

大阪府立公衆衛生研究所 研究報告

平成25年



BULLETIN
OF
OSAKA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No.51(2013)

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（2012年度）	青山幾子 上林大起 松井陽子 上澤行成 加瀬哲男	弓指孝博 熊井優子 中西顕一郎 平田武志 高橋和郎	1
大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析（2012年度）	中田恵子 左近直美	山崎謙治 加瀬哲男	7
GC/MSを用いた漢方製剤に残留するピレスロイド系農薬の実態調査	青山愛倫 田上貴臣	武田章弘 沢辺善之	14
健康食品中のムタプロデナフィル検出事例とその酸処理条件の検討	青山愛倫 武田章弘 梶月由香 沢辺善之	浅田安紀子 土井崇広 田上貴臣	18
平成23・24年度の違法ドラッグ買上調査について	武田章弘 田上貴臣 川口正美	浅田安紀子 土井崇広 沢辺善之	23
大阪府内の7市の薬局における残薬に関するアンケート調査	岡村俊男	味村真弓	28
大阪府における環境および食品中放射能調査（平成24年度報告）	東恵美子 足立伸一	肥塚利江	34
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（第2報）	東恵美子	中島孝江	42
モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン塗布のマウスに対する生体影響	中島孝江	東恵美子	51

—抄録—

2006年～2011年に国内産小売り鶏肉から分離したサルモネラの 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生およびAmpC型β-ラクタ マーゼ産生性（英文）	田口真澄 勢戸和子 久米田裕子	河原隆二 原田哲也	57
保育園で発生した細菌性赤痢の集団感染事例—大阪府	岡本優 漕江由佳 芝田元子 笹井康典 松井陽子 熊井優子 原田哲也	宇治田尚子 田代由希子 北島信子 大平文人 伊達啓子 勢戸和子 田口真澄	57
臨床における <i>Escherichia albertii</i> の重要性（英文）	大岡唯祐 河野喜美子 江藤良樹 金子紀子 山口敬治 T. A. T. GOMES M. BARDIAU L. BEUTIN 林哲也	勢戸和子 小林秀樹 市原祥子 磯部順子 堀川和美 A. LINDEN J. G. MAINIL 小椋義俊	58
0157以外の志賀毒素産生性大腸菌の重要性	勢戸和子		58
腸管出血性大腸菌の迅速診断法と確定診断	勢戸和子 寺嶋淳	伊豫田淳	59
大阪府のイヌにおける <i>Corynebacterium ulcerans</i> 保有状況 調査（英文）	勝川千尋 山岸寛明 西野俊治 岩城正昭 高橋元秀	小宮貴子 石井篤嗣 長濱伸也 山本明彦	59
大阪府における特定遺伝子型多剤耐性結核菌の優勢な 発生（英文）	田丸亜貴 和田崇之 井上学 前倉亮治 小倉壽 鈴木定彦	中島千恵 王亜軍 河原隆二 尾関百合子 小林和夫 松本壮吉	60
生食用ヒラメの喫食により起こる新規食中毒事件の病因物質は <i>Kudoa septempunctata</i> である（英文）	河合高生 八幡裕一朗 久米田裕子 鎌田洋一 大西貴弘	関塚剛史 黒田誠 飯島義雄 小西良子	60

易熱性溶血毒に対するモノクローナル抗体を用いたELISA法による生食用鮮魚介類中の腸炎ビブリオ汚染をスクリーニングする方法の開発 (英文)	坂田 淳子 河原 隆二 岩崎 忠 児玉 洋	川津健太郎 神吉政史 久米田裕子	61
腸炎ビブリオ F ₀ F ₁ -ATP合成酵素 δ サブユニットに対するモノクローナル抗体の作製とそれを用いた腸炎ビブリオ迅速同定法の開発 (英文)	坂田 淳子 岩崎 忠 竹中 重雄 児玉 洋	川津健太郎 田中勝啓 久米田裕子	61
日本で流通する鶏肉からの <i>vanA</i> 遺伝子保有 <i>Enterococcus cecorum</i> の分離および性状 (英文)	原田 哲也 神吉政史 久米田裕子	河原 隆二 田口真澄	62
ヒラメからの <i>Kudoa septempunctata</i> 検出用定量リアルタイムPCR法の確立 (英文)	原田 哲也 佐藤 宏 久米田裕子	河合高生 横山 博	62
ヒラメ生食による食中毒の患者便からの <i>Kudoa septempunctata</i> 18S rDNA の検出 (英文)	原田 哲也 陳内理生 小西良子	河合高生 大西貴弘 久米田裕子	63
低濃度オゾン水によるノロウイルスの不活化	山崎 謙治	中室克彦	63
低濃度オゾン水による新型インフルエンザウイルスの不活化効果の評価法	中室克彦 市川和寛 山崎 謙治	中田英夫 小阪教由	64
インフルエンザウイルス抗体価測定に関する問題点-2006/07 シーズンワクチン株A/広島/52/2005 (H3N2) の非特異的凝集抑制物質 (nonspecific inhibitor) 感受性に関する検討-	前田 章子 加瀬 哲男 廣田 良夫	森川佐依子 入江 伸	64
パンデミックインフルエンザ2009 H1N1におけるIgG3欠損と重症度の関係 (英文)	酒井絵美子 山本勝輔 金野 浩 高野美香 加瀬 哲男	山本 威久 溝口好美 伊橋 舞 安西 香織 下辻 常介	65
インフルエンザの診断	森川佐依子	加瀬 哲男	65

