

大阪府立公衆衛生研究所 研究報告

平成24年



BULLETIN
OF
OSAKA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.50(2012)

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（2011年度）	青 山 幾 子 熊 井 優 子 松 井 陽 子 平 田 武 志 高 橋 和 郎	弓 指 孝 博 梯 和 代 倉 持 隆 加 瀬 哲 男	1
大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析（2011年度）	中 田 恵 子 左 近 直 美	山 崎 謙 治 加 瀬 哲 男	8
ピーナッツあるいはゴマを含む食品中TBHQ分析法の検討	野 村 千 枝 清 田 恭 平 阿 久 津 和 彦	栗 津 薫 吉 光 真 人	14
「いわゆる健康食品」に含まれる勃起不全治療効果を示す医薬品成分の分析	武 田 章 弘 田 上 貴 臣 梶 月 由 香 沢 辺 善 之	浅 田 安 紀 子 土 井 崇 広 梶 村 計 志	19
固相抽出法とHPLCを用いたアセトアミノフェン及びその関連薬物の分析	岡 村 俊 男		24
電子イオン化法を用いたGC/MSによる漢方製剤中のピレスロイド系農薬を対象とした簡便・迅速分析	田 上 貴 臣 浅 田 安 紀 子 土 井 崇 広 沢 辺 善 之	武 田 章 弘 青 山 愛 倫 梶 村 計 志	26
大阪府における環境および食品中放射能調査（平成23年度報告）	肥 塚 利 江 大 山 正 幸	東 恵 美 子 足 立 伸 一	30
マウスに対するラウレス硫酸ナトリウム吸入の生態影響について	東 恵 美 子	中 島 孝 江	38
欧州規格EN71により乳幼児用繊維製品に規制されている着色剤のLC/TOF-MS及びLC/MS/MSによる分析調査	中 島 晴 信 山 崎 勝 弘	味 村 真 弓 鹿 庭 正 昭	45

—抄録—

シプロフロキサシン耐性結核菌臨床分離株のキノロン系薬剤に対する感受性：DNAジャイレース遺伝子変異の薬剤耐性に対する役割（英文）	鈴木 定彦 田丸 亜貴 松葉 隆司	中島 千恵 金 玄 斉 藤 肇	56
マレーシアからタイへ輸入された牛肉のEHEC 0157汚染実態調査（英文）	P. Sukhumungoon N. Ingviya 岩出 義人 R. Son V. Vuddhakul	中口 義次 J. Pradutkanchana 勢戸 和子 西 渕 光 昭	56
<i>Shigella boydii</i> 10と同一のO抗原を保有する志賀毒素産生性大腸菌（英文）	井口 純 勢戸 和子 EHEC研究グループ	伊豫田 淳真 大西 真	57
大腸菌における0157抗原合成関連遺伝子群の水平伝播（英文） ...	井口 純 勢戸 和子 小椋 義俊 大澤 佳代	白井 洋紀 大岡 唯祐 林 哲也 大澤 朗	57
下痢原性大腸菌の検査	勢戸 和子		58
Diffuse outbreakが疑われた <i>Salmonella enterica</i> serotype Montevideo事例の分子疫学解析（英文）	原田 哲也 神吉 政史 田口 真澄	坂田 淳子 勢戸 和子 久米田 裕子	58
エンテロウイルス感染症	山崎 謙治		59
感染症を引き起す微生物の基礎知識 ノロウイルスによる食中毒・感染症	左近 直美	西尾 治	59
注目されるウイルス感染症と制御対策 はじめに	加瀬 哲男		60
VPD(vaccine preventable diseases) のサーベイランス	加瀬 哲男		60
注目されるウイルス感染症と制御対策 新型インフルエンザについて	森川 佐依子		61
大阪府で検出されたアデノウイルス54型の遺伝子解析（英文） ...	廣井 聡 西村 哲哉 森川 佐依子	小池 尚子 高橋 和郎 加瀬 哲男	61

ダニによる病気の現状と注意点	弓 指 孝 博	62	
注目されるウイルス感染症と制御対策 アルボウイルス感染症	弓 指 孝 博	62	
日本脳炎の現状と予防接種	青 山 幾 子	63	
CCT η 遺伝子のイントロン配列はヒト病原体を含む遺伝的近縁種群である <i>Babesia microti</i> 群の4つの系統間の多様な進化史を示す (英文)	藤 沢 幸 平 陳 内 理 生 新倉(座本)綾 新 井 智	中 嶋 瑠 衣 平 田 晴 之 倉田(川淵)貴子 石 原 智 明	63
非硫酸化デキストランとポリ-L-リジンを結合することにより生じる新規抗HIV-1活性 (英文)	中 村 公 亮 森 治 代 A. HOQUE 狩 野 文 枝 棚 元 憲 一 川 崎 ナ ナ 小 川 温 子	大 槻 貴 博 星 野 洪 郎 大 上 厚 志 坂 上 ひ ろ み 牛 島 廣 治 穂 山 浩	64
注目されるウイルス感染症と制御対策 8 エイズ (AIDS)	森 治 代	64	
HIV対策—大阪府の現状と公衛研の取り組み	川 畑 拓 也	65	
HIV/AIDS感染者・患者の多い地域における公衆衛生専門機関の現状と課題	川 畑 拓 也 森 治 代	小 島 洋 子	65
ネコカリシウイルス、ヒトインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、イヌジステンパーウイルス、ヒトヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルス、イヌアデノウイルスおよびイヌパルボウイルスに対する二酸化塩素および次亜塩素酸ナトリウムの抗ウイルス活性の評価 (英文)	實 方 剛 三 浦 孝 典 李 哲 成 荒 木 和 子 川 畑 拓 也	福 田 俊 昭 森 野 博 文 前 田 健 大 竹 徹 柴 田 高	66
カフェオイル-5, 6-アンヒドロキナ酸誘導体の合成、抗HIVおよび抗酸化活性 (英文)	馬 超 美 服 部 征 雄 L. WANG	川 畑 拓 也 大 竹 徹 M. DANESHTALAB	66
性感染症サーベイランス結果の地方自治体による活用の評価と支援	中 瀬 克 己 堀 成 美 高 橋 裕 明 福 田 美 和 川 畑 拓 也	中 谷 友 樹 尾 本 由 美 子 山 内 昭 則 大 熊 和 行 白 井 千 香	67

	児玉とも江 大西真	山岸拓也	
タンデム固相抽出を用いた魚肉中ヒスタミン分析法の検討	栗津薫 山口瑞香	野村千枝 尾花裕孝	67
LC-MS/MSによる畜産物中のポリエーテル系抗生物質およびマクロライド系駆虫薬の一斉分析	山口瑞香 山口貴弘	柿本健作 尾花裕孝	68
体外受精に使用される培養液中のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)及びフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)の分析(英文)	高取聡 近藤文雄 中澤裕之	阿久津和彦 石井里枝 牧野恒久	68
ゴミシ中のシザンドリンおよびゴミシンAの分析	田上貴臣 伊藤美千穂 岡坂衛 酒井英二 高井善孝 中島健一 橋爪崇昭 本多義昭 山本豊	有本恵子 大住優子 金谷友成 嶋田康男 十倉佳代子 野口衛 久田陽一 守安正恭 横倉胤夫	69
クオタニウム-15及びその分解物の好気性細菌に対する殺菌活性に関する研究(英文)	梶村計志 浅田安紀子 田上貴臣	土井崇広 武田章弘	69
難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用されるラウリル硫酸ナトリウムの品質に関する研究(第1報)	梶村計志 四方田千佳子	川口正美	70
難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用されるラウリル硫酸ナトリウムの品質に関する研究(第2報)	梶村計志 四方田千佳子	川口正美	70
トラネキサム酸カプセルにおける溶出挙動の経時変化に関する検討	川口正美 田口修三	梶村計志	71
化粧品中とパッチテスト試料中におけるジアゾリジニル尿素の分解挙動の差について(英文)	土井崇広 田口修三	梶村計志	71
安全な抗がん剤調製のためのチェックリスト活用の提案	吉田仁 吉田俊明 熊谷信二	甲田茂樹 西田升三	72

国内民間分析機関によるシクロホスファミド拭き取り試験の包括的評価	濱 宏 仁 福 嶋 浩 一 橋 田 亨	杉 浦 伸 一 吉 田 仁	72
大阪府水道水質検査外部精度管理－蒸発残留物（平成21年度） －	田 中 榮 次 小 川 有 理 木 村 直 昭	安 達 史 恵 吉 田 直 志 足 立 伸 一	73
浄水処理過程におけるPFOSおよびPFOAの挙動について（英文） ...	高 木 総 吉 宮 野 啓 一 田 中 榮 次 田 辺 信 介	安 達 史 恵 小 泉 義 彦 渡 邊 功 K. Kannan	73
大阪府の水道における過塩素酸イオン濃度とその浄水処理による消長	高 木 総 吉 宮 野 啓 一 小 川 有 理 北 川 幹 也 足 立 伸 一	安 達 史 恵 吉 田 直 志 李 弁 子 関 口 陽 子 田 辺 信 介	74
本邦で初めて温泉水から <i>Legionella nagasakiensis</i> を検出した事例（英文）	古 畑 勝 則 宮 本 比 呂 志 吉 田 真 一	枝 川 亜 希 子 後 藤 慶 一 福 山 正 文	74
温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況および <i>L. pneumophila</i> の薬剤感受性（英文）	古 畑 勝 則 石 崎 直 人 福 山 正 文	枝 川 亜 希 子 原 元 宣	75
<i>Legionella</i> の低濃度オゾン水殺菌効果に及ぼす温度及びpHの影響 ..	中 室 克 彦 肥 塚 利 江	土 井 均 枝 川 亜 希 子	75
コンタクトレンズ消毒保存液マルチパーパスソリューションの <i>Acanthamoeba</i> に対する消毒効果	枝 川 亜 希 子 田 中 榮 次 楠 原 康 弘 宮 本 比 呂 志	木 村 明 生 土 井 均	76
マウス肺組織に対する亜硝酸曝露の影響（英文）	大 山 正 幸 安 達 修 一	岡 憲 司 竹 中 規 訓	76
二酸化窒素規制は亜硝酸規制に修正すべきか？（英文）	大 山 正 幸		77
ヒトモノサイト誘導マクロファージの活性酸素反応における大気粒子や大気粒子成分のモデル粒子の影響（英文）	大 山 正 幸 大 竹 徹 換 金 永 貴 亀 田 貴 之	赤 阪 進 二 森 永 謙 環 文 環 換 安 達 修 一	77

一般住民における有機リン系化合物および防虫剤の尿中代謝物の一斉分析法（英文）	吉田俊明	吉田仁	78
--	------	-----	----

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

(2011年度)

青山幾子^{*1} 弓指孝博^{*1} 熊井優子^{*2} 梯和代^{*3} 松井陽子^{*2}
倉持隆^{*4} 平田武志^{*5} 加瀬哲男^{*1} 高橋和郎^{*6}

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頭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。

2011年度は6月末から9月末にかけて府内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9種5605匹で、そのうちアカイエカ群(49.1%)とヒトスジシマカ(48.9%)が大部分を占め、他にコガタアカイエカ(1.9%)、シナハマダラカ(0.09%)、トウゴウヤブカ(0.04%)、キンパラナガハシカ(0.02%)、ヤマトヤブカ(0.02%)、カラツイエカ(0.02%)、キンイロヌマカ(0.02%)が捕集された。定点及び種類別の蚊369プールについてWNV遺伝子検査を実施したが、すべての検体においてWNVは検出されなかった。また、2011年度当所に搬入された死亡カラス(2頭)の脳を対象にWNV遺伝子検査を行ったが、WNV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

ウエストナイルウイルス(WNV)は、フラビウイルス科フラビウイルス属に属し、アルボウイルス(arthropod-borne virus: 節足動物によって媒介されるウイルス)の一つとされている。WNVは主に蚊を介してヒトに感染し、発熱疾患(ウエストナイル熱)や脳炎(ウエストナイル脳炎)を引き起こす原因となる。

このウイルスは自然界において蚊と鳥類の間で感染サイクルが維持されている。

ウエストナイル熱・脳炎は、従来アフリカ、ヨーロッパ、西アジア、中東を中心に散発的な流行がみられた感染症である¹⁾。しかし、1999年に米国で初めて発生して以来、北米での流行は毎年持続し、中南米へも拡大している²⁻⁵⁾。わが国では2005年に米国渡航者によるウエストナイル熱の輸入症例が初めて確認された⁶⁾。現在のところ、国内における感染報告事例はない。

わが国では、このウイルスが国内に侵入する可能性を考慮し、本感染症が国内で流行した場合に適切に対応できる体制づくりが必要とされている。また侵入経路として、航空機や船舶に紛れ込んだウイルス保有蚊や、WNVに感染した渡り鳥によるルートなどが考えられている。大阪府ではWNVの侵入を早期発見し、蔓延を防止するために、2003年度より蚊のサーベイランス調査を開始し、WNVに対する継続的な監視を実施している⁷⁻¹⁵⁾。また、2004年にウエストナイル熱対応指針を策定し、WNV侵入前のサーベイランス調査や、侵

^{*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

^{*3} 大阪府健康医療部保健医療室地域保健感染症課

(現 大阪府福祉部高齢介護室介護事業者課)

^{*4} 大阪府健康医療部環境衛生課 (現 大阪府守口保健所衛生課)

^{*5} 大阪府健康医療部環境衛生課

^{*6} 大阪府立公衆衛生研究所感染症部

West Nile Virus Surveillance in Osaka Prefecture

(Fiscal 2011 Report)

by Ikuko AOYAMA, Takahiro YUMISASHI, Yuko KUMAI, Kazuyo KAKEHASHI, Yoko MATSUI, Takashi KURAMOCHI, Takeshi HIRATA, Tetsuo KASE, and Kazuo TAKAHASHI

入後の対応が速やかに行える体制を整えている¹⁶⁾。また、蚊の調査以外にも、厚生労働省の通知に従い¹⁷⁾、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WNV検査を実施している。ここでは2011年度の調査結果について報告する。

調 査 方 法

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、2011年6月第4週から9月第4週（東大阪市及び高槻市は9月第2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。ただし、7月第4週は台風の影響を避けるため、水曜日から木曜日にかけてトラップを設置した。

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。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、ヒトを吸血する雌のみを検査の対象とし、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。乳剤は2mLのマイクロチューブに捕集蚊と滅菌したステンレス製クラッシャーを入れ、0.2%ウシ血清アルブミン(BSA)加ハンクス液を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、パ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



	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
	Q 泉佐野	はんなん浄化センター	阪南市
高槻	R 高槻	高槻市環境科学センター	高槻市
東大阪	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

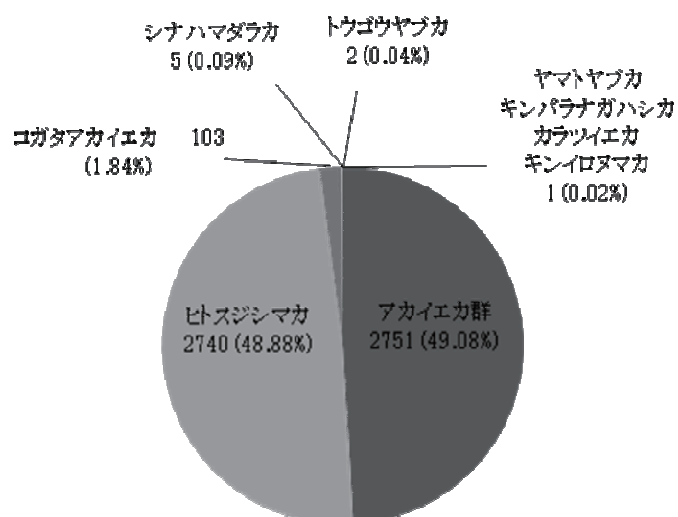


図2 捕集された蚊の種類と数及び構成比

ラッシャーを除去し、0.2%BSA 加ハンクス液を 500 μ L 追加して攪拌した。それを 4℃ 12,000rpm で 15 分間遠心し、その上清を 0.45 μ m Millex 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、加えるハンクス液を適宜調節した。検査材料のうち 150 μ L について E.Z.N.A. Viral RNA Kit (OMEGA bio-tek) を使用して RNA を抽出した。RT-PCR は、フラビウイルス共通プライマー(Fla-U5004/5457,YF-1/3)、および WNV 特異的検出プライマー(WN NY 514/904)を用いた^{18, 19)}。

また、同じく蚊媒介性のチクングニア熱についても

侵入が警戒されているため、病原体のチクングニアウイルス(CHIKV)の媒介蚊となるヒトスジシマカについて、CHIKV 特異的検出プライマー(chik10294s/ 10573c)を用いて、CHIKV の遺伝子検出を試みた²⁰⁾。

5. カラスからのウイルス検出

当所に搬入された死亡カラスを解剖し、脳についてウイルス検査を実施した。カラス毎に 0.2%BSA 加ハンクス液を用いて 10%乳剤を作成し、蚊と同様に RNA 抽出後、WNV 遺伝子検査を実施した。

結 果

1. 蚊の捕集結果について

捕集された雌の蚊は 9 種 5605 匹であった。その構成はアカイエカ群 (49.1%) とヒトスジシマカ (48.9%) が大半を占めた (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、トウゴウヤブカ、キンバラナガハシカ、ヤマトヤブカ、カラツイエカ、キンイロヌマカが捕集された。

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、その後半減し 8 月中旬に小さなピークがみられた。ヒトスジシマカは 7 月後半に捕集数が急増し、8 月には半数になり、その後緩やかに減少した。コガタアカイエカは、6 月から 9 月前半まで捕集された。その他の蚊は捕集数

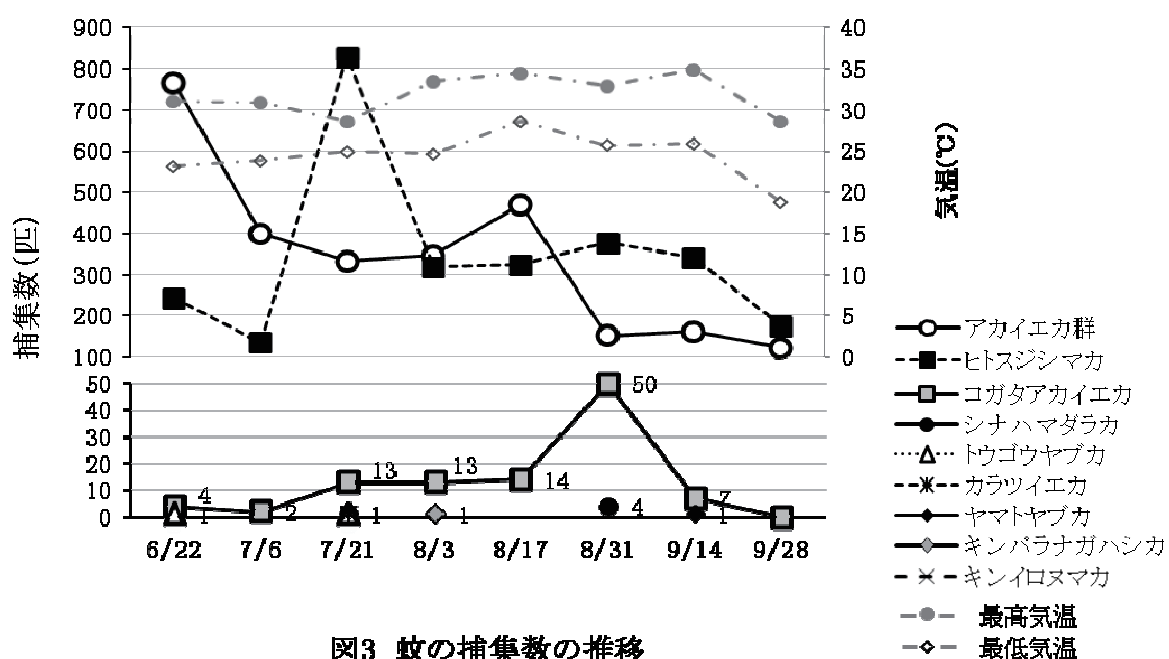


図3 蚊の捕集数の推移

が少なく、捕集場所も限られていた（図4）。

定点別の捕集数では、各地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。コガタアカイエカは10カ所で捕集され、富田林、貝塚、阪南で多く捕集された。シナハマダラカは富田林、和泉、貝塚、阪南、トウゴウヤブカは岸和田、東大阪東部、東大阪西部、キンバラナガハシカとヤマトヤブカは貝塚、カラツイエカは阪南、キンイロヌマカは寝屋川で捕集された。また、7/6の捕集について、東大阪市東部でトラップの作動異常が報告されており、捕集数が非常に少なかった。

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 369 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 WNV の遺伝子は検出さ

れなかった。またヒトスジシマカから CHIKV の遺伝子は検出されなかった。

3. 死亡カラスの回収数とウイルス遺伝子検査結果

今年度回収されたカラス2頭から、WNV の遺伝子は検出されなかった。

考 察

日本国内では、アカイエカ、チカイエカ、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカ、シナハマダラカなど複数の蚊が WNV 媒介蚊として注意すべき種類に挙げられている²¹⁾。今回の調査で捕集された蚊の種類は、ヒトスジシマカ、アカイエカ群、コガタアカイエカの3種類を合わせて99.8%を占め、大阪府において WNV 媒介蚊対策を行う際にはこれら3種の蚊

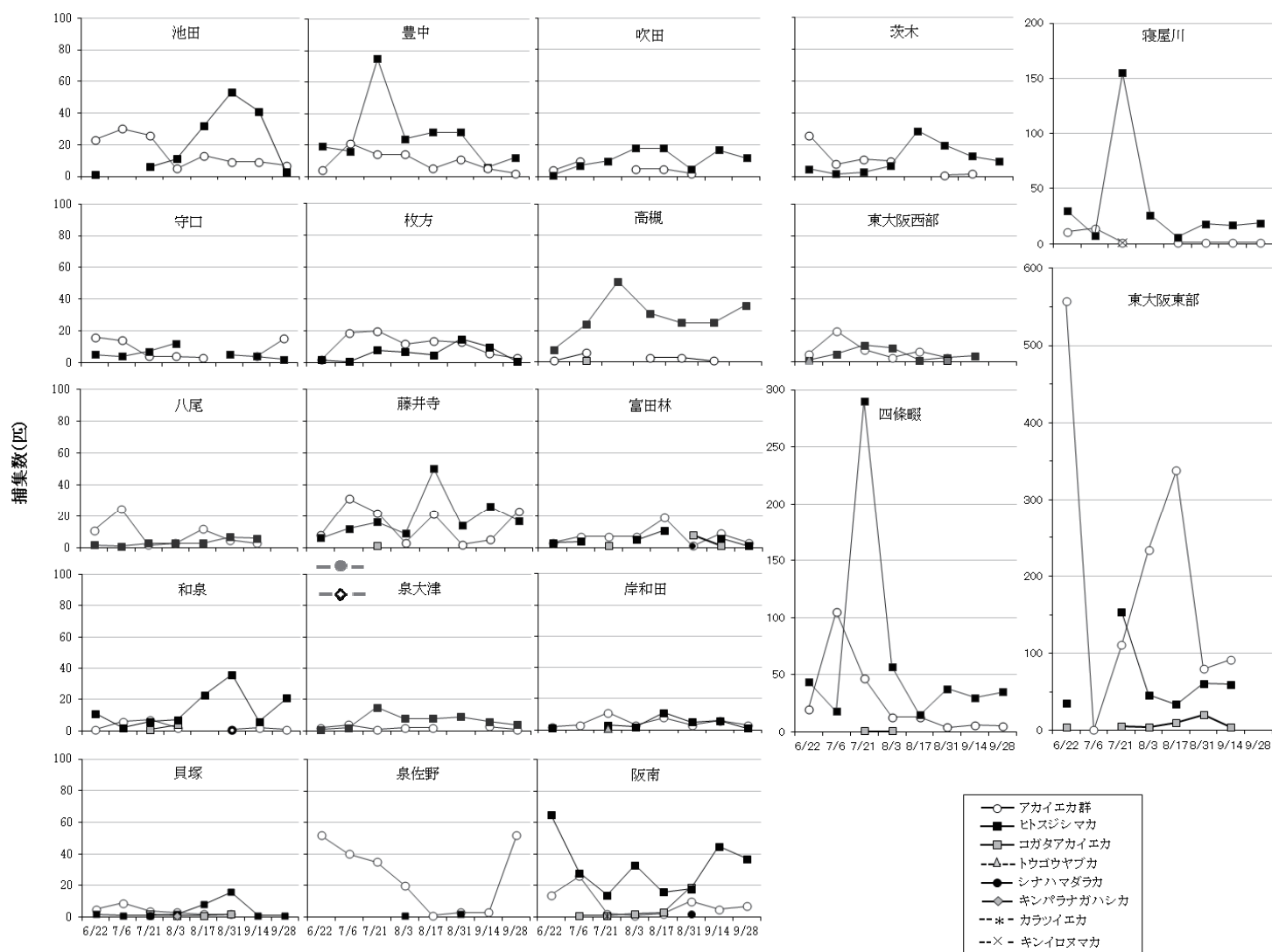


図4 定点別にみた蚊の捕集数の推移

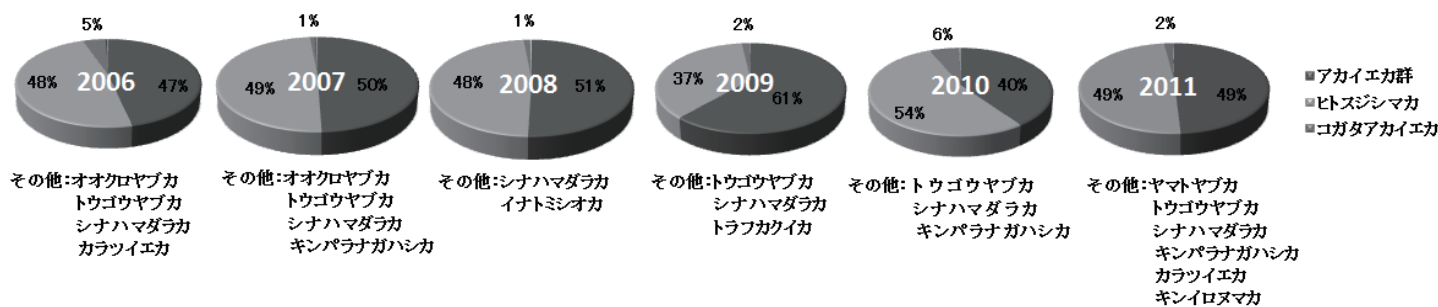


図5 捕集した蚊の種類構成

をターゲットとすれば、問題となる蚊の大半を網羅できると考えられた。ただし、阪南や貝塚など捕集される種類の多い地点もあり、このような蚊の種類の多い地点では、主要な3種以外にも注意が必要と考えられる。近年の捕集率を比較すると、昨年度はヒトスジシマカがアカイエカ群の1.3倍と、ヒトスジシマカの割合が多かったが、本年度はほぼ同じ割合であった。また、コガタアカイエカは昨年度の約1/3に減少したが、2007～2009年と同様の捕集率であり、本調査における捕集傾向は多少の増減はあるものの、ほぼ同等と考えられ、調査地点付近では大きな環境変化はないと考えられる（図5）。

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。7月21日の捕集については、7月19日、台風が近畿地方に上陸し、翌朝10時過ぎに暴風警報が解除された直後にトラップを設置することとなったが、捕集数は増加しており、調査に悪影響はみられなかったと考えられた。

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い。米国での患者発生数は2003年に9862人(死者264人)報告されたあと次第に減少したが、毎年ウエストナイル熱の流行は起きており、2008年頃からは700～1400人程度で推移している²⁾。また近年ロシアやヨーロッパでも感染者が報告され、どの国から我が国へWNVが持ち込まれるかは予測できない。

また、WNVは輸血や臓器移植でも感染することが知られており、米国における輸血のスクリーニング検査では2008年以降毎年100～200弱のWNV陽性ドナー血液が報告されている（2003年は714例）²⁾。今後、国内でWNVの流行が確認された場合は、これらについても警戒を行い、検査体制を整えなくてはならない。

また、地球温暖化で気温が上昇傾向にあるといわれる現代では、これまで熱帯・亜熱帯の感染症とされていたデング熱、チクングニア熱、マラリアなどの蚊が媒介するウエストナイル熱以外の疾患についても、今後注意が必要と考えられる。今回、全地点で捕集されたヒトスジシマカはデング熱やチクングニア熱のベクターとしても重要な蚊である²²⁾。これらのウイルスはWNVと異なり、ヒト一蚊一ヒトで感染サイクルが成立する。国内で蚊のウイルス保有が確認された場合、流行が起きる可能性があり、早期に対応が必要となる。また、マラリアの媒介蚊となるシナハマダラカも今年度は4地点で捕集され、数は少ないものの毎年捕集されている。蚊の生息地にマラリアが浸淫した場合、患者が発生する可能性がある。渡航歴のないマラリア患者が報告された場合は、WNV同様対策が必要になると考えられる。

蚊が媒介する他の感染症として、従来我が国では日本脳炎があげられる。大阪府内でも2009年度に患者が発生した²³⁾。本調査では、日本脳炎ウイルスを媒介するコガタアカイエカは毎年捕集されている。大阪府の動物由来感染症サーベイランス結果報告では、平成19～22年にかけて府内の豚から毎年日本脳炎抗体が検出されており、大阪府においても日本脳炎に感染する可能性があると考えられる²⁴⁾。

ウエストナイル熱やデング熱、チクングニア熱、マラリアなどは、未だヒト用のワクチンは実用化されておらず、予防対策は蚊に刺されないことのみである。このような蚊媒介性感染症は、現在国内で患者が発生していなくても、世界中から感染症が無くなることはないと考えられ、今後とも侵入に対する警戒や対策は必要である。また、サーベイランスを継続することは、防疫に従事する環境衛生監視員等保健所職員のウエストナイル熱や蚊の捕集・同定に関する知識と技術の向上や維持、衛生研究所との連携活動につながっている

²⁵⁾。さらに、これらの知識や経験、データを活かして保健所から各市町村へ蚊など衛生動物に関する感染症についての講習会や防疫に関する対応策の検討などが実施されている。2005、2006年には大阪府南西部の3市町、PC0等と共同し、ウエストナイル熱媒介蚊防除シミュレーションが実施された²⁶⁾。現在大阪府内には、専任の蚊など衛生害虫の防除体制を持っていない自治体もあるため、事前にこれらの対策を検討し、防除対策の習熟をしておくことは重要である。

ウイルスの侵入が確認されたとき、媒介種となる蚊を根絶することは困難である。行政として行うべきことは、少しでも感染リスクを減らすべく、感染症の正確な情報や個人レベルでの対策法を伝えるとともに、蚊の発生源を抑制し、ウイルス保有蚊の存在する地点などの特定に努め、情報発信することである。流行の拡大に遅れを取らないよう、緊急時に即対応するためには、保健所と行政、自治体同士の連携が不可欠であり、本サーベイランスは危機管理対策の一つとして非常に重要だと考えられる。

謝 辞

本調査は、大阪府立公衆衛生研究所、大阪府健康医療部環境衛生課および各保健所の協力のもとに大阪府健康医療部保健医療室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に深謝致します。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
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/index.htm>
- 3) Public Health Agency of Canada: West Nile Virus Monitor
<http://www.phac-aspc.gc.ca/wnv-vwn/index-eng.php>
- 4) Elizondo D, Davis CT, Fernandez I., et al: West Nile virus isolation in human and mosquitoes, Mexico, Emerg Infect Dis., 11, 1449-52. (2005)

- 5) West Nile Virus Update 2006 - Western Hemisphere (23): Argentina: 1st case, ProMed-mail, 20061228.3642 (2006)
- 6) 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(1), 56-57 (2006)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 青山幾子, 弓指孝博, 中田恵子ら: 大阪府におけるウエストナイルウイルスに対するサーベイランス調査 (2008 年度), 大阪府立公衛研所報, 47, 1-8 (2009)
- 14) 青山幾子, 弓指孝博, 加藤友子ら: 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 (2009 年度), 大阪府立公衛研所報, 48, 1-7 (2010)
- 15) 青山幾子, 弓指孝博, 加藤友子ら: 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 (2010 年度), 大阪府立公衛研所報 49, 1-6, 2011
- 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) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知: ウエストナイル熱の流行予測のための死亡カラス情報の収集

等について(2003.12.13)

- 18)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://www0.nih.go.jp/
vir1/NVL/WNVhomepage/WNVLbotest.pdf](http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/WNVhomepage/WNVLbotest.pdf)
- 19)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)
- 20)小林睦生ら：チクングニヤ熱媒介蚊対策に関するガ
イ ド ラ イ ン (2009) [http://www0.nih.go.jp/niid/
entomology/document/chikungunya.pdf](http://www0.nih.go.jp/niid/entomology/document/chikungunya.pdf)
- 21)日本環境生活衛生センター：ウエストナイル熱媒介
蚊対策ガイドライン (2003)
- 22)水野泰孝：国際的な感染症～ウイルス感染を中心と
して～IV.デング熱・チクングニヤ熱,アレルギー・
免疫,15(11),40-44 (2008)
- 23)大阪府立公衆衛生研究所：日本脳炎 (2010)
<http://www.iph.pref.osaka.jp/kansen/nihonnouen.html>
- 24)大阪府：平成 22 年度動物由来感染症サーベランス
結果報告
[http://www.pref.osaka.jp/attach/2769/
00006805/dobutsuyurai22.pdf](http://www.pref.osaka.jp/attach/2769/00006805/dobutsuyurai22.pdf)
- 25)弓指孝博,瀧幾子,大竹徹ら：地方におけるウエスト
ナイル熱対策,臨床とウイルス,33(1), 33-40 (2005)
- 26)大阪府健康医療部環境衛生課：ウエストナイル熱媒
介蚊対策シミュレーション
[http://www.pref.osaka.jp/kankyoeisei/westnilevirus/inde
x.html#simyu](http://www.pref.osaka.jp/kankyoeisei/westnilevirus/index.html#simyu)

大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2011 年度)

中田恵子* 山崎謙治* 左近直美* 加瀬哲男*

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律における 5 類定点届出疾患である手足口病、ヘルパンギーナおよび無菌性髄膜炎の原因は、主にエンテロウイルス感染が疑われる。2011 年度、大阪府に搬入されたこれらの疾患疑い検体、376 検体のうち 166 検体（44.1%）からエンテロウイルスが検出され、coxsackievirus A6(CA6)陽性が 91 検体（54.8%）、CA16 陽性が 21 検体（12.7%）と上位 2 位を占めた。分離培養ができた CA6 および CA16 からそれぞれ 12 株および 8 株を抽出し、得られた viral protein 1(VP1)領域の配列 310bp を用いて分子系統樹解析を実施した結果、CA6 は全てが同じクラスター（相同性 95%以上）に分類され、CA16 については 12 月に検出された 5 株が全て一つのクラスター（相同性 100%）に分類された。

キーワード: エンテロウイルス、手足口病、コクサッキーA6、コクサッキーA16

Key words : Enterovirus, Hand,foot and mouth disease, CoxsackievirusA6, CoxsackievirusA16

実 験 方 法

エンテロウイルス感染症は夏季に主に小児で流行する疾患である。その症状は、夏風邪様、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、感染性胃腸炎、中枢神経系合併症からの死亡等と多様性を示す。また、年によって流行する血清型が入れ替わり、地域によっても流行型に差がある。EV71 が原因となる手足口病が流行した年には中枢神経系合併症の頻度が高くなるという報告¹⁾があり、流行型によって症状や重症度が異なる場合があるため、流行型のモニタリングが必要である。

そこで、2011 年 4 月 1 日から 2012 年 3 月 31 日に手足口病、ヘルパンギーナあるいは無菌性髄膜炎疑いと診断されて大阪府立公衆衛生研究所に搬入された検体からのエンテロウイルス検出状況およびウイルスの分子疫学的解析を実施したので報告する。

1. 検体および情報収集

2011 年 4 月 1 日から 2012 年 3 月 31 日の期間、大阪府立公衆衛生研究所に手足口病、ヘルパンギーナあるいは無菌性髄膜炎疑いで搬入された 286 名から採取された 376 検体を対象とした。検体種別の内訳は、髄液が 71 検体、呼吸器系検体（咽頭拭い液、うがい液、鼻汁等）が 224 検体、糞便（腸内容物含む）が 70 検体、その他（尿、血清、水疱液等）が 11 検体であった。感染症法に基づく病原体発生動向調査事業によって得られた検体の情報は調査票より、それ以外から得られた検体の情報は医師から提供された書面より患者の年齢、性別、診断名、体温、発症日などの情報を収集した。

