

大阪府立公衆衛生研究所 研究報告

平成21年



BULLETIN
OF
OSAKA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.47 (2009)

大阪府立公衆衛生研究所

大阪府立公衆衛生研究所 研究報告

目 次

研究報告

大阪府におけるウエストナイルウイルスに対するサーベイランス調査(2008年度)	青 山 幾 子 弓 指 孝 博 中 田 恵 子 佐 藤 功 佐 藤 良 行 倉 持 隆 上 澤 和 加 瀬 哲 男 高 橋 和 郎	1
牛肉中の駆虫剤(トリクラベンダゾール)分析法の改良	藤 田 瑞 香 永 吉 晴 奈 尾 花 裕 孝	9
LC/MS/MSによる畜水産食品中のサルファ剤一斉分析法の検討 ..	藤 田 瑞 香 柿 本 健 作 山 口 貴 弘 尾 花 裕 孝	13
食品中亜硝酸根の小スケール迅速分析法の検討	野 村 千 枝 吉 光 真 人 阿 久 津 和 彦 尾 花 裕 孝	17
母乳中の残留性有機汚染物質(POPs)汚染調査(第19報)-POPs 簡易測定法の開発とモニタリング調査の最終報告	小 西 良 昌 柿 本 健 作 阿 久 津 和 彦 尾 花 裕 孝	21
無承認無許可医薬品の検査に用いるデータの収集	沢 辺 善 之 中 村 暁 彦 田 口 修 三	27
HPLCを用いた化粧品中の防腐剤の定量法	沢 辺 善 之 川 口 正 美	33
ダイエット効果を暗示するいわゆる健康食品からヨヒンピンを 検出した事例について	中 村 暁 彦 川 口 正 美 梶 村 計 志 田 口 修 三 岩 上 正 藏	37
チンピに残留するピレスロイド系農薬	田 上 貴 臣 梶 村 計 志 山 崎 勝 弘 田 口 修 三	43
界面活性剤の皮膚常在菌への影響	宮 野 直 子	47
大阪府における環境および食品中放射能調査(平成20年度報告) ..	味 村 真 弓 肥 塚 利 江 渡 邊 功	53
長期間鉛曝露者の経過観察	宮 島 啓 子 吉 田 俊 明 吉 田 仁 熊 谷 信 二	61
遊離残留塩素の自動分析	田 中 榮 次 安 達 史 恵 高 木 総 吉	67
乳幼児用繊維製品(衣服及び玩具)に使用されている染料成分 中の芳香族第一アミン類の分析調査	中 島 晴 信 鹿 庭 正 昭	75
大阪府水道水質検査外部精度管理結果 陰イオン界面活性剤 (平成18年度)	宮 野 啓 一 小 泉 義 彦 高 木 総 吉 安 達 史 恵 渡 邊 功	81

抄録

患者発生現場でのバイオセーフティ 腸管出血性大腸菌-正しい知識で正しく予防……………	勢 戸 和 子	89	
分子疫学研究の進歩と対策への応用 3 . 大阪府の結核対策における結核菌分子疫学の有用性……………	田 丸 亜 貴	89	
結核 (化学予防) ……………	鈴 木 定 彦 福 島 由 華 松 葉 隆 司	中 島 千 絵 田 丸 亜 貴	90
培養法およびPCR法による鶏肉からのサルモネラ検出における検体処理法と細菌数の影響 (英文) ……………	神 吉 政 史 田 口 真 澄 石 橋 正 憲 川 津 健 太 井 上 清	坂 田 淳 子 久 米 田 裕 子 河 合 高 生 山 崎 涉 子 宮 原 美 知	90
LAMP法による <i>Campylobacter jejuni</i> および <i>Campylobacter coli</i> の迅速かつ簡易な検出法の開発ならびに評価 (英文) ……………	山 崎 涉 石 橋 正 憲 井 上 清	田 口 真 澄 北 里 実 尚 三 澤 明	91
LAMP法によるコレラ毒素を産生する <i>Vibrio cholerae</i> の高感度かつ迅速な検出 (英文) ……………	山 崎 涉 田 口 真 澄 井 上 清	勢 戸 和 子 石 橋 正 憲	91
LAMP法による腸炎ピブリオの高感度かつ迅速な検出法の開発 (英文)	山 崎 涉 河 原 隆 二	石 橋 正 憲 井 上 清	92
LAMP法および培養法による <i>Campylobacter jejuni</i> および <i>Campylobacter coli</i> の市販鶏肉からの検出法の評価 (英文) ……………	山 崎 涉 河 合 高 淳 坂 田 淳 尚 三 澤 子 明	田 口 真 澄 川 津 健 太 井 上 清	92
チクングニヤ熱と確定診断されたインドからの輸入感染症症例……………	青 山 幾 子 弓 指 孝 博 高 橋 和 郎 片 山 智 香 塩 見 正 司 齊 藤 武 志 穴 瀬 文 也 高 崎 智 彦 倉 根 一 郎	宇 野 健 司 加 瀬 哲 男 後 藤 哲 宏 中 村 匡 宏 仁 科 展 志 森 登 志 英 吉 田 昌 子 林 登 子 樹 吉 林 宏 宏	93
奈良公園におけるニホンジカ (<i>Cervus nippon</i>) のE型肝炎ウイルス疫学調査……………	萩 原 克 郎 川 小 石 林 朋 智	辻 正 義 鳥 居 春 己 浅 川 満 彦	93
大阪府内におけるH1型麻疹ウイルス感染 (英文) ……………	倉 田 貴 子 古 谷 悦 美 高 橋 和 郎	宮 川 広 実 加 瀬 哲 男	94
大阪府内で発生したH1型麻疹ウイルスの国内感染事例……………	倉 田 貴 子 古 谷 悦 美 高 橋 和 郎	宮 川 広 実 加 瀬 哲 男	94
イムノクロマト法を用いたノロウイルス簡便検出キットの評価……………	山 崎 謙 治 伊 吹 てる み	左 近 直 美 立 田 多 美 恵	95

ウイルス感染症アウトブレイクへの迅速対応についての研究 モデルケースとしてのノロウイルス検査対応	山崎謙治			95
2008年春から秋までに大阪府で流行したエンテロウイルス (英文)	山崎謙治 中田恵子	左近直美 加瀬哲男		96
未治療HIV-1感染者に検出されたV108I変異がEFV耐性誘導に及ぼす影響	森川治代 畑拓也	小島洋子 後藤哲志		96
鳥根県における不明熱患者の原因病原体の検索と野外疫学調査 (英文)	田原研司 川石原智明 岡部信彦	新井智夫 板垣朝弘 佐藤正義 辻正		97
CCT 遺伝子を用いた <i>Babesia microti</i> グループ原虫の系統学的比較 (英文)	中嶋瑠衣紀 織田和紀 Wei Qiang 西田あつみ	辻座正義 本-新倉 綾石倉田 原智明		97
予防に役立つ「感染症の事典」 目に見えない世界をのぞいてみよう	北里研究所 木村明生博 弓指孝	青山幾子 西村公志		98
ガラスビーズ粉碎法を用いたLC/MS/MSによる畜水産食品中のサルファ剤の分析	藤田瑞香 尾花裕孝	田口修三		98
LC-MS/MSによる餃子中の農薬一斉分析法の検討	岡本葉子 北川陽直樹 福井本夫 住花裕孝 尾花	高取雅浩 起橋中之 村田之雄		99
2-アルキルシクロブタノン分析と照射食品の検知	尾花裕孝			99
プレカラム誘導体化HPLCによるドリンク中のタウリンの定量 (英文)	沢辺善之 山崎勝弘	田上貴臣		100
プロノールの分解により遊離するホルムアルデヒドの挙動に関する研究 (英文)	梶村計志 山本丈雄	田上貴臣 岩上正藏		100
親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた香粧品中のジアゾリジニル尿素、尿素、アラントイン同時分析法の開発(英文)	土井崇広 高取修三 田口修	梶村計志 福井直樹 岩上正藏		101
カンゾウ中の有機塩素系農薬の分析 (英文)	田上貴臣 山崎勝弘 田口修三	梶村計志 沢辺善之 岩上正藏		101
ケイヒ中のピレスロイド系農薬の分析 (英文)	田上貴臣 野村千枝 岩上正藏	梶村計志 田口修三		102
大型建築物内給湯水からの培養及び培養不能レジオネラ属菌の検出 (英文)	枝川亜希子 土井均子 富岡公千 中嶋	木村明生 田中榮 坂部憲 鈴木定彦		102

LAMP法を用いた浴槽水からのレジオネラ属菌検出時における反応阻害確認の必要性……………	枝川亜希子 木村明生 肥塚利江	土井均 田中榮 渡辺功	103
コンビニエンスストア設置浄化槽の水質改善手法-嫌気ろ床接触ばっ気方式の事例……………	奥村早代子 山本康次 木曾祥秋	中野仁 坂部憲一	103
大阪府内水道原水および浄水中におけるPFOSとPFOAについて(英文)……………	高木総吉 宮野啓一 田中榮次 渡邊功 K. Kannan	安達史恵 小泉義彦 味村真信 田辺信介	104
石綿の近隣曝露による中皮腫死亡リスクのマッピング(英文)……	車谷典男	熊谷信二	104
人工汗・唾液による無機系抗菌剤及び加工布からの金属溶出(英文)……………	中島晴信 高塚正	宮野直子	105
抗がん剤調製室におけるシクロホスファミド汚染に対する閉鎖系注入器具の有用性評価(英文)……………	吉田仁 望月千枝 甲田茂樹	丁元鎮 榊喜恵 熊谷信二	105

大阪府におけるウエストナイルウイルスに対するサーベイランス調査 (2008年度)

青山幾子^{*1} 弓指孝博^{*1} 中田恵子^{*1} 佐藤功^{*2} 佐藤良江^{*3}
倉持隆^{*4} 上澤行成^{*4} 加瀬哲男^{*1} 高橋和郎^{*5}

大阪府ではウエストナイルウイルス(WNV)の侵入を監視する目的で、2003年度より媒介蚊のサーベイランス事業を実施している。また、死亡原因の不明な鳥死骸が2羽以上同地点で見られた場合、その鳥についてもWNV検査を実施している。

2008年度は6月末から10月にかけて府内20カ所で蚊の捕集を行い、得られた雌の蚊についてWNV遺伝子の検出を試みた。捕集された蚊は5種3514匹で、そのうちアカイエカ群(50.5%)とヒトスジシマカ(48.7%)が大部分を占め、他にコガタアカイエカ(1.2%)、シナハマダラカ(0.3%)、イナトミシオカ(0.03%)が捕集された。定点及び種類別の蚊338プールについて遺伝子検査を実施したが、すべての検体においてフラビウイルスあるいはWNVの遺伝子は検出されなかった。また、2008年度当所に搬入された死亡カラス(6頭)についても同様に遺伝子検査を行ったが、すべての検体においてフラビウイルスあるいはWNVの遺伝子は検出されなかった。

キーワード:ウエストナイルウイルス、媒介蚊、サーベイランス、RT-PCR、カラス

Key words : West Nile Virus, vector mosquitoes, surveillance, RT-PCR, crow

ウエストナイル熱は蚊によって媒介されるウイルス性の熱性疾患である。その病原体であるウエストナイルウイルスは1937年にアフリカで発見されて以後、アフリカ、ヨーロッパ、西アジア、中東を中心に散発的に流行がみられていた¹⁾。しかし1999年夏にニューヨークで初めて流行が確認されて以後、米国においてウ

エストナイル熱の流行は毎年発生し、多くの患者や死者が報告されている²⁾。また、カナダやメキシコ、ハンガリー、イタリアでも患者が発生し、南米やオーストラリアにおいても鳥や馬の感染が報告されている³⁻⁹⁾。

このような国際的な感染症が、我が国にいつ侵入してくるかは予測できない。ウエストナイル熱の侵入・蔓延を防止するためにはWNVに対する継続的な監視を行い、早期発見、防疫対策を行うことが必要と考えられる。特に、関西国際空港や大阪港を擁する大阪府は、十分な警戒態勢をとっておくことが重要である。

大阪府ではベクターとなり得る蚊の種類や、蚊のウイルス保有について調べるため、2003年度より蚊のサーベイランス調査を実施している¹⁰⁻¹⁵⁾。また、死亡原因の不明なカラスの死骸が同地点で2羽以上見られた場合、その鳥についてもWNV検査を実施している。ここでは2008年度の調査結果について報告する。

調 査 方 法

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

^{*2}大阪府健康医療部保健医療室地域保健感染症課
(現所属 食の安全推進課)

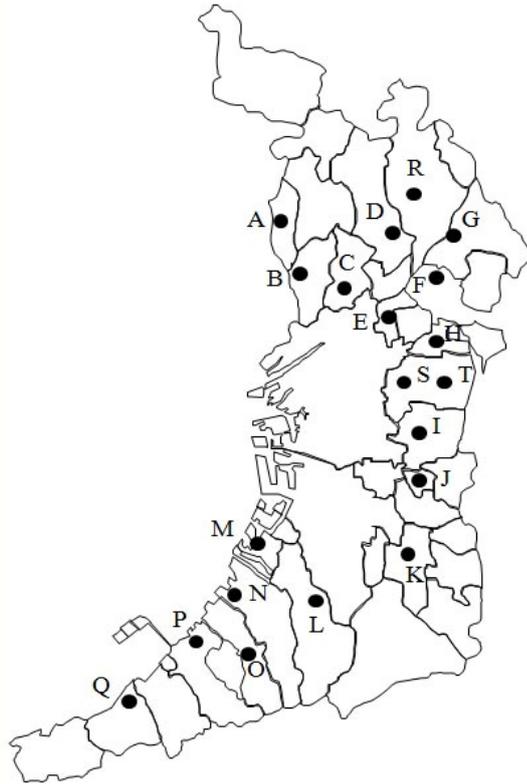
^{*3}大阪府健康医療部保健医療室地域保健感染症課

^{*4}大阪府健康医療部環境衛生課

^{*5}大阪府立公衆衛生研究所感染症部

West Nile Virus Surveillance in Osaka Prefecture
(Fiscal 2008 Report)

by Ikuko AOYAMA, Takahiro YUMISASHI, Keiko NAKATA, Isao SATO, Yoshie SATO, Takashi KURAMOCHI, Yukinari UEZAWA, Tetsuo KASE, and Kazuo TAKAHASHI



	担当保健所	設置施設名	市	
北摂	A	池田	池田市業務センター	池田市
	B	豊中	新豊島川親水水路	豊中市
	C	吹田	吹田保健所	吹田市
	D	茨木	茨木保健所	茨木市
北河内	E	守口	守口保健所	守口市
	F	寝屋川	寝屋川保健所	寝屋川市
	G	枚方	枚方保健所	枚方市
	H	四條畷	大阪府立消防学校	大東市
中南河内	I	八尾	八尾保健所	八尾市
	J	藤井寺	藤井寺保健所	藤井寺市
	K	富田林	富田林保健所	富田林市
泉州	L	和泉	和泉市立教育研究所	和泉市
	M	和泉	泉大津市消防本部	泉大津市
	N	岸和田	岸和田保健所	岸和田市
	O	岸和田	貝塚市立善兵衛ランド	貝塚市
	P	泉佐野	泉佐野保健所	泉佐野市
高槻	Q	泉佐野	はんなり浄化センター	阪南市
東大阪	R	高槻	高槻市環境科学センター	高槻市
	S	東大阪	東大阪西部	東大阪市
	T	東大阪	東大阪東部	東大阪市

図1 蚊の捕集地点

1. 捕集地点および調査実施期間

図1に示したように大阪府管内、東大阪市及び高槻市に計20カ所の定点を設定し、2008年6月第4週から10月第2週（東大阪市及び高槻市は9月第3週）までの期間、隔週の火曜日から水曜日にかけてトラップを設置し、蚊の捕集調査を実施した。

2. 蚊の捕集方法

蚊の捕集にはCDCミニライトトラップ(John W.Hock Company)を使用し、蚊の誘引のためドライアイス(1~2kg)を併用した。トラップは調査実施日の夕刻16~17時から翌朝9~10時までの約17時間設置した。

3. 蚊の同定

捕集した蚊は、各保健所において種類を同定し、種類ごとに別容器に入れて当日中に公衆衛生研究所に搬入した¹⁶⁾。同定が困難な蚊等については公衆衛生研究所で再度チェックした。アカイエカとチカイエカは外見上の区別が困難であることから、すべてアカイエカ群として分別した。

4. 蚊からのウイルス検出

各定点で捕集された蚊のうち雌を検査の対象とし、定点毎、種類毎に乳剤を作成し、ウイルス検査に用いた。1定点1種類あたりの検体数が50匹を超える場合は、複数のプールに分割した。乳剤の作成は2mLのマイクロチューブに捕集蚊とステンレス製クラッシャーを入れ、0.2%ウシ血清アルブミン(BSA)加ハanks液を250μL加えた後、多検体細胞破碎装置(シェイクマスターVer1.2システム、バイオメディカルサイエンス)で約1分振とうして作成した。破碎後のマイクロチューブを軽く遠心してからクラッシャーを除去し、0.2%BSA加ハanks液を500μL追加して攪拌した。それを4℃10,000rpmで20分間遠心し、その上清を0.45μmMillexフィルター(ミリポア)で濾過したものを検査材料とした。なお、1プール中の蚊の数の多寡により加えるハanks液を適宜調節した。検査材料のうち150μLはE.Z.N.A.Viral RNA Kit (OMEGA bio-tek)を使用してRNAを抽出し、残りの材料を細胞培養(Vero細胞、C6/36細胞)によるウイルス培養に用いた。RT-PCRは、フラビウイルス共通プライマー(Fla-U5004/5457,YF-1/3)、ウエストナイルウイルス特異

結 果

1. 蚊の捕集結果について

捕集された雌の蚊は5種3514匹であった。その構成はアカイエカ群とヒトスジシマカで99%を占めた(図2)。その他の蚊として、コガタアカイエカ、シナハマダラカ、イナトミシオカが捕集された。また、昨年まで数は少ないが毎年捕集されていたオオクロヤブカ、トウゴウヤブカは捕集されなかった。

調査期間を通じた捕集数の推移では、アカイエカ群はサーベイランス開始時より捕集数が多く、8月初めにピークを示したが、その後急減した(図3)。この傾向は昨年と同様であった。ヒトスジシマカは7月後半と9月中旬に2峰性のピークを示し、その後急減した。またアカイエカ群、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカ以外で2種捕集されたが、捕集数は少なく、捕集時期も限られていた。

定点別の捕集数では、定点により捕集数の大きな差はあるが、アカイエカ群とヒトスジシマカはすべての地点で捕集された。コガタアカイエカについては、昨年は泉州地域と東大阪でのみ捕集されたが、今年は北摂、北河内でも捕集された(図4)。シナハマダラカは富田林、貝塚、阪南の3カ所、イナトミシオカは東大阪の1カ所のみで捕集された。

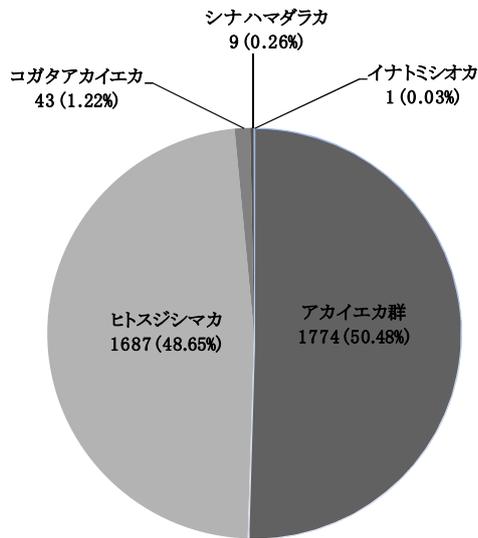


図2 捕集された蚊の種類と数及び構成比

的検出プライマー(WNNY 514/904)を用いた^{17,18)}。また、チクングニヤウイルス特異的検出プライマー(chik10294s/10573c)を用いて、チクングニヤウイルスについても遺伝子検出を試みた。

5. カラスからのウイルス検出

回収されたカラスは大阪府南部家畜保健衛生所病性鑑定室にて解剖された後、脳のみ当所にて検査を実施した。カラス毎に乳剤を作成し、蚊と同様にRNA抽出後遺伝子検査を実施した。

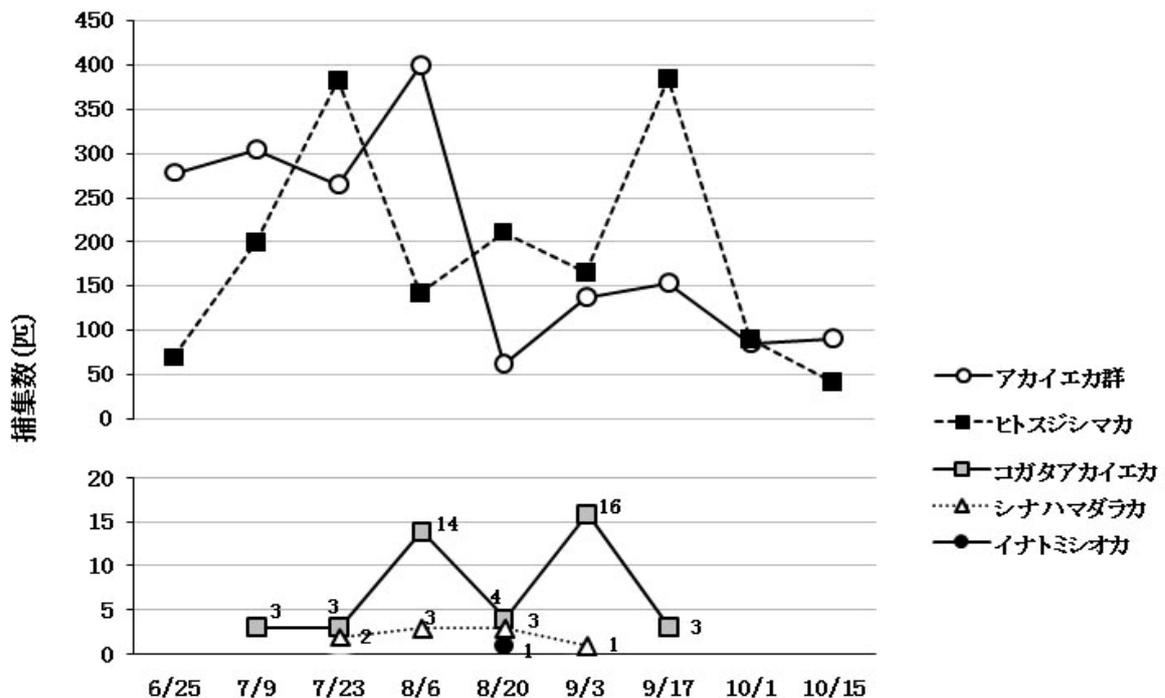


図3 蚊の捕集数の推移

考 察

2. 捕集蚊からのウイルス遺伝子検査結果

各定点で捕集された蚊を種類別に分け 338 プールの乳剤を作成して RT-PCR 法による遺伝子検査を実施したが、すべての検体においてフラビウイルス、WNV、チクングニヤウイルスの遺伝子は検出されなかった。またウイルス分離の結果も陰性であった。

3. 鳥死骸の回収数とウイルス遺伝子検査結果

今年度回収された鳥死骸 6 頭はすべてカラスで、すべての検体でフラビウイルス、WNV の遺伝子は検出されなかった。

今回の調査で捕集された蚊の種類は、アカイエカ群とヒトスジシマカが大半を占めた。昨年と比較すると、アカイエカ群とヒトスジシマカの捕集数の減少が見られたが、構成比は、昨年の結果とほぼ同様であった(図 5、6)。捕集数の推移を見るとコガタアカイエカの捕集数は昨年とほぼ同じで、大阪府全体ではこの種の生息域に変化がみられていないことが考えられた。また、今回イナトミシオカが東大阪で捕集された。イナトミシオカはこれまで大阪市や堺市におけるサーベイランスでは捕集されているが、大阪府のサーベイランスで捕集されたのは今回が初めてである。イナトミシオカ

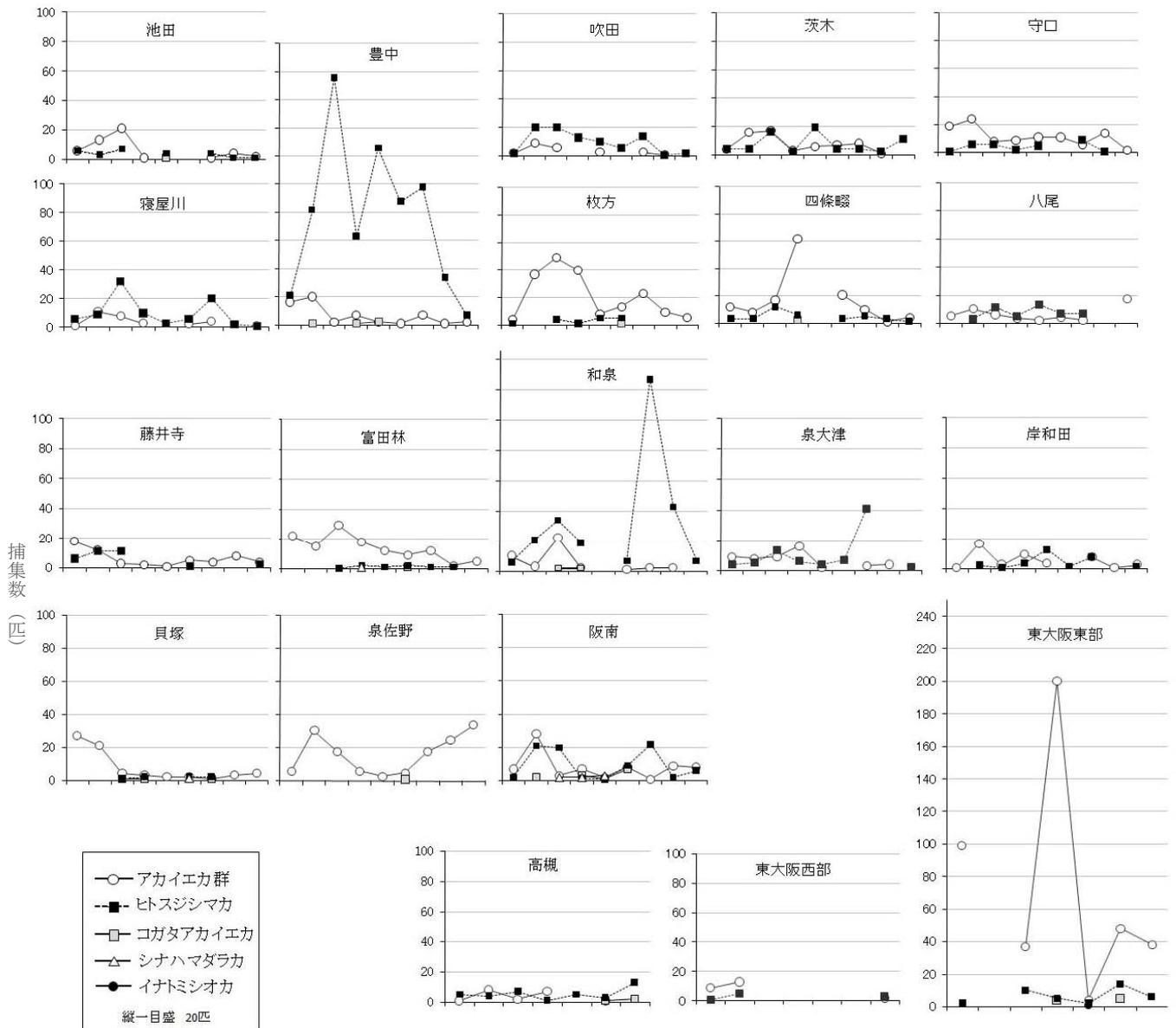


図4 定点別にみた蚊の捕集数の推移

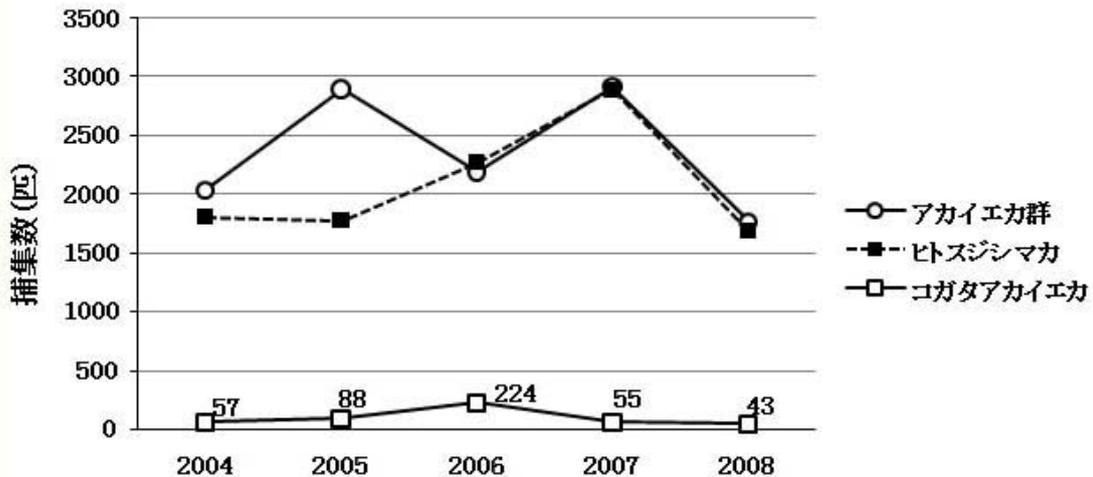


図5 蚊捕集数の5年間の推移

池田、門真・守口、阪南、東大阪西部、高槻は捕集場所の変更あり
2004,2005は門真のアカイエカ群データを除く

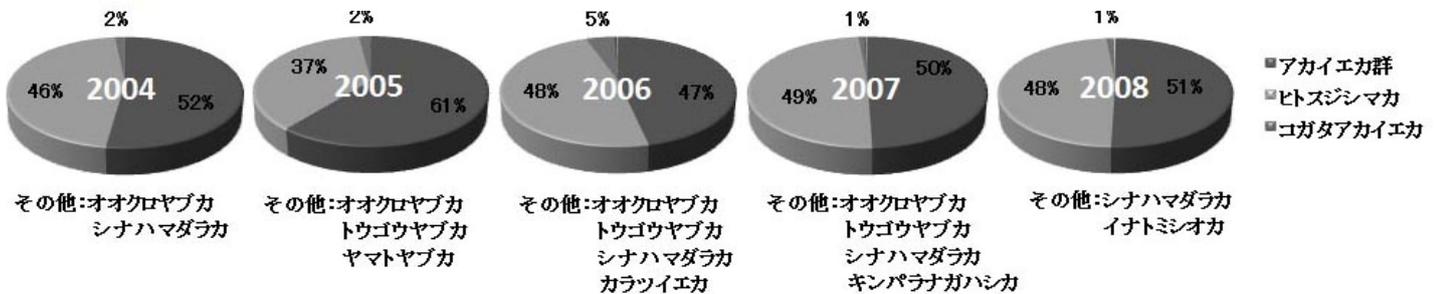


図6 捕集した蚊の種類構成

は汽水域に生息する蚊であるが、このような比較的内陸部でも捕集される場合があることが確認できた。この蚊はWNVを媒介できることが報告されており、アカイエカやヒトスジシマカ、コガタアカイエカなどと同じくWNV媒介蚊として注意すべき蚊である¹⁹⁾。

各調査地点で捕集される蚊の種類や数の変動には、気温、降水量などの気候変動と、調査実施日の天候、気温、風速などが大きく影響すると考えられる。今年度アカイエカ群もヒトスジシマカも7月後半から8月中旬にかけて捕集数が急減したが、その一因として7月末の大雨を伴う強風や、調査日の大雨など天候の影響があったことが考えられた。

定点別の捕集数では、昨年度と比較すると捕集数が増加したところは3カ所（豊中、枚方、貝塚）で、その他はほとんど減少しており、大阪府全域で捕集数が少なかったと考えられた¹⁵⁾。東大阪では、西部で4回、東部で1回捕集数が0のときがあり、昨年の捕集数から急減したが、この原因の一つとしてトラップの動作

不良が考えられた。

カラス検体については、2003年4月より2009年5月までに当所に持ち込まれた総数は66頭で、今のところWNVは検出されていない。カラスの回収について報告の多い地点はあるが、市街地、臨海、公園など様々な地点で発見され、捕集される環境に傾向はないと考えられた（図7）。

WNVについては、多くの自治体で蚊の調査が実施されている。現在のところ国内で蚊や鳥からWNVが検出されたという報告はなく、北米からの帰国者におけるウエストナイル熱輸入症例が報告されているのみである²⁰⁾。しかし、北米での流行は1999年以降毎年発生しており、終息する気配はなく、今後も輸入症例が発生する可能性が考えられる²¹⁾。

また、全地点で捕集されたヒトスジシマカはWNVだけではなく、デング熱やチクングニヤ熱のベクターとしても重要な蚊である。チクングニヤ熱は昨今大きな流行が相次いでインド洋諸島国、インド、スリランカ、

東南アジアで発生し、現在も流行は続いている。現在わが国では6例の輸入症例が報告されているが、すべて冬期から春期に起きた感染である²¹⁻²⁴。しかし、ヒトスジシマカの密度が高い夏期に、ウイルス血症をおこした有症者が帰国すれば、イタリアでインドから入国したチクングニヤ熱患者によってヒトスジシマカを介した300名前後の流行が起こったように、日本でも流行が起きる可能性はある²⁵。このような事例を考えると、今後も蚊媒介性疾患に対して監視を行っていくことが必要と考えられる。

謝 辞

本調査は、大阪府立公衆衛生研究所、大阪府健康福祉部環境衛生課(現 健康医療部環境衛生課)および各保健所の協力のもとに大阪府健康福祉部保健医療室地域保健感染症課(現 健康医療部保健医療室地域保健感染症課)の事業として実施されたものであり、調査に関係した多くの方々へ深謝致します。また、データをご提供頂いた東大阪市保健所、高槻市保健所の関係者の方々に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 高崎智彦: ウエストナイル熱・脳炎, ウイルス, 57(2), 199-206 (2007)
- 2) CDC: West Nile Virus Statistics, Surveillance, and Control
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control.htm>
- 3) Public Health Agency of Canada: West Nile Virus Monitor
<http://www.phac-aspc.gc.ca/wnv-vwn/index-eng.php>
- 4) West Nile virus -Mexico (Sonora) ProMed-mail, 20040905.2486 (2004)
- 5) Krisztalovics, K., Ferenczi, E., Molnar, Z., et al. : West Nile virus infections in Hungary, August - September 2008, Euro. Surveill.,13(45),pii:19030 (2008)
- 6) Rossini, G., Cavrini, F., Pierro, A., et al.: First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008-case report., Euro. Surveill.,13(41),pii:19002 (2008)

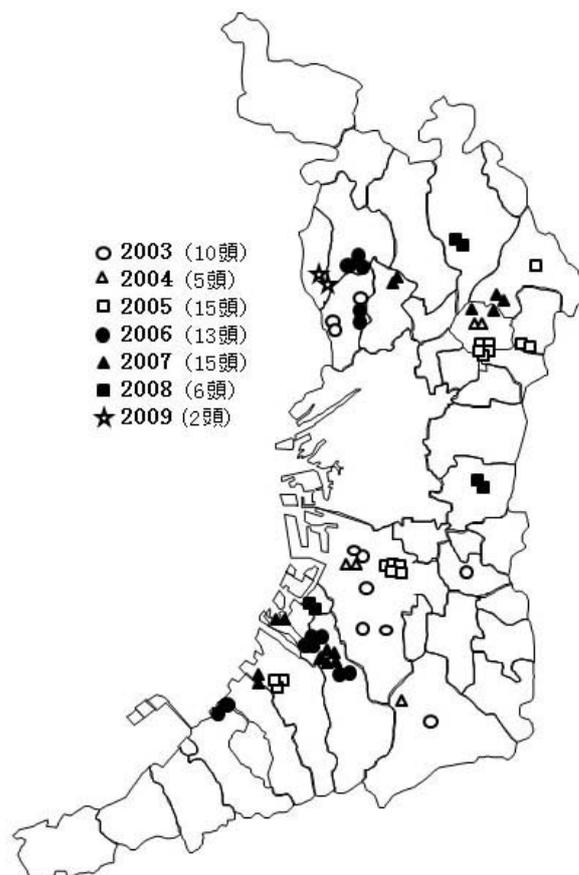


図7 カラスの回収地点 (2003年4月～2009年5月)

- 7) Morales, M.A., Barrandeguy, M., Fabbri, C., Garcia, G.B., et al.: West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. Emerg Infect Dis., 12: 1559-61. (2007)
- 8) Bosch, I., Herrera, F., Navarro, C.J., et al. : West Nile Virus, Venezuela, Emerg Infect Dis., 13, 651-653. (2006)
- 9) West Nile virus - Austria, birds, ProMed-mail, 20090214.0640 (2009)
- 10) 瀧幾子, 弓指孝博, 吉田永祥ら: 大阪府の住宅地域における蚊の分布調査, 大阪府立公衛研所報, 42, 65-70 (2004)
- 11) 弓指孝博, 瀧幾子, 齋藤浩一ら: 大阪府におけるウエストナイル熱に関する蚊のサーベイランス, 大阪府立公衛研所報, 42, 57-63 (2004)
- 12) 青山幾子, 弓指孝博, 齋藤浩一ら: 大阪府におけるウエストナイル熱に関する蚊のサーベイランス調査(平成16年度報告), 大阪府立公衛研所報, 43, 77-84 (2005)

- 13) 青山幾子,弓指孝博,齋藤浩一ら：大阪府におけるウエストナイルウイルスに関する蚊のサーベイランス調査（2005年度報告），大阪府立公衛研所報,44, 1-8 (2006)
- 14) 川淵貴子,弓指孝博,青山幾子ら：大阪府におけるウエストナイルウイルスに関する蚊のサーベイランス調査（2006年度報告），大阪府立公衛研所報,45, 1-5 (2007)
- 15) 弓指孝博,廣井聡,青山幾子ら：大阪府におけるウエストナイルウイルスに対する蚊のサーベイランス調査（2007年度），大阪府立公衛研所報,46, 9-15 (2008)
- 16) 弓指孝博,青山幾子：ウエストナイル熱（脳炎），大阪府立公衆衛生研究所感染症プロジェクト委員会編 感染症検査マニュアル第Ⅲ集, 1-13 (2004)
- 17) 国立感染症研究所 ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル Ver.4 (2006)
<http://www.nih.go.jp/vir1/NVL/WNVhomepage/WN.html>
- 18) 森田公一,田中真理子,五十嵐章：PCR法を用いたフラビウイルスの迅速診断法の開発に関する基礎的研究,臨床とウイルス,18(3), 322-325.(1990)
- 19) 江下優樹,上田泰史,水田英生ら：蚊類のアルボウイルス媒介能(9) 日本産イナトミシオカ *Culex modestus inatomii* のウエストナイルウイルス感受性, Med. Entmol. Zool.,56, 40 (2005)
- 20) 小泉加奈子,中島由紀子,松崎真和ら：本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例,感染症誌, 80, 56-57 (2006)
- 21) 水野泰孝,加藤康幸,工藤宏一郎ら：遷延する関節痛より確定診断に至ったチクングニヤ熱の本邦初症例,感染症誌, 81(5), 600-601 (2007)
- 22) 青山幾子,弓指孝博,宇野健司ら：チクングニヤ熱と確定診断されたインドからの輸入感染症症例,病原微生物検出情報 (IASR), 29,345-346.(2008)
- 23) 山本厚太,松本謙太郎,林昌宏ら：チクングニヤ熱の一症例報告,病原微生物検出情報(IASR),30,108-109 (2009)
- 24) Chikungunya : Japan ex Malaysia, ProMed-mail, 20090204.0494 (2009)
- 25) Liunbruno GM, Calteri D, Petropulacos K, et al. : The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. Blood Transfus., 6(4), 199-210. (2008)

牛肉中の駆虫剤（トリクラベンダゾール）分析法の改良

藤田瑞香* 永吉晴奈* 尾花裕孝*

牛肉中の残留トリクラベンダゾール分析法を改良し、誘導体化効率の改善を図った。牛肉への添加回収試験では、通知法と比較して回収率が15%程度改善し、6検体での平均回収率は80.1%、相対標準偏差は4%と良好な結果が得られた。

キーワード：駆虫剤、トリクラベンダゾール、高速液体クロマトグラフィー、誘導体化

Key words: Anthelmintic, Triclabendazole, HPLC, Derivatization

トリクラベンダゾールは、ベンゾイミダゾール系駆虫剤の一種で、牛の筋肉では残留基準値が0.2mg/kgと設定されている。この残留基準はトリクラベンダゾールおよびその代謝物の誘導体である5-クロロ-6-(2,3-ジクロロフェノキシ)-ベンゾイミダゾール-2-オン（以下ケトトリクラベンダゾール）として設定されており、誘導体化が必要である。厚生労働省が個別試験法としてトリクラベンダゾール試験法を通知しているが¹⁾（以下、通知法）、試料由来成分の影響により誘導体化効率が低下する傾向が認められた。そこで今回、試料由来成分を減少させ、誘導体化効率を改善させるための検討を行ったので報告する。

実験方法

1 試料

大阪府内で市販されていた牛肉を用いた。

2 試薬および器具等

2-1 標準品

トリクラベンダゾールは和光純薬工業(株)製を用いた。

2-2 試薬および器具

アセトニトリル、メタノール：関東化学(株)製高速液体クロマトグラフ用試薬

酢酸、過酸化水素、リン酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製試薬特級

その他の試薬：和光純薬工業(株)製残留農薬分析用試薬

水：ミリポア社製MILLI-Q SP. TOC.により精製して用いた

固相抽出カラム：Varian BOND ELUT C18 500mg（以下ODSカラム）、Varian BOND ELUT-FL 1g（以下フロリジルカラム）

メンブランフィルター：アドバンテック東洋(株)製DISMIC(親水性PTFE, 13mmφ, 0.45μm)

3 装置および測定条件

3-1 装置

高速ホモジナイザーはポリトロンPT10(KINEMATICA社製)、遠心分離機はhimac CR5B2(日立工機(株)製)を用いた。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)はWaters PDA System 996(Waters社製)を用いた。

3-1 分析条件

分析カラム：GL Sciences Inertsil ODS-3 (250×4.6mm, 3μm)

カラム温度：40℃ 流速：1mL/min 注入量：100μL

移動相：25mmol/L リン酸一ナトリウム：アセトニトリル：

メタノール (18：41：41)

検出波長：297nm

4 抽出および精製方法

4-1 抽出

試料5gを量りとり、アセトニトリル25mLおよび無水硫酸ナトリウム10gを加えてホモジナイズ後、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行い、アセトニトリル層を分液ロート中に移した。残留物にアセトニトリル25mLを加え攪拌後、同

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課
Improvement of Official Method for Residue Analysis of Anthelmintic (Triclabendazole) in Bovine Muscle.
by Mizuka FUJITA, Haruna NAGAYOSHI, Hirota OBANA

様に遠心分離を行い、アセトニトリル層を分液ロートに移して合わせた。ここに *n*-ヘキサン 25mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とう後、静置した。アセトニトリル 10mL を注入して前処理したフロリジルカラムに、分液ロート中のアセトニトリル層を通過させ、ナスフラスコに採取した。分液ロート中の *n*-ヘキサン層にアセトニトリル 5mL を加えて穏やかに振り、アセトニトリル層をフロリジルカラムに通過させ、ナスフラスコに合わせた。*n*-プロパノール約 10mL を加え、40℃以下で減圧乾固した。残留物にジクロロメタン約 5mL を加えて溶かし、ナスフラスコをジクロロメタン約 5mL で洗い込み、反応用耐圧試験管に移して窒素気流下で濃縮乾固した。

4-2 誘導体化

残留物にエタノール 1mL 及び酢酸 1mL を加えて溶かし、過酸化水素 1mL を加えて密栓し、よく振り混ぜた後、100℃で 2 時間加熱し、室温になるまで放置した。これに水 7mL を加え、よく振り混ぜた。

4-3 精製

メタノール 5mL および水 10mL で前処理した ODS カラムに誘導体化で得られた溶液を注入した後、水 10mL で洗浄した。メタノール 10mL で溶出し、40℃以下でメタノールを除去した。残留物に 85%アセトニトリル水溶液 1mL を加えて溶かして測定溶液を調製し、メンブランフィルターでろ過して HPLC で測定した。

結果および考察

1 LC 条件の検討

通知法では測定溶液にメタノールを用いているが、移動相に比べて極性が高く HPLC 測定時にピーク形状が著しく悪化した。そこで 85%アセトニトリルに溶解したところピーク形状は改善された。ケトトリクラベンダゾールの極大吸収波長付近で試料由来の妨害成分による吸収が少ない 297nm で定量を行った。

2 検量線および定量下限

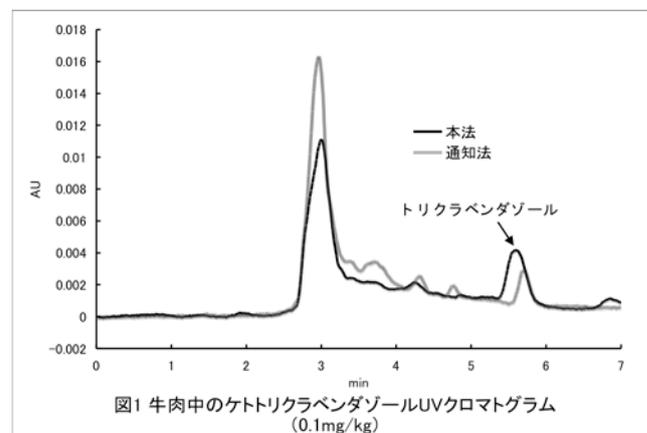
ケトトリクラベンダゾールとして 0.025~1.0mg/L となるように 0.0275~1.1mg/L のトリクラベンダゾール標準溶液を調製し、誘導体化、精製操作を行った。ケトトリクラベンダゾールとして検量線を作成したところ、決定係数 $r^2=0.999$ 以上の良好な直線性が認められた。

定量下限はケトトリクラベンダゾールとして 0.01mg/kg

であった。

3 前処理方法の検討

通知法では、アセトニトリル抽出後、ヘキサンによる脱脂を行い、アセトニトリル層を濃縮乾固して誘導体化を行っている。しかしこの方法では試料由来成分が多く、誘導体化効率が低下し、回収率に影響を与えていたと考えられた。抽出液を濃縮乾固後、残留物をエタノールに溶解すると著しく着色していた。また、ジクロロメタンを用い反応用耐圧試験管に移す時にジクロロメタンに溶解しない成分が多く認められた。このことから妨害成分は極性の高い成分であると考えられた。そこで、厚生労働省の通知試験法である HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅱ（畜水産物）¹⁾ を参考にフロリジルによる精製を検討した。アセトニトリル抽出液をフロリジルカラムに通過させることにより高極性の妨害成分を吸着させることができ、ジクロロメタンに溶解しない成分が減少した。これにより誘導体化効率も改善できたと考えられた。牛肉に通知法と本法の前処理を行って得られたクロマトグラムを図1に示した。保持時間3分付近の妨害ピークが減少し、6分付近のケトトリクラベンダゾールのピークが大きくなっていることが確認できる。



4 添加回収実験

あらかじめトリクラベンダゾールが含有していないことを確認した牛肉にトリクラベンダゾールを 0.1mg/kg 添加し、回収率を求めた (n=6)。平均回収率は 80.1%で、相対標準偏差は 4%と良好な結果が得られた。通知法と比較して回収率が 15%程度向上し、フロリジルカラムによる精製によって回収率の改善を行うことができた。

以上の結果より本法は、牛肉中のトリクラベンダゾール試験法として日常検査業務に十分使用できると考えられる。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について(通知)」平成17年1月24日，食安発第0124001号(2005)

LC/MS/MSによる畜水産食品中のサルファ剤一斉分析法の検討

藤田瑞香* 柿本健作* 山口貴弘* 尾花裕孝*

畜水産食品中の残留サルファ剤10種類の一斉分析法を高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いて検討した。2種類の固相カラムを使用することにより、多種類の試料の精製が可能となった。さけへの添加回収試験の結果、回収率は74~89%、相対標準偏差は7%以下と良好であり、日常の検査業務に適用できる試験法を確立することができた。

キーワード：サルファ剤、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計、畜水産食品

Key words: Sulfonamides, LC/MS/MS, livestock products and seafood

サルファ剤は広い抗菌スペクトルを有する合成抗菌剤の一種で動物用医薬品として広く使用されており、食品衛生法により残留基準が設定されている。当所では、以前よりサルファ剤の分析を行っているが、試料によっては試料由来の成分により分析が妨害されることがあった。そこで今回、試料の前処理方法を改善し、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いた分析法の検討を行ったので報告する。

実験方法

1 試料

大阪府内で市販されていたさけ、たら、鶏肉、牛乳を用いた。

2 試薬および器具等

2-1 標準品

スルファチアゾール(STZ)、スルファメラジン(SMR)、スル

ファジミジン(SDD)、スルファモノメトキシ(SMMX)、スルファクロルピリダジン(SCPD)、スルファドキシ(SDOX)、スルファメトキサゾール(SMXZ)、スルファジメトキシ(SDMX)、スルファキノキサリン(SQ)は関東化学(株)製、スルフィソゾールナトリウム(SIZ)は畜水産品残留安全協議会製を用いた。

2-2 試薬および器具

アセトニトリル、メタノール：関東化学(株)製高速液体クロマトグラフ用試薬

その他の試薬：和光純薬工業(株)製残留農薬分析用試薬水：ミリポア社製MILLI-Q SP. TOC. により精製して用いた。

固相抽出カラム：Varian社製Bond Elut Jr-C18(500mg)(以下ODS)、Waters社製Sep-Pak Plus Alumina B(以下Alumina B)

メンブランフィルター：アドバンテック東洋(株)製DISMIC(親水性PTFE, 13mm ϕ , 0.2 μ m)

3 装置

高速ホモジナイザーはポリトロンPT10(KINEMATICA社製)、遠心分離機はhimac CR5B2(日立工機(株)製)を用いた。LC/MS/MSはAQUITY UPLC-Quattro Premier XE(Waters社製)を用いた。

4 LC/MS/MS測定条件

分析カラム：Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(150 \times 2.1 mm 1.7 μ m)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C、流速：0.2mL/min、注入量：10 μ L