新しいD種リコンビナントアデノウイルスの分離および解析 (英文)	廣井 聡 高橋 和郎 加瀬 哲男	和泉 守篤 森川 佐依子	66
大阪府内における2011年の風疹患者発生状況	倉田 貴子 西村 公志 高橋 和郎	井澤 恭子 加瀬 哲男	66
京都府と大阪府における2010-2011年に分離された淋菌株の 性状解析	志牟田 健 伊東三喜雄 上田 朋宏 古林 敬一 大西 真	飛田 収 藤原 光文 亀岡 博也 川畑 拓也	67
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ポリ ソルベート80の品質に関する研究	梶村 計志 四方田千佳子	川口 正美	67
食品中ポリソルベートの迅速分析法	野村 千枝 阿久津和彦	山口 瑞香 尾花 裕孝	68
LC-MS/MSを用いた迅速で簡便な飲料中の残留農薬一斉分析法の 実用化に向けての検討	福井 直樹 北川 陽子 小阪田正和 中山裕紀子 尾花 裕孝	高取 聡 起橋 雅浩 中辻 直人 柿本 葉	68
化粧品およびパッチテスト試料におけるイミダゾリジニル尿素 由来分解物の解析 (英文)	土井 崇広 浅田安紀子	武田 章弘 梶村 計志	69
高速液体クロマトグラフィーによる、化粧品中の1,3-ジメチロ ール-5,5-ジメチルヒダントインとその分解物の定量 (英文) . . .	浅田安紀子 武田 章弘	土井 崇広 梶村 計志	69
大阪府における水道水およびヒト血清中有機フッ素化合物の 濃度について(英文)	高木 総吉 安達 史恵	吉田 仁	70
抗がん剤調製における安全対策の点数化と職業性曝露指標との 関連について(英文)	吉田 仁 西田 升三 丁 元鎮	甲田 茂樹 中野 寛之 熊谷 信二	70
フルオロウラシルのバイアル化に伴う調製環境中への漏出量の 減少および調製時間の短縮	吉田 仁 丁 元鎮	中野 寛之 西田 升三	71

	甲 田 茂 樹	熊 谷 信 二	
水環境中のフルオロキノロン類抗菌剤とその耐性遺伝子の分布 について(英文)	安 達 史 恵 高 倉 耕 一	山 本 敦 史 河 原 隆 二	71
揮発性有機化合物による乗用車室内空気の汚染	吉 田 俊 明		72
ラットにおける含フッ素ピレスロイド剤 メトフルトリン、 プロフルトリンおよびトランスフルトリンの尿中代謝物の 同定 (英文)	吉 田 俊 明		72
ガスクロマトグラフィー/質量分析による含フッ素ピレスロイ ド剤 メトフルトリン、プロフルトリンおよびトランスフルト リンの尿中代謝物の定量法 (英文)	吉 田 俊 明		73
PM2.5の喘息影響における亜硝酸の関与の可能性 (英文)	大 山 正 幸 坂 東 博	竹 中 規 訓	73
人口減少を踏まえた生活排水処理施設整備評価システムの構築 . . .	小 川 浩 城 戸 由 能 奥 村 早 代 子	細 井 由 彦 関 川 貴 寛 樽 林 茂 夫	74

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 (2012年度)