2. 検体からのウイルス遺伝子検出

糞便は LE 溶液（0.5%のラクトアルブミン水解物、2μg/mL のアンホテリシン B、200U/mL のペニシリンおよび 200μg/mL のストレプトマイシンを含む緩衝液）で 10%懸濁液を作製し、15,000rpm で 5 分間遠心分離した。上清をさらに LE 溶液で 10 倍希釈したのち、

*大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

Prevalence and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2011 Report)

by Keiko NAKATA, Kenji YAMAZAKI, Naomi SAKON and Tetsuo KASE

結 果

0.45μm ミニザルトシリンジフィルター (sartorius) でろ過したものを材料 (糞便溶液) とした。糞便溶液及びそれ以外の検体 200μL から Magtration®-MagaZorb® RNA Common Kit (PSS 社) を用いて、全自動核酸抽出装置 Magtration® System 6GC および 12GC (PSS 社) にて RNA を抽出した。エンテロウイルス VP4-2 領域に対する seminestedRT-PCR²⁾を実施したのち、増幅産物に対してダイレクトシーケンスを行ない、BLAST 相同性検索にて血清型を決定した。

3. 培養細胞によるウイルス分離

ウイルス分離には 24 ウェルマイクロプレートに播種した RD-18S 細胞、Vero 細胞を用いた。RD-18S 細胞および Vero 細胞には糞便溶液およびそれ以外の検体をそれぞれ 200μL 接種し、1 週間、CPE(cytopathic effect) を観察し、CPE が出現したウェルの培養上清を回収した。

4. マウスによる CA6 の分離

VP4-2 領域に対する RT-PCR で CA6 が陽性であった検体について糞便溶液あるいは検体を ICR 哺乳マウス頸部皮下に 0.05mL 接種し、1 週間観察した。観察期間内に弛緩麻痺を呈した哺乳マウスを回収し、-80℃で保存した。

5. 培養上清およびマウスからのウイルス遺伝子検出

RD-18S 細胞、Vero 細胞で CPE が見られた培養上清からは、検体からのウイルス遺伝子検出と同様に RNA 抽出を実施した。

弛緩麻痺が見られた哺乳マウスは、頭部、内臓、皮、四肢を取り除いた部分にLE溶液を加えて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分振とうしたのちクラッシュャーを取り除いて15,000rpmで5分間遠心し、その上清から同上的方法でRNAを抽出した。

培養上清およびマウスから抽出したRNAを用いてエンテロウイルスのVP1領域に対するRT-PCR³⁾を実施し、得られた増幅産物に対してダイレクトシーケンスを行ない、BLAST相同性検索にて血清型を決定した。また、CA6の12株およびCA16の8株 (310bp) に対して、得られた塩基配列を用いて系統樹解析を実施した。

1. 患者情報およびウイルスの検出状況

対象3疾患全体の患者年齢の中央値は3.75歳 (範囲: 0-77歳)、男性170名 (59.6%)、女性113名 (39.6%)、不明2名 (0.7%) であり、体温の中央値は38.8℃ (36.0-41.3) であった。疾患別患者年齢中央値は、手足口病患者では2.58歳 (0-54.6歳)、ヘルパンギーナ患者では5.0歳 (0-12.9歳)、無菌性髄膜炎患者では4.0歳 (0-77歳) であった。全患者286名中、131名 (45.8%) からエンテロウイルスが検出された。呼吸器系検体 (咽頭拭い液、うがい液、鼻汁等)、糞便 (腸内容物含む)、ではそれぞれ33.5%、20.0%とCA6の検出割合が最も多かった。検出方法別ではseminestedRT-PCRでの検出頻度が高く、159検体(42.3%)であった。CA6ではseminested RT-PCRで検出された91検体中、細胞培養で分離できた検体は1検体のみであり、ICR哺乳マウスで分離できた検体は85検体 (93.4%) であった (表.1)。

2. 疾患別患者割合および検出ウイルスタイプ

対象3疾患患者 286 名中、手足口病と診断された患者は 117 名 (40.9%) と最も多く、次いでヘルパンギーナが 90 名 (31.5%)、無菌性髄膜炎が 79 名 (27.6%) であった。各疾患においてエンテロウイルスが検出された患者は手足口病では 76 名 (65.0%) であり、そのうち CA6 が 67%、次いで CA16 が 28% であった。ヘルパンギーナでは 38 名 (13.3%) からエンテロウイルスが検出され、そのうち CA6 が 74% と最も高い頻度で検出された。無菌性髄膜炎では 14 名 (4.9%) からエンテロウイルスが検出され、そのうち CB4 および CB5 が 29% であった。(図 1,2,3)。

3. 月別エンテロウイルス検出数

平成23年度は突出してCA6の検出割合が高く、次いでCA16が高かった。CA6は主に6月、7月、8月に検出されていたが、9月以降は検出されていない。一方、CA16は7月から検出され始め、12月に最も多く検出された。その他のウイルスの検出には目立った特徴はなく、そのほとんどが通常のエンテロウイルスの流行期である夏季 (6月から10月) の期間に検出された (図4)。

表1.検体種・検出方法別の血清型別ウイルス検出数

検出 ウイルス	髄液					呼吸器系検体 (咽頭拭い液、うがい液、鼻汁)					糞便(腸内容物含む)					その他(尿、血液、水泡液等)					検体数合計				
	71					224					70					11					376				
	RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス		RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス	RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス	RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス	RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス				
CA6	1	0	0	0		75	0	1	74	14	0	0	10	1	0	0	1	91	0	1	85				
CA9	1	0	0	ND		0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	1	0	0	ND				
CA10	0	0	0	ND		4	0	1	ND	1	0	0	ND	0	0	0	ND	5	0	1	ND				
CA16	0	0	0	ND		17	0	11	ND	3	0	0	ND	0	0	0	ND	20	0	11	ND				
CB1	1	1	0	ND		0	0	0	ND	1	1	0	ND	0	0	0	ND	2	2	0	ND				
CB3	0	0	0	ND		1	2	0	ND	1	1	0	ND	1	0	0	ND	3	3	0	ND				
CB4	3	2	1	ND		4	3	0	ND	4	2	0	ND	0	0	0	ND	11	7	1	ND				
CB5	2	1	0	ND		4	4	0	ND	2	1	0	ND	1	1	0	ND	9	7	0	ND				
Echo6	2	0	1	ND		2	0	1	ND	3	0	3	ND	0	0	0	ND	7	0	5	ND				
Echo7	1	0	0	ND		0	0	1	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	1	0	1	ND				
Echo9	0	0	0	ND		0	0	1	ND	2	0	2	ND	0	0	0	ND	2	0	3	ND				
Echo25	1	0	1	ND		1	1	0	ND	3	0	0	ND	2	0	0	ND	7	1	1	ND				
検出数合計	12	4	3	ND		108	10	16	74	34	5	5	10	5	1	0	1	159	20	24	85				

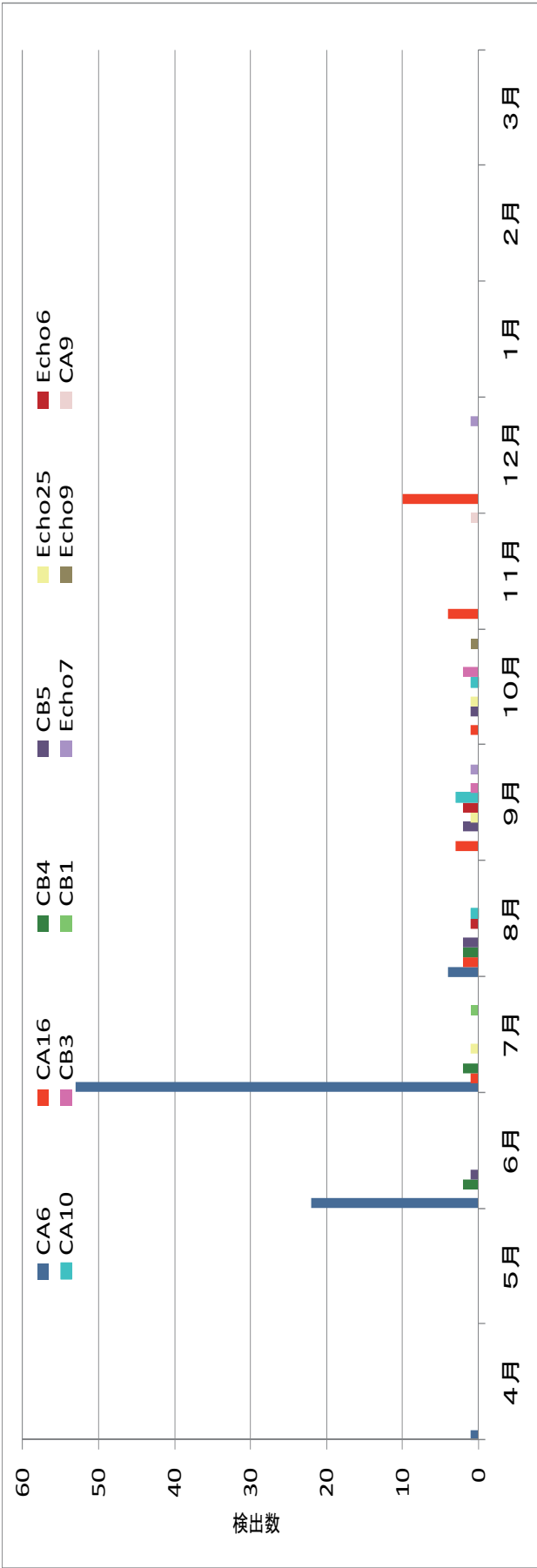


図4.月別検出ウイルス (血清型別)

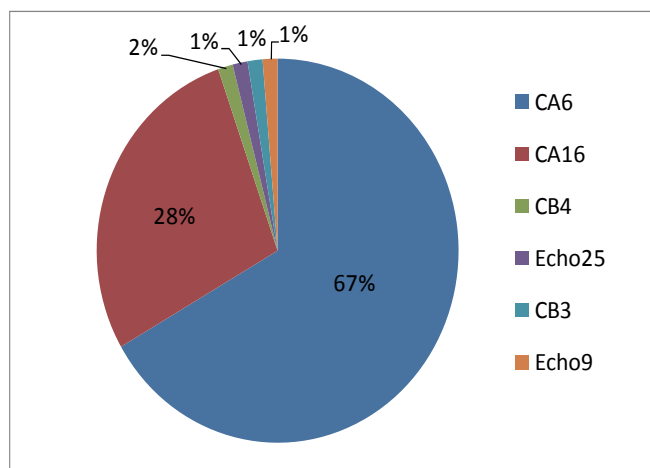


図 1.手足口病患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=76)

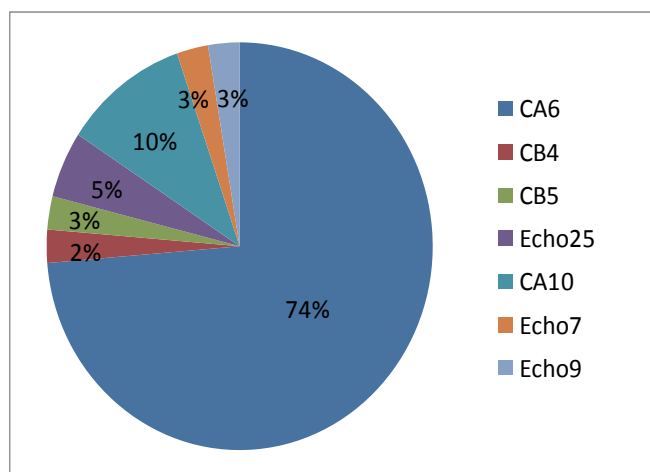


図 2.ヘルパンギーナ患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=38)

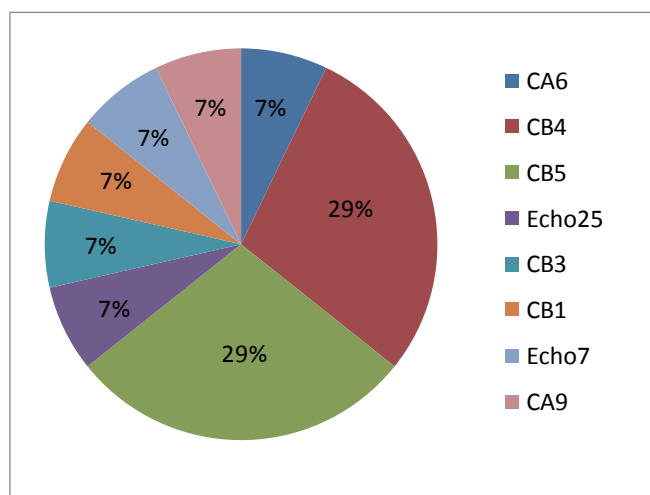


図 3.無菌性髄膜炎患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=14)

4. CA6およびCA16の系統樹解析

分離したCA6、12株およびCA16、8株についてVP1領域（310bp）の系統樹解析を実施した結果、CA6は6月、7月、8月に採取された株全てが同じクラスター（相同性95%以上）に分類され、同年に登録された静岡の株、2008年のフィンランドの株および2010年の中国の株とも同じクラスターであった。一方、CA16のうち、12月に採取された5株は同じクラスター（相同性100%）に分類されたが、その他の3株（230436:8月採取、230592:11月採取、230612:11月採取）は異なるクラスターに分類された（図5,6）。

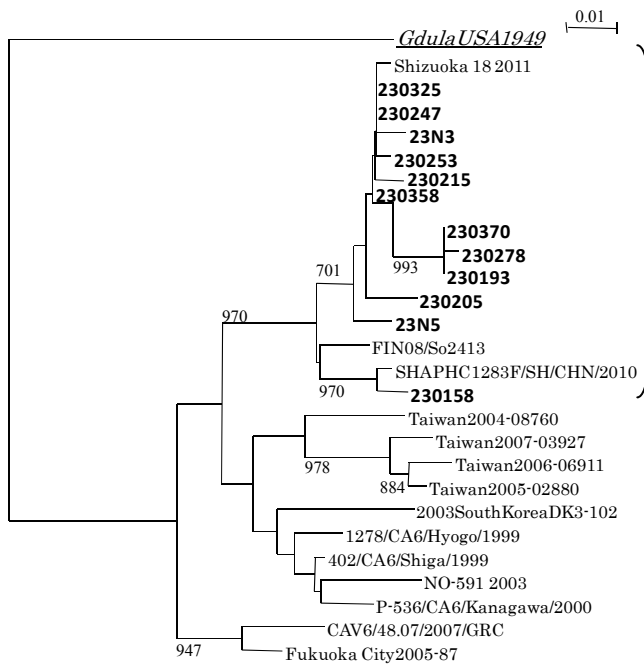
考 察

平成23年度、日本では全国的にCA6による手足口病の大きな流行があり、非定形的な皮膚症状や爪甲脱落症がみられるケースの報告があった⁴⁾⁵⁾⁶⁾。これらの症状は、EV71やCA16が原因となる通常の手足口病とは異なる様相を呈した。近年、諸外国においても我が国と同様のCA6による手足口病の流行が報告されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。大阪府においても平成23年度におけるエンテロウイルス感染症の特徴は、手足口病およびヘルパンギーナ患者から高率にCA6が検出されたことである。これに対し、無菌性髄膜炎ではCA6の検出は1検体のみであり、CA6が無菌性髄膜炎の原因になる可能性が低いことが示唆された。

通常、手足口病およびヘルパンギーナの患者は0歳から4歳未満の小児に多く、無菌性髄膜炎の患者はそれよりも年長の小児に多いとされている^{10) 11) 12)}。本研究の対象者ではヘルパンギーナ患者の中央値が5.0歳と高かったが、無菌性髄膜炎および手足口病では通常と大きな違いはなかった。

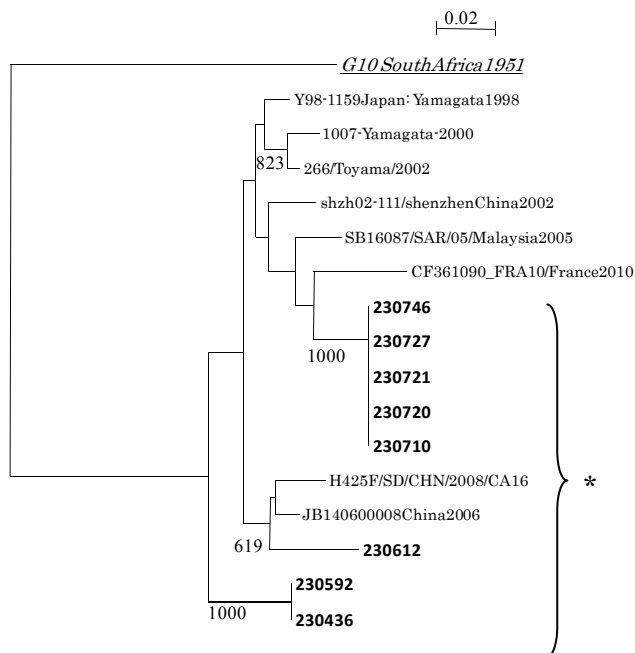
検出の最も多かったCA6はRD18S細胞で分離が可能であると言われているが、今回は細胞培養での分離は困難であった。この原因についてはさらにウイルス学的性状の解析を進め、追求する予定である。

哺乳マウスおよび培養細胞で分離ができたCA6およびCA16のうち、それぞれ12株および8株に対して行なった系統樹解析において、CA6では12株全てが同じクラスター（相同性95%以上）に分類された。また、



*太字:平成23年度大阪府分離株

図5. CA6系統樹 (VP1領域,310bp)



*太字:平成23年度大阪府分離株

図6. CA16系統樹 (VP1領域,310bp)

同年に登録された静岡の株が同じクラスターに分類されていることから、大阪府で検出された株は平成 23 年度に日本国内で流行していた株と近縁である可能性が示唆された。また、2008 年に CA6 による手足口病の

流行が報告されているフィンランド⁸⁾の株、2010 年の中国株とも同じクラスターであることから、近年、諸外国で流行を引き起こしているウイルスとも近縁であると考えられた。

国立感染症研究所の病原微生物検出情報によると、平成 23 年度は全国的に手足口病の患者において CA16 の検出が冬季まで続いており、大阪府においては 12 月に最も多く検出された。大阪府で検出された CA16 では 12 月の 5 株 (相同性 100%) は他の 3 株 (8 月、11 月検出株) と異なるクラスターに分類されたが、これは 12 月の 5 株が全て同一医療機関の手足口病患者検体から検出された株であるため、当該医療機関近郊での地域的流行を反映したものであると考えられる。

エンテロウイルスは血清型が数多く存在し、年ごとに流行のタイプが入れ替わり、流行の規模も大きく変化する。CA6 は通常、手足口病の主要原因になることは少ないが、平成 23 年度は大きな流行を引き起こした。手足口病のみならず、ヘルパンギーナ患者からも高率に検出されたことや、爪甲脱落症等の血清型特異的であると思われる症状の報告も相次いだことより、症状からの診断が容易ではなかったことが考えられる。エンテロウイルス感染症の流行規模の予測や予防啓発の観点からも、流行ウイルスタイプをモニタリングすることが今後も重要であると思われる。

文 献

- 1) 清水博之：東アジアにおけるエンテロウイルス 71 型感染症の流行,病原微生物検出情報月報 (IASR) 30, 9-10 (2009)
- 2) 石古博昭, 島田康司, 奥那覇麻理, 栄賢司：遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定,臨床とウイルス,17,283-93 (1999).
- 3) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification., J Virol 73, 1941-1948 (1990).
- 4) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011. Emerg Infect Dis. 18(2),337-9 (2012).

- 5) 飯塚節子 木内郁代 日野英輝; 2011 年に流行した手足口病およびヘルパンギーナからのウイルス検出—島根県, 病原微生物検出情報月報 (IASR) 33 ,58-59 (2012)
- 6) 渡部裕子; 手足口病後の爪変形・爪甲脱落症 (IASR) 33 ,62-63(2012)
- 7) Wei SH, Huang YP, Liu MC, Tsou TP, Lin HC, Lin TL, Tsai CY, Chao YN, Chang LY, Hsu CM; An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot, and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010. BMC Infect Dis. 14;11:346,(2011).
- 8) Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, Paananen A, Simonen ML, Vuorinen T, Roivainen M. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. J Clin Virol.; 48(1):49-54 (2010).
- 9) Bracho MA, González-Candelas F, Valero A, Córdoba J, Salazar A. Enterovirus co-infections and onychomadesis after hand, foot, and mouth disease, Spain, 2008. Emerg Infect Dis. 17(12):2223-31(2011).
- 10) 感染症発生動向週報 (IDWR) 感染症の話 ヘルパンギーナ 2003 年第 8 週号 (2003 年 2 月 17 日～23 日)
- 11) 感染症発生動向週報 (IDWR) 感染症の話 手足口病 2001 年第 27 週 (7 月 2 日～7 月 8 日)
- 12) 感染症発生動向週報 (IDWR) 感染症の話 無菌性髄膜炎 2003 年第 12 週号 (2003 年 3 月 17 日～23 日)

ピーナッツあるいはゴマを含む食品中 TBHQ 分析法の検討

野村千枝* 栗津薫* 清田恭平* 吉光真人* 阿久津和彦*

tert-ブチルヒドロキノン (TBHQ) は欧米で使用される酸化防止剤であるが、日本国内では食品添加物として認められておらず、輸入食品の抜き取り検査等において違反事例が報告されている。大阪府においても TBHQ の収去検査を行ってきたが、今回ピーナッツあるいはゴマを含む一部の食品において、食品由来の妨害成分により分析が困難となる事例があった。そこで試料の前処理方法について検討し良好な結果が得られたので報告する。

キーワード：TBHQ、ゴマ、ピーナッツ、固相抽出法、AC-2 カートリッジカラム

key words: TBHQ, sesame, peanut, solid-phase extraction, AC-2 cartridge column

tert-ブチルヒドロキノン (TBHQ) は米国や中国などでは酸化防止剤として用いられているが日本では使用が許可されておらず、輸入食品から検出される違反事例が報告されている¹⁾。従来の TBHQ の分析は食品中の食品添加物分析法²⁾に基づいて行われてきたが、平成 17 年 3 月に厚生労働省より改良法が通知された³⁾。改良法は TBHQ を L-アスコルビン酸パルミチン酸エステルを含むアセトニトリルで抽出後、*n*-ヘキサンを用いて油脂分を除去し、蛍光検出器付 HPLC により定量する。当所においては、この改良法を一部変更した変法（以下 SOP 法）を用いて検査を行ってきたが、ピーナッツあるいはゴマを含む一部の食品において食品由来の成分により分析が妨害される事例があった。通知法の改良法として、活性炭カートリッジカラムを利用し、食品中 TBHQ の簡易・迅速分析を試みた祭原らの報告がある⁴⁾。そこで今回、祭原らの方法⁴⁾を参考に試料の前処理方法を改良し蛍光検出器付 HPLC を用いて検討を行った。

方法

1. 試料

市販のピーナッツバター、ピーナッツクリーム、ピ

ーナッツ油、ハニーローストピーナッツ、ゴマビスケット、ゴマ油、コーン油、オリーブ油 2 種類（エキストラバージン）を用いた。

2. 試薬等

試薬：TBHQ 標準品、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル (AP) は和光純薬工業（株）製の特級品を用いた。無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用、アセトニトリル、*n*-ヘキサン、酢酸エチルは HPLC 用を用いた。水は Millipore 社製 Milli-Q 超純水製造装置で製造した。その他試薬は市販の特級試薬を用いた。抽出に用いるアセトニトリルは *n*-ヘキサンの飽和させたものを用いた。標準溶液の希釈および抽出に用いる有機溶剤（アセトニトリル、酢酸エチル）には、抽出操作や減圧濃縮操作等に伴う TBHQ の酸化分解を抑制するために、AP を 0.01%w/v の濃度となるように添加した（以下 AP アセトニトリル、AP 酢酸エチル）。

標準溶液：TBHQ50.0 mg を精秤し、通知法³⁾に従って AP アセトニトリルに溶解して 50 mL に定容し、TBHQ 標準原液とした（1 mg/mL）。この液を AP アセトニトリルで適宜希釈して標準溶液を調製した。

固相抽出カートリッジカラム：高純度活性炭カラムである Waters 社製 Sep-Pak Plus AC-2（充填量 400 mg）を用いた。使用前にアセトニトリル 4 mL および精製水 5 mL で平衡化した。

ディスポーザブルメンブランフィルター (PTFE、0.45 μm)、分析用ろ紙 (No.5A、150 mmφ) は Advantec 社製を用いた。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課
Studies on a Method for the Determination of TBHQ
in Sesami and Peanut Products by Chie NOMURA,
Kaoru AWAZU, Kyohei KIYOTA, Masato
YOSHIMITSU and Kazuhiko AKUTSU

3. 装置および測定条件

装置：島津製作所製 LC-10A シリーズ (RF-10VP 型蛍光検出器付)、カラム：Tosoh 製 TSK gel ODS-100V (5 μ m、 ϕ 4.6 $\times$ 150 mm)、移動相：5%酢酸・アセトニトリル混液 (3:2)、カラム温度：40℃、流速：1.0 mL/min、励起波長：293 nm、蛍光波長：332 nm、注入量：20 μ L

4. 試験液の調製

4.1 試験液の調製 (SOP 法)

4.1.1 液状または固形の油脂

均一化した試料約 1 g に無水硫酸ナトリウム 1 g と n-ヘキサン 10 mL を加え試料を溶解した。正確に AP アセトニトリル 10 mL を加え、1 分間振とうした。遠心分離した後、n-ヘキサン層を除き、アセトニトリル層に n-ヘキサン 10 mL を加え、よく振り混ぜた後、遠心分離した。抽出液 (アセトニトリル層) を採り、フィルターでろ過し、試験液とした (図 1-1)。

4.1.2 その他の食品

細切均一化した試料約 5 g に無水硫酸ナトリウム 5 g と AP 酢酸エチル 30 mL を加え、1 分間振とうまたは高速ホモジナイズした。5 分間遠心分離した後、酢酸エチル層をろ過した。残留物に AP 酢酸エチル 30 mL を加え同様に操作し、ろ液を合わせ、酢酸エチルを留去した。残留物に n-ヘキサンを加えて溶解し、50 mL に定容した。この溶液を遠心分離した後、10 mL を正確に採り、正確に AP アセトニトリル 10 mL を加え、1 分間振とう後、遠心分離した。n-ヘキサン層を除き、アセトニトリル層に n-ヘキサン 10 mL を加えよく振り混ぜた後、遠心分離した。抽出液 (アセトニトリル層) を採り、フィルターでろ過し、試験液とした (図 1-2)。

遠心操作はすべて室温下 3,000 回転で 5 分間行った。

4.2 AC-2 カートリッジカラムによる精製法 (本法)

SOP 法に“AC-2 カートリッジカラムによる精製法”を加えたものを本法とした (図 2)。SOP 法により得られた抽出液 5 mL を正確に採り、水 5 mL を加えて混和した後、AC-2 カートリッジカラムに通して TBHQ を吸着させた。次にアセトン・水混液 (1:1) 10 mL および水 10 mL で洗浄し、10%アスコルビン酸水溶液・アセトン混液 (1:9) 25 mL で溶出した。溶出液を完全に乾固させずに減圧濃縮した後、AP アセトニトリルを用いて 5

mL に定容し、フィルターでろ過し、試験液とした。

5. 定量

標準溶液および試験液 20 μ L を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。検量線は 0.1~0.4 μ g/mL の範囲で良好な直線性が得られた (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 μ g/mL の 4 点検量線、決定係数 $R^2=0.9999$)。本法の検出下限値は、通知法と同じ 1 μ g/g (試験液として 0.1 μ g/mL に相当) とした。定量下限値は検出下限値と同じ 1 μ g/g とした。

6. 添加回収試験

通知法では「TBHQ は酸化還元性の分解しやすい化合物で低濃度では容易に分解するため低濃度では良好な回収率が得られない。精度管理では 20 μ g/g での添加回収実験を実施することで十分な精度を維持できる」としている³⁾。しかし TBHQ は不検出基準の食品添加物であるため、検出下限値付近における添加濃度での精度管理が望ましいと考えた。そこで添加濃度は検出下限値の 2 倍である 2 μ g/g とした。

また分析法の妥当性を確認するために「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン」⁵⁾を参考に、1 日 2 併行、5 日間の枝分かれ実験モデルで精度管理試験を実施した。

結果および考察

1. 抽出・精製方法の検討

抽出方法は通知法を一部変更した。抽出効率を上げるためにアセトニトリル分配の回数を 1 回から 2 回に増やし、高速ホモジナイズ法も選択可能とした。このとき、抽出操作や減圧濃縮操作に伴う TBHQ の酸化分解を抑制するために、AP を添加した酢酸エチルを抽出溶媒に使用することにした (図 1-1, 1-2)。精製法は祭原らの方法⁴⁾を準用した (図 2)。

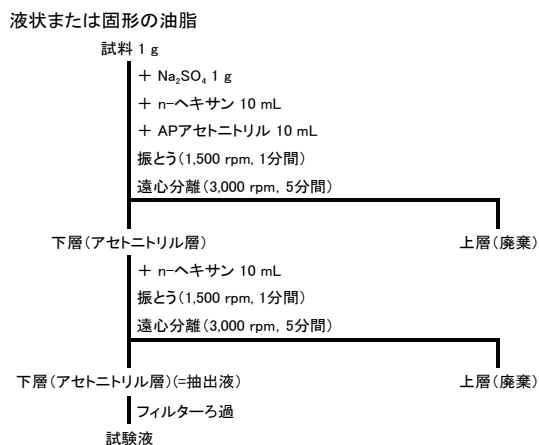


図 1-1 液状又は固形の油脂（SOP 法）のフローシート

SOP法で得られた

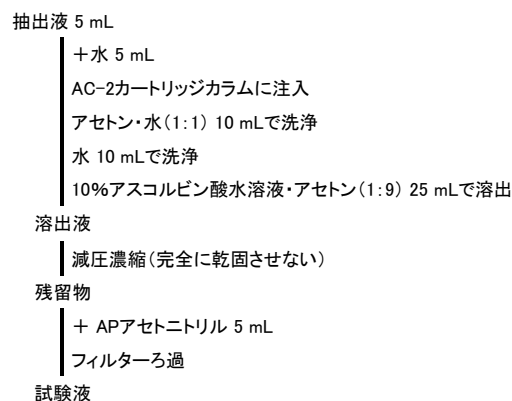


図 2 AC-2 カートリッジカラムによる精製方法（本法）のフローシート

2. 測定条件の検討

測定条件は通知法を一部変更した。通知法の検出下限を確保するために、試料注入量を 10 μ L から 20 μ L にした。通知法条件で試料注入量を 2 倍にした場合、10 μ L 注入時と異なり、TBHQ ピークの著しいリーディングが生じた。リーディングの原因について、標準溶液（AP アセトニトリル）と移動相（5%酢酸・メタノール・アセトニトリル混液（3:1:1））の溶媒組成のマッチングが悪いためと考え、移動相のメタノールをアセトニトリルで置き換え 5%酢酸・アセトニトリル混液（3:2）としてピーク形状の改善を図った。その結果、20 μ L 注入時のピーク形状が改善し、通知法の 2 倍以上の検出感度を得ることができた。通知法の測定条件のうち、注入量および移動相組成を各々、20 μ L および 5%酢酸・アセトニトリル混液（3:2）に変更した。（データ未掲載）

3. 添加回収試験

SOP 法と本法を比較するために、実験方法 1.試料に記述の 7 種類の食品を用いて 3 併行で添加回収試験を行った。コーン油、オリーブ油、ゴマ油、ピーナッツ油、ピーナッツバターの 5 種類は“液状または固形の油脂”、ハニーローストピーナッツ、ゴマビスケットの 2 種類は“その他の食品”の抽出・精製法を用いた。図 3-1、図 3-2 にクロマトグラムを示した。TBHQ の RT は 5.8 ～ 5.9 分であるが、ピーナッツバターおよびハニーローストピーナッツに共通する夾雑ピークは 6.2 分、6.7 分に見られた。この夾雑ピークの RT は TBHQ と最小でも

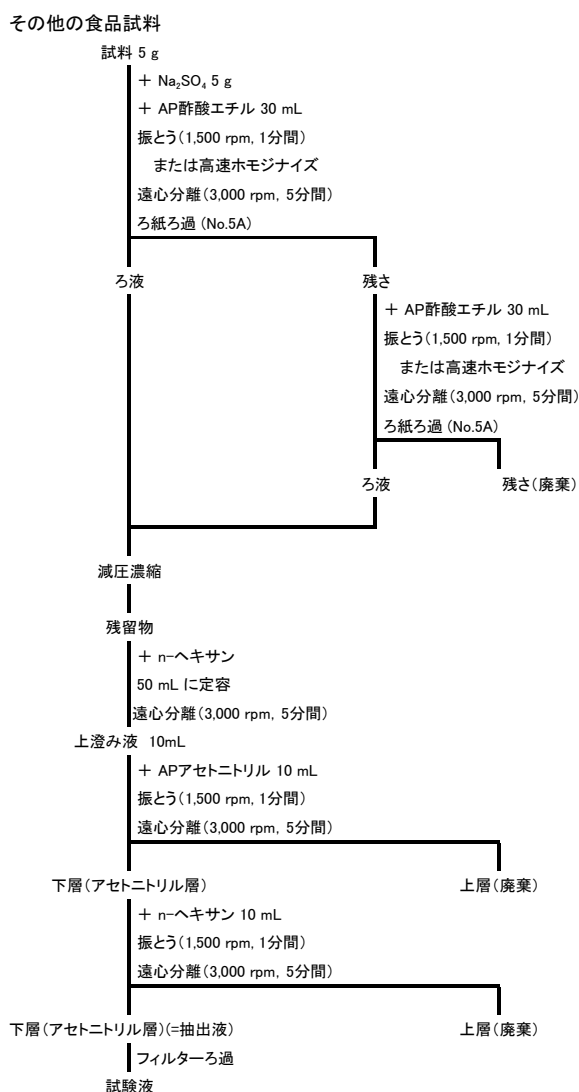


図 1-2 その他の試料（SOP 法）のフローシート

0.3 分のずれがあったものの、ピーク面積が非常に大きいため、TBHQ の同定・定量の妨害となった。また 6.2 分と 6.7 分の夾雑ピークは粒コーンや甘栗にも見られたがピーク面積が TBHQ の定量下限値以下であったことから定量は可能であった。ゴマ油およびゴマビスケットに共通するゴマ由来の主な夾雑ピークは 5.6 分、24.5 分および 34.4 分に見られた。ゴマビスケットにおける 5.6 分のピーク面積は定量下限値以下であり、TBHQ 定量値の算出は可能であった。しかし、HPLC の分析時間を 20 分間としているため、ゴマ由来の 24.5 分および 34.4 分のピークが、次の試験品注入時の妨害となっていた。

ゴマ油、ピーナッツバター、ハニーローストピーナッツは、SOP 法では夾雑ピークが測定妨害となり、定量不能であったが、本法では定量が可能となった。添加回収率は 81~100%、RSD は 1~6% と良好な結果を示した。真度は 70~120% の範囲に収まり、SOP 法よりも良好な値であった。

4. 真度と精度

1 日 2 併行、5 日間の枝分かれ実験モデルで本法の精度管理試験を実施し、併行精度および室内精度を算出した（表 2）。試料は“液状または固形の油脂”代表としてピーナッツバター、その他食品の代表としてハニーローストピーナッツを用いた。真度は 70~120% の範囲に収まり、併行精度が 10% 以下、室内精度が 15% 以下と良好な結果が得られた。

まとめ

ゴマおよびピーナッツを含む食品に関しては、改良法³⁾を一部変更した当所の SOP 法に AC-2 カートリッジカラムによる精製法を追加した本法を用いることで、定量が不能であった試料においても測定が可能となり、良好な精度と回収率が得られた。TBHQ の検査を行うとき、ゴマおよびピーナッツを含む食品の場合は、本法を用いる必要があると考えられた。

AC-2 カートリッジカラムを貸与して頂いた生活環境課の皆様に深謝いたします。

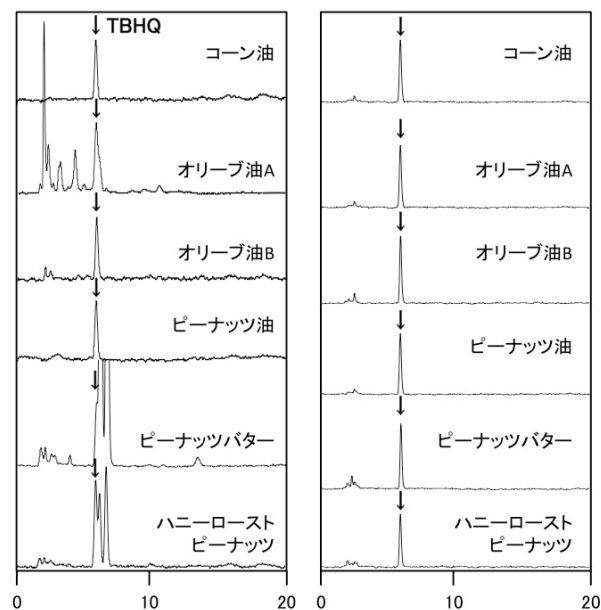


図 3-1 SOP 法と本法のクロマトグラムの比較

（左）SOP 法、（右）本法

添加濃度：2 $\mu\text{g/g}$ 、縦軸：相対強度、横軸：RT（分）

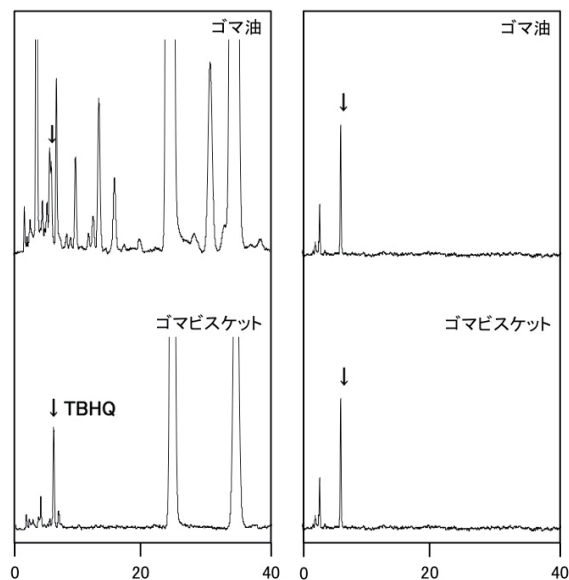


図 3-2 SOP 法と本法のクロマトグラムの比較(ゴマを含む食品)

（左）SOP 法、（右）本法

添加濃度：2 $\mu\text{g/g}$ 、縦軸：相対強度、横軸：RT（分）

表 1 SOP 法と本法の回収率の比較

試料	試料採取量 g	添加濃度 μg/g	平均回収率, % (RSD, %) , n=3	
			SOP法	本法
コーン油	1	2	95 (5)	96 (6)
オリーブ油	1	2	95 (2)	99 (2)
ごま油	1	2	算出不能*	99 (1)
ピーナッツ油	1	2	101 (3)	92 (2)
ピーナッツバター	1	2	算出不能*	100 (6)
ハニーローストピーナッツ	5	2	算出不能*	81 (4)
ごまビスケット	5	2	116 (8)	86 (2)

* 食品由来の妨害ピークがTBHQのピークに重なり定量値の算出は不能

表 2 本法の併行精度と室内精度

試料	試料採取量 g	添加濃度 μg/g	平均回収率 %	併行精度	室内精度
				%	%
ピーナッツバター	1	2	100	2	5
ハニーローストピーナッツ	5	2	82	3	5

文献

- 1) 輸入食品監視業務ホームページ
<http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/tp0130-1.html>
- 2) 平成 12 年 3 月 30 日付衛化第 15 号厚生省生活衛生局食品化学課長通知別添「第 2 版食品中の食品添加物分析法」(2000) .
- 3) 平成 17 年 3 月 3 日付食安監発第 0303001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長

通知「tert-ブチルヒドロキノン (TBHQ) に係る試験法について」(2005) .