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課
Multiresidue Method for the Determination of Sulfonamides in Livestock products and Seafood Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry
by Mizuka FUJITA, Kensaku KAKIMOTO, Takahiro YAMAGUCHI, Hirotaka OBANA

移動相：A液；0.1%ギ酸5%メタノール水溶液 B液；
5%メタノールアセトニトリル溶液

グラジエント条件：B液5-15% (10min)、15-75 (7min)

イオン化モード：ESI(+)、イオン源温度：120°C

脱溶媒ガス温度および流量：窒素 350°C、900L/hr

コーンガス流量：窒素 50L/hr

化合物ごとの条件は表1に示した。

表1 LC/MS/MS parameters for the determination of

	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
STZ	256	156	34	16
		92		28
SMR	265	92	28	25
		108		25
SDD	279	186	34	17
		92		31
SIZ	240	92	22	25
		156		11
SMMX	281	156	22	26
		126		31
SCPD	285	156	34	16
		92		34
SDOX	311	156	25	16
		92		28
SMXZ	254	92	25	30
		156		15
SDMX	311	156	28	22
		92		28
SQ	301	92	30	34
		108		22

4 抽出および精製方法

4-1 抽出法

試料5gを50mL遠心チューブに量り、無水硫酸ナトリウム10gおよびアセトニトリル25mLを加えホモジナイズ後、毎分3000回転で5分間遠心分離した。上清を100mLの分液ロートにろ紙でろ過して移し、残渣にアセトニトリル25mLを加えて攪拌後毎分3000回転で5分間遠心分離した。上清を同様にろ過して先のろ液と合わせ、*n*-ヘキサン40mLを加えて、振とう機を用いて5分間振とう後、静置し、下層をナスフラスコに集めた。*n*-プロパノールを約10mL加え約40°

Cで減圧乾固した。残留物に*n*-プロパノール3mLを加えて溶かした。

4-2 精製法

アセトニトリル5mLを通液して前処理したAlumina Bに抽出法で得られた溶液を注入し、ナスフラスコを*n*-プロパノール2mLで洗い込み、続けてカラムに注入した。カラムをアセトニトリル5mLで洗浄し、あらかじめアセトニトリル5mL、水5mLを通液して前処理したODSカラムを下に接続し、85%アセトニトリル水溶液10mLで溶出した。溶出液に*n*-プロパノールを約3mL加え約40°Cで減圧乾固し、アセトニトリル-水の混液(1:9)を1mL加えて溶かし、メンブランフィルターでろ過し、これを試験用液とした。

結果および考察

1 LC/MS/MS 条件の検討

1-1 MS/MS 条件の検討

イオン化にはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を選択し、マルチプルリアクションモニタリング(MRM)法で測定を行った。イオン化モードは感度が良好であったポジティブモードを採用した。

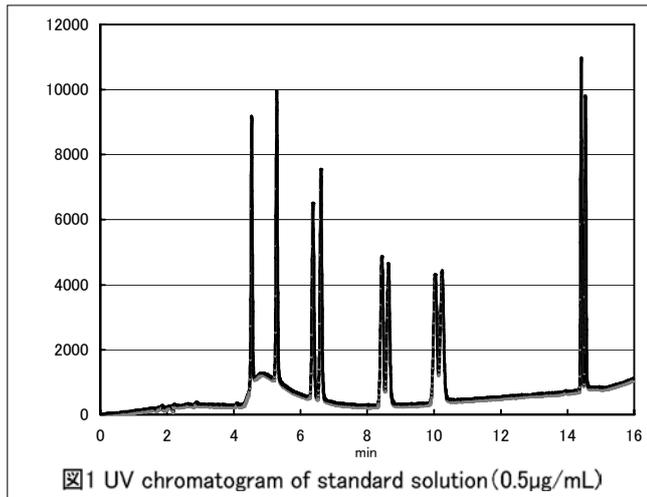
1-2 LC 条件の検討

イオン化モードがESI(+)であったため移動相にプロトンを供与するため0.1%ギ酸を用いた。また、UV265nmでの同時測定を行うため各ピークの完全分離を検討した。移動相に5%となるようメタノールを加え、グラジエント条件を検討したところ、10種類のサルファ剤のピークを分離することができた(図1)。

1-3 検量線および定量下限

0.05~0.5mg/Lの標準溶液を調製し、絶対検量線を作成したところ、すべてのサルファ剤で決定係数 $r^2=0.99$ 以上の良好な直線性が認められた。

定量下限は0.01mg/kgとした。



2 前処理方法の検討

本法は厚生労働省通知の個別試験法であるスルファジミジン試験法（以下、通知法）を基にしている¹⁾。通知法では中性アルミナ固相カラムに試料を95%アセトニトリル溶液で負荷することとなっているが、サルファ剤の保持が十分ではない。そこで、酸性物質であるサルファ剤を保持させるため塩基性アルミナを使用することとした。また、95%アセトニトリル溶液で負荷を行うと、十分に保持されないサルファ剤があった。そのためn-プロパノールに溶解し、Alumina Bに注入し、アセトニトリルで洗浄を行うこととしたところすべてのサルファ剤が保持された。さらに試料によっては低極性物質が十分に除去できなかったので溶出時にODSを連結し精製を行った²⁾。これにより、Alumina Bのみの精製では除去できなかった色素性分も除去できた。その結果、様々な種類の試料に対応できる前処理方法を確立できた。また、マトリックス添加標準溶液を用いることなく定量を行うことが可能となった。

3 添加回収試験

あらかじめ対象のサルファ剤が含有していないことを確認した後にサルファ剤0.03mg/kgを添加し、回収率を求めた(n=6)。平均回収率は74~89%で、相対標準偏差は7%以下と良好な結果が得られた。また、同時に測定したUVでの定量でもほぼ同様の結果であった。その他の試料での添加回収試験結果を表2に示した。たらおよび鶏肉の一部のサルファ剤を除いては良好な結果であった。この理由としては妨害成分の除去が不十分であったためと思われる。

4 まとめ

以上より、本法は簡易で十分な定量精度が得られることから、日常分析法として利用できると考えられる。

2 Recoveries of sulfonamides from livestock products and seafood

	Average recoveries% (RSD%)			
	Salmon (n=6)	Pacific cod (n=3)	milk (n=2)	chicken (n=6)
STZ	85 (6)	67 (9)	70	60 (9)
SMR	80 (6)	68 (5)	92	73 (11)
SDD	89 (4)	74 (15)	89	71(13)
SIZ	84 (2)	85 (7)	116	66 (15)
SMMX	81 (3)	80 (3)	85	66 (13)
SCPD	74 (7)	63 (10)	79	74 (11)
SDOX	82 (4)	82 (6)	86	71 (11)
SMXZ	80 (5)	75 (15)	84	70 (12)
SDMX	87 (3)	85 (20)	99	70 (12)
SQ	74 (7)	57 (4)	70	71 (9)

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について(通知)」平成17年1月24日、食安発第0124001号(2005)
- 2) 藤田瑞香, 田口修三, 尾花裕孝: ガラスビーズ粉砕法を用いたLC/MS/MSによる畜水産食品中のサルファ剤の分析, 食品衛生学雑誌, 49, 411-415 (2008)

食品中亜硝酸根の小スケール迅速分析法の検討

野村千枝* 吉光真人* 阿久津和彦* 尾花裕孝*

当所で実施する食品中の亜硝酸根 (NO_2^-) 濃度の比色検査において、これまで一部の高タンパク・高脂質試料(魚卵等)の抽出液が発泡・白濁する例が認められ、検査手順のろ過・定容操作の遅延化・煩雑化の要因となっていた。そこで、操作時間の短縮および試薬量の削減を目的としてディスポーザブル遠心管を用いる簡便迅速な前処理法について検討した。その結果、前処理法は従来法と比較して操作時間が約1/2に短縮、試薬量が1/4に削減されたことから、本迅速分析法は亜硝酸根検査の操作性の向上に有用であることが確認された。

キーワード: 食品、亜硝酸根 (NO_2^-)、比色法、小スケール法、ディスポーザブル遠心管

key words: food, nitrite, colorimetric method, small-scale method, disposable centrifugation tube

亜硝酸ナトリウムは食肉製品や魚卵等に発色剤の用途で使用が認められている食品添加物である。使用基準は亜硝酸根(亜硝酸イオン、 NO_2^-)としての最大残存量で、食肉製品では70 $\mu\text{g/g}$ 以下、魚肉ソーセージおよび魚肉ハムでは50 $\mu\text{g/g}$ 以下、いくらや筋子、たらこでは5.0 $\mu\text{g/g}$ 以下と定められている¹⁾。

亜硝酸根の分析は、食品中の亜硝酸塩を弱アルカリ性条件下で抽出し、除タンパク処理後、ジアゾ化による発色を利用した比色法により行うのが一般的である²⁻⁴⁾。当所においても、食品衛生検査指針(2003)³⁾に記載された亜硝酸根定量法を基にして栗津らが一部改良を加えた変法⁵⁾を用いて行政検査を実施している。

しかし従来の検査において、タンパク質・脂質が多い魚卵や食肉製品で、除タンパク処理不足による試料溶液への夾雑物の残存やろ過速度の低下が問題となる例が認められた。すなわち従来法では、ホモジナイズ抽出・除タンパク処理後、遠心分離し、上清を200 mL容のメスフラスコに移し水で定容した後、一部をろ紙

No. 5Cによりろ過し試験溶液としていたが、魚卵のように可溶性タンパクを多く含む発泡しやすい試料の場合、定容時にメスフラスコ内液上部の発泡層の厚さが5 mmを超え定容が困難になることが多かった。そのため、従前は定容前に泡が収まるまで20分間~1時間程度の静置時間を必要とし、この静置操作が試験操作の律速段階となっていた。また、魚卵等では遠心後にも卵膜等の固形物が上清に浮遊し、正確な定容操作を妨害することがあった。これらの試料については、試料量を削減して再分析することで夾雑物の影響を抑えることが可能であったが、必然的にこの方法は試験溶液中の亜硝酸根含量の低下を伴うことから、定量下限値(0.5 $\mu\text{g/g}$)付近の亜硝酸根を含む試料の測定が困難となる問題があった。

そこで、操作時間の短縮および試薬量の削減を目的として、ディスポーザブル遠心管を用いる小スケールかつ簡便迅速な前処理法について検討を行ったので報告する。

方法

1. 試料

試料は大阪市内で購入した亜硝酸ナトリウム使用表示のないハム、魚肉ソーセージ、たらこを添加回収試験に供し、亜硝酸ナトリウム使用表示のあるたらこ、

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Studies on a Small-Scale Method for the Rapid Determination of Nitrite Ion in Foods
by Chie NOMURA, Masato YOSHIMITSU, Kazuhiko AKUTSU, and Hiroataka OBANA

ハム、ロースハム、ベーコン、フィッシュハム、鯨ベーコンを陽性検体として用いた。

2. 標準溶液および試薬

標準品および試薬類はいずれも和光純薬工業製の試薬特級品を用いた。なお、ろ紙は ADVANTEC 製の定量ろ紙 No.5A および No.5C を用いた。

亜硝酸根標準溶液：亜硝酸ナトリウム 30 mg (亜硝酸根として 20 mg 相当) を正確に量り精製水 (以下、水) に溶解して 200 mL としたものを調製し、亜硝酸根として 100 µg/mL 標準原液とした。この標準原液を水で適宜希釈し、亜硝酸根標準溶液とした。

0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 10 g を水 500 mL に溶解した。

9% (w/v) 酢酸亜鉛溶液：酢酸亜鉛二水和物 45 g を水 500 mL に溶解した。

飽和ホウ酸ナトリウム溶液：四ホウ酸ナトリウム十水和物 5 g を温水 100 mL に溶解後、冷却した。

スルファニルアミド溶液：スルファニルアミド 0.5 g を加温した塩酸 (1→2) 溶液 100 mL に溶解後冷却した。

ナフチルエチレンジアミン溶液：N- (1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸 0.12 g を水 100 mL に溶解した。

3. 機器

フードプロセッサーは SQ-7 (東芝製) を用いた。高速ホモジナイザーはポリトロン PT10 (KINEMATICA 製) を使用し、シャフトは PT20S または PT10S を用いた。高速冷却遠心機は、himacSCR20B (日立工機製) を使用し、ローターは RPR12-2 または R12A5 を用いた。恒温振とう槽は WL-1 (宮本理研製) または BW100 (ヤマト科学製) を用いた。分光光度計は UV-3600 (島津製作所製) を用いた。

4. 試料溶液の調製

試料溶液の調製法について従来法と改良法を比較した。操作の詳細は図 1 に示した。いずれの方法においても、水を試料として同様に操作し、空試料液を調製した。

従来法：食品衛生検査指針食品添加物編³⁾の変法⁵⁾。試料 10 g に 80°C の温水 80 mL を加えてホモジナイズ後、水酸化亜鉛ゲルで試料中のタンパク質および脂質を除去し、試料溶液を調製した。

改良法：従来法を 1/4 に小スケール化し、80°C 加温時に恒温振とう槽による自動振とう操作を加えた。さらに従来法の定容操作の前にもろ紙 No. 5A によるろ過工程を追加した。

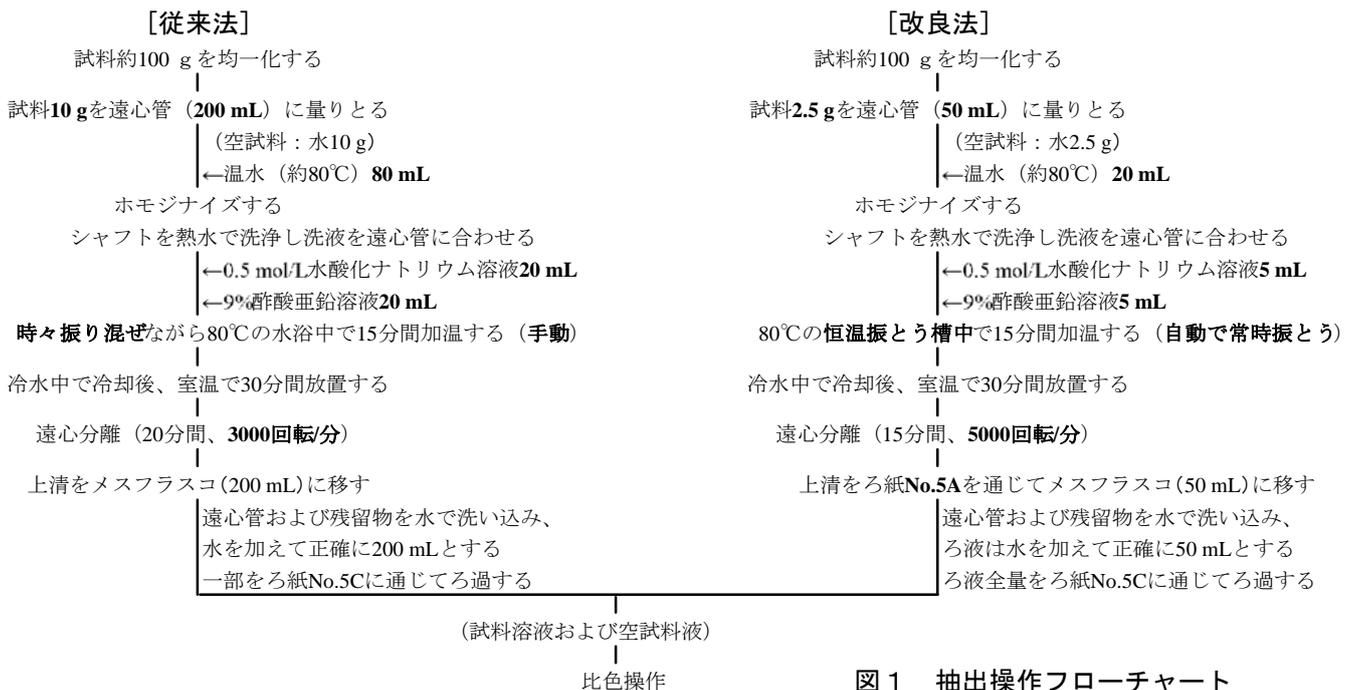


図 1 抽出操作フローチャート

5. 比色操作および測定

原材料欄にアスコルビン酸等還元剤の使用表示のある検体や、一部の魚卵試料（たらこ等）においては、発色操作時の試料溶液の採取量が多いほど、亜硝酸根の測定値が低くなることが報告されている^{5, 6)}。また、アスコルビン酸等の還元性物質は、発色操作時に亜硝酸根の分解反応を促進することが知られており、この影響を最小化するためにはジアゾ化反応の迅速化等が有効であることが示唆されている⁶⁾。測定値の低下を防止するためには、発色操作に供する試料溶液量を少なくし、試料成分に対する発色試薬の相対比率を高めることが効果的である。そこで定量可能な範囲内で、発色操作に供する試料溶液量を可能な限り削減して発色操作を行うこととした。

試料溶液 2~20 mL を 25 mL 容メスフラスコに正確に採取し、スルファニルアミド溶液 1.0 mL を加えてよく混和し、次にナフチルエチレンジアミン溶液 1.0 mL を加えてよく混和し発色させた。これに水を加えて正確に 25 mL とした後、室温で 20 分間放置した。放置後、分光光度計を用いて波長 540 nm の吸光度を測定し、予め亜硝酸根標準溶液を用いて作成した検量線より亜硝酸根濃度を求めた。空試料液についても同様の発色処理を行い、その吸光度値で試料発色液の吸光度値を補正した。なお、濁りや着色のある試料溶液については、空試料液 20 mL に塩酸（1→2）溶液 1 mL を加え、全量を 25 mL としたものを検体ブランク液とし、その吸光度値で試料発色液の吸光度を補正した。

結果および考察

1. 試料溶液調製法

(1) ろ紙 No. 5A によるろ過操作の追加

定容時の妨害となる遠心後に浮遊する卵膜等の固形物や泡を除くために、ろ紙 No. 5A を用いたろ過操作（以下、5A ろ過）について検討した。まず、ろ過操作の追加が回収率に影響を及ぼすか否かを検証するために、従来法を用いて 5A ろ過なし・ありの 2 種類の条件における添加回収試験を実施した。

水を試料として、定量下限値の倍量（1.0 μg/g）およびたらこの使用基準値の半量（2.5 μg/g）の添加濃度で各 3 回繰り返して添加回収試験を行った。その結果、表 1 に示した通り、いずれの条件においても良好

表 1 ろ過の有無による亜硝酸根回収率の比較

亜硝酸根			
添加量 (μg/g)	平均回収率 (%) ±SD, n=3		比 ^{*1)}
	5A ろ過なし	5A ろ過あり	
1.0	104.0±1.9	102.0±0.8	1.0
2.5	100.6±1.1	96.8±2.0	1.0

*1) 比=5Aろ過あり/5Aろ過なし

な回収率が得られ、5A ろ過の追加による影響は認められなかった。そこで改良法では、定容前に 5A ろ過操作を追加して上清中の浮遊物を除去することにした。

(2) 実験方法の小スケール化

操作時間の短縮と試薬量の削減を目的として実験方法の小スケール化について検討した。改良法では試料の抽出・遠心時に使用する遠心管をこれまでの 200 mL 容から 50 mL 容に変更することにより、恒温振とう槽および遠心分離機に配架可能な遠心管数が約 2~4 倍に増加し操作性が向上した。さらに、従来 3000 回転/分であった遠心速度を 5000 回転/分まで上昇させることが可能となった。遠心速度の上昇により、遠心上清中に残留する浮遊物および白濁成分が明らかに減少し、ろ過速度も改善されたことから、改良法では 5000 回転/分の遠心速度を基本条件とした。以上の改良により発泡が減少し、定容時のメスフラスコ内液上部の泡の高さはすべて 5 mm 以下となり、定容前の静置時間が短縮され、一連の操作時間は約半分に減少した。

2. 添加回収試験

試料に亜硝酸根使用表示のない 3 検体を用いて添加回収試験を行い、従来法および改良法を比較した（表 2）。添加量は定量下限値の 2 倍量（1.0 μg/g）および当該食品に設定されている使用基準値の半量とした。従来法で平均回収率および標準偏差（SD）が 71.0~85.9% および 0.7~3.3 であったのに対し、改良法では 79.7~100.9% および 0.2~2.0 であり、従来法と比較して改良法では全体的な回収率および精度（SD）の向上が認められた。なお、いずれの検体についても、改良法の平均回収率は従来法より高い値を示し、その相対比は 1.1~1.2 と概ね一定であった。これは自動振とう操作および高速遠心操作の追加により、従来法と比較して添加回収率が向上したためであると考えられた。

表2 従来法と改良法による亜硝酸根回収率の比較

試料	亜硝酸根				比 ^{*1)}
	試料溶液採取量(mL)	添加量(μg/g)	平均回収率(%) ±SD、n=5		
			従来法	改良法	
たらこ	10	1.0	74.1±3.3	79.7±2.0	1.1
	10	2.5	76.3±3.2	80.7±1.5	1.1
魚肉ソーセージ	10	1.0	71.0±1.5	80.3±1.2	1.1
	2	25.0	73.5±0.7	83.2±1.1	1.1
食肉製品	10	1.0	85.9±1.2	100.9±1.1	1.2
	2	35.0	81.0±1.1	92.9±0.2	1.1

*1) 比=改良法/従来法

表3 従来法と改良法による亜硝酸根定量値の比較

試料	亜硝酸根			比 ^{*1)}
	試料溶液採取量(mL)	平均値(μg/g) ±SD、n=3		
		従来法	改良法	
たらこ	10	0.8±0.05	1.1±0.02	1.4
フィッシュハム	5	8.5±2.2	9.8±0.9	1.2
ハム	2	11.5±0.2	16.2±0.2	1.4
ロースハム	5	7.5±0.05	8.2±0.08	1.1
ベーコン	2	13.9±0.08	18.7±0.1	1.3
鯨肉ベーコン	2	13.5±0.5	18.6±0.6	1.4

*1) 比=改良法/従来法

3. 陽性検体の分析

陽性検体の分析を行い、従来法と改良法を比較した(表3)。試料に亜硝酸ナトリウム使用表示のある6検体、たらこ、フィッシュハム、ハム、ロースハム、ベーコン、鯨ベーコンを用いた。分析の結果、改良法では従来法の約1.1~1.4倍の定量値が得られた。この比率は前述した両者の添加回収率の比率と概ね同程度であることから、従来法に比べ改良法における回収率が向上したことが同程度の比率となった要因であると考えられた。また、改良法で得られた定量値は、試料中の亜硝酸根濃度の真値をより正確に反映していると推測された。定量値の精度については、試料ごとの精度は従来法とほぼ同等の値が得られた。

まとめ

従来法を1/4に小スケール化し、定容前にろ紙No. 5Aによるろ過操作を追加することにより、操作の簡便化および迅速化を達成した。また、自動振とう操作および高速遠心操作を追加することにより、従来法と比較

して添加回収率が向上した。さらに従来法とほぼ同等の精度が得られたことから、改良法は亜硝酸根の迅速分析法としての有用性が確認された。

文献

- 1) 食品、添加物等の規格基準、昭和34年12月28日付厚生省告示第370号
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005，p. 330~331，金原出版，東京（2005）
- 3) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編，p. 142~148，日本食品衛生協会，東京（2003）
- 4) 辻澄子，今井昌也，三島郁子，石光進，柴田正，伊藤誉志男：比色定量法による食品中の亜硝酸根の試料溶液調製法の検討，衛生化学，**43**，305~310（1997）
- 5) 粟津薫，北川幹也，尾花裕孝，田中之雄：大阪府立公衛研所報，**45**，47~52（2007）
- 6) 平間祐志，西村一彦，中野道晴：ジアゾ化法によるタラコ中の亜硝酸イオンの定量における塩酸の効果，北海道立衛生研究所所報，**44**，69~72（1994）

母乳中の残留性有機汚染物質 (POPs) 汚染調査 (第19報)

-POPs 簡易測定法の開発とモニタリング調査の最終報告-

小西 良昌* 柿本 健作* 阿久津 和彦* 尾花 裕孝*

1972年度より継続している大阪府内在住授乳婦の母乳中の残留性有機汚染物質 (POPs) 調査を実施した。PCBs や DDT 等の有機塩素系化合物による母乳汚染は 70 年代半ばの最も高濃度時に比べて、2008 年度現在約 1/8~1/70 にまで低下し、その低レベル域で今世紀以降平衡状態にあり、危険水域を大きく下回っている。PCBs の減少速度は化合物の中で最も遅く、残留性が高い。これら食物連鎖、特に魚介類摂取由来による曝露が起因である POPs に対し、白アリ駆除剤クロルデン (CHL) や 2,3,3,3,2',3',3'-Octachlorodipropyl ether (S-421)、臭素系難燃剤 Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) は毎年数名の高濃度曝露された母乳があり、室内からの直接・間接的な汚染が推測された。精製法について、従来法では微量分析測定が困難かつ煩雑なため、前処理方法の改良を開発した。37 年間継続されてきた当調査は種々の理由により、今年度限りで幕を閉じる。

キーワード : 母乳、残留性有機汚染物質、PCBs、クロルデン、環境汚染

key words : human milk, persistent organic pollutants (POPs), PCBs, chlordane, environmental contamination

大阪府では、国の補助金を得て 1972 年度より、大阪府健康福祉部保健医療室地域保健福祉室健康づくり課を実施主体として府保健所、保健センター、大阪市、堺市、東大阪市の協力のもと、「大阪府母乳栄養推進事業」を現在に至るまで行ってきた。大阪府内在住、出産後 1 ヶ月から 3 ヶ月の授乳婦を対象に、母乳中の残留性有機汚染物質 (POPs) モニタリング継続調査を行い^{1,2,3)}、年に一度、大阪府健康福祉部保健医療室地域保健福祉室健康づくり課の主催により、「大阪府母乳栄養推進事業検討委員会」を開催し、事業結果に基づいて、母乳哺育の安全性の確認等、総合的な判断を下し

てきた。結果、母乳哺育による乳児への危険性等報告事例は一度も無く、母乳栄養の優秀性を考慮したリスク評価から、母乳育児を推進して差し支えないという委員会の結論に至ってきた。

しかしながら、白アリ駆除剤として使用されてきたクロルデン (CHL) については、依然比較的高濃度の母乳が存在した。また、別の調査研究により床下等に散布した CHL が、台所に保管している精米に吸着するという結果を得た^{4,5,6)}。

近年の食生活の変化、特に動物性脂肪摂取の増加や、スクワレン等新たな脂質類摂取は、母乳中の脂肪組成に大きく影響を与えていると思われる。その影響から、母乳中 POPs 分析で行ってきた従来の抽出・精製法⁷⁾では、脂肪酸由来と思われる夾雑物の影響により、POPs 濃度を正確に測定することが困難になってきた。また、従来の精製法は非常に煩雑かつ、微量分析の処理法としては不十分で、正確な分析値を得るに厳しい。そこで、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) と硫酸シリカゲルカラムによる精製法を検討した。非常に簡

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Surveillance of Persistent Organic Pollutants in Human Breast Milk (19 th report) - Development of POPs simplified assay and the final report of monitoring study -

by Yoshimasa KONISHI, Kensaku KAKIMOTO, Kazuhiko AKUTSU and Hiroataka OBANA

易であり、かつ GC/MS クロマト上の夾雑物も非常に少ない。前報⁷⁾以降、2004～2008 年度の調査結果も併せて報告する。37 年間継続されてきた当調査は、残念ながら諸事情により、今年度で幕を閉じる。

なお、本調査は大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査委員会の承認を受けている。

調査方法

1. 試料

大阪府内の保健所・保健センターを通じて、府内在住の出産後 1 ヶ月～3 ヶ月の授乳婦（初産者のみ）より提供を受けた母乳について分析を行った。試料数は 2005 年 57 例、2006 年 58 例、2007 年 58 例、2008 年 57 例（いずれも 11～12 月）であった。分析化合物は PCBs、Hexachlorobenzene (HCB)、 β -HCH、DDT 関連物質として *p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、*o,p'*-DDT の 4 種、Heptachlor epoxide (HCE)、CHL 関連物質として Oxychlorodane (Oxy)、*trans*-Nonachlor (*t*-Nona)、*cis*-Nonachlor (*c*-Nona) の 3 化合物とした。2006 年度からは有機リン系殺虫剤の共力剤として使用されている 2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropyl ether (S-421) を、2007 年度からは臭素系難燃剤 Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) を分析対象に加えた。なお、PBDEs は主要な 4 種異性体 (#47, #99, #100, #153) の合計値を PBDEs 濃度とした。

2. 分析方法

母乳は搬入後、全量にシュウ酸カリウム 1 g と母乳と等量のエタノールを加えて脂肪球を破壊した後、母乳の半量のジエチルエーテルとヘキサン 100 mL を加えて振とうし、乳脂肪を抽出した。ヘキサン層を脱水・濃縮し、得られた濃縮液を窒素気流下で恒量になるまで、さらに濃縮して脂肪重量 (%) を求めた。

POPs 分析 (PCBs を除く) には乳脂肪各 0.5 g を、内部標準物質にはラベル化した ¹³C δ -HCH を使用した。

乳脂肪を GPC 移動相溶液 2.5 mL に溶解し、そのうちの 2 mL を GPC に負荷した。得られた溶液を減圧濃縮し 44%硫酸シリカゲル 1 g に負荷、ヘキサン 10 mL により溶出した。その溶出液を濃縮して 1.0 mL に定容

し、GC/MS 用試験溶液 (PCBs を除く) とした。以下に条件を示す。

- ① GPC 条件カラム : Shodex EV-G+EV-2000 AC(40°C)
移動相 : アセトン/シクロヘキサン(3:7) 5 mL/min
- ② GC/MS 条件 日本電子製 GCmate (分解能 3,000)、注入口温度 : 250°C、注入法 : スプリットレス、2 μ L、カラム : Rtx-1MS (15m \times 0.25mm ϕ , 膜厚 0.1 μ m)、昇温条件 : 100°C (2min)-10°C/min-310°C (3min)、キャリアーガス : He (1mL/min)、イオン源温度 : 280°C、トランスファーライン温度 : 310°C、イオン化エネルギー : 35eV、モニターイオン(m/z) : HCH (218.9, 220.9), HCB (283.8, 285.8), HCE (352.8, 354.8), Oxy (386.8, 388.8), *t*-Nona (408.8, 406.8), *c*-Nona (408.8, 406.8), *p,p'*-DDE (246.0, 248.0), *p,p'*-DDD (235.0, 237.0), *p,p'*-DDT (235.0, 237.0), *o,p'*-DDT (235.0, 237.0), TeBDE(#47) (485.7, 483.7), PeBDE(#99,#100) (563.6, 565.6), HxBDE(#153) (643.5, 641.5), S-421 (129.9, 131.9), ¹³C δ -HCH (224.9, 226.9)。検出下限値は、各 0.1 ng/g とした。

PCBs 分析は、従来法⁷⁾に酸分解を加え、さらに精製を強化した。乳脂肪 0.2 g を共栓遠沈管に秤量し、2 N 水酸化カリウム/エタノール溶液で一夜室温アルカリ分解、ヘキサン抽出後、水洗・濃縮した溶液をフロリジル (1g) に負荷し、約 8 mL のヘキサンで溶出した。正確に 0.5 mL に濃縮後、硫酸約 0.5 mL で酸分解を行った。水洗したヘキサン溶液に少量の無水硫酸ナトリウムを加え、PCBs 用試験溶液とした。定量は、パックドカラム (2%OV-1) 付 ECD-GC (島津製 GC-14BP) を用い、KC-500 を標準品として、パターン法により総 PCBs 量を測定した。検出下限値は、10 ng/g とした。

結果および考察

2005 年度までは、アセトニトリル抽出分配とフロリジル湿式カラム、GPC による精製を行ってきたが、低濃度の POPs を測定するには、クロマトグラム上に多くの夾雑ピークが残り、不十分であった。そこで新たな精製法として、硫酸シリカゲルカラムによる精製を試みた。硫酸シリカゲルを使用すれば、脱脂肪は GPC のみで十分であり、煩雑な分析工程が省略でき、迅速かつ、正確なクロマトグラムを得ることが出来た。図 1 に GPC の溶出パターンを示した。また、既報⁷⁾では

分離不可能であった DDT 関連物質 (*o,p'*-DDT, *p,p'*-DDD) も検出可能となった。*p,p'*-DDD は *p,p'*-DDE 同様、DDT の代謝物で強い毒性を有する。DDT には *p,p'* 体 *o,p'* 体の核スピン異性体が存在するが、*o,p'*-DDT が外因性エストロゲン作用を有するのに対して、*p,p'*-DDT には無いと報告されている⁸⁾。このように DDT 類の詳細な分析が可能となったが、精製に硫酸シリカゲルカラムを使用した場合、Heptachlor epoxide (HCE) と Dieldrin は酸に弱く分解するので、定量不可能になった。

PCBs や DDT による人体汚染が問題となった 1970-80 年代、POPs 曝露による慢性毒性評価は、発ガン性の有無が大きなウェイトを占めた。1990 年代になって、環境中に放出されたこれら化学物質が、広範な野生動物の生態系、特に内分泌系に対して影響を与え、人体にも影響を及ぼしている可能性が報告された⁹⁾。俗に「環境ホルモン」と呼ばれるこれらの作用は、今まで発ガン性があると思われていた濃度よりも遥かに微量で毒性を発現する可能性がある。従って、以前よりも更に低濃度レベルの正確な定量が要求される。分析機器の進歩・発展により、これら化学汚染物質の低濃度レベルの分析が可能になったが、それに伴い、より十分な試料精製が必要となっており、今回開発した処理法は、広範囲に応用できる可能性がある。

前報以降、2005 年度から 2008 年度までの 4 年間の母乳中 POPs 濃度 (乳脂肪中) の基礎統計量を表 1 に、1972 年度からの年推移を表 2 および図 2 に示した。POPs の汚染レベルは、今世紀に入っては全体的にはほぼ平衡状態に達しているが、化合物により乳脂肪中の減少度は異なり、PCBs > DDT > β -HCH の順で残留性が高いことがわかった。これら化合物は、主に魚介類

摂取を経た食物連鎖により、人体に蓄積することが既に明らかにされている。残留性の高い PCBs についての異性体別分析等の詳細は別途報告しているの、そちらを参照して頂きたい^{10,11,12)}。

測定した化合物中、CHL のみは他の POPs と異なり、100% 母乳哺育を行った場合、1 日摂取許容量 (ADI, 0.5 μ g/kg/day) を超える高濃度汚染された母乳が今なお、毎年約 10%~20% 検出されている。CHL は 1986 年第 1 種特定化学物質に指定されたので、使用禁止となつてから既に 20 年以上経過している。にもかかわらず、未だに CHL による母乳汚染問題は解消されていない。CHL は内分泌かく乱作用を有しており¹³⁾、また乳児は CHL に対する感受性が高いため、出来るだけ汚染を防ぐ必要がある。そのためには、モニタリングはもちろん、散布家屋の換気の徹底を呼びかける等、よりいっそうの行政対策が必要と思われる。

2006 年度より分析項目に加えた S-421 および 2008 年度測定した臭素系難燃剤 PBDEs には、CHL 同様、大きな個人差が認められた。CHL を含め、これら化学物質に共通する点は、他の POPs が食物連鎖 (主に魚介類) を介して人体曝露するのに対し、それ以外の経路、即ち室内環境による直接、あるいは間接的に人体曝露することである^{13,14)}。これらの事実は、POPs による人体曝露の中心が、食物連鎖から室内環境による曝露に移行しつつあり、多種多様な生活環境が母乳 POPs 汚染に影響を及ぼしていることを示唆する。

日本の POPs 研究の先駆者である立川涼氏は、著書¹⁵⁾の中で「環境調査は、調査時の汚染の状況をつかむことはできる。しかし、過去の汚染状況を明らかにすることはむずかしい。標本としての生物や土壌試料で、一応の復元が可能な場合もあるが、それはむしろきわめて幸運な場合に限られる。(中略)過去の汚染の歴史を復元するために、組織的に環境や生物試料を保存しておくことも重要である。(中略)要は、問題が生じたときに、過去が復元可能な試料を準備しておけば良い。」と述べている。1996 年、焼却場におけるダイオキシン類汚染が社会的に大きな問題となった。当研究所では、幸いにも母乳汚染調査で使用された乳脂肪の残りを冷凍保存していたため、著者らは 1973-1996 年の乳脂肪を用いて、乳脂肪中のダイオキシン類測定を行った。これにより過去の汚染状況を把握し、母乳中

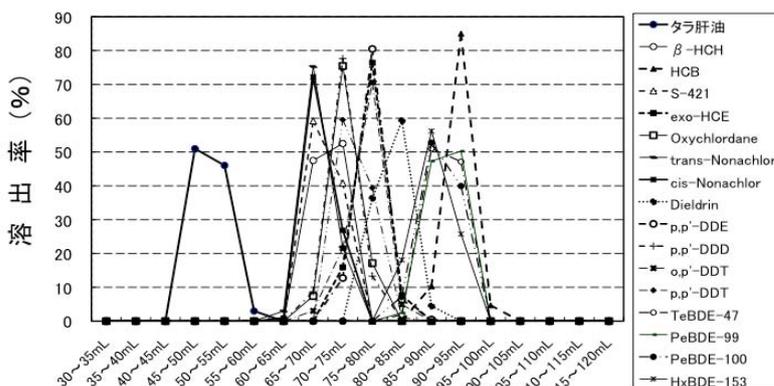


図1. 残留性有機汚染物質のGPC溶出パターン

表 1. 乳脂肪中POPs濃度 (2005~2008年度) の基礎統計量表

2005 年度	年齢 (years)	Fat (%)	β -HCH (ng/g)	p,p' -DDE (ng/g)	p,p' -DDD (ng/g)	p,p' -DDT (ng/g)	o,p' -DDT (ng/g)	T-DDT (ng/g)	PCB (ng/g)	HCB (ng/g)	Dieldrin (ng/g)	HCE (ng/g)	Oxy (ng/g)	t -Nona (ng/g)	c -Nona (ng/g)	T-CHL (ng/g)	S-421 (ng/g)	PBDE (ng/g)
平均値	29.0	4.02	85.5	193.1	-	202.0	-	141.8	7.23	3.59	2.35	16.5	50.1	7.6	74.2	-	-	-
標準偏差	5.1	1.32	70.7	118.1	-	6.84	-	124.9	57.5	3.33	4.01	2.45	8.6	40.8	7.7	53.9	-	-
幾何平均値	28.6	3.79	66.2	167.5	-	6.80	-	174.3	130.5	7.27	1.42	1.09	14.5	39.5	5.4	60.7	-	-
中央値	29	3.85	61.3	170.6	-	6.92	-	177.6	138.6	7.23	3.69	1.47	14.0	35.9	5.2	57.3	-	-
最大値	40	7.35	328.8	733.1	-	38.56	-	771.6	330.3	16.96	19.38	11.18	43.6	193.3	45.1	262.9	-	-
最小値	20	1.25	21.1	43.0	-	ND	-	44.0	43.4	ND.	ND.	ND.	4.2	10.9	ND.	16.4	-	-

2006 年度	年齢 (years)	Fat (%)	β -HCH (ng/g)	p,p' -DDE (ng/g)	p,p' -DDD (ng/g)	p,p' -DDT (ng/g)	o,p' -DDT (ng/g)	T-DDT (ng/g)	PCB (ng/g)	HCB (ng/g)	Dieldrin (ng/g)	HCE (ng/g)	Oxy (ng/g)	t -Nona (ng/g)	c -Nona (ng/g)	T-CHL (ng/g)	S-421 (ng/g)	PBDE (ng/g)
平均値	29.1	4.01	82.7	220.8	1.37	7.84	1.15	231.2	97.4	12.8	-	-	15.8	40.5	5.3	61.6	10.3	-
標準偏差	4.3	1.10	63.6	112.5	0.88	4.00	0.52	114.3	48.9	4.9	-	-	12.4	34.9	3.6	50.2	31.8	-
幾何平均値	28.8	3.85	66.2	196.1	1.20	6.94	1.04	206.4	87.9	11.9	-	-	12.9	32.1	4.5	49.9	3.9	-
中央値	29	3.88	67.6	196.5	1.37	7.13	1.07	207.6	83.0	11.9	-	-	11.8	28.9	4.5	44.5	3.1	-
最大値	38	6.43	351.6	609.1	3.55	20.74	2.77	621.4	325.4	31.8	-	-	75.6	207.4	22.2	305.3	230.6	-
最小値	19	1.53	15.7	63.6	0.36	2.52	0.31	67.4	27.8	3.5	-	-	3.4	7.1	1.2	11.7	0.7	-

2007 年度	年齢 (years)	Fat (%)	β -HCH (ng/g)	p,p' -DDE (ng/g)	p,p' -DDD (ng/g)	p,p' -DDT (ng/g)	o,p' -DDT (ng/g)	T-DDT (ng/g)	PCB (ng/g)	HCB (ng/g)	Dieldrin (ng/g)	HCE (ng/g)	Oxy (ng/g)	t -Nona (ng/g)	c -Nona (ng/g)	T-CHL (ng/g)	S-421 (ng/g)	PBDE (ng/g)
平均値	29.9	4.00	105.4	266.9	0.70	11.75	1.47	280.8	207.5	17.4	-	-	22.3	68.8	10.9	102.0	10.0	1.06
標準偏差	4.9	1.33	111.8	189.5	0.46	6.67	0.75	193.2	85.7	7.1	-	-	15.6	78.9	9.7	98.3	22.0	0.72
幾何平均値	29.5	3.77	72.8	226.3	0.58	10.41	1.29	239.9	191.0	16.1	-	-	18.4	42.8	7.3	71.4	4.6	0.93
中央値	30	3.95	63.8	227.7	0.58	10.41	1.36	237.6	191.3	16.3	-	-	20.0	44.0	7.3	76.7	3.2	0.87
最大値	40	7.15	595.9	1333.4	2.69	39.08	3.61	1353.3	473.8	44.7	-	-	99.2	432.3	41.2	524.7	144.2	4.83
最小値	18	1.10	16.2	71.0	0.12	4.36	0.30	77.2	75.3	6.1	-	-	4.1	2.2	0.5	7.1	1.4	0.41

2008 年度	年齢 (years)	Fat (%)	β -HCH (ng/g)	p,p' -DDE (ng/g)	p,p' -DDD (ng/g)	p,p' -DDT (ng/g)	o,p' -DDT (ng/g)	T-DDT (ng/g)	PCB (ng/g)	HCB (ng/g)	Dieldrin (ng/g)	HCE (ng/g)	Oxy (ng/g)	t -Nona (ng/g)	c -Nona (ng/g)	T-CHL (ng/g)	S-421 (ng/g)	PBDE (ng/g)
平均値	29.3	3.90	98.4	271.2	1.28	14.36	1.81	288.6	193.1	20.2	-	-	26.7	68.3	8.6	103.6	12.4	1.59
標準偏差	4.9	1.10	84.3	134.4	0.86	8.51	1.10	139.7	70.0	9.2	-	-	18.3	56.9	5.9	79.4	29.7	2.16
幾何平均値	28.9	3.75	79.4	242.2	0.99	12.07	1.45	258.4	181.6	18.1	-	-	21.3	49.0	6.7	77.9	6.1	1.29
中央値	28	3.69	72.2	250.9	1.07	12.73	1.58	272.2	177.1	19.5	-	-	20.1	44.1	7.5	75.0	5.2	1.25
最大値	41	6.38	568.4	753.3	4.25	40.34	4.46	771.9	405.1	43.2	-	-	73.3	204.9	25.3	284.5	216.6	17.03
最小値	20	2.19	19.8	82.4	0.14	2.57	0.18	86.5	75.7	6.4	-	-	3.6	10.5	1.5	15.6	1.1	0.63

のダイオキシン類が1970年代をピークに経年的に減衰していることを明らかにした^{16,17)}。この調査結果は、大阪府および国のダイオキシン類排出規制対策に大きく貢献した。

また、欧米で1990年代、母乳が高濃度曝露されることがわかり、問題となった臭素系難燃剤 PBDEs にも素早く対応、経年推移を明らかにした^{18,19)}。同様に、PBDEs の代替品である Hexabromocyclododecane (HBCDs) についても経年推移を報告、母乳の安全性を確認した²⁰⁾。これら人体試料を30年以上過去にさかのぼって、経年変化を明確にした調査研究は世界にも例が無く、これら成果は長年の地道な調査研究の賜と言える。

科学の発展に伴い、分析機器は飛躍的に進歩し、以前では同定・定量出来なかった低濃度測定が可能となった。また、今までは毒性が無いと思われていた化合物や、内分泌かく乱作用のように新たな毒性が疑われた場合、現在の試料を集め、現状を把握することは出来るが、過去を検証することは出来ない。過去を知ることが、現状との比較はもちろん、未来の予測に繋がる。著者らが明らかにした母乳脂肪を用いたダイオキシン類、PBDEs および HBCDs の研究成果は、ま

さにこれに当てはまる。母乳中 POPs の経年推移を調査するような研究は、地味ですぐに結果は出ない。また、フィールドの確保も困難で、大阪府だからこそ成し得た研究成果とも言える。

このような長期間にわたるモニタリング調査は、著者ら研究員だけの力では成し得ない事業であり、特に行政の協力があったらこそその成果である。しかしながら、国の補助金が無くなり、「母乳栄養推進事業」の実施が困難となり、本調査研究もひとまず終了することとなった。非常に残念である。「継続は力」である。地道な疫学調査は、時として大きな成果を得る。近年は短期間で研究成果を求める傾向にあるが、本調査研究のように、長い展望を見据えた地道な調査研究の重要性を認識し、行政としての積極的な取り組みが求められよう。

表2. 初産婦の乳脂肪中POPs濃度平均値の年推移

年度 (year)	年齢 (years)	N(PCB) (サンプル)	PCB (ng/g)	N(OCC) (サンプル)	β-HCH (ng/g)	T-DDT (ng/g)	T-CHL (ng/g)	HCB (ng/g)	HCE (ng/g)	Diel (ng/g)	S-421 (ng/g)	PBDEs (ng/g)
1972	25	62	1300	12	2990	—	2990	—	—	—	—	—
1973	25	67	1310	22	3650	—	3650	—	—	93	—	—
1974	25	59	1510	12	2660	—	2660	—	—	90	—	—
1975	25	62	1260	11	4000	—	4000	—	—	62	—	—
1976	26	42	1110	11	2100	—	2100	—	—	75	—	—
1977	26	54	1240	11	2240	—	2240	—	—	47	—	—
1978	26	49	1210	9	2300	—	2300	—	—	74	—	—
1979	26	46	1100	10	2170	—	2170	—	—	33	—	—
1980	26	58	1050	39	2340	—	2340	64	—	33	—	—
1981	27	51	1040	29	2620	—	2620	79	—	30	—	—
1982	26	41	900	25	—	—	—	77	—	28	—	—
1983	26	54	1130	0	—	—	—	—	—	—	—	—
1984	26	50	880	0	—	—	—	—	—	—	—	—
1985	27	51	740	0	1270	119	1270	—	—	—	—	—
1986	27	53	734	53	1090	120	1090	44.8	34.6	—	—	—
1987	27	55	619	55	1138	101	1138	45.7	24.8	—	—	—
1988	26	55	538	55	951	88.6	951	35.4	18.7	—	—	—
1989	27	55	524	55	639	68.2	639	28.4	12.4	—	—	—
1990	26	58	429	58	668	69.1	668	23.3	13.4	—	—	—
1991	27	60	367	60	528	61.9	528	29.3	9.4	—	—	—
1992	27	60	343	60	644	96.3	644	18.0	10.4	—	—	—
1993	27	58	284	58	459	88.2	459	20.2	12.6	—	—	—
1994	26	61	301	61	374	72.9	374	19.4	11.8	—	—	—
1995	27	59	312	59	283	65.8	283	17.1	14.6	—	—	—
1996	27	57	340	57	318	70.0	318	14.3	7.9	—	—	—
1997	28	47	260	47	288	84.6	288	13.6	8.3	—	—	—
1998	27	49	200	49	240	75.6	240	13.6	7.5	—	—	—
1999	28	53	263	53	226	68.9	226	13.8	8.1	—	—	—
2000	29	56	203	56	204	51.7	204	12.0	4.3	—	—	—
2001	28	57	178	57	188	54.1	188	10.4	4.4	—	—	—
2002	28	54	169	54	122	59.0	122	7.8	6.0	—	—	—
2003	29	55	151	55	179	54.1	179	9.4	5.1	—	—	—
2004	28	57	132	57	202	74.2	202	7.1	4.9	2.51	—	—
2005	29	57	142	57	85.5	202	74.2	7.2	2.3	3.59	—	—
2006	29	58	97	58	82.7	231	61.6	12.8	—	—	10.3	—
2007	30	58	208	58	105.4	281	102.0	17.4	—	—	10.0	1.06
2008	29	56	193	56	98.4	289	103.6	20.2	—	—	12.4	1.59

N(PCB): PCBの分析試料数

N(OCC): PCB以外の化合物の分析試料数

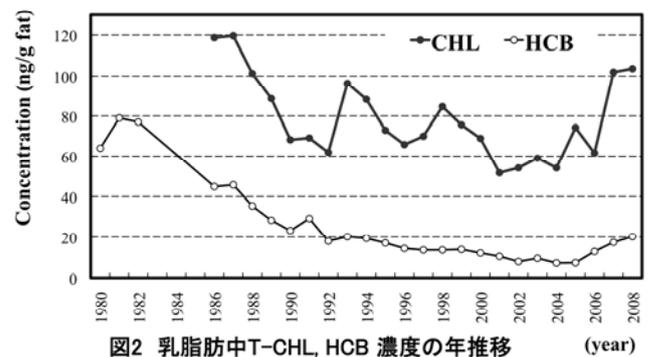
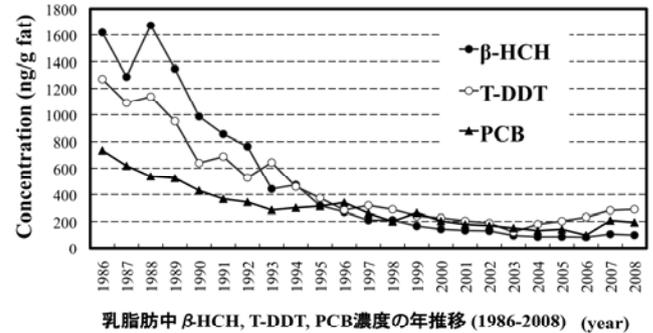
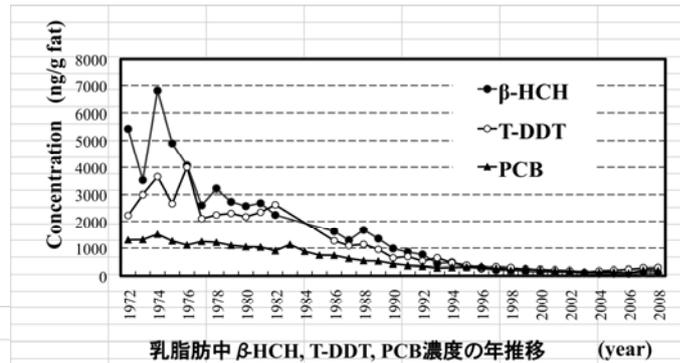


