省による調査結果の濃度範囲であった。

41) 寝屋川流域河川から大阪湾への栄養塩類負荷量とその起源

中尾賢志, 山口之彦, 西尾孝之

日本水環境学会関西支部第7回研究発表会, 大阪市 (2016.12.2)

大阪市内河川の窒素とリン負荷量変動を20年分調べ、大阪市内中心部に流入する寝屋川流域河川についての窒素とリンの負荷量を算出した。同時に寝屋川流域河川に放流する大阪府流域下水処理場および大阪市公共下水処理場からの窒素とリンの負荷量も計算した。河川中の窒素とリンの負荷量はほぼ下水処理場由来であると考えられ、第5次水質総量規制目標年度(平成16年度)前後の20年間で減少傾向にあった。さらに、大阪湾へ流入する各流域河口から流出する窒素とリンの負荷量を参考文献から推計し、寝屋川流域河川からは窒素は25%、リンは22%の負荷があることを示した。

42) 従来型エンテロトキシン非産生の黄色ブドウ球菌による食中毒事例

梅田 薫, 中村寛海, 山本香織, 長谷 篤, 後藤 薫, 平山照雄, 平井有紀, 小笠原準

平成28年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会, 大阪市 (2016. 12. 2)

黄色ブドウ球菌食中毒は、黄色ブドウ球菌が食品内に産生したエンテロトキシンを摂取することにより発症する。食中毒を引き起こすのは、主に従来型のA-E型エンテロトキシンであると考えられてきた。平成28年5月に大阪市内の認知症対応型グループホームにおける昼食会で発生した食中毒事例では、複数の患者、食品残品、調理人手指ふき取り水から共通して黄色ブドウ球菌が検出されたが、従来型のエンテロトキシンは検出されなかった。しかし、PCR法による遺伝子検査の結果、複数の新型エンテロトキシン遺伝子を保有していることが分かった。本事例の発生要因は、調理人手指を介した食品の汚染と、それに続く不適切な食品保存管理によると推測された。今後、黄色ブドウ球菌食中毒の発生予防には、従来型のみでなく、新型エンテロトキシン遺伝子保有株を含めた汚染に注意を払う必要がある。

43) ナノ銀が使われている食品用プラスチック容器からの金属類の溶出について

尾崎麻子, 岸 映里, 大嶋智子, 長谷 篤, (河村葉子)

日本女性科学者の会第11回学術大会, 大阪市 (2017.1.6)

ナノ銀抗菌剤(粒子径100 nm以下の銀系抗菌剤)が、

プラスチック、繊維、化粧品等に広範囲に使用されるようになってきた。食品用途では、保存容器、袋、トレイ、まな板等のプラスチック製品への使用が報告されている。ナノ銀抗菌剤は従来の銀抗菌剤に比べてサイズが非常に小さく、質量あたりの表面積が大きいため、反応性が高く、より強力な抗菌作用を有する。一方、従来とは異なる体内動態を示し、臓器毒性等を示すとも報告されており、安全性に関する情報は十分ではない。しかし、国内に流通するナノ銀抗菌製品について銀の溶出を調査した報告は見られない。そこで、大阪市内においてナノ銀抗菌剤の使用表示のあるプラスチック製品を収集し、銀に加え、抗菌作用をもつ亜鉛や食品衛生上問題となると素、鉛、カドミウムの材質中の含有量を調査した。さらに、食品への溶出量を評価するために食品擬似溶媒を用いた溶出試験を行った。また、一般的な銀抗菌剤使用表示のある製品についても同様に試験を実施し、結果を比較した。ナノ銀抗菌製品から溶出した銀については、その形態に関する検証を行った。

44) 大阪市内の医療機関で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)の耐性機序

梅田 薫, 中村寛海

第28回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 長崎市 (2017. 1.20-22)

大阪市内のCREの流行状況を把握し、院内感染で問題となるカルバペネマーゼ産生株(CPE)の浸淫状況明らかにするため、H27年度～28年度に市内の医療機関から大阪市保健所を介して回収された92株のCREについて、薬剤耐性遺伝子の保有状況を調査した。38株のCPEの内、関西地方で多く検出されるIMP-6型菌が33株と最も多く分離された。その性状解析から、IMP-6型の薬剤耐性プラスミドは、多様な菌種間に分布していることが分かった。また、海外流行型のKPC型菌、稀な型のKHM型菌も各1株ずつ検出された。今後も、CREの分離状況を監視し、その拡大を防ぐことが重要と考えられた。

45) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)として分離されるEnterobacter属菌の特徴

中村寛海, 梅田 薫

第28回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 長崎市 (2017. 1.20-22)

Enterobacter属菌は腸内細菌科細菌の中でCREとして届出される主要な細菌であるが、染色体性のAmpC型β-ラクタマーゼを産生することから、カルバペネマーゼ産生菌(CPE)でない場合が多い。本研究では、大阪市内の医療機関で分離されたCREのうちEnterobacter属菌の特徴を調べることを目的とした。2015年4月～2016年9月に保健所を介して搬入された92株のCREのうちEnterobacter属菌は49株(53.3%)であった。β-ラクタマーゼ産生菌は49株中14株であり、CPEは14株中7株であった。7株のCPEは全てメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生菌であり、遺伝子型はIMP-6型が3株でIMP-1型が2株、IMP-11型とKHM型が各1株であった。これらは全てメロペネム耐性であり、カルバペネマーゼ陽性(1株は判定