- 4) 祭原ゆかり, 三橋隆夫: 活性炭カートリッジを用いた食品中 tert-ブチルヒドロキノン (TBHQ) の HPLC 簡易分析法, 兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要 5 号, 61-64 (2008) .
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について”平成 22 年 12 月 24 日, 食安発第 1224 第 1 号 (2010).

「いわゆる健康食品」に含まれる 勃起不全治療効果を示す医薬品成分の分析

武田章弘* 浅田安紀子* 田上貴臣* 土井崇広*
 梶月由香* 梶村計志* 沢辺善之*

強壮効果を標榜する健康食品について、勃起不全治療効果を示す医薬品成分が添加されていないか監視することを目的として試買調査を実施した。その結果、試買した9検体のうち6検体から医薬品成分または医薬品成分の類似体が検出された。

キーワード：健康食品、医薬品成分、勃起不全治療薬

Key words: health food, medicinal ingredients, drugs for treating erectile dysfunction

人々の健康に対する意識や関心の高まりを背景にインターネットの普及による入手の手軽さ等から、健康食品は我が国において大きな市場を形成している。しかし、一部の健康食品には効果の増強を目的に医薬品として用いられる成分が違法に添加されている場合^{1,2)}があり、それらを服用したことによる健康被害が報告されている³⁻⁵⁾。

大阪府では、違法な健康食品による健康被害の未然防止および拡大防止のため、インターネット等で販売されている製品を対象とし、試買調査を行っている。本稿では、平成23年度に行われた、大阪府における試買調査の結果について報告する。

調査方法

1) 検体

インターネット上で販売されている9品目を購入し、検体とした。

2) 標準品および試薬

クエン酸シルデナフィル、タダラフィル、キサントアントラフィル、バルデナフィル、ホンデナフィルは

国立医薬品食品衛生研究所から、ホモシルデナフィルは東京都健康安全研究センターから、メチソシルデナフィルは千葉県衛生研究所から提供を受けた。ホモチオデナフィル、チオアイルデナフィル、ヒドロキシチオホモシルデナフィルはTLC pharmacem製、チオデナフィルはSanta Cruz Biotechnology製、アミノタダラフィルはToronto Research Chemicals製を使用した。また、アミノタダラフィル、ヒドロキシホモシルデナフィルは平成22、23年度の試買調査で当該成分が検出された製品を、プソイドバルデナフィルは平成18年度の試買調査で当該成分が検出された製品を陽性対照として用いた。トルブタミド、グリベンクラミド、グリクラジド、ヨヒンビン塩酸塩を含む、その他試薬類はすべて市販品を用いた。

3) 装置

医薬品成分または医薬品成分の類似体の分析には、以下のシステムを使用した。

システム1

高速液体クロマトグラフ（HPLC）； Prominence（島津製作所）

フォトダイオードアレイ紫外可視検出器（PDA）；
 SPD-M10AVP（島津製作所）

システム2

高速液体クロマトグラフ（HPLC）； LC-10
 CLASS-VP システム（島津製作所）

フォトダイオードアレイ紫外可視検出器（PDA）；
 SPD-M20A（島津製作所）

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課

Determination of Medicinal Ingredients for Treating Erectile Dysfunction
 in Health Food.

by Akihiro TAKEDA, Akiko ASADA, Takaomi TAGAMI, Takahiro DOI,
 Yuka SATSUKI, Keiji KAJIMURA and Yoshiyuki SAWABE

システム 3

高速液体クロマトグラフ (HPLC) ; Alliance HPLC システム (Waters)

フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 (PDA) ; 2998 フォトダイオードアレイ検出器 (Waters)

システム 4

高速液体クロマトグラフ (HPLC) ; Prominence UFLC (島津製作所)

フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 (PDA) ; SPD-M10AVP (島津製作所)

質量分析計 (MS) ; LCMS2020 (島津製作所)

4) 試料溶液の調製

試料溶液は下記の通り試料原液を調製後、適宜メタノールで希釈して調製した。

調整法(1) : 硬カプセル剤は内容物全量またはその一部を、錠剤は 1 個またはすりつぶした後、その一部をポリチューブにとり、70%メタノール 10 mL を加え、15 分間超音波抽出を行った。その後、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、試料原液とした⁶⁾。

調整法(2) : 硬カプセル剤は内容物の一部を、錠剤はすりつぶした後、その一部をポリチューブにとり、1% ギ酸溶液/アセトニトリル混液 (1 : 4) 10 mL を加え、5 分間超音波抽出を行った。次いで、遠心分離を行い、上澄液 1 mL をとり、アセトニトリル/5 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH3.5) 混液 (1 : 3) 1 mL を加え、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、試料原液とした^{7,8)}。

5) 標準溶液・陽性対照溶液の調製

各標準原液および陽性対照原液は下記の通り標準原液および陽性対照原液を調製後、適宜メタノールで希釈して使用した。

[医薬品成分 : シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、トルブタミド、グリベンクラミド、グリクラジド、ヨヒンビン塩酸塩および医薬品類似成分 : キサントアントラフィル、ホンデナフィル、ホモチオデナフィル、チオデナフィル、チオアイルデナフィル、ヒドロキシチオホモシルデナフィル、アミノタダラフィル標準原液の調製]

各医薬品成分および、その化学構造の一部を変化させた類似体 (以下、類似体と記載する) について

100-1000 μ g/mL となるように、メタノールを加えて溶解し、標準原液とした。

[ヒドロキシホモシルデナフィル、アミノタダラフィル陽性対照原液の調製]

ヒドロキシホモシルデナフィル、アミノタダラフィル陽性対照「夢」(平成 22 年度試買品目) もしくは今年度ヒドロキシホモシルデナフィル、アミノタダラフィルが検出された検体「真珠」のカプセル内容物全量もしくは約 10mg をとり、70%メタノール 10 mL を加え、15 分間超音波抽出を行った。その後、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、陽性対照原液とした。
[プソイドバルデナフィル陽性対照原液の調製]

プソイドバルデナフィル陽性対照「性春源」(平成 18 年度試買品目) 約 10 mg をとり、メタノール 10 mL を加え、15 分間超音波抽出を行った。その後、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、陽性対照原液とした。

[ホモシルデナフィル標準原液の調製]

東京都より提供を受けたホモシルデナフィル標準原液 (75.5 μ g/mL) を使用した。

[メチソシルデナフィル標準原液の調製]

千葉県より提供を受けたメチソシルデナフィル 100 μ g にメタノールを 1 mL 加えて溶解し、標準原液とした。

6) 測定条件

測定条件は以下の方法を用いた。また、グラジエント条件、アイソクラティック条件、注入量、流量、質量範囲は適宜変更した。

HPLC-PDA 測定条件(1) : 移動相 A ; アセトニトリル / 水 / リン酸混液 (100 : 900 : 1, 5 mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有)、移動相 B ; アセトニトリル / 水 / リン酸混液 (900 : 100 : 1, 5 mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有)、カラム ; L-column ODS (化学物質評価研究機構、150 mm $\times$ 4.6 mm、5 μ m)、カラム温度 ; 40 $^{\circ}$ C、検出波長 ; 200- 400 nm、流量 ; 1.0 mL/min、グラジエント条件 ; 0 分 (A/B : 90/10) $\rightarrow$ 25 分 (A/B : 55/45) $\rightarrow$ 44 分-49 分 (A/B : 10/90) $\rightarrow$ 50-70 分 (A/B : 90/10)、注入量 ; 20 μ L⁶⁾

HPLC-PDA 測定条件(2) : 移動相 A ; アセトニトリル / 5 mmol/L ギ酸アンモニウム (pH 3.5) 混液 (1 : 3)、移動相 B ; アセトニトリル、カラム ; L-column ODS (150

mm×4.6 mm、5 μm)、カラム温度；40 °C、検出波長；200- 400 nm、流量；1.0 mL/min、グラジエント条件；0-3 分 (A/B：100/0) →13-20 分 (A/B：70/30) →30 分 (A/B：50/50) →31-50 分 (A/B：100/0)、注入量；20 μL⁷⁾

HPLC-PDA 測定条件(3)：移動相 A；10 mmol/L 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 10.0)、移動相 B；アセトニトリル、カラム；L-column ODS (150 mm×4.6 mm、5 μm)、カラム温度；40 °C、検出波長；200- 400 nm、流量；1.0 mL/min、アイソクラティック条件；A/B：50/50、注入量；20 μL⁹⁾

HPLC-MS 測定条件(1)：移動相 A；アセトニトリル/5 mmol/L ギ酸アンモニウム (pH 3.5) 混液 (1：3)、移動相 B；アセトニトリル、カラム；Ascentis express C18 (SUPELCO、75 mm×2.1 mm、2.7 μm) 又は Inertsil ODS-4 (GL Science、100 mm×2.1 mm、3 μm)、カラム温度；40 °C、流量；0.2 mL/min、グラジエント条件；0-3 分 (A/B：100/0) →13-20 分 (A/B：70/30) →30 分 (A/B：50/50) →31-50 分 (A/B：100/0)、注入量；1 μL、イオン化法；ESI/ positive, scan モード (m/z ：50-800)、乾燥ガス流量；600 L/h、検出器電圧；1.5 kV、DL 温度；250 °C、DL 電圧；0 V、インターフェイス電圧；4.5 kV、ネブライザーガス流量；90 L/h^{7,8)}

HPLC-MS 測定条件(2)：移動相 A；10 mmol/L 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 10.0)、移動相 B；アセトニトリル、カラム；Ascentis express C18 (75 mm×2.1 mm、2.7 μm) 又は Inertsil ODS-4 (100 mm×2.1 mm、3 μm)、カラム温度；40 °C、流量；0.3 mL/min、アイソクラティック条件；A/B：60/40、注入量；1 μL、イオン化法；ESI/ positive, scan モード (m/z ：50-800)、乾燥ガス流量；600 L/h、検出器電圧；1.5 kV、DL 温度；250 °C、DL 電圧；0 V、インターフェイス電圧；4.5 kV、ネブライザーガス流量；90 L/h⁹⁾

結果

1) スクリーニングによる医薬品成分の探索

平成 23 年度の試買調査においては、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、トルブタミド、グリベンクラミド、グリクラジド、ヨヒンビン塩酸塩、キサントアントラフィル、ホンデナフィルを測定対象成分とした。以上の医薬品成分および類似体を対象として、9 検体についてスクリーニングを行った。試料溶

液は 4) 試料溶液の調製の 1.により調製し、測定は 6) 測定条件の 1.および 2. (2) による HPLC-PDA または HPLC-MS を用いて行った。その結果、9 製品中 2 製品についてはシルデナフィルの含有が疑われた。また、上記以外のうち 4 製品については、1 種類以上の類似体の含有が疑われた。

2) 医薬品成分の確認と含量の推定

医薬品成分および類似体の含有が疑われた 6 製品について、HPLC-MS により確認を行った。その結果、標準品または陽性対照と保持時間およびマススペクトルが一致し、医薬品成分または類似体の含有が確認された (表 1)。検出された成分のうち、シルデナフィルを除いた 9 種類は、医薬品成分の構造の一部を変化させた類似体であった。

さらに HPLC-PDA または HPLC-MS により各検体の 1 錠または 1 カプセルの含量の推定を行った。結果を表 1 に示す。

考察

今回の試買調査において、2 製品の健康食品からは 1 錠あたり 96mg、153mg のシルデナフィルが検出された。これは医薬品として服用されるシルデナフィルの 1 回服用量である 25～50mg を大幅に超えている。そのため、医薬品として承認されている製剤を服用する場合に比べ、強い作用を示すことが考えられ、当該健康食品を服用することによる健康被害が懸念された¹⁰⁾。

また、残りの 4 製品の健康食品から、医薬品として承認された成分の化学構造の一部を変えた類似体が 9 種類検出された。これらは医薬品として承認を受けておらず、安全性が全く考慮されていないため、服用により予期せぬ副作用が生じることが危惧された。

本稿に示すように、健康食品の中には医薬品成分やその類似体を含有するものがあり、それらによる健康被害が懸念されるところである。これらの成分が違法に添加された健康食品を服用することによる健康被害を未然に防止する為に、今後も試買調査を続けていくことは重要であると考えます。

近年、健康食品からは既存の医薬品成分のみならず、摘発を逃れるために、その化学構造の一部を変化させ

表1 試料溶液の調製方法、測定条件と定量結果

検体名	検出された成分	試料溶液 の調製法 ^{*1}	検出器	測定 条件 ^{*2}	測定波長 (nm) /測定イオン (m/z)	確認/定量 ^{*3}	含量 ^{*4}
ラッキー ボーイ	シルデナフィル	1	PDA	1	290	定量	96
		2	MS	1	-	確認	
男性 DNA(II) カプセル	シルデナフィル	1	PDA	1	290	定量	153
		2	MS	1	-	確認	
亀王糖減	プソイドバルデナ フィル	1	PDA	1	254	定量	2
		2	MS	1	-	確認	
真珠	アミノタダラフィル	1	PDA	1	270	確認	10
		2	MS	1	391	定量	
	ヒドロキシホモ シルデナフィル	1	PDA	1	270	確認	68
		2	MS	1	505	定量	
キンタン ウイリー 【飲用タイプ】	ホモチオデナフィル	1	PDA	3	290	定量	53
		2	MS	2	-	確認	
	チオデナフィル	2	PDA	3	349	定量	3
		2	MS	1	-	確認	
	ホモシルデナフィル	2	PDA	3	290	定量	1
		2	MS	1	-	確認	
マックス エナジー 男性用 (MEM)	チオデナフィル	2	PDA	3	290	定量	5
		2	MS	2	-	確認	
	チオアイルデナフィル	2	PDA	3	290	定量	10
		2	MS	1	-	確認	
	ヒドロキシチオホモ シルデナフィル	2	PDA	2	290	定量	13
		2	MS	1	-	確認	
	アミノタダラフィル	2	PDA	3	290	定量	10
		2	MS	1	-	確認	
	メチソシルデナフィル	2	PDA	3	290	定量	53
		2	MS	2	-	確認	

*1 調査方法、4)試料溶液の調製

*2 調査方法、6)測定条件

*3 「確認」は含有の疑われる成分の同定を行った。「定量」は含有が認められた成分の含量の推定値(mg)を求めた。

*4 含量は1錠または1カプセルあたりの推定値(mg)

た類似体が多数検出されている。そのため、健康食品に配合された医薬品成分やその類似体を見逃さず、迅速かつ適切に対応する事が必要である。そのために、医薬品成分の検出事例を収集し、陽性対照や標準品を可能な限り保有し、その分析条件を検討するなど、多数の医薬品成分を検出可能とする体制を構築する必要があると考える。また、情報の共有や陽性対照の共有などについて地方自治体間の連携も重要であると考え

る。

以上により、大阪府の健康食品中の医薬品成分および類似体に対する検査体制を強化し、健康食品による府民の健康被害を未然に防止する事を目指す。

謝辞

本調査にあたり、標準品を提供して頂き、有益な助言をいただいた、国立医薬品食品衛生研究所 合田幸広生薬部長、東京都健康安全研究センター医薬品研究科の皆様、千葉県衛生研究所 長谷川貴志研究員、高橋市長研究員、神奈川県衛生研究所 熊坂謙一主任研究員に深謝いたします。

文献

- 1) 守安貴子, 重岡捨身, 岸本清子, 石川ふさ子, 中嶋順一, 上村尚, 安田一郎: 健康食品中に含有するシルデナフィルの確認試験, 薬学雑誌, **121** (10), 765-769(2001)
- 2) 熊坂謙一, 小島尚, 土井佳代, 佐藤修二: 健康食品に添加されていた経口血糖降下薬グリベンクラミドの検出事例、薬学雑誌, **123** (12), 1049-1054(2003)
- 3) 守安貴子, 岸本清子, 中嶋順一, 重岡捨身, 箕輪佳子, 上村尚, 安田一郎: 健康被害を起こした中国製ダイエット健康食品における検査結果, 東京都健康安全研究センター年報, **54**, 69-73 (2003)
- 4) 神村英利, 吉田都, 富永博之, 宮崎悟, 藤岡稔大, 佐々木悠, 加留部善晴: 中国産健康食品「圣首牌莽芪胶囊 (Qiao Qi Jiao Nang)」とグリメピリドの併用による低血糖, 医療薬学, **32**(5), 407-413 (2006)

- 5) 安田一郎: 健康食品に含まれる医薬品類似成分, 食品衛生学雑誌, **51**(6), 402-407 (2010)
- 6) 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, 千葉県衛生研究所年報, **55**, 74-78 (2006)
- 7) 最所和宏, 若菜大悟, 花尻 (木倉) 璃理, 合田幸広: 平成 21 年度無承認無許可医薬品の買い上げ調査について—強壮用健康食品—, 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 298-299 (2010)
- 8) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知薬食監麻発0825002号「シルデナフィル、バルデナフィル、タダラフィルの迅速分析法について」, 2005年8月25日
- 9) 高橋市長, 長谷川貴志, 西條雅明, 永田知子, 若菜大悟, 合田幸広: いわゆる健康食品中から検出されたシルデナフィル構造類似体について, 千葉県衛生研究所年報, **58**, 55-60 (2009)
- 10) ファイザー株式会社: 医薬品インタビューフォーム バイアグラ錠, 2010年11月 (改訂第11版)

固相抽出法と HPLC を用いたアセトアミノフェン及びその関連薬物の分析

岡村俊男*

アセトアミノフェンはかぜ薬の配合成分であり、一般薬として広く用いられている。さらに入手しやすいことから、誤飲事故や自殺目的での摂取による中毒例が多い。アセトアミノフェン及びその配合成分である無水カフェイン、マレイン酸クロムフェニラミン、エテンザミドの分析法を固相抽出法と HPLC により開発した。人血清に添加した結果、良好な回収率が得られた。同時に分析できる方法は中毒原因物質の究明や治療に役立つと思われる。

キーワード：HPLC、アセトアミノフェン、固相抽出

Key words: HPLC, acetaminophen, solid phase extraction

アセトアミノフェン、無水カフェイン、マレイン酸クロムフェニラミン、エテンザミド(以下、AA、CF、CP、EZ と略す。)はかぜ薬の配合成分であり、一般薬(OTC 薬)として広く用いられている。特に AA は、入手しやすいことから、誤飲事故や自殺目的での摂取による中毒事例が多く見られている。AA の 2009 年における(財)日本中毒センターへの問い合わせ件数は一般用医薬品 3,527 件中 466 件であった¹⁾。また、CF の推定経口致死量は約 10g とされるため、コーヒーなどの摂取によって中毒を起こすことはまずない。CF は薬物の配合薬として広く使用されるため、多量に体内に摂取された場合には問題となると考えられる²⁾。さらに CP の毒性は過敏症、神経過敏、頭痛などが知られている。なお、EZ は長期・大量投与により、過呼吸、貧血、腎障害、肝障害が現れることがある。なお、EZ の毒性は過敏症、神経過敏、頭痛などが知られている³⁾。いずれも大量投与により中毒症状に影響を及ぼすことから分析法の開発は重要と考えられるが、人血清からのこれら薬物の簡便な同時分析法は報告されていない。そこで、簡便な AA、CF、CP、EZ の同時分析法を固相抽出法と HPLC により開発し、若干の知見が得られたのでここに報告する。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課

Analysis of Acetaminophen and Its Related Drug by Using Solid Phase Extraction and HPLC

by Toshio OKAMURA

実験方法

1.試薬及び材料

AA、CF、CP、EZ は日本薬局方標準品(一般財団法人、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団)、フェノール(内標準物質)は和光純薬工業株式会社製を用いた。人血清(男性)AB型、血漿由来は Sigma aldrich 製を用いた。固相抽出用カラムとして多孔性ポリマーに硫酸基を導入した Oasis MCX 3cc(60mg)は waters 製(USA)を用いた。

2.装置

液体クロマトグラフ装置は LC-10A Class-vp システムを用いた。カラムオーブン CTO-10ACvp、送液ユニット LC-10ADvp、フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 SPD-M10Avp、オートインジェクタ SIL-10ADvp はいずれも島津製作所製を用いた。

3.HPLC の条件

カラム：L-columnODS 150mm×4.6mm i.d. 粒径 5μm、財団法人、化学物質評価研究機構製を用いた。カラム温度：25℃、移動相：0.1%リン酸/メタノール混液(77:23)、検出波長：254nm、流速：1.0mL/min、注入量：10μL なおピーク面積に基づき定量を行った。

4.前処理方法

標準溶液(AA、CF、CP、EZ を 50μg/mL を含有する水

溶液) 1mL、人血清 1mL、0.1mol/mL 塩酸 1mL を加え、Oasis MCX カートリッジ (あらかじめメタノールと 0.1 mol/mL 塩酸各 3mL で洗ったもの) に AA、CF、CP、EZ を吸着させた。次に 2%アンモニア・メタノールで溶出し、溶出液 2mL をとり、内標準溶液(IS)としてフェノール 1mL(100 μ g/mL)を正確に加え、HPLC 用の試料溶液とした。なお、AA、CF、CP、EZ を 10 μ g/mL を含有する水溶液も同様の操作を行った。

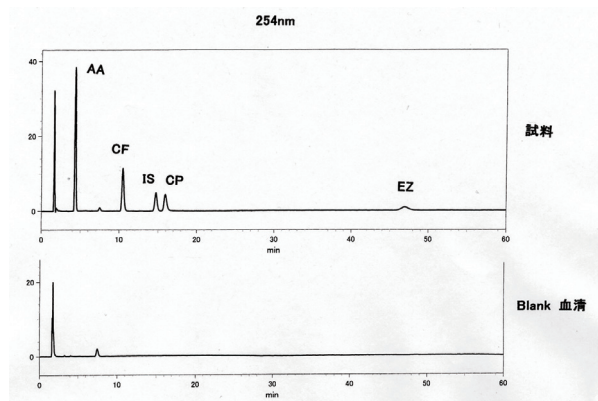


図 1. 人血清に添加したアセトアミノフェン(AA)、カフェイン(CF)、クロルフェニラミン(CP)及びエテンザミド(EZ)混合物と血清の blank のクロマトグラム (各々50 μ g/mL)

結果及び考察

図 1 に人血清にそれぞれの薬物を添加した試料のクロマトグラムを示した。人血清による妨害物質はなく AA、CF、CP、EZ 及び IS は完全分離した。又、標準溶液の UV スペクトルとの比較により、AA、CF、CP、EZ のピークの同定を行った。中毒症状を起こす血清中の濃度を考慮して人血清にこれらの薬物はそれぞれ、10 μ g/mL、50 μ g/mL を添加した。Oasis MCX カートリッジを用いた平均回収率(n=3)は 89.10%~99.52%と良好であった。(表 1)

AA、CF、CP、EZ が注入試料濃度 1 μ g~100 μ g/mL の範囲で良好な直線性を示した。(相関係数それぞれ、0.999、0.999、0.999、0.999) S/N=5 としたときの AA、CF、CP、EZ の検出限界は血中濃度としてそれぞれ、0.1 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.3 μ g/mL、0.6 μ g/mL と微量域まで分析可能であった。本研究には逆相系とイオン交換の作用を持つ Oasis MCX を用いたが、この前処理カラムは操作法が簡便である。

なお Sep-PakC₁₈ による AA の固相抽出法では添加回収率は約 45%と報告されている⁴⁾。今回の分析法の対象薬

物として AA は日本中毒学会が提唱する分析すべき薬毒物 15 品目の中の一つとしてあげられている。中毒物質としての AA の重要性は高く、さらによく使われる配合成分を同時に分析できる方法は中毒原因物質の究明や治療に役立つと思われる。

表 1. ヒト血清への AA、CF、CP、EZ の添加回収実験(n=3)

成分名	各々の薬物濃度はいずれも 10 μ g/mL		各々の薬物濃度はいずれも 50 μ g/mL	
	回収率		回収率	
	平均(%)	C.V.(%)	平均(%)	C.V.(%)
アセトアミノフェン(AA)	99.52	0.21	90.03	3.21
無水カフェイン(CF)	99.20	1.48	91.05	2.62
マレイン酸クロルフェニラミン(CP)	96.83	4.58	95.47	1.47
エテンザミド(EZ)	95.96	0.92	89.1	1.19

文献

- 1) (財) 日本中毒情報センター：2009 年受信報告，中毒研究, **23**, 137-168 (2010)
- 2) 日本薬学会編:薬毒物化学試験法と注解—第 4 版—, p.406, 南山堂, 東京 (1992)
- 3) 鈴木 修, 屋敷幹雄 編:薬毒物分析実践ハンドブック, p.420, じほう, 東京 (2002)
- 4) 安藤英治, 山口 実, 奈女良 昭, 屋敷幹雄：フォトダイオードアレイ検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)システムによる血清中の急性中毒起因物質、アセトアミノフェン、ブロムワレリル尿素、メソミル、DEP、NAC の分析, 島津評論, **57**(1-2), 109-113 (2000)

電子イオン化法を用いた GC/MS による漢方製剤中のピレスロイド系農薬を 対象とした簡便・迅速分析

田上貴臣* 武田章弘* 浅田安紀子* 青山愛倫*
土井崇広* 梶村計志* 沢辺善之*

電子イオン化法を用いた GC/MS による漢方製剤中のピレスロイド系農薬を対象とした簡便・迅速な分析法について検討を行った。9 製剤を対象として分析法の妥当性を確認したところ、8 製剤については良好な回収率及び再現性が得られた。以上のことから、今回検討を行った方法は、漢方製剤中のピレスロイド系農薬の分析法として有用であると考えられた。

キーワード：漢方製剤、残留農薬、ピレスロイド系農薬、電子イオン化法

Key words : kampo products, pesticide residue, pyrethroid pesticide, electron ionization

漢方製剤の原料である生薬は天産物であり、その多くは植物を原料としている。生薬の原料として野生品を用いる場合には、生薬に農薬が残留している可能性は低いと考えられるが、現在、生薬の主な輸入先である中国においても 6 割程度が栽培品であるといわれ、栽培時に農薬が使用される可能性がある¹⁾。わが国では、生薬中の残留農薬は、日本薬局方により規制されており、一部の生薬を対象として α -benzenhexachloride (BHC)、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC の合計である総 BHC 及び *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE)、*o,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)、*p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethane (DDD)、*p,p'*-DDT の合計である総 DDT としてそれぞれ 0.2 ppm 以下という残留基準が設定されている。一方、漢方製剤中の残留農薬は法的には規制されていないが、日本漢方生薬製剤協会は、一部の生薬を配合する漢方製剤を対象として、有機塩素系農薬について、総 BHC (0.2 ppm 以下) 及び総

DDT (0.2 ppm 以下)、ピレスロイド系農薬について、シペルメトリン (1.0 ppm 以下) 及びフェンバレーレート (1.5 ppm 以下)、有機リン系農薬について、パラチオン (0.5 ppm 以下)、パラチオンメチル (0.2 ppm 以下)、メチダチオン (0.2 ppm 以下)、マラチオン (1.0 ppm 以下) の自主的な残留基準を定めている。

これまでに生薬からは、有機塩素系農薬やピレスロイド系農薬などの検出事例がある^{2,3)}。このことから、生薬原料の栽培時にピレスロイド系農薬が使用されている可能性がある。脂溶性の農薬は、水抽出液には移行しにくく、移行した農薬についても分解や揮散により消失することが報告されている^{2,3,4)}。漢方製剤の製造方法から考えると、脂溶性の農薬が漢方製剤に高濃度に残留している可能性は低いと考えられるが、その残留実態を確認するためには残留農薬の分析を行う必要がある。我々は、負化学イオン化 (negative chemical ionization : NCI) 法を用いた質量分析計 (mass spectrometer : MS) 付きガスクロマトグラフ (gas chromatograph : GC) による漢方製剤中のピレスロイド系農薬を対象とした簡便・迅速な分析法を報告している⁵⁾。NCI 法は、塩素などを含有する電子親和性の高い化合物に対して、選択性の高いイオン化法であるため、夾雑物の多い生薬中の電子親和性の高い残留農薬の分析法として有用であるが、EI 法に比べ汎用性が低い。本研究では、汎用性の高い電子イオン化法 (electron ionization : EI) 法を用いて NCI 法と同じ試料溶

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課

Simple and Rapid Determination of Pyrethroid

Pesticide Residues in Kampo Products by Gas

Chromatography-Mass Spectrometry with Electron

Ionization. by Takaomi TAGAMI, Akihiro TAKEDA, Akiko

ASADA, Airin AOYAMA, Takahiro DOI, Keiji KAJIMURA and

Yoshiyuki SAWABE

液の分析が可能か検討を行った。

実験方法

1. 試料

平成 21 年～平成 23 年に購入した漢方製剤（医療用医薬品：補中益気湯、大建中湯、柴苓湯、加味逍遙散、小柴胡湯、麦門冬湯、牛車腎気丸、六君子湯、小青竜湯）を用いた。これらの 9 製剤は、いずれもわが国で販売及び輸入金額が上位 10 位以内であり、多くの製品が国内で流通している。

2. 対象農薬

日本漢方生薬製剤協会では、漢方製剤中のピレスロイド系農薬を対象とした自主基準として、シペルメトリン及びフェンバレーートの残留基準を定めている。また、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⁶⁾では、シペルメトリン、フェンバレーートは、それぞれ検出数上位 1 位及び 2 位であることから、シペルメトリン及びフェンバレーートを対象とした。

3. 試薬

農薬標準品は、Dr. Ehrenstorfer GmbH.から購入した。その他の試薬は、和光純薬工業株式会社製を用いた。

4. 標準溶液の調製

各農薬標準品をノルマルヘキサン（以下、ヘキサンと記載する）に溶解し、標準原液(500 ppm)とした。各標準原液を混合したものを添加用標準溶液（5 ppm）とした。添加用標準溶液をヘキサンの希釈して標準溶液とした。

5. 試料溶液の調製

試料溶液は、NCI 法を用いた GC/MS による分析法⁵⁾に準じて調製した。粉碎した漢方製剤 5 g をポリチューブに採取し、アセトン 10 mL 及びヘキサン 20 mL を加え、30 分間振とうし、遠心分離した。上澄みに水 20 mL を加え、5 分間振とうした。ヘキサン層 5 mL をとり、無水硫酸ナトリウム 1 g を加えて脱水した。ヘキサン層 2 mL をとり、ヘキサン 3 mL を加えて混合し、試料溶液（試料換算：0.1 g/mL）とした。

6. 装置及び測定条件

GC-MS は、Agilent 6890N GC-5973N MSD を用いて以下の条件で測定した。測定条件は、NCI 法を用いた GC/MS による分析法⁵⁾を参考に設定した。カラム:DB-1701(0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 μm (Agilent)、キャリアガス：ヘリウム、キャリアガス流量：1.7 mL/分、注入口温度：200℃、カラム温度：初期温度 50℃で 1 分間保持した後、100℃まで 30℃/分で昇温した。その後、270℃まで 25℃/分で昇温し、270℃で 20 分間保持した。インターフェース温度：270℃、イオン源温度：230℃、注入量：2 μL、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 (*m/z* : 181 [定量イオン]、163)、フェンバレーート (*m/z* : 167 [定量イオン]、125)

GC/MS を安定化させるため、試料溶液を数回注入した後に、分析を行った。

結果及び考察

1. 直線性

標準原液を段階的に希釈し、20-1000 ppb の範囲で直線性を検討したところ、相関係数は 0.9986（シペルメトリン）及び 0.9974（フェンバレーート）であり、良好な直

表1 添加回収試験

漢方製剤	シペルメトリン		フェンバレーート	
	平均回収率(%)	相対標準偏差(%)	平均回収率(%)	相対標準偏差(%)
補中益気湯	108.8	1.1	103.9	1.7
大建中湯	116.3	4.2	107.0	3.4
柴苓湯	94.3	2.9	88.3	4.8
加味逍遙散	112.7	3.9	101.3	4.7
小柴胡湯	109.9	3.0	104.7	3.7
麦門冬湯	104.7	4.1	102.3	3.2
牛車腎気丸	110.3	3.3	108.1	4.9
六君子湯	112.4	3.5	100.4	4.4
(n=3)				

線性を示した。また、漢方製剤における定量限界はいずれも 0.2 ppm であった。

2. 添加回収試験

漢方製剤を対象として添加回収試験を行った。対象とした漢方製剤は、1. 試料に示した 9 製剤である。添加濃度は、自主基準を参考とし、1.0 $\mu\text{g/g}$ と設定した。添加回収試験の結果、小青竜湯以外の 8 製剤について、回収率は 88.3%-116.3%、相対標準偏差は 10% 以下であった(表 1)。これらの結果から、EI 法を用いた場合においても、小青竜湯以外の 8 製剤に残留するピレスロイド系農薬を十分な真度及び精度をもって分析することが可能であると考えられた。

また、小青竜湯以外の 8 製剤のブランク試料溶液からは、妨害となるピークは認められなかった。例として標準溶液、小柴胡湯のブランク試料溶液から得られたクロマトグラムを図 1 に示した。