図2 乳脂肪中T-CHL, HCB 濃度の年推移 (year)

謝 辞

長期間にわたり当調査研究にたずさわって支援して頂いた多くの方々、および諸先輩に深謝する。

文 献

- 1) 小西良昌, 田中之雄, 西宗高弘: 母乳の有機塩素系化合物汚染調査 (第 16 報), 大阪府立公衛研所報, 食品衛生編, 第 25 号, 15~20 (1994)
- 2) 小西良昌, 桑原克義, 田中之雄, 堀伸二郎: 母乳の有機塩素系化合物汚染調査 (第 17 報), 大阪府立公衛研所, 研究報告, 第 36 号, 87~92 (1998)
- 3) Konishi Y, Kuwabara K, Hori S : Continuous surveillance of organochlorine compounds in mothers milk from 1972 to 1998 in Osaka, Japan, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **40**, 571-578 (2001)
- 4) 小西良昌, 薬師寺積, 田口修三, 西宗高弘, 田中涼一: 白アリ防除家屋における食餌性クロルデン量の増加, *食衛誌*, **31**, 238~243 (1990)
- 5) 薬師寺積, 小西良昌, 田口修三, 西宗高弘, 田中涼一: 白アリ防除家屋における空气中クロルデン量のコメへの吸着, *食衛誌*, **32**, 78~85 (1991)
- 6) 小西良昌, 薬師寺積, 田口修三, 西宗高弘, 田中涼一: 白アリ防除家屋における食餌性クロルデン量の増加, *食衛誌*, **31**, 238~243 (1990)4)
- 7) 小西良昌, 阿久津 和彦, 田中之雄: 母乳中有機塩素系化合物汚染調査 (第 18 報) -POPs 測定における精製法の検討-, 大阪府立公衛研所, 研究報告, 第 44 号, 40~45 (2006)
- 8) 松井三郎, 田辺信介, 森 千里, 井口泰泉, 吉原進一, 有園幸司, 森澤眞輔: 環境ホルモンの代謝とホルモン用作用の変化, 有機塩素系殺虫剤 DDT の代謝変換とホルモン様作用の変動, 環境ホルモンの最前線, 有斐閣選書, p.143-145 (2002)
- 9) Sedaka M : Ministry of Health and Welfare, Japan, Report on public welfare scientific research by the Healthy Earth Research Program Promotion (1996)
- 10) Konishi Y, Kuwabara K, Hori S : Continuous monitoring of PCB isomers in human breast milk from 1973 to 2000 in Osaka, JAPAN, *Organohalogen Compounds*, **63**, 441-444 (2003)
- 11) Konishi Y, Nakano T, Masho R, Tohyama C : Surveillance of PCB congener and isomeric patterns in human breast milk from 1973 to 2000 in Osaka, Japan, *PCB Workshop 2004*, Illinois, USA, (2004)
- 12) Konishi Y, Kitagawa M, Akutsu K, Tanaka Y : Surveillance of PCB congeneric patterns in human breast milk from 1973 to 2004 in Osaka, Japan, *Environ. Health Prev. Med.*, **11**, 38-44 (2006)
- 13) 植村振作: 床下の毒物シロアリ防除剤, p.124, 三省堂, 東京 (1999)
- 14) 松島裕子, 内田雄幸, 斉藤 実, 川崎 靖, 伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 井上 達, 菅野 純: 家庭用の蚊取線香、電気蚊取等に広く使用されているピレスロイド系殺虫剤の共力剤である 2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropyl ether (S-421) のラットを用いた 28 日間反復強制経口投与毒性試験, 国立衛生研究所, 研究報告, 第 121 号, 40~47 (2003)
- 15) 立川 涼: PCB について, *食品衛生研究*, **22**, 15-21 (1972)
- 16) Hori S, Konishi Y, Kuwabara K : Decrease of PCDDs, PCDFs and co-PCBs levels in human milk from Osaka (1973-1996), *Organohalogen Compounds*, **44**, 141-144.(1999)
- 17) 小西良昌, 田中之雄, 堀 伸二郎, 多田 裕: ダイオキシン類による母乳汚染の経年推移, -「ダイオキシン類対策特別措置法」の効果-, *環境化学*, **16**, 667-689 (2006)
- 18) Akutsu K, Obana H, Okihashi M, Kitagawa, Nakazawa H, Matsuki Y, Makino T, Oda H, Hori S : GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish collected from the Inland Sea of Seto, Japan. *Chemosphere*, **44**, 1325-1333 (2001)
- 19) 阿久津 和彦, 堀伸二郎: 難燃剤ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) による食品・母乳汚染. *食衛誌*, **45**, 175-183 (2004)
- 20) Kakimoto K, Konishi Y, Akutsu K : Time trend of hexabromocyclododecane in the breast milk of Japanese women, *Chemosphere*, **71**, 1110-1114 (2008)

無承認無許可医薬品の検査に用いるデータの収集

沢辺 善之* 中村 暁彦* 田口 修三*

「いわゆる健康食品」に違法に含まれる医薬品成分のスクリーニングに用いるために、GC-MS及びHPLCによる医薬品成分63種類の検出の可否と保持時間のデータを収集した。その内訳は、中枢神経用剤15、ホルモン剤11、気管支拡張剤4、食欲抑制剤3、利尿剤4、ED治療剤1、排尿障害用剤2、糖尿病用剤2、解熱鎮痛消炎剤4、高脂血症用剤1、抗ヒスタミン剤4、血圧降下剤8、副腎皮質ホルモン剤2及び痛風治療剤2種である。

キーワード : ガスクロマトグラフィー質量分析計、高速液体クロマトグラフィー、医薬品

key words : GC-MS, HPLC, drug

大阪府では収去試験の一環として、「いわゆる健康食品」(以下、健康食品)に違法に含まれる医薬品成分の検査を実施している¹⁻⁵⁾。医薬品成分を含有する健康食品は無承認無許可医薬品といわれ、薬事法による取締りの対象となる。今回、無承認無許可医薬品の検査に役立てる目的で、GC-MS及びHPLCを用いた医薬品成分の測定データを収集したので報告する。

実験方法

1. 試薬

中枢神経用剤15、ホルモン剤11、気管支拡張剤4、食欲抑制剤3、利尿剤4、ED治療剤1、排尿障害用剤2、糖尿病用剤2、解熱鎮痛消炎剤4、高脂血症用剤1、抗ヒスタミン剤4、血圧降下剤8、副腎皮質ホルモン剤2及び痛風治療剤2種の全63種類の医薬品成分を試料とした。それぞれの試料は、当課に保存していた試薬及び医薬品の標準品を用いた。

TMS誘導体化剤は、BSTFA(N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, SUPELCO)を用いた。

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課
Gathering of GC-MS and HPLC Data on Illegal Drug Test
by Yoshiyuki SAWABE, Akihiko NAKAMURA and
Shuzo TAGUCHI

2. 装置および測定条件

GC-MS装置はAgilent 6890N GC System - 5973 Mass Selective Detectorを、HPLC装置は島津 HPLC LC-10 CLASS-VPシステムを用いて以下の条件で操作した。

GC-MS 測定条件

カラム : DB-5ms, 0.25 mm × 30 m, 0.25 μm

注入口温度 : 300°C

カラム温度 : 100°C - (10°C/min) - 320°C, 18 分間保持

注入量 : 1 μL (Splitless)

イオン源温度 : 150°C

インターフェイス温度 : 250°C

キャリアーガス : ヘリウム 2 mL/min

スキャン範囲 : m/z 10 - 700

MS ライブラリー : Mass Spectral Libraries NIST
Rev.D.04.00

HPLC 測定条件

カラム : L-column ODS. 4.6 × 150 mm, 5 μm

移動相 : ドデシル硫酸ナトリウム (1→128)・アセトニ
トリル・リン酸混液 (570 : 430 : 1)

流量 : 1.5 mL/min

カラム温度 : 45°C

注入量 : 10 μL

検出器 : フォトダイオードアレイ検出器
(測定波長 210 nm、範囲 200 - 400 nm)

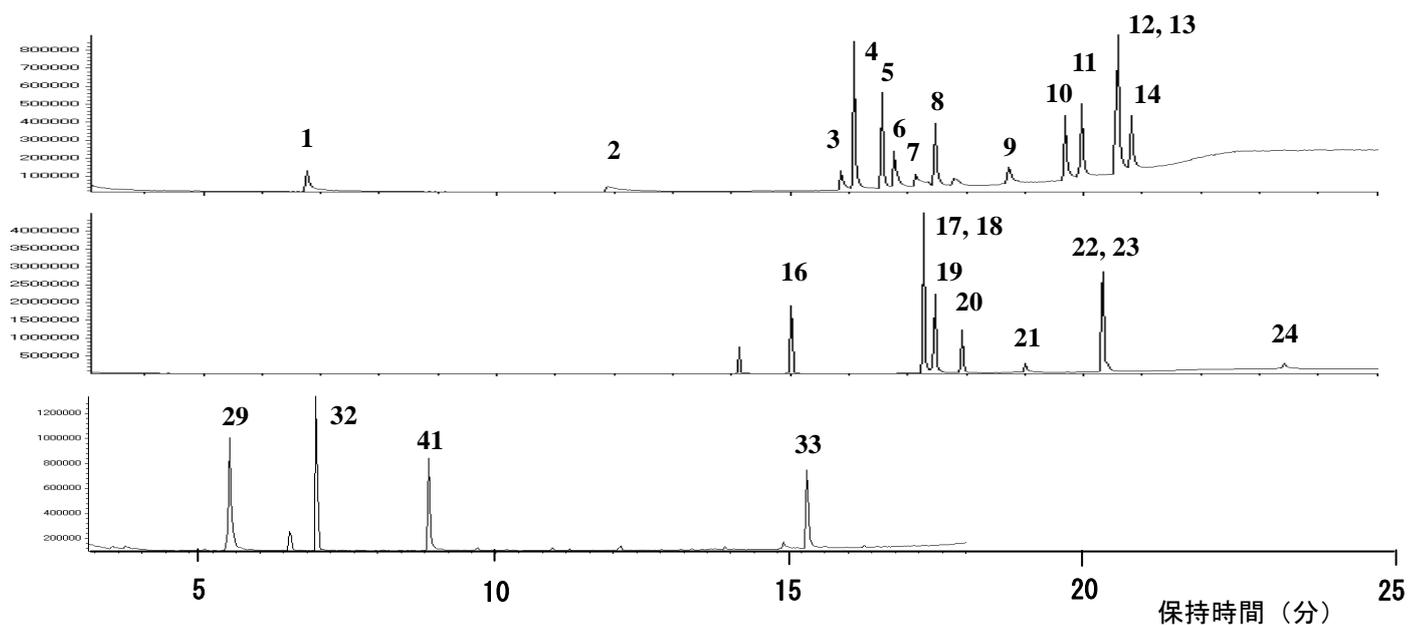


図1 GC-MSのトータルイオンクロマトグラム (TIC)
 (一部の成分のみを示す。ピーク番号の成分名は表1を参照)

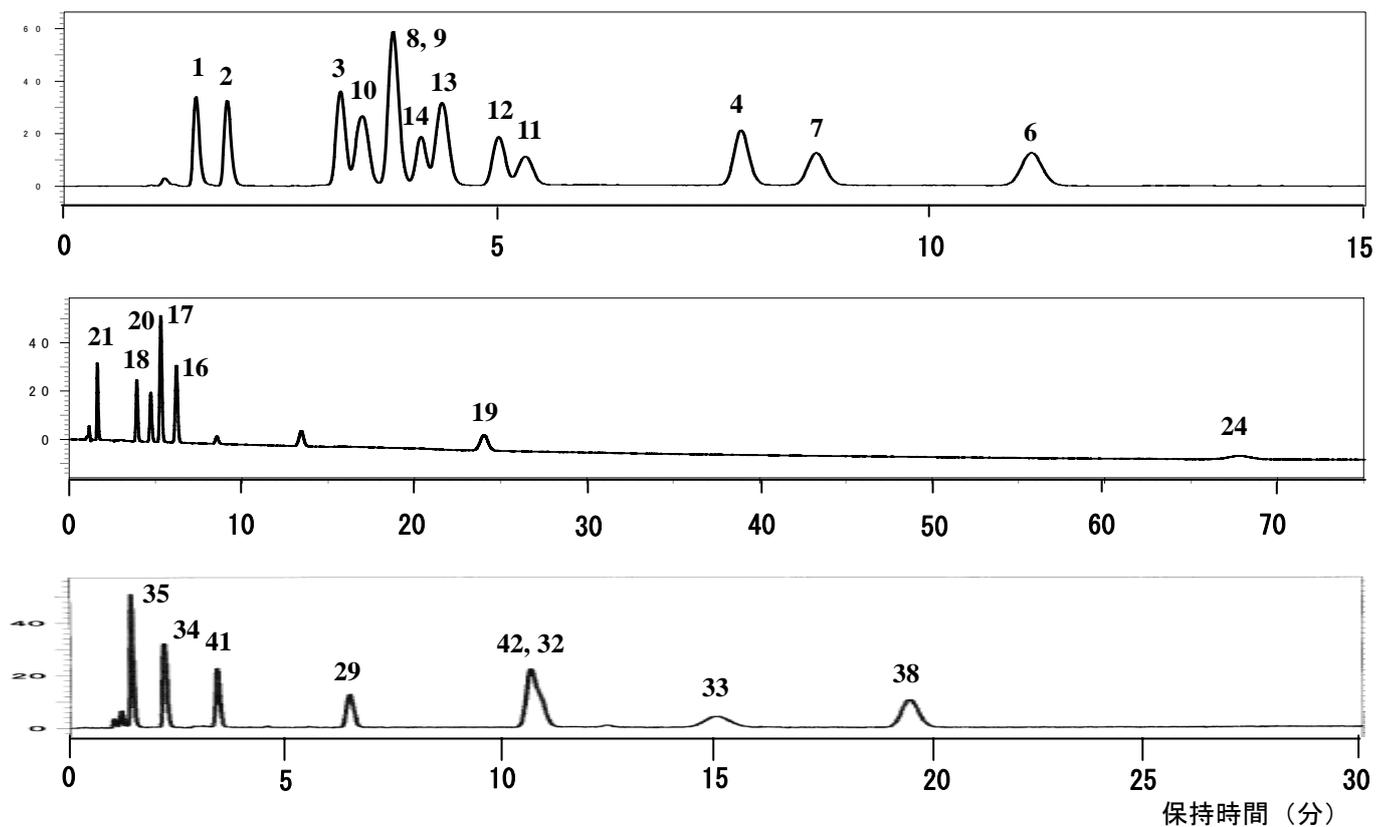


図2 HPLCのクロマトグラム (測定波長 210 nm)
 (一部の成分のみを示す。ピーク番号の成分名は表1を参照)

表1 医薬品成分の GC-MS 及び HPLC の保持時間

ピーク 番号	薬効	医薬品成分名	保持時間 (分)		
			GC-MS 原体	TMS	HPLC 原体
1		バルビタール	6.9	7.8	1.5
2		フェノバルビタール	11.9	11.6	1.9
3		ロラゼパム	15.9	16.3	3.2
4		ジアゼパム	16.1	NR	7.8
5		クロルプロマジン塩酸塩	16.6	NR	ND
6		クロルジアゼポキシド	16.8	NR	11.2
7		オキサゾラム	17.2	15.9	8.7
8	中枢神経用剤	フルニトラゼパム	17.5	NR	3.8
9		ニトラゼパム	18.8	16.8	3.8
10		エスタゾラム	19.7	NR	3.4
11		アルプラゾラム	20.0	NR	5.3
12		エチゾラム	20.6	NR	5.0
13		トリアゾラム	20.6	NR	4.4
14		ブロチゾラム	20.9	NR	4.1
15		ブロモバレリル尿素	6.7	6.3	2.0
				8.4	
16		ジエチルスチルベストロール	14.9	14.2	6.5
17		エストロン	17.3	17.4	5.5
18		エストラジオール	17.4	17.6	4.1
19		メストラノール	17.5	18.0	24.0
20		エチニルエストラジオール	17.9	18.4	4.7
21	ホルモン剤	エストリオール	19.0	19.0	1.7
22		エストラジオールプロピオン酸エステル	20.4	NR	ND
23		エストラジオール吉草酸エステル	20.4	20.4	ND
24		エストラジオール安息香酸エステル	23.5	23.4	68.0
25		クロルマジノン酢酸エステル	21.4	NR	14.9
26		メチルテストステロン	17.8	17.7	5.9
27		エフェドリン塩酸塩	5.1	5.1	6.1
				6.9	
28	気管支拡張剤	プソイドエフェドリン塩酸塩	5.1	5.0	5.7
					7.0
29		メチルエフェドリン塩酸塩	5.5	5.4	6.5
30		テオフィリン	12.2	11.0	1.3
31		フェンフルラミン塩酸塩	3.5	5.8	22.0
32	食欲抑制剤	N-ニトロソフェンフルラミン	7.0	NR	11.0
33		マジンドール	15.3	14.9	15.0

表1 つづき

34		フロセミド	ND	ND	2.2
35	利尿剤	ヒドロクロチアジド	ND	ND	1.4
36		トリクロルメチアジド	ND	ND	1.9
37		スピロラクトン	24.6	NR	6.0
38	ED 治療剤	シルデナフィルクエン酸塩	ND	ND	19.5
39	排尿障害用剤	プロピベリン塩酸塩	15.8	NR	ND
40		オキシブチニン塩酸塩	16.4	NR	ND
41	糖尿病用剤	クロルプロパミド	8.9	9.7	3.4
42		グリベンクラミド	ND	ND	10.7
43	解熱鎮痛消炎剤	インドメタシン	19.4	19.5	10.1
44		ジクロフェナクナトリウム	13.4	14.5	10.0
45		メフェナム酸	13.7	13.7	16.1
46		プラノプロフェン	15.7	NR	2.5
47	高脂血症用剤	プラバスタチンナトリウム			2.0
48	抗ヒスタミン剤	ジフェンヒドラミン塩酸塩	10.8	NR	22.9
49		クロルフェニラミンマレイン酸塩	12.2	NR	ND
50		メキタジン	18.9	NR	ND
51		ホモクロルシクリジン塩酸塩	15.3	NR	ND
52	血圧降下剤	マニジピン塩酸塩	ND	NR	ND
53		ニフェジピン	17.1	NR	4.5
54		ニルバジピン	18.8	NR	10.9
55		ニカルジピン塩酸塩	24.4	NR	28.9
56		カプトプリル	10.5	12.4	1.5
57		エナラプリルマレイン酸塩	18.4	NR	12.2
58		ジルチアゼム塩酸塩	19.9	NR	20.4
59		ベニジピン塩酸塩	27.1	NR	34.9
60	副腎皮質ホルモン剤	デキサメタゾン	19.6		2.5
61		プレドニゾン	19.3		1.9
62	痛風治療剤	アロプリノール	ND	7.8	1.1
63		ベンズブロマロン	18.4	19.1	38.8

ND : ピークを検出しない

NR : TMS 化をされない

網掛けのピークのMSスペクトルは市販のライブラリーと一致した

薬効は日本医薬品集医療薬 2009 年版 (株式会社じほう) を参考にした

3. 試料溶液の調製

GC-MS 用試料溶液

各試料をアセトニトリルに溶かし、0.1 mg/mL に調製した液を GC-MS に注入した。

GC-MS 用 TMS 化試料溶液

GC-MS 用試料溶液 0.5mL をバイアルにとり、BSTFA 0.1 mL を加え、きつくフタをしめ、60°C で 5 分間放置した液を GC-MS に注入した。

HPLC 用試料溶液

GC-MS 用試料溶液を HPLC に注入した。

結果及び考察

測定した 63 種類の医薬品成分のうち一部の成分のクロマトグラムを図 1 (GC-MS) 及び図 2 (HPLC) に示した。クロマトグラムのピーク番号は、表 1 のピーク番号と一致している。

また、GC-MS 及び HPLC で測定した医薬品成分 (原体) の保持時間を表 1 に示した。GC-MS の測定では、TMS 化した医薬品成分 (TMS) の保持時間も示した。また、医薬品成分の TMS 誘導体の情報を収集することは、気化しにくいいため GC-MS での分析に適さず、通常はライブラリーに収載されない医薬品成分の検索にも有用となるものと考ええる。

GC-MS により得られたマススペクトルは自製のライブラリーとして保存した。表 1 の網掛けの保持時間のピークは、市販のマススペクトルのライブラリー (Mass Spectral Libraries NIST Rev.D.04.00) と一致した成分である。

当課において健康食品に含まれる無承認無許可医薬品の検査は、平成 14 年に全国規模で発生した中国製減肥茶による健康被害事例を端緒としている。翌年から大阪府独自で健康食品の買い上げ検査を実施し、現在まで複数の医薬品成分を検出してきた。

健康食品に違法に添加された医薬品成分を検査する場合、個々の検体のパッケージやホームページに掲載されている文言、暗示される効能などの情報をもとに、添加されたと推定される医薬品成分を決定し、一次スクリーニングとして HPLC や TLC (薄層クロマトグラフィー) による分析が行われる。この際、推定医薬品

と同一保持時間及び同一スペクトルが得られた場合は、種々のクロマトグラフィーの組み合わせ、特に、高速液体クロマトグラフィー - 質量分析計 (LC-MS) や GC-MS により最終的な同定結果とする。また、HPLC の分析においては、検体のクロマトグラムに現れるすべてのピークの紫外吸収スペクトルを検討し、医薬品成分の類似化合物の存在も検査される。

このように、まずはじめにターゲットとする医薬品成分を決定し検査する手法が用いられてきたのは、ほとんどの医薬品成分が HPLC や TLC を使うと容易に分析できること。また、端緒となった中国製減肥茶の分析で目的とする医薬品成分が確定していたことによると考えられる。

しかしながら、従来の手法では、ターゲットの医薬品成分は判別可能であるが、それ以外の多くの医薬品成分については試験を行わないので含有されていても見落とすことになる。さまざまな分析法の特性を考慮した場合、一次スクリーニングとしては GC-MS が最も有効性が高い手法であると考ええる。今後は本報告のように、GC-MS や HPLC で得たデータを収集し、活用することで、従来の TLC や HPLC での方法とともに、より見過ごすことが少ない検査法を検討していきたいと考える。

文 献

- 1) 大阪府立公衆衛生研究所企画総務部企画調整課編, 大阪府立公衆衛生研究所年報 - 平成 15 年度版, 77 ~82 (2004)
- 2) 大阪府立公衆衛生研究所企画総務部企画調整課編, 大阪府立公衆衛生研究所年報 - 平成 16 年度版, 75 ~80 (2005)
- 3) 大阪府立公衆衛生研究所企画総務部企画調整課編, 大阪府立公衆衛生研究所年報 - 平成 17 年度版, 67 ~72 (2006)
- 4) 大阪府立公衆衛生研究所企画総務部企画調整課編, 大阪府立公衆衛生研究所年報 - 平成 18 年度版, 74 ~78 (2007)
- 5) 大阪府立公衆衛生研究所企画総務部企画調整課編, 大阪府立公衆衛生研究所年報 - 平成 19 年度版, 69 ~74 (2008)

HPLC を用いた化粧品中の防腐剤の定量法

沢辺 善之* 川口 正美*

HPLC を用いた化粧品中の防腐剤の一斉分析法を検討した。従来の ODS 系カラムを用いる分析法に比べて、Discovery RP Amide C16 カラムを用いることで、薄めたリン酸とアセトニトリルの混液という調製の簡単な移動相で一斉分析が可能となった。この方法の分析法バリデーションでは、真度、精度、直線性、特異性及び定量限界濃度のいずれも満足できる結果であった。また、市販化粧品に含まれる防腐剤の含有量を従来法と比較したところ、同等の定量値を示し、有用な分析法であることを確認した。

キーワード : 防腐剤、高速液体クロマトグラフィー、化粧品

key words : antiseptics, HPLC, cosmetics

大阪府では薬事法に基づく収去試験の一環として、化粧品に含まれる配合制限成分¹⁾の分析を行っている。主な分析対象物は防腐剤であり、その含有量が配合制限内であることを確認している。従来、収去品目の成分表示やメーカーの成分表から、測定対象とする防腐剤を絞り、個々に分析法を選定し、その含有量を測定してきた。本報では、主な防腐剤の一斉分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬

フェノキシエタノール、パラベン類 6 種 (メチルパラベン、エチルパラベン、イソプロピルパラベン、プロピルパラベン、イソブチルパラベン、ブチルパラベン)、ソルビン酸、安息香酸、デヒドロ酢酸及びサリチル酸は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入し標準品として用いた。4-ヒドロキシ安息香酸 n-アミルは東京化成工業株式会社 (東京) から購入し内標準物質として用いた。その他の試薬は特級品を用いた。

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課
Determination of Antiseptics in Cosmetics by HPLC
by Yoshiyuki SAWABE and Masami KAWAGUCHI

2. 装置及び測定条件

HPLC 装置は島津 HPLC LC-10 CLASS-VP システムを用いた。

HPLC 測定条件

検出器 : フォトダイオードアレイ検出器 (測定波長
フェノキシエタノール : 220 nm、パラベン類 : 254 nm、ソルビン酸 : 260 nm、安息香酸 : 230 nm、デヒドロ酢酸 : 310 nm、サリチル酸 : 205 nm、内標準物質 : 254 nm)

カラム : Discovery RP Amide C16, 25 cm × 4.6 mm,
5 μm (SUPELCO)

カラム温度 : 40 °C

移動相 : 薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル
混液 (55 : 45)

流量 : 1 mL / min

3. 試料溶液の調製

試料約 0.2 g を精密に量り、内標準溶液 2 mL を正確に加え、更にメタノールを加えて 30 mL とした液を 5 分間激しく振り混ぜた。この液を 0.45 μm のフィルターでろ過した液を試料溶液とした。

内標準溶液は 4-ヒドロキシ安息香酸 n-アミル (IS) 0.1 g をとりメタノールで 100 mL とした。

4. 標準溶液の調製

フェノキシエタノール及びパラベン類は、それぞれ

約 0.1 g を精密に量り、メタノールで 100 mL とした。ソルビン酸及びデヒドロ酢酸は、それぞれ約 0.05 g を精密に量り、メタノールで 100 mL とした。安息香酸及びサリチル酸は、それぞれ約 0.02 g を精密に量り、メタノールで 100 mL とした。これらの液を標準原液とした。

フェノキシエタノール、安息香酸及びパラベン類のそれぞれの標準原液 2 mL を正確にとり、内標準溶液 2 mL を正確に加え、更にメタノールを加えて 30 mL とした混液を標準溶液-1 (STD-1) とした。同様に、ソルビン酸、デヒドロ酢酸及びサリチル酸の混液を調製し、標準溶液-2 (STD-2) とした。この 2 種の標準溶液を添加回収実験の対照溶液とした。また、化粧品中の防腐剤の定量用標準溶液とした。

5. 添加回収実験

各防腐剤を化粧品に添加し、その回収率を求め、本法の真度及び精度を検討した。回収率を真度とし、回収率の相対標準偏差 (RSD) を精度とした。

各防腐剤の添加量は、配合制限量の上限とした。

検体とした化粧品は 3 種で、ジェル、乳液及び化粧水である。検体約 0.2 g を精密に量り、防腐剤の標準

原液 2 mL と内標準溶液 2 mL をそれぞれ正確に加え、更にメタノールを加えて 30 mL とした液を 5 分間激しく振り混ぜた。この液を 0.45 μm のフィルターでろ過した液を試料溶液とした。回収率は次式により求めた。

$$\text{回収率 (\%)} = \left(\frac{\text{試料溶液の防腐剤のピーク面積比}}{\text{対照溶液の防腐剤のピーク面積比}} \right) \times 100$$

結果及び考察

1. 分析法バリデーション

1-1 真度 (回収率) と精度 (回収率の RSD)

回収率と RSD を表 1 に示した。回収率は 96.0-104.7 %、RSD は 1 % 以下であり、すべての防腐剤で化粧品の性状に関係なく、良好な真度と精度を確認した。

1-2 直線性と定量限界濃度

標準原液をメタノールで順次希釈した液につき、標準溶液と同様の調製法で標準系列を作成し、直線性を検討した。検討範囲は、各防腐剤の配合上限量の 2 ~ 500 %、検量点数は 18 点とした。表 2 に各防腐剤の回帰式と相関係数 (X 軸: 配合制限量に対する %、Y 軸: ピーク面積比) 及び配合上限量の 2% 濃度における RSD を示した。

表 1 化粧品中の防腐剤の回収率

防腐剤	回収率 RSD (%)					
	検体 1 (ジェル)		検体 2 (乳液)		検体 3 (化粧水)	
①フェノキシエタノール	101.1	0.59	102.3	0.90	100.2	0.49
②ソルビン酸	99.8	0.34	102.8	0.44	99.8	0.06
③安息香酸	96.0	0.66	102.5	0.55	100.2	0.44
④デヒドロ酢酸	100.4	0.53	102.0	0.37	100.1	0.12
⑤メチルパラベン	102.0	0.53	102.3	0.88	100.5	0.66
⑥サリチル酸	101.5	0.66	104.7	0.47	99.3	0.29
⑦エチルパラベン	100.1	0.67	103.9	0.27	100.4	0.75
⑧イソプロピルパラベン	99.6	0.66	103.9	0.54	100.2	0.32
⑨ブチルパラベン	99.8	0.93	103.2	0.23	100.6	0.36
⑩イソブチルパラベン	99.7	0.83	103.0	0.44	100.2	0.72
⑪ブチルパラベン	99.5	0.66	101.8	0.22	100.1	0.42

(n=3)

表 2 防腐剤の直線性

防腐剤	回帰式	相関係数	配合上限量の 2% 濃度での RSD (%)
①フェノキシエタノール	y=0.0055x+0.0097	1.0000	0.56
②ソルビン酸	y=0.0137x+0.0129	1.0000	1.89
③安息香酸	y=0.0023x+0.0015	1.0000	1.01
④デヒドロ酢酸	y=0.0046x+0.0075	1.0000	0.38
⑤メチルパラベン	y=0.0120x+0.0123	1.0000	1.52
⑥サリチル酸	y=0.0049x+0.0343	1.0000	0.65
⑦エチルパラベン	y=0.0112x+0.0121	1.0000	1.49
⑧イソプロピルパラベン	y=0.0108x+0.0076	0.9998	0.09
⑨ブチルパラベン	y=0.0106x+0.0085	1.0000	1.24
⑩イソブチルパラベン	y=0.0110x+0.0067	0.9999	1.03
⑪ブチルパラベン	y=0.0102x+0.0054	0.9988	4.48

すべての防腐剤で回帰式は原点付近を通り、良好な直線性を示し、一点検量線法による定量が可能であった。

定量限界は、当該濃度における RSD が 5 % 以下であり、紫外吸収スペクトルが明確に認められる濃度とした。すべての防腐剤で配合上限量に対して 2 % 濃度が定量限界濃度であった。

1-3 検出波長と特異性

各防腐剤の検出波長は、それぞれの防腐剤の紫外吸収スペクトルの極大吸収波長とした。

標準溶液（配合上限濃度）のクロマトグラムと保持時間を図 1 に示した。

各防腐剤の回収率は 100 % 付近であり、添加試料溶液のクロマトグラムに妨害となるピークを認めなかったため、特異性が高いと判断した。

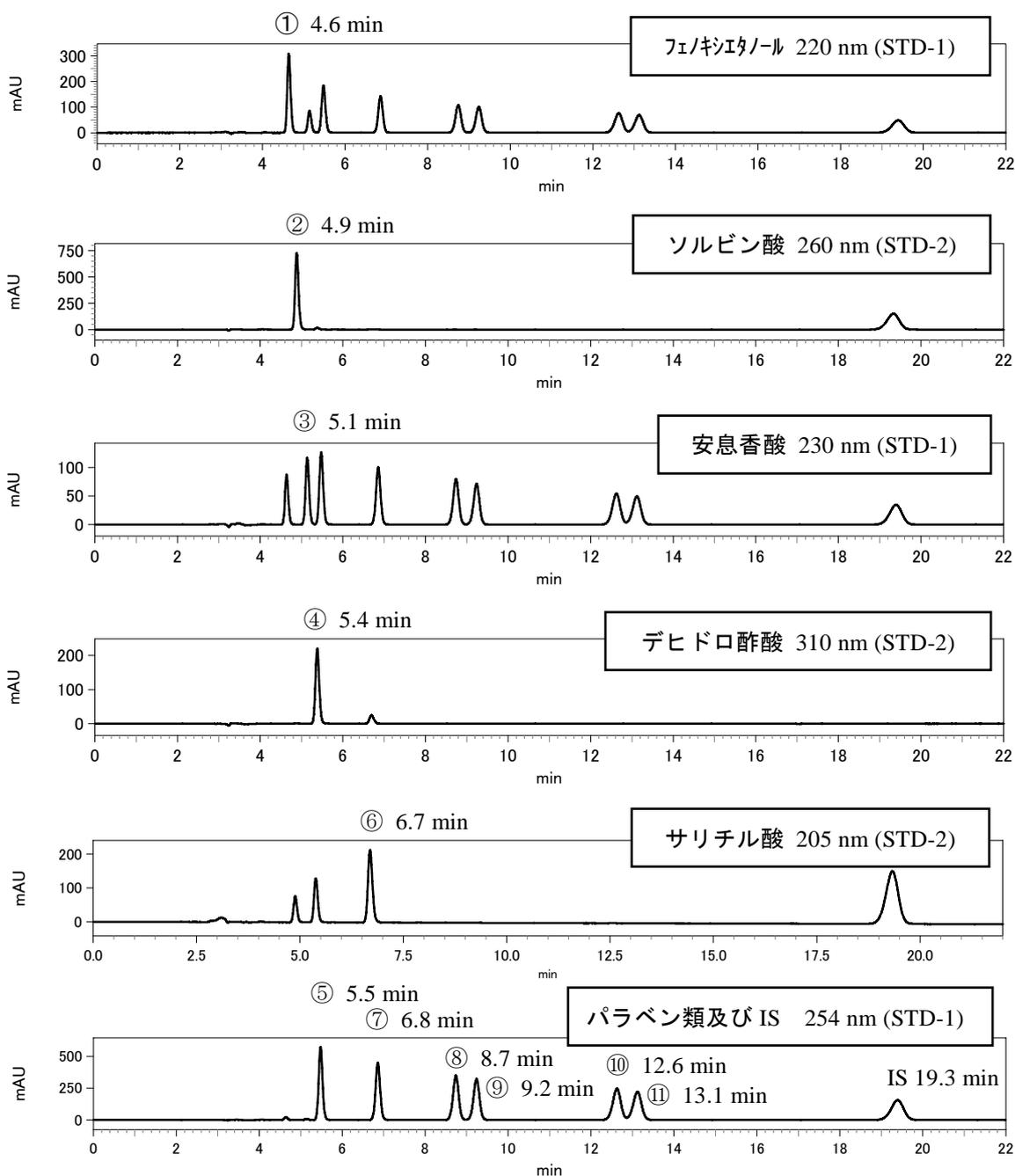


図 1 防腐剤標準溶液のクロマトグラム

2. 化粧品中の防腐剤の定量

本法により化粧品中の防腐剤を定量し、従来法²⁾の定量値と比較することで、本法の信頼性を検証した。

市販化粧品 5 品目を検体とした。配合されていた防腐剤はフェノキシエタノール、メチルパラベン、エチルパラベン及びプロピルパラベンであった。定量値と RSD を表 3 に示した。すべての検体で、従来法とほぼ同じ定量値を示し、バラツキを示す RSD も満足できるものであり、従来法と同等の定量法であることを確認した。

従来法の移動相の調製は、0.05 mol/L リン酸二水素ナトリウムを調製し、メタノール及びアセトニトリルを加え、それに塩化セチルトリメチルアンモニウムを添加し、さらにリン酸で p H5.2 に調整しなければならない。このように調製が煩雑であるだけでなく、イオン対クロマトグラフィーであるためにカラムの平衡化に時間が必要となる。本法では薄めたリン酸とアセトニトリルの混液を移動相とするため、その調製が簡単になり、分析の迅速性も増すものと考えられる。

表 3 本法と従来法による化粧品中の防腐剤の定量値の比較

検体	定量成分	定量値 RSD (%)			
		本法		従来法	
1	フェノキシエタノール	0.31	0.28	0.32	1.48
	メチルパラベン	0.19	0.58	0.19	1.46
	エチルパラベン	0.05	1.25	0.05	1.43
2	フェノキシエタノール	0.32	0.81	0.34	0.92
	メチルパラベン	0.11	0.80	0.11	0.82
	プロピルパラベン	0.11	0.81	0.11	0.82
3	フェノキシエタノール	0.31	0.13	0.31	1.32
	メチルパラベン	0.20	0.06	0.20	1.26
4	フェノキシエタノール	0.52	0.29	0.52	1.76
	メチルパラベン	0.21	0.32	0.21	2.16
5	メチルパラベン	0.03	1.65	0.03	1.74
	エチルパラベン	0.05	0.88	0.05	1.66

(n=3)

まとめ

従来、化粧品の防腐剤の分析には ODS 系のカラムが用いられ、移動相を工夫することにより一斉分析を可能としてきた。³⁾ 今回、Discovery RP Amide C16 カラムを分析に用いた。このカラムは ODS 基の 1 個の炭素がアミド基に変わること、フェノール性水酸基やカルボキシル基と特異的な相互作用を示す。その結果、カウンターイオンを用いることなく、薄めたリン酸とアセトニトリルの混液という調製の簡単な移動相で防腐剤の一斉分析が可能となった。化粧品中の防腐剤の試験において本法は有用であると考えられる。

文献

- 1) 化粧品基準 (平成 12 年厚生省告示第 331 号)
- 2) 日本薬学会編, 衛生試験法・注解 2005, 668~670, 金原出版, 東京 (2005)
- 3) 森 謙一郎, 中村義昭, 大貫奈穂美, 寺島 潔, 宮本道子, 荻野周三, 斉藤和夫: 化粧品中防腐剤の検査結果 (平成 16 - 18 年度) と検査法の改良, 東京都健康安全研究センター研究年報, 第 58 号, 103~106 (2007)

ダイエット効果を暗示するいわゆる健康食品から

ヨヒンビンを検出した事例について

中村 暁彦*¹ 川口 正美*¹ 梶村 計志*¹
田口 修三*¹ 岩上 正藏*²

大阪府ではダイエット効果を暗示するいわゆる健康食品について、医薬品成分配合の有無を確認することを目的とし、平成14年度から試買調査を実施している。今回、インターネットサイトを通じて購入したダイエット効果を暗示する健康食品から、催淫薬であるヨヒンビンが検出されたので報告する。ヨヒンビンの確認はフォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC/PDA) 及び薄層クロマトグラフィー (TLC) により行い、含量の測定は HPLC/PDA により行った。

キーワード : ヨヒンビン、催淫薬、ダイエット、健康食品

Key words : yohimbine, aphrodisiac drug, weight reduction, dietary supplement

近年、健康志向の高まりと通信販売の普及を背景として、健康食品が注目を集めている。厚生労働省の推計によると、2000年に1.3兆円程度であった健康食品の市場は急速に拡大しており、2010年には3.2兆円に達するとされている¹⁾。保健機能食品以外の健康志向食品「いわゆる健康食品(以下、健康食品)」には法令上の定義がなく、健康の増進に役立つものとして販売・利用されているものの、一般食品と同じ分類となる。一方、これら健康食品が原因と疑われる健康被害が多数発生している²⁻⁵⁾。ダイエット効果を暗示する健康食品についても例外ではなく、それらに配合された医薬品成分により健康被害を受けた人数は、平成14年から平成18年7月12日までの間に、796名、うち4名が死亡している⁵⁾。

平成14年の検出事例⁶⁾を契機に、大阪府では府民の健康被害を防止するため、健康食品安全対策事業として健康食品の試買調査を継続している。その一環とし

て、当所では健康食品中に配合された医薬品成分の分析を行っている。

本稿では、平成20年度に行われた試買調査において、ダイエット効果を暗示する健康食品(輸入品)1検体から催淫薬のヨヒンビン(図1)を検出した事例について報告する。

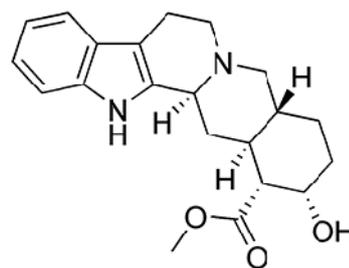


図1 ヨヒンビンの構造式

実験方法

1. 試料

平成20年度に、ダイエット効果を暗示する健康食品「SLIMQUICK extreme」(図2)を試買した。試料は赤色の軟カプセルであり、内容物は粘稠性のある茶色の液体であった。また、1日目から段階的に増量し、5日目以降1日あたり6カプセルの摂取を推奨するスケジ

*1 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課

*2 旧 大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部

Yohimbine Found in a Dietary Supplement with Suggestive Expression for Weight Reduction

by Akihiko NAKAMURA, Masami KAWAGUCHI, Keiji KAJIMURA,

Shuzo TAGUCHI, Shozo IWAGAMI

ユーラが容器に記載されていた。(図3)

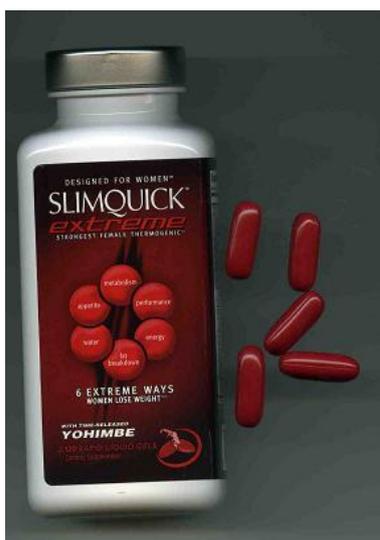


図2 試料

Dosing Schedule:	First Serving:	Second Serving
Day 1-2	1 Rapid Liquid Gel	1 Rapid Liquid Gel
Day 3-4	2 Rapid Liquid Gels	2 Rapid Liquid Gels
Day 5 and on	3 Rapid Liquid Gels	3 Rapid Liquid Gels

図3 服用スケジュールの記載

2. 標準品及び試薬

1) 標準品

ヨヒンビン塩酸塩は和光純薬工業社製の一級試薬を、グリベンクラミド、グリクラジド及びトルブタミドは同社製の生化学用を標準品として用いた。フェンフルラミン塩酸塩、*N*-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミン塩酸塩一水和物は国立医薬品食品衛生研究所から供与されたものを標準品として使用した。マジンドールはSigma社製のTLC用を標準品として使用した。

2) 試薬

試薬は全て和光純薬工業社製を用いた。メタノール、アセトニトリル、エタノールはHPLC用を使用した。リン酸、28%アンモニア水は特級を使用した。酢酸エチルは残留農薬用、硫酸は精密分析用を使用した。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)は生化学用、ヘキサンスルホン酸ナトリウムはイオンペアクロマトグラフ用を使用した。

3. HPLC/PDAによる痩身用医薬品成分の一斉分析

西條らの方法⁷⁾に準じて試験を実施した。試料3カプセル(1日最大服用目安量の半量)をとり切れ目を入れ、70%メタノールを正確に100 mL加えた。スターラーを用いて5時間攪拌し、さらに超音波抽出を15分間行った溶液を0.45 μmのメンブランフィルターでろ過し、試料溶液とした。また、フェンフルラミン塩酸塩、*N*-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミン塩酸塩一水和物、マジンドール、グリベンクラミド、グリクラジド、トルブタミド、ヨヒンビン塩酸塩をそれぞれメタノールで溶解し、各標準溶液の濃度を60、60、5、0.5、2.5、40、50、3 μg/mLとした。

HPLC/PDA測定条件は以下の通りである。

装置：LC-10 AD-VP システム (島津製作所)

測定波長：200~350 nm (検出波長 フェンフルラミン：207 nm、*N*-ニトロソフェンフルラミン：233 nm、シブトラミン：223 nm、マジンドール：267 nm、グリベンクラミド：229 nm、グリクラジド：228 nm、トルブタミド：229 nm、ヨヒンビン：220 nm)

カラム：TSK-gel ODS-80Ts QA、15 cm × 4.6 mm、5 μm (東ソー)

カラム温度：40℃

移動相 A 液：5 mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有 アセトニトリル/水/リン酸混液 (100 : 900 : 1)

移動相 B 液：5 mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有 アセトニトリル/水/リン酸混液 (900 : 100 : 1)

グラジエント条件：0分 (A:B=90:10) →25分 (A:B=55:45) →44-49分 (A:B=10:90) →50-65分 (A:B=90:10)

流量：1 mL/min

注入量：20 μL

4. TLCによるヨヒンビンの確認

試料1カプセルをとり、切断してカプセルごと100 mLのマイヤーに入れ、0.1%酢酸を含むメタノール50 mLを加えて20分間激しく振り混ぜた。この液を0.45 μmのメンブランフィルターでろ過し、ろ液全体をOasis MCX (60 mg/3cc, Waters) (あらかじめメタノール2 mL、ついで0.1%酢酸2 mLでコンディショニングしたもの)に負荷し(自然落下法)、このカートリッジを水2 mL、次いでメタノール2 mLで洗浄した。次に2%アンモニアを含むメタノール2 mLで溶出させ、溶出液をナス型フラスコに入れ減圧乾固し、メタノール100 μLを加えて振り混ぜ、TLC用試料溶液(SAM)と

した。また、ヨヒンビン塩酸塩をメタノールに溶かして 1.0 mg/mL とした溶液を TLC 用標準溶液 (STD) とした。

TLC 測定条件は以下の通りである。

薄層板：HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (MERCK)

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/28%アンモニア水混液 (90 : 10 : 1)

スポット量：試料溶液は 2 μ L 及び 4 μ L、標準溶液は 1 μ L 及び 2 μ L をスポットした。

検出法：50%硫酸エタノール溶液を噴霧後、105°C で 5 分間加熱し、紫外線(365 nm)を照射した。

5. ヨヒンビン含量の測定

宮武らの方法⁸⁾に準じて試験を実施した。試料 3 カプセルをとりカプセルに切れ目を入れ、下記に示す HPLC 用移動相を 90 mL 加えて 10 分間超音波処理を行った後、30 分間振とう抽出した。この液に移動相を加えて正確に 100 mL とした後、遠心分離し、上澄液を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、ろ液を試料溶液とした。また、ヨヒンビン塩酸塩約 3 mg (1 日最小服用量⁹⁾の半量)を精密に秤量し、移動相に溶解して正確に 100 mL としたものを標準溶液とした。次に、標準溶液を移動相で正確に 1/3、1/6、1/12 の濃度に希釈した溶液を検量線用標準溶液とし、検量線を作成して定量を行った。

HPLC/PDA 測定条件は以下の通りである。

装置：島津 Prominence LC-20 システム (島津製作所)

測定波長：200~350 nm (定量波長 272 nm)

カラム：TSK-gel ODS-120T、15 cm \times 4.6 mm、5 μ m (東ソー)

カラム温度：40°C

移動相：0.6% SDS 含有 水/アセトニトリル/リン酸混液 (550 : 450 : 0.7)

流量：1 mL/min

注入量：5 μ L

結果

1. 痩身用医薬品成分の一斉分析

試料溶液について、HPLC/PDA による分析を行ったところ、当初の目的成分であるフェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミン、マジンド

ール、グリベンクラミド、グリクラジド及びトルブタミドは検出されなかった。しかし、測定対象ではないヨヒンビンのピークと保持時間が一致するピークが確認された。当該ピークの紫外外部吸収スペクトルをヨヒンビンのものと比較したところ、同一のパターンを示した (図 4)。

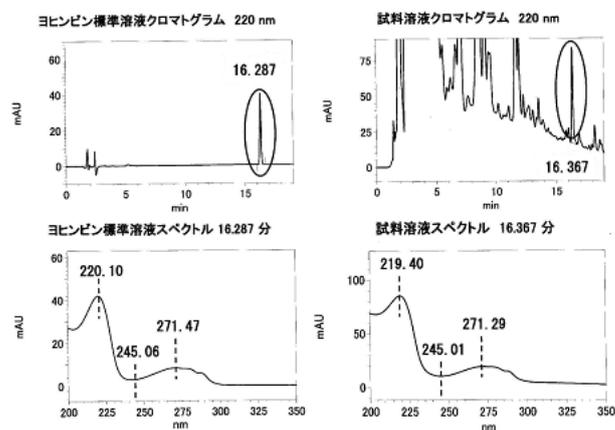


図 4 220 nm におけるクロマトグラム及び検出ピークの UV スペクトル

2. TLC によるヨヒンビンの確認

試料溶液について、TLC による分析を行ったところ、紫外線照射下においてヨヒンビンと同じ R_f 値 (約 0.44) に同様の青色蛍光スポットが確認された (図 5)。これらの結果により、試料から検出した成分をヨヒンビンと同定した。

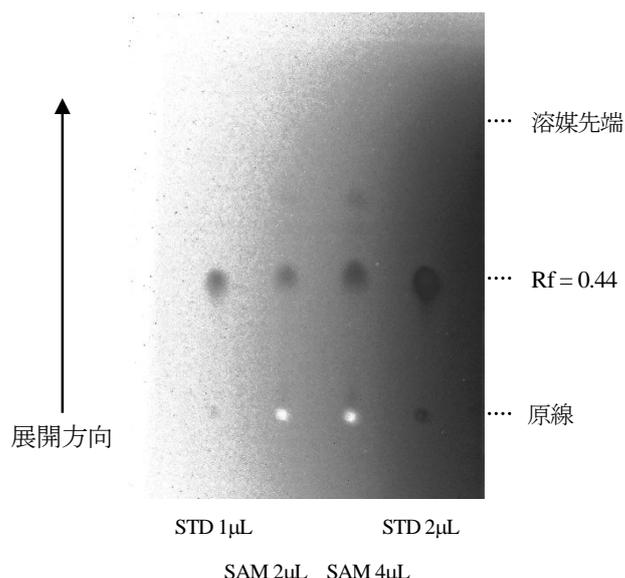


図 5 紫外線照射下における TLC クロマトグラム (365 nm、明暗反転)