青山幾子^{*1} 弓指孝博^{*1} 上林大起^{*1} 熊井優子^{*2} 松井陽子^{*3}
中西顕一郎^{*3} 上澤行成^{*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、死亡原因の不明なカラス死骸が2頭以上同一地点で見られた場合、それについてもWNV検査を実施している。

2012年度は6月末から10月にかけて府内20カ所で蚊の捕集を行い、得られた雌の蚊についてWNV遺伝子の検出を試みた。捕集された蚊は7種4471匹で、そのうちアカイエカ群(41.3%)とヒトスジシマカ(55.6%)が大部分を占め、他にコガタアカイエカ、シナハマダラカ、トウゴウヤブカ、キンパラナガハシカ、カラツイエカが捕集された。定点及び種類別の蚊337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、2012年度当所に搬入された死亡カラス2頭の脳について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、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。

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し、本感染症が国内で流行した場合に備え、検査体制の整備が必要とされている。ウイルスの侵入経路として、航空機や船舶に紛れ込んだWNV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^{7,8)}。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、侵入後の対応が速やかに行える体制を整えている。また、蚊の調査以外にも、厚生労働省の通知に従い⁹⁾、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2012年度の調査結果について報告する。

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

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

^{*3}大阪府健康医療部保健医療室地域保健感染症課

^{*4}大阪府健康医療部環境衛生課(現 大阪府四条畷保健所衛生課)

^{*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 2012 Report)

by Ikuko AOYAMA, Takahiro YUMISASHI, Daiki KANBAYASHI,
Yuko KUMAI, Yoko MATSUI, Kenichiro NAKANISHI, Yukinari U
EZAWA, Takeshi HIRATA, Tetsuo KASE, and Kazuo TAKAHASHI

調査方法

1. 捕集地点および調査実施期間

大阪府管内、東大阪市及び高槻市に、図1に示した計20カ所の定点を設定し、2012年6月第4週から10月第1週（東大阪市、高槻市及び豊中市は9月第3週）までの期間、隔週の火曜日から水曜日にかけてトラップを設置し、蚊の捕集調査を実施した。

2. 蚊の捕集方法

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

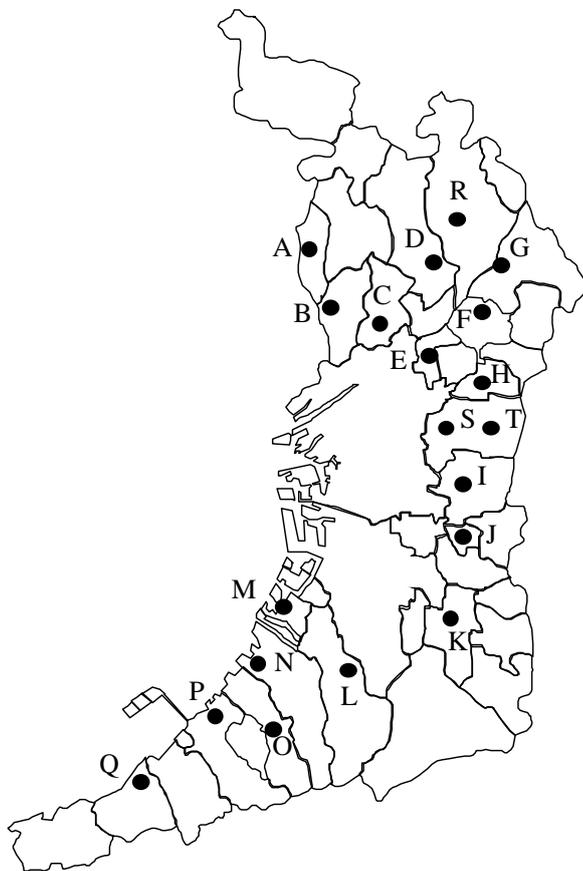
3. 蚊の同定

捕集した蚊は、各保健所において種類を同定し、種類ごとに別容器に入れて当日中に公衆衛生研究所に搬入した。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anks液を250μL加えた後、多検体細胞破碎装置（シェイクマスターVer1.2システム、バイオメディカルサイエンス）で約1分振とうして作成した。破碎後のマイクロチューブを軽く遠心してからクラッシャーを除去し、0.2%BSA加ハanks液を500μL追加して攪拌した。それを4℃、12,000rpmで15分間遠心し、その上清を0.45μm 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anks液を



	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
	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
豊中	B	豊中	新豊島川親水水路	豊中市