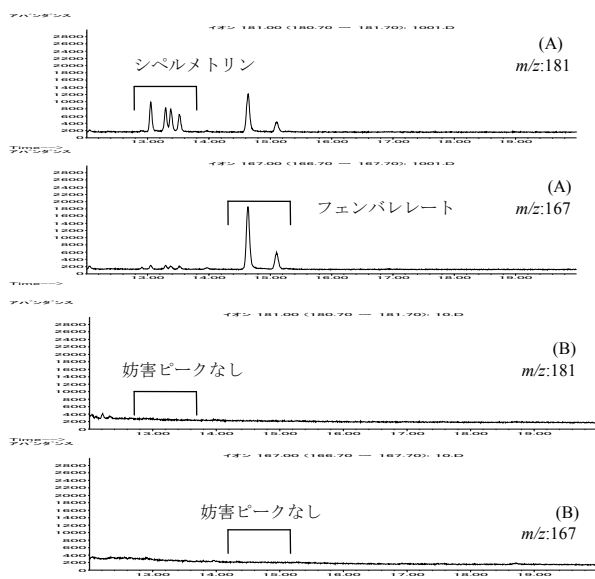


図1 EI法を用いたGC/MSによる小柴胡湯のクロマトグラム

- (A) 標準溶液 (各農薬: 0.1 ppm),
(B) 小柴胡湯 (ブランク試料溶液)

小青竜湯については、試料に由来する妨害ピークが認められたことから、EI 法で分析することは困難であると考えられた。図 2 に標準溶液、小青竜湯のブランク試料溶液のクロマトグラムを示した。更に、比較のために NCI 法を用いたクロマトグラムを図 3 に示した。

NCI法を用いたGC/MSによる測定条件はイオン源温度(180℃)を除き、EI法と同じ条件とした。また、モニタリングイオンは、シペルメトリン (m/z : 207 [定量イオン]、171)、フェンバレート (m/z : 211 [定量イオン]、213) とした。小青竜湯から得られた試料溶液については、EI 法では妨害を受け、NCI 法では妨害を受けなかったことから、今回測定対象とした農薬については、EI 法に比べ NCI 法の方が選択性が高いと考えられた。しかし、NCI 法に比べ EI 法は一般的に使用されていることから、適用可能な製剤が限られるが、今回検討した分析法は、漢方製剤中のピレスロイド系農薬の簡便・迅速な分析に有用であると考えられた。

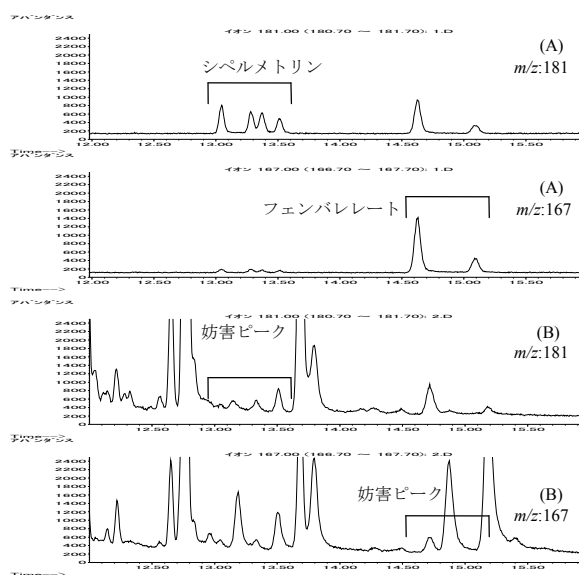


図2 EI法を用いたGC/MSによる小青竜湯のクロマトグラム

- (A) 標準溶液 (各農薬: 0.1 ppm),
(B) 小青竜湯 (ブランク試料溶液)

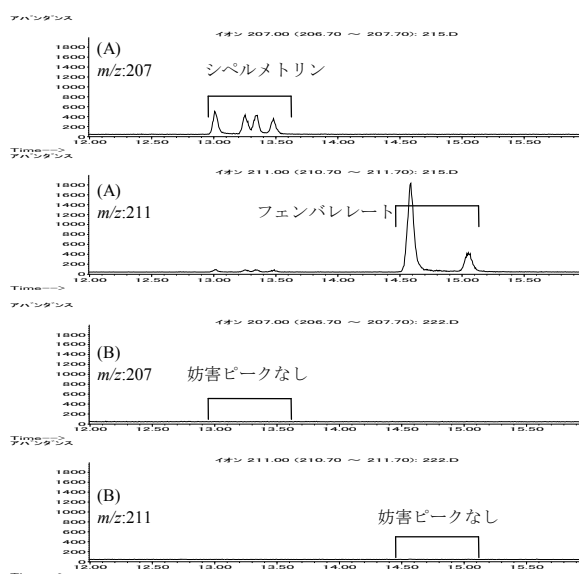


図3 NCI法を用いたGC/MSによる小青竜湯のクロマトグラム

- (A) 標準溶液 (各農薬: 0.1 ppm),
(B) 小青竜湯 (ブランク試料溶液)

結論

EI 法を用いた GC/MS による漢方製剤中のピレスロイド系農薬の分析法を検討した。一部の製剤については試料由来の妨害ピークが認められたが、国内で販売されている主要な製剤について良好な回収率及び再現性が得られた。以上のことにより、本分析法は漢方製剤中のピレスロイド系農薬の簡便・迅速な分析法として有用であると考えられた。

文献

- 1) 西澤秀男：生薬中の農薬残留分析の現状とポジティブリスト制，防菌防黴，**35**，831～838（2007）
- 2) 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）
- 3) 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，東京都健康安全研究センター年報，**55**，43～47（2004）
- 4) 佐藤正幸，姉帯正樹，鎌倉浩之，合田幸広：生薬に含まれる有機リン系農薬の漢方処方煎液への移行，医薬品研究，**41**，458～468（2010）
- 5) Takaomi Tagami, Keiji Kajimura, Katsuhiko Yamasaki, Yoshiyuki Sawabe, Chie Nomura, Shuzo Taguchi, Hiroataka Obana, Simple and Rapid Determination of Cypermethrin and Fenvalerate Residues in Kampo Products by Gas Chromatography / Mass Spectrometry with Negative Chemical Ionization. *Journal of Health Science*, **55**, 777-782 (2009)
- 6) 佐藤元昭：中国における食品安全と検査状況，食品衛生学雑誌，**50**，J-9～J-11（2009）

大阪府における環境および食品中放射能調査

（平成 23 年度報告）

肥塚 利江* 東 恵美子*

大山 正幸* 足立 伸一*

平成 23 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 134、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。

また、平成 22 年度末より行っていた福島第 1 原子力発電所の事故を受けたモニタリングの強化を引き続き文部科学省の指示により行った。内容は、モニタリングポストの空間放射線量率調査、毎日の上水（蛇口水）および定時降下物のガンマ線核種分析、さらにサーベイメータによる地上 1 m における空間放射線量率調査であった。

平成 23 年度の環境および各種食品中の放射能および放射線の測定の結果、降下物、大気浮遊じん、上水原水において福島第 1 原子力発電所の事故に由来すると考えられるセシウム 134 およびセシウム 137 が検出された。しかし、そのレベルは低く、府民への健康影響には全く問題のないレベルであった。また、本年度も上水原水（淀川河川水）から医学利用に由来すると考えられる極微量のヨウ素 131 を検出したが、その濃度は約 1.0 mBq/L であり、飲食物の摂取制限に関する指標値（300 Bq/kg 以上）から判断して、府民への健康影響には全く問題のないレベルであった。

また、福島第 1 原子力発電所の事故に伴うモニタリング強化において、空間放射線量率の異常値や人工放射性物質は検出されなかった。

さらに、ガンマ線核種分析の精度確認のため（財）日本分析センターとのクロスチェック（標準試料法による相互比較分析）を行った結果、ガンマ線核種分析の精度は確保されていることを確認した。

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 134 (^{134}Cs)、セシウム 137 (^{137}Cs)、ヨウ素 131 (^{131}I)、カリウム 40 (^{40}K) 等）を行った。また、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、既知量の放

* 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 2011 Report)

by Toshie HIZUKA, Emiko AZUMA, Masayuki OHYAMA and Shin-ichi ADACHI

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／平成24年1～3月	17
ガンマ線核種分析	大気浮遊じん		大阪市東成区 当所屋上	3ヶ月毎	4
	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23年6月)	1
		蛇口水	大阪市東成区 当所本館1F	年1回(平成23年6月)	1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(平成23年7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(平成23年7月)	1
					1
	土壌	0～5cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成23年7月)	1
		5～20cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成23年7月)	1
	牛乳	原乳(生産地)	大阪府羽曳野市	年1回(平成23年8月)	1
	野菜	タマネギ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成23年7月)	1
		キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成24年2月)	1
ガンマ線核種分析	相互比較分析試料 (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23年9月)	1
		模擬土壌	(財)日本分析センターで調製	年1回(平成23年9月)	1
		寒天	(財)日本分析センターで調製	年1回(平成23年9月)	5
	降下物	雨水・ちり	大阪市東成区 当所屋上	毎日／～平成23年12月27日	271
	モニタリング強化 上水	蛇口水 蛇口水(3ヶ月)	大阪市東成区 当所本館1F 大阪市東成区 当所本館1F	毎日／～平成23年12月27日 3ヶ月毎／平成24年1～3月	271 1
空間線量率	モニタリングポスト		大阪市東成区 当所屋上	毎日／年間	366
	モニタリング強化 サーベイメータ		大阪市東成区 当所中庭	毎日／平成23年6月13日～12月27日	198
			大阪市東成区 当所中庭 大阪府内18カ所	毎月／平成24年1～3月 1回(平成23年6月)	3 18

放射性核種を添加した試料7検体について、クロスチェック（標準試料法による相互比較分析）を行った。

さらに、平成23年3月11日の東北地方太平洋沖地震により発生した福島第1原子力発電所の事故を受け、昨年度に引き続き、文部科学省の指示により、モニタリングポストの空間放射線量率調査、上水（蛇口水）および定時降下物のガンマ線核種分析、さらにサーベイメータによる地上1mにおける空間放射線量率調査を行った。

本報告では、平成23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23年度）」¹⁾に基づいて行った。表1に調査項目および試料等を示す。

1. 全ベータ放射能測定

1-1 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（表面積1000cm²）で雨水を集めた。毎朝9時30分に採取し、100mL（1mm）以上の降水について、100mL

を測定試料とした。但し、年度当初から12月末までは、モニタリング強化の降下物試料の採取に降水採取用のデポジットゲージを使用するため、降水試料の全ベータ放射能測定は休止した。

1-2 測定方法

試料100mLにヨウ素担体（1mgI⁻/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。3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 10000m³）とした。

(2) 降下物（雨水・ちり）：当所観測室屋上（地上約 20 m）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 1 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（時期および測定数は表 1 を参照）。

(4) 食品：牛乳は、2L を直接マリネリビーカー（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、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 を直接マリネリビーカー（2L 容）に入れ測定用試料とした。土壌および海底土は、採取後に 105℃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) 標準試料法による相互比較分析：（財）日本分析センターが数核種を添加して調製した放射能標準容積線源（寒天）（以下「寒天」という）および放射能標準容積線源（模擬土壌（アルミナ））（以下「模擬土壌」という）ならびに分析比較試料（模擬牛乳）（以下「模擬牛乳」という）について、寒天（U-8 容器：5 試料）および模擬土壌（U-8 容器：1 試料）は U-8 容器のまま、また、模擬牛乳（1 試料）は全量（2L）を直接マリネリビーカー（2L 容）に入れ、測定を行った。

測定結果については（財）日本分析センターにおいて、基準値（添加値）との比較および評価を行った。評価は、当方（分析機関）と基準値の拡張不確かさ（ U ）から En 数を算出し、 $|En| \leq 1$ を基準値内（基準値と一致）とした。なお、 En 数は下記の式により求められる。

$$En \text{ 数} = \frac{(\text{分析値}_{\text{分析機関}} - \text{基準値})}{\sqrt{U^2_{\text{分析機関}} + U^2_{\text{基準値}}}}$$

2-2 測定方法

あらかじめエネルギーの異なる核種を含んだ標準線源を用いてエネルギー校正および検出効率校正を行ったゲルマニウム半導体検出器（キャンベラ製 GC2018）を用い、試料中の核種より放出されるガンマ線量を測定した。測定時間は原則 80000 秒とし、相互比較分析の寒天のみ 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（¹³⁴Cs, ¹³⁷Cs, ¹³¹I および ⁴⁰K 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）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）。

4. 原子力災害に対するモニタリング強化

4-1 モニタリングポストによる空間放射線量率調査

前年度に引き続き、12 月 27 日までの毎日、前日午前 10 時から当日午前 9 時までのデータを 10 時までにとりまとめ、文部科学省へ報告した。平成 24 年 1 月からは、平日のみ同様の報告を行った。

4-2 ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析

(1) 測定試料

1) 降下物（定時降下物）：前年度に引き続き、12 月 27 日までの毎日、前日 9 時から当日 9 時までの 24 時間に降水用デポジットゲージ（表面積 1000 cm²）で採取された降水、降水がなければ 160 mL の精製水でデポジットゲージについたちりを洗い流して採取し、80mL を U-8 容器に入れ測定用試料とした。

2) 上水（蛇口水）：前年度に引き続き、12 月 27 日までの毎日、当日午後に当所本館 1 階実験室内蛇口から採水した上水を 2 L メスシリンダーで量り取り 2 L 容マリネリビーカーに入れ測定用試料とした。また、平成 24 年 1 月以降は平日毎に当所本館 1 階実験室内蛇口から採水した上水 1.5 L をメスシリンダーで量り取り、3 ヶ月分（約 90L）を集めて上水自動濃縮装置を用いて

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23年 4月	92	モニタリング強化のため休止 (平成23年4月～12月)		
平成23年 5月	279			
平成23年 6月	189			
平成23年 7月	134			
平成23年 8月	219			
平成23年 9月	221			
平成23年10月	149			
平成23年11月	84			
平成23年12月	14			
平成24年 1月	32	2 (0)	ND	ND
平成24年 2月	100	7 (1)	ND ～ 0.28	11.43
平成24年 3月	124	8 (1)	ND ～ 0.51	5.63
平成23年度	1637	17 (2)	ND ～ 0.51	17.1
過去3年間の値				
平成20年度	1415	86 (7)	ND ～ 0.7	39.4
平成21年度	1169	86 (13)	ND ～ 0.6	28.6
平成22年度	1436	78 (13)	ND ～ 0.7	36.9

ND:計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

蒸発濃縮し、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。

(2) 測定方法

2-2 と同様の方法でガンマ線核種分析を行った。測定時間は 20000 秒とした。降下物データは当日 17 時までに、上水データは翌日 10 時までに文部科学省へ報告した。平成 24 年 1 月～3 月の上水試料においては、測定時間を 80000 秒とし、測定終了後すみやかに文部科学省へ報告した。

4-3 サーベイメータによる空間放射線量率調査

6月13日より12月27日までの毎日、午前10時に当所中庭においてサーベイメータ（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。測定は、平成20年度まで行われていたサーベイメータ調査の方法（「環境放射能水準調査委託実施計画書（平成20年7月）」²⁾）に準じて行った。即ち、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。但し、文部科学省の指示により上記計画書で加えることとなっている宇宙線による線量率30 nGy/hは、加えていない。平成24年1月以降は毎月第2週目の水曜日の午前10時に同様に測定を行った。また、6月27～30日に府営公園18カ所で同様の測定を行った。

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、平成 24 年 1 月以降の 17 試料中 2 例から検出されたが、異常値は検出されなかった。

2. 核種分析

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

(1) ^{134}Cs および ^{137}Cs : 今年度も例年同様、 ^{137}Cs が土壌、海底土の各試料から検出されたが、そのレベルは過去の値と同程度であった。しかし、そのほかに ^{137}Cs が大気浮遊じんの第 1 四半期 (0.68 mBq/m^3)、降下物の 4～9 月 ($0.066 \sim 7.9 \text{ MBq/km}^2$) および上水原水試料 (0.23 mBq/L) より検出され、さらに ^{134}Cs が大気浮遊じんの第 1 四半期 (0.63 mBq/m^3)、降下物の 4～7 月、9、10 月 ($0.036 \sim 8.3 \text{ MBq/km}^2$) および上水原水試料 (0.33 mBq/L) より検出された。 ^{137}Cs は、昭和 63 年 (1988 年) に当所にゲルマニウム半導体検出器が配備されて以降、降下物で微量の検出例が数例あるもののそのレベルは 0.1 MBq/km^2 未満であり、今回の値は、それらに比べて大きいものもあること、また、 ^{134}Cs は、昭和 63 年 (1988 年) 以降、初めての検出であり、半減期も 2.06 年と短いこと、双方とも他に排出源も考えられないことから、平成 23 年 3 月に起こった福島第 1 原子力発電所の事故の影響であろうと考えられる。しかし、これらの放射性セシウムより受ける実効線量は下記で示すように、一般人の線量限度 1 mSv/年 に比べて十分低く、府民への健康影響には全く問題のないレベルであった。

①大気浮遊じん：約 3.1×10^{-4} mSv/年。

第1四半期の濃度の放射性セシウムを吸入し続けたと
 考えて1年間の実効線量を計算。実効線量係数を
 $^{134}\text{Cs} : 2.0 \times 10^{-5} \text{ mSv/Bq}$ 、 $^{137}\text{Cs} : 3.9 \times 10^{-5} \text{ mSv/Bq}$ 、日
 平均呼吸率を $22.2 \times 10^6 \text{ cm}^3/\text{日}$ とする³⁾。

(式)

$$^{134}\text{Cs} : 0.63\text{mBq/m}^3 \times 10^{-3}\text{Bq/mBq} \times 2.0 \times 10^{-5}\text{mSv/Bq} \times 22.2 \times 10^6\text{cm}^3/\text{日} \times 10^{-6}\text{m}^3/\text{cm}^3 \times 365 \text{ 日} \\ \doteq 1.0 \times 10^{-4} \text{ mSv/年}$$

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

試料	採取年月日	単位	¹³⁴ Cs	¹³⁷ Cs	¹³¹ I	⁴⁰ K
大気浮遊じん						
平成23年 4月～6月	H23.4.4 ～ H23.6.25	mBq/m ³	0.63 ± 0.0094	0.68 ± 0.010	ND	0.32 ± 0.042
7月～9月	H23.7.6 ～ H23.9.27	〃	ND	ND	ND	0.23 ± 0.038
10月～12月	H23.10.3 ～ H23.12.20	〃	ND	ND	ND	0.28 ± 0.041
平成24年 1月～3月	H24.1.6 ～ H24.3.20	〃	ND	ND	ND	0.19 ± 0.038
平成23年度		mBq/m ³	ND ～ 0.63	ND ～ 0.68	ND	0.19 ～ 0.32
過去3年間の値		mBq/m ³	ND	ND	ND ～ 0.016	ND ～ 0.30
降下物						
平成23年4月	H23.4.1 ～ H23.5.2	MBq/km ²	8.3 ± 0.080	7.9 ± 0.077	ND	1.2 ± 0.21
平成23年5月	H23.5.2 ～ H23.6.1	〃	1.1 ± 0.031	1.0 ± 0.029	ND	0.66 ± 0.18
平成23年6月	H23.6.1 ～ H23.7.1	〃	0.29 ± 0.018	0.28 ± 0.017	ND	1.5 ± 0.21
平成23年7月	H23.7.1 ～ H23.8.1	〃	0.11 ± 0.013	0.12 ± 0.012	ND	0.55 ± 0.18
平成23年8月	H23.8.1 ～ H23.8.31	〃	ND	0.067 ± 0.011	ND	ND
平成23年9月	H23.8.31 ～ H23.9.30	〃	0.072 ± 0.010	0.066 ± 0.0092	ND	1.9 ± 0.22
平成23年10月	H23.9.30 ～ H23.10.31	〃	0.036 ± 0.0087	ND	ND	1.5 ± 0.21
平成23年11月	H23.10.31 ～ H23.12.1	〃	ND	ND	ND	ND
平成23年12月	H23.12.1 ～ H24.1.4	〃	ND	ND	ND	0.71 ± 0.19
平成24年1月	H24.1.4 ～ H24.2.1	〃	ND	ND	ND	0.85 ± 0.19
平成24年2月	H24.2.1 ～ H24.2.29	〃	ND	ND	ND	ND
平成24年3月	H24.2.29 ～ H24.3.30	〃	ND	ND	ND	ND
平成23年度		MBq/km ²	ND ～ 8.3	ND ～ 7.9	ND	ND ～ 1.9
過去3年間の値		MBq/km ²	ND	ND ～ 0.037	ND	ND ～ 1.4
上水 原水	H23.6.29	mBq/L	0.33 ± 0.072	0.23 ± 0.044	1.0 ± 0.13	80 ± 2.5
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	0.38 ～ 0.76	64 ～ 92
上水 蛇口水	H23.6.13	mBq/L	ND	ND	ND	60 ± 2.2
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND ～ 0.42	76 ～ 85
海水	H23.7.6	Bq/L	ND	ND	ND	5.4 ± 0.39
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	3.3 ～ 4.4
海底土	H23.7.6	Bq/kg dry	ND	2.0 ± 0.30	ND	620 ± 12
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	2.2 ～ 2.4	ND	630 ～ 670
土壌 0～5cm層	H23.7.22	Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	0.98 ± 0.28 (49 ± 14)	ND (ND)	680 ± 11 (34000 ± 530)
過去3年間の値		Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	0.83 ～ 1.3 (46 ～ 69)	ND (ND)	720 ～ 770 (37000 ～ 40000)
土壌 5～20cm層	H23.7.22	Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	2.8 ± 0.26 (450 ± 40)	ND (ND)	670 ± 10 (110000 ± 1600)
過去3年間の値		Bq/kg dry (MBq/km ²)	ND (ND)	2.7 ～ 3.2 (460 ～ 570)	ND (ND)	700 ～ 730 (110000 ～ 130000)
牛乳 原乳	H23.8.30	Bq/L	ND	ND	ND	48 ± 0.94
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	47 ～ 49
農産物						
タマネギ	H23.7.14	Bq/kg生	ND	ND	ND	45 ± 0.33
キャベツ	H24.2.10	〃	ND	ND	ND	81 ± 0.51
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	42 ～ 80

ND:計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

$$^{137}\text{Cs} : 0.68\text{mBq/m}^3 \times 10^{-3}\text{Bq/mBq} \times 3.9 \times 10^{-5}\text{mSv/Bq} \times 22.2 \times 10^6\text{cm}^3/\text{日} \times 10^{-6}\text{m}^3/\text{cm}^3 \times 365 \text{ 日} \\ \rightleftharpoons 2.1 \times 10^{-4} \text{ mSv/年}$$

②降下物：約 3.8×10^{-3} mSv。

今年度の放射性セシウム降下量がすべて地面に沈着したとして、そこから長期にわたって受ける実効線量を計算。換算計数を $^{134}\text{Cs} : 1.30 \times 10^{-4}\text{mSv/MBqkm}^{-2}$ 、 $^{137}\text{Cs} : 2.69 \times 10^{-4} \text{ mSv/MBqkm}^{-2}$ とする^{4,5)}とする。

(式)

$$^{134}\text{Cs} : 9.9 \text{ MBqkm}^{-2} \times 1.30 \times 10^{-4} \text{ mSv/MBqkm}^{-2} \\ \rightleftharpoons 1.3 \times 10^{-3} \text{ mSv}$$

$$^{137}\text{Cs} : 9.4 \text{ MBqkm}^{-2} \times 2.69 \times 10^{-4} \text{ mSv/MBqkm}^{-2} \\ \rightleftharpoons 2.5 \times 10^{-3} \text{ mSv}$$

③上水原水：約 6.8×10^{-6} mSv/年。

検出された濃度の放射性セシウムを飲み続けたとして 1 年間の実効線量を計算。実効線量係数を $^{134}\text{Cs} : 1.9 \times 10^{-5} \text{ mSv/Bq}$ 、 $^{137}\text{Cs} : 1.3 \times 10^{-5} \text{ mSv/Bq}$ ³⁾、1 日の水分摂取量を 2L とする。

(式)

$$^{134}\text{Cs} : 0.33\text{mBq/L} \times 10^{-3}\text{Bq/mBq} \times 1.9 \times 10^{-5}\text{mSv/Bq} \times 2\text{L/} \\ \text{日} \times 365 \text{ 日} \rightleftharpoons 4.6 \times 10^{-6} \text{ mSv/年}$$

$$^{137}\text{Cs} : 0.23\text{mBq/L} \times 10^{-3}\text{Bq/mBq} \times 1.3 \times 10^{-5}\text{mSv/Bq} \times 2\text{L/} \\ \text{日} \times 365 \text{ 日} \rightleftharpoons 2.2 \times 10^{-6} \text{ mSv/年}$$

(2)¹³¹I：¹³¹I は、上水原水試料から微量（1.0mBq/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 については、平成元年度から検出されており、そのレベルも過去の値と同程度であること、他の環境試料等から検出されていないことや半減期が 8 日と短いことなどから福島第 1 原発事故由来では無く、既報⁶⁾に述べたように、その起源は医学利用によるものであろうと推定される。

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⁶⁾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⁷⁾」（飲料水中¹³¹I 濃度：300Bq/kg 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

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 Bi	²²⁸ Ac
大気浮遊じん	12	mBq/m ³	0.2 ～ 0.3	1.4 ～ 4.0	ND	ND	ND
降下物	12	MBq/km ²	ND ～ 1.9	13 ～ 170	ND	ND	ND ～ 0.2
上水 原水	1	mBq/L	80	ND	ND	ND	ND
蛇口水	1	〃	60	ND	ND	ND	ND
海水	1	Bq/L	5.4	ND	ND	ND	ND
海底土	1	Bq/kg 乾土	620	ND	44	21	50
土壌 (0～5cm)	1	Bq/kg 乾土	680	ND	33	17	37
		(MBq/km ²)	(34000)	ND	(1600)	(860)	(1800)
	1	Bq/kg 乾土	670	ND	40	17	42
(5～20cm)		(MBq/km ²)	(110000)	ND	(6300)	(2600)	(6600)
	1	Bq/kg 乾土	670	ND	40	17	42
牛乳 原乳	1	Bq/L	48	ND	ND	ND	ND
農産物 タマネギ	1	Bq/kg 生	45	0.1	ND	ND	ND
キャベツ	1	〃	81	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)

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⁸⁾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、および降下物から昨年と同様に検出された。

3) その他天然放射性核種：降下物、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)標準試料法による相互比較分析：(財) 日本分析センターの報告書によると、当所の分析結果は、基準値（添加値）とよく一致しており、かつ、En 数も「1」以下であり、ガンマ線核種分析の精度は確保されている事が認められた。

3. 空間放射線量率

モニタリングポストによる空間放射線量率調査の結果を表 5 に示す。

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 41～66 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。

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23年 4月	30	55	41	43
同 5月	31	56	41	43
同 6月	30	58	41	43
同 7月	31	62	41	42
同 8月	31	60	41	42
同 9月	30	54	41	42
同 10月	31	50	41	43
同 11月	30	53	41	43
同 12月	31	51	42	43
平成24年 1月	31	52	42	43
同 2月	29	60	42	44
同 3月	31	66	41	44
平成 24年度	366	66	41	43
過去3年間の値				
平成20年度	365	66	40	43
平成21年度	365	63	40	43
平成22年度	365	61	40	43

表 6 サーベイメータによる空間放射線量率(その1)
(地上1m、当所中庭)

測定年月	サーベイメータ(nGy/h)			
	測定回数	最高値	最低値	平均値
平成23年 4月	—	—	—	—
同 5月	—	—	—	—
同 6月	18	84	74	80
同 7月	31	87	73	80
同 8月	31	92	73	78
同 9月	30	85	76	80
同 10月	31	84	74	80
同 11月	30	84	75	79
同 12月	27	84	75	80
平成24年 1月	1	—	—	82
同 2月	1	—	—	75
同 3月	1	—	—	81
平成 24年度	201	92	73	80
過去の値				
平成8～20年度	156	108	77	92

4. 福島第 1 原子力発電所の事故によるモニタリング強化

(1)モニタリングポストによる空間放射線量率調査

4月1日～12月27日の期間における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、41～62nGy/hの範囲であり、平常値の範囲内であった。

(2)ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析

4月1日から12月27日まで毎日の定時降下物および蛇口水からは、人工放射性核種は検出されなかった。

(3)サーベイメータによる空間放射線量率調査

当所中庭で行った結果を表6に府営公園18カ所で行った結果を表7に示す。

当所中庭での値は、測定期間中73～92nGy/hrの範囲であり、同じ場所で測定していた過去の値(平成8年度～20年度)から見て平常値の範囲内であった。また、府営公園で測定した値は、41～86nGy/hrであった。

ま と め

核種分析により人工放射性核種である ^{131}I および ^{134}Cs 、 ^{137}Cs が検出された。医学利用等に由来すると考えられる ^{131}I は上水(原水)に極低レベルで検出された。 ^{137}Cs は土壌や海底土から例年と同様に検出されたが、その他に大気浮遊じん、降下物および上水(原水)より ^{134}Cs と共に検出され、福島第1原発事故由来と考えられた。しかし、その値は低く、府民への健康

影響には全く問題のないレベルであった。

また、他の人工放射性核種は検出されなかった。さらに、空間放射線量率にも異常値は検出されなかった。

なお、福島第1原発事故によるモニタリング強化で実施された、モニタリングポストおよびサーベイメータによる空間放射線量率調査は、例年とほぼ同じ範囲内であった。また、ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析調査でも人工放射性核種は検出されなかった。

表7 サーベイメータによる空間線量率測定結果(その2)
(地上1m、府営公園18ヶ所)

測定場所	測定日時	測定結果 (nGy/h)
石川河川公園	平成23年6月27日	60
錦織公園	平成23年6月27日	43
長野公園	平成23年6月27日	53
服部緑地	平成23年6月28日	86
箕面公園	平成23年6月28日	67
山田池公園	平成23年6月28日	66
寝屋川公園	平成23年6月28日	56
深北緑地	平成23年6月28日	66
枚岡公園	平成23年6月29日	41
久宝寺緑地	平成23年6月29日	71
浜寺公園	平成23年6月29日	51
大泉公園	平成23年6月29日	49
住吉公園	平成23年6月29日	52
住之江公園	平成23年6月29日	63
蜻蛉池公園	平成23年6月30日	68
二色の浜公園	平成23年6月30日	84
りんくう公園	平成23年6月30日	70
せんなん里海公園	平成23年6月30日	78

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、大阪府環境農林水産総合研究所、大阪広域水道企業団庭窪浄水場の各機関に感謝致します。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健康医療部環境衛生課の皆様には謝意を表します。また、福島第1原子力発電所の事故に伴うモニタリング強化に際し、測定業務に多大なご協力をいただいた当所生活環境課の皆様には感謝いたします。

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23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23年度

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：環境放射能水準調査委託実施計画書、平成20年7月

3)原子力安全委員会：環境放射線モニタリング指針、平成20年3月

4)放射線医学総合研究所：放射性降下物の量から放射線量への換算について、平成23年3月30日

5)放射線医学総合研究所：放射性降下物の量から放射線量への換算について(追加情報)、平成23年4月19日

6)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)

7)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―三一(2)

8)東恵美子，肥塚利江，大山正幸，味村真弓，足立伸一：大阪府における環境および食品中放射能調査（平成22年度報告），大阪府立公衛研所報，第49号，24-30(2011)

マウスに対するラウレス硫酸ナトリウム吸入の生体影響について

東 恵美子* 中島 孝江*

シャンプーに使用されているラウレス硫酸ナトリウムを鼻部から吸入した場合に卵白アルブミン(OVA)によるアレルギー反応を増強するか否かを調べた。アレルゲンとして OVA を用いて作製したアレルギーモデルマウスにシャンプー時の曝露濃度レベルのラウレス硫酸ナトリウムを OVA と同時に吸入させた後、インターロイキン 4(IL-4)、OVA 特異的免疫グロブリン E(IgE 抗体)および OVA 特異的免疫グロブリン G1(IgG1 抗体)の測定、病理組織学的検査等を行った。

その結果、OVA と同時にラウレス硫酸ナトリウムを吸入させたマウスで、アレルギー症状を増悪させるような生体への影響は見られなかった。

キーワード：マウス、アレルギー、卵白アルブミン、吸入、陰イオン界面活性剤

Key words: mouse, allergy, ovalbumin, inhalation, anion surfactant

近年、アレルギー疾患が増加している。その要因として遺伝要因と環境要因が考えられるが、遺伝子の変異が短期間で生じたことによるものとは考えにくく、急激に大きく変化している環境要因が重要ではないかと考えられている。生活環境中に存在する化学物質の種類と使用量が増加している¹⁾ことから、化学物質の特異的抗体産生に関与する可能性を検討することは重要である。その中でも界面活性剤の生産量は年に約100万トンで推移しており、食器洗い、洗濯、掃除、洗顔、手洗い、洗髪等の生活関連用品においても広く使用されている。

洗髪に使われるシャンプーにも界面活性剤^{2,3)}が使われている。シャンプーを使用する場合、原液を泡立てて頭髮に付け、洗髪することから、シャンプー成分である界面活性剤が頭皮と鼻部の両方から吸収される可能性が考えられる。

一方、洗髪習慣は50年間で大きく変化している。以前は固形石鹸の使用が一般的であり、洗髪回数も週に2～3回程度であったが、近年はほとんどの人が合成界面活性剤を主成分とする液体シャンプーを使用してお

り、50歳代以下の人はほぼ毎日洗髪をしている。

アレルギー疾患に、生活環境中で頻繁に使用される合成界面活性剤がリスク要因としてどの程度関与しているのかを検討した。

アレルギーの指標としてIL-4、OVA特異的IgE抗体、OVA特異的IgG1抗体、マスト細胞等がある。IL-4はT細胞やマスト細胞から分泌されるサイトカインでIgE産生細胞へのクラススイッチのほか、Th2細胞の誘導、B細胞の活性化(大きさの増加、MHCクラスII抗原発現の増加など)、局所へのT細胞、好酸球浸潤に重要な役割を果たす血管内皮細胞上のVCAM-1の発現を誘導するなど、アレルギー性炎症の発症に重要なサイトカインである。IgEの産生にとってIL-4は最も重要な因子であり、IL-4はIgEのほか、マウスではIgG1へのクラススイッチ因子としても働いている。マスト細胞は、IgE抗体に対する高親和性受容体を有し、アレルゲンの侵入によるIgEレセプターの架橋を経て、ヒスタミン等のメディエータを遊離し、即時型アレルギー反応を引き起こすことが知られている。そこで、IL-4、OVA特異的IgE抗体、OVA特異的IgG1抗体を測定し、マスト細胞の観察を行った。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課
Effects of Sodium Laureth Sulfate on Mice by Inhalation Exposure
by Emiko AZUMA and Takae NAKAJIMA

実験方法

1. 試薬と器具

界面活性剤：陰イオン界面活性剤の「ラウレス硫酸ナトリウム」について調べた。化学式は $C_{12}H_{25}O(CH_2CH_2O)_nSO_3Na$ である。ラウレス硫酸ナトリウムは、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウムともいい、洗浄効果や起泡性にすぐれていることから、市販シャンプーの70%以上に使用されている。界面活性剤で配合率は10～20%である。実験にはラウレス硫酸ナトリウムを25%含有するシャンプー基材を用いた。

アレルゲン：OVA は、SIGMA Grade (V) を用いた。

霧化装置：喘息などの治療に用いられるタイプの超音波ネブライザー (オムロン NE-U17, 粒径 1～5 μ m) を使用した。

2. 予備実験

浴室での曝露濃度：ヒトが浴室で洗髪する時の浴室の陰イオン界面活性剤濃度を測定するために、浴室環境中の空気をインピンジャー (蒸留水、10ml) でサンプリング (3.2L/分) し、メチレンブルー活性物質として比色定量した。

被験者は女性2名 (A、B) で、空気吸引ポンプの吸入口を洗髪に近い場所に設置し、洗髪中の空気をサンプリングした。洗髪時間はA、B共に2～3分程度であり、6回のサンプリングで陰イオン界面活性剤の濃度は0.135～0.344 μ g/Lの範囲であった。

3. 吸入実験

実験動物と飼育条件：BALB/c オスマウス (SPF、日本エスエルシー、静岡) を5週齢で19匹購入し、4群に分け、飼育ケージには1匹ずつ入れた。水は水道水を与え、餌は自由摂取させた。週に1回飼育ケージの交換を行い、体重の測定を行った。

吸入装置の構成：吸入装置の構成を示す (図1)。超音波ネブライザーで試料液を霧化し、ポンプで吸引して吸入チェンバーに導入した。卵白アルブミン (OVA) を安全に廃棄するため、吸入チェンバーとポンプの間にバブリング用の水を入れたタンクを設けた。