3. ヨヒンビン含量の測定

ヨヒンビンの定量はより妨害の少ない宮武らの方法⁸⁾に準じて実施した。試料溶液及び標準溶液についてHPLC/PDAによる分析を行ったところ、結果1と同様の結果を示し、試料中にヨヒンビンが存在することを確認した(図6)。次に、検量線(図7)を用いて試料中のヨヒンビン含量を測定した結果、試料中から1カプセルあたり約0.15 mg(塩酸塩として0.17 mg)のヨヒンビンが検出された。

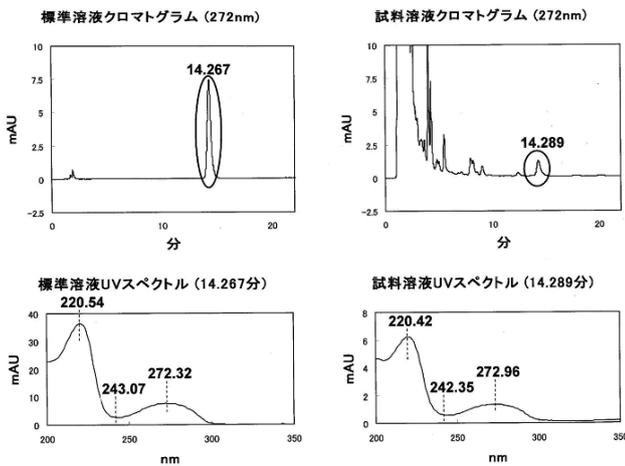


図6 272 nmにおけるクロマトグラム及び検出ピークのUVスペクトル

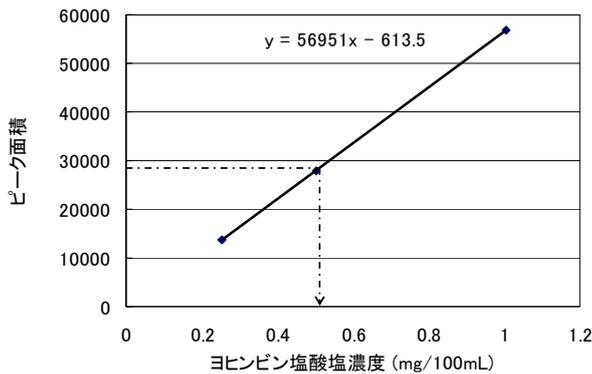


図7 ヨヒンビンの検量線

考察及びまとめ

ヨヒンビンは、アカネ科高木ヨヒンベ*Pausinystalia yohimbe*の樹皮又はラウオルフィア属植物に含有されるインドール系アルカロイドであり、催淫薬として使用される¹⁰⁾。国内ではヨヒンビン塩酸塩製剤が医薬品

として承認されており第一類医薬品に区分されている⁹⁾。副作用として、発疹、発赤、めまい、発汗、虚脱感等が知られている。

入手した試料に「1回1~3カプセル、1日2回摂取」と記載されており(図3)、使用法に従って摂取した場合、ヨヒンビン塩酸塩として1日あたり最大1.01 mg服用することになる。日本国内で販売されているヨヒンビン塩酸塩製剤が1日あたり6~19.9 mgを服用量としている⁹⁾ことから、使用法に従って摂取した場合、今回の試料から服用するヨヒンビンの量は薬用量以下である。現在のところこの製品による健康被害の報告はないが、薬用量は年齢、体重、性別等により個人差が存在することから、使用法に従って摂取した場合でも安全であるとは限らない。本件は輸入代行であったため、府民への注意喚起を図る意味で、大阪府では薬務課ホームページで当該製品使用の中止を呼びかけると共に、健康被害などの発生が疑われる場合は速やかに医療機関を受診すること等を周知した¹¹⁾。

このように、近年ダイエット効果を暗示する健康食品から、予期せぬ医薬品成分が検出される事例が見られるようになった。特にヨヒンビンは、海外の文献でダイエット効果の可能性が報告されており¹²⁾、その効果を暗示する健康食品に配合される事例が今後増えてくると予想される。従って、ヨヒンビンを含め服用目的から予想されない成分や新規に配合される可能性のある成分に対応した監視の強化を行う必要がある。

文献

- 1) 厚生労働省, 第1回「健康食品」制度のあり方に関する検討会資料,
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/04/s0423-6b2.html>
(accessed 2009-5-11)
- 2) 三谷裕昭, 高石喜久, 滝口祥令: 中国製ダイエット食品により肝障害・甲状腺中毒症を示した症例, 日本医事新報, **4122**, 40-43 (2003)
- 3) 熊坂謙一, 宮澤真紀, 小島尚, 土井佳代, 佐藤修二: 有症苦情に係るダイエット用健康食品の検査結果について, 神奈川県衛生研究所研究報告, **33**, 114-116 (2003)
- 4) 愛知県衛生研究所, 医薬品成分が検出された健康食品について,

- http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/3f/ken_shoku2.html
(accessed 2009-5-11)
- 5) 厚生労働省, 中国製ダイエット用健康食品(未承認医薬品)による健康被害事例等,
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/07/h0719-3.html>
(accessed 2009-5-11)
- 6) 大阪府薬務課, 中国製痩身用健康食品の収去試験結果について,
<http://www.pref.osaka.jp/yakumu/ryutsu/harmful/KenH14kaiage.htm> (accessed 2009-5-11)
- 7) 西條雅明, 石井俊靖, 長谷川貴志, 永田知子: 「いわゆる健康食品」中の医薬品成分分析について, 千葉県衛研年報, **55**, 74-77 (2006)
- 8) 宮武ノリエ, 安田一郎, 三宅啓文, 守安貴子, 中嶋順一, 岸本清子, 上村尚: いわゆる「合法ドラッグ」中に含有する医薬品成分の分析ー高速液体クロマトグラフィーによる塩酸ヨヒンビンの定量ー, 東京衛研年報, **51**, 29-33 (2000)
- 9) 日本医薬品集フォーラム監修: 日本医薬品集一般薬 2009-10 年度版, p.907-909, じほう, 東京 (2008)
- 10) 高木敬次郎, 亀山勉監修: 最新基礎薬理学, p.85, 廣川書店, 東京 (1999)
- 11) 大阪府薬務課, 医薬品成分が検出された健康食品について,
<http://www.pref.osaka.jp/yakumu/ryutsu/harmful/slimquick.html>
(accessed 2009-5-11)
- 12) Ostojic SM : Yohimbine: the effects on body composition and exercise performance in soccer players, **14**, 289-299 (2006)

チンピに残留するピレスロイド系農薬

田上 貴臣* 梶村 計志* 山崎 勝弘* 田口 修三*

国内で流通するチンピ 10 試料に残留するピレスロイド系農薬を測定したところ、一部の試料から農薬を検出した。生薬は主に水で抽出され、漢方製剤として利用される。農薬が検出された試料を水を用いて抽出したところ、抽出液からピレスロイド系農薬は検出されなかった。このことから、生薬にピレスロイド系農薬が残留していた場合でも、漢方製剤へはほとんど移行しないものと考えられた。

キーワード : 生薬、残留農薬、ピレスロイド系農薬、チンピ

Key words : crude drug, pesticide residue, pyrethroid pesticide, Citrus unshiu peel

日本薬局方チンピは、ウンシュウミカン *Citrus unshiu* Markovich 又は *Citrus reticulata* Blanco (*Rutaceae*) の成熟した果皮である。チンピは主として漢方処方用として使用され、健胃消化薬、鎮咳去痰薬とみなされる処方に比較的高頻度で配合されている¹⁾。

ミカン等のかんきつ類は、果皮の表面にワックス層や表層部に精油層を有している。農薬の多くは脂溶性であることから、これらのワックス成分や精油成分に溶け込み、内部には入りにくい²⁾。チンピは、かんきつ類の果皮を原料とし、乾燥減量が 13.0%以下になるまで乾燥されていることから、農薬が高濃度に残留することが考えられる。しかし、チンピをはじめとする生薬中の残留農薬に関する報告は少なく、その実態に関しては不明な部分が多い。我が国において残留基準が定められているBHC及びDDTをはじめとした有機塩素系農薬³⁾や有機リン系農薬⁴⁾についての報告は散見されるが、ピレスロイド系農薬の残留実態に関する報告は極めて少ない^{5) 6)}。また、中国で日本向け食材を対象とした残留農薬の検査では、ピレスロイド系農薬の検出頻度が高い⁷⁾。我が国では、生薬の多くを中国から輸入しているため、ピレスロイド系農薬の残留実態を把握することは重要である。そこで、国内で流通するチンピについてピレスロイド系農薬の残留実態に関する調査を行った。また、チンピは、主とし

て水で抽出して漢方製剤へと製剤化される。そこで、ピレスロイド系農薬が検出された試料を用いて、製剤への移行に関する検討も合わせて行った。

実験方法

1. 試料

平成19年～平成21年に購入したチンピ10試料を対象とした。

2. 調査対象農薬

日本漢方生薬製剤協会では、ピレスロイド系農薬についての自主基準として、チンピ(他4生薬)を配合する漢方製剤及び生薬製剤を対象としてシペルメトリン及びフェンバレレート⁸⁾の残留基準を定めている。また、前述の中国における日本向け食材を対象とした残留農薬の検査⁷⁾では、シペルメトリン、フェンバレレートは、それぞれ検出農薬上位1位及び2位であり、これらの農薬の残留実態を把握することは重要であることから、シペルメトリン及びフェンバレレートを対象とした。

3. 試薬

農薬標準品は、Dr. Ehrenstorfer 製を用いた。微結晶セルロースは、フナコシ製を用いた。

フロリジルミニカラムは、Supelco 製(6mL, 1g)を用いた。また、フロリジル1gをポリプロピレンチューブ(内径:12mm)に充てんし、手製フロリジルミニカラムとした。活性炭と微結晶セルロースを等量混合し、その1gを

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課
Pyrethroid Pesticides in Citrus Unshiu Peel
by Takaomi TAGAMI, Keiji KAJIMURA, Katsuhiko YAMASAKI
and Shuzo TAGUCHI

ポリプロピレンチューブ（内径：12mm）に充てんし、活性炭ミニカラムとした。

他の試薬及び溶媒は、和光純薬工業製を用いた。

4. 標準溶液の調製

農薬標準品をヘキサンに溶解し、標準原液（500ppm）とした。標準原液をヘキサンで希釈し、添加用標準溶液（5ppm）とした。定量用標準溶液は、添加用標準溶液を希釈して調製した。「チンピに残留するピレスロイド系農薬の測定」においては、マトリックス効果を抑制することを目的として、シペルメトリン、フェンバレレートが検出されなかった試料溶液を用いて、標準溶液を希釈した。

5. 生薬抽出液の調製

第15改正日本薬局方 製剤総則 煎剤の項に準じて、以下のように調製した。

300mLのビーカーにチンピ5g及び水95mLを加え、30分間加熱した。遠心分離（3000rpm）し、上澄み液をとった。残渣に水25mLを加えて混和した後、遠心分離（3000rpm）し、上澄み液を合わせて、生薬抽出液とした。

6. 試料溶液の調製

(1) チンピに残留するピレスロイド系農薬の測定既報⁸⁾に準じて試験を行った。

粉碎した試料10gをとり、アセトニトリル40mLを加え、30分間放置した。これを1分間ホモジナイズし、塩化ナトリウム1g及び無水硫酸ナトリウム4gを加え、振り混ぜた後、遠心分離した。上澄み液20mLをとり、予めアセトニトリル/トルエン混液（3:1）20mLで洗浄した活性炭ミニカラムに負荷し、アセトニトリル/トルエン混液（3:1）20mLで溶出した。溶出液及び負荷時に溶出した液を混合し、減圧下濃縮乾固した。残留物をトルエン5mLに溶解し、予めアセトン/ヘキサン混液（3:17）5mL及びトルエン5mLで洗浄したフロリジルミニカラムに全量負荷し、アセトン/ヘキサン混液（3:17）25mLで溶出した。溶出液及び負荷時に溶出した液を混合し、減圧下濃縮乾固した。残留物は、アセトン/ヘキサン混液（3:17）5mLに溶解し、「生薬の試料溶液」とした。

(2) 生薬抽出液に移行したピレスロイド系農薬の測定
生薬抽出液を放冷後、塩化ナトリウム5gを加えた。更

にヘキサン50mLを加え、20分間振とうした。遠心分離（3000rpm）し、ヘキサン層20mLをとり、予めアセトン/ヘキサン混液（3:17）15mLで洗浄した手製フロリジルミニカラムに負荷し、アセトン/ヘキサン混液（3:17）40mLで溶出した。溶出液及び負荷時に溶出した液を混合し、減圧下濃縮乾固した。残留物は、アセトン/ヘキサン混液（3:17）2mLに溶解し、「生薬抽出液の試料溶液」とした。

7. 装置及び測定条件

GC/MSは、Agilent製6890N GC/5973N MSDを用い、以下の条件で測定した。

カラム：DB-1701（0.25mm i.d×30m、膜厚0.25μm、Agilent製）、ヘリウム流量：1.7mL/min、カラム温度：50℃（1min）→25℃/min→100℃→5℃/min→270℃（10min）、インターフェース温度：270℃、イオン源温度：180℃、モード：負化学イオン化モード、注入量：2μL、注入方法：スプリットレス、モニタリングイオン：シペルメトリン（207（m/z）、171（m/z））、フェンバレレート（211（m/z）、213（m/z））

結果及び考察

1. チンピに残留するピレスロイド系農薬の測定結果

チンピ10試料を分析したところ、表1に示すような結果を得た（検出限界：0.01ppm）。

表1. チンピに残留していたピレスロイド系農薬

試料	購入年	シペルメトリン (ppm)	フェンバレレート (ppm)	産地
1	2007	N.D.	N.D.	日本
2	2007	0.03	0.04	中国
3	2007	N.D.	N.D.	日本
4	2007	0.04	0.08	中国
5	2007	0.13	0.04	中国
6	2009	0.04	Tr.	不明
7	2009	0.05	Tr.	不明
8	2009	0.11	N.D.	不明
9	2009	N.D.	N.D.	不明
10	2009	N.D.	N.D.	日本

N.D.:<0.01ppm

Tr.:トレース

一部の試料からピレスロイド系農薬が検出された。しかし、その値は、日本漢方生薬製剤協会が、チンピ（他 4 生薬）を原料として製造する漢方製剤及び生薬製剤を対象として定める自主基準（シペルメトリン：1.0ppm、フェンバレレート：1.5ppm）を下回るものであった。

2. 生薬抽出液への農薬の移行

生薬は、主として水で抽出し、服用される。しかし、ピレスロイド系農薬は脂溶性であることから、実際の摂取量は、生薬から検出された量より大幅に低くなる可能性が高い。今回農薬が検出されたチンピについて、生薬抽出液を調製し、農薬が抽出液へと移行する割合を調査した。「生薬抽出液に移行したピレスロイド系農薬の測定」に記載した分析法の妥当性を確認するために、抽出液に各農薬を 0.1ppm となるように添加し、添加回収試験を実施した。その結果、表 2 に示す結果が得られた。

表 2. 生薬抽出液への添加回収試験

農薬名	回収率(%)	相対標準偏差 (%)
シペルメトリン	109.0	13.3
フェンバレレート	110.8	8.9

(n=3)

シペルメトリン及びフェンバレレートについて、回収率は、109.0%及び110.8%であり、相対標準偏差も13.3%及び8.9%であった。今回検討した分析法は、チンピ抽出液中のピレスロイド系農薬を適切に測定することができると考えられた。

確立した分析法を用いて、チンピに残留していた農薬（シペルメトリン：試料5、フェンバレレート：試料4）の生薬抽出液への移行率を調査した（表 3）。

表 3. 生薬及び生薬抽出液中の農薬の量の比較

農薬名	生薬中の量 ($\mu\text{g}/5\text{g}$)	生薬抽出液中の量 ($\mu\text{g}/2\text{mL}$)
シペルメトリン	0.640	N.D.
フェンバレレート	0.375	N.D.

N.D.<0.02 $\mu\text{g}/2\text{mL}$

その結果、生薬抽出液からはピレスロイド系農薬は検出されなかった。また、標準溶液（各農薬 5 μg 相当量）について、チンピと同様に「生薬抽出液の調製」に従って操作したところ、抽出液からは、50~60%の農薬が回収された（表 4）。

表 4. 農薬標準品を「生薬抽出液の調製」により処理した場合の挙動

農薬名	添加した標準品の量 (μg)	残存率(%)
シペルメトリン	5	52.7
フェンバレレート	5	57.5

n=3

このことから、「生薬抽出液の調製」過程ではピレスロイド系農薬の半分程度は分解、揮散せず残存するものと考えられた。チンピの抽出液からはピレスロイド系農薬が検出されなかったことから、チンピに残留していたピレスロイド系農薬は、生薬抽出液へはほとんど移行せず、移行したのものについても分解、揮散したために検出されなかったものと考えられた。この結果は、塩田らの検討結果とほぼ一致した⁵⁾。有機塩素系農薬⁹⁾及び有機リン系農薬¹⁰⁾についても同様の挙動を示すことが報告されている。これらのことから、水に溶けにくい農薬は、水を用いて製造する製剤へはほとんど移行しないと考えられた。

通常、漢方製剤は水を用いて製造される。今回の調査では、チンピから検出されたピレスロイド系農薬は、自主基準と比べて低いものであった。また、水で抽出した場合、生薬抽出液には、農薬がほとんど移行しなかった。以上のことから、今回検出された濃度では、漢方製剤を製造した場合でも、日本漢方生薬製剤協会が定める自主基準より大幅に低い値となると考えられた。しかし、漢方製剤を製造する場合は、複数の生薬から同時に抽出するため、他の生薬から溶出してきた成分により、製剤化における農薬の挙動が変わることも予想される。さらに、生薬製剤については、水以外の溶媒により抽出される可能性も考えられることから、更なる検討を行う必要があると考えられた。

結論

1. チンピに残留するピレスロイド系農薬についての実態調査を行ったところ、一部の試料から、ピレスロイド系農薬を検出した。
2. ピレスロイド系農薬が検出されたチンピを水を用いて抽出したところ、抽出液にはほとんど移行しなかった。

文献

- 1) 第十五改正日本薬局方解説書, pD-469~472, 廣川書店, 東京 (2006)
- 2) 食品安全性セミナー3 残留農薬, p129~133, 中央法規出版, 東京 (2004)
- 3) 梶村計志, 田上貴臣, 皐月由香, 中村暁彦, 山本文雄, 岩上正藏: 1990~2005年に実施した人参・紅参に対する有機塩素系農薬の実態調査, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, **44**, 61~65 (2006)
- 4) 佐藤正幸, 姉帯正樹, 鎌倉浩之, 合田幸広: 生薬中の残留有機リン系農薬の分析(第2報), 医薬品研究, **39**, 203~222 (2008)
- 5) 塩田寛子, 浜野朋子, 中島順一, 下村壽一, 末次大作, 安田一郎: 生薬及び煎出液に残留する有機リン系及びピレスロイド系農薬, 東京健安研セ年報, **55**, 43~47 (2004)
- 6) 中島順一, 浜野朋子, 塩田寛子, 安田一郎, 鎌倉浩之, 合田幸広: 生薬中のピレスロイド系農薬分析における測定値のばらつき要因と残留実態, 東京健安研セ年報, **55**, 48~53 (2004)
- 7) 佐藤元昭: 中国における食品安全と検査状況, 食衛誌, **50**, J-9~J-11(2009)
- 8) Takaomi Tagami, Keiji Kajimura, Chie Nomura, Shuzo Taguchi, Shozo Iwagami: Determination of Pyrethroid Pesticides in Sinnamonomi Cortex. YAKUGAKU ZASSHI, **129**, 173~176 (2009)
- 9) 吉岡直樹, 秋山由美, 三橋隆夫, 畑中久勝, 辻正彦, 松下純雄: ニンジン・センナの残留農薬分析法の検討と実態調査, 医薬品研究, **31**, 225~231 (2000)
- 10) 佐藤正幸, 姉帯正樹, 合田幸広: 生薬煎液中の残留有機リン系農薬, 医薬品研究, **37**, 245~250 (2006)

界面活性剤の皮膚常在菌への影響

宮野直子*

合成界面活性剤は家庭内では多くの場面に使用されている化学物質である一方、合成洗剤、洗浄剤による皮膚障害が問題となっている。これは界面活性剤によって皮膚のバリアが破壊されることが、原因のひとつと考えられる。また界面活性剤の抗菌作用による皮膚常在菌への影響が一因ではないかと考え今回、市販の基剤も含めて検討を行った。その結果、抗菌性を有する陽イオン系以外に陰イオン系や非イオン系の一部に皮膚常在菌等に対する生育抑制が見られ、皮膚常在菌への影響が示唆された。

キーワード：界面活性剤、MIC、MBC、CFU、皮膚常在菌

Key words: Surfactants, MIC, MBC, CFU, Skin microbial flora

合成界面活性剤は洗濯用洗剤、台所用洗剤、柔軟仕上げ剤、髪用、皮膚用洗浄剤として、家庭のなかで大量に使われている化学物質である。厚生労働省の「家庭用品に係る健康被害モニター報告」によると、皮膚科の報告件数のうち合成洗剤や洗浄剤による皮膚障害は毎年上位にある¹⁾。界面活性剤により皮脂膜が脱落して進行性指掌角皮症(KTPP型)が発症する。この要因として、界面活性剤の細胞膜機能消失作用や刺激作用により皮膚のバリアが破壊されるためと考えられている¹⁾。また、界面活性剤には抗菌作用のあるものもあり、特に陽イオン系界面活性剤はその抗菌作用のため洗濯用洗剤や化粧品などに添加されている²⁾。著者は、以前に、市販の抗菌防臭加工製品の抗菌力評価を行い、皮膚常在菌のバランスを崩す可能性を指摘した³⁾。皮膚常在菌は *Staphylococcus* 属や *Propionibacterium* 属が大半を占め、密集することによって、真菌等の微生物の侵入を防ぐ働きがあると言われており⁴⁾、バランスの崩れは皮膚障害を引き起こす要因になりえる。身の回りで利用される界面活性剤は皮膚に接触する機会も多く、陽イオン系に限らず、

その抗菌性による皮膚常在菌への影響について検討を行った。

実験方法

1. 供試菌

試験には、大腸菌 (*Escherichia coli* IFO3972)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae* IFO13277)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* IFO12732)、皮膚常在菌 (*Staphylococcus epidermidis* NRBC100865 とヒト健康者足裏より採取した *Staphylococcus capitis* B、*Staphylococcus warnei*) を用いた。

これらの菌をニュートリエントブロス (NTB) 中で 37°C 1 晩震盪培養した後、NTB で 50 倍希釈し、さらに 2 時間震盪培養した。遠沈 (4°C、3000rpm、10 分) して菌を滅菌生食水で洗浄後、菌を滅菌蒸留水に 660nm で吸光度が 0.05 になるように懸濁した後、滅菌蒸留水で 2~5 倍希釈した液を試験菌液とした ($10^6 \sim 10^7$ 個/ml)。

2. 界面活性剤

陽イオン系界面活性剤として、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルトリメチルアンモニウム、塩化トリメチルアンモニウム、および塩化テトラメチルアンモニウムの 6 種類を用いた。

陰イオン系界面活性剤として、オレイン酸 K、1-ペ

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

Effect of Surfactants on Skin Microbial Flora.

by Naoko MIYANO

ンタスルホン酸 Na、1-デカンスルホン酸 Na、ブチルナフタレンスルホン酸 Na、ドデシル硫酸 Na、ドデシルベンゼンスルホン酸 Na、およびヘキサデシル硫酸 Na の 7 種類を用いた。

また、メーカー5 社より陰イオン系界面活性剤を主成分とする 8 種類の基剤の提供を受けた。基剤の用途は表 1 に示した。

表1. 陰イオン系基剤の用途

No	用途
①	ハウスホールド、台・洗剤、シャンプー
②	ハウスホールド
③	洗剤
④	シャンプー、洗顔料
⑤	シャンプー、洗顔料
⑥	洗剤
⑦	洗剤
⑧	洗剤

非イオン系界面活性剤として、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (tween20) ; A、ソルビタンモノオレート ; B、ポリエチレングリコールモノステアレート ; C、ポリオキシエチレン (10) ノニルフェニルエーテル ; D、ポリオキシエチレンラウリルエーテル ; E、ポリオキシエチレン (5) ドコシルエーテル ; F の 6 物質を用いた。

またメーカー4 社より非イオン系界面活性剤を主成分とする 9 種類の基剤の提供を受けた。基剤 (G~O) の用途は表 2 に示した。

表2. 非イオン系基剤の用途

	用途
G	化粧品用乳化剤、消泡剤、抑泡剤
H	活性剤 (農薬)
I	シャンプー、家庭用液体洗剤
J	スキンケア、ヘアケア、潤滑剤
K	洗浄剤、スキンケア、ヘアケア
L	化粧品用増泡増粘剤
M	化粧品用乳化剤
N	濃縮型粉末洗剤、液体洗剤
O	洗剤の増泡増粘剤

3. MIC (Minimum inhibitory concentration、最小発育阻止濃度) の測定

界面活性剤は蒸留水で 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、メンブランフィルターでろ過滅菌後、マイクロプレート (IWAKI製 96 穴平底) 上に、滅菌蒸留水で順次 2 倍希釈して 39~5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度系列の 100 μl 溶液を作製した。また、基剤は、有効成分が 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう調整し、同様に滅菌後、39~5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度系列の 100 μl 溶液を作製した。さらに、滅菌した 2 倍濃度

感受性測定用ブイヨン (ニッスイ) を 100 μl ずつ加え、試験菌液を 10 μl ずつ加えて 35 $^{\circ}\text{C}$ で 24~48 時間培養した。マルチスキャン MS (Labsystems製 630 nm) により吸光度を測定し、濁りの観察されない最小濃度を MIC 値とした^{5, 6)}。

4. MBC (Minimum bactericidal concentration、最小殺菌濃度) の測定

短試に滅菌蒸留水 500 μl ずつ加え、次に調製した試料 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 500 μl 加え、順次 2 段階希釈を行って 39~5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度系列の 500 μl 溶液を作製した。さらに、試験菌液を 500 μl ずつ加えて 30 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間静置した。マイクロプレートに NTB ブイヨン 200 μl を加えた後、短試から 10 μl ずつ移した。1 濃度 4 穴で行ない、35 $^{\circ}\text{C}$ で 24~48 時間培養した。マルチスキャン MS により吸光度を測定して、濁りの観察されない最小濃度を MBC 値とした^{5, 6)}。

5. CFU (colony forming unit) による殺菌作用の測定

界面活性剤はエチルアルコールに溶解して 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした後、エチルアルコールで希釈して 125~2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した。基剤はエチルアルコールに溶解して 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にした後、2 倍希釈して 125~2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した。

滅菌した 1.5ml のサンプルチューブに、リン酸緩衝液 100 μl 、精製水 325 μl 、各濃度の界面活性剤 25 μl 、試験菌液 50 μl を加えた (全量 500 μl) 後、37 $^{\circ}\text{C}$ 60 分温浴した。混合試験液 0.2ml を滅菌生理食塩水 1.8ml に加えて 2 回希釈した ($\times 10$ 、 $\times 100$)。希釈液 100 μl を標準寒天培地にコンラージで塗抹し、24~48 時間培養した後、コロニーアナライザー (システムサイエンス社製 CA-11) で計測した。

結果および考察

1) 陽イオン系界面活性剤

陽イオン系 6 物質の MIC を測定した結果を表 3 に示した。塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムおよび塩化セチルトリメチルアンモニウムの MIC 値が 2 未満~31.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示し、全菌種に対して高い発育阻止がみられた。*E. coli* および *K. pneumoniae* より皮膚常在菌 3 種に対する MIC 値は低

く、より影響を受けやすいと考えられた。安全性の面から塩化セチルピリジニウム、塩化セチルトリメチルアンモニウムは皮膚・粘膜・眼の刺激作用がいわゆる等、これら4物質は薬事法でアレルギー反応をおこす可能性があるとした表示指定成分である^{2, 7)}。

陽イオン系は殺菌性、脱臭性あるいは吸着性があり、衣料用合成洗剤に殺菌剤、柔軟剤、帯電防止剤として添加されている。また毛髪や皮膚のリンス剤として生産量は増加していることから⁷⁾、皮膚上の常在菌を殺菌してバリア機能の低下をおこす要因のひとつとなる可能性が考えられる。

2) 陰イオン系界面活性剤

陰イオン系7物質のMICを測定した結果を表4に示した。ドデシルベンゼンスルホン酸Naおよびヘキサデシル硫酸Naは*E. coli*および*K. pneumoniae*に対する発育阻止は見られないが、*S. aureus*および皮膚常在菌3種に対するMIC値は15.7~500 $\mu\text{g/ml}$ を示し、発育阻止がみられた。

陰イオン系界面活性剤を主成分とする基剤のMICを表5に示した。基剤⑦は*K. pneumoniae*、*S. aureus*および皮膚常在菌3種に対するMIC値が78.1~156.3

$\mu\text{g/ml}$ であり発育阻止がみられた。また、基剤⑥および⑧は*S. aureus*および皮膚常在菌3種に対するMIC値が39.1~156.3 $\mu\text{g/ml}$ であり、発育阻止がみられた。

基剤のMBCについて表6に示した。基剤⑤および⑥156.3~625 $\mu\text{g/ml}$ であり殺菌作用がみられた。基剤⑦値が78.1~312.5 $\mu\text{g/ml}$ であり殺菌作用がみられた。

ヘキサデシル硫酸Naや基剤⑦は気泡性や洗浄力があり、台所、衣料用洗剤、シャンプー、歯磨き等の用途がある。しかし、皮膚刺激、毛髪発育障害、経皮吸収促進があるといわれている。ドデシルベンゼンスルホン酸Naや基剤⑧は気泡性、浸透性、洗浄性が優れ衣料用、台所用、住居用洗剤の主基剤として利用されている。両物質はアレルギー性があり表示指定物質である⁷⁾。

陰イオン系は界面活性剤生産量の過半を占めており、合成洗剤中に5~30%含まれている。また洗濯時における界面活性剤の通常使用濃度は0.01% (100 $\mu\text{g/ml}$)である^{2, 8)}。今回、皮膚常在菌に影響を与える濃度を検討した結果、100 $\mu\text{g/ml}$ 以下でも皮膚常在菌は影響

表3. 陽イオン系界面活性剤のMIC (最小発育阻止濃度)

界面活性剤	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	大腸菌	肺炎桿菌	黄色ぶどう球菌	皮膚常在菌		
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis B</i>	<i>S. warneri</i>
塩化セチルピリジニウム	15.75	8	<2	<2	<2	<2
塩化ベンザルコニウム	15.75	4	<2	<2	<2	<2
塩化ベンゼトニウム	31.5	4	<2	<2	<2	<2
塩化セチルトリメチルアンモニウム	31.5	8	<2	<2	<2	<2
塩化トリメチルフェニルアンモニウム	>500	>500	>500	>500	>500	>500
塩化テトラメチルアンモニウム	>500	>500	>500	>500	>500	>500

表4. 陰イオン系界面活性剤のMIC (最小発育阻止濃度)

界面活性剤	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	大腸菌	肺炎桿菌	黄色ぶどう球菌	皮膚常在菌		
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis B</i>	<i>S. warneri</i>
オレイン酸カリウム	>500	>500	>500	>500	500	250
1-ペンタスルホン酸Na	>500	>500	>500	>500	>500	>500
1-デカンスルホン酸Na	>500	>500	>500	>500	>500	>500
ブチルナフタレンスルホン酸Na	>500	>500	>500	500	>500	500
ドデシル硫酸Na	>500	250	250	250	500	250
ドデシルベンゼンスルホン酸Na	>500	>500	31.5	31.5	125	31.5
ヘキサデシル硫酸Na	>500	>500	31.5	15.75	500	250

表5. 陰イオン界面活性剤を主成分とする基剤のMIC(最小発育阻止濃度)

基剤	主成分	MIC(μg/ml)					
		大腸菌	肺炎桿菌	黄色ぶどう球菌	皮膚常在菌		
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis B</i>	<i>S. warneri</i>
①	ポリオキシエチレン	>2500	1250	2500	>2500	>2500	>2500
	アルキルエーテル硫酸Na	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	2500
②	ポリオキシエチレン	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
	オクチルエーテル硫酸Na	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
③	ポリオキシエチレンヤシ油脂肪酸	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
	モノエタノールアミド硫酸Na	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
④	ポリオキシエチレン	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
	スルホコハク酸ラウリル2Na	>2500	>2500	>2500	312.5	>2500	>2500
⑤	ポリオキシエチレン	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
	スルホコハク酸ラウリル2Na	>2500	>2500	39.1	39.1	156.3	78.1
⑥	アルキルジフェニルエーテル	>2500	156.3	78.1	78.1	156.3	156.3
	ジスルホン酸Na	>2500	>2500	39.1	39.1	39.1	39.1
⑦	アルキル 硫酸Na	>2500	>2500	39.1	39.1	39.1	39.1
⑧	ドデシルベンゼンスルホン酸Na	>2500	>2500	39.1	39.1	39.1	39.1

表6. 陰イオン界面活性剤を主成分とする基剤のMBC(最小殺菌濃度)

基剤	主成分	MBC(μg/ml)					
		大腸菌	肺炎桿菌	黄色ぶどう球菌	皮膚常在菌		
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis B</i>	<i>S. warneri</i>
①	ポリオキシエチレン	>2500	2500	2500	>2500	2500	1250
	アルキルエーテル硫酸Na	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
②	ポリオキシエチレン	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
	オクチルエーテル硫酸Na	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
③	ポリオキシエチレンヤシ油脂肪酸	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
	モノエタノールアミド硫酸Na	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
④	ポリオキシエチレン	>2500	>2500	>2500	1250	>2500	>2500
	スルホコハク酸ラウリル2Na	>2500	2500	625	312.5	2500	312.5
⑤	ポリオキシエチレン	>2500	>2500	312.5	156.3	2500	312.5
	スルホコハク酸ラウリル2Na	>2500	>2500	312.5	156.3	2500	312.5
⑥	アルキルジフェニルエーテル	>2500	1250	156.3	312.5	312.5	156.3
	ジスルホン酸Na	>2500	>2500	78.1	78.1	312.5	78.1
⑦	アルキル 硫酸Na	>2500	>2500	78.1	78.1	312.5	78.1
⑧	ドデシルベンゼンスルホン酸Na	>2500	>2500	78.1	78.1	312.5	78.1

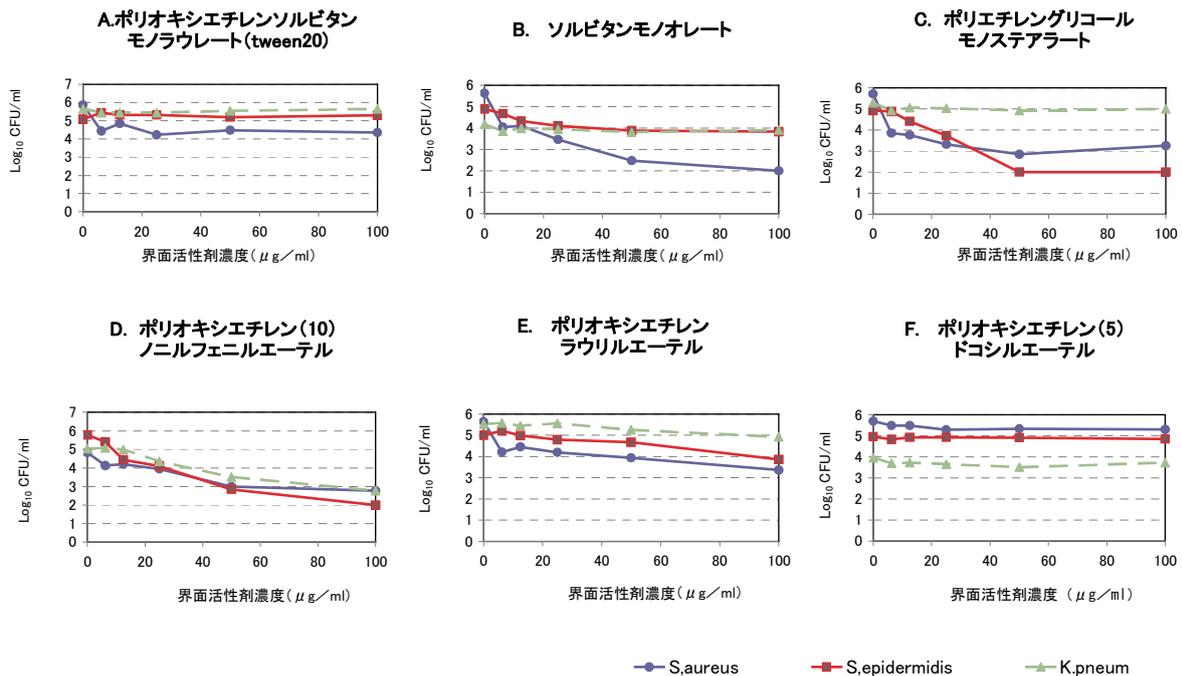


図1. 非イオン系界面活性剤のCFU測定

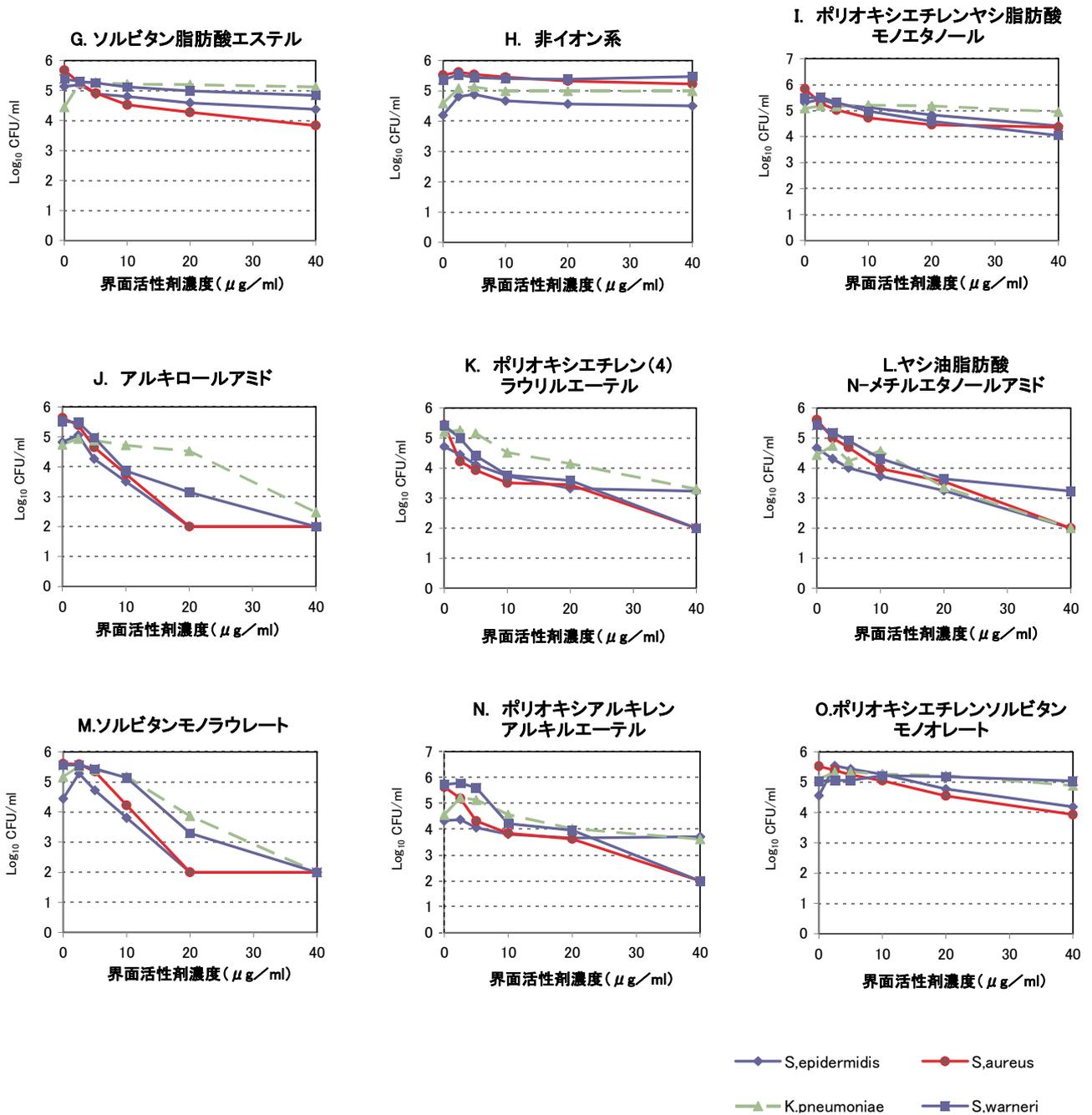


図2. 非イオン系界面活性剤を主成分とする基剤のCFU

を受けることがわかった。従って通常使用濃度であっても皮膚常在菌に影響がでる可能性がある。陰イオン系の殺菌作用は高くないが、皮膚に直接付着する可能性があり、濃度によっては、病原性菌は発育できるが皮膚常在菌は発育できない状態が出現する可能性が考えられる。

3) 非イオン系界面活性剤

非イオン系の一部が水に難溶のため、エチルアルコールに溶解してCFU測定を行った。非イオン系界面活性剤6物質についてCFU測定した結果を図1に示した。脂肪酸系に分類される3物質(A, B, C)について

K. pneumoniae に対して3物質の影響はみられないが、*S. aureus* に対して3物質による殺菌効果と

S. epidermidis に対してCによる殺菌効果がみられた。高級アルコール系(D, E, F)の場合、Dは3菌種に対して殺菌効果を示したが、Fの影響はみられなかった。

非イオン系界面活性剤を主成分とする市販の基剤について、CFU測定した結果を図2に示した。脂肪酸系の基剤(J, L, M)は4菌種に殺菌効果が見られ、特に*S. aureus*、*S. epidermidis* に強い殺菌効果みられた。高級アルコール系の基剤(K, N)は4菌種に殺菌効果が見られ、特に*S. aureus*、*S. warneri* にやや強い殺菌効果がみられた。脂肪酸系の基剤(G, I, O)は4菌種に対し殺菌効果は弱かった。この結果、基剤の脂肪酸系には殺菌効果の高いグループと低いグループがみられた。

非イオン系は陰イオン系と比較して洗浄力は弱い、皮膚に対する刺激性や経口毒性は少ない。泡立ちが少なく、すすぎ性にすぐれたものが多いので台所用洗剤や衣類用洗剤に陰イオン系と共に利用される⁹⁾。台所用洗剤による繰り返しの水仕事等の外部刺激によって発症する進行性指掌角皮症は非イオン系および陰イオン系の影響と考えられる。界面活性剤は浸透力の強いタイプは眼や皮膚刺激性が強いとされるが、非イオン系のアルキル基や酸化エチレン鎖が長くなるほど眼や皮膚刺激性は弱くなるといわれている²⁾。

非イオン系はカビに対し生育促進作用を示すといわれるが、タイプ間で作用が異なる。脂肪酸系はアミド系を除いて室内、洗濯槽に見られるカビ全般に生育促進作用を示し、高級アルコール系は洗濯槽に多く見られるカビにのみ生育促進作用を示したという報告がある⁸⁾。

今回の実験から、非イオン系は製品使用によって皮膚常在菌等には殺菌効果を示す一方で、洗濯機内部に関するカビに対しては生育促進するという両面があると考えられる。

謝 辞

今回、市販界面活性剤の提供にご協力いただきましたメーカーの皆様には深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省：平成19年度家庭用品に係る健康被害モニター報告、(2009)
- 2) 東京都生活文化局消費生活部：家庭内で使用される化学物質の安全性に関する調査、2-33 (2002)
- 3) 宮野直子、中島春信、松永一朗：天然系薬剤使用の抗菌防臭加工繊維製品に対する抗菌力評価(第3報)、大阪府立公衆衛生研究所報、**37**、23-26 (1999)
- 4) 中山一誠、山地恵美子：検査と技術、**18**、576-578 (1990)
- 5) H. KOURAI, Y. MANABE, E. MATSUTANI, Y. HASEGAWA and K. NAKAGAWA, : Antimicrobial Activities Alkylallyldimethylammonium Iodides and Alkylallyldiethyl Ammonium Iodides, *J. Antibact. Antifung. Agents* **15**, 271-280 (1955)
- 6) 日本防菌防黴学会編：防菌防黴ハンドブック(1993)
- 7) 長谷川治：化粧品の実態、日本消費者連盟 (2006)
藤本武彦：新・界面活性剤入門、三洋化成工業 (1981)
- 8) 濱田信夫、中村正樹：種々の界面活性剤のカビの生育に与える影響、生活衛生、**49**、365-371 (2005)
- 9) 竹原淳彦：講座-界面活性剤の基礎的性質、防菌防黴、**33**、299-305 (2005)
- 10) T. MAEDA, S. GOTO, Y. MANABE, K. OKAZAKI, H. NAGAMUNE and H. KOURAI : Bactericidal Action of N-Alkylcyanopyridinium Bromide A against *Escherichia coli* K12W3110, *Biocontrol Science*, **1**, 41-49(1996)
- 11) 石坂要、石川敬治、稲垣誠、杉浦渉：健常人より分離した皮膚常在菌について、*J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn*, **35**, 34-41 (2001)

大阪府における環境および食品中放射能調査

(平成20年度報告)

味村真弓* 肥塚利江* 渡邊 功*

平成20年度の文部科学省委託により実施した大阪府における環境および各種食品中放射能調査結果を報告する。調査は、降水中の全ベータ放射能測定、環境試料(降下物, 大気浮遊じん, 上水, 海水, 土壌, 海底土)および各種食品試料中のガンマ線放出核種分析[セシウム137, ヨウ素131, カリウム40等]および空間放射線量率について実施した。

平成20年度の環境および各種食品中の放射能および放射線のレベルは、昨年度と同様すべて平常値であり、人工放射性物質の環境への新たな放出はなかったことが確認された。本年度も上水の原水(淀川河川水)から医学利用によると思われるヨウ素131を検出したが、その濃度は0.76mBq/Lと非常に低く、府民への健康影響には問題とならないレベルであった。

また、測定値の信頼性確保のため実施された(財)日本分析センターとのクロスチェックの結果、ガンマ線核種分析の精度は確保されていた。

キーワード: 環境放射能、全ベータ放射能、核種分析、空間放射線量率

Key words: environmental radioactivity, gross β activity, radionuclide analysis, environmental γ activity

当所では、昭和35年(1960年)度より大阪府における環境および食品中の放射能測定調査を実施している。この調査は、人工放射性降下物および原子力施設等からの放射性物質の漏洩による環境汚染の有無およびそのレベルを明らかにする目的で行っており、主として文部科学省の委託によるものである。降水(雨水)については全ベータ放射能測定、その他の環境試料および食品試料についてはガンマ線核種分析[セシウム137 (^{137}Cs), ヨウ素131 (^{131}I), カリウム40 (^{40}K)等]を行った。また、サーベイメータおよびモニタリングポストによる空間放射線量率調査を行った。

ガンマ線核種分析に関しては、測定値の信頼性確保

のため、(財)日本分析センターとの間で、標準試料7検体および環境試料3検体について、クロスチェック(以下、分析確認)を行った。

本報告では、平成20年度に実施した上記の放射能調査結果を、過去の測定結果との比較も含め報告する。

実験方法

試料の採取、処理および測定は、「環境放射能水準調査委託実施計画書(平成20年度)」¹⁾に基づいて行った。また、分析確認用試料に関しては、「平成20年度放射能分析確認調査実施要領」²⁾および「平成20年度放射能分析確認調査実施細目」³⁾に基づいて行った。表1に調査項目および試料等を示す。

1. 全ベータ放射能測定

1-1 降水(雨水)試料

当所(大阪府立公衆衛生研究所:大阪市東成区)観測室屋上(地上約20m)に設置したデポジットゲージ

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課
Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture
(Fiscal 2008 Report)
by Mayumi MIMURA, Toshie HIZUKA and Isao WATANABE

表1 放射能調査項目および試料等

調査項目	試料名	種別	採取場所	採取回数等	件数
全ベータ放射能	定時降水	雨水	大阪市東成区 当所屋上	降雨毎/年間	86
ガンマ線核種分析	大気浮遊じん		大阪市東成区 当所屋上	毎月	12
	降下物	雨水・ちり	大阪市東成区 当所屋上	毎月	12
	上水	原水	守口市大庭町 大阪府庭窪浄水場	年1回(平成20年7月)	1
		蛇口水	大阪市東成区 当所本館1F	年1回(平成20年6月)	1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(平成20年7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(平成20年7月)	1
	土壌	0~5cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成20年7月)	1
		5~20cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成20年7月)	1
	牛乳	原乳(生産地)	大阪府堺・羽曳野市	年1回(平成20年8月)	1
		市販乳(消費地)	大阪市東成区	年1回(平成20年8月)	1
	米	消費地	大阪市東成区	年1回(平成20年11月)	1
	野菜	タマネギ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成20年7月)	1
		ダイコン(消費地)	大阪市東成区	年1回(平成20年11月)	1
		ホウレン草(消費地)	大阪市東成区	年1回(平成20年11月)	1
		キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成21年1月)	1
	魚	タイ(消費地)	大阪市東成区	年1回(平成20年12月)	1
日常食	陰膳	大阪市	年2回(平成20年6月、12月)	2	
分析確認試料	標準試料	模擬牛乳	(財)日本分析センターで調製	年1回(平成20年5月)	1
		模擬土壌	(財)日本分析センターで調製	年1回(平成20年6月)	1
	分割試料	寒天	(財)日本分析センターで調製	年1回(平成20年6月)	5
		土壌(0-5cm)	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成20年7月)	1
空間線量率	モニタリングポスト	牛乳	大阪市東成区	年1回(平成20年8月)	1
		日常食	大阪市	年1回(平成20年6月)	1
		モニタリングポスト	大阪市東成区 当所屋上	毎日/年間	365
サーバイメータ	サーバイメータ	モニタリングポスト	大阪市東成区 当所中庭	毎月	12
		モニタリングポスト	大阪市中央区 大阪城公園内	毎月	12
		モニタリングポスト	大阪府泉南郡熊取町	年2回(平成20年7月、平成21年1月)	6