図1 蚊の捕集地点定点

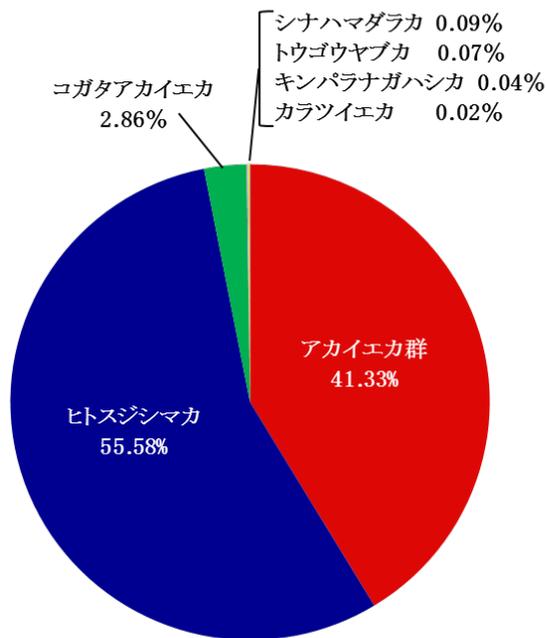


図2 捕集された蚊の比率

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 (WNNY 514/904) を用いた¹⁰⁻¹²⁾。

また、2005 年以降アジア地域で流行が拡大している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¹³⁾。

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 加ハックス液を用いて 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 7 種 4471 匹であった。その構成はアカイエカ群 (41.3%) とヒトスジシマカ (55.6%) 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 (2.9%)、シナハマダラカ (0.09%)、トウゴウヤブカ (0.07%)、キンバラナガハシカ (0.04%)、カラツイエカ (0.02%) 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、7 月前半にピークに達した後減少した。ヒトスジシマカは 6 月から 8 月前半にかけて増加し、2 峰性のピークを示した。コガタアカイエカは、7 月から 9 月まで捕集された。その他の蚊は捕集数が少なく、捕集場所も限られていた (図 3)。

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、東大阪東部で多く捕集された。シナハマダラカは富田林、泉佐野、トウゴウヤブカは岸和田、東大