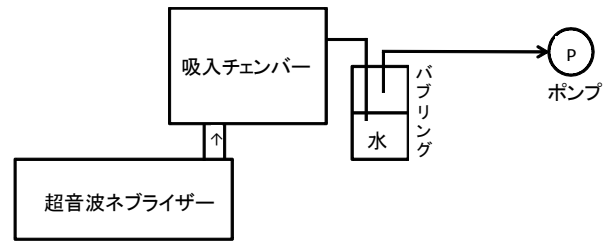


図1 吸入装置の構成

界面活性剤の濃度：超音波ネブライザーで泡立ちが見られずに霧化出来る10万倍希釈 ($\times 10^{-5}$) とした。

実験群：蒸留水を吸入させる「蒸留水群」、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤を吸入させる「界面活性剤群」、1%OVAを吸入させる「OVA群」、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤と1%OVAを同時に吸入させる「界面活性剤+OVA群」の4群で、1群5匹としたが、蒸留水群は4匹とした。

吸入チェンバー内の濃度： $\times 10^{-5}$ 界面活性剤を霧化させた時の吸入チェンバー内の濃度変化を調べた。蒸留水10mlを入れたインピンジャーを5分毎に交換して30分間ポンプで吸引 (3.2L/分) して通気した。結果を図2に示す。吸入チェンバー内の濃度は霧化直後から徐々に上昇し、26分後には最も高くなった。

この予備実験ではマウスは入れずに行った。

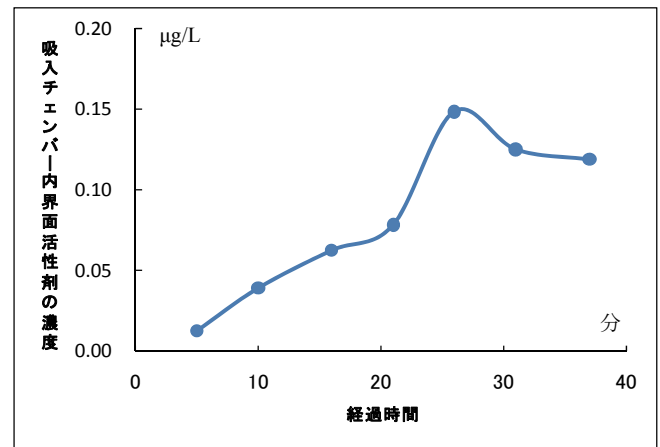


図2 吸入チェンバー内の界面活性剤濃度の時間変化

感作と吸入の方法：7週齢で全マウスに10 μ gのOVAを腹腔内に投与した。投与から2週後、3週後、4週後、5週後、6週後に計5回、蒸留水、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤、1%OVA、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤+1%OVAの50ml溶液を超音波ネブライザーで霧化して、それぞれの群のマウスに30分間吸入させた。

臓器重量、左肺上清中IL-4の測定：OVAを腹腔内投与してから8週後にソムノペンチル麻酔薬腹腔内投

与 (60mg/kg) により麻酔を行った。体重測定後、開腹、開胸し心臓採血をした。胸腺、脾臓、肝臓の重量測定を行った。

左肺(左葉) は肺門部をクリップで留めて切断し、重量を測定した後、1ml の冷 PBS を加えて肺ホモジネートを作製した。これを遠心 (2000×g、60 分、4℃) し、上清中の IL-4 を INSTRUCTIONS Mouse IL-4 ELISA Kit (Thermo SCIENTIFIC) で測定⁴⁾した。

OVA 特異的 IgE、OVA 特異的 IgG1 の測定：血清中の OVA 特異的 IgE 抗体価は、anti-mouse IgE (PHARMINGEN R35-72)、biotinylated OVA を用い、PCA タイター ×320 のマウスプール血清を標準として ELISA 法で測定⁵⁾した。OVA 特異的 IgG1 は、HRP 標識した anti-mouse IgG1 (ZYM610120) を用い、Anti Ovalbumin mouse monoclonal antibody (ANTIBODY SHOP HYB 099-01) を標準として ELISA 法で測定⁶⁾した。

臓器の病理組織学的観察：右肺 (上葉、中葉、下葉、心葉) に 10%中性緩衝ホルマリン液を 20cm 水柱圧で注入し、気管とともに 10%中性緩衝ホルマリン液に入れ固定した。胸腺、脾臓、肝臓も 10%中性緩衝ホルマリン液に入れ固定した。固定後、通常の病理組織標本作製法により、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE) 染色を行った。中葉はマスト細胞の観察のために、トルイジンブルー(TB) 染色も行った。染色後、光学顕微鏡による観察を行った。

実験のプロトコールを示す (図 3)。

動物: BALB/c オスマウス

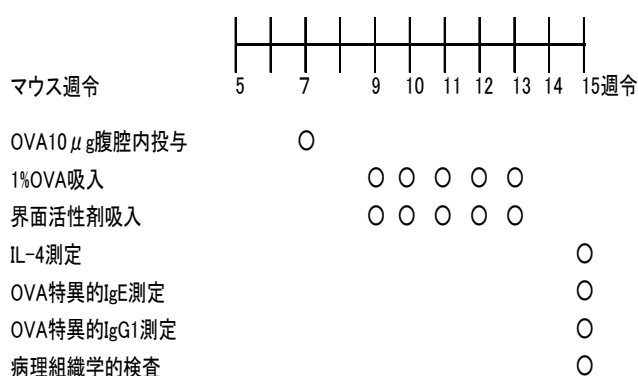


図3 実験のプロトコール

統計処理：統計解析用ソフト SPSS 12.0J (エス・ピー・エス・エス株式会社) を用いて行った。

結果

「蒸留水群」、「界面活性剤群」はそれぞれ「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」のコントロールである。この実験では、アレルギーモデルマウスである「OVA 群」と界面活性剤を追加した「界面活性剤+OVA 群」の結果を中心に比較した。検定はノンパラメトリックな方法である Mann-Whitney 検定で行った。

1. 体重と臓器重量対体重比

図 4 に OVA を投与してから 8 週間後におけるマウスの体重を示す。各コントロール群との間あるいは「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に有意な差は見られなかった。

図 5 に左肺重量対体重比を示す。「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の値が増加したことから「蒸留水群」、「界面活性剤群」との間には有意差が見られたが、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に差は見られなかった。

図 6 に胸腺重量対体重比を示す。各コントロール群との間あるいは「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に有意な差は見られなかった。

図 7 に脾臓重量対体重比を示す。各コントロール群との間あるいは「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に有意な差は見られなかった。

図 8 に 肝臓重量対体重比を示す。各コントロール群との間あるいは「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に有意な差は見られなかった。

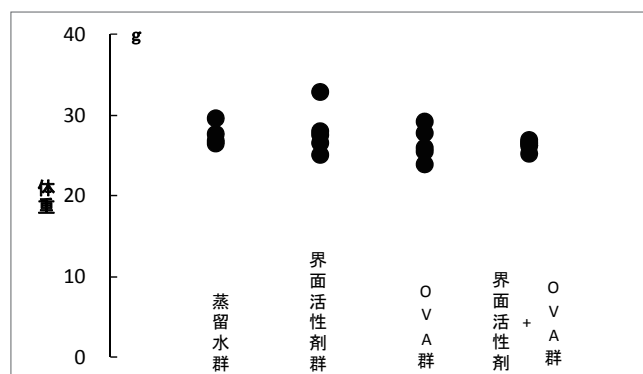
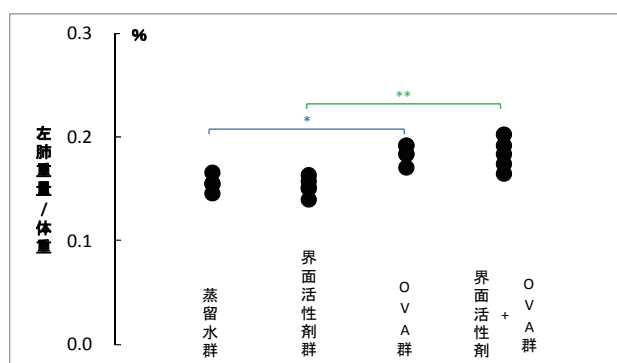


図4 体重の比較



**p<0.01, *p<0.05

図5 左肺重量対体重比の比較

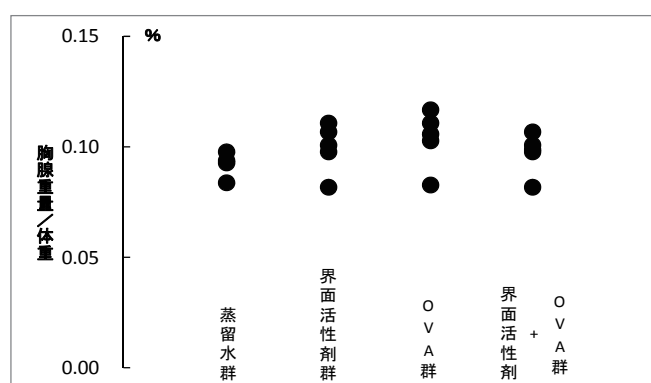


図6 胸腺重量対体重比の比較

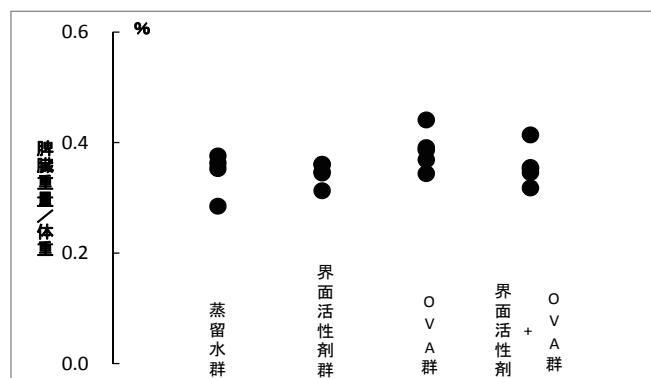


図7 脾臓重量対体重比の比較

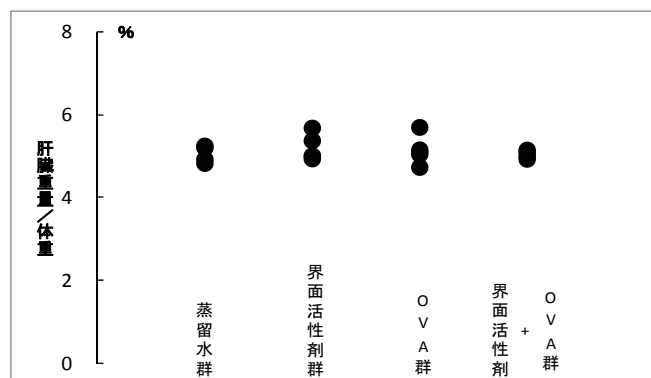


図8 肝臓重量対体重比の比較

2. 左肺上清中 IL-4 と OVA 特異的抗体

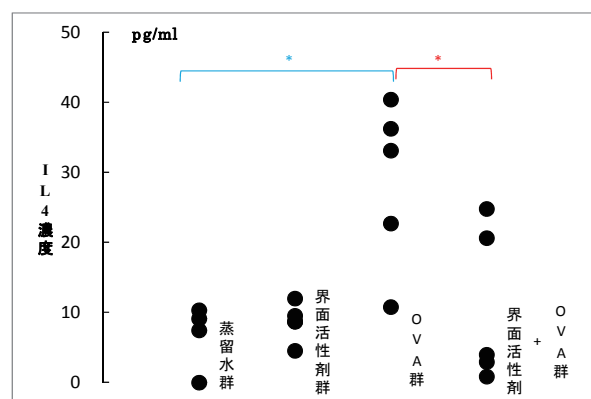
IL-4 : 図9に左肺ホモジナイズ上清中 IL-4 を示す。

「OVA 群」では、「蒸留水群」、「界面活性剤群」「界面活性剤+OVA 群」に比較して有意に高かった。

OVA-IgE と OVA-IgG1 : 図10に血清中 OVA-IgE 値を示す。縦軸は、陽性標準血清値を 100%とした場合の血清中 OVA-IgE 濃度である。

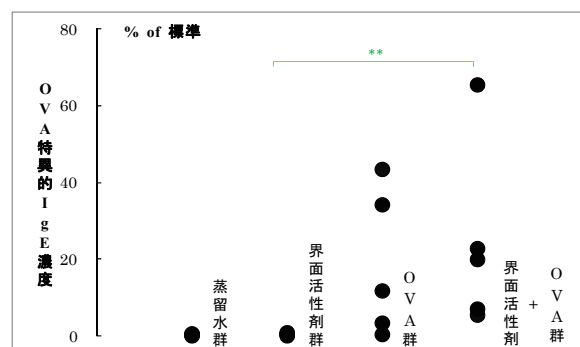
「界面活性剤+OVA 群」はコントロール群に比較して有意に高かった。「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の値は高くなったが、両群間に差は見られなかった。

図11に血清中 OVA-IgG1 値を示す。「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」はそれぞれコントロール群に比較して有意に高かったが、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に差は見られなかった。



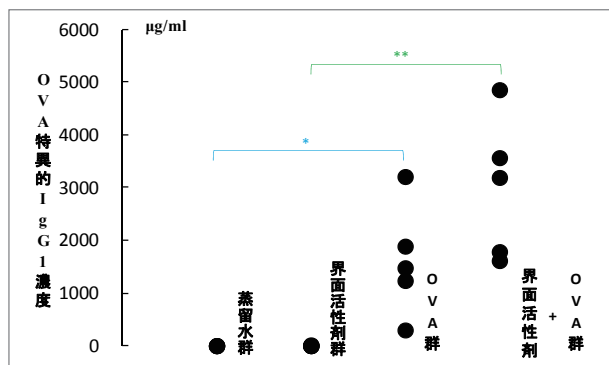
*p<0.05

図9 左肺ホモジナイズ上清中 IL-4 の比較



**p<0.01

図10 血清中 OVA-IgE 値の比較



**p<0.01, *p<0.05

図 11 血清中 OVA-IgG1 値の比較

3. 病理組織学的検査

図 12 に右肺中葉の気管支、図 13 に肺泡道、図 14 に肺胞の光学顕微鏡写真を示す。「蒸留水群」と「OVA 群」、「界面活性剤群」と「界面活性剤+OVA 群」のマウス中葉の気管支、肺泡道、肺胞の病理組織学的所見に差は見られなかった。

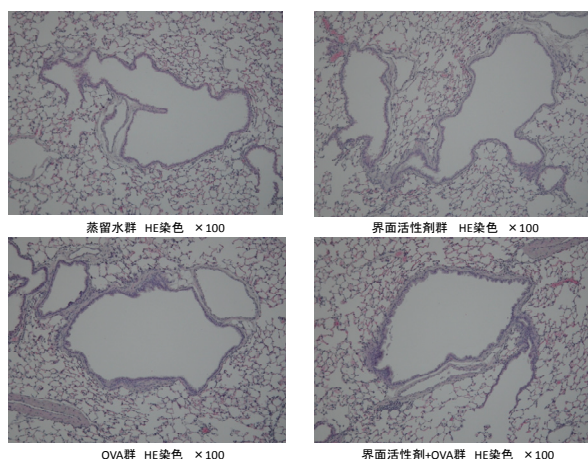


図 12 右肺中葉の気管支の光学顕微鏡写真

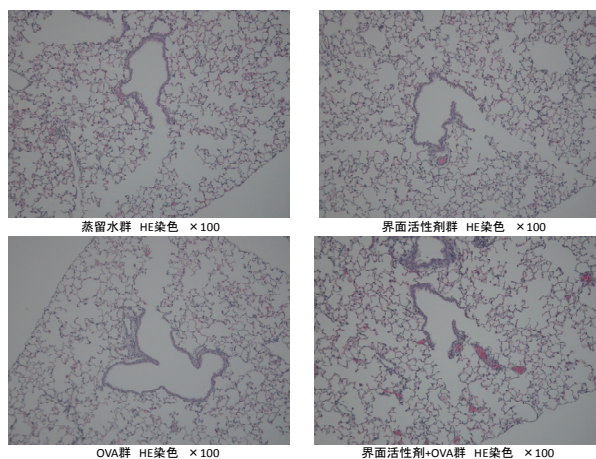


図 13 右肺中葉の肺泡道の光学顕微鏡写真

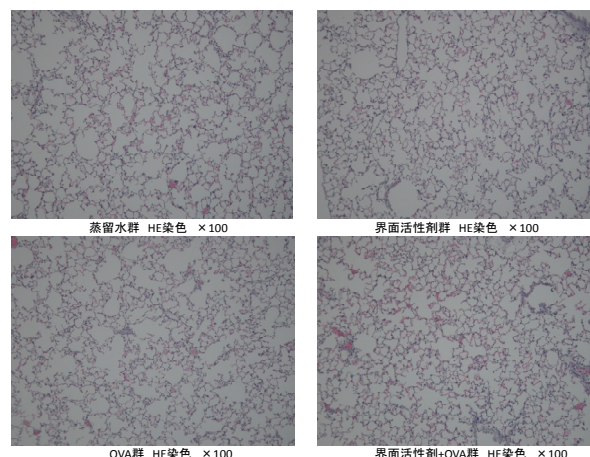


図 14 右肺中葉の肺胞の光学顕微鏡写真

図 15 に気管支や血管周囲にリンパ球が浸潤している肺病理標本の光学顕微鏡写真を示す。表 2 にリンパ球の浸潤が見られたマウスの割合を示す。

「蒸留水群」と「界面活性剤群」の右肺（上葉、中葉、下葉、心葉）の病理組織標本では、リンパ球の浸潤が見られないか見られてもわずかだったのに比べ、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」では、気管支や血管周囲にリンパ球の浸潤が多く見られた。

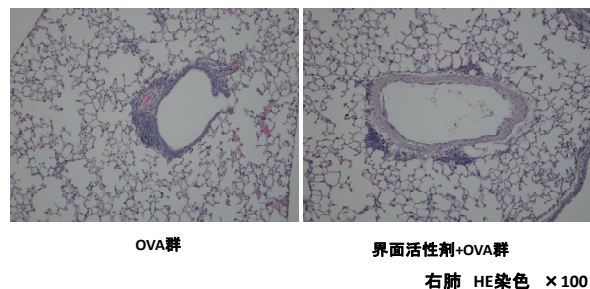


図 15 リンパ球の浸潤

表 2 右肺にリンパ球の浸潤が見られたマウスの割合

蒸留水群	界面活性剤群	OVA 群	界面活性剤+OVA 群
1/4	0/5	5/5	5/5

(リンパ球の浸潤が見られたマウスの数 / 匹数)

図 16 にマスト細胞を観察するために右肺中葉のパラフィン切片を用いて TB 染色を行い、光学顕微鏡による観察を行ったものを示す。TB 染色ではほとんどの細胞は青く染まるが、マスト細胞は顆粒が赤〜赤紫色に染まる（メタクロマジー）ため、観察することが

出来る。マスト細胞の増加や顆粒の放出などが見られる群はなかった。

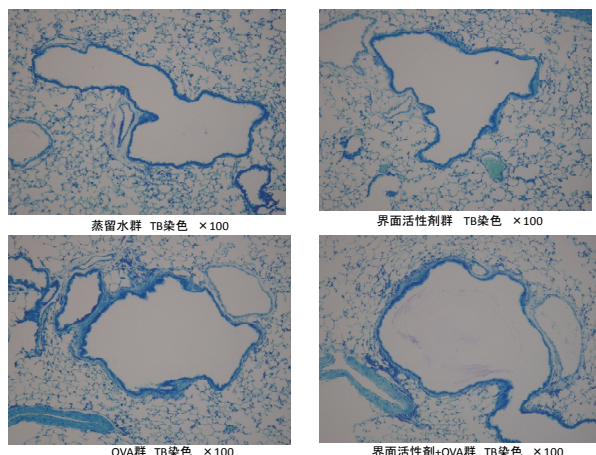


図 16 右肺中葉の気管支の光学顕微鏡写真

図 17 に胸腺、図 18 に脾臓、図 19 に肝臓の光学顕微鏡写真を示す。4 群の胸腺、脾臓、肝臓の病理組織学的所見に差は見られなかった。

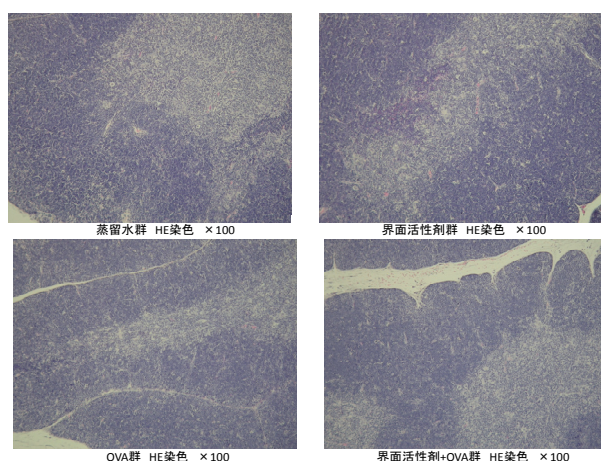


図 17 胸腺の光学顕微鏡写真

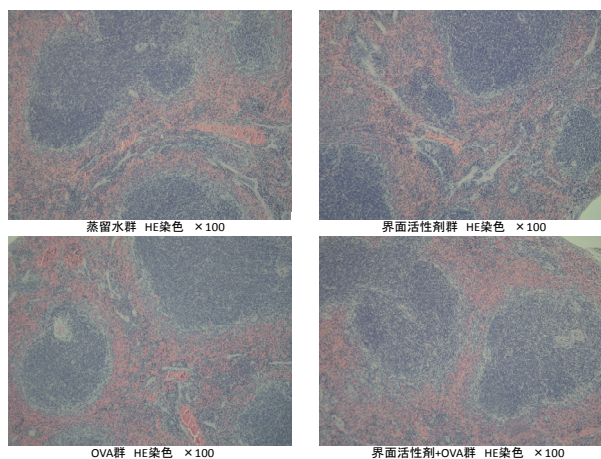


図 18 脾臓の光学顕微鏡写真

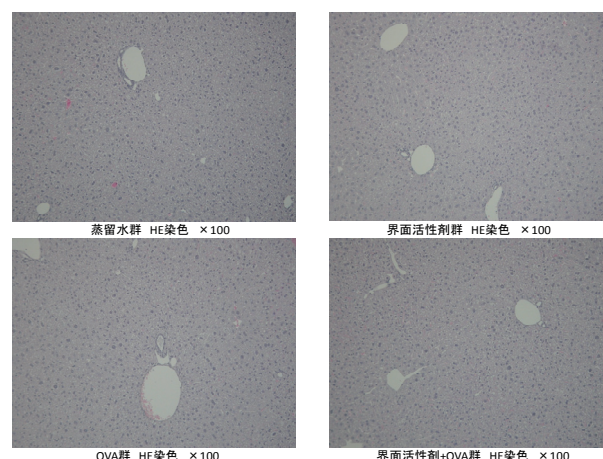


図 19 肝臓の光学顕微鏡写真

考察および結論

予備実験と吸入実験の陰イオン界面活性剤の濃度については、ほぼ同じような値であった。

吸入実験の「蒸留水群」、「界面活性剤群」と「OVA群」、「界面活性剤+OVA群」を比較すると、

- 1) OVA を吸入した群で、左肺重量の増加が見られた。
- 2) OVA を吸入した群で、右肺の気管支や血管周囲にリンパ球の浸潤が多く見られた。
- 3) 「OVA 群」で左肺上清中の IL-4 値の上昇が見られた。
- 4) OVA を吸入した群で、血清中の OVA 特異的 IgE と OVA 特異的 IgG1 値の上昇が見られた。

また、

- 1) 全群にマスト細胞の増加や顆粒の放出等は見られなかった。
- 2) 右肺 (上葉、中葉、下葉、心葉)、胸腺、脾臓、肝臓の病理組織学的所見は全群に差は見られなかった。

アレルギーモデルマウスである「OVA 群」と界面活性剤を吸入させた「界面活性剤+OVA 群」を比較すると、

- 1) 体重や臓器 (左肺、胸腺、脾臓、肝臓) 重量、臓器重量対体重比に差は見られなかった。
- 2) 左肺上清中の IL-4 の測定値に有意差が見られたが、値は「OVA 群」の方が高かった。
- 3) 血清中の OVA 特異的 IgE と OVA 特異的 IgG1 の測定値に差は見られなかった。

I 型アレルギーは、①アレルゲンの感作によって IgE が産生される。②IgE がマスト細胞や好塩基球の表面に結合し、さらに抗原と反応してこれらの細胞を活性化させる。③活性化の結果、各種の炎症を起こす化学伝達物質が放出されてアレルギー反応が起こる。ことで成立するとされる。

OVA を吸入させると、I 型アレルギー成立過程の第①段階に影響が見られたが、OVA と同時に界面活性剤を吸入させたマウスで、アレルギー症状を増悪させるような生体への影響は見られなかった。

シャンプーに使用されるラウレス硫酸ナトリウムは、通常のシャンプー使用時の濃度レベルにおいて生体への影響はないと考えられた。

この研究は、大阪府立公衆衛生研究所の動物実験委員会の指針に従い、動物に不必要な苦痛を与えないように配慮して行った。

文 献

- 1) 環境省：平成 13 年度版環境白書，平成 13 年 5 月
- 2) Villar-Gómez A, Muñoz X, Culebras M, Morell F, Cruz MJ. : Occupational asthma caused by inhalation of surfactant composed of amines, Scand J Work Environ Health, 35 (6), 475-478(2009)
- 3) van Rooy FG, Houba R, Palmen N, Zengeni MM, Sander I, Spithoven J, Rooyackers JM, Heederik DJ. : A cross-sectional study among detergent workers exposed to liquid detergent enzymes, Occup Environ Med., 66 (11), 759-765(2009)
- 4) S. Konno, K. Asano, M. Kurokawa, K. Ikeda, K. Okamoto and M. Adachi : Antiasthmatic activity of a macrolide antibiotic, roxithromycin: analysis of possible mechanisms in vitro and in vivo, Int Arch Allergy Immunol., 105, 308-316(1994)
- 5) T. Hirano, N. Yamakawa, H. Miyajima, K. Maeda, S. Takai, A. Ueda, O. Taniguchi, H. Hashimoto, A. Shirase, K. Okumura and Z. Ovary : An improved method for the detection of IgE antibody of defined specificity by ELISA using rat monoclonal anti-IgE antibody, Journal of Immunological Methods, 119, 145-150(1989)
- 6) H. Fujimaki, N. Ui and T. Endo : Induction of inflammatory response of mice exposed to diesel exhaust is modulated by CD4(+) and CD8(+) T cells, American Journal of Respiratory and Crit Care Med, 164, 1867-1873(2001)

欧州規格 EN71 により乳幼児用繊維製品に規制されている着色剤の

LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS による分析調査

中島晴信^{*1} 味村真弓^{*1} 山崎勝弘^{*2} 鹿庭正昭^{*3}

We are engaged in the reevaluation and improvement of the testing methods for 16 types of colourants for use in toys made of textiles as regulated by the European Standards EN71, “Safety Regulations of Toys.” First, we examined HPLC separation conditions for the purpose of introducing LC/MS as the final test method. Using a mixture of ammonium acetate and formic acid aqueous solution / acetonitrile as a mobile phase, the mutual separation of 16 types of colourants was possible by using an ODS column. In the next step, the measurement method using LC/TOF-MS was examined via positive/negative mode. The detection limit of the extracted ions from 15 types of colourants was between 0.62 pg (Basic Red 9) and 60 pg (Disperse Blue 1) for S/N=3. Acid Red 26 showed low sensitivity (3 ng). The calibration curves obtained from the peak area value of the extracted ions from each colourant (0.02-5 µg/ml) all showed good linearity. Furthermore, the measurement method using LC/MS/MS was also examined under positive/negative mode. The detection limit of selected reaction monitoring (SRM) ions of 15 types of colourants was between 0.013 pg (Basic Violet) and 1.9 pg (Disperse Orange 37) for S/N=3. Here, Acid Red 26 also showed low sensitivity (0.1 ng). The calibration curve obtained from the peak area value of SRM ions for each colourant (1-1000 ng/ml) all showed good linearity.

The commercially available textile products for infant were used by LC/TOF-MS and LC/MS/MS. As a result, even with low concentrations, 74.2 ng/g of Disperse Orange 3 was detected in one sample, and 112.2 ng/g of Disperse Orange 37 was detected in another sample. These concentration values are much lower than the regulation value (action limit) of EN71 of 10 µg/g. These results show that both the LC/TOF-MS and LC/MS/MS measuring methods are sufficiently accurate to be used as the final determination of safety.

キーワード : 着色剤、欧州規格 EN71、LC/TOF-MS、LC/MS/MS、乳幼児用繊維製品

Key words : colourants, European Standards EN71, LC/TOF-MS, LC/MS/MS, textile products for infant

衣類などの繊維製品には、非常に多種類の染料が着色剤として使用されている。しかし、その中には、皮膚感作性や発癌性を有する物質もある。世界的には、欧州の繊維製品安全性自主基準である OEKOTEX Standard が用いられ、それら染料の溶出量も規定され

ている。特に乳幼児用製品の基準は厳しく定められている¹⁾。しかし、この自主規制は、分析方法などは非公開である。ドイツでは、ドイツ規格 (DIN54231) 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類が規制されている^{2,3)}。この規格で

*1 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

*2 いわき明星大学薬学部 社会薬学部門

*3 国立医薬品食品衛生研究所

Analytical Study Using LC/TOF-MS and LC/MS/MS on Colourants Regulated by European Standards EN71 for Infant Textile Products.

by Harunobu NAKASHIMA, Mayumi MIMURA, Katsuhiko YAMASAKI and Masa-aki KANIWA

は初回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⁾に加えて人工唾液による溶出試験⁷⁾を既に実施した⁸⁾。EN71 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、まず我々は、規制されている 9 種の芳香族第一アミン類の最終試験法である GC/MS (Gas chromatography mass spectrometry) 法による分析調査を行った⁹⁾。EN71 に準拠した我々の分析調査では、規制アミン類は検出しなかった。しかし、河上らは、EU 規制 EN14326 に準拠して市販繊維製品を分析したところ、ランチョンマットから高濃度の (56.2~439 µg/g) benzidine、3,3'-dimethoxybenzidine 及び 2,4-diaminotoluene を検出したことを報告している¹⁰⁾。

次に、16 種の着色剤の最終試験法の第一段階である HPLC-DAD (Liquid chromatography-photodiode array detector) による分析調査を行い、対象の着色剤は検出しなかったことを報告した¹¹⁾。最終試験法の第二段階では、LC/MS (Liquid chromatography mass spectrometry) 及び LC/MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) で測定を行うように記載されている。そこで今回、この LC/MS/MS と分子イオンが同定できる

LC/TOF-MS (Liquid chromatography-time of flight mass spectrometry) による測定条件を検討した。その結果、両法共に高感度な測定が可能となり、最終的判定方法として適用可能な測定法を確立した。さらに、HPLC-DAD による分析調査に用いた市販乳幼児繊維製品 (玩具、衣服) を、LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS で分析した。その結果、微量ではあるが、規制着色剤が検出された。これら測定法の検討結果及び市販製品の分析結果を、あわせて報告する。

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 HPLC、LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS 測定用の試料とした (Table1)。

2. 試薬

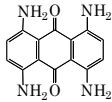
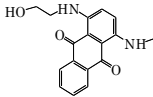
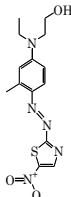
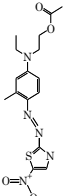
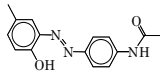
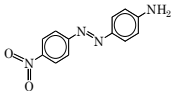
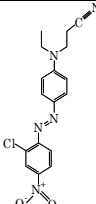
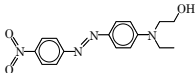
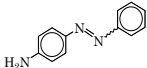
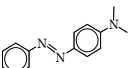
規制されている 16 種の着色剤標準品の製造社名及び CAS 番号や、物理化学的性質を Table 2 に示す。各標準品 5 mg を量り取り、エタノール 100 ml に溶解した。この溶液を 40℃で 1 時間超音波槽に入れて完全に溶解し、50 µg/ml の標準原液を作製した。これを希釈して標準液系列を作成した。

Table 1 Commercially Available Textile Products for Infant Analyzed by HPLC, LC/TOF-MS and LC/MS/MS
(7 Products of Clothing for Infant (8 Parts) and 5 Products of Toys Made of Textile (12 Parts))

No.	Usage	Materials	Manufacturer	Country
1	Coverall	Cotton 100%	Familiar	Japan
2	Trousers	Cotton 100%	BOBSON	China
3	Sweater	Cotton 70%, nylon 15%, wool 15%	BOBSON	China
4	Cut and sewn	Cotton 100%	VON AMMY	China
5	Cut and sewn	Cotton 100%	AEON	China
6	Trousers	Cotton 70%, nylon 90%, polyurethane 10%	AIC	China
7	Coverall	Polyester 100%, cotton 95%, polyurethane 5%	Takiho	China
9	Toy (the stuffed toy)	Polyester, acryl, polystyrene	Japan ToysRus	China
10				
11				
12	Toy (the stuffed toy)	Polyester, acryl, polystyrene	Japan ToysRus	China
13				
14				
15	Toy (the stuffed toy)	Unknown	ORGANIC	China
16				
17	Toy (the stuffed toy)	Polyester	TAKARA TOMY	China
18				
19	Toy (clothes of the doll)	Polyester and others	TAKARA TOMY	China
20				

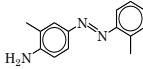
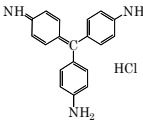
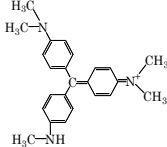
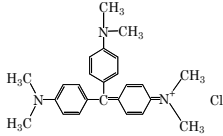
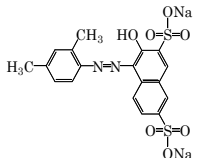
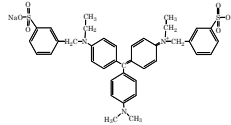
Table 2-1 Physicochemical Properties of 16 Types of Commercialized Colourant Standard Products
Regulated European Norm EN71

(Manufacturers, CAS Number, Molecular Weight, Chemical Structure and Labelling Content (%))

Compounds (Manufacturer)	CAS No.	Molecular Weight	Chemical Structure	Content (%)
Disperse Blue 1 (Aldrich)	2475-45-8	268.2707		—
Disperse Blue 3 (Sigma-Aldrich)	2475-46-9	296.3205		20%
Disperse Blue 106 (FLUKA)	12223-01-7	335.3815		—
Disperse Blue 124 (FLUKA)	61951-51-7	377.423		—
Disperse Yellow 3 (Sigma-Aldrich)	2832-40-8	269.2985		30%
Disperse Orange 3 (Sigma-Aldrich)	730-40-5	242.2334		90%
Disperse Orange 37 (FLUKA)	13301-61-6	392.24		98%
Disperse Red 1 (Aldrich)	2872-52-8	314.3391		95%
Solvent Yellow 1 (Aldrich)	60-09-3	197.2358		98%
Solvent Yellow 2 (Sigma-Aldrich)	60-11-7	225.289		—

— : Not Indicated

Table2-2. Physicochemical Properties of 16 Types of Commercialized Colourant Standard Products
Regulated European Norm EN71
(Manufacturers, CAS Number, Molecular Weight, Chemical Structure and Labelling Content (%))

Solvent Yellow 3 (Sigma-Aldrich)	97-56-3	135.1665		97%
Basic Red 9 (Sigma-Aldrich)	569-61-9	288.3658		85%
Basic Violet 1 (Aldrich)	8004-87-3	358.4987		80%
Basic Violet 3 (Sigma-Aldrich)	548-62-9	407.98		—
Acid Red 26 (Sigma-Aldrich)	3761-53-3	480.4225		—
Acid Violet 49 (Tokyo Chemical Industry)	1694-09-3	733.8712		—

— : Not Indicated

アセトニトリル、エタノールは和光純薬製残量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 を通過したものを用いた。

3. HPLC 置及び測定条件

LC/MS 導入のためには、イオン化するための移動相条件が必要である。そのため前報⁹⁾の条件を参考にし、HPLC 分離条件を検討した。

HPLC 装置は以下の島津製作所製の装置を用いた。送液ポンプは、LC-10ADVP、フォトダイオードアレイ検出器は SPD-M10AVP、カラム恒温槽は CTO-10ACVP、オートサンプラーは SIL-10ADVP、コントローラーは SCL-10AVP、データ処理は CLASS-VP を用いた。HPLC カラムは、(財) 化学品評価研究機構製 L-Column ODS-3(4.6mm I.D.×150mm)を用いた。カラム恒温槽温度は 40℃に設定した。A 液はアセトニトリル、B 液は 10 mM HCOONH₄ (ギ酸で pH 2.8 に調製) の混合水溶