(表面積 1000cm²)で雨水を集めた。毎朝 9時30分に採取し、100mL以上の降水について、100mLを測定試料とした。

1-2 測定方法

試料100mLにヨウ素担体(1mg I⁻/mL)1mL、0.05mol/L硝酸銀2mLおよび10%硝酸1mLを加え加熱濃縮し、直径25mmのステンレス製試料皿に移し蒸発乾固させた。測定は低バックグラウンド放射能自動測定装置(キャンベラ製S5X2050E型)で行った。比較試料は、酸化ウラン(U₃O₈:日本アイソトープ協会製、35.3dps)を用いた。測定は試料採取6時間後に行った。測定時間は、比較試料5分、降水試料30分とした。

2. 核種分析

2-1 測定試料

(1) 大気浮遊じん: 当所観測室屋上(地上約20m)に設置したハイボリウム・エアサンプラー(紀本電子工業製、121型)を用いて、ろ紙(東洋濾紙、HE-40T)

上に大気浮遊じんを捕集した。捕集は、毎月3回、午前10時から翌日の午前10時までの24時間行った。1ヶ月分のろ紙試料を円形(直径50mm)に切り取り、ポリプロピレン製容器(U-8容器)に詰め測定用試料(測定に供した吸引量:約3000m³)とした。

(2) 降下物(雨水・ちり): 当所観測室屋上(地上約20m)に設置した水盤(表面積5000cm²)に1ヶ月間に降下した雨水およびちりを採取し、採取試料全量を上水自動濃縮装置(柴田理化学器械製)を用いて蒸発濃縮した。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固した後、残留物をU-8容器に移し測定用試料とした。

(3) 上水: 原水(淀川河川水)は大阪府庭窪浄水場(守口市)原水取水口から、蛇口水は当所本館一階実験室内蛇口から採取した。採取試料各100Lを上水自動濃縮装置を用いて蒸発濃縮した。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固した後、残留物をそれぞれU-8容器に移し測定用試料とした。

(4) 食品: 米および牛乳は、それぞれ約2kgを直接マ

リネリピーカー（2L 容）に入れ測定用試料とした。野菜類は食用部約 4kg を 80℃の乾燥器で乾燥後、魚類の食用部分約 4kg ならびに陰膳方式で採取した日常食 5 人分・1 日の試料全量は電磁調理器等を用いて加熱炭化した後、それぞれ石英製容器に移して電気炉（450℃）で灰化した。灰試料を 0.35mm メッシュのふるいを通し、U-8 容器に移して測定用試料とした（試料採取場所、時期および測定数は表 1 を参照）。

(5) 海水，土壌，海底土：海水は、2L を直接マリネリピーカー（2L 容）に入れ測定用試料とした。土壌および海底土は、採取後に 105℃で乾燥し、2mm メッシュのふるいで分けて得た乾燥細土約 100g を U-8 容器に入れ、測定用試料とした（試料採取場所、時期および測定数は表 1 を参照）。

(6) 分析確認試料：

①標準試料；(財) 日本分析センターが数核種を添加して調製した標準試料（模擬牛乳、寒天、模擬土壌）について、模擬牛乳（1 試料）は全量（2L）を直接マリネリピーカー（2L 容）に入れ、また、寒天試料（U-8 容器：5 試料）および模擬土壌（U-8 容器：1 試料）は U-8 容器のまま測定を行った。

②分割試料；環境試料 3 検体〔牛乳（市販乳）、土壌（0-5cm）、日常食（6 月採取分）〕について、各々上記(4)および(5)の方法で前処理等を行い測定した。

牛乳については、マリネリピーカーで測定後の 2L に 1L を足して 3L としたものを電磁調理器等を用いて加熱炭化した後、電気炉（450℃）で灰化し、灰試料を 0.35mm メッシュのふるいを通し、U-8 容器に移して分割試料とした。他の試料は、測定した U-8 容器をそのまま分割試料として(財) 日本分析センターに送付した。

①②の測定結果について、①の試料については添加値、②については分析センター（JCAC）の測定結果と比較検証し、更に、当方（分析機関）と分析センターの拡張不確かさ（ U ）から En 数を算出し、 $|En| > 1$ の場合は技術的検討を要すると判断した。なお、 En 数は下記の式により求められる。

$$En \text{ 数} = \frac{(\text{分析値}_{\text{分析機関}} - \text{分析値}_{\text{JCAC}} \text{ または 添加値})}{\sqrt{U^2_{\text{分析機関}} + U^2_{\text{JCAC}}}}$$

2-2 測定方法

あらかじめエネルギーの異なる核種を含んだ標準線源を用いてエネルギー校正および検出効率校正を行ったゲルマニウム半導体検出器（東芝 K.K. 製 IGC-

20175SD）を用い、試料中の核種より放出されるガンマ線量を測定した。測定時間は原則 80000 秒とし、分析確認の標準試料の寒天試料のみ 20000 から 80000 秒とした。得られた計測結果をバックグラウンド補正した後、エネルギー補正および検出効率補正を行ない、測定試料中の核種（ ^{137}Cs 、 ^{131}I および ^{40}K 等）の定性定量分析を行った。

3. 空間放射線量率測定

モニタリングポスト（NaI シンチレーション式、エネルギー補償型、アロカ製 MAR-22 型）およびサーベイメータ（NaI シンチレーション式、アロカ製 TCS-166 型）で空間放射線量率を測定した。

モニタリングポストによる空間放射線量率は、当所観測室屋上に設置したポスト（地上約 20m）に検出器を設置し、連続測定した（1 時間毎に平均値を、また、1 日毎に最大値、最小値、平均値を自動印字）。

サーベイメータによる空間放射線量率測定は、一般環境として当所中庭および大阪城公園（いずれも大阪市）で毎月、原子炉（京都大学原子炉実験所，泉南郡熊取町）周辺 3 ヶ所で 7 月および 1 月の 2 回行った。測定器の時定数を 30 秒とし、地表 1m の位置におけるサーベイメータの指示値を 30 秒間隔で 5 回以上読み取り、平均値を算出した。

表2 降水中全ベータ放射能測定結果

年 月	降水量 mm	件数 (検出数)	濃度 Bq/L	降下量 MBq/km ²
平成20年 4月	136	9 (0)	ND	ND
平成20年 5月	206	6 (0)	ND	ND
平成20年 6月	190	9 (0)	ND	ND
平成20年 7月	141	6 (1)	ND ~ 0.63	0.83
平成20年 8月	82	6 (0)	ND	ND
平成20年 9月	174	12 (3)	ND ~ 0.69	24.96
平成20年10月	76	7 (0)	ND	ND
平成20年11月	50	5 (0)	ND	ND
平成20年12月	55	5 (1)	ND ~ 0.37	10.65
平成21年 1月	34	4 (1)	ND ~ 0.29	2.12
平成21年 2月	126	9 (0)	ND	ND
平成21年 3月	145	8 (1)	ND ~ 0.43	0.86
平成20年度	1415	86 (7)	ND ~ 0.69	39.4
過去3年間の値				
平成17年度	1017	86 (10)	ND ~ 1.2	18.7
平成18年度	1320	78 (14)	ND ~ 1.0	47.5
平成19年度	1063	83 (22)	ND ~ 1.2	66.2

ND: 計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

表3 環境および食品試料中の¹³⁷Cs、¹³¹Iおよび⁴⁰K濃度

試料	採取年月日	単位	¹³⁷ Cs	¹³¹ I	⁴⁰ K
大気浮遊じん					
平成20年 4月	H20.4.2 ~ H20.4.15	mBq/m ³	ND	ND	ND
平成20年 5月	H20.5.7 ~ H20.5.20	"	ND	ND	0.28 ± 0.082
平成20年 6月	H20.6.2 ~ H20.6.17	"	ND	ND	ND
平成20年 7月	H20.7.3 ~ H20.7.15	"	ND	ND	ND
平成20年 8月	H20.8.4 ~ H20.8.19	"	ND	ND	0.30 ± 0.079
平成20年 9月	H20.9.3 ~ H20.9.17	"	ND	ND	0.29 ± 0.081
平成20年10月	H20.10.3 ~ H20.10.16	"	ND	ND	0.25 ± 0.082
平成20年11月	H20.11.4 ~ H20.11.18	"	ND	ND	0.30 ± 0.079
平成20年12月	H20.12.3 ~ H20.12.16	"	ND	ND	ND
平成21年 1月	H21.1.6 ~ H21.1.20	"	ND	ND	0.29 ± 0.080
平成21年 2月	H21.2.4 ~ H21.2.17	"	ND	ND	0.26 ± 0.080
平成21年 3月	H21.3.2 ~ H21.3.17	"	ND	ND	ND
平成20年度		mBq/m ³	ND	ND	ND ~ 0.30
過去3年間の値		mBq/m ³	ND	ND	ND ~ 0.38
降下物					
平成20年 4月	H20.4.30	MBq/km ²	ND	ND	ND
平成20年 5月	H20.5.30	"	ND	ND	1.4 ± 0.31
平成20年 6月	H20.7.1	"	ND	ND	ND
平成20年 7月	H20.8.1	"	ND	ND	ND
平成20年 8月	H20.9.1	"	ND	ND	ND
平成20年 9月	H20.10.1	"	ND	ND	ND
平成20年10月	H20.10.31	"	ND	ND	ND
平成20年11月	H20.12.1	"	ND	ND	ND
平成20年12月	H21.1.5	"	ND	ND	ND
平成21年 1月	H21.2.2	"	ND	ND	ND
平成21年 2月	H21.2.27	"	ND	ND	1.1 ± 0.29
平成21年 3月	H21.3.31	"	ND	ND	1.1 ± 0.30
平成20年度		MBq/km ²	ND	ND	ND ~ 1.4
過去3年間の値		MBq/km ²	ND ~ 0.053	ND	ND ~ 2.9
上水 原水	H20.7.4	mBq/L	ND	0.76 ± 0.09	64 ± 2.9
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND ~ 0.95	86 ~ 90
上水 蛇口水	H20.6.13	mBq/L	ND	ND	76 ± 3.0
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	81 ~ 97
海水	H20.7.9	Bq/L	ND	ND	3.3 ± 0.38
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	3.7 ~ 6.7
海底土	H20.7.9	Bq/kg dry	2.2 ± 0.33	ND	630 ± 13
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND ~ 2.1	ND	610 ~ 630
土壌	H20.7.24	Bq/kg dry	1.3 ± 0.31	ND	740 ± 12
0~5cm層		(MBq/km ²)	(69 ± 17)	(ND)	(39000 ± 610)
過去3年間の値		Bq/kg dry	1.1 ~ 3.3	ND	680 ~ 730
		(MBq/km ²)	(63 ~ 250)	(ND)	(37000 ~ 52000)
土壌	H20.7.24	Bq/kg dry	3.2 ± 0.30	ND	700 ± 11
5~20cm層		(MBq/km ²)	(570 ± 53)	(ND)	(130000 ± 2000)
過去3年間の値		Bq/kg dry	2.9 ~ 3.7	ND	680 ~ 710
		(MBq/km ²)	(540 ~ 600)	(ND)	(100000 ~ 150000)

表3 環境および食品試料中の¹³⁷Cs、¹³¹Iおよび⁴⁰K濃度（続き）

試料	採取年月日	単位	¹³⁷ Cs	¹³¹ I	⁴⁰ K
牛乳 原乳	H20.8.25	Bq/L	ND	ND	49 ± 0.98
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	48 ~ 50
牛乳 市販乳	H20.8.7	Bq/L	ND	ND	50 ± 1.0
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	47 ~ 49
米	H20.11.12	Bq/kg	ND	ND	25 ± 0.79
過去3年間の値		Bq/kg	ND	ND	20 ~ 26
農産物					
タマネギ	H20.7.22	Bq/kg生	ND	ND	43 ± 0.35
ダイコン	H20.11.12	〃	ND	ND	60 ± 0.44
ホウレン草	H20.11.12	〃	ND	ND	180 ± 0.96
キャベツ	H21.1.30	〃	ND	ND	72 ± 0.52
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	42 ~ 210
水産生物 タイ	H20.12.1	Bq/kg生	0.09 ± 0.009	ND	140 ± 0.79
過去3年間の値 (サバ)		Bq/kg生	0.07 ~ 0.08	ND	67 ~ 79
日常食					
大阪市	H20.6.8	Bq/人/日	ND	ND	35 ± 0.38
	H20.12.7	〃	ND	ND	33 ± 0.36
過去3年間の値		Bq/人/日	ND ~ 0.033	ND	31 ~ 80

結果および考察

1. 全ベータ放射能

表2に降水中の全ベータ放射能測定値を示す。

降水中の全ベータ放射能は、86試料中7例から検出されたが、異常値は検出されなかった。なお、年間降水量は 39.4MBq/km²で、過去3年間と同レベルの範囲であった。

2. 核種分析

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

(1)¹³⁷Cs: 今年度も大半の試料中の¹³⁷Cs濃度は検出限界以下の値であり、¹³⁷Csは土壌、水産生物（タイ；前年度まではサバを使用）の各試料から検出されたが、そのレベルは過去の値と同程度であった。

(2)¹³¹I: ¹³¹Iは、原水試料から微量（0.76mBq/L）検出された。なお、他の環境試料および食品試料からは検出されなかった。上水中の¹³¹Iは、平成元年度から検出されているが、既報⁴⁾に述べたように、降下物や原子力施設などからの人工放射性物質の漏洩はなく、

その起源は医学利用によるものであると推定される。原水試料中¹³¹Iレベルは、平成3年度の1例（4.9mBq/L）を除き、本年度を含めいづれも1mBq/L程度の低レベルであった。上水中の¹³¹Iレベルに明確な

表4 環境および食品試料中の天然放射性核種濃度

調査対象	件数	単位	⁴⁰ K	⁷ Be	²⁰⁸ Tl	²¹⁴ Pb	²²⁸ Ac
大気浮遊じん	12	mBq/m ³	ND~0.30	2.0~9.0	ND~0.04	ND~0.05	ND
降下物	12	MBq/km ²	ND~1.4	54~240	ND~0.22	ND~0.19	ND
上水							
原水	1	mBq/L	64	4.4	0.39	0.72	ND
蛇口水	1	〃	76	ND	ND	ND	ND
海水	1	Bq/L	3.3	ND	ND	ND	ND
海底土	1	Bq/kg 乾土	630	ND	21	25	43
土壌	(0~5cm)	Bq/kg 乾土	740	ND	18	22	48
	(5~20cm)	(MBq/km ²)	(39000)	ND	(930)	(1200)	(2500)
		Bq/kg 乾土	700	ND	15	23	45
		(MBq/km ²)	(130000)	ND	(2800)	(4100)	(8100)
牛乳							
原乳	1	Bq/L	49	ND	ND	ND	ND
市販乳	1	〃	50	ND	ND	ND	ND
米	1	Bq/kg 生	25	ND	ND	ND	ND
農産物							
タマネギ	1	Bq/kg 生	43	ND	ND	ND	ND
ダイコン	1	〃	60	ND	ND	ND	ND
ホウレン草	1	〃	180	ND	ND	ND	ND
キャベツ	1	〃	72	ND	ND	ND	ND
魚							
タイ	1	Bq/kg 生	140	ND	ND	ND	ND
日常食	2	Bq/人/日	35, 33	ND	ND	ND	ND

ND: 検出されず(計数値が計数誤差の3倍を下回るもの)

経年変化は認められず、微量の¹³¹Iが常に存在することが確認された。

なお、上水中に存在する¹³¹Iによる府民への健康影響については、既報⁴⁾でも論じたように、そのレベルは「飲食物の摂取制限に関する指標⁵⁾」(飲料水中¹³¹I濃度:300Bq/L以上)の30万分の1程度の低値であり、問題はないと考えられる。

(3)天然放射性核種：環境試料および食品試料から検出されたガンマ線を放出する天然放射性核種は、⁷Be (宇宙線生成核種)、⁴⁰K (崩壊系列を作らない地球起源核種)、²³⁸U (地球起源核種)より崩壊生成するウラン系列核種 (²²⁶Ra, ²¹⁴Pb, ²¹⁴Bi)、²³²Th (地球起源核種)より崩壊生成するトリウム系列核種(²²⁸Ac, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²⁰⁸Tl)であった。環境試料および食品試料中の⁷Beおよび⁴⁰K濃度および²¹⁴Bi (ウラン系列核種の代表)、²²⁸Acおよび²⁰⁸Tl (トリウム系列核種の代表)の濃度を表4に示す。

- 1) ⁴⁰K：環境試料および食品試料中の⁴⁰Kレベルは昨年度の報告値⁶⁾と同レベルであり、特に異常値は認められなかった。
- 2) ⁷Be：宇宙線生成核種である⁷Beが大気浮遊じん、降下物および上水から昨年と同様に検出された。
- 3) その他天然放射性核種：大気浮遊じん、降下物、上水、土壌、海底土よりウラン系列核種やトリウム系

列核種の天然放射性核種が昨年と同様に検出された。

(4)分析確認：(財)日本分析センターの報告書⁷⁾によると、当所の分析結果は標準試料法・試料分割法共、添加値または分析センターの結果とよく一致しており、かつ、En数も「1」以下であり、ガンマ線核種分析の精度は確保されている事が認められた。

3. 空間放射線量率

(1)モニタリングポストによる空間放射線量率値

表5に結果を示す。

空間放射線量率値の1時間平均値に基づく一日の変動は、年間を通じて40~66 nGy/hの範囲で、平常値の範囲であり、過去3年間の結果と変わらなかった。

(2)サーベイメータによる空間放射線量率値

表6に結果を示す。

サーベイメータによる空間放射線量率値は、一般環境および原子炉(京都大学原子炉実験所、泉南郡熊取町)周辺のいずれにおいても異常値は検出されず、過去3年間の結果と変わらなかった。

まとめ

核種分析によって検出された人工放射性核種は¹³¹Iおよび¹³⁷Csであった。医学治療等に由来すると考え

表5 モニタリングポストによる空間放射線量率

測定年月	モニタリングポスト(nGy/h)			
	測定回数	最高値	最低値	平均値
平成20年 4月	30	54	41	42
同 5月	31	52	41	42
同 6月	30	58	41	42
同 7月	31	52	40	42
同 8月	31	59	40	42
同 9月	30	52	41	43
同 10月	31	52	41	43
同 11月	30	52	41	43
同 12月	31	58	41	43
平成21年 1月	31	55	41	43
同 2月	28	61	41	43
同 3月	31	66	41	43
平成20年度	365	66	40	43
過去3年間の値				
平成17年度	365	66	38	42
平成18年度	365	66	39	42
平成19年度	366	65	40	42

表6 サーベイメータによる空間放射線量率

測定年月	サーベイメータ(nGy/h)				
	当所中庭	大阪城公園	熊取町		
			大久保	長池	弘法池
平成20年 4月	110	82.1			
同 5月	113	83.6			
同 6月	114	86.2			
同 7月	118	88.7	74.9	108	90.0
同 8月	119	89.6			
同 9月	111	86.6			
同 10月	114	87.9			
同 11月	107	90.7			
同 12月	115	86.6			
平成21年 1月	110	82.3	87.0	105	100
同 2月	110	85.5			
同 3月	109	82.3			
平成20年度	107~119	82~91	75, 87	105, 108	90, 100
過去3年間の値					
平成17年度	114~122	83~89	72, 77	107, 114	95, 97
平成18年度	114~122	83~91	77, 79	103, 104	93, 93
平成19年度	107~126	86~90	71, 79	107, 115	94, 97

られる¹³¹Iは上水(原水)に極低レベルで検出され、¹³⁷Csは土壌や一部の食品から検出されたが、そのレベルは前年度と同様に低値であった。また、他の人工放射性核種はいずれの試料からも検出されなかった。更に、空間放射線量率にも異常値が検出されていないことから、今年度もフォールアウトおよび原子力施設からの漏洩等による人工放射性物質の環境への新たな放出はなかったことが確認された。

謝 辞

本調査の遂行にあたり、調査試料の採取にご協力いただきました大阪市ゆとりとみどり振興局東部方面公園事務所、熊取町役場、明治乳業株式会社関西工場、大阪府水道部庭窪浄水場の各機関に感謝致します。また、日常食試料の提供にご協力いただきました大阪府民の皆様へ感謝致します。調査実施にあたり、ご指導をいただきました文部科学省科学技術・学術政策局原子力安全課防災環境対策室、日本分析センターならびに大阪府庁健康福祉部環境衛生課の皆様へ謝意を表します。

注：本報告は、電源開発促進対策特別会計法に基づく文部科学省からの受託事業として、大阪府立公衆衛生研究所が実施した平成20年度「環境放射能水準調査」の成果です。

文 献

- 1) 文部科学省科学技術・学術政策局原子力安全課防災環境対策室：環境放射能水準調査委託実施計画書、平成20年7月
- 2) 文部科学省科学技術・学術政策局原子力安全課防災環境対策室：放射能分析確認調査実施要領（隣接県）平成20年
- 3) 文部科学省科学技術・学術政策局原子力安全課防災環境対策室：放射能分析確認調査実施細目（隣接県）平成20年
- 4) 田村幸子，渡辺功，布浦雅子：大阪府における環境および食品中放射能調査，一平成元年4月～平成2年3月一，大阪府立公衛研所報，公衆衛生編，第28号，165-170(1990)

- 5) 原子力施設等の防災対策について（昭和55年6月，原子力安全委員会，平成14年4月改訂），五-三-（2）
- 6) 肥塚利江，味村真弓，渡辺功：大阪府における環境および食品中放射能調査（平成19年度報告），大阪府立公衛研所報，第46号，27-33(2008)
- 7) 財団法人日本分析センター：放射能分析確認調査（隣接県）事業報告書，平成21年3月

長期間鉛曝露者の経過観察

宮島啓子* 吉田俊明* 吉田 仁* 熊谷信二*

鉛製品製造業における長期間にわたる作業環境測定および鉛中毒健診の経過観察をまとめた。A社は、鉛を20~30%含有する鉛青銅合金を1200℃の高温で熔融し、手杓で鋳型に流し込む作業である。鋳造作業場のA測定値および個人曝露濃度はそれぞれ管理濃度および許容濃度を超過しており、また血中鉛濃度および尿中デルタアミノレブリン酸濃度は生物学的許容値を超過していた。B社の鉛工は鉛棒をアセチレンバーナで溶かしながら鉄板に張り付けるホモゲン作業を行っており、個人曝露濃度は許容濃度を超過していた。また、血中鉛濃度および尿中デルタアミノレブリン酸濃度は生物学的許容値を超過していた。

キーワード：鉛製品製造業、鉛作業者、環境鉛濃度、血中鉛、尿中デルタアミノレブリン酸

Key words : lead manufacturing industry, lead workers, airborne lead level, blood lead level,
Urinary δ - aminolevulinic acid

古代から身近に使われてきた主要金属の中で、鉛は比較的柔らかく加工が容易なため、様々な分野で使われてきた。その反面、鉛は毒性を持つことや優れた代替品の出現などで、最近では、使用される用途が減少してきた。しかし、鉛の需要が全く無くなったわけではない。

現在、産業現場では鉛中毒予防規則¹⁾により作業環境管理や健康管理が行われており、典型的な鉛中毒の報告は少なくなってきたが、長期間の鉛曝露による鉛中毒事例は、今なお発生している。我々は、鉛を取り扱っている事業所の作業環境測定と鉛中毒健診を1968年から2007年まで長期間にわたり行ってきた。本報では、これらのデータをまとめて報告する。

対象と方法

1. 鉛青銅合金製造

A社は、船などのシャフトの軸受に用いる鉛青銅合金を製造している。合金には、鉛(約20~30%)、銅

(約65~70%)、錫(約1~8%)、その他の金属(ニッケル、亜鉛)を含む。製造工程は大きく鋳造と成型に分けられる。鋳造は、①砂で鋳型を作成、②転炉で鉛青銅の材料を1200℃で融解(図1)、③融けた合金を杓で鋳型に流し込む(湯入れ)(図2)、④鉛青銅が固まると鋳型を外し、鋳物を取り出す、⑤鋳型を壊し、砂を一箇所に集めるといった流れである。成型では、鋳造品をグラインダーおよび切削機械で形を整える。鋳造作業者は1~7名、成形作業者は1~7名である。鉛中毒健診は1968年から始めているが、血中鉛(PbB)および尿中デルタアミノレブリン酸(ALA-U)については1976年から2005年まで毎年2回測定した。作業環境測定は主に鋳造作業場について1978年から2002年まで断続的に実施した。

2. 鉛板・鉛管・電極板製造

B社は、X線や放射線の防護・遮蔽用および防音用の鉛板や鉛合板、亜鉛メッキに使用する電極板などを製造しており、鉛板、鉛管、機械、管理検査および鉛工の5部門がある。

鉛板作業では、4~5tの鉛を釜に入れ約400℃で熔融し、型に流し込んでブロックにして、冷却後ローラで圧延する。鉛管作業では、熔融した鉛を管状の型に流し込み、連続的に冷却しながら押し出して鉛管とし、それを巻き取る。機械作業では製品の成形、管理検査

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

The Follow-up of the Lead-workers for Long Terms

by Keiko MIYAJIMA, Toshiaki YOSHIDA, Jin YOSHIDA and Shinji KUMAGAI



図1. 鉛合金を1200℃で溶解



図3. ホモゲン作業



図2. 溶解した鉛を杓で鑄型に流し込む（湯入れ）



図4. 電極板の修理

作業では製品の検査を行う。鉛工作業では、鉛インゴットを溶かしてホモゲン用の鉛棒を作り、アセチレンバーナを用いて棒を溶かし鉄枠に張り付けて電極板を作成したり（ホモゲン作業）（図3）、あるいは水素バーナを用いて電極板を修理・解体する（図4）。鉛工は1～7名、その他は1～29名である。

鉛中毒健診は1970年から始めているが、PbBおよびALA-Uについては1978年から2007年まで毎年2回測定した。作業環境測定は1984年から2007年まで断続的に実施した。

3. 測定法

環境気中鉛濃度は、ローボリュームエアースンプラー・原子吸光法で測定した²⁾。1987年からは、作業環境測定法による方法³⁾で行った。PbB量については、

1984年まではフレーム原子吸光法⁴⁾、それ以降はフレームレス原子吸光法⁵⁾で測定した。ALA-U量は単一カラム法⁶⁾で測定した。

結果

1. 鉛青銅合金製造

鑄造作業場の変遷を図5に示す。1971年当時は溶融釜と鑄込作業を同じ作業場で行っていたが、1980年にプッシュ・プル型の換気装置を設置し、さらに1983年には、溶融釜と鑄込作業場との間を壁で仕切るとともに、鑄造作業場の近くにあった休憩場所を独立した別の場所に移した。1986年にはプッシュ・プル型換気装置の性能が低下したということで、要定期点検の指摘があった。1996年にはプッシュ・プル型の換気装置

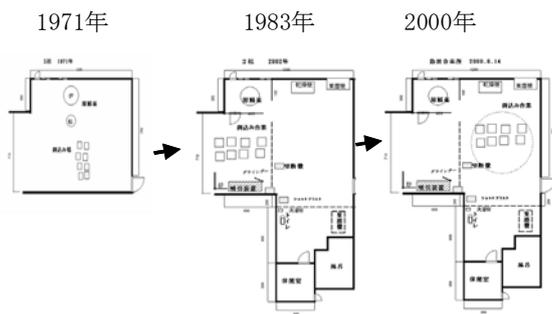


図5. A社の作業場の変化
(1971年→1983年→2000年)

だけでは換気が不十分なため、防塵マスクの着用を徹底した。2000年に、天井に換気扇を設置し、鑄込作業場所を変更したが、2002年には鑄込み作業場所を元の場所に戻した。

作業環境測定結果の推移を図6に示す。毎回の作業内容や作業量が異なること、あるいはサンプリングのタイミングが異なることなどから、同一条件での測定にはなっていない。このため、測定結果は上述の作業場の変遷を直接的には反映していないが、どの時点でもA測定値の幾何平均値 0.95 mg/m^3 ($0.02\sim 2.64\text{ mg/m}^3$)は管理濃度 (0.05 mg/m^3)を大幅に超え、また個人曝露濃度 2.21 mg/m^3 ($0.72\sim 8.25\text{ mg/m}^3$)も許容濃度 (0.1 mg/m^3)を大幅に超えており、作業環境が非常に悪いことがわかる。

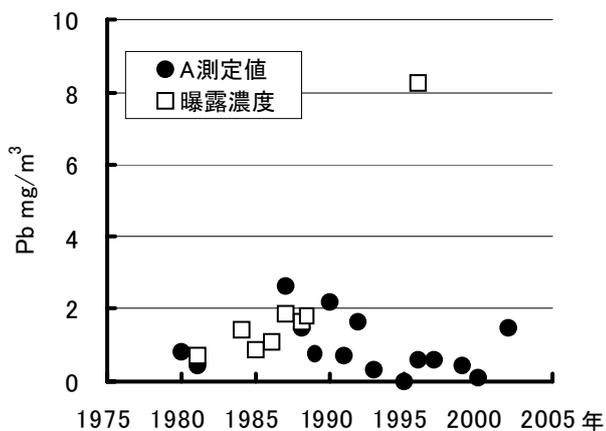


図6. 鑄造作業場のA測定値(定点での測定値の幾何平均値)および個人曝露濃度の推移

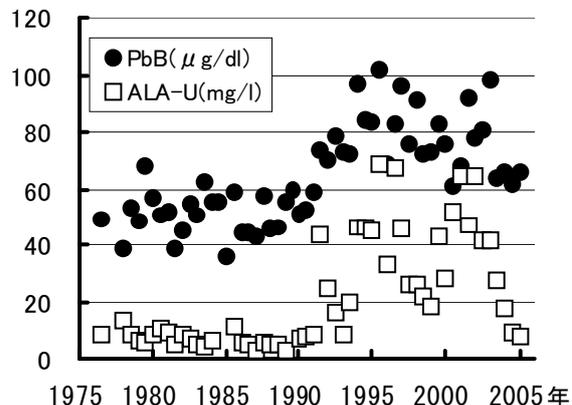


図7. 鑄造作業者の血中鉛(PbB)および尿中デルタアミノレブリン酸(ALA)の推移

PbB および ALA-U の推移を図7に示す。鑄造作業者のPbBは1970年代後半と1980年代には概ね $40\sim 60\text{ }\mu\text{g/dl}$ で推移していたが、1990年代に入ると上昇し $100\text{ }\mu\text{g/dl}$ に達するようになった。その後、上下して2005年ごろには $60\text{ }\mu\text{g/dl}$ 台になった。ALA-Uもほぼ同様の推移を示し、1970年代後半と1980年代には概ね 10 mg/l 以下であったが、PbBが $70\text{ }\mu\text{g/dl}$ を超えるようになった1990年代に入ると急激に上昇し、ピーク時には 70 mg/l 近くに達するようになった。その後、PbBの動きと連動して上下し、2005年ごろには 10 mg/l 程度まで低下した。PbB および ALA-Uの生物学的許容値はそれぞれ $40\text{ }\mu\text{g/dl}$ および 5 mg/l なので、ほとんどのすべての時期の測定値も超えている。

PbB および ALA-Uの時間的推移は、本来、作業環境濃度や個人曝露濃度の変動を反映しているはずであるが、必ずしもそうはなっていない。ひとつの理由は、上記したように作業環境測定が同一条件で行われていないことである。また、防塵マスクの着用の有無によっても鉛の体内取り込み量は大きく異なることも理由である。もう一つは、長期の観察のため、当初の作業者は徐々に退職して、後半は全員が新しい作業者に入れ替わっており、しかも別の会社で鉛の高濃度曝露を受けていた方が入社したことにより、PbB および ALA-Uの平均値が高くなるという事態も生じている。

2. 鉛板・鉛管・電極板製造

鉛工の個人曝露濃度 0.36 mg/m^3 ($0.06\sim 1.31\text{ mg/m}^3$)を図8に示す。毎回の作業内容や作業量が異なること

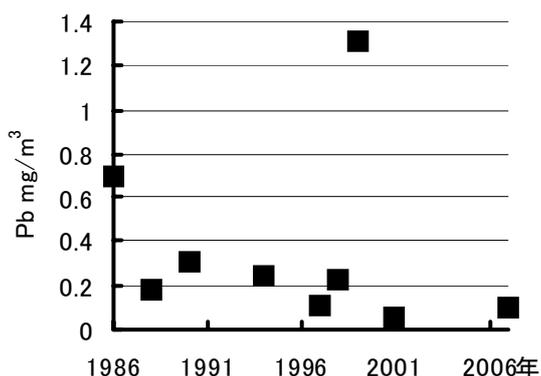


図 8. 鉛工作者の個人曝露濃度

などから、同一条件での測定にはなっていないが、許容濃度 ($0.1\text{mg}/\text{m}^3$) を超えていることが多く、作業環境が悪いことがわかる。

PbB および ALAU の推移を図 9 に示す。鉛工では、PbB は $38\sim 100\ \mu\text{g}/\text{dL}$ 、ALAU は $3\sim 53\text{mg}/\text{L}$ とほとんどの時期に生物学的許容値を超えている。その他の作業では、図には示していないが、PbB は概ね生物学的許容値以下、ALAU は生物学的許容値を超える時期が時々あった。

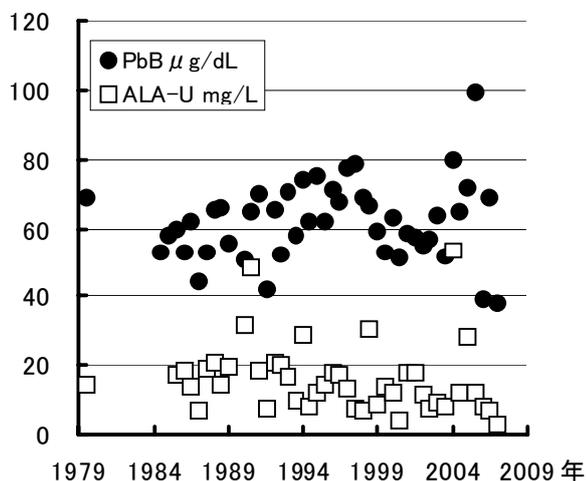


図 9. 鉛工作者の血中 (PbB) および尿中デルタアミノレブリン酸 (ALAU) の推移

考察

A 社では、鉛を約 20~30% 含む鉛青銅合金を製造するため、銅と鉛などを 1200°C の高温で熔融し、杓で流

し込む作業があり、鉛ヒュームが作業場全体に大量に発生する。このため、鑄造作業場の A 測定値および個人曝露濃度はそれぞれ管理濃度および許容濃度を大幅に超えていた。また、鑄造作業者の PbB および ALAU も高く、いずれも生物学的許容値を超えていた。1980 年代に設置されたプッシュ・プル型換気装置は当時としては画期的なものであった。しかし、村田ら⁷⁾の報告にもあるように、プッシュ・プル換気気流内での作業では、気流がさえぎられると曝露濃度が上昇する弱点もあり、この改善では十分な効果が得られなかった。また、プッシュ・プル型換気装置は性能の維持管理に手間がかかることもあり、適切な管理ができず、性能が徐々に低下していった。A 社のような小規模事業所では、作業環境改善のための余裕はあまりなく、これ以上のことはできなかった。設備費をかけずに曝露を低減するには、防塵マスク着用の徹底が有効な対策の一つであると考えられる。

清田^{8,9)}、中野ら¹⁰⁾は、故鉛製造作業者の長期観察において、熔融釜周辺に強力な局所排気装置を設置することにより環境改善効果が認められ、作業者の PbB は高値が続いているものの、減少傾向にあることを報告している。千葉ら¹¹⁾も 12 年間の調査から局所排気装置の改善が検査指標の改良に関係があったと述べている。このように局所排気装置により、改善効果が認められたとの報告もある。

一方、B 社の鉛工が行うホモゲン作業では、鉛棒をアセチレンバーナで熔融しながら鉄枠に張り付けていくため、高濃度の鉛ヒュームが発生する。このため、個人曝露濃度 $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ の許容濃度を大幅に超え、また、PbB および ALAU も生物学的許容値を超えていた。鉛工は、このような工場での作業のほかに、出張して X 線や放射線の防護・遮蔽装置の設置をしたり、タンク内での鉛板の接着作業などの作業もあり、そのような機会にも鉛の高濃度曝露を受けていると考えられる。改善はなかなか困難であるが、最低でも効果的な防塵マスクの着用を徹底することが不可欠であろう。

最近、小川ら¹²⁾は、保護具の不十分さや作業場の換気の悪さなどが原因の鉛中毒事例を、また、後藤¹³⁾は、含有量が 10% 未満の鉛合金作業者の鉛中毒事例を報告しており、古典的な職業病である鉛中毒が現在でも克服できていない重要な課題であることを示している。

文献

- 1) 労働安全衛生法, 鉛中毒予防規則 (労働省令第 37号)
- 2) Slavin W. : 原子吸光分析、下村滋他訳、広川化学シリーズ, **31**, 263 (1970)
- 3) 作業環境測定ガイドブック, 金属類, (社)日本作業環境測定協会
- 4) Selander S. , Cramer K., Determination of lead in blood by atomic absorption spectrophotometry, Brit. J. Ind. Med., **25**, 209-213 (1968)
- 5) 小坂 博, 宮島啓子 : フレームレス原子吸光法による血中鉛測定法の検討, 大阪府立公衛研研究報告労働衛生編, **21**, 17-20 (1983)
- 6) Sun M.W., Edward S. Frances W. : A single column method for the determination of urinary δ -aminolevulinic acid, **15**, 183~ (1969)
- 7) 村田 克, 伊藤昭好, 木村菊二 : プッシュ・プル換気 airflow 内での作業者の動作が個人曝露に及ぼす影響, 産衛誌, **44**, (2002)
- 8) 清田郁子, 堀口俊一, 中野碩夫, 品川興造, 寺本敬子, 福本紘一 : 某故鉛精錬所における労働衛生学的実態の長期観察 (第2報), 産衛誌, **50**, 486-487 (1977)
- 9) 清田郁子, 堀口俊一, 北畑 暁 : 某再生鉛工場作業者検診結果の疫学的検討 (第2報), 産衛誌, **54**, 216-217 (1981)
- 10) 中野碩夫, 堀口俊一, 品川興造, 寺本敬子, 清田郁子, 福本紘一 : 某故鉛精錬所における労働衛生学的実態の長期観察 (第3報), 産衛誌, **50**, 488-489 (1977)
- 11) 千葉百子, 菊池正一 : 鉛曝露検査指標の長期観察—焼き入れ作業者について—, 産衛誌, **50**, 488-489 (1977)
- 12) 小川真規, 圓藤陽子 : 職業性鉛中毒の3事例, 産業医学ジャーナル, **32**, 28-32 (2009)
- 13) 後藤博俊 : グラインダー作業での慢性鉛中毒の疑い, 安全と健康, **10**, 94-95 (2009)

遊離残留塩素の自動分析

田中榮次* 安達史恵* 高木総吉*

オートアナライザーを用いた水中遊離残留塩素の自動分析法の検討を行った。多孔質膜の透過性を利用して検水から発生した塩素ガスを分離し、DPD 吸光光度法で検出し、自動的に比色定量するものである。その結果、検量線は 1mgCl/L まで直線性があり、検出限界値 (S/N=3) は 0.01mgCl/L であった。水道水の分析における変動係数 (n=5) は 0.15mgCl/L で 5.4%、0.61mgCl/L で 1.4% を示し、5 つの水道水における回収率は 98~104% であった。本法では遊離残留塩素は選択的に分析されることから、懸濁物質、着色成分や高濃度の Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 HCO_3^- 、 SiO_3^{2-} を含む試料であっても分析を妨害しなかった。また、本法では少量の検水 (4mL) で 1 時間に 20 試料の分析が可能になった。これらのことから、本自動分析は水中の遊離残留塩素分析に有効な分析法であると考えられる。

キーワード : 遊離残留塩素、自動分析、DPD 法、水道水、濁度

key words : Free Residual Chlorine, Automated Determination, DPD Method, Tap Water, Turbidity

平成 15 年 9 月の水道法の改定¹⁾により、水道水中の残留塩素の試験方法はジエチル-p-フェニレンジアミン法 (DPD法)、電流法、DPDによる吸光光度法、連続自動測定機器によるDPD吸光光度法、ポーラログラフ法の 5 つの方法に規定された。これらの方法の中で現場において多く使用されるのがDPD法、DPDによる吸光光度法である。しかしながら、これらのDPD法は懸濁物質による妨害を受け易いなどの問題点があると考えられた。著者らは、既に懸濁物質による妨害を受けずに正確に分析できる連続流れ方式の自動分析法を報告してきた。これらの自動分析法はガス透過性のガス分離管を用いてアンモニア性窒素^{2,3)}、シアン⁴⁾、クロルシアン^{5,6)}、硫化物⁷⁾を分離した後、上水試験方法^{8,9)}に準拠した検出法を採用したものである。自動化することによって同時に手分析の問題点である煩雑な試験操作や長時間の分析を解決してきた。

遊離残留塩素については塩酸酸性 (pH2 以下) では大部分が塩素ガスとして存在^{10,11)}することから、アンモニア、シアン、クロルシアン、硫化物と同様にガス分離管で分離可能であり、自動分析化できると考えた。

既にガス透過性膜を用いた遊離残留塩素の自動分析法が青木ら¹²⁾によって報告されていたが、採用された検出法は水道法¹⁾に準拠したDPD吸光光度法ではなかった。

著者らは検出法に水道法¹⁾に準拠したDPD吸光光度法を採用し、ガス分離管を装備したオートアナライザーを用いて水中残留塩素の自動分析法を試みた。検討の結果、本自動分析法は懸濁物質や着色成分等の共存物質による妨害をほとんど受けることなく、しかも少量の検水で迅速に精度良く遊離残留塩素を分析することができたので報告する。

実験方法

1. 試薬

1-1 精製水 (塩素消費ゼロ水)

精製水は僅かに塩素を消費することから、精製水 1L に標準塩素水 (50mgCl/L) 約 0.1mL を加え、2~3 日放置して残留塩素を除き、塩素消費ゼロの精製水を調製した。なお、以下の実験では、全てこの精製水を使用した。

1-2 リン酸緩衝液 (pH6)

0.2mol/L リン酸二水素カリウム溶液 100mL に 0.2mol/L 水酸化ナトリウム溶液 12mL を混合し、pH6

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

Automated Determination of Free Residual Chlorine in Water

by Hidetsugu TANAKA, Fumie ADACHI and Sokichi TAKAGI

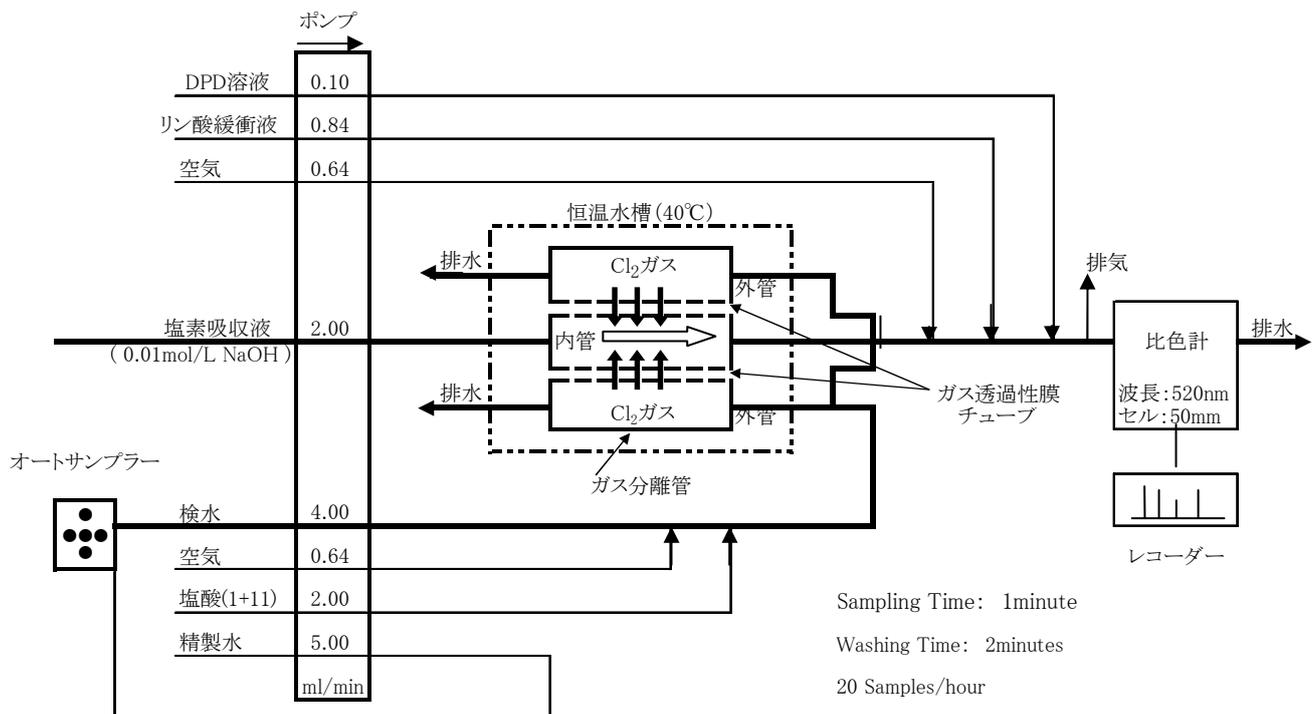


図1 遊離残留塩素分析用フローシステム

に調整した。

1-3 DPD 溶液

N, N-ジエチル-p-フェニレンジアミン硫酸塩 1g を精製水 100mL に溶かし、褐色瓶に貯えた。

1-4 塩素吸収液 (0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液)

1-5 塩酸 (1+11)

1-6 標準塩素水 (50mgCl/L)

有効塩素濃度約 5% の次亜塩素酸ナトリウムを精製水に溶かして 50mgCl/L になるよう調製した。

1-7 標準列塩素水 (0.05~1mgCl/L)

標準塩素水 (50mgCl/L) を精製水に溶かして 0.05~1mgCl/L になるよう調製した。

2. 分析装置

2-1 オートアナライザー

オートアナライザー (テクニコン社製) を用いて遊離残留塩素自動分析用のフローシステムを作製した (図1)。なお、ポンプはワトソン・マーロー社製 (205 S 型) を使用し、配管は全てテフロン管を用いた。

2-2 ガス分離管

多孔質テフロン管 (長さ 80cm、内径 1mm、外径 2mm、気孔率 60%、孔径 1μm) を螺旋状のガラス管 (長さ 80cm、内径 3.8mm) の中に挿入し、管が二重になったガス分離管^{2,3)} を作製した。多孔質テフロン管を境にし

て、外管には検水、内管には 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液を流した。

3. 分析操作及び方法

図1に示したように検水をサンプルカップ 5ml に採り、オートサンプラーにセットした。1分間に検水 4mL をフローシステム内に吸入後、洗浄水 (希釈水) を2分間吸入できるようにオートサンプラーのタイマーを設定した。フローシステム内に吸入された検水は塩酸 (1+11) と混和される。検水中の遊離残留塩素は塩素ガスを発生し、恒温水槽 (40°C) に設置したガス分離管の外管に流入する。塩素ガスは多孔質テフロン管で分離され、内管を流れる 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液に吸収される。塩素ガスを吸収した水酸化ナトリウム溶液にリン酸緩衝液 (pH6)、DPD 溶液の順に添加されて、塩素と DPD が反応してセミキノンを生成し赤色を呈する。この赤色の吸光度を比色計 (波長 520nm、セル長 50mm) で測定した。

結果及び考察

1. 分析法の最適化

1-1 pH

1-1-1 塩素ガス発生時の最適 pH: 検水に添加する塩

酸濃度を変化させて、ガス分離管の外管に流入する検水の pH を 0.5~6 に調整し、塩素ガス発生時の最適 pH を検討した (図 2)。

pH0.5~1.3 では吸光度は最大値を示し、pH1.5~3 では急激に減少し、pH3~6 では吸光度ほぼ認められなかったことから、塩素ガス発生時の最適 pH は 0.5~1.3 であることがわかった。

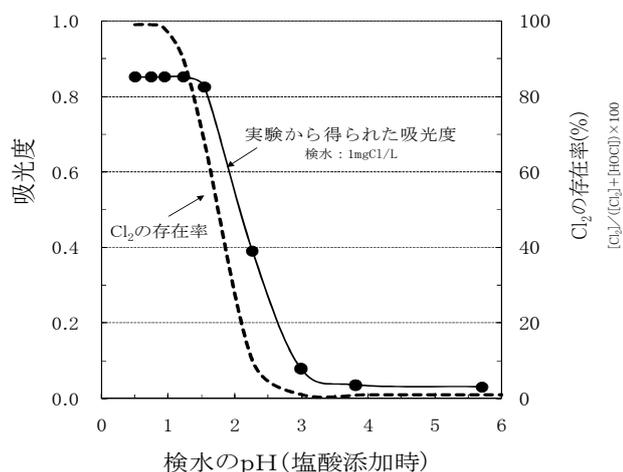
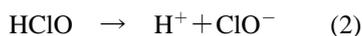


図 2 塩素ガス発生時の最適 pH

塩素ガスは水に溶解すると(1)式及び(2)式のように表され、次亜塩素酸及び次亜塩素酸イオンとなる。塩素ガスと次亜塩素酸の存在割合は pH と塩素イオンに依存し、次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンの存在割合は pH に依存する。



(1)式、(2)式の化学平衡定数を k_1 、 k_2 とするとそれぞれ(3)式、(4)式 の様に表される。

$$k_1 = \frac{[\text{HClO}][\text{H}^+][\text{Cl}^-]}{[\text{Cl}_2]} \quad (3)$$

$$k_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{ClO}^-]}{[\text{HClO}]} \quad (4)$$

水温=25°C、 $k_1=4.5 \times 10^{-4}(\text{mol/L})^2$ の時^{10,13}、添加した各塩酸濃度からガス分離管の外管に流入した検水の $[\text{Cl}^-]$ を算出し、(3)式から塩素ガスの存在率を求め、図 2 に破線で示した。実験から得られた吸光度曲線と上記の理論式より求めた塩素ガスの存在率を比較すると、pH1~5 では吸光度曲線は理論式より求めた塩素ガスの存在率より酸性側にシフトしたが、pH1 以下では吸光度曲線は塩素ガスの存在率とほぼ一致した。