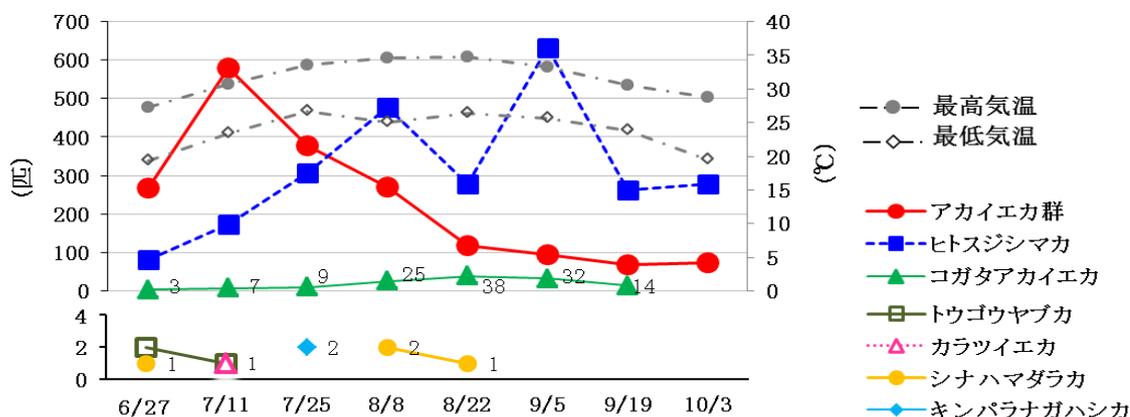


図3 蚊の捕集数の推移

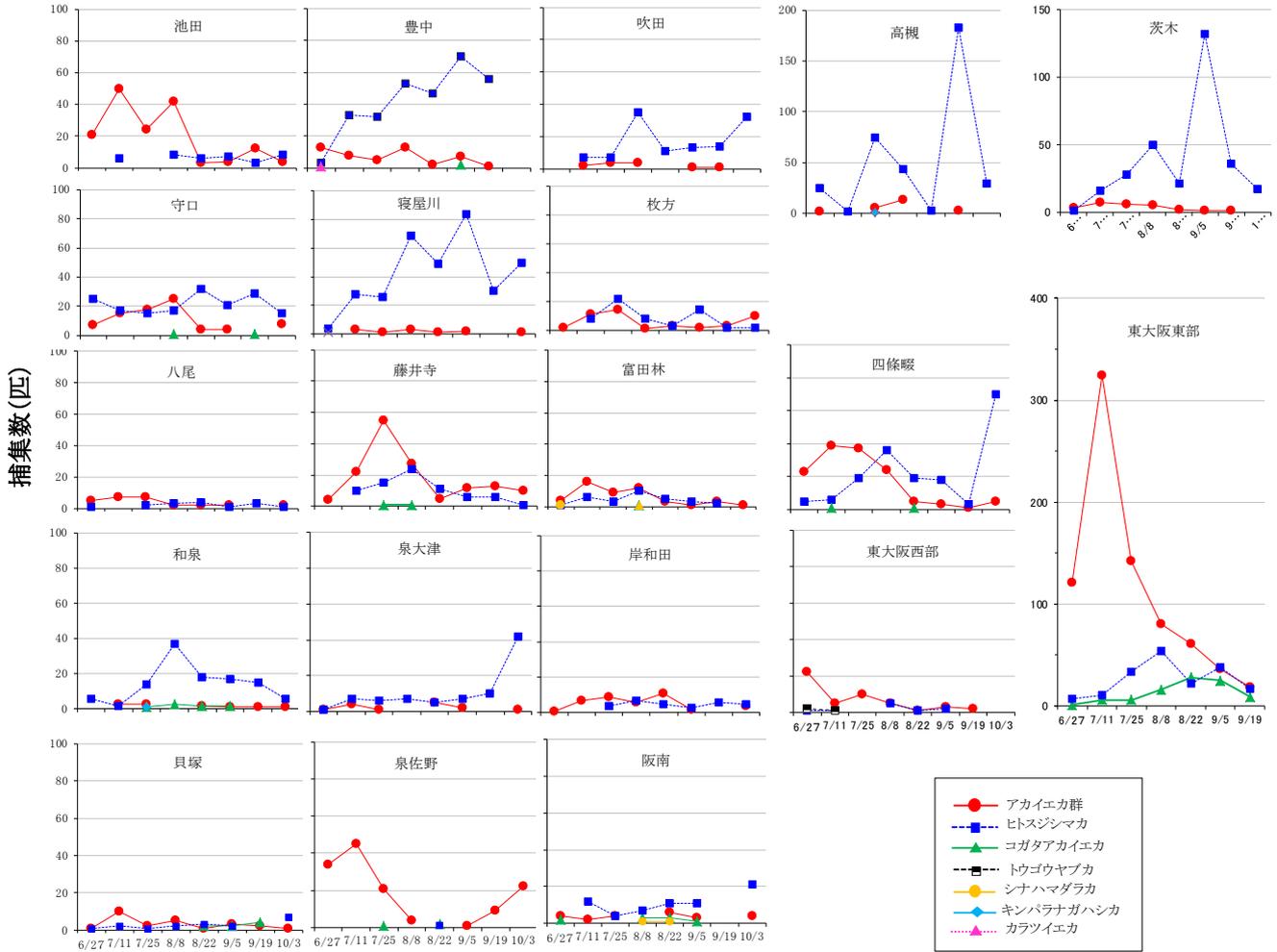


図4 定点別にみた蚊の捕集数の推移

阪西部、キンバラナガハシカは高槻、和泉、カラツイエカは豊中の各地点で捕集された (図4)。

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。

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 337 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