液の 2 液グラジエントで行った。移動相条件は、流量を 1.5 ml/min とし、A 液と B 液の混合比は、75/25—20/80(60 min.)となるグラジエントプログラムで行った。注入量は、10 µl で、ピークの同定は、リテンションタイム及び UV スペクトルで同定し、定量は、各物質に適した波長で定量した。

4. LC/TOF-MS 装置及び測定条件

HPLC 装置は、Agilent Technologies 社製の Agilent 1200 を用いた。HPLC カラムは、GL サイエンス社製の Inertsil ODS-4(2.1mm I.D.×150mm、5µm)を用いた。カラム恒温槽温度は 40℃に設定した。A 液はアセトニトリル、B 液は 10 mM HCOONH₄ と 0.1%HCOOH の混合水溶液を使用した 2 液グラジエントで行った。移動相条件は、流量を 0.2 ml/min とし、A 液と B 液の混合比は、20/80—100/0(30 min.)となるグラジエントプログラムで行った。注入量は、3 µl とした。MS 装置 (TOF-MS) は、Agilent Technologies 社製の Agilent 6200

型を用いた。イオン化法はESI (Electro Spray Ionization) 法での positive 及び negative の両モードで、マスレンジは m/z 100-1000 ピークの範囲で測定した。フラグメンター電圧は 100V に、乾燥ガス (Drying gas) は流量 10L/min で温度 350℃に、ネブライザーガス (Nebulizer gas) 圧力は 345kPa に設定した。参照イオン (Reference mass) は、positive モードでは、 m/z 121.050873 及び m/z 922.009798 を、negative モードでは、 m/z 112.966 を用いた。

5. LC/MS/MS 装置及び測定条件

HPLC 装置は、Agilent Technologies 社製の Agilent 1290LC 型を用いた。HPLC カラムは、Agilent Technologies 社製の Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 mm I.D. ×150 mm、1.8 μ m)を用いた。カラム恒温槽温度は 40℃ に設定した。A 液はアセトニトリル、B 液は 10 mM HCOONH_4 と 0.1% HCOOH の混合水溶液を使用した 2 液グラジエントで行った。移動相条件は、流量を 0.25 mL/min とし、A 液と B 液の混合比は、20/80–58/42 (23 min.)となるグラジエントプログラムで行った。注入量は、5 μ l とした。MS 装置 (MS/MS) は、Agilent Technologies 社製の Agilent 6460 型 Triple Quad LC/MS を用いた。イオン化法は、ESI (Electro Spray Ionization) 法の改良法である AJS (Agilent Jet Stream)法による positive 及び negative モードで測定した。乾燥ガス (Drying gas) は流量 10 L/min で温度 350℃に、ネブライザーガス (Nebulizer gas) 圧力は 345kPa に、シースガス (Sheath gas) は流量 12 L/min で温度 400℃に設定した。各着色剤の変換エネルギー (Collision energy)

は、Table 4 に示す。

6. 試験溶液の調製

試料溶液の調製方法は、概ね EN71 の方法に準拠した。試料 (繊維製品) 0.5g を細切し、40 ml のガラスびんに量り採った。エタノール 10ml を加え、ガラスびんを超音波槽に入れ、15 分間放置した。その抽出液をガラスフィルターでろ過して試験管に移した後、アルゴン気流下で 1 ml に濃縮して試験溶液とした。

結果及び考察

1. LC/MS 導入のための HPLC 測定条件の検討

我々は、逆相系カラムの Inertsil ODS-SP を用いて、16 種の着色剤を同時分析できる条件を報告した。この報告では、移動相にアセトニトリルと 10 mM NaH_2PO_4 混液を用いた。今回、LC/MS 導入のための移動相条件を検討した。そこで、酢酸アンモニウムとギ酸の水溶液及びアセトニトリル混液での分離条件を検討し、実験の章に記載した条件で、16 種の着色剤の相互分離を可能とした。Fig.1 にこれら 16 種の着色剤の 300 nm での HPLC クロマトグラム (各 50 μ g/ml) を示す。また、これらクロマトグラム (50 μ g/ml) の再現性は全て良好であった。各々の物質に適した波長のピーク面積値での検量線 (1~5 μ g/ml) を作成したところ、いずれも R^2 が 0.99 以上の良好な直線性を示した。定量限界も 1 μ g/ml (10ng) 以下であった。欧州 (EN71) における各物質の規制限度値 (Action limit) は、10 μ g/g (mg/kg)である。これは操作法に従って最終試料溶液を 1 ml のエ

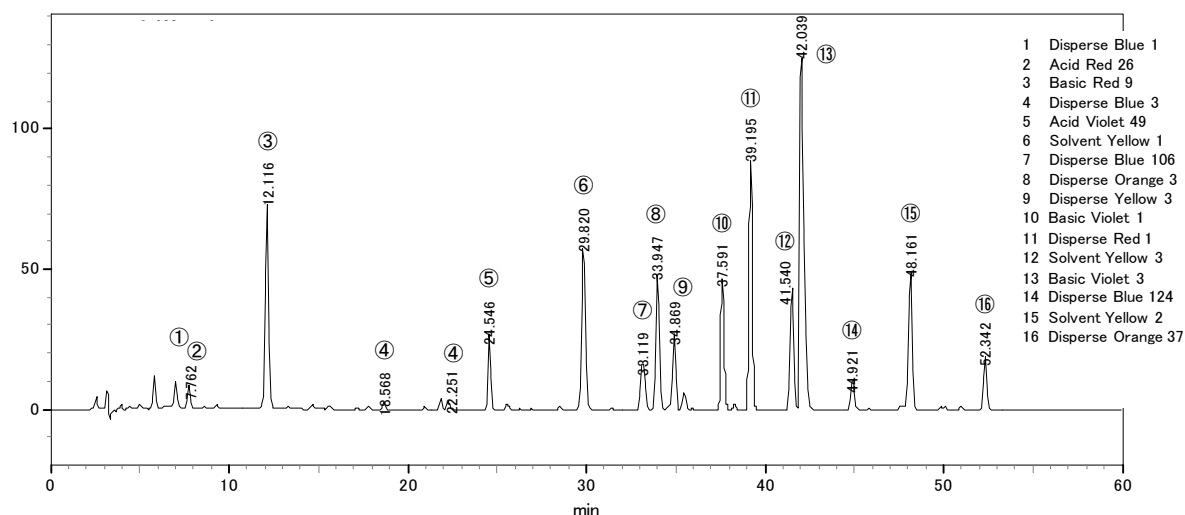


Fig.1 High Performance Liquid Chromatogram of 16 Types of Colourants

Operating conditions of HPLC are given in text.

ール溶液にした場合、5 µg/ml の濃度である。各標準物質の感度から考慮すれば、定性的には十分確認可能な感度と考えられる。

分析した 20 試料には、これら 16 種の着色剤と一致する UV スペクトル及び保持期間を持つピークを示す試料はなかった。

2. LC/TOF-MS 測定

次に、HPLC 分離条件に準じて LC/TOF-MS での各標準品の測定条件を検討した。ただし、HPLC 装置及びカラムが異なるので、分離条件は若干変更した。その結果、実験の項に示す条件で、16 種の着色剤の相互分離が可能となった。これら 16 種の各着色剤の抽出イオ

ン(Extract Ion)によるクロマトグラム(EIC)を Fig.2 に示す。また、これら着色剤のイオン化した分子の精密質量と検出モードを Table.3 に示す。Acid Red 26 は、negative モードでの検出で、 $[M-2Na]^{2-}$ として検出された。Acid Violet 49 は positive/negative の両モードで検出可能であった。さらに、各色素の 0.02 µg/ml 溶液を 3 µl 注入した時の SNR (Signal to noise ratio) 及び SNR から算出した検出限界値 (S/N=3) も Table 3 に示す。Acid Red26 以外の 15 種の着色剤の検出限界(S/N=3)は、0.62 (Basic Red 9) ～60pg (Disperse Blue 1) と、100 倍の感度の違いがあった。Acid Red 26 は、0.1 µg/ml 溶液で測定しても SNR は 1 より小さく、高濃度溶液 (5

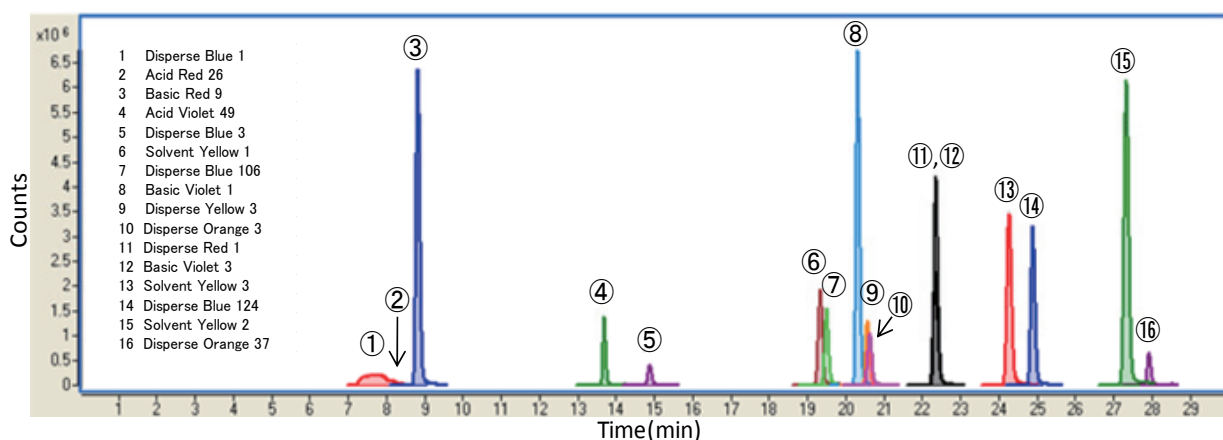


Fig.2 Extracted Ion Chromatogram of 16 Types of Colourants Using Liquid Chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry(LC/TOF-MS)
Operating conditions of LC/TOF-MS are given in text.

Table 3 LC/TOF-MS Detection Parameters and Analytical Data for 16 Types of Colourants
Retention time, Accurate mass of ionized molecule, Detection mode, Charge state, SNR (signal to noise ratio)
and Detection limit (signal to noise ratio of 3, S/N=3)

No.	Compounds	Retention Time (min.)	Accurate Mass m/z	Detection Mode	Charge State	SNR ¹	Detection Limit ² (S/N=3)(pg)
1	Disperse Blue 1	7.71	269.10281	Positive	$[M+H]^+$	3	6.00E+01
2	Acid Red 26	8.44	217.01219	Negative	$[M-2Na]^{2-}$	<1	3.00E+03
3	Basic Red 9	8.83	288.15004	Positive	$[M-Cl]^+$	289	6.23E-01
4	Acid Violet 49	13.70	710.23677	Positive	$[M+H]^+$	122	1.48E+00
5	Disperse Blue 3	14.89	297.12480	Positive	$[M+H]^+$	9.7	1.86E+01
6	Solvent Yellow 1	19.33	198.10242	Positive	$[M+H]^+$	56.1	3.21E+00
7	Disperse Blue 106	19.51	336.11265	Positive	$[M+H]^+$	87.7	2.05E+00
8	Basic Violet 1	20.32	358.22815	Positive	$[M+H]^+$	167.1	1.08E+00
9	Disperse Yellow 3	20.58	270.12325	Positive	$[M+H]^+$	30.6	5.88E+00
10	Disperse Orange 3	20.64	243.08780	Positive	$[M+H]^+$	47.1	3.82E+00
11	Disperse Red 1	22.34	315.14550	Positive	$[M+H]^+$	159.9	1.13E+00
12	Basic Violet 3	22.35	372.24421	Positive	$[M-Cl]^+$	122.1	1.47E+00
13	Solvent Yellow 3	24.28	226.13330	Positive	$[M+H]^+$	104.2	1.73E+00
14	Disperse Blue 124	24.90	378.12278	Positive	$[M+H]^+$	222.6	8.09E-01
15	Solvent Yellow 2	27.33	226.13424	Positive	$[M+H]^+$	219.9	8.19E-01
16	Disperse Orange 37	27.93	392.06849	Positive	$[M+H]^+$	9.6	1.88E+01

1: Signal-to-Noise Ratio (20ppb, 3 µl)

2: Detection Limit (Signal-to-Noise Ratio of 3, S/N=3)

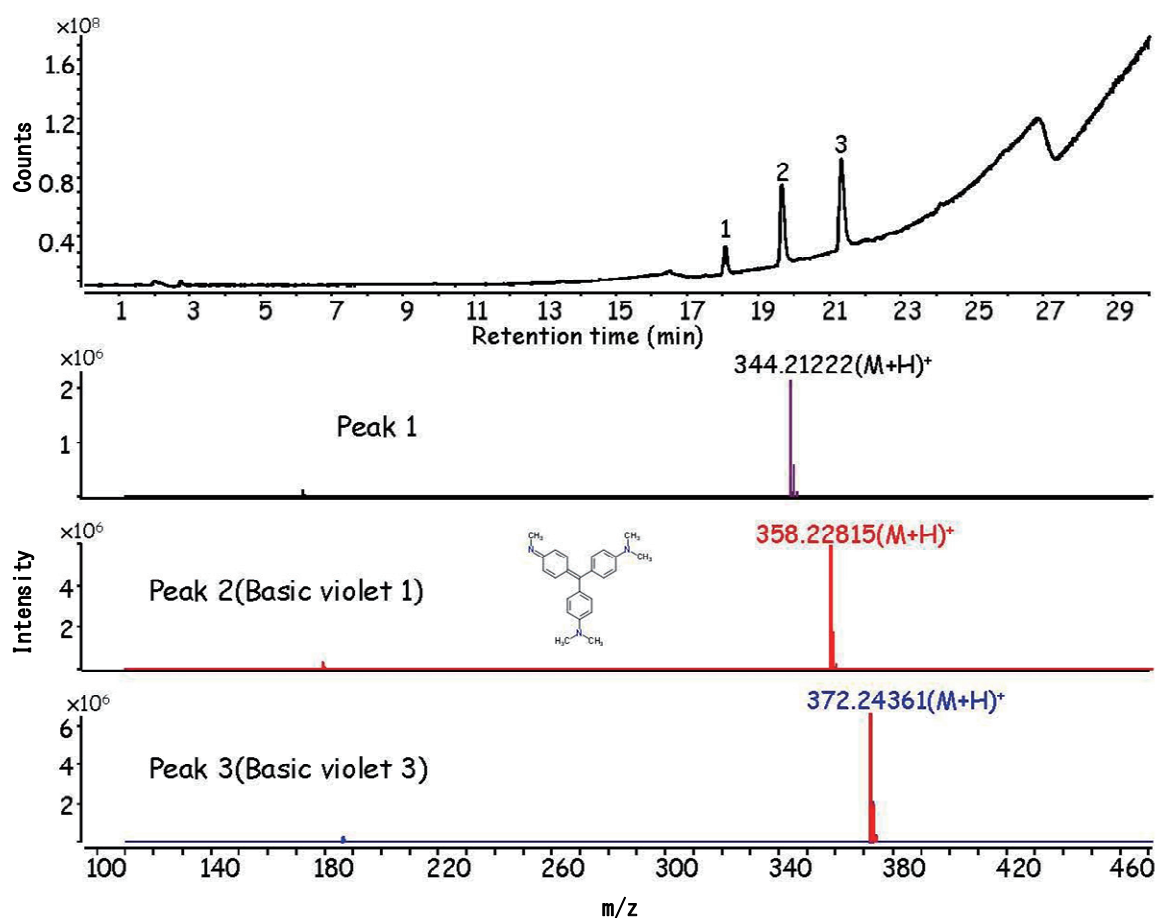


Fig.3 Total Ion Chromatogram and Mass Spectra of Basic Violet 1 Standard by Liquid Chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry(LC/TOF-MS)

μg/ml) で測定した検出限界 (S/N=3) は、3 ng であった。これは、Disperse Blue 1 と比べても、50 分の 1 レベルの低感度であった。しかし、いずれの着色剤も、EN71 の規制限度値(action limit)である 10 μg/g (最終試料溶液量が 1 ml 中の濃度は 5 μg/ml) は、十分測定可能なことが分かった。Acid Red 26 以外のイオンの相対質量誤差は、3.92～3.93 μg/ml の範囲に収まり良好であった (0.02～5 μg/ml 濃度の溶液)。また、これら着色剤の各抽出イオン(Extract Ion)のピーク面積値での検量線(0.02～5 μg/ml)を作成したところ、いずれも R^2 が 0.99 以上の良好な直線性を示した。また、これらクロマトグラムの再現性は全て良好であった。

標準品として販売しているが、数種の混合物からなる製品が見うけられた。例えば、Basic Violet 1 は (純度 80%と表示)、主に 3 種の混合からなる商品であった。この標準品の TIC 及び 3 種のマスペクトルを Fig.3 に示す。すなわち、Basic Violet 1、Basic Violet 3

及び $[M+H]^+$ の質量が 344.212 である質量の 3 物質からなる混合物であることが分かった。

3. LC/MS/MS 測定

さらに、HPLC 分離条件に準じて LC/MS/MS での各標準品の測定条件を検討した。この場合も、HPLC 装置及びカラムが異なるので、分離条件は若干変更した。その結果、実験の項に示す条件で、16 種の着色剤の相互分離が可能となった。Selected Reaction Monitoring 法による SRM クロマトグラムを Fig.4 に示す。検出は、positive/negative モードで行った。各着色剤の親イオン (Precursor ion、m/z)、測定イオン (Target ion、m/z) 及び変換エネルギー (collision energy) を Table.4 に示す。また、1 ng/ml 溶液を 5 μl 注入したときの、SNR (Signal to noise ratio) 及び SNR から算出した検出限界値 (S/N=3) も Table 4 に示す。Acid Red 26 以外の着色剤の検出限界は、S/N=3 として 0.013 (Basic Violet 3)

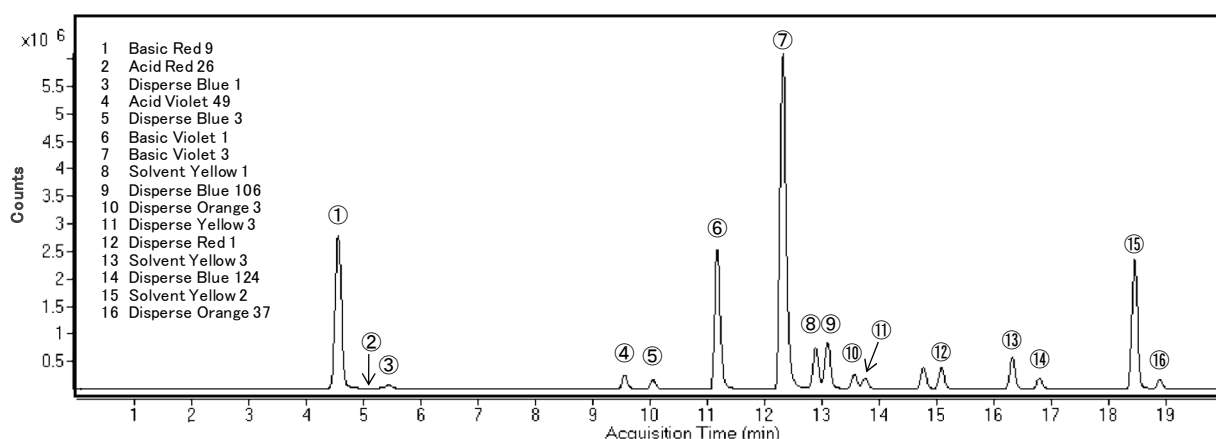


Fig.4 Selected Reaction Monitoring Chromatogram of 16 Types of Colourants Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry(LC/MS/MS)

Operating conditions of LC/MS/MS are given in text.

Table 4 LC/MS/MS Detection Parameters and Analytical Data for 16 Types of Colourants

(Retention time, Precursor ion, Product ion, Collision energy, SNR (signal to noise ratio) and Detection limit (signal to noise ratio of 3, S/N=3))

No.	Compounds	Retention Time (min.)	Detection Mode	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	CE ¹ (eV)	SNR ²	Detection Limit ³ (S/N=3)(pg)
1	Basic Red 9	4.58	positive	288	195	30	428.2	3.50E-02
2	Acid Red 26	5.01	negative	217	137	20	<1	1.00E+02
3	Disperse Blue 1	5.44	positive	268	239	40	12.9	1.16E+00
4	Acid Violet 49	9.56	positive	712	526	55	282.9	5.30E-02
5	Disperse Blue 3	10.05	positive	297	252	15	13.9	1.08E+00
6	Basic Violet 1	11.17	positive	358	342	40	254.9	5.88E-02
7	Basic Violet 3	12.31	positive	372	356	40	1126.9	1.33E-02
8	Solvent Yellow 1	12.89	positive	198	77	20	218.1	6.88E-02
9	Disperse Blue 106	13.09	positive	336	178	15	477.5	3.14E-02
10	Disperse Orange 3	13.56	positive	243	122	15	57.4	2.61E-01
11	Disperse Yellow 3	13.75	positive	270	107	25	16.6	9.04E-01
12	Disperse Red 1	15.08	positive	315	134	25	81.5	1.84E-01
13	Solvent Yellow 3	16.32	positive	226	91	20	148.9	1.01E-01
14	Disperse Blue 124	16.79	positive	378	220	6	150.6	9.96E-02
15	Solvent Yellow 2	18.45	positive	226	77	20	835.1	1.80E-02
16	Disperse Orange 37	18.89	positive	392	351	20	7.7	1.95E+00

1: Collision Energy

2: Signal-to-Noise Ratio (1ppb, 5 μ l)

3: Detection Limit (Signal-to-Noise Ratio of 3, S/N=3)

～1.9 pg (Disperse Orange 37) であり、LC/TOF-MS の場合と同様に、着色剤によって 100 倍程度の感度の違いが見られた。しかし、LC/TOF-MS よりは、30～50 倍ほど高感度であった。negative モードで測定した Acid Red 26 の感度は低く、SNR は 1 より小さく、1 μ g/ml で測定した検出限界 (S/N=3) は、0.1 ng であった。これは、Disperse Orange 37 の 50 分の 1 の低感度であった。それでも、EN71 の規制限度値(action limit) である 10 μ g/g (最終試料溶液量を 1ml として濃度は 5 μ g/ml) は、十分測定可能である。使用装置、条件は異なるものの、Acid Red 26 を negative モードで測定した報告がある^{12,13)}。この報告では、positive モードで測定した Disperse Blue 1 よりやや高い感度が得られてい

る。今後、異なる機種でも検出を試みる予定である。各着色剤の SRM イオンのピーク面積値での検量線(1～1000 ng/ml)を作成したところ、いずれも R^2 が 0.99 以上の良好な直線性を示した。また、これらクロマトグラムの再現性は全て良好であった。

4. 市販製品の分析

我々は既に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) の 20 試料に対して、HPLC-DAD による定性、半定量試験を行った。その結果、分析した製品からは、どの着色剤も検出しなかったことを報告した¹¹⁾。今回検討した LC/MS に導入するための移動相条件 (酢酸アンモニウムとギ酸の水溶液及び

アセトニトリル混液)で、同一製品を分析したところ、やはり、16種の着色剤とUVスペクトル及び保持期間が共に一致するピークを示す試料はなかった。

次に、これら製品に、LC/MS/MS法及びLC/TOF-MS法による測定を行った。まず、LC/TOF-MSによる測定で構造解析を行ったところ、2試料から微量のDisperse Orange 3とDisperse Orange 37が検出された。試料No.13からDisperse Orange 3が、試料No.18からはDisperse Orange 37が検出された。その抽出イオンクロマトグラム(EIC)及びスペクトルをFig.5に示す。さらに、LC/MS/MSによる測定・定量を行い、やはり前

述の2試料からDisperse Orange 3とDisperse Orange 37が検出された。そのSRMクロマトグラムをFig.6に示す。検出した値は、試料No.13から検出されたDisperse Orange 3が74.2 ng/g(溶液量1 ml、濃度37.1 ppb)、試料No.18からのDisperse Orange 37が112.2 ng/g(溶液量1 ml、濃度56.1 ppb)であった。この値は、EN71の規制限度値(action limit)である10 µg/g(最終試料溶液量が1 mlとして5 µg/mlの濃度)と比較すれば、はるかに低濃度である。従って、最終的判定方法として、今回検討したLC/TOF-MS、LC/MS/MS共に、十分適用可能な測定法であることが分かった。

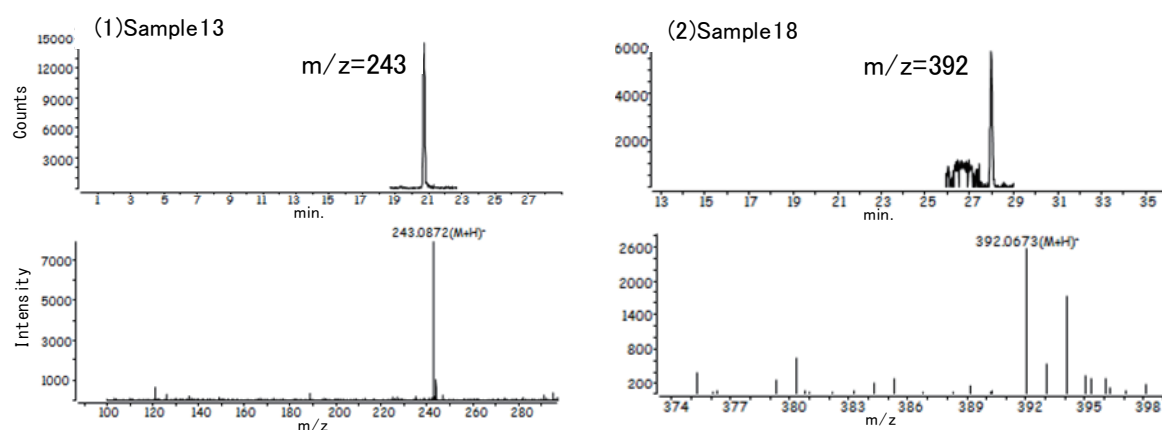


Fig.5 Extracted Ion Chromatograms and Mass Spectra of Disperse Orange 3 from Sample 13 and Disperse Orange 37 from Sample 18 Using Liquid Chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry(LC/TOF-MS)
(1) Sample 13 : Disperse Orange 3 was Detected (20.7 min.), (2) Sample 18 : Disperse Orange 37 was Detected (28 min.)

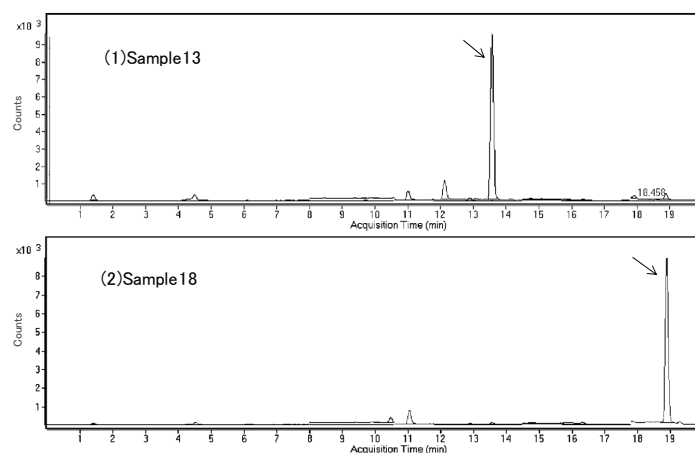


Fig.6 Selected Reaction Monitoring Chromatograms of Disperse Orange 3 from Sample 13 and Disperse Orange 37 from Sample 18 by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry(LC/MS/MS)
(1) Sample 13 : Disperse Orange 3 was Detected (m/z=122, 13.6 min.),
(2) Sample 18 : Disperse Orange 37 was Detected (m/z= 351, 18.9 min.)

まとめ

我々は、欧州規格 EN71「玩具の安全性規制」の中で、繊維製玩具に対し規制されている 16 種の着色剤の試験法について再検討と改良を行っている。既に、最終試験法の第一段階である HPLC-DAD による分析法を検討し、結果を報告した。今回まず、最終試験法の第二段階である LC/MS 導入のために、HPLC 分離条件の検討を行い、移動相に酢酸アンモニウムとギ酸水溶液／アセトニトリル混液を用いて、ODS カラムによる 16 種の着色剤の相互分離を可能とした。

次に、LC/TOF-MS による測定法 (positive/negative) を検討した。positive モード測定で 15 種の着色剤の抽出イオン (EI) による検出限界は、S/N=3 として 0.62

(Basic Red 9) ～60 pg (Disperse Blue 1) であり、着色剤によって 100 倍の感度の違いがあった。negative モード測定で Acid Red 26 は Disperse Blue 1 に比べて 50 分の 1 の低感度であった (S/N=3 として 3ng)。各着色剤の抽出イオンのピーク面積値での検量線 (0.02～5 µg/ml) は、いずれも R^2 が 0.99 以上の良好な直線性を示した。

さらに、LC/MS/MS による測定法を検討した。positive モード測定で 15 種の着色剤の SRM イオンでの検出限界は、S/N=3 として 0.013 (Basic Violet 3) ～1.9pg (Disperse Orange 37) であり、着色剤によって 100 倍以上の感度の違いがあった。ここでも negative モード測定で Acid Red 26 は Disperse Orange 37 より 50 分の 1 以下の低感度であった (S/N=3 として 0.1ng)。しかし、いずれも LC/TOF-MS よりは、30～50 倍ほど高感度であった。各着色剤の SRM イオンのピーク面積値での検量線 (1～1000ng/ml) を作成したところ、いずれも R^2 が 0.99 以上の良好な直線性を示した。

前報 HPLC-DAD での分析調査に用いた市販乳幼児繊維製品 (玩具、衣服) を、LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS で分析した。その結果、低濃度ではあるが、1 試料から 74.2 ng/g (試料溶液量 1ml、濃度 37.1ppb) の Disperse Orange 3 が、1 試料から 112.2 ng/g (試料溶液量 1ml、濃度 56.1ppb) の Disperse Orange 37 が検出された。この値は、EN71 の規制限度値 (Action limit) である 10µg/g (最終試料溶液量が 1ml として 5µg/ml の濃度) と比較すれば、はるかに低濃度である。従って、最終的判定方法としては、LC/TOF-MS、LC/MS/MS 共に、十分適

用可能な測定法であることが分かった。

LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS での測定に際し、ご協力頂いたアジレント・テクノロジー株式会社の滝埜昌彦博士に深謝いたします。

文 献

- 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, 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), pp160-208
- 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 0809:200, 東京(2001)
- 7) (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)
- 8) 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)
- 9) 中島晴信, 鹿庭正昭: 乳幼児繊維製品 (玩具及び衣服) 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, 大阪府立公衆衛生研究所報告, 47, 75-80(2009)
- 10) Kawakami T, Isama K, Nakashima H, Tsuchiya T and Matsuoka A: Analysis of primary aromatic amines originated from azo dyes in commercial textile products in Japan, J. Environ. Sci. Health Part A, 45, 1281-1295(2010)
- 11) 中島晴信, 山崎勝弘, 深谷 崇, 鹿庭正昭: 乳幼児繊維製品 (玩具及び衣服) に規制されている 16 種の着色剤の分析調査, 大阪府立公衆衛生研究所

報告, 48, 65-69(2010)

- 12) Ding Y, Cao X, Wu L and Zhang Q: Fast separation and identification of nine carcinogenic dyes in textiles using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, Chinese Journal of chromatography, 26(5), 603-605(2008)
- 13) Ding Y, Sun C and Xu X: Simultaneous identification of nine carcinogenic dyes from textiles by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry via negative/positive ion switching mode, Eur.J.Mass Spectrom., 15, 705-713(2009)

Sensitivities of Ciprofloxacin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates to Fluoroquinolones; Role of Mutant DNA Gyrase Subunits in Drug Resistance

Y. SUZUKI^{*1}, C. NAKAJIMA^{*1}, A. TAMARU^{*2}, H. Kim^{*1},
T. MATSUBA^{*3}, H. SAITO^{*4}

Int. J. Antimicrob. Agents, 39, 435-439 (2012)

日本で分離された 59 株のシプロフロキサシン耐性結核臨床分離株の、シタフロキサシン、ガチフロキサシン、モキシフロキサシン、スパフロキサシン、レボフロキサシン、スプロフロキサシンに対する最少発育阻止濃度を測定した。これらの臨床分離株はシタフロキサシン、ガチフロキサシンにもっとも感受性であった。キノロン耐性に関与する DNA ジャイレース A、B の塩基変異を調べたところ、ジャイレース A の 2 か所の変異と、ジャイレース A、B 両方に変異がおこった変異がキノロン系薬剤への耐性の強さと相関していた。

Investigation of *stx2+* *eae+* *Escherichia coli* O157:H7 in Beef Imported from Malaysia to Thailand

P. SUKHUMUNGOON^{*1}, Y. NAKAGUCHI^{*2}, N. INGVIYA^{*1}, J. PRADUTKANACHANA^{*1}, Y. IWADE^{*3}, K. SETO^{*4}, R. SON^{*5}, M. NISHIBUCHI^{*2} and V. VUDDHAKUL^{*1}

International Food Research Journal, 18, 381-386 (2011)

東南アジアの国々を流通する食品の微生物学的安全性について知見を得るため、マレーシアからタイ南部へ輸入された牛肉について腸管出血性大腸菌 O157 の汚染実態を調査し、タイ国内への二次汚染の拡大についても検討した。

免疫磁気ビーズ法とクロモアガーO157 寒天培地を用いて O157 を検出したところ、マレーシアから輸入された牛肉 31 検体中 8 検体 (25.8%) から 14 株、タイ国産牛肉 36 検体中 4 検体 (11.1%) から 6 株の O157 が分離された。このうち、輸入肉由来の 1 株は、インチミン遺伝子 (*eae*) を保有していたが志賀毒素遺伝子はタイプ 1 (*stx1*)、タイプ 2 (*stx2*) とともに陰性であった。残りの 19 株は *stx1* 陰性、*stx2* および *eae* 陽性であったが、逆受身ラテックス凝集反応で測定した毒素量は極めて少ないあるいは陰性と判定された。これらの株では、*stx2* の転写に関わる *q* 遺伝子領域が Stx2 産生菌とは異なっていた。また、薬剤感受性試験や IS-printing System およびパルスフィールド・ゲル電気泳動法を用いた遺伝子型別の結果から、タイ国産牛肉由来株の中にはマレーシア輸入肉由来株と近似度の高い株があり、輸入肉を介してマレーシアからタイへ汚染が拡大してきた可能性が考えられた。

^{*1} 北海道大学人獣共通伝染病リサーチセンター

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*3} 鳥取大学医学部

^{*4} 広島県環境保健協会

シプロフロキサシン耐性結核菌臨床分離株のキノロン系薬剤に対する感受性：DNA ジャイレース遺伝子変異の薬剤耐性に対する役割

^{*1} ソンクラ大学

^{*2} 京都大学東南アジア研究所

^{*3} 三重県保健環境研究所

^{*4} 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*5} プトラ大学

マレーシアからタイへ輸入された牛肉の EHEC O157 汚染実態調査

Emergence of a Novel Shiga Toxin-Producing
Escherichia coli O-Serogroup Cross-Reacting with
Shigella boydii type 10

A. IGUCHI^{*1}, S. IYODA^{*2}, K. SETO^{*3}, M. OHNISHI^{*2}
and ON BEHALF OF THE EHEC STUDY GROUP

J. Clin. Microbiol., 49, 3678-3680 (2011)

日本で分離される志賀毒素産生性大腸菌（STEC）の中には、市販免疫血清でO抗原型が型別できないOUT株がある。このうち、2008年に血便患者から分離されたSTEC（EHOUT32）について、O抗原コード領域（約18kb）の塩基配列を決定して相同性解析を行った結果、*Shigella boydii* 10のO抗原コード領域と遺伝子構成が同じであった。EHOUT32は、*S. boydii* 10のO抗原免疫血清と凝集することも確認され、EHOUT32のO抗原は遺伝学的・血清学的に*S. boydii* 10と相同であると考えられた。大腸菌と*Shigella*属菌においては、いくつかのO抗原型で交差反応を示すことが知られているが、大腸菌と*S. boydii* 10の交差はこれまでに報告されていない。

便宜上、EHOUT32のO抗原型を「OSB10」とし、日本におけるSTEC OSB10の分離状況を調査した。2007年から2010年に日本各地で分離されたSTEC OUT 20株のうち、11株が*S. boydii* 10の免疫血清と凝集した。さらにOSB10を特異的に検出するPCR法において、これらの11株がOSB10コード領域を保有することが確認された。