以上のことから、検水中の遊離残留塩素は、塩酸との混和によって pH が 1 以下になると 100%塩素ガスとなることが明らかになった。

実験では塩酸 (1+11) を混和し、外管における検水の pH が約 0.8 となるように設定した。

1-1-2 塩素ガス吸収時の最適 pH: ガス分離管の外管で発生した塩素ガスは、ガス透過性の多孔質テフロン管を境として、内管を流れる塩素吸収液に吸収される。そこで、各種濃度の硫酸及び水酸化ナトリウム溶液を用いて、pH を変化させた塩素吸収液を調製し、塩素ガス吸収時の最適 pH を検討した (図 3)。

pH2~12 では少し右肩上がりの幅広いピークが出現し、pH2~6 と pH7~12 の二つに区切って比較すると pH7~12 の方が高い吸光度値を示し、pH3 以下と pH12 以上では急激に吸光度は減少し、塩素ガス吸収時の最適 pH は 7~12 であることが認められた。

水温=25°C、 $k_2=3.0 \times 10^{-8}(\text{mol/L})$ の時^{10,14,15}、前述の(4)式から次亜塩素酸、次亜塩素酸イオンの存在率を求め図 3 にそれぞれ破線で示した。実験から得られた吸光度曲線と上記の理論式より求めた次亜塩素酸、次亜塩素酸イオンの存在率を比較すると、吸光度曲線は pH12 以上を除くと次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンの存在率曲線を足したものとほぼ重なり合う。外管で発生した塩素ガスは、HClO と ClO⁻として存在することができる pH 域の塩素吸収液では良く吸収され、HClO として存在するより ClO⁻として存在することが出来る pH 域の方が塩素ガスを吸収し易いと考えられる。

一方、pH2 以下と pH12 以上での急激な吸光度の減少は、pH2 以下と pH12 以上の塩素吸収液にリン酸緩衝液 (pH6) を添加しても、発色時の pH がそれぞれ 3 以下及び 8 以上となり、後述の 1-1-3 で示すとおり発色の最適 pH 域から外れた為である。

実験では 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液を塩素吸収液として使用し、内管の pH が 11.5 となるように設定した。

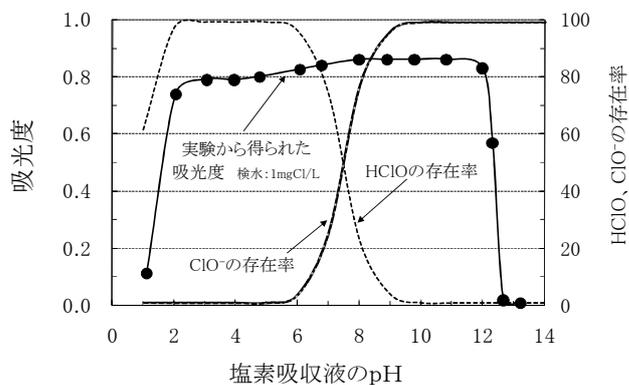


図 3 塩素ガス吸収時の最適 pH

1-1-3 発色時の最適 pH : 塩素吸収液 (0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液) に、各種濃度の塩酸及び水酸化ナトリウム溶液を添加して DPD 溶液添加後の pH を変化させ、発色時の最適 pH を検討した (図 4)。

pH3 以下では急激に吸光度が減少し、pH3~7 ではほぼ一定で最大値を示し、pH8~10 では吸光度が急激に減少し、pH12 以上ではほとんど発色しなかった。

前述の(4)式から次亜塩素酸の存在率を求め図 4 に破線で示した。吸光度曲線と次亜塩素酸の存在率を比較すると、吸光度曲線は次亜塩素酸の存在率より若干酸性側にシフトしたが、pH3~7 では吸光度曲線は次亜塩素酸の存在率とほぼ一致した。以上のことから、発色時の最適 pH は pH3~7 であり、その最適 pH は次亜塩素酸が 100%存在できる pH 域と一致することが認められた。

実験では、塩素ガスを吸収した 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液にリン酸緩衝液 (pH6) を添加し、pH6 に一定にした後、DPD 溶液を添加して発色させた。

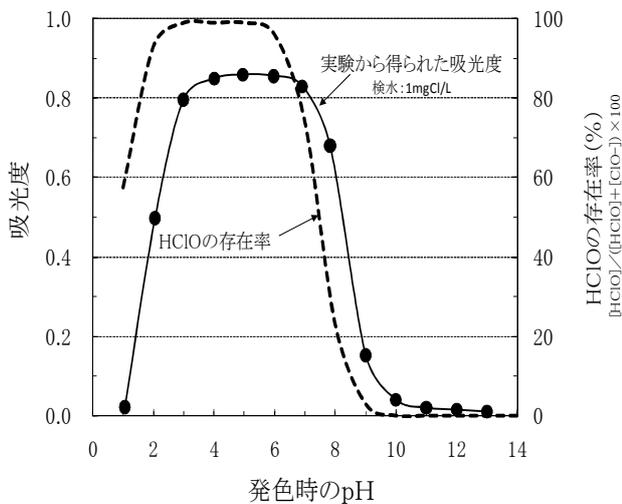


図 4 発色時の最適 pH

1-2 温度

1-2-1 ガス分離管の最適温度: ガス分離管を恒温水槽に設置し温度を 1~80°C に変化させ最適温度について検討した (図 5)。

1~40°C では吸光度は温度と共に漸増し、40~60°C では最大値を示し、60~80°C では緩やかな減少を示したことから、ガス分離管の最適温度は 40~60°C であった。実験では、ガス分離管を設置した恒温水槽の温度を 40°C に設定した。

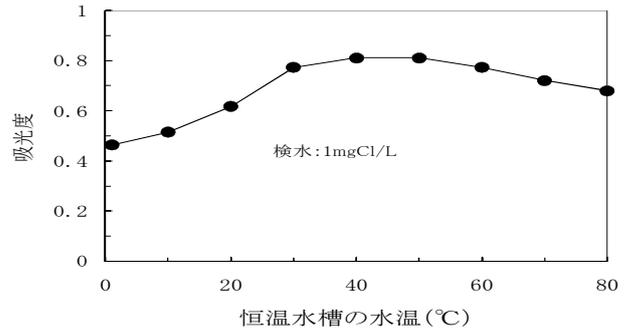


図 5 ガス分離管の最適温度

1-2-2 発色時の最適温度: DPD 溶液を添加した後の混合コイルを恒温水槽に浸し、温度を 1~80°C に変化させ発色時の最適温度について検討した (図 6)。

1~40°C では吸光度はほぼ一定の吸光度値を示し、40~80°C では吸光度は少しずつ減少したことから、発色時の最適温度は 1~40°C であることがわかった。実験では、発色は室温で行った。

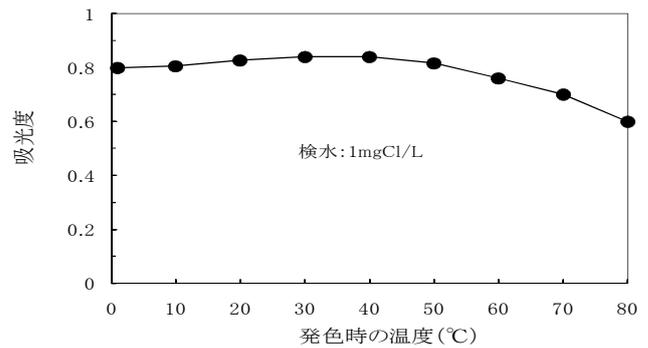


図 6 発色時の最適温度

1-3 発色試薬の最適濃度

発色時における DPD 溶液の最適濃度について検討した。0.02~0.75% では吸光度は濃度と共に増加し、0.75~4% で吸光度は最大値を示し、最適濃度は 0.75~4% であることが認められた。実験では、1% の DPD 溶液を使用した。

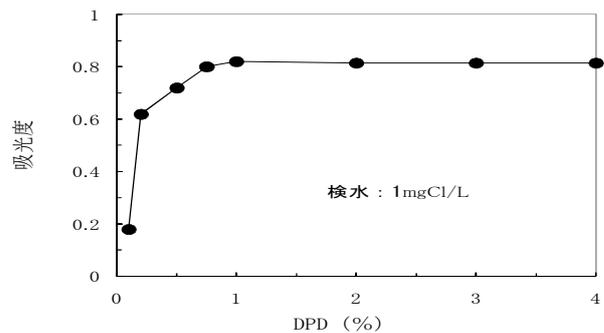


図 7 DPD の最適濃度

1-4 検水の最適吸入時間

検水の吸入時間を 10~120 秒に変化させ、最適吸入時間について検討を行った (図 8)。10~60 秒で吸光

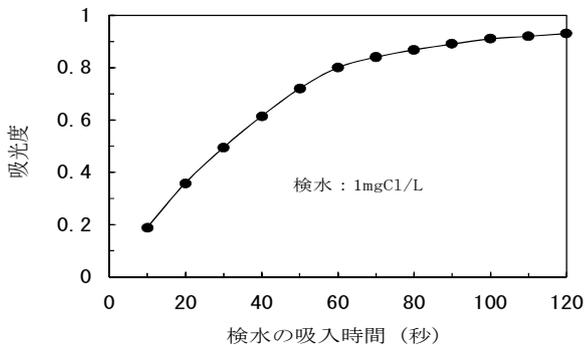


図 8 検水の最適吸入時間

度は徐々に増加したが、60~120 秒で吸光度はほぼ一定となり最大値を示したことから、最適吸入時間は 60~120 秒であることが認められた。実験では、検水の吸入時間を 60 秒、洗浄水 (精製水) の吸入時間は 2 分に設定した。その結果、本法における 1 試料の検水量は 4mL、分析所要時間は 3 分となり、1 時間に 20 試料の分析が可能になった。

2. 検量線とその精度

以上の最適分析条件で、標準列塩素水 (0.05~1mgCl/L) を用いて検量線とその精度について検討した (図 9)。0.05~1mgCl/L で検量線に直線性が認められ、各標準列塩素水の変動係数は 0.5~1.5% と良好な結果が得られた。

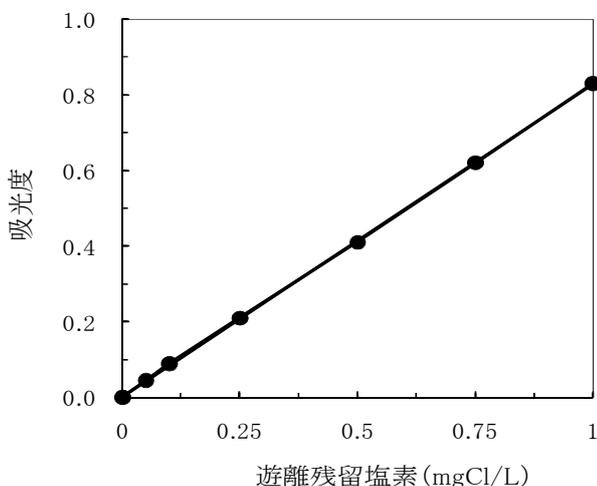


図 9 遊離残留塩素の検量線

3. 共存物質による妨害

各種の共存物質を添加した塩素標準溶液 (1mgCl/L) を調製し、遊離残留塩素の回収率を求め、共存物質による妨害について検討を行った (表 1)。

表 1 共存物質による妨害

共存物質 (n=5)	添加量 (mg/L)	回収率 ^{a)} (%)	共存物質 (n=5)	添加量 (mg/L)	回収率 ^{a)} (%)
カオリン	1000	99	SO ₄ ²⁻	10000	103
Na ⁺	10000	103	NO ₃ ⁻	1000	102
K ⁺	1000	99	CO ₃ ²⁻	1000	97
Ca ²⁺	1000	98	"	2000	93
Mg ²⁺	1000	100	"	5000	83
Fe ³⁺	100	99	HCO ₃ ⁻	1000	98
Mn ⁷⁺	10	101	"	2000	95
Cu ²⁺	10	103	"	5000	85
Zn ²⁺	10	102	PO ₄ ³⁻	1000	101
Cr ⁶⁺	10	98	SiO ₃ ²⁻	1000	96
Pb ²⁺	10	103	BO ₂ ⁻	1000	101
Ni ²⁺	10	101	F ⁻	1000	100
Cd ²⁺	10	98	Br ⁻	0.1	100
As ⁵⁺	10	100	"	1	75
Al ³⁺	10	100	"	10	56
Cl ⁻	1000	100	I ⁻	0.1	98
"	5000	88	"	1	40
"	10000	75	"	10	0

a) : 塩素標準溶液 (1mgCl/L) に各種の共存物質を添加した時の回収率

濁度成分であるカオリンでは、1000mg/L 添加しても回収率は 99% を示し妨害は認められなかった。また、高濃度存在すると着色する重金属 Fe³⁺、Mn⁷⁺、Cu²⁺、Cr⁶⁺、Ni²⁺ は 10mg/L を添加しても回収率は 98~103% を示し妨害は認められなかった。このことから、本法では懸濁した試料や重金属が原因で着色した試料であっても妨害を受けずに分析できることがわかった。

他の陽イオンについても、回収率は 98~103% を示し妨害は認められなかった。

陰イオンでは、CO₃²⁻、HCO₃⁻、Cl⁻ の添加量が高濃度になるに従って回収率が少しずつ減少し妨害を示す傾向があった。さらに、Br⁻、I⁻ は低濃度の添加量でも顕著な妨害が認められた。

CO₃²⁻、HCO₃⁻ の回収率減少は、CO₃²⁻、HCO₃⁻ が炭酸

ガスを発生したことに原因があったと考えられる。検水中の CO_3^{2-} 、 HCO_3^- は塩酸の添加により検水が酸性となると炭酸ガスを発生し¹⁶⁾、ガス分離チューブの内管を流れる塩素吸収液（0.01mol/L水酸化ナトリウム溶液）に溶け込む。しかし、ここで発生した炭酸ガスは、塩素標準溶液（1mgCl/L）から発生する塩素ガスと比較して大量であることから、水酸化ナトリウム溶液による塩素ガスの回収を妨害したと考えられる。

また、Br⁻、I⁻の顕著な妨害については、以下のことが原因であったと考えられる。Br⁻、I⁻は検水中の遊離残留塩素によって酸化されて、Br⁻はBr₂、I⁻はI₂を生成する。Br₂、I₂は塩素ガス（Cl₂）と同様にDPD溶液と反応することができるが、Br₂、I₂は塩素ガス（Cl₂）と比較して、いずれも沸点が高くガス化し難く¹⁷⁾、ガス透過性膜を透過できないことが顕著な妨害の原因であったと考えられる。

高濃度のCl⁻による回収率の減少については、自然界ではCl⁻が存在すると必ず0.数%の比率でBr⁻が存在することから¹⁴⁾、添加した試薬中のCl⁻に付随して少量のBr⁻が含まれていたと考えられ、このBr⁻が検水中の遊離残留塩素によって酸化されてBr₂を生成し、前述したBr₂による妨害を示したことが原因であったと考えられる。

以上のことから、高濃度の懸濁物や呈色の原因となる高濃度の重金属を含む試料であっても妨害を受けることなく遊離残留塩素を分析できることが明らかになった。また、高濃度の CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、Cl⁻では軽微な妨害が、低濃度のBr⁻、I⁻では顕著な妨害が認められたが、通常の試料ではこれらの妨害イオンは低濃度であることから、本法ではほとんど妨害を受けないと考えられる。

4. 結合残留塩素の分析

塩素標準溶液（1mgCl/L）にアンモニア態窒素1mgN/Lを添加し、pH8.3に調整した後、密栓し一時間放置して結合残留塩素であるモノクロラミン（NH₂Cl）、同様にpH5に調整してジクロラミン（NHCl₂）を生成させて¹⁸⁾、本法によるNHCl₂、NH₂Clの分別定量の可能性について検討した。

NHCl₂、NH₂Clを手分析のDPD法¹⁾で分析するといずれも結合残留塩素0.9mgCl/Lと測定された。一方、本法で分析するとNH₂Cl、NHCl₂は共に0.1mgCl/Lの遊

離残留塩素として測定された。

これらのことから、本法では、結合残留塩素であるNH₂Cl、NHCl₂は遊離残留塩素と完全に分別して測定することができず、NH₂Cl、NHCl₂は結合残留塩素量の約1/10の遊離残留塩素としてそれぞれ測定されることが認められた。

5. 添加実験における分析精度と回収率

水道水に標準塩素水（50mgCl/L）を添加し、本法における精度と回収率について検討を行った（表2）。

5つの水道水では、それぞれ平均値0.15～0.61mgCl/Lの遊離残留塩素が検出され、その変動係数は1.4～5.4%であった。また、0.025と0.050mgCl/Lの塩素を添加された各試料は、変動係数0.8～2.7%、回収率96～104%を示し、良好な精度と回収率であった。

表2 添加実験における分析精度と回収率

試料名	添加量 (mgCl/L)	平均値 ^{a)} (mgCl/L)	変動係数 (%)	回収率 (%)
水道水1	0	0.38	2.8	-
	0.25	0.63	1.8	103
	0.50	0.87	1.3	99
水道水2	0	0.24	1.5	-
	0.25	0.49	2.7	100
	0.50	0.73	1.5	99
水道水3	0	0.15	5.4	-
	0.25	0.41	2.4	103
	0.50	0.67	1.3	104
水道水4	0	0.61	1.4	-
	0.10	0.71	0.7	101
	0.25	0.85	0.4	96
水道水5	0	0.46	1.4	-
	0.10	0.56	0.8	98
	0.25	0.7	0.8	97

a): 試料数(n=5)

まとめ

遊離残留塩素の自動分析法を検討し、次の結果が得られた。

(1) オートアナライザーを用いた自動化により、本法では少ない検水量（4mL）で、広範囲（0.01～1mgCl/L）に、さらに精度（変動係数：1.4～5.4%）、回収率（96～104%）共に良好に分析することができた。また、1時間に20試料の分析が可能になった。

(2) 遊離残留塩素はガス分離管のガス透過性膜を透過して選択的に分離・測定された。一方、共存物質のカオリン、Fe³⁺、Mn⁷⁺、Cu²⁺、Cr⁶⁺、Ni²⁺等はガス透過性膜を透過できないため、本法では高濃度の懸濁、着色の原因物質を含む試料であっても、妨害を受ける

ことなく遊離残留塩素を分析することができた。

(3) 結合残留塩素の NH_2Cl 、 NHCl_2 は、遊離残留塩素と同様にガス分離管のガス透過性膜を透過し、塩素吸収液に吸収され、本法ではいずれも結合残留塩素量の約 1/10 の遊離残留塩素として測定された。

(4) 高濃度の CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、 Cl^- では軽微な妨害が、低濃度の Br^- 、 I^- では顕著な妨害が認められたが、これらイオンは通常の実試料では低濃度であり、本法ではほとんど妨害しないものと考えられる。

以上の結果から、本自動分析は水中の遊離残留塩素分析に有効な分析法であると考えられる。

文献

- 1) 水道法施行規則に基づく告示(厚生労働省告示第318号)、平成15年9月29日
- 2) 田中栄次、足立伸一、布浦雅子：チューブ状のガス透過性膜を用いた水中のアンモニア性窒素の自動分析、水道協会雑誌、第59巻、第5号(第668号)、pp.18~24(1990)
- 3) 田中栄次、足立伸一、布浦雅子：迅速化されたアンモニア性窒素の自動分析、大阪府立公衆衛生研究所報、公衆衛生部編、第30号、pp.107~116(1992)
- 4) 田中栄次、大原佐紀子、足立伸一、布浦雅子：ガス分離チューブを用いた水中シアンの自動分析、水道協会雑誌、第61巻、第3号(第690号)、pp.21~31(1992)
- 5) 田中栄次、足立伸一：ガス分離チューブを用いた水中クロルシアン自動分析、水道協会雑誌、第63巻、第6号(第717号)、pp.51~62(1994)
- 6) 田中栄次、足立伸一、鶴川昌弘：水中シアン自動分析とチオシアン酸イオンの分別、水道協会雑誌、第65巻、第12号(第747号)、pp.18~28(1996)
- 7) 田中栄次、沖野亜希子、足立伸一：水中硫化物自動分析、水道協会雑誌、第70巻、第2号(第797号)、pp.16~23(2001)
- 8) 日本水道協会：上水試験方法、(1993)
- 9) 日本水道協会：上水試験方法、(2001)
- 10) 金子光美：水質衛生学、技報堂(1997)
- 11) 日本水道協会：上水試験方法解説、(2001)
- 12) Toyoaki Aoki, Makoto Munemori : Continuous Flow Determination of Free Chlorine in Water, Anal.Chem.55,209~212(1983)
- 13) 日本化学会編：化学便覧 改訂4版、丸善、(1993)
- 14) 丹保憲仁：水道とトリハロメタン、技報堂(1983)
- 15) 河村清史：塩素による消毒、用水と廃水、第32巻、第4号、pp.8~16(1990)
- 16) APHA, AWWA, WEF : Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, (2005)
- 17) MERCK : THE MERCK INDEX 14TH EDITION, (2006)
- 18) 水通技術差研究センター：管路内残留塩素濃度管理マニュアル、(1999)

乳幼児用繊維製品（衣服及び玩具）に使用されている

染料成分中の芳香族第一アミン類の分析調査

中島晴信^{*1} 鹿庭正昭^{*2}

We studied the final test analytical method using the GC/MS method for 9 kinds of aromatic primary amines regulated in the EN71 standard of dye components for toys in Europe. Twelve commercially available textile products (toys and infant-toddler clothing) (20 parts of the products) were analyzed by the method. As a result, the amines could not be detected in all the products. This method had sufficient sensitivity as a qualitative analysis method for confirmation. However, it had problems with reproducibility, *etc.* as a quantitative analysis method, and it was considered that the method needed to be improved for higher accuracy.

キーワード : 乳幼児用繊維製品、染料、芳香族第一アミン、欧州規格 EN71、GC/MS

Key words : textile products for infant and baby, dye, aromatic primary amines, European Norm EN71, Gas chromatography mass spectrometry

乳幼児は、化学物質に対する感受性が高く、化学物質暴露には特に留意しなければならない。現在、日本においては、玩具や乳幼児衣類などに使用されている繊維製品中の染料に関しては規制がない。ヨーロッパでは繊維製品の安全性自主基準としてOEKOTEX Standardが用いられ、染料の溶出量も規定している¹⁾。特に乳幼児用製品の基準は厳しく定められているが、分析方法などは非公開である。ドイツでは、ドイツ規格及びドイツ日用品規制令(LMBG)において、アゾ染料・顔料などが規制され、分析法など定められている。さらに中国でも、繊維製品に使用されるアゾ染料から生成する24種の芳香族アミンについて国家的に規制されている。欧州では、EN71「玩具の安全性規制」の中で繊維製玩具に使用する染料に対して、16種の着色剤と9種の芳香族第一アミンが規制されている^{2,3)}。この規格では初期試験方法から最終試験方法までの分

析法も公開されている^{2,3)}。我々は、初回試験に該当するJISの汗に対する染色堅牢度試験(JIS L 0801:2004)⁴⁻⁶⁾を既の実施した⁷⁾。EN規格では、初回試験で色落ちした製品(3級以下)には、最終試験分析法を実施する事になっている。そこで今回、発ガン性を有するために規制されている9種の芳香族第一アミン類のGC/MSによる最終試験分析法を検討し、市販乳幼児用繊維製品(衣服、玩具)について分析調査を行った。

実験方法

1. 試料

市販の乳幼児用衣服7製品(8部位)、繊維製玩具5製品(12部位)をGC/MS測定用の試料とした(表1)。

2. 試薬

規制されている9種の芳香族第一アミン類標準品及び1-ナフチルアミン標準品のCAS番号、製造社名及びIARC(International Agency for Research on Center)による発ガン分類基準を表2に示す。2-ナフチルアミンは、スペルコ社製の1000 µg/mlメタノール溶液を用いた。その他の標準品は、アセトニトリルに溶解して1000 µg/mlの標準原液を作製した。これを、*tert*-ブチルメチ

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

^{*2}国立医薬品食品衛生研究所

ルエーテルで希釈して標準液系列を作成した。

アセトニトリル、*tert*-ブチルメチルエーテルは和光純薬製残留農薬試験用を用いた。純水はミリポア製超純水製造装置（逆浸透膜後、イオン交換処理）Milli RO 5plus, Milli Q plusを通過したミリQ水（超純水）を用いた。多孔質珪藻土カラムは、MACHEREY-NAGEL社製 CHROMABOND XTR (70 ml, 14.5 g)を用いた。

表1. 分析した市販製品

No.	製品	素材	色	製造元など	生産国
1	カバーオール	綿100%	赤	(株)ファミリア	日本製
2	ズボン	綿100%	茶	(株)ボフソン	中国製
3	セーター	綿70%、ナイロン15%、毛15%	赤	(株)ボフソン	中国製
4	カットソー	綿100%	黒	(株)ボンアミー	中国製
5	カットソー	綿100%	赤	イオン(株)	中国製
6	ズボン	綿100%、ナイロン90%、ポリウレタン10%	黒	(株)アイク	中国製
7	カバーオール	ポリエステル100%、綿95%、ポリウレタン5%	黄赤	タキヒヨー(株)	中国製
9			黄緑		
10	ぬいぐるみ	ポリエステル、アクリル、ポリスチレン	緑黄	輸入元: 日本トイザラス(株)	中国製
11			黄		
12			赤黒		
13	ぬいぐるみ	ポリエステル、アクリル、ポリスチレン	赤黒	輸入元: 日本トイザラス(株)	中国製
14			赤		
15	ぬいぐるみ	表示なし	黄茶	オーガニック(株)	中国製
16			茶		
17	ぬいぐるみ	ポリエステル	青赤	発売元: (株)タカラトミー	中国製
18			赤		
19	着せ替え人形用の服	ポリエステル 他	水色	発売元: (株)タカラトミー	中国製
20			青		

表2. 芳香族第一アミン類のCAS番号、製造会社及びIARC分類

	CAS No.	製造会社	*IARC分類
Aniline	62-53-3	フルカ	グループ3
<i>o</i> -toluidine	95-53-4	フルカ	グループ2A
2-methoxyaniline	90-04-0	アルドリッチ	グループ2B
4-chloroaniline	106-47-8	フルカ	グループ2B
2-naphthylamine	91-59-8	スベルコ	グループ1
Benzidine	92-87-5	片山化学	グループ1
3,3'-dimethylbenzidine	119-93-7	フルカ	グループ2B
3,3'-dichlorobenzidine	91-94-1	スベルコ	グループ2B
3,3'-dimethoxybenzidine	119-90-4	シグマアルドリッチ	グループ2B
1-naphthylamine	134-32-7	関東化学	グループ3

* 1: Carcinogenic to humans 2A: Probably carcinogenic to humans
2B: Possibly carcinogenic to humans 3: Not classifiable as to carcinogenicity to human
4: Probably not carcinogenic to humans

3. GC/MS装置及び分析条件

GC/MS装置は、Hewlett Packard社製5890 Series II Plus型GCに同社製MS検出器（MSD 5972）を装着したものをを用いた。GC用カラムは、GL Science 社製Inert CAP 5 MS/NP (0.25 mm φ × 30 m、膜厚 0.25 μm)を用いた。キャリアーガス流量はHe 0.8 ml/min、注入口温度は250℃、interface temperatureは280℃に設定した。カラム温度は、60℃(3 min) -7℃/min - 280℃(4 min) -10℃/min - 300℃(2.58 min)にプログラミングした。

4. 試験溶液の調製

試料（繊維製品）1 gを細切し、50 mlのポリプロピレン製試験管に量り採った。精製水を15 ml加え、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌した。ガラスフィルターで濾過し、ろ液を多孔質珪藻土カラムに注ぎ入れ、20分間放置し液を吸着させた。カラムに*tert*-ブチルメチルエーテル80 ml (40 ml x 2)を加えて溶出させた。溶出液を100 mlの丸底フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターを用いて50℃で約5 mlにまで濃縮した。エーテル溶液を10 ml試験管に移し、アルゴン気流下で1 mlに濃縮し、試験溶液とした。

結果及び考察

1. GC/MS測定法の検討

GC/MS条件は、EN71に記載された条件に準拠し、GL Science 社製Inert CAP 5 MS/NPを用いて、これら9種の芳香族第一アミン類の相互分離を検討した。その結果、相互分離が可能となった。図1にこれら9種のアミン類10 μg/ml濃度のトータルイオンクロマトグラム（TIC）を示す。また、図2に、これらアミン類10 μg/ml濃度のマスクロマトグラムを示す。各物質の定量イオン（ターゲットイオン）の m/zは図中に記載した。

なお、IARC分類ではグループ1（ヒトに対して発ガン性がある）に分類されているため規制対象となっている2-ナフチルアミンの類似物質として、IARC分類ではグループ3（ヒトに対して発ガン性があるとは分類できない）である1-ナフチルアミンが検出される可能性も考えられる。そこで、両物質をGC/MSで測定し、結果を比較した。これら2物質は少し保持時間が異なり、マスライブラリーからの判別も異なった。

先に保持時間がある5種のアミン類は、1-10 μg/mlの範囲で直線性を示したが、1-20 μg/mlの範囲では直線性を示さなかった。4種のベンチジン類は、1-20 μg/mlの範囲で直線性を示した。各アミン類の定量イオンによる直線性のある範囲の検量線（1-10 μg/ml、1-20 μg/ml）を図3に示す。いずれも $r^2=0.97$ 以上の直線性を示した。また、10 μg/mlの5回繰り返し注入ではCV=2.7-9.5%の再現性であった。各物質のピーク面積による変動係数を表3に示す。これらの物質は注入部位（ライナーなど）の汚れや不活性の低下に影響を受けやすく、注入回数が増えると再現性が悪くなる傾向を示した。また、検

出限界は各物質により異なっていた。どのアミン類も40 ng/mlレベルまでは検出できたが、10 ng/mlレベルでは4種のベンチジン類は検出できなかった。これらのアミン類、特にベンチジン類は、インサート部分やカラム中で熱分解し、感度、精度共に良くなかったものと考えられる。

しかし、欧州 (EN71) における各物質の規制限度値 (action limit)は、5 $\mu\text{g/g}$ (mg/kg)である。今回の操作法に従って最終試験溶液を1 mlの*tert*-ブチルメチルエーテル溶液にした場合、5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度となる。各標準物質のGC/MS感度から考慮すれば、いずれも定性的には十分確認可能な感度である。

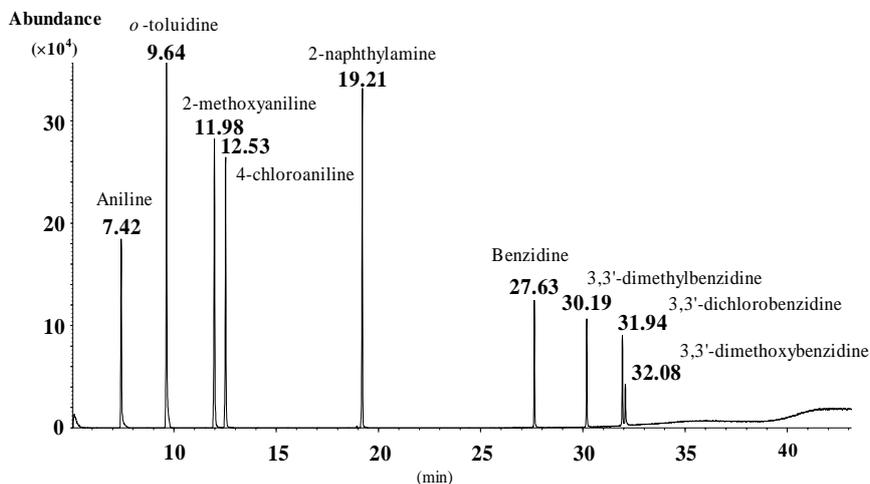


図 1. 9 種のアミン類のトータルイオンクロマトグラム (10 $\mu\text{g/ml}$)

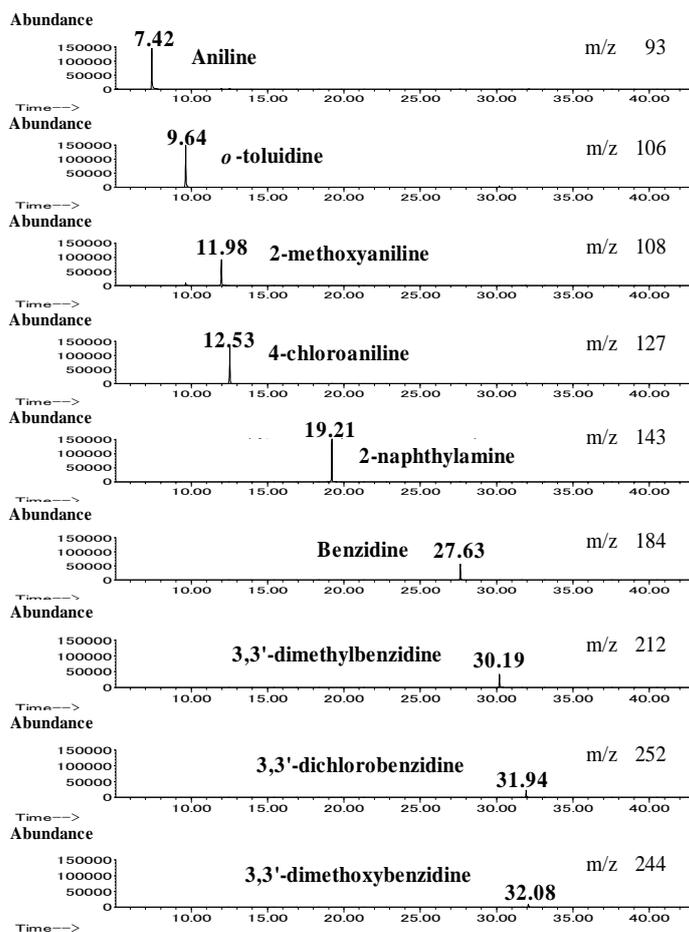


図 2. 9 種のアミン類のマスクロマトグラム (10 $\mu\text{g/ml}$)

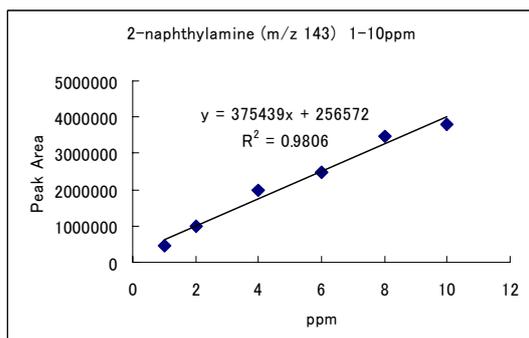
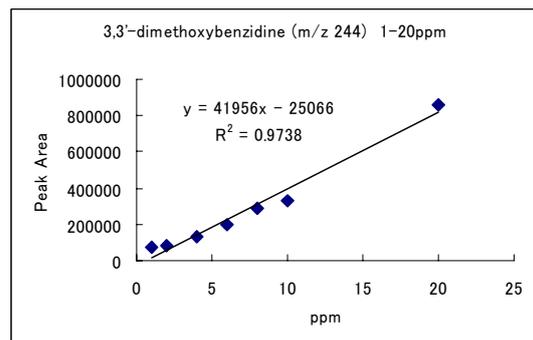
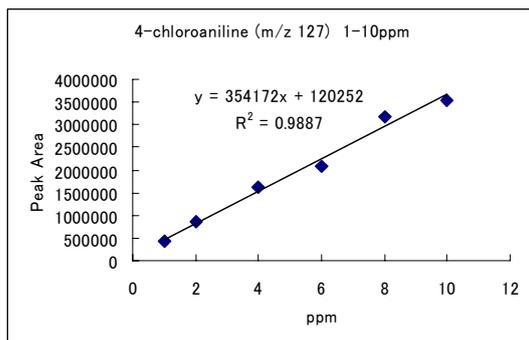
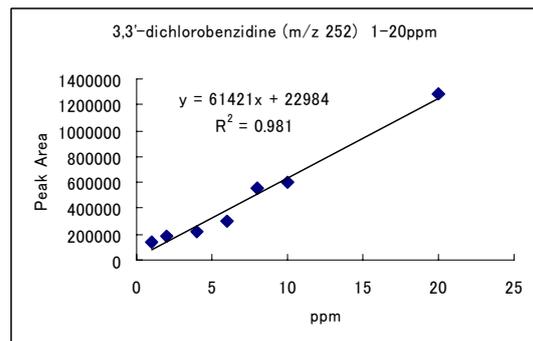
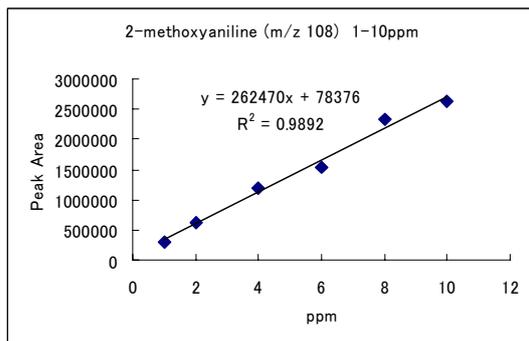
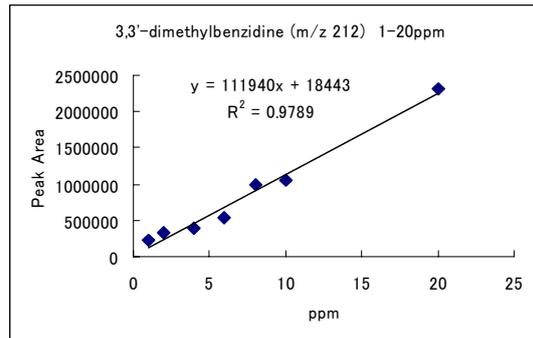
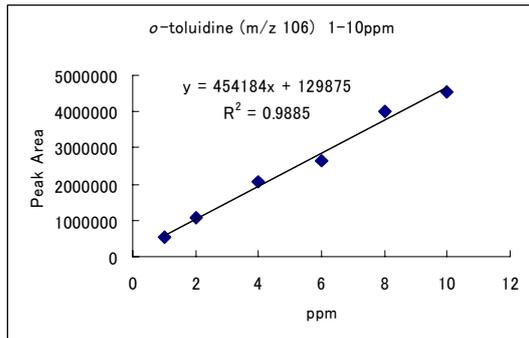
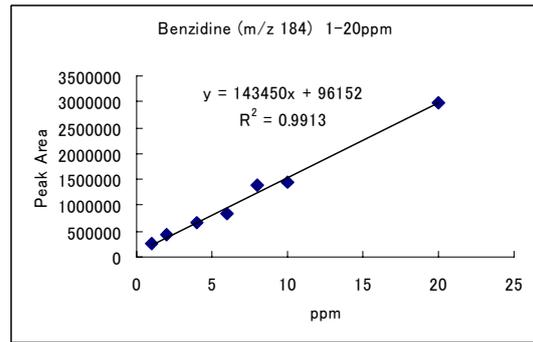
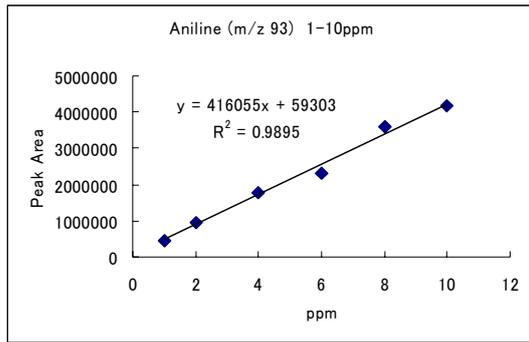


図3. 9種のアミン類の検量線

表3. 各物質のピーク面積による変動係数 (10 µg/ml)

	m/z	SD	CV(%)
Aniline	93	142067.0	4.5
<i>o</i> -toluidine	106	94340.2	2.7
2-methoxyaniline	108	121132.9	5.6
4-chloroaniline	127	158182.5	5.5
2-naphthylamine	143	300156.9	7.9
Benzidine	184	232614.4	8.9
3,3'-dimethylbenzidine	212	157474.7	7.7
3,3'-dichlorobenzidine	252	96202.7	8.6
3,3'-dimethoxybenzidine	244	71226.9	9.5

2. 試験溶液調製法の検討

試験溶液の調製方法はほぼEN71に準拠した。しかし、EN71では、水抽出液を「2000 gで15分間遠心分離する」と記載されているが、この方法では遠心後に布試料が再度含水するため、抽出水が十分に回収できなかった。そこで、ガラスフィルターでろ過して、抽出水を回収することとした。

調製した試料溶液をGC/MS測定したところ、どの試料からも多くの共雑物質が出現した。特にジ-*tert*-ブチルフェノールが高濃度で検出された。これは、ガラスフィルターで濾過した試料水溶液を多孔質珪藻土カラムに吸着させ、*tert*-ブチルメチルエーテルで溶出させる操作で汚染されることが分かった。つまりカラムから様々な物質が溶出することに起因する。しかし、その処理をした溶液中の物質には、各定量イオンへの妨害はなかった。各アミン類を10 µg添加し、多孔質珪藻土カラム処理をした場合の回収率を観察した (n=3)。各アミン類の回収率は、平均35.3~80.6%と物質によりばらつきがあった。各アミン類の回収率を表4に示す。ベンチジンが38.0%、3,3'-ジメトキシベンチジンは35.3%と良くなかった。カラムによっても溶出挙動の違いが見受けられた。

表4. 多孔質珪藻土カラム処理をした各アミン類の回収率 (10 µg添加)

	m/z	回収率
Aniline	93	80.57%
<i>o</i> -toluidine	106	73.27%
2-methoxyaniline	108	78.17%
4-chloroaniline	127	65.89%
2-naphthylamine	143	59.12%
Benzidine	184	37.92%
3,3'-dimethylbenzidine	212	51.94%
3,3'-dichlorobenzidine	252	60.58%
3,3'-dimethoxybenzidine	244	35.34%

3. 市販製品の分析

我々は既に市販の乳幼児用繊維製品41製品(62部位)と玩具8製品(15部位)に対し初期試験(染色堅牢度試験)に、人工唾液による溶出試験⁸⁾も加えて実施し、基準違反(3級以上)製品はなかったものの、乳幼児用衣服7製品(8部位)から色落ちしたことを報告した⁷⁾。そこで、それらの7製品(8部位)と、新たに購入した玩具5製品(12部位)に対して、今回の最終試験を行った。

その結果、分析した製品からは、どのアミン類も検出しなかった。初期試験で3-4級の色落ちがあった試料No.1のTICを図4に、各定量イオンのマスクロマトグラムを図5に示す。試料から検出された物質として、No.19とNo.20(着せ替え人形用の服)からUV吸収剤であるベンゾフェノンが検出された。

試料No.18に各アミン類10 µg/gを添加し、操作法に従って添加回収実験を行ったところ、回収率は28.7~68.9%(n=3)であった。やはり、各物質により回収率が異なった。ベンチジンの回収率は28.7%、3,3'-ジメトキシベンチジンは45.5%と良くなかった。

今回は、試料からアミン類が検出されなかったが、この方法では全てのアミン類が再現性よく正確に定量できない。規限度値付近でこれら物質が検出され、正確な定量を行う場合には、より精度の高い方法を検討する必要がある。例えば、内部標準物質を使った方法⁹⁾などを検討していく必要があると考えられる。

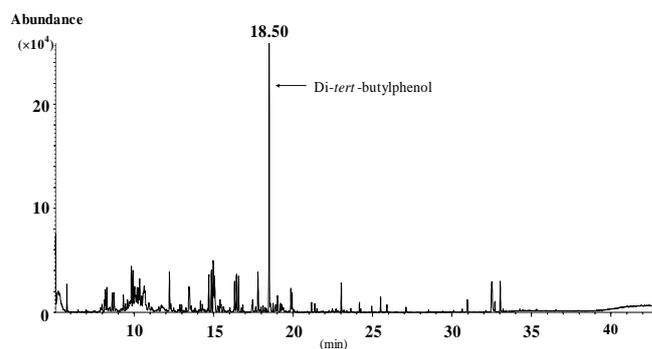


図4. 試料No.1のトータルイオンクロマトグラム

文 献

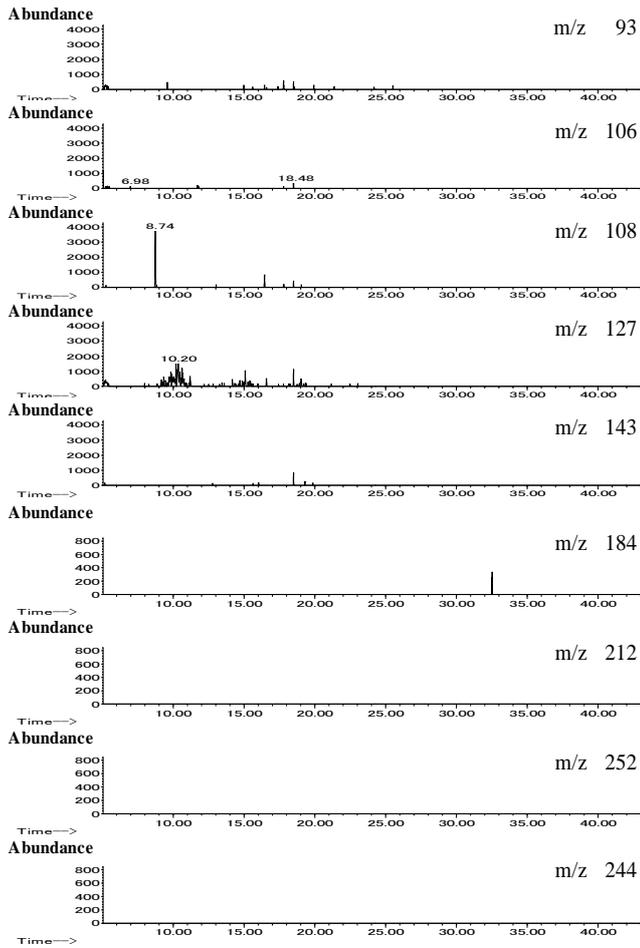


図 5. 試料 No.1 のマスククロマトグラム

結 論

欧州における玩具中染料の規制規格EN71の中で規制されている芳香族第一アミン類9種のGC/MS法による最終試験分析法を検討した。そして、その方法で、市販の繊維製品（乳幼児用衣服、玩具）12製品（20部位）の分析を行った。その結果、全ての製品からこれらアミン類は検出しなかった。この方法は、定性分析には十分であるが、定量分析法としては、さらに改良する必要があると考えられる。

謝 辞

2-ナフチルアミン標準品の分与及び中国での規制情報（分析法など）をご提供頂きました国立医薬品食品衛生研究所療品部伊佐間和郎室長と河上強志博士に深謝いたします。

- 1) エコテックスについて、(財)日本染色検査協会エコテックス事業所発行・編集、東京(2004)
- 2) 河村葉子, 高野忠夫, 津田 博:「乳幼児用玩具の規格基準に関する研究」,平成 17 年度厚生労働科学研究分担研究報告書(食品の安心・安全確保推進研究事業)
- 3) 小瀬達夫, 岡田弘毅:平成 17 年度厚生労働科学研究「乳幼児用玩具の規格基準に関する研究」付属文書(欧州規格 EN 71-10 及び EN-11 最終原案), p.160-208
- 4) (財)日本規格協会:染色堅ろう度試験方法通則 JIS L 0801:2004, 東京(2004)
- 5) (財)日本規格協会:汗に対する染色堅ろう度試験法 JIS L 0848:2004, 東京(2004)
- 6) (財)日本規格協会:計器による変退色及び汚染の判定方法 JIS L 0809:2001, 東京(2001)
- 7) 中島晴信, 高塚 正, 鹿庭正昭:人工汗・唾液による乳幼児繊維製品(玩具及び衣類)からの染料成分の溶出挙動、大阪府立公衆衛生研究所報告, 46, 97-102(2008)
- 8) (財)日本規格協会:歯科用金属材料の腐食試験方法 JIS T 6002:2005, 東京(2005)
- 9) 中華人民共和国国家品質監督検査検疫総局 中国国家標準化管理委員会:繊維製品 使用禁止アゾ染料の測定, 中国標準出版社出版・発行, 北京(2006)

大阪府水道水質検査外部精度管理結果

—陰イオン界面活性剤(平成18年度)—

宮野啓一* 小泉義彦* 高木総吉*
安達史恵* 渡邊 功*

大阪府水道水質検査外部精度管理事業は、本府環境水質課が公衆衛生研究所の協力を得て、府内の試験研究機関および水道事業所を対象に実施している。平成18年度の対象項目として「陰イオン界面活性剤」を選んだ。分析法は固相抽出-高速液体クロマトグラフ法を用いた。評価は、各機関の検査結果の分布からZスコアを求め、その絶対値が3未満であるか、またその機関の検査における変動係数が±10%以内にあるかで判定した。同様に、陰イオン界面活性剤の5構成成分についても評価を行った。外れた機関を対象に原因等について検討した結果、下記のような留意点が得られた。

1) 検量線を作成する時は、各構成成分の総面積値を用いる。

2) 陰イオン界面活性剤の各構成成分のピーク面積値を求める際、コンピュータによる計算結果をそのまま検査結果とするのではなく、標準品と試料の波形処理が同一であることを、クロマトグラムを見て判断し、異なっておれば同一にして検査結果を求める。

キーワード：水道、陰イオン界面活性剤、固相抽出、高速液体クロマトグラフ法

key words： Water, Anionic Surfactants, Solid-Phase Extraction, High-Performance Liquid Chromatography

大阪府水道水質検査外部精度管理事業は水道水質検査精度の向上を図ることを目的として、大阪府健康福祉部(現:健康医療部)環境衛生課が公衆衛生研究所の協力を得て、平成5年度より大阪府内の試験研究機関および水道事業所の参加と協力を得て実施している。平成18年度の対象項目は「陰イオン界面活性剤」とした。陰イオン界面活性剤を選んだのは、平成19年度より分析法が限定されるためである。すなわち、平成18年度までは「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」¹⁾で①固相抽出-高速液体クロマトグラフ法②流路型吸光光度法の2種類の 방법이

認められていたが、平成19年4月1日からは①法しか認められなくなるためである。

実施方法

1. 対象項目

陰イオン界面活性剤(デシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム)を対象項目とした。

2. 参加機関

参加は表1に示した22機関であった。

3. 実施方法

3-1. 試料の調製

試料調製は、平成19年1月15日(月)に公衆衛生研

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

The Examination for the Acquisition of Precise Water Analyses in Osaka Prefecture —Anionic Surfactants (2006)—

by Keiichi MIYANO, Yoshihiko KOIZUMI, Sokichi TAKAGI, Fumie ADACHI and Isao WATANABE