不能)であった。市内の1医療機関から9ヶ月に渡って継続的に分離された14株の*Enterobacter*属菌は全てメロペネムに感受性でカルバペネマーゼ非産生であった。14株のPFGEパターンは多様であり、CREによる院内感染の可能性は否定された。以上より、メロペネム耐性およびカルバペネマーゼ産生は*Enterobacter*属菌の中でCPEを判定するのに有効な特徴であると考えられた。

46) 大阪市内河川における人工甘味料の実態調査 山口之彦

第31回全国環境研協議会東海・近畿・北陸支部研究会、福井市 (2017.1.27)

海域を含む大阪市内河川において人工甘味料の実態調査を行った。対象とした5種類のうちアセスルファム、サッカリン、スクラロースの3種類が $\mu\text{g/L}$ のレベルで検出された。海域の濃度は河川水のものとは大きく変わることがなく、海域まで分布していることが示唆された。

47) 淀川下流域におけるホウ素の分布と起源 新矢将尚

第51回日本水環境学会年会、熊本市 (2017.3.15-17)

ホウ素がしばしば高濃度で検出されている都市感潮河川である淀川下流域において、河川水中のホウ素の分布調査およびホウ素同位体比分析を行い、検出されるホウ素の起源を推定し、海水の寄与について検討した。ホウ素濃度とホウ素同位体比の関係から、淀川下流域においては、汽水域、大川水域、寝屋川水域、第二寝屋川・平野川水域の4水域に区分できることが分かった。汽水域の $\delta^{11}\text{B}$ はホウ素濃度が高いほど海水の値に近い値を示した一方で、淡水域では下水処理水が流入する水域でホウ素濃度が高いほど $\delta^{11}\text{B}$ は小さい値を示し、小さな $\delta^{11}\text{B}$ を示す人為発生源の存在が示唆された。海水と淡水の混合比率による理論値を計算した結果、汽水域のホウ素の起源は、海水のみならず、淡水上流域からの影響も受けていることが示唆された。

48) 大阪湾圏域の干潟におけるマイクロプラスチック分布の実態把握

中尾賢志、尾崎麻子、山崎一夫、榎元慶子、(山田浩二)

第51回日本水環境学会年会、熊本市 (2017.3.15-17)

大阪湾圏域の干潟におけるマイクロプラスチックの実態把握をおこなった。調査地点は湾口、湾東、湾奥に存

在する干潟で、それぞれ兵庫県淡路島南東部の成ヶ島前浜干潟、近木川河口干潟、神崎川河口干潟であった。湾口から湾奥にかけて人口が多くなる地域に近い干潟ほど乾燥泥10gあたりのマイクロプラスチック数が増加する傾向にあった。また、有機分が高い泥ほどマイクロプラスチックの数が多くなる傾向にあった。

49) 大気エアロゾルに含まれる化学成分の長期観測結果とその特徴

船坂邦弘

日本化学会第97春季年会、横浜市 (2017.3.16-19)

大阪市内の一般環境大気測定局では1976年度から、自動車排出ガス測定局では1995年度から大気エアロゾルの粒径分布測定を継続している。大気エアロゾルは、長期的にみると微小粒子、粗大粒子ともに減少しており、イオン成分や炭素成分、重金属濃度も多くの項目で減少傾向にある。しかしながらVanadium (V)濃度は近年、減少傾向にあるとは言い難く、船舶を含む重油燃焼由来発生源の影響について考察した。

50) 生活用品試験法 器具・容器包装および玩具試験法 プラスチック製品中金属類の定量法

(六鹿元雄、河村葉子、有菌幸司、大野浩之)、尾崎麻子、(金子令子、中西 徹、羽石奈穂子、松井秀俊 村上亮)

日本薬学会第137年会、仙台市 (2017.3.24-27)

金属類はプラスチックの着色料、安定剤、充てん剤、重合触媒などに使用され、また、原料や添加剤の不純物として混入するおそれがある。そこで、食品衛生法では、材質試験として Cd および Pb はすべてのプラスチック製品で各 100 $\mu\text{g/g}$ 以下、Ba はポリ塩化ビニリデンで 100 $\mu\text{g/g}$ 以下と定めている。これらの限度値は、試験を簡易化するために安定剤としては効果が認められない濃度に設定されたものであり、規制の趣旨はこれらを使用してはならないということである。ただし、着色料としては 100 $\mu\text{g/g}$ 程度でも十分効果があるため、着色された輸入品などから Cd や Pb が検出され、違反となることがある。これらの試験に関する共同試験の結果を踏まえ、「マイクロウェーブ分解 ICP/質量分析法による定量」を新規に作成し、「原子吸光度法(AAS)および ICP 発光分光分析法による定量」を改訂したので報告する。

査読委員

阿部 仁一郎
市原 真紀子
角谷 直哉
後藤 薫
先山 孝則
仲谷 正
藤原 康博
山本 香織
油谷 藍子

編集委員

大島 詔
酒井 護○
出口 智月
宮本 伊織
山崎 一夫
(○ 編集委員長)

(五十音順)

大阪市立環境科学研究所報告
調査・研究年報第79集 [非売品]

ISSN 0285-5801

(無断転載禁止)

平成29年12月 印刷・発行

編集

地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所天王寺センター
大阪市立環境科学研究所センター
大阪市天王寺区東上町8番34号

発行

地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
大阪市東成区中道1丁目3番69号
電話 (06)6972-1321

印刷所

株式会社いづみ企画