本研究で得られたOSB10株は合計12株で、3株は下痢患者（うち1件は血便患者）由来であり、9株は無症状保菌者由来であった。

以上の結果から、STEC OSB10が日本各地で散発感染事例を引き起こしている可能性が示唆された。今後、日本のみならず世界における本菌の動向に注意が必要であると考えられた。

^{*1} 宮崎大学 IR 推進機構

^{*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 細菌課

Shigella boydii 10 と同一の O 抗原を保有する志賀毒素産生性大腸菌

Wide Distribution of O157-Antigen Biosynthesis Gene
Clusters in *Escherichia coli*

A. IGUCHI^{*1}, H. SHIRAI^{*2}, K. SETO^{*3}, T. OOKA^{*4}, Y.
OGURA^{*4,5}, T. HAYASHI^{*4,5}, K. OSAWA^{*2} and R.
OSAWA^{*6}

PLoS ONE, 2011, 6, e23250

O 抗原型が O157 を示す大腸菌のうち、O157:H7 の多くは志賀毒素（Stx）を産生し、ヒトの重要な食品媒介病原体である腸管出血性大腸菌（EHEC）として知られている。一方で、Stx を産生せず H7 以外の H 抗原型を示す O157 もヒトから分離される。このような O157:non-H7 について multilocus sequence analysis を実施したところ、21 株の O157:non-H7 は EHEC O157:H7 とは異なる複数の系統群に分類され、O157 抗原合成遺伝子群が広く大腸菌に分布していることが示唆された。

系統群の異なる O157:non-H7 5 株と EHEC O157:H7 1 株について O157 抗原コード領域とその周辺領域（約 59kb）を比較したところ、遺伝子構成はいずれの株でも高度に保存されており、塩基配列レベルでの詳細な解析により大きく 2 つのタイプに分類されることが明らかになった。また、各株の進化系統と 2 タイプの O157 抗原合成遺伝子群の分布の関係は一致せず、2 タイプの O157 抗原合成遺伝子群がそれぞれ独立して大腸菌株間を水平伝播している可能性が示唆された。O157 抗原合成遺伝子群の周辺には repetitive extragenic palindromic（REP）配列があり、REP 配列での遺伝子組換えによって、複数の系統群に O157 抗原合成遺伝子群の分布が広がったと推察される。

^{*1} 宮崎大学 IR 推進機構

^{*2} 神戸大学大学院保健学研究科

^{*3} 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*4} 宮崎大学医学部

^{*5} 宮崎大学フロンティア科学実験総合センター

^{*6} 神戸大学大学院農学研究科

大腸菌における O157 抗原合成関連遺伝子群の水平伝播

下痢原性大腸菌の検査

勢戸和子*

検査と技術, 39, 659-664 (2011)

下痢原性大腸菌は病原機序の違いから数種類に分類される。このうち食中毒や集団感染症が報告されているものは、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAEC) で、同定には病原因子の確認が必要である。

なかでも腸管出血性大腸菌 (EHEC) は病原性が強く、溶血性尿毒症症候群や脳症などの合併症を引き起こす場合があるため、感染症法では全数把握疾患 (三類感染症) に指定されており、食中毒統計でもその他の病原大腸菌とは区別して集計されている。

食品からの EHEC 検出法は、平成 18 年に厚生労働省から通知された方法に従って実施されるが、食品が冷凍あるいは加熱されている場合は非選択性の増菌培地が望ましい。分離培地は、代表的な血清群である O157 や O26 については特徴的な性状を利用した培地が使用できるが、その他の血清群については、多くのコロニーをベロ毒素 (VT) 産生性または VT 遺伝子保有でスクリーニングする必要がある。

同様に、ETEC はエンテロトキシン産生性、EIEC は細胞侵入性、EPEC と EAEC は細胞付着性を確認して同定する。いずれもエンテロトキシン遺伝子あるいは侵入性や付着性に関連する遺伝子を検出する PCR 法を利用できるが、EIEC は赤痢菌と同一の病原性関連遺伝子を保有するため、生化学的性状や血清型別による鑑別が必要である。

EHEC の遺伝子型別法は、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法が標準的解析法になっており、国立感染症研究所と地方衛生研究所を結ぶネットワーク (パルスネット) で PFGE 型と疫学情報を組み合わせて活用されている。PFGE 法は、EHEC 以外の下痢原性大腸菌でも有用である。

Molecular Epidemiological Investigation of a Diffuse Outbreak Caused by *Salmonella enterica* serotype Montevideo Isolates in Osaka Prefecture, Japan

T. HARADA, J. SAKATA, M. KANKI, K. SETO, M. TAGUCHI, and Y. KUMEDA

Foodborne Pathog. Dis., 8, 1083-1088 (2011)

2007 年 9 月から 2008 年 5 月に、大阪府内で *Salmonella enterica* serotype Montevideo (*S. Montevideo*) による 3 件の食中毒が発生した。また、同時期に複数の散発下痢症患者および健康保菌者からも本菌の分離が報告された。これらの株の関連性を明らかにするため、1991 年から 2006 年の分離株を加えた 29 株の薬剤感受性試験および PFGE 解析を行った。また、Multiple-locus variable-number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) の検討を実施した。

薬剤感受性試験では、29 株中 1 株のみがナリジクス酸に耐性を示した。また、制限酵素 *Xba*I および *Bln*I を用いた PFGE では、29 株は 17 (PFGE type a-q) のパターン (相同性 90%以上) に分けられた。MLVA の検討では、3~12bp の 100%相同の繰り返し配列をもつ locus M-1、locus M-2、locus M-3 の 3 領域が VNTR 領域として選出され、結果として、供試された 29 株は 11 タイプ (MLVA type A-K) に分類された。

今回の分子疫学解析では、2007 年から 2008 年の間に分離された 10 株のうち 6 株は、疫学的関連性がないにもかかわらず、同一の薬剤感受性パターン (感受性)、PFGE パターン (PFGE type d)、MLVA パターン (MLVA type D) を示した。これらのパターンを示す株は 1991 年からの 18 年間でこの時期にのみ確認されたため、特定の *S. Montevideo* 株による diffuse outbreak がこの期間に発生した可能性が強く示唆された。また、今回検討した MLVA でもこの diffuse outbreak 株を特定することが可能であったことから、*S. Montevideo* の分子疫学解析における本方法の有効性が示された。

*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

Detection and Identification of Diarrheagenic *Escherichia coli*

大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

Diffuse outbreak が疑われた *Salmonella enterica* serotype Montevideo 事例の分子疫学解析

エンテロウイルス感染症

山崎謙治*

防菌防黴誌, 39, 319-327 (2011)

ピコルナウイルス科エンテロウイルス属には 64 の血清型ウイルスがあり、ポリオ、コクサッキーA, B、エコーウイルスなどに分類される。エンベロープを持たない小型の RNA ウイルスである。日本では夏季を中心に主として乳幼児の間で毎年流行する。経口・飛沫により感染し、無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナなど多様な病像を示す。ウイルスの分離または遺伝子検出による実験室内診断が行われる。エンテロウイルス(EV)は血清型が 64 種もあるにもかかわらず日本人成人の 50%以上がほとんどすべての血清型に対する抗体を保有している。ということは大半の日本人が乳幼児期に多くの EV 感染の洗礼を受けているということである。EV 感染は不顕性で終わることも多いが、さまざまな病態を現し、時には死に至らしめることもある。EV には適切な治療薬やワクチンもないことから、EV 感染にたいする積極的な予防対策やサーベイランス活動が重要であると考ええる。

感染症を引き起す微生物の基礎知識
ノロウイルスによる食中毒・感染症

左近直美^{*1}, 西尾治^{*2}

クリーンテクノロジー, 12, 21-27 (2011)

ウイルスが原因物質として食品衛生法に組み込まれたのは 1997 年で、10 年以上が経過した。その間、検出感度の向上にむけた努力がなされ、二枚貝のみならず、拭き取り検査や各種食品からの検出によってノロウイルスの汚染実態や様々な感染経路が明らかにされるようになった。2006/07 年の大流行の後、多くの施設でノロウイルス対策が実施されてきたにもかかわらず、ノロウイルスによる食中毒や集団胃腸炎の減少には至っていない。

そこで、ノロウイルスによる感染症及び食中毒対策としてノロウイルスの 1) 性状 2) 免疫 3) 疫学: 食中毒と集団胃腸炎性状 4) 大量調理施設マニュアル 5) 食品検査法の開発 6) 環境サイクルと感染性の維持について述べ、発生の特徴について述べた。次に各種ウイルスを用いた不活化試験の報告を紹介し、それぞれの試験法の特徴とその評価について、さらにノロウイルスのウイルス学的性状を考慮したそれら試験結果の解釈について考察した。

*¹ 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

Infection with enteroviruses

*¹ 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

*² 愛知医科大学 医学部 公衆衛生額教室

Food-borne and Infectious disease occurred by Norovirus

注目されるウイルス感染症と制御対策
はじめに

加瀬哲男*

防菌防黴 39 (5) 291-296 (2011)

ウイルスは細菌とは大きく性質が異なるため、ウイルス感染症の制御対策も細菌感染症とは異なる点があります。ウイルスには、ほとんど抗ウイルス剤が存在しないため、多くのウイルス感染症では、感染源の隔離あるいは淘汰、感染経路の把握、ワクチン接種が主な対策になります。また熱や紫外線などの物理的刺激あるいは化学消毒剤に対しても細菌とは異なることも多いので、ウイルス感染症の制御には、疾病毎の病因となる病原体特有の性質を理解することが重要です。

VPD(vaccine preventable diseases) のサーベイランス

加瀬哲男*

総合臨牀 60 (11) 2198-2203 (2011)

感染症サーベイランスとは、感染症の対策に必要な情報を広範囲に収集することにより、その疾病の特徴を明らかにし、疾病の対策に直結するような方策を示すために行われるものである。当然、Vaccine Preventable Diseases (VPD) のサーベイランスとは、通常患者数の推移など単純な発生動向をみるだけでなく、現在日本で実施されているワクチンの有効性を明らかにするために行われるべきサーベイランスと考えられる。しかしながら、現在の日本でのワクチン政策はかなり複雑で、定期接種、任意接種または任意接種でも公的補助があるものなどに分かれており、すべての VPD が効果的にサーベイランスされているわけではない。感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）では疾病分類として 1～5 類、新型インフルエンザ等の類型がある。この中で謳われている VPD は少なくとも、法律上は感染症サーベイランスが行われている疾患である。ただ、感染症法のサーベイランスは全数把握疾患と定点把握疾患に分かれており、また病原体についても検索すべき疾患と特に検索を必要としない疾患がある。

ワクチンには、予防接種法で定期接種に位置付けられているポリオ、ジフテリア・百日咳・破傷風・(DPT)、麻疹・風疹 (MR)、日本脳炎、BCG(結核)、インフルエンザと通常任意接種のおたふくかぜ(流行性耳下腺炎)、水痘、A型肝炎、B型肝炎、b型インフルエンザ菌 (Hib)、肺炎球菌、ヒトパピローマウイルス (HPV)、などがある。

ここでは、代表的な VPD について特に感染症法の疾病分類との関連において、実際に地方衛生研究等で行われている感染症サーベイランスについて概説した。

*大阪府立公衆衛生研究所

Noteworthy viral infection and Control Measures

(1) Opening Remarks

*大阪府立公衆衛生研究所

Surveillance of vaccine preventable diseases

注目されるウイルス感染症と制御対策
-新型インフルエンザについて-

森川佐依子*

防菌防黴、39、297-306 (2011)

インフルエンザウイルス H1N12009pdm について、ウイルスの性状、病原性、従来よりヒト社会で流行している「季節性インフルエンザ」との差異などについて下記の項目で解説した。

1. インフルエンザウイルスについて
分類
宿主域
感染環
2. 新型インフルエンザとは
抗原性について
3. 2009 年の新型インフルエンザについて
由来
流行の特徴
臨床像の特徴
診断
治療
予防

Genetic analysis of human adenovirus type 54
detected in Osaka, Japan

S. HIROI^{*1}, N. KOIKE^{*2}, T. NISHIMURA^{*2},
K. TAKAHASHI^{*1}, S. MORIKAWA^{*1} and T. KASE^{*1}

Jpn. J. Infect. Dis., 64, 535-537 (2011)

アデノウイルス 54 型は近年同定された流行性角結膜炎の原因となるウイルスである。今のところ 54 型は日本でのみ検出されており、大阪府で 2010 年に結膜炎のサーベイランス検体から分離したアデノウイルス 7 株の遺伝子解析を行ったところ、すべて 54 型と判明した。また、以前に行っていた中和試験による血清型別では 54 型を判別できないため、過去の分離株の遺伝子も解析したところ 2003 年に分離された 1 株が 54 型と判明した。

アデノウイルスの型別は現状では中和試験よりも遺伝子解析が有効だと考えられる。新しい型のアデノウイルスの検出報告が国内外で相次いでいることから、大阪府でもアデノウイルスの継続的なサーベイランスが重要である。

*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

Noteworthy viral infectious and control measures.

-Pandemic influenza virus.-

*1 大阪府立公衆衛生研究所

*2 関西医科大学附属滝井病院

大阪府で検出されたアデノウイルス 54 型の遺伝子解析

ダニによる病気の現状と注意点

弓指孝博

ビル管理の研究と開発、**38**、6-13(2011)

ダニによって媒介される感染症のうち、ツツガムシ病、日本紅斑熱、ライム病、野兔病、バベシア症、ロシア春夏脳炎について、その発生状況、症状、媒介ダニなどについて概説し、わが国及び大阪府での現況を紹介した。また、感染症ではないが、ダニによる重篤な皮膚病として疥癬についてもその生態、対策の注意点などについて解説した。

注目されるウイルス感染症と制御対策
アルボウイルス感染症

弓指孝博

防菌防黴、**39** (7)、443-459 (2011)

蚊やダニなどの節足動物から脊椎動物へ伝播されるアルボウイルスは、熱帯・亜熱帯を中心に世界に広く分布しており、人に感染して重篤な脳炎や出血熱を起こすものも多い。ここでは、かつてわが国で大流行し現在も少数ながら患者が発生している日本脳炎や北海道での存在が明らかになったダニ媒介性脳炎(ロシア春夏脳炎)、また、輸入感染症として増加傾向にあるデング熱及びチクングニヤ熱、さらに海外で感染する危険性のあるウエストナイル熱などアルボウイルスの中で我々に関係のあるものを中心に、その分類、病因、病態、検査法、予防・治療について解説した。

* 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課
Tickborne Diseases and Cautions against Them

* 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課
Noteworthy Viral Infections and Control Measures
Arboviral Infections

日本脳炎の現状と予防接種

青山幾子

大阪公衆衛生 83, 18-19 (2012)

日本脳炎は極東から東南アジア・南アジアにかけて広く分布する急性のウイルス脳炎である。世界的には毎年 3 ～4 万人の患者報告がある。日本では、1940 年代から 1960 年代半ばまで毎年 1 千人～5 千人以上の患者が発生していた。その後患者は激減し、1972 年以降は 100 人以下、1990 年以降は 10 人以下の発生で推移している。大阪府内でも 2002 年、2009 年に患者報告がみられた。

日本脳炎の病原体はフラビウイルス科に属する日本脳炎ウイルスである。このウイルスに感染しているブタや鳥類を吸血した蚊がヒトを刺すことによって感染する。ヒトからヒトへの感染はない。

日本脳炎は、6～16 日の潜伏期間の後、典型的な症状として 38 度以上の高熱、頭痛、悪心、嘔吐、めまいなどを呈し、その後、意識障害やけいれん、麻痺などが生じる。不顕性感染は 80%程度であるが、発病した場合の死亡率は約 20%で、精神神経学的後遺症は生存者の 45～70%に残り、特に小児では重度の障害を残すことが多いといわれている。

日本脳炎は代表的なワクチンで防げる病気 (VPD) の一つで、予防にはワクチン接種が有効である。また、対策としては蚊に刺されないことが重要である。日本脳炎の予防接種は 1994 年から定期接種として実施されてきたが、2005 年にワクチン接種後に急性散在性脳脊髄症 (ADEM) という疾患になったと考えられる事例があったことから、厚生労働省は日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨を差し控えた。2010 年 4 月から積極的勧奨が再開されたが、勧奨中止期間の 2006、2008 年は低年齢の抗体保有率が顕著に低くなり、再開後の 2010 年でもまだ中止前の半分程度である。

日本、韓国、台湾などではワクチン接種により日本脳炎の流行が阻止されているが、ワクチン接種率が低下すると発症者の増加につながるおそれがある。

*大阪府立公衆衛生研究所

The present state of Japanese encephalitis vaccine.

Intron Sequences from the CCT7 Gene Exhibit Diverse Evolutionary Histories among the Four Lineages within the *Babesia microti*-group, a Genetically Related Species Complex that Includes Human Pathogens

K. Fujisawa^{*1}, R. Nakajima^{*2}, M. Jinnai^{*3}, H. Hirata^{*1}, A. Zamoto-niikura^{*4}, T. kawabuchi-Kurata^{*3}, S. Arai^{*4} and C. Ishihara^{*1}

Jpn J Infect Dis, 64, 403-410 (2011)

北米のヒトバベシア症の主要な病原体である *Babesia microti* はマダニおよび齧歯類に起因してヨーロッパに蔓延したと考えられていた。β チューブリンおよび the chaperonin-containing t-complex protein 1 (CCT η) 遺伝子の η サブユニットの最近の解析により、分離したクラスター (US、Kobe、Munich および Hobetsu の少なくとも 4 つの分類群で構成される種群) が明らかとなった。

種間のマイクロ進化史および遺伝的多様性をさらに解析することを目的として、CCT η 遺伝子の 6 つのイントロンのセットを組み合わせ、系統発生的および比較配列解析を行った。その結果、US の分類群を 3 つの地理学的サブクレードに細分類した。日本の一部の地理的地域でのみ発生する Kobe 分類群はさらに 2 つのサブグループに細分類できた。ヨーロッパおよび日本において一般的である Munich および Hobetsu の分類群は、地理的に多様なサンプルでの比較に関わらず、それぞれの配列多様性はほとんど見られず、最近の進化史内での大規模な集団的ボトルネックが示唆された。本研究により *B. microti* 群の各系統内にみられるマイクロ進化的関係および遺伝的多様性のさらなる理解が得られた。

*¹ 酪農学園大学 獣医学部

*² Academia sinica 台北 (台湾)

*³ 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

*⁴ 国立感染症研究所

CCT η 遺伝子のイントロン配列はヒト病原体を含む遺伝的近縁種群である *Babesia microti* 群の 4 つの系統間の多様な進化史を示す

Novel Anti-HIV-1 Activity Produced by Conjugating
Unsulfated Dextran with PolyL-lysine

K.NAKAMURA^{*1}, T.OHTSUKI^{*2}, H.MORI^{*3},
H.HOSHINO^{*2}, A.HOQUE^{*2}, A.OUE^{*2}, F.KANO^{*1},
H.SAKAGAMI^{*1}, K.TANAMOTO^{*4}, H.USHIJIMA^{*5},
N.KAWASAKI^{*6}, H.AKIYAMA^{*6} and H.OGAWA^{*1}

Antiviral Research, **94**, 89-97 (2008)

それぞれ単体では抗 HIV-1 活性を持たないポリ L-リジン (PLL) と非硫酸化デキストラン (Dex) を還元アミノ化により結合させたシュードプロテオグリカン (pseudoPG) は、種々のアッセイ系においてマクロファージ指向性の R5 HIV-1 と T 細胞指向性の X4 HIV-1 の双方に対して優れた抑制活性を示した。中でも、10kDa-PLL と 10kDa-Dex を用いて合成された pseudoPG PLL-Dex は硫酸化デキストランと比較すると R5 ウイルスに対しては 4~40 倍、X4 ウイルスに対してもほぼ同等の増殖抑制効果があり、PBMC と臨床分離 HIV-1 株を用いたアッセイでも R5 ウイルスの増殖を強く抑制した。さらに、ウイルスと細胞を PLL-Dex で前処理したところ、どちらも濃度依存性に抗 HIV-1 活性が認められたことから、PLL-Dex の作用点はウイルス側と細胞側の双方であることが示唆された。

注目されるウイルス感染症と制御対策 8
エイズ (AIDS)

森 治代*

防菌防黴誌、**39**、433-442 (2011)

エイズは、その原因ウイルスである HIV が免疫担当細胞に感染することにより引き起こされる重篤な免疫不全疾患である。HIV の増殖を強力に抑制する治療薬が多数開発され、早期に適切な治療を行えばコントロール可能な慢性疾患と位置づけられるようになっていくが、未だ完治はできない。本稿では、日本における HIV/エイズの現状について

- ・ HIV 感染者、エイズ患者の発生動向
- ・ 感染経路
- ・ サブタイプ
- ・ HIV 検査
- ・ 抗 HIV 療法、等

の項目を挙げて解説した。

*1 お茶の水女子大学大学院

*2 群馬大学大学院医学系研究科

*3 大阪府立公衆衛生研究所

*4 武蔵野大学

*5 藍野大学

*6 国立医薬品食品衛生研究所

非硫酸化デキストランとポリ L-リジンを結合することにより生じる
新規抗 HIV-1 活性

* 大阪府立公衆衛生研究所

Noteworthy viral infection and Control Measures 8: AIDS

HIV 対策—大阪府の現状と公衛研の取り組み

川畑拓也*

病原微生物検出情報, **31**, 228-229 (2010)

大阪府内の HIV 感染の現状であるが、感染拡大が著しく、また潜在的な感染者が少なくないと考えられる。感染は MSM（男性と性行為を行う男性）を中心に同性間性的接触によって拡大している。推定では、これまで約 1,000 名の MSM が医療に繋がったが、約 1,000 名の MSM が未だ自身の感染に気がついておらず、4 万人以上の非感染 MSM が感染のリスクにさらされている状況であると考えられる。府内 MSM の HIV 検査の受検傾向は、40 歳代以上の MSM において自発的に HIV 検査を受ける人が少ない。

公衛研の取り組みとして、ゲイ・バイセクシャル男性が受診しやすい診療所を開拓することを目的に、府内複数の診療所の協力を得て、MSM を対象とした性感染症の検査キャンペーンを展開していることを紹介した。

HIV/AIDS 感染者・患者の多い地域における
公衆衛生専門機関の現状と課題

川畑拓也*, 小島洋子*, 森 治代*

公衆衛生, **74**, 914-917 (2010)

当所における HIV/AIDS 対策の活動の紹介として、以下の項目について概要を述べた。

- ・ 確認検査・ウイルス遺伝子解析と陽性者支援
- ・ 感染症発生動向調査における届出状況のモニタリングと情報の還元
- ・ 感染の広がりを知るための疫学調査
- ・ 新規治療薬の開発
- ・ 感染者の治療のためのウイルス学的検査法の開発
- ・ MSM（男性と性行為を行う男性）の医療環境の改善に向けた MSM を対象とした HIV 検査の実施
- ・ 地方衛生研究所の現状

また、「HIV/AIDS に対する公衆衛生対策の現状と課題」として、HIV の対策には、公衆衛生学的な視点に基づいた施策や利用者(住民)の視点に立った施策が重要であり、そのためには、医療関係者や医学研究者、民間支援団体、当事者組織等との協働が不可欠であることを述べた。

* 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

Countermeasures against HIV; Present situation in Osaka Prefecture and the role played by the Osaka Prefectural Institute of Public Health in the activity

* 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

Current situations and issues of (local governmental) public health institutes in the areas where many HIV/AIDS patients are reported

Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. Dioxide and Sodium Hypochlorite

T.SANEKATA^{*1}, T.FUKUDA^{*2}, T.MIURA^{*2},
H.MORINO^{*2}, C. LEE^{*2}, K.MAEDA^{*3}, K.ARAKI^{*4},
T.OTAKE^{*5}, T.KAWAHATA^{*5} and T.SHIBATA^{*2}

Biocontrol Science, **15**, 45-49 (2010)

我々は、二酸化塩素ガス溶液 (CD) と次亜塩素酸ナトリウム (SH) の抗ウイルス性の活性を、ネコカリシウイルス、ヒトインフルエンザウイルス、はしかウイルス、犬ジステンパーウイルス、ヒトヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルス、犬アデノウイルス、犬パルボウイルスを用いて評価した。その結果、1~100ppm の濃度に渡って CD は強い抗ウイルス活性を示した。そして、増感のための 15 秒の処置でウイルスの 99.9% を不活化した。CD の抗ウイルス活性は、SH のそれより約 10 倍高かった。

各種ウイルスの不活化に於いて次亜塩素酸ナトリウムと比較して二酸化塩素がより有効であることが明らかとなった。

Synthesis, anti-HIV and anti-oxidant activities of caffeoyl 5,6-anhydroquinic acid derivatives

CM. Ma^{*1}, T. KAWAHATA^{*2}, M. HATTORI^{*1},
T. OTAKE^{*2}, L. WANG^{*1} and M. DANESHTALAB^{*1}

Bioorg Med Chem. , **18**, 863-869 (2010)

生物活性を付加したクロロゲン酸アナログとその誘導体に関する我々の継続的な研究において、今回いくつかのカフェオイル酸誘導体を合成した。これらのカフェオイル酸の抗 HIV 活性と抗酸化活性を測定したところ、複数の誘導体で弱いながらも抗 HIV 活性をみとめた。

^{1*} 鳥取大学

^{2*} 大幸薬品

^{3*} 山口大学

^{4*} 国立感染症研究所

^{5*} 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

ネコカリシウイルス、ヒトインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、イヌジステンパーウイルス、ヒトヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルス、イヌアデノウイルスおよびイヌパルボウイルスに対する二酸化塩素および次亜塩素酸ナトリウムの抗ウイルス活性の評価

^{*1} 富山大学

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

カフェオイル-5,6-アンヒドロキナ酸誘導体の合成、抗 HIV および抗酸化活性

一抄 録一

性感染症サーベイランス結果の地方自治体による活用 の評価と支援

中瀬克己^{*1}, 中谷友樹^{*2}, 堀 成美^{*3}, 尾本由美子^{*4},
高橋裕明^{*5}, 山内昭則^{*5}, 福田美和^{*5}, 大熊和行^{*5},
川畑拓也^{*6}, 白井千香^{*7}, 兒玉とも江^{*8}, 山岸拓也^{*9},
大西 真^{*9}

日本性感染症学会誌, **22**, 49-55 (2011)

新型インフルエンザを機に、法に基づく感染症発生動向調査に限らず、広く感染症の動向を把握するサーベイランスシステムへの期待と関心が高まっている。今回、性感染症サーベイランスを運営する全国自治体を対象に、その運営と結果活用の状況に関してアンケート調査を実施した。回収率は 61.5%であった。集団発生を把握した自治体は 3 か所あり、HIV 感染症、梅毒などに関した伝播経路調査、接触者調査を行うなどの対応を行っていたが、少数にとどまった。7 割を超える自治体がサーベイランス結果を公表・還元していたが、その評価やコメントを記している割合は 4 割以下と低かった。広報への活用や施策への反映 は、HIV 感染症では 6 割程度あるものの、4 性感染症では 3 割以下と少なかった。アウトブレイク対応、定例的結果の活用例など発生動向調査の意義を関係者に伝えと共に、性感染症サーベイランス活用の推進には、結果活用ガイドライン、注意報・警報の試行の有用性を示唆した。

^{*1} 岡山市保健所

^{*2} 立命館大学

^{*3} 聖路加看護大学

^{*4} 江東区保健所

^{*5} 三重県保健環境研究所

^{*6} 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

^{*7} 神戸市保健所

^{*8} 岡山市保健所

^{*9} 国立感染症研究所

The Evaluation and improving measures of STI surveillance systems at the
local government level in Japan

タンデム固相抽出を用いた魚肉中ヒスタミン分析法の検討

栗津 薫^{*}, 野村 千枝^{*}, 山口 瑞香^{*}, 尾花 裕孝^{*}

食品衛生学雑誌, **52**(3), 199-204 (2011)

魚肉中のヒスタミンの分析を目的として、2 種類の固相抽出カートリッジカラムを直列に連結した精製法を検討した。魚肉中のヒスタミンを、トリクロロ酢酸溶液を添加し、ホモジナイズして抽出した。その上清を中和後、中性りん酸緩衝液で希釈し、ODS の下部に SCX を連結したカラムで精製した。試験溶液をフルオレスカミンで蛍光誘導体化し、蛍光検出器付き HPLC により測定したところ、クロマトグラム上に妨害ピークがほとんど見られなかった。6 種類の鮮魚および水産加工品における添加回収試験の結果、平均回収率は 83~92%、相対標準偏差は 5%以下であった。本法は、魚肉中のヒスタミン分析法として有用であった。

^{*}大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Determination of Histamine in Fish and Fish Products by Tandem
Solid-Phase Extraction

LC-MS/MS による畜産物中のポリエーテル系抗生物質
およびマクロライド系駆虫薬の一斉分析

山口瑞香*, 柿本健作*, 山口貴弘*, 尾花裕孝*

食品衛生学雑誌, **52**, 281-286 (2011)

LC-MS/MS を用いた畜産物中のポリエーテル系抗生物質およびマクロライド系駆虫薬の一斉分析法を検討した。試料にアセトニトリルを加えて抽出し、分散固相抽出とシリカゲル固相抽出カラムを用いて精製を行った。10 検体を約 3 時間で前処理することができ、迅速一斉分析が可能であった。畜産物での添加回収試験を実施した。マトリックス添加検量線を用いた定量結果は、牛肝臓のナラシンおよび牛乳のナラシン、ラサロシドを除き真度は 70~117%、相対標準偏差はガイドラインの目標値以内と良好であった。また、定量下限は 0.00005~0.0005 $\mu\text{g/g}$ であった。

Di(2-ethylhexyl)phthalate and
Mono(2-ethylhexyl)phthalate in the Media Using for in
Vitro Fertilization

S. TAKATORI*1, K. AKUTSU*1, F. KONDO*2, R.
ISHII*3, H. NAKAZAWA*4 and T. MAKINO*5

Chemosphere, **86**, 454-459 (2012)

フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP) は、可塑剤として多用されており、日常的な曝露が危惧される化学物質のひとつである。DEHP の主要な代謝物であるフタル酸モノ(2-エチルヘキシル) (MEHP) には、発生及び発育期にある精巣に毒性を示すことが動物実験において明らかにされている。このために妊婦、胎児及び乳児への当該化学物質の曝露が危惧されており、その曝露評価が求められている。この度、体外受精技術に不可欠な培養液中に当該化学物質の存在を認めたので分析することとした。発表者らは、市販の体外受精用培養液及びタンパク質供給源として培養液に添加する血液由来製剤(ヒトアルブミン溶液等)中の DEHP 及び MEHP を分析した。代表的な培養液について分析したところ、血液由来製剤を配合した培養液に DEHP 及び MEHP に相当するピークを検出した。定性試験を行った結果、当該ピークは、DEHP 及び MEHP であることが確認された。更に血液由来製剤の分析を行ったところ、より高い濃度の DEHP 及び MEHP を検出した。これらの結果により当該化学物質は、血液由来製剤の添加によって培養液中に持ち込まれていることが示唆された。また、その培養液で培養される受精卵は、当該化学物質に曝露されうることが推察された。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Simultaneous Determination of Polyether Antibiotics and Macrolide Anthelmintics in Livestock Products by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

*1 大阪府立公衆衛生研究所

*2 愛知県衛生研究所

*3 埼玉県衛生研究所

*4 星薬科大学

*5 有隣厚生会東部病院

体外受精に使用される培養液中のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)及びフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)の分析

ゴミシ中のシザンドリンおよびゴミシンAの分析

田上貴臣^{*1}、^{*2} 有本恵子^{*2} 伊藤美千穂^{*2} 大住優子^{*2}
岡坂衛^{*2} 金谷友成^{*2} 酒井英二^{*2} 嶋田康男^{*2}
高井善孝^{*2} 十倉佳代子^{*2} 中島健一^{*2} 野口 衛^{*2}
橋爪 崇^{*2} 久田陽一^{*2} 本多義昭^{*2} 守安正恭^{*2}
山本 豊^{*2} 横倉胤夫^{*2}

生薬学雑誌、65(2)、108-113(2011)

生薬ゴミシは主として漢方処方用薬であり、小青竜湯、人参養榮湯などに配合され、成分としてシザンドリン、ゴミシンAをはじめ多くのリグナン化合物を含む。シザンドリンおよびゴミシンAの定量法に関する報告はあるが、それらは抽出溶媒として有害試薬であるクロロホルムを用いている。さらに、既報においては液体クロマトグラフィーの移動相としてアセトニトリルが使用されているが、2009年にアセトニトリルの供給量が少なくなるという事態が発生した。

このことから、我々は有害試薬およびアセトニトリルを用いないシザンドリンおよびゴミシンAの分析法を確立するため本研究を行った。更に、市場品のシザンドリンおよびゴミシンA含量の測定を行い、この2成分を指標とした品質評価を試みた。

検討の結果、シザンドリンおよびゴミシンAの有害試薬およびアセトニトリルを用いない HPLC による定量法を確立した。また、ゴミシ市場品についてシザンドリン含量およびゴミシンA含量を測定したところ、シザンドリン含量は 0.214~0.868%、ゴミシンA含量は 0.073~0.314%であった。

近年10年間の市場品を5年単位で新しいものと古いもの2つに分け、シザンドリン含量、ゴミシンA含量および希エタノールエキス含量について比較したところ、いずれの間においても有意な差は認められず、これらを指標にした評価では新しいものと古いものにおいて品質の変動がほとんどないことが示唆された。また、シザンドリン、ゴミシンA共に果肉よりも種子に高濃度（シザンドリン：6.2~14.7倍、ゴミシンA：6.2~11.1倍）で存在していた。

Bactericidal Activity of Quaternium-15 and its
Decomposition Products against Aerobic Bacteria

K. KAJIMURA*, T. DOI*, A. ASADA*, A. TAKEDA*
and T. TAGAMI*

Journal of Japanese Cosmetic Science Society, 36(1),
1-6(2012)

化粧品に配合されるホルムアルデヒド (FA) ドナー型防腐剤、Quaternium-15 (QN-15) の殺菌特性について検討した。QN-15 が配合された化粧品中における、FA 及び QN-15 含量を測定したところ、106~493ppm に相当する FA が検出された。各化粧品から QN-15 は、検出されなかった。これら化粧品の好気性細菌に対する殺菌作用を調査したところ、いずれの試料にも殺菌効果が認められた。

次に、FA 以外の QN-15 分解物の殺菌作用を調査したところ、好気性菌に対して殺菌効果を有することが示された。さらに QN-15 本体の殺菌作用についても検討し、同様の殺菌効果を示すことを明らかとした。

本研究により QN-15 が配合された化粧品は、QN-15 本体に加え、分解により遊離した FA 及び FA 以外の分解物も殺菌作用に寄与しており、結果として防腐効果が長期間ほぼ一定に保たれていることが明らかとなった。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課

^{*2} 生薬品質懇談会

A Quantitative Analysis of Schizandrin and Gomisin A in Schisandrae Fructus

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

クオタニウム-15 及びその分解物の好気性細菌に対する殺菌活性に関する研究

一抄 録一

難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用されるラウリル硫酸ナトリウムの品質に関する研究 (第1報)

梶村 計志^{*1}, 川口 正美^{*1}, 四方田千佳子^{*2}

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**(7),
626-632(2011)

市場には、多数の試薬メーカーが製造した、様々な規格のラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 試薬が流通しており、溶出試験に使用される SDS 試薬の種類も多岐にわたる。SDS の品質の違いが溶出性に影響を及ぼすことが予測される。本稿では、販売者が異なる SDS 試薬を用いた溶出試験をアネトールトリチオン 12.5mg 錠、イプリフラボン 200mg 錠及び酢酸コルチゾン 25mg 錠について実施し、試験結果に影響を及ぼす SDS の品質について検討を行った。

3種類の SDS 試薬を用い、溶出試験を行ったところ、使用する SDS 試薬により溶出挙動が異なることが確認された。高い溶出率をもたらす SDS 試薬には、テトラデシル硫酸ナトリウム (STS) が約 25%程度含まれていた。SDS 試薬の代わりに STS 試薬を使用し溶出試験を行ったところ、より高い溶出率をもたらすことが明らかとなった。市販の SDS 試薬に混在するアルキル硫酸ナトリウムを分析したところ、全ての SDS から STS が検出された。しかし、大多数の SDS 試薬では、その組成比が 1%以下であった。SDS 試薬に混在する 1%以下の STS は、溶出挙動にほとんど影響を及ぼさないことを確認した。