表 1. 陰イオン界面活性剤の検査に参加した機関名

機 関 名	担 当 部 局
大阪市水道局	水質試験所
豊中市水道局	浄水課
吹田市水道部	浄水課水質管理センター
茨木市水道部	浄水課水質係
枚方市水道局	浄水管理室水質グループ
守口市水道局	浄水課水質担当
門真市水道局	工務課
河内長野市水道局	浄水課水質担当
岸和田市上下水道局	浄水課水質担当
大阪府水道部	村野浄水場水質課
大阪府水道部	庭窪浄水場水質グループ
大阪府水道部	水質管理センター
大阪府水道部	水質管理センター(共同検査)
堺市衛生研究所	理化学グループ
高槻市保健所	環境部環境政策室環境保全課環境科学センター
東大阪市環境衛生検査センター	水質検査担当
大阪府茨木保健所	生活衛生室検査課
大阪府四條畷保健所	生活衛生室検査課
大阪府藤井寺保健所	生活衛生室検査課
大阪府泉佐野保健所	生活衛生室検査課
社団法人大阪府薬剤師会	試験検査センター
大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部環境水質課

究所(大阪市東成区中道1丁目3番69号)に給水されている水道水を用いて行った。予めステンレス製タンクに水道水(pH 7.5、全有機炭素 0.8mg/L、残留遊離塩素 0.2mg/L)を約 100L 採水し、アスコルビン酸ナトリウムで定量的に残留塩素の消去を行った。水道法では、試料に対し脱塩素処理をしないことになっているが、残留塩素存在下にポリマー系固相を用い前処理すると陰イオン界面活性剤のクロマトグラム上に定量を妨害する物質が検出されるため脱塩素処理を行った。

試料調製用添加標準溶液は、200mL 有栓メスシリンダーに水質試験用デシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準液(和光純薬製、1mg/mL メタノール溶液) 2.0mL、ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準液(和光純薬製、1mg/mL メタノール溶液) 3.2mL、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準液(和光純薬製、1mg/mL メタノール溶液) 2.6 mL、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準液(和光純薬製、1mg/mL メタノール溶液) 2.2 mL、およびテトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準液(和光純薬製、1mg/mL メタノール溶液) 2.0 mL を採取し、メタノール(和光純薬製、LC-MS 用)で 200 mL に定容し調製した。この濃度は、陰イオン界面活性剤として 60mg/L に相当する。

精度管理用標準試料は、平成 19 年 1 月 16 日(火)に、ステンレス製タンクから試料調製用水道水をメスシリンダーで 500mL 分取し、500mL ガラス製ネジ口瓶(内容量は約 525mL)に分注し、そこに上記の試料調製用添

加標準溶液を 0.5mL 加え調製した。なお、試料調製用水道水に含まれる陰イオン界面活性剤の各構成成分濃度は定量下限値未満(0.002mg/L 未満)であった。そのため、試料中の陰イオン界面活性剤濃度は、標準溶液の添加量から 0.06mg/L(=60 μg/L)であると推定された。

3-2. 配布方法

試料は 500mL 瓶 6~7 本を平成 19 年 1 月 17 日(水)に、当所環境水質課(現:生活環境課)微量有機分析室において各検査機関に配布した。

3-3. 検査方法

検査方法は固相抽出-高速液体クロマトグラフ法を採用し実施した。その検査法の前処理は当日に行うこととしたが、できない場合は冷蔵庫で保存しできるだけ速やかに行うように指示した。

3-4. 検査結果の回収

検査結果として、検査結果報告書(陰イオン界面活性剤の濃度結果、各構成成分濃度結果、定量下限値、検査操作法、検査操作の作業記録、高速液体クロマトグラム、検量線のチャート等)を平成 19 年 2 月 28 日(水)までに回収した。

3-5. 検査結果の検証方法

3-5-1. Zスコアによる評価²⁻⁴⁾

全体の検査結果から、各機関の Zスコアを求めた。評価は、Zスコアの絶対値が 2 未満は満足な結果、2 以上 3 未満の結果は疑わしい結果、3 以上は不満足な結果である。

3-5-2. 変動係数による評価

各検査機関の結果について変動係数を求めた。変動係数は 10% 以下を検査精度として良好とした。

今回は、Zスコアが 2 以上もしくは変動係数が 10% 超過した機関についてはその原因を検証することとした。

検査結果と考察

1. 検査結果のまとめ

陰イオン界面活性剤とその構成成分の検査結果について、設定値、平均値、最大値、最小値を表 2 に示す。

陰イオン界面活性剤の結果はデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム~テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム成分を合計した結果の 5 回平均値を表示しているため、各成分の 5 回平均値の合計値とは必ずし

表 2. 陰イオン界面活性剤と各構成成分の検査結果

検査機関名	陰イオン界面活性剤 ($\mu\text{g}/?$)	デシルベンゼンスルホン酸 ナトリウム ($\mu\text{g}/?$)	ウンデシルベンゼンスルホン酸 ナトリウム ($\mu\text{g}/?$)	ドデシルベンゼンスルホン酸 ナトリウム ($\mu\text{g}/?$)	トリデシルベンゼンスルホン酸 ナトリウム ($\mu\text{g}/?$)	テトラデシルベンゼンスルホン酸 ナトリウム ($\mu\text{g}/?$)
B-01	48.2	9.05	14.1	10.6	8.02	6.41
B-02	48.9	9.25	14.6	11.0	8.19	5.85
B-03	50.9	10.1	15.2	10.6	8.35	6.71
B-04	52.8	9.87	15.5	11.5	8.68	7.24
B-05	53.4	10.5	15.7	12.1	8.51	6.62
B-06	53.7	9.94	15.8	11.8	9.08	7.10
B-07	56.2	9.96	15.7	12.6	9.94	7.90
B-08	56.3	10.1	16.0	12.2	9.99	7.99
B-09	56.5	10.8	16.5	11.7	9.60	7.93
B-10	56.9	7.70	17.1	12.9	11.0	8.22
B-11	57.2	10.7	15.8	11.6	10.4	8.84
B-12	57.8	10.6	16.7	13.8	9.33	7.48
B-13	58.3	10.3	16.4	12.7	10.3	8.55
B-14	58.4	11.1	17.5	12.5	9.64	7.60
B-15	59.0	11.7	17.6	12.6	10.2	6.91
B-16	59.9	10.9	17.7	13.6	10.3	7.41
B-17	61.5	11.3	17.7	13.0	10.7	8.53
B-18	62.4	11.6	17.8	13.2	11.0	8.79
B-19	62.6	11.3	17.3	13.2	11.3	9.44
B-20	64.3	11.8	18.5	14.3	11.0	8.70
B-21	64.4	13.2	20.3	12.2	10.3	8.51
B-22	68.7	11.6	17.8	15.4	12.8	11.1
設定値	60.0	10.0	16.0	13.0	11.0	10.0
平均値	57.7	10.6	16.7	12.5	9.94	7.90
最大値	68.7	13.2	20.3	15.4	12.8	11.1
最小値	48.2	7.70	14.1	10.6	8.02	5.85
標準偏差	5.03	1.12	1.38	1.14	1.15	1.13
変動係数(%)	8.72	10.52	8.25	9.13	11.53	14.35

検査機関名の B-01～B-22は、陰イオン界面活性剤の結果を昇順に便宜上付けた。

も一致しない。

陰イオン界面活性剤結果の平均値／設定値の比率は 96.2%となり、添加推定値とよく一致していた。しかし、各成分の平均値/設定値の比率はデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムで各々106、104、96.2、90.4、79.0%となり炭素数の増加と共に減少した。それに対し、変動係数はデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを除けば炭素数の増加と共に増加傾向であった。

2. 陰イオン界面活性剤(5構成成分の合計)の検証

検査結果と変動係数、およびZスコアを表3に示す。Zスコアは-1.84～2.22で、21検査機関が満足、1機関が疑わしい評価となった。ただし、全機関のZスコアが3未満であり、良好な結果と言える。この結果の度数分布を図1に示す。

機関の変動係数は0.532～10.8%で、10%を超過した機関は22機関中1機関(B-02)であった。

B-02 機関の変動係数が超過した点の検討を行った。

表 3. 陰イオン界面活性剤の検査結果

検査機関名	検査結果 ($\mu\text{g}/\ell$)	変動係数(CV%)	Zスコア
B-01	48.2	1.98	-1.84
B-02	48.9	10.8	-1.71
B-03	50.9	6.38	-1.31
B-04	52.8	1.90	-0.93
B-05	53.4	1.31	-0.81
B-06	53.7	2.51	-0.75
B-07	56.2	1.58	-0.26
B-08	56.3	4.08	-0.24
B-09	56.5	6.06	-0.20
B-10	56.9	9.58	-0.12
B-11	57.2	1.32	-0.06
B-12	57.8	5.26	0.06
B-13	58.3	2.28	0.16
B-14	58.4	1.81	0.18
B-15	59.0	4.59	0.30
B-16	59.9	5.46	0.48
B-17	61.5	3.34	0.79
B-18	62.4	3.34	0.97
B-19	62.6	0.532	1.01
B-20	64.3	2.04	1.35
B-21	64.4	0.336 ^{*1}	1.37
B-22	68.7	3.60	2.22
検査結果数	22		
平均値	57.7		
最大値	68.7		
最小値	48.2		
標準偏差	5.03		
変動係数(%)	8.72		

*1:1試料を5回注入した結果

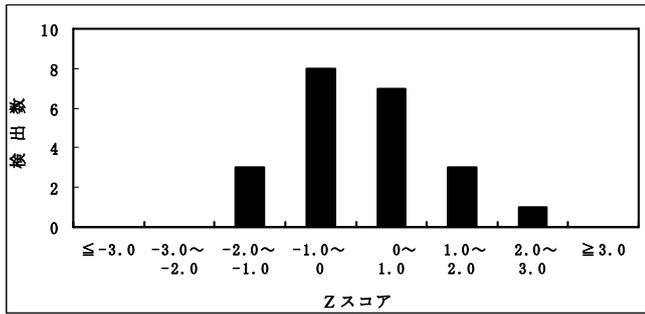


図1. 陰イオン界面活性剤の検査結果の度数分布

その結果、5 検体中 3 検体はほぼ揃った結果であるのに対し、残りの 2 検体の結果はそれらに比べ約 9% 低いために変動係数が高くなった。しかし、その原因は解らなかつた。

3. 陰イオン界面活性剤構成成分の検証

今回対象物質とした陰イオン界面活性剤の構成成分であるデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムおよびテトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの各検査結果についても同様に Z スコアと変動係数で検証を行った。また、Z スコアの絶対値が 2 超過、もしくは変動係数が 10% 超過した機関について、その問題点の検討を行った。

3-1. デシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検証

検査結果と変動係数、および Z スコアを表 4 に示す。また、その度数分布を図 2 に示す。

Z スコアの範囲は -3.11 ~ 2.59 となり、20 検査機関が満足、1 機関(B-21)が疑わしい、1 機関(B-10)が不満足な結果であった。変動係数が 10% 超過した機関は無かつた。

Z スコアが疑わしい結果の B-21 と、不満足な結果の B-10 についての問題点を検討した。

① B-21 について

試料の前処理は 5 本行うと規定していたのに、この機関は 1 本だけ行ない同一試料を 5 回注入しているため、偶然濃度が高くなったものと推察された。もしくは、オクタデシルシリカ基結合シリカゲル(ODS)カラムによるクロマトグラム(図 3)では異性体ピークが数本検出されているのに、一つの異性体ピーク値のみで検量線を作成しているため、疑わしい結果になった可

表 4. デシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検査結果

検査機関名	検査結果 ($\mu\text{g}/\ell$)	変動係数(CV%)	Zスコア
B-10	7.70	9.09	-3.11
B-01	9.05	2.10	-1.71
B-02	9.45	9.72	-1.30
B-04	9.87	2.10	-0.86
B-06	9.94	2.58	-0.79
B-07	10.0	1.49	-0.77
B-03	10.1	5.61	-0.62
B-08	10.1	3.51	-0.62
B-13	10.3	1.86	-0.42
B-05	10.5	0.673	-0.21
B-12	10.6	2.47	-0.10
B-11	10.7	0.839	0.00
B-09	10.8	8.25	0.10
B-16	10.9	5.66	0.21
B-14	11.1	2.34	0.42
B-17	11.3	3.58	0.62
B-19	11.3	0.885	0.62
B-22	11.6	5.10	0.93
B-18	11.6	3.07	0.93
B-15	11.7	4.31	1.04
B-20	11.8	1.66	1.14
B-21	13.2	0.523 ^{*1}	2.59
検査結果数	22		
平均値	10.6		
最大値	13.2		
最小値	7.70		
標準偏差	1.11		
変動係数(%)	10.4		

*1:1試料を5回注入した結果

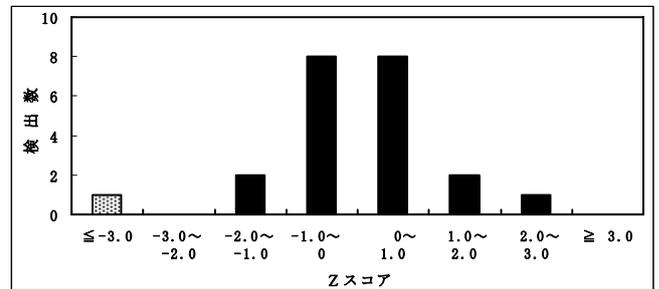


図 2. デシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検査結果の度数分布

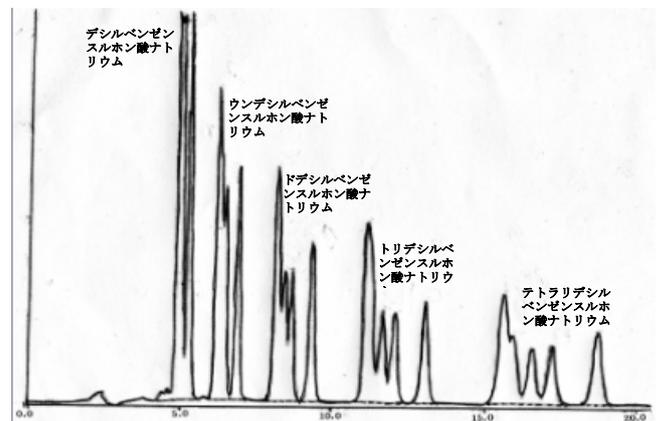


図 3. 陰イオン界面活性剤の ODS クロマトグラム

能性があった(この機関は5成分共に各異性体の1本のピーク値のみで検量線を描いている)。この場合、標準品が製造業者やロットにより、異性体パターンが異なることが予想されるので、水道法で記載されているように、異性体全ての面積値を合計した値で検量線を描く必要がある。

② B-10 について

デシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準品のクロマトグラムのピーク形状は、異性体ピーク比が P-1:P-2≒2:1 となっている(図 4-①)のに対し、B-10 の結果の異性体ピーク比が P-1:P-2≒1:1(図 4-②)となり P-1 のピークの回収率が低下している。しかし、そのクロマトグラムを見る限り P-1:P-2≒2:1 となっており、波形処理の間違いではないかと推測された。試料の P-1 は 2 つピークからなっているが、この検査機関に P-1 の前のピークが P-1 として同定されているか否か確認した。その結果、前のピークが P-1 として同定されていなかったため、低い検査結果となったことが分かった。

3-2. ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検証

検査結果と変動係数、および Z スコアを表 5 に示す。また、その度数分布を図 5 に示す。

検査濃度の Z スコア範囲は-1.69~2.50 となり、21

表 5. ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検査結果

検査機関名	検査結果 (μg/l)	変動係数 (CV%)	Zスコア
B-01	14.1	2.04	-1.69
B-02	14.6	9.91	-1.36
B-03	15.2	6.00	-0.94
B-04	15.5	2.75	-0.74
B-05	15.7	0.450	-0.61
B-07	15.7	1.71	-0.61
B-06	15.8	1.15	-0.54
B-11	15.8	2.25	-0.54
B-08	16.0	3.39	-0.40
B-13	16.4	1.90	-0.13
B-09	16.5	6.18	-0.07
B-12	16.7	1.53	0.07
B-10	17.1	9.81	0.34
B-19	17.3	1.33	0.47
B-14	17.5	1.55	0.61
B-15	17.6	4.53	0.67
B-16	17.7	3.54	0.74
B-17	17.7	5.29	0.74
B-22	17.8	2.22	0.81
B-18	17.8	2.96	0.81
B-20	18.5	1.92	1.28
B-21	20.3	0.413 ^{*1}	2.50
検査結果数	22		
平均値	16.7		
最大値	20.3		
最小値	14.1		
標準偏差	1.38		
変動係数(%)	8.25		

*1:1試料を5回注入した結果

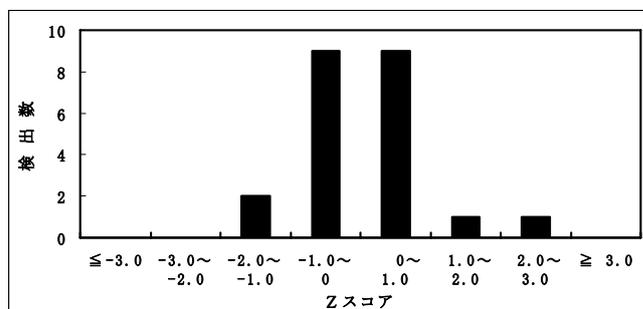


図 5. ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検査結果の度数分布

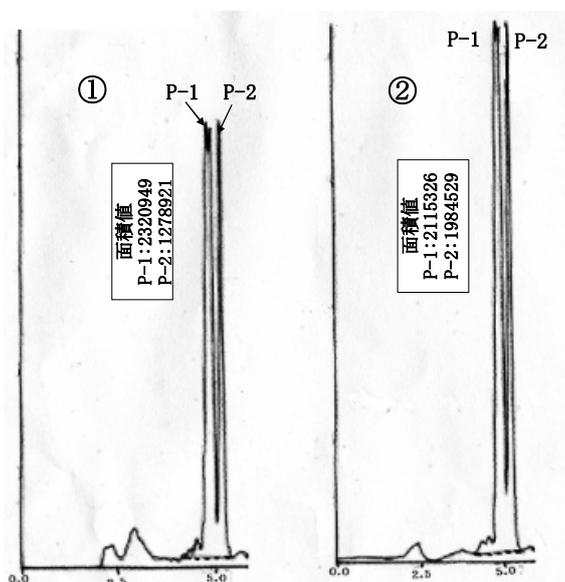


図 4. 機関 B-10 の ODS クロマトグラム

- ① : デシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準品の処理
- ② : 試料の処理

検査機関が満足、1 機関が疑わしい結果であった。変動係数が 10% 超過した機関は無かった。

Z スコアが疑わしい結果の B-21 の問題点は、前述の C10-LAS の場合と同じ検量線作成時の問題点であった。

3-3. ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検証

検査結果と変動係数、および Z スコアを表 6 に示す。また、その度数分布を図 6 に示す。

検査結果の Z スコア範囲は-1.80~2.52 となり、21 検査機関が満足、1 機関(B-22)が疑わしい結果であった。

表 6. ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検査結果

検査機関名	検査結果 (μg/l)	変動係数(CV%)	Zスコア
B-03	10.6	6.65	-1.80
B-01	10.6	2.05	-1.80
B-02	11.0	10.8	-1.41
B-04	11.5	2.13	-0.99
B-11	11.6	1.42	-0.90
B-09	11.7	6.11	-0.81
B-06	11.8	1.59	-0.72
B-05	12.1	2.08	-0.45
B-21	12.2	0.448 ^{*1}	-0.36
B-08	12.2	4.59	-0.36
B-14	12.5	1.21	-0.09
B-15	12.6	5.05	0.00
B-07	12.6	2.14	0.00
B-13	12.7	1.96	0.09
B-10	12.9	9.78	0.27
B-17	13.0	3.51	0.36
B-18	13.2	2.04	0.54
B-19	13.2	2.81	0.54
B-16	13.6	4.82	0.90
B-12	13.8	17.7	1.08
B-20	14.3	2.80	1.53
B-22	15.4	7.61	2.52
検査結果数	22		
平均値	12.5		
最大値	15.4		
最小値	10.6		
標準偏差	1.14		
変動係数(%)	9.13		

*1:1試料を5回注入した結果

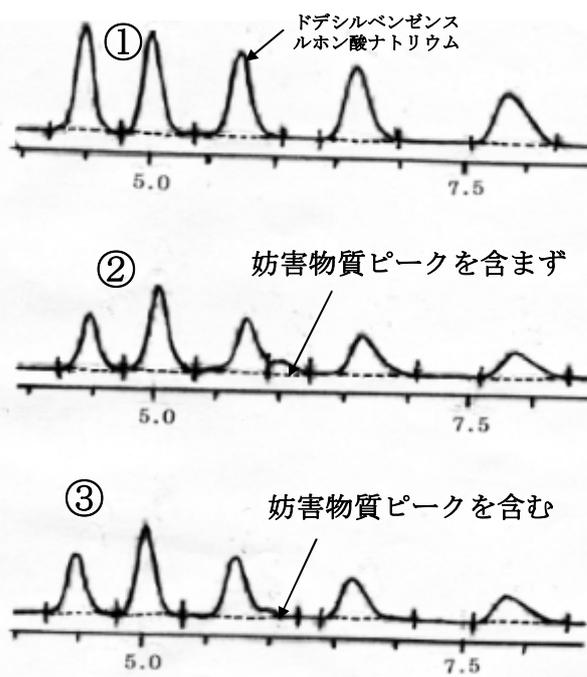


図 7. 機関B-22のTeSクロマトグラム

- ①: ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準品
- ②: 正常処理している試料
- ③: 正常処理していない試料

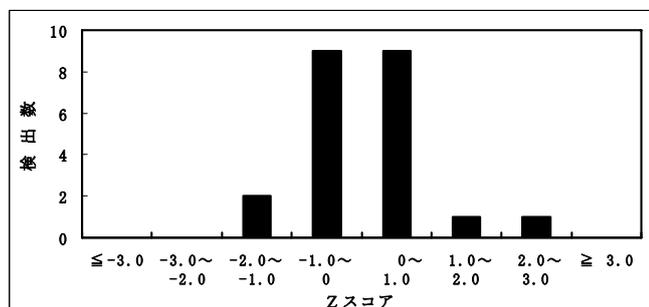


図 6. ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検査結果の度数分布

変動係数が10%超過した機関(B-02)は1機関であった。

Zスコアが2を超えたB-22と変動係数が10%超過したB-02について問題点を検証した。

①B-22について

5検査結果の内2検査結果が高い値を示した。この機関はテトラシル基結合シリカゲル(TeS)カラムを用いている。そのクロマトグラムは、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準品のクロマトグラムはほぼ左右対称ピーク(図7-①)であるのに対し、試料のクロマトグラムはピークの後に小ピークの妨害物質が検出されている。5つの結果の内3つは妨害物質の面積

を除去して算出している(図7-②)のに対し、2つの結果は妨害ピークの面積もドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムと同定して算出されており、これが原因で高い値となっている(図7-③)。従って、クロマトグラムを確認し標準品と試料の波形処理が同一であることを確認する必要がある。

②B-02について

5検査結果の内3検査結果が高い値、もしくは2検査結果が低い値であったが、その原因はクロマトグラムを見た限りでは解らなかった。

3-4. トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検証

検査結果と変動係数、およびZスコアを表7に示す。また、その度数分布を図8に示す。

検査濃度のZスコア範囲は-1.87~2.43となり、21検査機関が満足、1機関(B-22)が疑わしい結果であった。変動係数が10%超過した機関は1機関(B-02)であった。

Zスコアが2を超えたB-22と、変動係数が10%超過したB-02について問題点を検討した。

①B-22について

5検査結果の内2検査結果が高い値を示した。この原因として、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウ

表 7. トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検査結果

検査機関名	検査結果 ($\mu\text{g}/\ell$)	変動係数(CV%)	Zスコア
B-01	8.02	2.66	-1.87
B-02	8.19	12.1	-1.72
B-03	8.35	7.48	-1.57
B-05	8.51	2.29	-1.43
B-04	8.68	2.80	-1.28
B-06	9.08	2.66	-0.92
B-12	9.33	6.55	-0.69
B-09	9.60	4.91	-0.45
B-14	9.64	2.29	-0.41
B-07	9.94	2.17	-0.14
B-08	9.99	5.27	-0.10
B-15	10.2	5.12	0.09
B-16	10.3	6.12	0.18
B-21	10.3	0.495 ^{*1}	0.18
B-13	10.3	2.91	0.18
B-11	10.4	1.26	0.27
B-17	10.7	3.68	0.54
B-20	11.0	2.09	0.81
B-10	11.0	9.85	0.81
B-18	11.0	4.45	0.81
B-19	11.3	1.01	1.08
B-22	12.8	3.74	2.43
検査結果数	22		
平均値	9.94		
最大値	12.8		
最小値	8.02		
標準偏差	1.15		
変動係数(%)	11.5		

*1:1試料を5回注入した結果

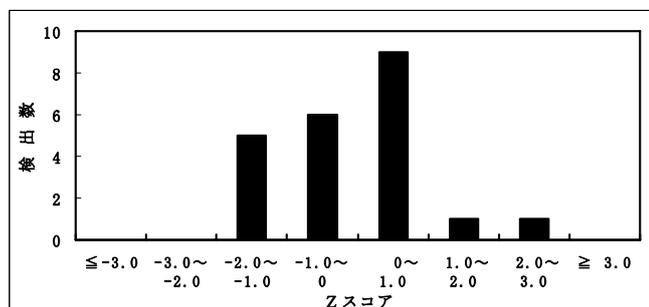


図 8. トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検査結果の度数分布

ム結果と同様に標準品のクロマトグラムはほぼ左右対称ピークであるのに対し、試料のクロマトグラムはショルダーがあった。今回、そのショルダー箇所の面積もトリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムと同定していたため、高い検査結果となっている。この場合もクロマトグラムを確認し、波形処理を同一にする必要がある。

②B-02 について

5 検査結果の内 3 検査結果が高い値、もしくは 2 検査結果が低い値であったが、その原因はクロマトグラムを見た限りでは解らなかつた。

3-5. テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの検証

検査結果と変動係数、および Z スコアを表 8 に示す。また、その度数分布を図 9 に示す。

検査濃度の Z スコア範囲は-1.98~3.04 となり、21 検査機関が満足、1 機関(B-22)が不満足な結果であった。この結果の度数分布を図 9 に示す。変動係数が 10% 超過した機関は 1 機関(B-02)であった。

Z スコアが 3 を超えた B-22 と、変動係数が 10% 超過した B-02 について問題点を検証した。

表 8. テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム成分の検査結果

検査機関名	検査結果 ($\mu\text{g}/\ell$)	変動係数(CV%)	Zスコア
B-02	5.85	13.4	-1.98
B-01	6.41	3.30	-1.44
B-05	6.62	3.00	-1.24
B-03	6.71	7.28	-1.16
B-15	6.91	4.24	-0.97
B-06	7.10	6.45	-0.78
B-04	7.24	3.86	-0.65
B-16	7.41	6.77	-0.49
B-12	7.48	4.87	-0.42
B-14	7.60	4.08	-0.31
B-07	7.90	2.17	-0.02
B-09	7.93	5.19	0.01
B-08	7.99	5.25	0.07
B-10	8.22	9.74	0.29
B-21	8.50	0.368 ^{*1}	0.55
B-17	8.53	3.46	0.58
B-13	8.55	3.85	0.60
B-20	8.70	2.28	0.75
B-18	8.79	9.04	0.83
B-11	8.84	2.74	0.88
B-19	9.44	3.22	1.45
B-22	11.1	6.01	3.04
検査結果数	22		
平均値	7.90		
最大値	11.1		
最小値	5.85		
標準偏差	1.13		
変動係数(%)	14.3		

*1:1試料を5回注入した結果

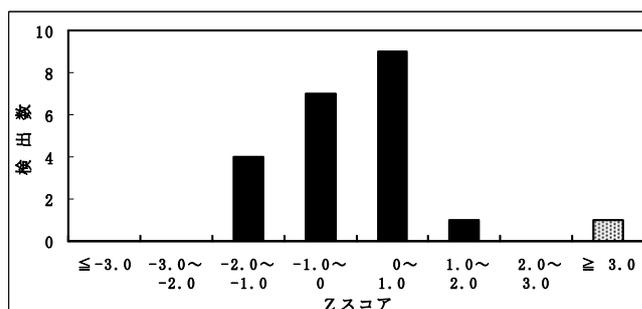


図 9. テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム

の検査結果の度数分布

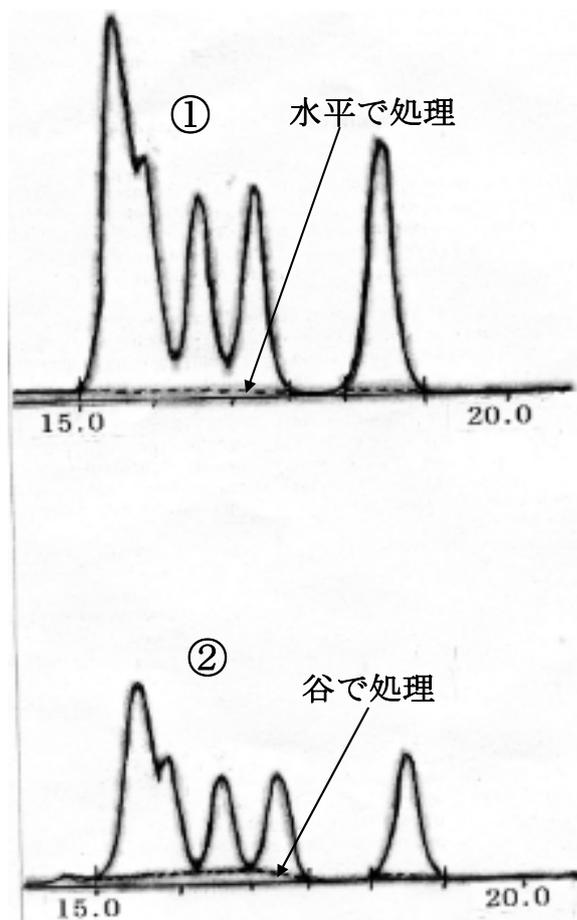


図 10. 機関B-22 の ODS クロマトグラム

- ①：テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準品
- ②：処理の異なる試料

①B-22 について

5 検査結果の内 3 検査結果が高い値であったが、その原因はクロマトグラムを見た限りでは不明であった。

②B-02 について

テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの標準品ではピークのベースラインを水平に処理し(図 10-①)、一方、試料では谷で処理しており(図 10-②)、この処理法が異なった結果、試料の検査値が低くなったと思われる。必ずクロマトグラムを見て、波形処理法を統一する必要がある。

4. まとめ

1) 陰イオン界面活性剤(5 構成成分の総和)の検査結果について Z スコアで評価を行った。結果は、Z スコアの絶対値が 3 以上の不満足な結果を報告した機関は

無かった。変動係数は、10% 超過する機関が 1 機関(10.8%)あったものの良好な外部精度管理の結果を得た。

2) 陰イオン界面活性剤の 5 構成成分についても個別に Z スコアと変動係数で評価したところ、Z スコアの絶対値が 3 以上の不満足な結果はテトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム成分の 1 件だけで、構成成分の測定についても概ね良好な精度を有していることが分かった。

なお、Z スコアの絶対値が 2 以上疑わしい結果と変動係数が 10% 超過した原因を考察したところ、

- (1) 検量線の作製を水道法が示す各構成成分の面積値の総和で行っていない。
- (2) 面積値の得る際の検出開始点と検出終了点、もしくはベースラインの引き方等、波形処理法が標準品と試料で異なっていることが考えられた。

文 献

- 1) 水質基準に関する省令(平成 15 年 5 月 30 日厚生労働省令第 10 号)
- 2) 藤井賢三, 試験所認定制度における技能試験(1), 環境と測定技術, **27(2)**, 51-56, 2000
- 3) 藤井賢三, 試験所認定制度における技能試験(2), 環境と測定技術, **27(3)**, 42-44, 2000
- 4) 藤井賢三, 試験所認定制度における技能試験(3), 環境と測定技術, **27(5)**, 56-60, 2000

患者発生現場でのバイオセーフティ
腸管出血性大腸菌-正しい知識で正しく予防

勢戸和子*1

Journal of Bio-Medical Science Association, 19, 85-89
(2008)

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、症状が激しく重篤な合併症を引き起こす場合もあるため、感染症法で第 3 類感染症として位置づけられ、全数把握の対象疾患となっている。2000 年以降厚生労働省への届出数は 3,000~4,000 名であったが、2007 年は大規模な食中毒事例もあり、12 月 30 日までの速報値で 4,586 名と全数把握疾患になって以来最多となっている。日本で分離される EHEC の血清群は 0157 が最も多いもののその割合は年々減少しており、代わって 2004 年以降は 026 が 20%以上を占めている。EHEC 感染症の潜伏期間は平均 3~5 日と言われており、典型的な臨床経過では激しい腹痛と血便が特徴的であるが、軽い下痢症や無症状保菌者も多い。大阪府内で 1996 年からの 11 年間に届出のあった 0157 感染者 1,273 人と 026 感染者 131 人について、年齢分布と症状を比較したところ、026 では 6 歳以下の割合が高かったが、腹痛や血便の有症率はいずれも有意に低率であった。一方で 4 件の 026 保育園事例ではいずれも二次感染者が発生しており、026 感染症は年少者においても症状が軽いため、発症していると自覚しないまま感染を拡大させている可能性がある。EHEC 感染症は、食品の取り扱いや調理方法に注意し、生食を避けることで、食品からの感染は予防できる。また、患者だけでなく無症状保菌者からの二次感染は EHEC の主要な感染経路であるが、保育や介護、調理に従事する者がその自覚をもち、日頃から徹底した手洗いを励行して糞口感染の成立を防止すれば、感染は拡大しない。

*1大阪府立公衆衛生研究所感染症部

分子疫学研究の進歩と対策への応用 3. 大阪府の結核対策における結核菌分子疫学の有用性

田丸亜貴

結核、84, 55-57 (2009)

大阪府では結核対策として 1995 年から IS6110-RFLP 分析法 (RFLP 分析) による結核集団発生事例の感染源調査、地域分子疫学を実施してきたが、同法には解析時間の長さ、解析上の困難、同一 RFLP パターンの地域集積などにより実用に限界があった。そこで、迅速性、比較の容易さに優れた反復配列多型 (VNTR 型別) を導入し、22loci-VNTR 型別による結核集団発生事例感染源調査、地域分子疫学を実施し同法が RFLP 分析と同等以上の有用性があることを示した。VNTR 法の導入により、結核感染源調査は単なる確認検査でなく感染拡大防止に繋がる有用な手段となっている。今後は VNTR 型別のより有効な活用のために、VNTR 型別の標準化・精度管理を実施した上で、各地域における地域分子疫学を含めた積極的疫学調査の事業化が望まれる。

大阪府立公衆衛生研究所

結核（化学予防）

鈴木定彦*1、中島千恵*1、福島由華里*1、田丸亜貴*2、
松葉隆司*3

臨床と微生物、35, 669-675

近年、わが国の結核患者数は減少傾向を示しているが、これに伴って結核患者に接触したことがなく結核に対する免疫を持たない人口が増えている。また、エイズ患者、高齢者、特定の基礎疾患保持者などにおいて発症リスクが高いことも報告されている。このようなグループにおいて、早期に結核感染を見出し、化学予防により発症を抑え込むことは、新たな結核の広がりを未然に防ぐための重要な結核対策の一つと考えられる。

Effects of Sample Preparation and Bacterial Concentration
on *Salmonella enterica* Detection in Poultry Meat Using
Culture Methods and PCR Assaying of Preenrichment
Broths

M. KANKI*1, J. SAKATA*1, M. TAGUCHI*1, Y.
KUMEDA*1, M. ISHIBASHI*1, T. KAWAI*1, K.
KAWATSU*1, W. YAMAZAKI*1, K. INOUE*1, M.
MIYAHARA*2

Food Microbiology, 26, 1-3 (2009)

鶏肉 162 検体について、検体の処理法によるサルモネラの検出率への影響を検討した。切身の場合、ストマッカー、手もみ、無処置の 3 通りの処理法での PCR によるサルモネラの検出率は、50.0%、62.2%、48.9%であった。挽肉の場合は、21.7%、48.0%、40.7%であり、挽肉の場合はストマッカーによる PCR への影響が顕著だった。挽肉 12 検体の菌数を MPN 法で測定した結果、すべて 1.0 CFU/g 以下であった。このうち 7 検体は増菌しても 1000 CFU/g 以下であり、PCR の検出限界を下回っていた。鶏肉の場合は、阻害物質の多さおよび汚染菌数が PCR でのスクリーニングを困難にしていることが判明した。

*1 北海道大学人獣共通伝染病リサーチセンター国際疫学部門

*2 大阪府立公衆衛生研究所

*3 鳥取大学医学部細菌学分野

Tuberculosis-Preventive Chemotherapy-

*1大阪府立公衆衛生研究所

*2国立医薬品食品衛生研究所

培養法および PCR 法による鶏肉からのサルモネラ検出における検体処理法と細菌数の影響

Development and Evaluation of a Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Simple Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

W. YAMAZAKI*¹, M. TAGUCHI*¹, M. ISHIBASHI*¹, M. KITAZATO*², M. NUKINA*³, N. MISAWA*³ and K. INOUE*¹

Journal of Medical Microbiology, **57**, 444-451 (2008)

LAMP 法を用いて、ヒトの細菌性胃腸炎の主要な原因菌であるカンピロバクター・ジェジュニ(*C. jejuni*) およびカンピロバクター・コリ(*C. coli*)の迅速検査法を開発した。本法は供試した 65 株の *C. jejuni* ならびに 45 株の *C. coli* をそれぞれ正確に同定し、陰性対照として使用した 75 株の非 *C. jejuni/C. coli* 菌株には反応を示さなかった。90 検体の有症患者便を対象に本法による直接検出を実施し、直接培養法と結果を比較したところ、本法の感度は 81.3%、特異性は 96.6% であった。判定に要した時間は直接培養法では 4 日以上、本法ではわずか 2 時間であった。本法は *C. jejuni* および *C. coli* の迅速同定ならびに患者の迅速診断の一助として有用と思われた。

Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification

W. YAMAZAKI*¹, K. SETO*¹, M. TAGUCHI*¹, M. ISHIBASHI*¹ and K. INOUE*¹

BMC Microbiology, **8**, 94 (2008)

LAMP 法を用いて、コレラ毒素を産生する *Vibrio cholerae* の高感度・迅速検出法を開発した。本法は供試した 34 株のコレラ毒素を産生する *Vibrio cholerae* には陽性であり、陰性対照として使用した 13 株のコレラ毒素を産生しない *Vibrio cholerae* および 47 株の非 *Vibrio cholerae* には陰性だった。従来法による同定の所用時間は通常 3-4 日である。DNA 抽出の開始から同定までに本法が要した時間は分離平板上のコロニーおよびヒト糞便を用いた場合で、それぞれわずか 35 分および 70 分であった。コレラ毒素を産生する *Vibrio cholerae* 培養菌をヒト糞便に添加して測定した際の本法の検出限界は 780 CFU/g (1.4 CFU/test tube) であった。輸入冷凍魚介類の汚染調査ならびに海外旅行者・国内由来のコレラ患者の迅速診断の一助として本法は有用と思われた。

*1 大阪府立公衆衛生研究所

*2 淀川キリスト教病院

*3 神戸市環境保健研究所

*4 宮崎大学

LAMP 法によるカンピロバクター・ジェジュニおよびカンピロバクター・コリの迅速かつ簡易な検出法の開発ならびに評価

*1 大阪府立公衆衛生研究所

LAMP 法によるコレラ毒素を産生する *Vibrio cholerae* の高感度かつ迅速な検出

Development of a Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Sensitive and Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus*

W. YAMAZAKI*¹, M. ISHIBASHI*¹, R. KAWAHARA*¹
and K. INOUE*¹

BMC Microbiology, **8**, 163 (2008)

LAMP 法を用いて、腸炎ビブリオの高感度・迅速検出法を開発した。本法は供試した 143 株の腸炎ビブリオには陽性であり、陰性対照として使用した 89 株の非腸炎ビブリオには陰性だった。従来法による同定の所用時間は通常 2-3 日である。DNA 抽出の開始から同定までに本法が要した時間は分離平板上のコロニーおよびエビを用いた場合で、それぞれわずか 40 分および 60 分であった。腸炎ビブリオ培養菌をエビに添加して測定した際の本法の検出限界は 530 CFU/g (2.0 CFU/test tube)であった。魚介類の汚染調査ならびに食中毒患者の迅速診断の一助として本法は有用と思われた。

Comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* detection in Naturally Contaminated Chicken Meat Samples between Loop-mediated Isothermal Amplification Assay and Conventional Culture Methods

W. YAMAZAKI*¹, M. TAGUCHI*¹, T. KAWAI*¹, K. KAWATSU*¹, J. SAKATA*¹ and K. INOUE*¹ and N. MISAWA*²

Applied and Environmental Microbiology, **75**, 1597-1603 (2009)

昨年度開発した LAMP 法が市販鶏肉からの検出法として応用可能であるかを評価するため、144 検体の鶏肉の増菌培養液から *C. jejuni* および *C. coli* の分離培養と LAMP 法による検出を比較した。LAMP 法を用いた鶏肉の増菌培養液からの検出法の所要時間は 1 日以内であり、分離・同定を基礎とする従来法と比較して、判定所要日数を 2 日以上短縮することが可能であった。培養法と比較した LAMP 法の感度は 98.5% (67/68)、特異度は 97.4% (74/76)であり、LAMP 法は従来法のスクリーニング法として実用可能であることが示された。

*1 大阪府立公衆衛生研究所

LAMP 法による腸炎ビブリオの高感度かつ迅速な検出法の開発

*1 大阪府立公衆衛生研究所

*2 宮崎大学

LAMP 法および培養法による *Campylobacter jejuni* および *C. coli* の市販鶏肉からの検出法の評価

チクングニヤ熱と確定診断された
インドからの輸入感染症症例

青山幾子*1, 宇野健司*2, 弓指孝博*1, 加瀬哲男*1, 高橋和郎*1, 後藤哲志*2, 片山智香子*2, 中村匡宏*2, 塩見正司*2, 仁科展子*3, 齊藤武志*3, 森登志子*3, 穴瀬文也*3, 吉田英樹*3, 高崎智彦*4, 林昌宏*4, 倉根一郎*4

病原微生物検出情報, 29,345-346 (2008)

チクングニヤ熱は、蚊によって媒介されるウイルス性急性熱性疾患である。現在わが国におけるチクングニヤウイルスの流行はないが、流行地域からの帰国者における輸入症例が報告されている。今回、インド滞在中に発熱・発疹・関節痛を認め、帰国後も関節痛が持続し、チクングニヤ熱感染が疑われた症例について、当所において実験室診断を実施した。

患者は 30 代男性、大阪府在住。7月にインドへ渡航し、現地にて発熱、関節痛などで発症し入院となった。入院中に発疹も出現した。症状の改善後退院し、8月に帰国したが、全身の関節痛が再燃したため医療機関を受診した。

抗体検査の結果、患者のデングウイルス感染は否定された。チクングニヤウイルスに対する特異的 IgM 抗体陽性、IgG 抗体陽性、中和抗体陽性であり、チクングニヤ熱と確定診断した。

本邦で確認されたチクングニヤ熱輸入症例は、これまで 2006 年 11 月にスリランカで感染したと思われる 2 例のみで、本症例が 3 例目である。本症例により依然としてわが国への侵入の危険性が存在することが示唆された。

チクングニヤ熱は、現在のところ我が国では感染症法や検疫法に定められていない疾患であるが、輸入症例が認められた場合、迅速な感染防止対策を遂行するためにも、感染症法ならびに検疫法において本疾患の類型化を定め、法的整備が必要だと思われる。

奈良公園におけるニホンジカ(*Cervus nippon*)の
E 型肝炎ウイルス疫学調査

萩原克郎*1, 辻正義*1, 川淵貴子*2, 鳥居春己*3, 小林朋子*1, 浅川満彦*1, 石原智明*1

Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 13, 35-37
(2008)

E 型肝炎ウイルス(HEV)は、家畜のみならずシカにもその感染が報告されている。一方、奈良公園に生息する天然記念物ニホンジカ *Cervus nippon* の HEV に関する疫学的知見は、報告されていない。そこで、当公園に生息する 173 頭(成獣メス)を対象に、血清中の HEV 抗体と HEV-RNA の検査を行った。ELISA では全ての個体が HEV 抗原と反応性を示さない低値を示し、いずれの血清中からも HEV-RNA 遺伝子は検出されなかった。以上、今回調査したニホンジカには、HEV 抗体陽性個体は確認されず HEV に感染していない個体群であることが推察された。

*1大阪府立公衆衛生研究所

*2大阪市立総合医療センター

*3大阪市保健所

*4国立感染症研究所

Imported Chikungunya fever from India to Japan : case report.

*1 酪農学園大学 獣医学部

*2 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

*3 奈良教育大学 教育学部

Epidemiological study of hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Nara Park.

An outbreak of measles classified as genotype H1 in 2008
in Osaka prefecture

Japanese Journal of Infectious Diseases, 62, 76-77 (2009)

T. Kurata^{*1}, H. Miyagawa^{*1}, E. Furutani^{*2}, T. Kase^{*1} and K.
Takahashi^{*1}

2008年第7週から13週に大阪府内で麻疹と診断された2家族、7例のうち3例からH1型麻疹ウイルスを検出した。患者検体からPCRにより増幅されたN遺伝子3'末端領域の部分配列は3例で全て一致し、系統樹解析によりH1型麻疹ウイルスと同定された。これらの配列をBLAST検索した結果EU368828 (MVs/Hong Kong.CHN/36.07/1[H1])と100%の相同性を示した。

2007年以降に当所で麻疹ウイルスを検出した24症例は、全てD5型ウイルスによるものであったが、今回の3症例では初めてH1型ウイルスが検出された。日本国内で2007年以降に検出された麻疹ウイルスは主にD5型で、H1型ウイルスは中国で感染したと考えられる1症例が報告されたのみであった。今回検出されたウイルスは、そのN遺伝子部分配列が2007年に香港で検出されたH1型麻疹ウイルスの配列と完全に一致しており、ごく最近国外から大阪府内に持ち込まれたウイルスである可能性が考えられた。

大阪府内で発生したH1型麻疹ウイルスの
国内感染事例

倉田貴子^{*1}、宮川広実^{*1}、古谷悦美^{*2}、加瀬哲男^{*1}、
高橋和郎^{*1}

病原微生物検出情報, 29, 160-161 (2008)

2007-2008年にかけて全国的に流行した麻疹ウイルスの遺伝子型はD5型であり、大阪府内でも同様にD5型ウイルスの流行が見られた。しかし、2008年第7週から13週に大阪府内で麻疹と診断された2家族、7例のうち3例からH1型麻疹ウイルスが検出された。患者検体からPCRにより増幅されたN遺伝子3'末端領域の部分配列は3例で全て一致し、系統樹解析によりH1型麻疹ウイルスと同定された。これらの配列をBLAST検索した結果EU368828 (MVs/Hong Kong.CHN/36.07/1[H1])と100%の相同性を示した。いずれの患者にも海外渡航歴はなかったが、発端者となった患者は職業上の理由から関西国際空港に出入りしていたとのことであった。しかし麻疹患者との接触の有無は不明で、感染源は不明であった。また、感染が確認された2家族間には明らかな接触も認められなかった。

今回検出されたウイルスは、そのN遺伝子部分配列が2007年に香港で検出されたH1型麻疹ウイルスの配列と完全に一致しており、ごく最近国外から大阪府内に持ち込まれたウイルスである可能性が考えられた。また、接触の明らかではない複数の家族から患者発生があったことから、H1型ウイルスが地域流行している可能性も示唆され、今後同地域のH1型麻疹ウイルスの感染拡大を監視していく必要があると考えられる。麻疹流行地域からの人の移入がおこる国際空港などの施設周辺では積極的に麻疹の実験室診断を行い、麻疹ウイルス移入状況を把握する必要があると思われる。

*1 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

*2 古谷こどもクリニック

*1 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

*2 古谷こどもクリニック

- 抄録 -

イムノクロマト法を用いたノロウイルス簡便検出キットの評価

山崎謙治*¹、左近直美*¹、伊吹てるみ*²、立田多美恵*³

検査と技術、**36**、772-773 (2008)

現在ノロウイルス (NV) の検出は逆転写(RT)-PCR法など遺伝子を検出する方法が主として採用されている。2007年11月にイムノクロマト(IC)法によるNV抗原検出試薬が発売されたことから、急性胃腸炎患者糞便を用いてIC法と在来法との比較検討を行った。RT-PCRでノロウイルスG I陽性の20検体中6検体(30%)がイムノクロマト(IC)法で陽性であり、G II陽性の30検体中21検体(70%)がIC陽性であった。リアルタイムPCRとの比較により、反応液中に10の7乗コピー以上あればICで陽性となることが推定された。しかしG Iについてはコピー数が多いにもかかわらずIC陰性となる検体が少なからずあり、抗体の反応性が低いことが示唆された。

ウイルス感染症アウトブレイクへの迅速対応についての研究-モデルケースとしてのノロウイルス検査対応--

山崎謙治*

医療の広場、**10**、15-18, 2008

アンケート調査および試験的ノロウイルス検査実施によって、病院でのウイルス検査に対応できるキャパシティを把握し、何が自前でできうるのか、また何が効率的であるのかを明らかにしていき、病院内におけるノロウイルス検査実施の実現を提言することを目的とした。全国の独立行政法人国立病院機構に属する病院を対象としたアンケート調査およびノロウイルス検出試薬の性能評価依頼により、以下のような事柄が明らかになった。1)ノロウイルス検査の必要性は認識されているが検査導入が進んでいない。2)ノロウイルス簡便検査法が開発されたが診断的価値を十分に満たしているとは言えない。3)RNA抽出等の習熟を成すことによりノロウイルス遺伝子検査を行うことは充分可能である。4)入院医療費削減のため、積極的に検査の導入を進める必要がある。

*¹大阪府立公衆衛生研究所

*²大阪府泉佐野保健所

*³大阪府茨木保健所

Assessment of Simple and Easy Norovirus Detection Kit using An Immunochromatography Based Method

*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

A Study on Rapid Correspondence for Outbreaks of Viral Infection

Prevalence of Enterovirus in Osaka, Japan, between April
and September 2008

K.YAMAZAKI*, N.SAKON*, K.NAKATA* and
T.KASE*

Jpn. J. Infect. Dis., **62**, 80-81, 2009

ウイルス分離および RT-PCR 法を用いて、2008 年 4 月から 9 月の間に大阪府で流行したエンテロウイルスの血清学的解析を行った。感染症流行予測調査事業で得られた 147 名の患者のうち 52 名から 64 株のエンテロウイルスが検出された。合計 10 血清型のウイルスが検出されたが、疾患別では無菌性髄膜炎患者から Echo30 と CoxB5 が、手足口病患者から CoxA16 が主として検出されたが、ヘルパンギーナ患者からは様々なエンテロウイルスが検出された。また Echo5 による発疹症の集団発生が認められた。

未治療 HIV-1 感染者に検出された V108I 変異が
EFV 耐性誘導に及ぼす影響

森 治代*¹, 小島洋子*¹, 川畑拓也*¹, 後藤哲志*²

日本エイズ学会誌、**10**、184-190 (2008)

Polymorphism として存在する V108I 変異が EFV 耐性獲得に及ぼす影響を検討する目的で、未治療感染者から分離された RT 領域に V108V/I 変異を持つ HIV-1 KK141 株を用いて EFV 耐性ウイルスの誘導を試みた。

KK141 株を PBMC に感染させ、培養液中の EFV 濃度を徐々に上げながら培養した。RT-PCR およびシーケンスにより耐性ウイルスの出現を確認し、MAGIC5 アッセイにより EFV 感受性を調べた。

EFV 存在下で KK141 株の感染・培養を行ったところ、V108I が優位に増殖し軽度耐性を示したが、新たな耐性変異の出現は認められず、EFV 濃度上昇に伴いウイルスは検出されなくなった。ところが、108I ウイルスをさらに EFV 非存在下で培養したところ、V108I に加えて A62V 変異を持つウイルスの増殖が認められ、この A62V/V108I ウイルスを再び EFV 存在下で培養したところ、K103N または L100I 変異が出現し耐性度が上昇した。一方、KK141 株を EFV 非存在下で感染させた後に EFV を添加し培養したところ、野生型の 108V を持つウイルスのみに耐性変異が蓄積し高度耐性を獲得した。

以上の結果より、V108I 変異はそれのみでは EFV 高度耐性の誘導に大きな影響を及ぼさないが、A62V 等の変異が共存することにより、薬剤存在下での耐性変異の導入に係わる可能性が示された。

*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

2008 年春から秋までに大阪府で流行したエンテロウイルス

* 大阪府立公衆衛生研究所

*2 大阪市立総合医療センター

Influence of V108I Mutation Detected in a Treatment-naive HIV-1-infected Patient on the Development of Resistance to Efavirenz

Molecular survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* species and *Candidatus neoehrlichia mikurensis* in wild rodents from Shimane Prefecture, Japan.