以上の結果から、SDS 試薬に混在する STS は 1%程度であれば、ほとんど影響を及ぼさないが、高い割合で混在した場合、溶出性に影響を及ぼすことが明らかとなった。

難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用されるラウリル硫酸ナトリウムの品質に関する研究 (第2報)

梶村 計志^{*1}, 川口 正美^{*1}, 四方田千佳子^{*2}

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **43**(2),
194-199(2012)

本稿では、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 試薬を溶解したときの pH の違いに着目し、製剤の溶出性に及ぼす影響について検討した。

市販の SDS 試薬について、水溶液 (1.0w/v%) を作製し、pH を測定したところ、5.58~8.13 の値を示した。溶出試験に使用される各試験液に SDS 試薬を溶解し、pH の値に及ぼす影響について検討した。水以外の試験液では、オレンジブックの試験で使用される最高濃度である 5.0w/v% を添加した場合でも、pH の値はほとんど変化せず、試験液の緩衝能は保たれていた。

次に、pH が異なる 3 種類の SDS 試薬を使用し、溶出性に pH 依存性が認められる 3 製剤 (ピロミド酸 250mg 錠、メフェナム酸 250mg カプセル及びテプレノン 50mg カプセル) について、水を試験液として、溶出試験を行ったところ、使用する SDS 試薬により溶出挙動に差が認められた。

*1 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

*2 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

The Quality of Sodium Dodecyl Sulfate used in Dissolution Test for the Poor Water Solubility formulation as a Surfactant (Part 1)

*1 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

*2 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

Variation in Quality of Sodium Dodecyl Sulfate Used in the Dissolution Test as a Surfactant for the Poorly Water Soluble Drug (Part 2)

一抄 録一

トラネキサム酸カプセルにおける溶出挙動の経時変化 に関する検討

川口正美*, 梶村計志*, 田口修三*

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 42,
836-842 (2011)

トラネキサム酸の硬カプセル剤 (4 製剤) を、3 種類の条件で保存し、0,1,4,6,10 ヶ月後に溶出試験を実施した。溶出試験の条件は、日局および局外規第三部に従い、医療用医薬品品質情報集に収載されている 4 種類の試験液を用い、溶出曲線を作成した。

保存試験の結果、25°C,60%RH の条件では、全ての製剤で溶出挙動に変化が認められなかった。一方、40°C,75%RH の条件では、ひとつの製剤を除いて、溶出挙動の変化が認められた。溶出性に最も違いが認められた製剤は、25°C, 75%RH で保存した場合でも溶出の遅延が認められたことから、温度だけではなく湿度の影響も大きいことが示された。

変動の原因を検討するため、カプセルの内容物や、それぞれの製品間でカプセル皮膜と内容物を交換し、調製した試料を用いて同様の条件で溶出試験を行った。その結果、溶出率の遅延が改善された製剤と、溶出率の低下は改善されるものの、溶出の遅延が認められた製剤が存在した。溶出率の遅延が十分に改善されなかった製剤は、試験液中で製剤が崩壊する過程や、試験終了時の製剤の様子が異なっていた。また、製品中の添加物は、湿度の影響を受けることで溶出速度が著しく低下する成分が配合されており、添加物が保存による影響を受けていることが推測された。

これらのことから、溶出挙動の変化の原因は、カプセル皮膜単独の変化に起因する場合と、カプセル皮膜及び内容物の両方の変化に起因する場合の 2 種類が考えられた。

The Different Decomposition Properties of Diazolidinyl Urea in Cosmetics and Patch Test Materials

T. DOI*, K. KAJIMURA* and S. TAGUCHI*

Contact Dermatitis, 65(2), 81-91
(2011)

HPLC や LC-MS、¹H-NMR による分析を行い、緩衝液、化粧品、およびパッチテスト試料中でのジアゾリジニル尿素 (DU) の分解挙動の解明を試みた。HPLC による分析では多くの試料において 4 本のピークを与え、LC-MS による分析の結果からそれぞれ 2 本のピークについては分子量が 218、その他の 2 本については分子量 188、248 と考えられた。¹H-NMR による分析の結果から、化粧品における DU 由来の化合物のうち、90%以上のピーク面積を占める 2 本のピークについては、(4-hydroxymethyl -2,5-dioxo-imidazolidine-4-yl)-urea (HU; MW 188)及び(3,4-bis-hydroxymethyl-2,5-dioxo-imidazolidine-4-yl)-urea (3,4-BHU; MW218)と示唆された。一方でワセリン基材のパッチテスト試料は、同定はできていないが約 75%が分子量 248 のピークであり、化粧品中での 2 種類の DU 主構成成分とは違う化合物が主な構成成分であった。また水基材の試料ではパッチテスト中に分解が進むため、陽性反応の原因物質を特定できない可能性が考えられた。DU を用いた化粧品由来のアレルギー反応の評価には、HU や 3,4-BHU をワセリン基材に混和した試料を用いてパッチテストを行うことが望ましいと考えられた。

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課

Changes in Dissolution Behavior of Tranexamic Acid
Capsules during Storage

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

化粧品中とパッチテスト試料中におけるジアゾリジニル尿素の分解
挙動の差について

安全な抗がん剤調製のための
チェックリスト活用の提案

吉田 仁^{*1}, 甲田茂樹^{*2}, 吉田俊明^{*1}, 西田升三^{*3},
熊谷信二^{*4}

医療薬学, 37, 145-155 (2011)

医療従事者が抗がん剤調製に関する安全対策の客観的評価および対策が必要な個所を抽出するためのツールとして、チェックリストを作成した。

チェックリストの設問内容は、A) 設備・メンテナンスについて、B) 文書化・トレーニングについて、C) 安全対策キットについて、D) 個人保護具について、および E) 緊急時の対応についての 5 項目とした。質問は、その重要度に応じて配点 (8~1 点) し、チェックリストの達成度を点数化できるようにした。そして、安全な抗がん剤調製の目安として各群 80%と設定した。

チェックリストの妥当性を評価するために、これまで定期的に調査を実施した病院において調査当時の抗がん剤取扱状況をチェックリストに記入し、項目の達成度と清拭調査の結果との関連性を調べた。その結果、チェックリストの点数が増加することにより、職場環境中抗がん剤濃度の減少傾向がみられた。

本研究にて作成したチェックリストを医療従事者が用いることにより、安全対策の要である安全設備、院内にて手技や清掃方法を統一化するための文書と訓練、個人保護具、安全対策キットおよび緊急時対応について客観的に評価することができると考えられた。

国内民間分析機関によるシクロホスファミド拭取り
試験の包括的評価

濱 宏仁^{*1}, 杉浦 伸一^{*2}, 福嶋 浩一^{*1}, 吉田 仁^{*3},
橋田 亨^{*1}

医療薬学, 37, 607-610 (2011)

抗がん剤の一つであるシクロホスファミド(CPA)の拭取り試験は、抗がん剤の院内汚染や安全対策の評価に用いられている。従来、日本の医療機関は、拭取り試験を海外の分析機関に依頼してきたが、日本の民間分析機関が高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計により依頼分析を開始した。そこで、これまで研究的に分析を行ってきた公的機関での分析との同等性を検証し、包括的評価を行った。

正確に調製した CPA を拭取り試料に添加し、それぞれの機関に分析を依頼した。得られた測定結果について、その誤差率・変動係数から精度及び真度を求め、それぞれ 15%以内を目標とした。その結果、いずれの機関の分析結果は、誤差率、変動係数共に目標の範囲内であり、分析方法の違いによる影響はないと考えられた。

これまでのところ、この民間分析機関の拭取り試験の対象薬剤は CPA のみであり、他薬やさらに尿中の分析等へも今後拡大されることが望ましいと考える。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所

^{*2} 独立行政法人労働安全衛生総合研究所

^{*3} 近畿大学薬学部 薬物治療学研究室

^{*4} 産業医科大学 産業保健学部

Proposal of a Checklist for Safe Handling of Antineoplastic Drugs

^{*1} 神戸市立医療センター 中央市民病院 薬剤部

^{*2} 名古屋大学医学部医療システム管理学寄附講座

^{*3} 大阪府立公衆衛生研究所

Comprehensive Evaluation of Cyclophosphamide Wipe Test Using
Commercial Laboratory in Japan

大阪府水道水質検査外部精度管理
—蒸発残留物（平成 21 年度）—

田中榮次^{*1}, 安達史恵^{*1}, 小川有理^{*2}, 吉田直志^{*2},
木村直昭^{*2}, 足立伸一^{*1}

日本水道協会雑誌, 80 (10), 12-22 (2011)

平成 21 年度の大阪府水道水質検査外部精度管理において蒸発残留物を対象項目とした。報告された 44 の検査値の内、Z スコアの許容範囲 ± 3 を超えた検査値はなく、誤差率の許容範囲 $\pm 10\%$ を超えた検査値は 4 つ存在した。しかし、Z スコア、誤差率の 2 つの許容範囲を超えた「外れ値」に該当する検査値は存在しなかった。この「外れ値」の存在率 0% (0/44) で検査結果を評価すると、蒸発残留物の外部精度管理は良好な結果であった。

しかし、今回の外部精度管理の結果、アルミカップを蒸発皿として使用すると、試料中の HCO_3^- が加熱されて CO_2 を発生し、この CO_2 がアルミカップから Al を溶出させ、溶出した Al から $\text{Al}(\text{OH})_3$ が生成することによって蒸発残留物が増加し、検査値は他種の皿を使用した場合と比較して約 15~20 mg/L 高くなることが認められたことから、アルミカップの使用は避けることが望ましいと考えられた。

なお、検査精度を向上するには、以下の留意点が考えられた。

- 1) 晴れの日でも、湿度が高いことがあり、皿の秤量に影響することから、出来るだけエアコンを使用することが望ましい。
- 2) 湿度が高い日、特に雨の日には蒸発乾固前・後の皿の秤量は避けることが望ましい。
- 3) 天秤の自主検査は毎年一度実施するのが望ましいが、最低でも 2 年に 1 度実施し、日頃から何時でも検査が行えるように天秤の調整並びに整備を行うことが望ましい。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活衛生課

^{*2} 大阪府 健康医療部 環境衛生課

Fate of Perfluorooctanesulfonate and Perfluorooctanoate in
Drinking Water Treatment Processes

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

Water Research, 45, 3925-3932 (2011)

ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) とペルフルオロオクタン酸 (PFOA) は世界規模で存在する汚染物質として認識されている。日本を含む多くの国において水道水から検出されているが、その浄水処理過程における挙動に関する報告は少ない。そこで、高度浄水処理を導入している大阪府内の複数の浄水場を対象に、浄水処理過程毎に PFOS・PFOA の分析を行いその挙動を調べた。

その結果、凝集沈殿・砂ろ過処理、オゾン処理は効果がなかった。一方、活性炭処理は、活性炭交換後 1 年未満では、処理前の水に対して処理後における水での検出濃度が大きく低下しており、処理効果が高かった。しかし、1 年以上使用した場合、処理前後で検出濃度に変化がないか、処理後の水において検出濃度の増加が認められた。したがって、活性炭を数年間使用する現在の方法は PFOS および PFOA の除去には効果的でないことがわかった。また、検出濃度の増加は夏季において顕著であった。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活衛生課

^{*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

大阪府の水道における過塩素酸イオン濃度と
その浄水処理による消長

高木総吉^{*1}, 安達史恵^{*1}, 宮野啓一^{*1}, 吉田直志^{*2},
小川有理^{*2}, 李 卉^{*3}, 北川幹也^{*3}, 関口陽子^{*3},
足立伸一^{*1}, 田辺信介^{*4}

環境化学, **21**, 251-256 (2011)

大阪府内の水道原水および水道水中の過塩素酸イオンを、イオンクロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (IC-MS/MS) を用いて分析をした。その結果、水道原水からは $<0.015\sim0.48\ \mu\text{g/L}$ 、水道水からは $<0.015\sim0.95\ \mu\text{g/L}$ の過塩素酸イオンが検出された。水道原水中濃度と水道水中濃度に大きな差はなく、今回調査をしたオゾン-活性炭処理、活性炭処理、急速ろ過および緩速ろ過などの浄水処理によって過塩素酸イオンは除去されないことがわかった。また塩素消毒に使用している次亜塩素酸ナトリウム溶液から過塩素酸イオンが検出され、その濃度により水道原水に比べ水道水中濃度は増加する場合のあることがわかった。しかし、一日2Lの水道水を飲用した場合、過塩素酸イオンの摂取量は $0.0\sim1.8\ \mu\text{g/day}$ となり、参照用量 (RfD) から求めた一日摂取量と比べ十分に低値であった。したがって、大阪府における水道水中過塩素酸イオンによる健康リスクは小さいと考えられた。

The First Case of *Legionella nagasakiensis* Isolation
from Hot Spring Water

K. FURUHATA^{*1}, A. EDAGAWA^{*2}, H. MIYAMOTO^{*3},
K. GOTO^{*4}, S. YOSHIDA^{*5} and M. FUKUYAMA^{*1}

Biocontrol Sci., **16**, 171-176 (2011)

レジオネラ症の原因菌であるレジオネラ属菌は、温泉水など環境中に広く生息しており、現在までに50種以上の菌種が報告されている。我々は、温泉水からレジオネラ属菌の分離を行い、分離株の菌種の特特定を行った。分離株のうち、免疫血清などで菌種の特特定が出来なかったHYMO-6株について、16S rRNAの塩基配列について検討したところ、他のレジオネラ種とは96.6%未満の類似度であり、既存の種には該当しなかった。そこで、種々分類学的検討を行った結果、HYMO-6株は2011年に報告された新種 *Legionella nagasakiensis* であることが判明した。本研究は、日本国内の温泉水から *L. nagasakiensis* が検出された初めての報告である。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

^{*2} 大阪府 健康医療部 環境衛生課

^{*3} 日本ダイオネクス株式会社

^{*4} 愛媛大学 沿岸環境科学研究センター

Perchlorate Concentration in Water System and Its Variation by Water Treatment in Osaka

^{*1} 麻布大学 生命・環境科学部

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

^{*3} 佐賀大学 医学部

^{*4} 九州大学 大学院医学研究院

^{*5} 三井農林食品総合研究所

本邦で初めて温泉水から *Legionella nagasakiensis* を検出した事例

Isolation of *Legionella* Species from Hot Spring Bath Water Samples in Japan, and the Antibiotic Susceptibility of the *L. pneumophila* Isolates

K. FURUHATA^{*1}, A. EDAGAWA^{*2}, N. ISHIZAKI^{*1},
M. HARA^{*3}, and M. FUKUYAMA^{*1}

Journal of Azabu University, 23, 17-23 (2011)

温泉水のレジオネラ属菌の生息状況を把握するために、温泉水からレジオネラ属菌の分離を行った。その結果、366 試料中 89 試料 (24.3%) から分離された。内湯と露天に区別して分離率を比較すると、内湯では 239 試料中 48 試料 (20.1%)、露天では 127 試料中 41 試料 (32.3%) からそれぞれ分離され、露天における分離率の方が高かった。分離されたレジオネラ属菌の同定結果では、*Legionella pneumophila* が 78 株 (69.6%) と最も多く、優占種であった。また、*L. pneumophila* の他に同定された菌種は *L. londiniensis* が 20 株、*Legionella micdadei* が 5 株であった。分離した *L. pneumophila* の各薬剤における MIC₉₀ 値を比較すると、10 薬剤のうちリファンピシンが 0.016 µg/ml と最も低い値を示し、感受性が高かった。

Legionella の低濃度オゾン水殺菌効果に及ぼす
温度及び pH の影響

中室克彦^{*1}, 土井 均^{*2}, 肥塚利江^{*2}, 枝川亜希子^{*2}

防菌防黴, 40, 75-79 (2012)

本研究は、実際の浴槽水へのオゾン殺菌の導入を考慮して、pH5.8~pH9.5、水温 40℃における低濃度オゾン水の *Legionella pneumophila* に対する殺菌効果について検討した。その結果、オゾン濃度は高い pH 域において急速なオゾン濃度の減少が認められたが、0.026 mg/l のオゾン初期濃度においては pH5.8~9.5 の範囲における pH の影響はほとんど認められず、曝露 3 分後にはいずれの pH においてもほぼ完全に *Legionella* を殺菌することを示した。

^{*1} 麻布大学 生命・環境科学部

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

^{*3} 麻布大学 獣医学部

温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況および *L. pneumophila* の薬剤感受性

^{*1} 摂南大学 理工学部

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Disinfection Efficacy of Low Levels of Dissolved Ozone against *Legionella pneumophila* at Various pHs and 40℃

コンタクトレンズ消毒保存液マルチパーパスソリューションの *Acanthamoeba* に対する消毒効果

枝川亜希子^{*1}, 木村明生^{*2}, 田中榮次^{*1}, 土井 均^{*1},
楠原康弘^{*3}, 足立伸一^{*1}, 宮本比呂志^{*4}

防菌防黴, 38, 661-665 (2010)

角膜炎の原因となる *Acanthamoeba* に対するマルチパーパスソリューション（以下、MPS）の消毒効果について検討を行った結果、*Acanthamoeba* 数は時間経過と共に減少し、1-4 日後に死滅した。一方、精製水、生理食塩水、0.4 mg/l 塩素水と接触した *Acanthamoeba* は、28 日後も生存していた。今回我々が使用した 3 種の MPS については、*Acanthamoeba* に対する十分な消毒効果があると認められ、MPS の使用が *Acanthamoeba* 角膜炎の感染リスクを増大させる可能性は低いことを示唆するものであった。

Histological Effect of Nitrous Acid with Secondary Products of Nitrogen Dioxide and Nitric Oxide Exposure on Pulmonary Tissue in Mice

M. OHYAMA^{*1}, K. OKA^{*2}, S. ADACHI^{*3} and
N. TAKENAKA^{*4}

J. Clinic. Toxicol., 1, 1000103 (2011)

疫学調査により二酸化窒素が喘息影響を持つことが報告されている。しかし、二酸化窒素測定法は亜硝酸も誤検出するため、喘息影響の原因は亜硝酸による可能性がある。我々は、モルモットに 3.6 ppm の亜硝酸（0.3 ppm の二酸化窒素と 1.6 ppm の一酸化窒素を副生）を 4 週間連続曝露し、肺気腫様変化や平滑筋細胞の肺胞道への伸展を認めた。但し、二酸化窒素曝露により起きるような肺胞道での線維化は認められなかった。喘息患者では線維化を伴わない肺気腫が起きることから、線維化を起こす二酸化窒素より亜硝酸の方が喘息において重要ではないかと考えられる。

今回、動物曝露実験で亜硝酸の傷害性の強さを検討するため、8.4 ppm の亜硝酸（2.4 ppm の二酸化窒素と 7.2 ppm の一酸化窒素の副生成を伴う）をマウスに 3 週間曝露し呼吸器の組織変化を調べた。その結果、肺胞道の線維化が認められなかっただけでなく、肺気腫様変化も明らかではなかった。これらの結果は、亜硝酸の傷害性は弱い、亜硝酸が平滑筋細胞や好酸球に作用して肺気腫様変化を起こすことを示唆する。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所 企画総務部

^{*3} 藤田保健衛生大学 医療科学部

^{*4} 佐賀大学 医学部

Disinfection Efficacy of Contact Lens Multipurpose Solutions against *Acanthamoeba*

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所

^{*2} 大阪府環境農林水産総合研究所

^{*3} 相模女子大学

^{*4} 大阪府立大学大学院工学研究科

マウス肺組織に対する亜硝酸曝露の影響

Should the Regulation of Nitrogen Dioxide be Amended for
the Regulation of Nitrous Acid?

M. OHYAMA*

J. Clinic. Toxicol., **2**, 1000e103 (2012)

大気中にはいくつかの窒素酸化物 (NO_x) が存在し、そのうちの一つの二酸化窒素 (NO₂) は、日本では 1973 年に大気汚染防止法で規制されている。NO₂ が規制されている理由は、NO₂ は毒性が強く疫学調査で喘息との関連性が認められているからだ、一酸化窒素 (NO) は大気中で NO₂ に変化するし、NO₂ は大気中に亜硝酸に変化する。

亜硝酸の生体影響に関しては、人体吸入実験では、0.65 ppm の亜硝酸を軽度の喘息患者に 3 時間吸入させ、呼吸器の軽度の刺激性症状を報告した論文と、健康人に 0.395 ppm の亜硝酸を 3.5 時間吸入させ、呼吸機能が約 10%低下したことを報告した論文がある。また、疫学調査では、NO₂ より亜硝酸が肺機能の低下や呼吸器症状と関連することが示され、「従来の研究で示されている NO₂ と喘息との関連は、亜硝酸によるものだった」と考察されている。さらに、我々の動物実験では室内濃度レベルに近い亜硝酸の 4 週間曝露により、肺気腫様変化が認められている。

将来、亜硝酸に関して多くの疫学調査や多くの動物実験が実施されるべきであり、NO₂ 規制は亜硝酸規制に修正されると予想する。

Effects of Atmospheric Particles and Several Model
Particles of Particulate Matter Components on Human
Monocyte-Derived Macrophage Oxidative Responses

M. OHYAMA*¹, S. AKASAKA*¹, T. OTAKE*¹, K.
MORIMAGA*², Young W. Kim*³, Kyong-W. Moon*³, T.
KAMEDA*⁴ and S. ADACHI*⁵

J. Clinic. Toxicol., **2**, 1000121 (2012)

肺に吸入された大気粉塵は肺胞マクロファージに貪食されて、処理される。肺胞マクロファージは異物を貪食したときに活性酸素を放出する。今回の実験の目的は、大気粉塵のどのような成分がマクロファージの活性酸素反応に影響を与えるか検討することである。

我々は、大気粉塵や、大気粉塵成分である、ディーゼル排気粒子、シリカ粒子、カーボンブラック粒子、ディーゼル排気粒子に含まれている強力な変異原性物質である 3-ニトロベンズアントロンをコーティングしたカーボンブラック粒子に対する、ヒトモノサイト誘導マクロファージの活性酸素反応を調べた結果、大気粉塵に対する反応性と最も類似する反応性を示したモデル粒子は 3-ニトロベンズアントロンをコーティングしたカーボンブラック粒子であることを認めた。

今回の結果は、大気粉塵の生体影響において、多環芳香族化合物の役割を検討する必要性を示唆する。

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課
二酸化窒素規制は亜硝酸規制に修正すべきか？

*¹ 大阪府立公衆衛生研究所

*² 労働安全衛生総合研究所

*³ 高麗大学保健科学大学

*⁴ 金沢大学医薬保健研究域薬学系

*⁵ 相模女子大学

ヒトモノサイト誘導マクロファージの活性酸素反応における大気粒子や大気粒子成分のモデル粒子の影響

Simultaneous Analytical Method for Urinary Metabolites of
Organophosphorus Compounds and Moth Repellents in
General Population

T. YOSHIDA* and J. YOSHIDA*

J. Chromatogr. B, 880, 66-73 (2012)

一般住宅の室内空気中から検出される可能性の高い数種の有機リン系化合物（殺虫剤、難燃剤、可塑剤）および防虫剤に着目し、これらの住民への曝露を把握する目的で、尿中に排泄される各物質の代謝物（ジメチルホスフェート、ジエチルホスフェート、ジメチルチオホスフェート、ジエチルチオホスフェート、ジ-*n*-ブチルホスフェート、ジフェニルホスフェート、ビス(2-エチルヘキシル)ホスフェート、2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジノール、3,5,6-トリクロロ-2-ピリジノール、3-メチル-4-(メチルチオ)フェノール、3-メチル-4-ニトロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2,5-ジクロロフェノール、1-ナフトール、2-ナフトール)の一斉分析法を開発した。代謝物は、尿に塩酸を加えて加水分解後吸着剤（水酸化ポリスチレンジビニルベンゼン共重合体）を用いて抽出し、酢酸メチルおよびアセトニトリルで脱着後濃縮し、誘導体化（*tert*-ブチルジメチルシリル化）してガスクロマトグラフィー/質量分析（電子衝撃イオン化モード）により定量した。各代謝物は、200 μ g/L以下の尿中濃度において再現性よく正確に定量することが可能であり、定量下限濃度は0.8～4 μ g/Lであった。採取した尿試料は、約1ヶ月間－20℃の冷凍庫内にて保存可能であった。本法は、住民の有機リン系化合物および防虫剤への曝露量を把握するために十分適用できるものと考えられた。

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

一般住民における有機リン系化合物および防虫剤の尿中代謝物の一斉分析法

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

CONTENTS

—RESEARCH REPORTS—

West Nile Virus Surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2011 Report)

I. AOYAMA, T. YUMISASHI, Y. KUMAI, K. KAKEHASHI, Y. MATSUI, T. KURAMOCHI, T. HIRATA, T. KASE and K. TAKAHASHI	1
--	---

Prevalence and Molecular Epidemiological Analysis of Enterovirus Infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2011 Report)

K. NAKATA K. YAMAZAKI N. SAKON and T. KASE	8
--	---

Studies on a Method for the Determination of TBHQ in Sesami and Peanut Products

C. NOMURA, K. AWAZU, K. KIYOTA, M. YOSHIMITSU and K. AKUTSU	14
---	----

Determination of Medicinal Ingredients for Treating Erectile Dysfunction in Health Food.

A. TAKEDA, A. ASADA, T. TAGAMI, T. DOI, Y. SATSUKI, K. KAJIMURA, and Y. SAWABE	19
---	----

Analysis of Acetaminophen and Its Related Drug by Using Solid Phase Extraction and HPLC

T. OKAMURA	24
------------------	----

Simple and Rapid Determination of Pyrethroid Pesticide Residues in Kampo Products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Electron Ionization.

T. TAGAMI, A. TAKEDA, A. ASADA, A. AOYAMA, T. DOI, K. KAJIMURA and Y. SAWABE	26
---	----

Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2011 Report)

T. HIZUKA, E. AZUMA, M. OHYAMA and S. ADACHI	30
--	----

Effects of Sodium Laureth Sulfate on Mice by Inhalation Exposure

E. AZUMA and T. NAKAJIMA	38
--------------------------------	----

Analytical Study Using LC/TOF-MS and LC/MS/MS on Colourants Regulated by European Standards EN71 for Infant Textile Products

H. NAKASHIMA, M. MIMURA, K. YAMASAKI and M. KANIWA	45
--	----

—ABSTRACTS—

Sensitivities of Ciprofloxacin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates to Fluoroquinolones; Role of Mutant DNA Gyrase Subunits in Drug Resistance

S. SUZUKI, T. NAKAJIMA, A. TAMARU, H. KIM, T. MATSUBA and H. SAITO	56
--	----

Investigation of <i>stx2</i> + <i>eae</i> + <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in Beef Imported from Malaysia to Thailand	
P. SUKHUMUNGOON, Y. NAKAGUCHI, N. INGVIYA, J. PRADUTKANCHANA, Y. IWADE, K. SETO, R. SON, M. NISHIBUCHI and V. VUDDHAKUL	56
Emergence of a Novel Shiga Toxin-Producing <i>Escherichia coli</i> O-serogroup Cross-Reacting with <i>Shigella boydii</i> type 10	
A. IGUCHI, S. IYODA, K. SETO and M. OHNISHI; ON BEHALF OF THE EHEC STUDY	57
Wide Distribution of O157-Antigen Biosynthesis Gene Clusters in <i>Escherichia coli</i>	
A. IGUCHI, H. SHIRAI, K. SETO, T. OOKA, Y. OGURA, T. HAYASHI, K. OSAWA and R. OSAWA	57
Detection and Identification of Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> (in Japanese)	
K. SETO	58
Molecular Epidemiological Investigation of a Diffuse Outbreak Caused by <i>Salmonella enterica</i> serotype Montevideo isolates in Osaka Prefecture, Japan	
T. HARADA, J. SAKATA, M. KANKI, K. SETO, M. TAGUCHI and Y. KUMEDA	58
Infection with Enteroviruses (in Japanese)	
K. YAMAZAKI	59
Foodborn and Infectious Disease Caused by Noroviruses (in Japanese)	
N. SAKON, O. NISHIO	59
Noteworthy Viral Infection and Control Measures 1: Opening Remarks (in Japanese)	
T. KASE	60
Surveillance of vaccine preventable diseases (in Japanese)	
T. KASE	60
Noteworthy Viral Infection and Control Measures : Pandemic influenza virus (in Japanese)	
S. MORIKAWA	61
Genetic Analysis of Human Adenovirus Type 54 Detected in Osaka, Japan	
S. HIROI, N. KOIKE, T. NISHIMURA, K. TAKAHASHI, S. MORIKAWA and T. KASE	61
Tickborne Diseases and Cautions against Them (in Japanese)	
T.YUMISASHI	62
Noteworthy Viral Infections and Control Measures : Arboviral Infections (in Japanese)	
T.YUMISASHI	62
The Present State of Japanese Encephalitis Vaccine (in Japanese)	
I. AOYAMA	63

Intron Sequences from the CCT7 Gene Exhibit Diverse Evolutionary Histories among the Four Lineages within the Babesia microti-group, a Genetically Related Species Complex that	
K. FUJISAWA, R. NAKAJIMA, M. JINNAI, H. HIRATA, A. ZAMOTO-NIIKURA, T. KAWABUCHI-KURATA, S. ARAI and C. ISHIHARA	63
Novel Anti-HIV-1 Activity Produced by Conjugating Unsulfated Dextran with PolyL-lysine	
K.NAKAMURA, T.OHTSUKI, H.MORI, H.HOSHINO, A.HOQUE, A.OUE, F.KANO, H.SAKAGAMI, K.TANAMOTO, H.USHIJIMA, N.KAWASAKI, H.AKIYAMA and H.OGAWA	64
Noteworthy viral infection and Control Measures 8 : AIDS (in Japanese)	
H. MORI	64
Countermeasures against HIV; Present Situation in Osaka Prefecture and the Role Played by the Osaka Prefectural Institute of Public Health in the Activity (in Japanese)	
T. KAWAHATA	65
Current Situations and Issues of (Local Governmental) Public Health Institutes in the Areas where Many HIV/AIDS Patients are Reported (in Japanese)	
T. KAWAHATA, Y. KOJIMA, H. MORI	65
Evaluation of the Antiviral Activity of chlorine Dioxide and Sodium Hypochlorite Against Feline Calicivirus, Human Influenza Virus, Measles Virus, Canine Distemper Virus, Human Herpesvirus, Human Adenovirus, Canine Adenovirus and Canine Parvovirus.	
T.SANEKATA, T.FUKUDA, T.MIURA, H.MORINO, C. LEE, K.MAEDA, T.KAWAHATA and T.SHIBATA	66
Synthesis, anti-HIV and anti-oxidant Activities of Caffeoyle 5,6-anhydroquinic Acid Derivatives	
CM. Ma, T. KAWAHATA, M.HATTORI, T.OTAKE, L.WANG and M.DANESHTALAB	66
The Evaluation and Improving Measures of STI Surveillance Systems at the Local Government Level in Japan (in Japanese)	
K. NAKASE, Y. NAKATANI, N. HORI, Y. OMOTO, H. TAKAHASHI, A. YAMAUCHI, M. FUKUDA, K. OKUMA, T. KAWAHATA, C. SHIRAI, T. KODAMA, T. YAMAGISHI and M. ONISHI	67
Determination of Histamine in Fish and Fish Products by Tandem Solid-Phase Extraction	
K. AWAZU, C. NOMURA, M. YAMAGUCHI and H. OBANA	67
Simultaneous Determination of Polyether Antibiotics and Macrolide Anthelmintics in Livestock Products by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry	
M. YAMAGUCHI, K. KAKIMOTO, T. YAMAGUCHI and H. OBANA	68
Di(2-ethylhexyl)phthalate and Mono(2-ethylhexyl)phthalate in the Media Using for in Vitro Fertilization	
S. TAKATORI, K. AKUTSU, F. KONDO, R. ISHII, H. NAKAZAWA and T. MAKINO	68

A Quantitative Analysis of Schizandrin and Gomisin A in Schisandrae Fructus (in Japanese) T. TAGAMI, K. ARIMOTO, M. ITO, Y. OSUMI, M. OKASAKA, T. KANAYA, E. SAKAI, Y. SHIMADA, Y. TAKAI, K. TOKURA, K. NAKAJIMA, M. NOGUCHI, T. HASHIZUME, Y. HISATA, G. HONDA, M. MORIYASU, Y. YAMAMOTO and T. YOKOKURA	69
Bactericidal Activity of Quaternium-15 and its Decomposition Products against Aerobic Bacteria K. KAJIMURA, T. DOI, A. ASADA, A. TAKEDA and T. TAGAMI	69
The Quality of Sodium Dodecyl Sulfate used in Dissolution Test for the Poor Water Solubility formulation as a Surfactant (Part 1) (in Japanese) K. KAJIMURA, M. KAWAGUCHI and C. YOMOTA	70
Variation in Quality of Sodium Dodecyl Sulfate Used in the Dissolution Test as a Surfactant for the Poorly Water Soluble Drug (Part 2) (in Japanese) K. KAJIMURA, M.KAWAGUCHI and C. YOMOTA	70
Changes in Dissolution Behavior of Tranexamic Acid Capsules during Storage (in Japanese) M. KAWAGUCHI, K. KAJIMURA and S. TAGUCHI	71
The Different Decomposition Properties of Diazolidinyl Urea in Cosmetics and Patch Test Materials T. DOI, K. KAJIMURA and S. TAGUCHI	71
Proposal of a Checklist for Safe Handling of Antineoplastic Drugs (in Japanese) J. YOSHIDA, S. KODA, T. YOSHIDA, S. NISHIDA and S. KUMAGAI	72
Comprehensive Evaluation of Cyclophosphamide Wipe Test Using Commercial Laboratory in Japan (in Japanese) K.HAMA, S. SUGIURA, K. FUKUSHIMA, J. YOSHIDA and T. HASHIDA	72
Result of External Quality Control on the Analytical Measures for Tap Water in Osaka Prefecture—Total Solids (2009)— (in Japanese) H. TANAKA, F. ADACHI, Y. OGAWA, N. YOSHIDA, N. KIMURA and S. ADACHI	73
Fate of Perfluorooctanesulfonate and Perfluorooctanoate in Drinking Water Treatment Processes S. TAKAGI, F. ADACHI, K. MIYANO, Y. KOIZUMI, H. TANAKA, I. WATANABE, S. TANABE and K. KANNAN	73
Perchlorate Concentration in Water System and Its Variation by Water Treatment in Osaka (in Japanese) S. TAKAGI, F. ADACHI, K. MIYANO, N. YOSHIDA, Y. OGAWA, H. LI, M. KITAGAWA, Y. SEKIGUCHI, S. ADACHI and S. TANABE	74
The First Case of <i>Legionella nagasakiensis</i> Isolation from Hot Spring Water K. FURUHATA, A. EDAGAWA, H. MIYAMOTO, K. GOTO, S. YOSHIDA and M. FUKUYAMA	74

Isolation of <i>Legionella</i> Species from Hot Spring Bath Water Samples in Japan, and the Antibiotic Susceptibility of the <i>L. pneumophila</i> Isolates	
K. FURUHATA, A. EDAGAWA, N. ISHIZAKI, M. HARA and M. FUKUYAMA	75
Disinfection Efficacy of Low Levels of Dissolved Ozone against <i>Legionella pneumophila</i> at Various pHs and 40°C (in Japanese)	
K. NAKAMURO, H. DOI, H. HIZUKA and A. EDAGAWA	75
Disinfection Efficacy of Contact Lens Multipurpose Solutions against <i>Acanthamoeba</i> (in Japanese)	
A. EDAGAWA, A. KIMURA, H. TANAKA, H. DOI, Y. KUSUHARA, S. ADACHI and H. MIYAMOTO	76
Histological Effect of Nitrous Acid with Secondary Products of Nitrogen Dioxide and Nitric Oxide Exposure on Pulmonary Tissue in Mice	
M. OHYAMA, K. OKA, S. ADACHI and N. TAKENAKA	76
Should the Regulation of Nitrogen Dioxide be Amended for the Regulation of Nitrous Acid?	
M. OHYAMA	77
Effects of Atmospheric Particles and Several Model Particles of Particulate Matter Components on Human Monocyte-Derived Macrophage Oxidative Responses	
M. OHYAMA, S. AKASAKA, T. OTAKE, K. MORIMAGA, Young W. Kim, Kyong-W. Moon, T. KAMEDA and S. ADACHI	77
Simultaneous Analytical Method for Urinary Metabolites of Organophosphorus Compounds and Moth Repellents in General Population	
T. YOSHIDA and J. YOSHIDA	78

大阪府立公衆衛生研究所 研究報告
第50号

発行年月日	平成24年9月
編集兼	大阪府立公衆衛生研究所
発行者	所長 山本容正
〒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