K. Tabara*1, S. Arai*2, T. Kawabuchi*3, A. Itagaki*1, C. Ishihara*4, H. Satoh*2, N. Okabe*2 and M. Tsuji*4.

Microbiology and Immunology, 51, 359-67 (2007)

ダニ媒介性疾患が地域流行している島根県では、多くの不明熱患者が存在する。我々は *Babesia microti*, *Ehrlichia* 属原虫、および *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* について、島根県の 62 人の不明熱患者および 62 匹の野鼠について分子疫学を行った。*Babesia* 属原虫の 18SrRNA、*Anaplasmataceae* の groESL それぞれに特異的なプライマーを用いて PCR を行い、捕獲した野鼠の 45%(28/62)および 25.8%(16/62)で増幅産物を得た。28 の 18SrDNA 陽性バンドのうち 23 は穂別、5 は神戸型 *B. microti* の配列であった。16 の groESL 陽性バンドのうち、8 つは *Ehrlichia muris*、1 つは *Ehrlichia sp.* HF565、7 つは *Candidatus N. mikurensis* であった。神戸型 *B. microti* については、原虫分離に成功し、これまで兵庫県淡路島が神戸型 *B. microti* の分布地域として知られていたが、今回初めて島根県での分布が明らかになった。62 人の不明熱患者の DNA の PCR では、上記に加え *Rickettsia japonica* 17K 属共通抗原遺伝子および *Orientia tsutsugamushi* 56K antigen gene 検出プライマーを用いたが、いずれも増幅産物は得られなかった。患者血清を用いた *B. microti*, *E. muris* の間接蛍光抗体では 1 人が *E. muris* 抗体陽性であった。

Babesia microti-Group parasites compared phylogenetically by complete sequencing of CCT η Gene in 36 isolates

R. NAKAJIMA*1 M. TSUJI*1, K. ODA*1, A. ZAMOTO-NIIKURA*2, Q. WEI*1, T. KURATA-KAWABUCHI*3, A. NISHIDA*1, and C. ISHIHARA*1

Journal of Veterinary Medical Science, 71, 55-68 (2009)

これまでに使用されてきた分類マーカー遺伝子 (18SrRNA, beta-tubulin) では分類が困難であった原虫種の比較のために、chaperonin-containing t-complex polypeptide (CCT η) をマーカー遺伝子として用いて *B. microti* グループ原虫の系統学的解析を行った。36 のピロプラズマ原虫の CCT η 遺伝子の完全長のシーケンスを決定し、系統樹解析を行った結果、*B. microti* グループ原虫は一つのクラスターを形成し、*Babesia sensu stricto* および *Theileria* 属原虫とは明らかに分岐していた。さらに *B. microti* グループ原虫内では、進化距離が離れた 4 つのクラスター (U.S., Kobe, Hobetsu, Munich) が存在することが明らかになった。また、CCT η 遺伝子内に存在するイントロンの場所と有無を指標とした解析においても、系統樹解析と同様のクラスターが形成されたことから、CCT η 遺伝子はこれまで分類が困難であった *B. microti* グループ原虫と近縁なピロプラズマ属原虫種の分類に有用なマーカー遺伝子になると考えられた。

*1 島根県保健環境科学研究所

*2 国立感染症研究所 感染症情報センター

*3 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

*4 酪農学園大学 獣医学部

島根県における不明熱患者の原因病原体の検索と野外疫学調査

*1 酪農学園大学 獣医学部

*2 国立感染症研究所

*3 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

CCT η 遺伝子を用いた *Babesia microti* グループ原虫の系統学的比較

予防に役立つ「感染症の事典」
目に見えない世界をのぞいてみよう

北里研究所*1、青山幾子*2、木村明生*2、
西村公志*2、弓指孝博*2

PHP 研究所 (2008)

この本は、感染症の世界を、わかりやすく紹介することを心がけて作られた。

第 1 部では、病原体の種類、体を守る働きや免疫、また、人類と感染症の戦いの歴史、研究史の偉人などを紹介した。

第 2 部では、それぞれの病原体の特徴とともに、それらが引き起こす感染症の予防法なども解説した。

感染症を引き起こすものは、ウイルス、細菌、カビ、原虫などたくさんある。昔は、多くのヒトが感染症で亡くなった。しかし、人類は対抗する手段として、公衆衛生・ワクチン・抗菌薬の 3 つの対抗手段を考えついたことを解説した。

世界中には、数え切れないほどの微生物がいるが、すべてが悪いわけではなく、役に立つ菌、必要な菌もたくさんいることも紹介した。

この本が、感染症を正しく学び、知ることで、病気の予防、ひいては読者の健康増進に役立つ用に変更された。

ガラスビーズ粉碎法を用いた LC/MS/MS による
畜水産食品中のサルファ剤の分析

藤田瑞香*¹、田口修三*¹、尾花裕孝*¹

食品衛生学雑誌, 49, 411-415 (2008)

食品中に残留するサルファ剤 25 成分を高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法(LC/MS/MS)により測定する一斉分析法を検討した。ガラスビーズ粉碎法により抽出を行い、抽出液を ODS と塩基性アルミナを連結した固相抽出カラムに通過させる精製方法により、迅速な前処理が可能となった。食品への添加回収試験の結果、一部を除き平均回収率は 70～120%、相対標準偏差は 15%以下と良好であった。また、定量下限は 0.0025～0.005 $\mu\text{g/g}$ であり、食品中の妨害成分の影響を受けない迅速かつ高精度な試験法を確立することができた。

*1 社団法人北里研究所

*2 大阪府立公衆衛生研究所

We help prevention 「The encyclopedia of the infection」

We will look in the invisible world

*¹大阪府立公衆衛生研究所

Determination of Sulfonamides in Livestock Products and Seafoods by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry using Glass Bead Homogenization

LC-MS/MS による餃子中の農薬一斉分析法の検討

岡本 葉*¹ 高取 聡*¹ 北川陽子*¹
起橋雅浩*¹ 福井直樹*¹ 村田 弘*¹
住本建夫*¹ 田中之雄*² 尾花裕孝*¹

食品衛生学雑誌 50、10-15 (2009)

LC-MS/MS を用いた餃子中の農薬の分析法を検討した。均一化した餃子を酢酸エチルで抽出し、遠心分離後酢酸エチルを留去した。残留物をヘキサンに再溶解し、アセトニトリル/ヘキサン分配法により脂質を除き、アセトニトリル層をグラファイトカーボン/PSA 積層カラムにより精製し、LC-MS/MS で測定した。99 種類の農薬について、20 および 100 ng/g になるよう餃子に添加し、回収率を求めたところ、72 種類の農薬について両濃度で良好な結果（回収率、70-120% ; RSD, 20% 未満）となった。本分析法を用いて、12 検体を処理するのに要した時間は 6 時間であった。したがって、本分析法は餃子中残留農薬分析法として有用な方法であると考えられる。

2-アルキルシクロブタノン分析と照射食品の検知

尾花裕孝*¹

食品照射, 43, 37-45 (2008)

2-アルキルシクロブタノンを指標にした放射線照射食品の検知について解説した。前半では我々が開発した 2-アルキルシクロブタノン法が、EU 公定法に比べ迅速性や簡便性が優れた検知法であることを解説した。また 2-アルキルシクロブタノンの分析が、より簡便な方向に進んでいることも示した。後半では 2-アルキルシクロブタノンを分析することにより、原材料である食肉類の放射線照射履歴を加熱調理後、さらに一年を目途にした冷凍保存後も検知可能であることを解説した。

*1 大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部 食品化学課

*2 社団法人 大阪食品衛生協会 食品検査センター

Determination of Pesticides in Chinese Dumplings Using Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

*1 大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部 食品化学課

Analysis of 2-alkylcyclobutanone and detection of the irradiated food

Determination of Taurine in Energy Drinks by HPLC Using
a Pre-column Derivative

Y.SAWABE*, T.TAGAMI* and K.YAMASAKI*

Journal of Health Science, 54 (6) 661-664 (2008)

4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラン (NBD-F) を用いたプレカラム誘導体化 - 液体クロマトグラフ法による迅速で簡便な健康ドリンク中のタウリンの分析法を検討した。NBD-Fによるタウリンの誘導体化は60°C, 10分間で終了した。この誘導体は、紫外可視吸光度計 (470nm) で測定できた。カラムは一般的なODSカラム、移動相は10mmol/lテトラブチルアンモニウムブロミドを含むpH5.4のリン酸水素二ナトリウム・クエン酸塩緩衝液とアセトニトリルの混液 (7:3) を用いた。添加回収実験 (n=3) による回収率は、98.2 - 99.9%であり、標準偏差は0.3-0.5%であった。相関係数は0.999であり、良好な直線性と特異性を確認した。タウリンを含有する市販のドリンクを測定したところ、表示量に対する含有量は92.9 - 105.1%であった。本法は、一般的な分析条件及び機器で測定が可能であり、小規模な検査室においても日常の検査法として利用できるものと考えられる。

The Release of Formaldehyde upon Decomposition of 2-Bromo-2-nitropropan-1,3-diol (Bronopol)

K. KAJIMURA*, T. TAGAMI*, T. YAMAMOTO*,
and S. IWAGAMI*

Journal of Health Science, 54(4), 488-492(2008).

ブロナポール (BP) の分解により遊離するホルムアルデヒド (FA) の挙動について調査を行った。BP は化粧品に配合される防腐剤であり、欧米で汎用されている。

BP から遊離する FA 量は、溶解液の pH 及び温度に大きく影響を受けた。pH がアルカリ性になるほど遊離する FA 量は顕著に増加した。pH8.0 のリン酸ナトリウム緩衝液 (0.005mol/L) で 0.1w/v%溶液を調製し 25°C で 24 時間保存したとき、溶液中の FA 濃度は約 30ppm に達した。また、pH6.0 のリン酸ナトリウム緩衝液 (0.005mol/L) で 0.1w/v%溶液を調製し、60°C の水浴中で 30 分間放置したとき、溶液中の FA 濃度は、約 40ppm に達した。一方、溶解液の塩濃度は FA の遊離に影響を及ぼさなかった。

BP (0.1w/v%) を添加した化粧水及びジェルモデル処方を作製し、経日的に遊離する FA 量の測定を行った。モデル処方中に遊離する FA 量は経日的に増加し、25°C の保存条件下では、10 日後に約 20ppm に達した。また、pH6.0 のリン酸ナトリウム緩衝液 (0.005mol/L) で調製した BP 溶液を室温で保存し、季節毎に経日的な FA の遊離を調査したところ、季節変動が非常に大きいことが明らかとなった。

*大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部 薬事指導課
プレカラム誘導体化 HPLC によるドリンク中のタウリンの定量

*大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部
ブロナポールの分解により遊離するホルムアルデヒドの挙動に関する研究

Simultaneous Measurement of Diazolidinyl Urea, Urea,
and Allantoin in Cosmetic Samples by Hydrophilic
Interaction Chromatography

T. DOI*, K. KAJIMURA*, S. TAKATORI*, N. FUKUI*,
S. TAGUCHI* and S. IWAGAMI*

Journal of Chromatography B, 877(10), 1005-1010
(2009)

トリアゾール結合型シリカゲルカラムを用いた親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)による、化粧品中の DU、尿素、アラントイン同時分析法を開発した。

化粧品試料は、20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.0) およびアセトニトリルを加えて激しく混ぜ、遠心分離した上清をろ過し、HPLC で分析を行った。検量線は尿素、アラントイン、DU についてそれぞれ 30-1250 mg/L, 0.25-18.75 mg/L, 2.5-125.0 mg/L の範囲で良好な直線性を示した。手作り化粧水、コンディショナー、ジェルを用いた添加回収試験の結果も 92.84-103.22 % と良好であった。室内再現性や日間変動について検討したところ、相対標準偏差が最大でも約 3 % であった。

本法はバリデーションの結果も良好であり、化粧品中の DU、尿素、アラントインの迅速分析に有用であると考えられた。

Determination of Organochlorine Pesticides in
Glycyrrhizae Radix

T. TAGAMI*, K. KAJIMURA*, K. YAMASAKI*,
Y. SAWABE*, S. TAGUCHI* and S. IWAGAMI*

Journal of Health Science, 54, 665-670 (2008)

第 15 改正日本薬局方に収載されている「生薬中の有機塩素系農薬の分析法」は、カンゾウに対する回収率が低いことから不十分である。本研究では、良好な回収率を示す「カンゾウ中の有機塩素系農薬の分析法」を開発した。本法は、残留基準値が定められている全ての生薬中の有機塩素系農薬を分析することが可能であった。

* 大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部

親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた化粧品中のジアゾリジニル尿素、尿素、アラントイン同時分析法の開発

* 大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部 薬事指導課

カンゾウ中の有機塩素系農薬の分析

Determination of Pyrethroid Pesticides in
Cinnamomi Cortex

T. TAGAMI*, K. KAJIMURA*, C. NOMURA*,
S. TAGUCHI* and S. IWAGAMI*

YAKUGAKU ZASSHI, **129**, 173-176 (2009)

我が国では、14種類の生薬を対象として、有機塩素系農薬の残留基準値が定められている。残留基準値の設定を契機として、残留基準値が定められている生薬に残留する農薬が、有機塩素系以外の農薬へと変わっていることが懸念される。我が国で流通する生薬に残留するピレスロイド系農薬の実態調査は、ほとんど行われていない。また、残留基準値の設定以降、実態調査は行われておらず、残留実態を明らかとする必要がある。既に11生薬に残留するペルメトリン、シペルメトリン、フェンバレレートの実態調査は報告されているものの、ケイヒに対する回収率が低いことや煩雑な液/液分配を含むことから不十分である。本研究では、ケイヒ中のペルメトリン、シペルメトリン、フェンバレレートを固相抽出を用いて分析する方法について検討した。試料溶液は、質量分析計付きガスクロマトグラフの負化学イオン化モードを用いて分析した。ケイヒに対するペルメトリン、シペルメトリン、フェンバレレートの回収率は87.9~90.7%であった。また、本法によりケイヒを対象として実態調査を行ったところ、ペルメトリン、シペルメトリン、フェンバレレートは検出されなかった。また、本法は、残留基準値が定められている全ての生薬中のピレスロイド系農薬を分析することが可能であった。

Detection of Culturable and Nonculturable
Legionella Species from Hot Water Systems
of Public Buildings in Japan

A. EDAGAWA*¹, A. KIMURA*¹, H. DOI*¹,
H. TANAKA*¹, K. TOMIOKA*¹, K. SAKABE*²,
C. NAKAJIMA*³ and Y. SUZUKI*³

Journal of Applied Microbiology, **105**, 2104-2114 (2008)

近年、給湯水を感染源とするレジオネラ症の発生が報告され、給湯水の微生物汚染対策が重要となっている。大型建築物内で使用されている給湯水からレジオネラ属菌の検出を行ったところ、培養不能レジオネラ属菌が検出され、給湯水がレジオネラ症の感染源となる可能性が示唆された。また、塩素濃度、鉄濃度、従属栄養細菌の生息と、レジオネラ属菌汚染との関連性が認められた。

*大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部 薬事指導課
ケイヒ中のピレスロイド系農薬の分析

*¹ 大阪府立公衆衛生研究所

*² 大阪府

*³ 北海道大学

大型建築物内給湯水からの培養及び培養不能レジオネラ属菌の検出

LAMP 法を用いた浴槽水からのレジオネラ属菌検出
時における反応阻害確認の必要性

枝川亜希子*¹, 土井 均*¹, 木村明生*¹, 田中榮次*¹
肥塚利江*¹, 渡辺 功*¹

防菌防黴 37, 3-8 (2009)

LAMP 法を用いた浴槽水からのレジオネラ属菌検出時に、同時に反応阻害確認を行うことで試料中の反応阻害物質の有無及びその発生頻度を検討するとともに、LAMP 法実施に際しての反応阻害確認の必要性について検討した。その結果、浴槽水の 5.6%で反応阻害が認められ、偽陰性となる可能性があることが明らかになった。そのため、LAMP 法によるレジオネラ属菌検出時には、同時に反応阻害確認を行う必要性が認められた。

コンビニエンスストア設置浄化槽の水質改善手法
—嫌気ろ床接触ばっ気方式の事例—

奥村早代子*¹, 中野仁*¹, 山本康次*¹, 坂部憲一*²,
木曾祥秋*³

用水と廃水 50, 768-773 (2008)

コンビニエンスストアに設置された浄化槽には、所期の機能が発揮されていないものが多く見られる。このような浄化槽として、嫌気ろ床接触ばっ気方式の浄化槽 2 施設 (A, B) を対象に、流入負荷の調査と改善対策について検討を行った。一般開放されているトイレの排水や毎日廃棄されるおでん汁の負荷だけで設計値と同程度と計算され、水道使用量から推定した平均流入 BOD は 230mg/L と 360mg/L となり、流入 BOD 負荷が高いことが水質悪化の一因と考えられた。改善対策として、ブロワ吐出量の増加と循環水量の調整を行い、処理機能の改善効果について清掃後 1 年間の処理状況の調査を行った。A 施設は改善前の処理水 BOD の平均値は 66 mg/L であったが、改善後で清掃実施後の約 8 ヶ月間は平均 BOD が 14 mg/L と改善された。しかし、それ以後は汚泥蓄積により処理機能が低下した。B 施設は改善前の処理水 BOD の平均値が 123 mg/L であったが、改善後は処理水質の安定性には欠けるものの、1 年間の BOD 平均値は対策前の 1/3 程度に低減した。このような方法に加えて清掃間隔を適正にすることにより、安定した処理性能を維持できることが示された。

*¹ 大阪府立公衆衛生研究所

*¹ 大阪府立公衆衛生研究所 環境水質課

*² 大阪府健康福祉部 環境衛生課

*³ 豊橋技術科学大学 エコロジー工学系

Perfluorooctanesulfonate and Perfluorooctanoate in Raw
and Treated Tap Water from Osaka, Japan

S. TAKAGI^{*1}, F. ADACHI^{*1}, K. MIYANO^{*1},
Y. KOIZUMI^{*1}, H. TANAKA^{*1}, M. MIMURA^{*1},
I. WATANABE^{*1}, S. TANABE^{*2} and K. KANNAN^{*3}

Chemosphere, **72**, 1409-1412 (2008)

パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) およびパーフルオロオクタン酸 (PFOA) などの有機フッ素化合物 (PFCs) は、環境、生物およびヒトなどに広く存在しており、新しい汚染物質として認識されている。日本の水環境中からも PFOS と PFOA は検出されているが、水道水中における状況は明らかとはなっていない。そこで、我々は大阪府内の 14 の浄水場における原水・浄水中の PFOS と PFOA を夏季と冬季に調査を行った。その結果、全ての原水試料から PFOS と PFOA が検出された。検出濃度範囲は PFOS が 0.26~22 ng/L、PFOA が 5.2~92 ng/L であった。大阪府内の原水中の PFOS は他の日本の地域と同程度であったが、PFOA は他の地域より高かった。浄水中における PFOS の検出濃度範囲は 0.16~22 ng/L で、PFOA の検出濃度範囲は 2.3~84 ng/L であった。原水と浄水中の PFCs には正の相関があった。したがって、現在の浄水処理による除去効率は低いと考えられた。USEPA のアクションレベルと比較すると今回浄水中に検出された PFOA による健康への影響は低いものと考えられた。

Mapping the Risk of Mesothelioma Due to Neighborhood
Asbestos Exposure

N. KURUMATANI^{*1} and S. KUMAGAI^{*2}

Am J Respir Crit Care Med, **178**, 624-629 (2008)

石綿産業の周辺住民の中皮腫死亡リスクに関する知見は少ない。この研究では、尼崎市の旧石綿管製造工場の周辺住民における中皮腫死亡リスクの大きさを気中石綿の濃度レベル別に検討した。この工場は 1957 年から 1975 年まで、青石綿と白石綿を用いて石綿管を製造していた。我々は、当時、この工場の周辺に居住していた住民の中で中皮腫により死亡したものの 162 人について、職業歴、居住歴、病歴、死亡状況などに関する詳細な調査を行い、1995 年から 2006 年までに死亡した、職業性石綿曝露の経験のないもの 73 人 (男性 35 人、女性 38 人) を確定した。そして、これらの観察値を基に、日本人を標準集団とした標準化死亡比を算出した。その結果、工場を中心から 300m 以内に居住していた住民の中皮腫の標準化死亡比は男性 13.9 (95%信頼区間: 5.6-28.7) および女性 41.1 (同: 15.2-90.1) と非常に高いことが確認された。さらに、調査区域を相対的な気中石綿濃度により 5 つの地域に分け、各地域の中皮腫の標準化死亡比を算出した結果、石綿濃度と中皮腫死亡率の間に男女とも直線関係が確認された。また、中皮腫死亡率が上昇していた地域は工場から風下方向に 2,200m に達していることもわかった。このように、石綿の周辺曝露は住民に重大なリスクを及ぼすことが示された。

*1 大阪府立公衆衛生研究所

*2 愛媛大学 沿岸環境科学研究センター

*3 ニューヨーク州保健局

大阪府内水道原水および浄水中における PFOS と PFOA について

*1 奈良県立医科大学 地域健康医学教室

*2 大阪府立公衆衛生研究所 生活環境部生活衛生課

石綿の近隣曝露による中皮腫死亡リスクのマッピング

Elution of Metals with Artificial Sweat/Saliva from
Inorganic Antimicrobials/Processed Cloths and Evaluation
of Antimicrobial Activity of Cloths

H. NAKASHIMA*¹, N. MIYANO*¹
and T. TAKATUKA*²

Journal of Health Science, **54**(4), 390-399 (2008)

無機系抗菌剤の安全性評価のために、金属ゼオライト (Ag, Cu, Zn, Cr) を作製し、それら抗菌剤と銀系抗菌剤 AG300 を付着させた標準加工布を作製した。作製した抗菌剤及び加工布を用いて、人工汗・唾液での金属溶出実験を行った。また、市販製品中の高濃度金属検出部位に対しても同様の溶出実験を行った。標準加工布及び市販製品ともに Cu、Zn の溶出量が多かった。Ag の溶出は標準加工布、市販製品ともに少なかった。また、Cr の溶出は殆ど見られなかった。さらに、作製した標準加工布の抗菌力評価を、統一試験法 (JIS1902) で評価した。Cu 及び Ag (Agゼオライト、AG300) 加工布の抗菌力が、*S.aureus* 及び *K.pneumoniae* に対して高かった。*S.aureus* に対しては Zn 加工布も抗菌効果を示した。

Use of a Closed System Device to Reduce Occupational
Contamination and Exposure to Antineoplastic Drugs in the
Hospital Work Environment

J. YOSHIDA*¹, G. TEI*², C. MOCHIZUKI*², Y. MASU*²,
S. KODA*³ and S. KUMAGAI*¹

Annals of Occupational Hygiene, **53**, 153-160 (2009)

抗がん剤調製室で抗がん剤のミキシング業務を行う薬剤師の抗がん剤による曝露が懸念されている。本研究の目的は、抗がん剤調製室における抗がん剤汚染実態を明らかにし、さらに具体的な対策を提案するために、海外で使用されている閉鎖系注入器具の有用性を検証することである。病院薬局内抗がん剤調製室において、従来のルアーロックシリンジを用いた調製方法と閉鎖系注入器具を用いた調製方法との間で、職場環境中シクロホスファミド (以下、CPA) 汚染状況および抗がん剤を調製する薬剤師の CPA 曝露状況を比較した。その結果、調製室内の CPA 環境汚染指標および薬剤師の CPA 曝露指標いずれにおいても閉鎖系器具を用いることにより有意に減少したことから、閉鎖系注入器具は抗がん剤の職場環境汚染および職業的曝露の予防に有効であることが明らかになった。

*¹ 大阪府立公衆衛生研究所

*² 大阪府立産業技術総合研究所

人工汗・唾液による無機系抗菌剤及び加工布からの金属溶出

*¹ 大阪府立公衆衛生研究所

*² 大阪府立成人病センター薬局

*³ 独立行政法人労働安全衛生総合研究所

抗がん剤調製室におけるシクロホスファミド汚染に対する閉鎖系注入器具の有用性評価

**BULLETIN OF
OSAKA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH**

CONTENTS

RESEARCH REPORTS

West Nile Virus Surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2008 Report) I. AOYAMA, T. YUMISASHI, K. NAKATA, I. SATO, Y. SATO, T. KURAMOCHI, Y. UEZAWA, T. KASE and K. TAKAHASHI	1
Improvement of Official Method for Residue Analysis of Anthelmintic (Triclabendazole) in Bovine Muscle M. FUJITA, H. NAGAYOSHI and H. OBANA	9
Multiresidue Method for the Determination of Sulfonamides in Livestock products and Seafood Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry M. FUJITA, K. KAKIMOTO, T. YAMAGUCHI and H. OBANA	13
Studies on a Small-Scale Method for the Rapid Determination of Nitrite Ion in Foods C. NOMURA, M. YOSHIMITSU, K. AKUTSU and H. OBANA	17
Surveillance of Persistent Organic Pollutants in Human Breast Milk (19 th report) -Development of POPs simplified assay and end of continuous research- Y. KONISHI , K. KAKIMOTO, K. AKUTSU and H. OBANA	21
Gathering of GC-MS and HPLC Data on Illegal Drug Test Y. SAWABE, A. NAKAMURA and S. TAGUCHI	27
Determination of Antiseptics in Cosmetics by HPLC Y. SAWABE and M. KAWAGUCHI	33
Yohimbine Found in a Dietary Supplement with Suggestive Expression for Weight Reduction A. NAKAMURA, M. KAWAGUCHI, K. KAJIMURA, S. TAGUCHI and S. IWAGAMI	37
Pyrethroid Pesticides in Citrus Unshiu Peel T. TAGAMI, K. KAJIMURA, K. YAMASAKI and S. TAGUCHI	43
Effect of Surfactants on Skin Microbial Flora N. MIYANO	47
Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2008 Report) M. MIMURA, T. HIZUKA and I. WATANABE	53
The Follow-up of the Lead-workers for Long Terms K. MIYAJIMA, T. YOSHIDA, J. YOSHIDA and S. KUMAGAI	61
Automated Determination of Free Residual Chlorine in Water H. TANAKA, F. ADACHI and S. TAKAGI	67

An Analytical Survey of Aromatic Primary Amines in Dye Components from Textile Products for Infant and Baby (Clothes and Toys) H. NAKASHIMA and M. KANIWA.....	75
The Examination for the Acquisition of Precise Water Analyses in Osaka Prefecture —Anionic Surfactants (2006)— K. MIYANO, Y. KOIZUMI, S. TAKAGI, F. ADACHI and I. WATANABE.....	81
ABSTRACTS	
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> Infection - Disease and Prevention (in Japanese) K. SETO.....	89
Progress of Molecular Epidemiology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and Its Application for the Prevention of Tuberculosis. 3. the Advantage of Molecular Epidemiology of <i>M.tuberculosis</i> to the Tuberculosis Control in Osaka A. TAMARU.....	89
Tuberculosis-Preventive Chemotherapy- (in Japanese) Y. SUZUKI, T. NAKAJIMA, Y. FUKUSHIMA, A.. TAMARU, T. MATUBA.....	90
Effects of Sample Preparation and Bacterial Concentration on <i>Salmonella enterica</i> Detection in Poultry Meat Using Culture Methods and PCR Assaying of Preenrichment Broths M. KANKI, J. SAKATA, M. TAGUCHI, Y. KUMEDA, M. ISHIBASHI, T. KAWAI, K. KAWATSU, W. YAMAZAKI, K. INOUE, M. MIYAHARA.....	90
Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Simple Detection of <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Campylobacter coli</i> W. YAMAZAKI, M. TAGUCHI, M. ISHIBASHI, M. KITAZATO, M. NUKINA, N. MISAWA, K. INOUE.....	91
Sensitive and Rapid Detection of Cholera Toxin-Producing <i>Vibrio cholerae</i> Using a Loop-Mediated Isothermal W. YAMAZAKI, K. SETO, M. TAGUCHI, M. ISHIBASHI, K. INOUE.....	91
Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Sensitive and Rapid Detection of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> W. YAMAZAKI, M. ISHIBASHI, R. KAWAHARA, K. INOUE.....	92
Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Conventional Culture Methods for Detection of <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Campylobacter coli</i> in Naturally Contaminated Chicken Meat Samples W. YAMAZAKI, M. TAGUCHI, T. KAWAI, K. KAWATSU, J. SAKATA, K. INOUE, N. MISAWA.....	92
Imported Chikungunya Fever from India to Japan : Case Report. (in Japanese) I. AOYAMA, K. UNO, T. YUMISASHI, T. KASE, K. TAKAHASHI, T. GOTO, T. KATAYAMA, K. NAKAMURA, M. SHIOMI, N. NISHINA, T. SAITO, T. MORI, F. ANASE, H. YOSHIDA, T. TAKASAKI, M. HAYASHI and I. KURANE.....	93

Epidemiological Study of Hepatitis E Virus among Wild Sika Deer, <i>Cervus nippon</i> , in Nara Park (in Japanese) K. HAGIWARA, M. TSUJI, T. KAWABUCHI, H. TORII, T. KOBAYASHI, M. ASAKAWA and T. ISHIHARA.....	93
An Outbreak of Measles Classified as Genotype H1 in 2008 in Osaka Prefecture T. KURATA, H. MIYAGAWA, E. FURUTANI, T. KASE and K. TAKAHASHI.....	94
An Outbreak of Measles Classified as Genotype H1 in Osaka Prefecture (in Japanese) T. KURATA, H. MIYAGAWA, E. FURUTANI, T. KASE and K. TAKAHASHI.....	94
Assessment of Simple and Easy Norovirus Detection Kit using An Immunochromatography Based Method (in Japanese) K. YAMAZAKI, N. SAKON, T. IBUKI and T. TATSUDA.....	95
A Study on Rapid Correspondence for Outbreaks of Viral Infection (in Japanese) K. YAMAZAKI.....	95
Prevalence of Enterovirus in Osaka, Japan, between April and September 2008 K. YAMAZAKI, N. SAKON, K. NAKATA and T. KASE.....	96
Influence of V108I Mutation Detected in A Treatment-naive HIV-1-infected Patient on the Development of Resistance to Efavirenz (in Japanese) H. MORI, Y. KOJIMA, T. KAWAHATA and T. GOTO.....	96
Molecular Survey of <i>Babesia microti</i> , <i>Ehrlichia</i> Species and <i>Candidatus neoehrlichia mikurensis</i> in Wild Rodents from Shimane Prefecture, Japan. K. TABARA, S. ARAI, T. KAWABUCHI, A. ITAGAKI, C. ISHIHARA, H. SATOH, N. OKABE and M. TSUJI.....	97
<i>Babesia microti</i> -Group Parasites Compared Phylogenetically by Complete Sequencing of CCT η Gene in 36 Isolates R. NAKAJIMA, M. TSUJI, K. ODA, A. ZAMATO-NIIKURA, Q. WEI, T. KURATA-KAWABUCHI, A. NISHIDA and C. ISHIHAWA.....	97
We Help Prevention "The Encyclopedia of the Infection" We Will Look in the Invisible World (in Japanese) THE KITASATO INSTITUTE, I. AOYAMA, A. KIMURA, H. NISHIMURA and T. YUMISASHI.....	98
Determination of Sulfonamides in Livestock Products and Seafoods by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry using Glass Bead Homogenization Determination of Sulfonamides in Livestock Products and Seafoods by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry using Glass Bead Homogenization M. FUJITA, S. TAGUCHI and H. OBANA.....	98
Determination of Pesticides in Chinese Dumplings Using Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry Y. OKAMOTO, S. TAKATORI, Y. KITAGAWA, M. OKIHASHI, N. FUKUI, H. MURATA, T. SUMIMOTO, Y. TANAKA and H. OBANA.....	99

Analysis of 2-alkylcyclobutanone and detection of the irradiated food H. OBANA.....	99
Determination of Taurine in Energy Drinks by HPLC Using a Pre-column Derivative Y. SAWABE, T. TAGAMI and K. YAMASAKI.....	100
The Release of Formaldehyde upon Decomposition of 2-Bromo-2-nitropropan-1,3-diol(Bronopol) K. KAJIMURA, T. TAGAMI, T. YAMAMOTO and S. IWAGAMI.....	100
Simultaneous Measurement of Diazolidinyl Urea, Urea, and Allantoin in Cosmetic Samples by Hydrophilic Interaction Chromatography T. DOI, K. KAJIMURA, S. TAKATORI, N. FUKUI, S. TAGUCHI and S. IWAGAMI	101
Determination of Organochlorine Pesticides in Glycyrrhizae Radix T. TAGAMI, K. KAJIMURA, K. YAMASAKI, Y. SAWABE, S. TAGUCHI and S. IWAGAMI.....	101
Determination of Pyrethroid Pesticides in Cinnamomi Cortex T. TAGAMI, K. KAJIMURA, C. NOMURA, S. TAGUCHI and S. IWAGAMI.....	102
Detection of Culturable and Nonculturable <i>Legionella</i> species from Hot Water Systems of Public Buildings in Japan A. EDAGAWA, A. KIMURA, H. DOI, H. TANAKA, K. TOMIOKA, K. SAKABE, C. NAKAJIMA and Y. SUZUKI.....	102
Investigation of Inhibitors in the LAMP Reaction for the Detection of <i>Legionella</i> spp. From Bathwater Samples (in Japanese) A. EDAGAWA, H. DOI, A. KIMURA, H. TANAKA, T. HIZUKA and I. WATANABE.....	103
Improvement of Water Quality of Johkasou Installed in Convenience Store -- Investigation Report of Anaerobic Filter-Contact Aeration Process-- (in Japanese) S. OKUMURA, H. NAKANO, Y. YAMAMOTO, K. SAKABE and Y. KISO.....	103
Perfluorooctanesulfonate and Perfluorooctanoate in Raw and Treated Tap Water from Osaka, Japan S. TAKAGI, F. ADACHI, K. MIYANO, Y. KOIZUMI, H. TANAKA, M. MIMURA, I. WATANABE, S. TANABE and K. KANNAN.....	104
Mapping the Risk of Mesothelioma Due to Neighborhood Asbestos Exposure N. KURUMATANI and S. KUMAGAI.....	104
Elution of Metals with Artificial Sweat/Saliva from Inorganic Antimicrobials/Processed Cloths and Evaluation of Antimicrobial Activity of Cloths H. NAKASHIMA, N. MIYANO and T. TAKATUKA.....	105
Use of a Closed System Device to Reduce Occupational Contamination and Exposure to Antineoplastic Drugs in the Hospital Work Environment J. YOSHIDA, G. TEI, C. MOCHIZUKI, Y. MASU, S. KODA and S. KUMAGAI.....	105

大阪府立公衆衛生研究所研究報告発行要領

昭和 40 年 5 月 1 日

(総 則)

1. この発行要領は当研究所研究管理要領に規定する研究報告書（以下「所報」という。）の発行に関して必要なことを定めたものである。

(編集 発行)

2. 所報は当所の主たる業績報告書であって研究報告等はすべてこれに掲載し、編集するものとする。
3. 所報の発行者および編集責任者は所長とする。
4. 所報の内容は研究報告、所外誌に掲載された論文の抄録その他で、原則として和文とする。
5. 掲載の資格として、当所職員の業績によるものでなければならない。ただし、当所職員が主担者となっている場合、所外者との共著はこの限りではない。
6. 所報は原則として年 1 回 10 月に発行するものとする。なお原稿は 5 月末日までに編集委員会に提出しなければならない。

(編集委員会)

7. 所報は企画、編集するために所報編集委員会（以下「委員会」という。）をおく。委員会の委員は各課 1 名の職員によって構成する。委員長は所長が指名する。
8. 所報は部課長および所内の査読者により審査され、所長により採択の決定を受けなければ掲載することができない。
9. 委員会は委員長が召集する。ただし、3 分の 1 以上の委員からの要請があった場合は委員会を開催しなければならない。

(様 式)

10. 所報及び原稿の様式については別に定める「投稿規定」による。

(そ の 他)

11. 「発行要領」及び「投稿規定」に定められていない事項についてはそのつど委員会で協議する。

(附 則)

この要領は、昭和 50 年 4 月 5 日から適用する。

(附 則)

この要領は、平成 16 年 10 月 1 日から適用する。

(附 則)

この要領は、平成 18 年 5 月 1 日から適用する。

「大阪府立公衆衛生研究所研究報告」

投稿規定

(平成20年8月改正)

1. 構成

研究報告は原則として、表題、要約およびキーワード、はしがき、方法（実験方法または調査方法など）、結果、考察および結論、謝辞、文献の順に記載し、通し番号を付けずに記述する。ただし、抄録は表題および本文より構成し、本文は図表を含めて原稿用紙1枚以内とする。

2. 表題

- A 2行以上の表題は原則として逆三角形とする。
- B サブタイトルは次のとおりとする。
 - (1) 行をかえ、前後にハイフンをつける。
 - (2) サブタイトルが二つ以上ある場合は、I、II…とする。
- C シリーズの表題は表題の後に（第1報）、（第2報）とする。
- D 論文の発表機関名および発表年次（西暦年号）は表題またはサブタイトルの右肩に*印をつけ、第1ページの脚注に記す。
- E 著者名は表題の右下（中央より右）に記す。
- F 著者の所属は著者名の右肩に*印をつけ、第1ページの脚注に記す（2名以上の場合、著者名の区切りにコンマをいれない）。ただし、脚注が2つ以上になる場合には、2. Dでつけた脚注と区別せずに最初に出現したもののから順次一連の通し番号をつけて*1、*2、*3…の順に列記する。所属が単一の場合は*とする。（*1とはしない）。
- G 論文には必ず英文表題（名詞、代名詞、形容詞の頭文字は大文字）およびローマ字の著者名（byに続けてフルネーム、姓は全部大文字、名は頭文字のみ大文字）を第1ページの脚注に記す。
- H 原稿の第1ページ（表紙）は表題、著者名および第1ページの脚注（発表機関名、発表年次、著者の所属機関名、英文表題、ローマ字著者名）のみとし、本文は第3ページより書きはじめる。

3. 要約およびキーワード

- A 要約とキーワードは第2ページに記載する。
- B 要約は日本文で字数200～300、または、英文で所定の

原稿用紙で10～20行とする。

- C 要約を英文で記載するときは、日本語訳を別紙（A4判）に書いて、投稿原稿に添付する。
- D キーワードは日本語および英語で併記する。選定数はそれぞれ3個以上5個以内とする。

4. 文体・文字

- A 現代かなづかい、新送りがな、常用漢字を使用して、できるだけわかりやすい表現の口語体を用い、横書きとする。
- B 専門用語はなるべく文部省編「学術用語集」に準拠し、原語の使用はできるだけさける。
例：paper chromatography、glucoseなどは、ペーパークロマトグラフィー、ブドウ糖と書く。
- C 酵素名その他は国際科学連合酵素委員会報告「酵素名、酵素反応記号一覧（田宮信雄訳、共立出版）」による。
- D 動・植物名はカタカナ、学名はイタリック体を用いる。
- E 本文中では物質名を化学式であらわさない。ただし、反応式であらわす部分は化学式を用いてもよい。
例： CH_3COOH 、 NaOH は酢酸、水酸化ナトリウム（ NaOH 、 EtOH などは不可）
- F 物質名は原則として略号は用いないが、記載頻度の多い場合、または、一般に使用されている場合は使用してもよい。略号が多い場合は、まとめて最初のページの脚注に略号表を記す。
- G 人名、地名は原語を用いる。
- H 読み誤りやすい文字はとくに注意して明瞭に書き、必要な場合は欄外に読み方を鉛筆書きで示す。大文字、小文字の区別を明瞭に書くこと。
- I 字体の指定は朱書きとする。
 - (1) ゴシック体は下に朱で実線を引く。
例：結果
 - (2) イタリック体はその旨を欄外に朱書きする。
 - (3) 英文字と誤りやすいギリシャ文字およびドイツ文字はその旨を欄外に朱書きする。
例： α 、アルファ(キ)、 β 、ベーター(キ)

5. 区画および行のとりかた

- A 本文の句読点は、と。を用いる。（、. は用いない）。

- B 改行毎に1コマあける。
- C 英文字・数字は2文字で原稿用紙1コマ、1字のみのときは、1文字1コマとする。
- D 大みだし(実験方法、結果等)は原稿用紙の上下1行ずつあけ、行の中央に書く。中みだしは、上1行のみをあけ、1コマあけて書きはじめる。小みだしは、行をあけずに行をかえるだけで1コマあけて書きはじめ、小みだしのつぎに印を入れて本文を書きはじめる。大、中、小のみだしの文字はすべてゴシック体とする。
- E 式は必ず改行して書く。

6. 数字・数式・単位・記号

- A 数字は原則としてアラビア数字を用いる。
例：図1、表2、3g
- B 文章中に数式を挿入するときは、 a/b 、 $(a+b) / (c+d)$ とし、文章中でないものは、以下のように表す。
a $\frac{(a+b)}{c+d}$
b、 $(c+d)$
- C 単位は原則としてCGS単位を用い、温度は摂氏(または絶対温度)を用いる。必要に応じてMKSA単位を用いてもよい。
- D 記号は国際的に慣用されているものを用いる。
例：MpH, %, m, cm, mm, g, mg, μ , μ g, ℓ , M ℓ , Rf を用いる。その他の特殊な記号は脚注に説明を加える。
- E 平成4年5月に計量法が改正されたことにより、国際単位系(SI単位系)への移行が公布され平成5年11月から施行された。猶予期間は平成11年9月30日。従ってN(規定度)M(mol)の記載は認められず、mol/ ℓ とする。

7. 文献

- A 参考文献は、引用箇所の右肩に通し番号を、右側片カッコを付けて小さく書き、本文の末尾に引用番号順に列記する。
- B 欧文雑誌の略号は、Chemical Abstract, 50(No. 23)1956による。
- C 文献の句読点は、 \cdot と \cdot を用いる。
- D 原則として著者名は省略しない。
- E same author、ibid、投稿中、未発表、私信による等の用語を用いる。

- F 引用形式は原則として次の要領による。

1) 雑誌の場合

著者名、表題、雑誌名、巻数、開始ページ～最終ページ、(発行年)の順に記載する。ただし、通巻ページのない場合のみ巻数の後に(号数)を挿入する。雑誌の巻数はゴシック体で記す(朱の下線で指定)。欧文雑誌名はイタリック体で記す(その旨を朱書き)。

(例)

イ) Conden, R., Gordon, A. H. and Martin, A. P. :
Determination of cholesterol in blood,
Biochem. J., 38, 224~330 (1994)

ロ) 大谷 璋, 石橋富和: 車線変更の予告効果に関する研究, 大阪府立公衆衛生研究所報, 労働衛生編, 第3号, 21~30 (1974)

ハ) 小林義隆, 白井 正: PCBの代謝に関する研究, 食品化学, 19, 215~221 (1970)

2) 図書の場合

著者名、図書名、版数または巻数、ページ数、発行所、発行地、発行年の順に記載する。図書中の特定部分引用したときは、その引用した箇所のページ数を記入するが、全体を引用したときはページ数を記入しない。

(例)

イ) 赤堀四郎: アミノ酸及び蛋白質, p. 158, 共立出版, 東京 (1964)

ロ) Kiver, M. S. : Color Television Fundamentals,
McGrawHill Book Co., New York (1964)

3) 双書、シリーズものなどの場合

著者名、一部分の表題、図書名(編者名)、版または巻数、開始ページ～最終ページ、発行所、発行地(発行年)の順に記載する。

(例)

イ) 佐橋佳一, 森高次郎: 生体成分, 生化学講座(赤堀四郎ほか), 2, p. 1~10, 共立出版, 東京 (1958)

ロ) Brown G. B. and Roll, P. M. : The Nucleic Acid
(ed. by Chargoff, E. and Davidson, J. N.), 2,
p. 341~351, Academic Press Inc., New York (1955)

4) 講演の場合

(例)

イ) Bonner, D. M. : 第6回核酸シンポジウム要旨集(大阪, 1956)

8. 謝辞

論文の末尾、文献の前に上1行あけ、1コマあけて書く。

9. 脚注

- A 本文中の脚注は、挿入箇所の右肩に注1)、注2) …とし、用紙の下部に記述する。ページがかわっても通し番号とする。脚注と本文との境界に横線を引く。脚注の文字はMS 明朝8ポイントを用いる。
- B 図表の注は図表のすぐ下に記入し、記号はa)、b) …として列記する。

10. 図・表・写真

- A 図表はそれぞれ一連番号をつけ、本文中の引用は番号による。
- B 図表は図1、表1などとする(第1図、第1表などとはしない)。
- C 写真は図とおなじに扱う。印刷物からの複写はしない。カラー写真は採用しない。
- D 図は要約が英文の場合は図表の説明を英文で、要約が日本文の場合は図表の説明を日本文または英文のいずれか一方で統一する。
- E 図表は本文中に挿入する。
- F 表のタイトルおよび説明は表の中央上部に記載する。

11. 用紙

本文は白紙(A4判)を用い、1枚24×24=576字詰めとする。

12. 校正

原則として著者が校正を行い、編集委員が確認する。校正段階で内容の増加、行数の増加は認めない。

13. 著作権

本「研究報告」に掲載された論文等(抄録を含む)の著作権は、公衆衛生研究所に帰属する。ただし、論文等の内容については著者が責任を負う。

14. その他

- A イタリック体に統一するもの
欧文雑誌名、学名、in vitro, in vivo, ibid
- B ゴシック体に統一するもの

大・中・小の各みだし文字、雑誌の巻数

[その他了解事項]

- 1) 「研究報告」表紙部分と第1頁の右肩上部に表記されている発行年(和号)に西暦年号を併記する。
- 2) 英文等の欧文による抄録を収載する場合には、脚注に和文による表題を記す。
- 3) 英文目次の脚注に英文による公衆衛生研究所在地名(住所)を付記する。

(以上昭和59年5月)

- 4) 表紙右肩部にISSN(国際標準逐次刊行物番号)を付記する。

(以上昭和59年8月)

- 5) 投稿原稿は原則として、表題、要約、キーワード、はしがき、方法(実験方法または調査方法など)、結果、考察および結論、謝辞、文献の順に記載するが、下記の2点についてとくに留意する。

- i) はしがきおよび謝辞のみだしは記載しない。
- ii) 考察および結論は、考察と結論に分けて記載してもよいし、考察のみを記載して結論を省略してもよい。

(以上昭和61年5月)

- 6) 英文抄録、英文目次の著者の名前(first, second name)は大文字でイニシャルのみとし、姓(last name)は大文字で記載する。

(以上平成11年5月)

- 7) 投稿原稿の表はExcelで作成し、印刷した表(タテ、ヨコの長さを指定)とともにフロッピーディスクを提出する。

(以上平成13年5月)

- 8) 投稿原稿とともに本文をワード形式で保存したフロッピーディスクを提出する。

- 9) 別刷は100部以内とする。

(以上平成16年8月)

平成21年度（2009）所報編集

委員	：	久米田裕子（委員長）	立脇富士男	木村明生	神吉政史
		山崎謙治	吉光真人	梶月由香	味村真弓
査読協力者	：	赤阪 進	阿久津和彦	安達史恵	起橋雅浩
		尾花裕孝	北川陽子	久米田裕子	小泉義彦
		高取 聡	田口修三	田中榮次	

大阪府立公衆衛生研究所 研究報告
第47号

発布年月日	平成21年10月
編集兼	大阪府立公衆衛生研究所
発行者	所長 織田 肇
〒537-0025	大阪市東成区中道1丁目3番69号
	TEL 06-6972-1321(代)
	FAX 06-6972-2393