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

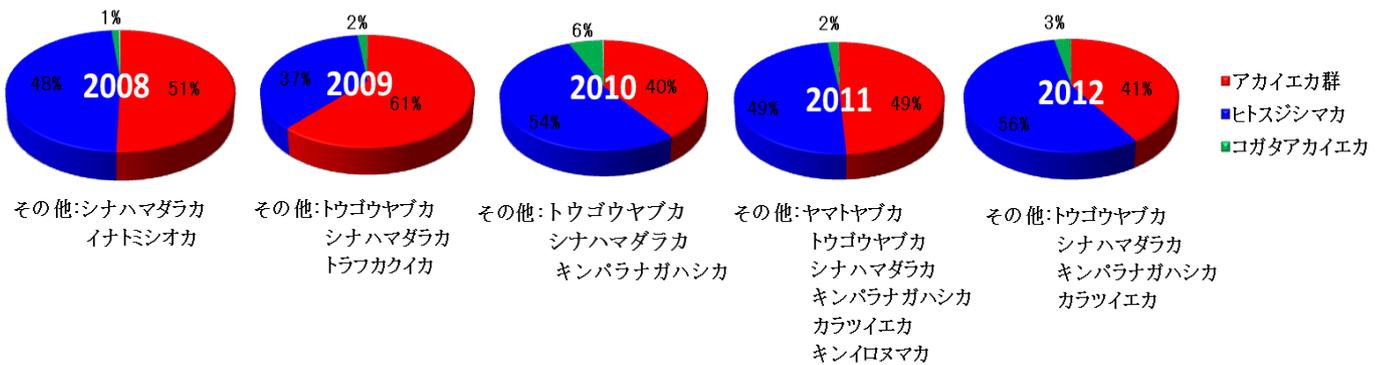


図5 捕集した蚊の種類構成

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おり¹⁴⁾、今回の調査で捕集された蚊は、ほぼ WNV 媒介蚊として注意すべき蚊であった。また、捕集された蚊の種類では、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% を占めた。年度によりアカイエカ群とヒトスジシマカの占有割合は異なるが、毎年この 3 種で約 99% を占めていることが確認され、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 (図 5)。

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。現在のところ国内に生息する蚊や鳥から 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) が報告されたあと次第に減少し、2008 年頃から 2011 年までは 700 ~ 1400 人程度で推移していたが、2012 年は患者発生数が急増し、5674 人 (死者 286 人) となった (図 6)²⁾。また近年ヨーロッパ、アフリカ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状況である¹⁵⁾。

また、WNV は輸血や臓器移植でも感染することが知られている。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たが、2012 年は 703 例が報告され、患者発生数の増加に伴い、陽性ドナー数も急増した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、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¹⁶⁾。これらのウイルスは WNV と異なり、ヒト-蚊-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。これらの蚊媒介性

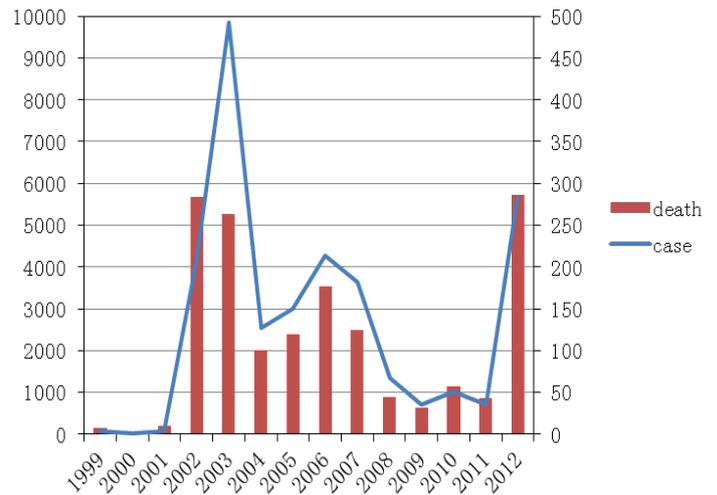


図6 米国におけるウエストナイル熱患者発生数

感染症の予防としてはワクチンの使用が有効であると考えられるが、実用化されているヒト用ワクチンは日本脳炎ウイルスに対するもののみである。その他のウイルスを予防するには蚊に刺されないようにするしかない。このような感染症に対し、少しでも感染リスクを低下させるために行政が実施できることは、ウイルスの侵入を早期発見し、感染症や媒介蚊の正確な情報、個人レベルでの対策法を伝えるとともに、ウイルス保有蚊の存在する地点などの特定に努め、随時情報発信することである。本サーベイランスは、保健所と行政、自治体との連携で実施されている。緊急時に直ちに対応するためには、このような連携は不可欠であり、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¹⁷⁾。

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、豊中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>,
 (参照 2013-6-22)
- 3) Public Health Agency of Canada: West Nile Virus Monitor
<http://www.phac-aspc.gc.ca/wnv-vwn/index-eng.php>,
 (参照 2013-6-22)
- 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) 青山幾子, 弓指孝博ら：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
<http://www.iph.pref.osaka.jp/report/report.html#syoho>,
 (参照 2013-6-22)
- 9) 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)
- 10)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三集, 1-13 (2004)
- 11)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/Labotest.htm>, (参照 2013-6-22)
- 12)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)
- 13)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://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/CHIKV.pdf>, (参照 2013-6-22)
- 14)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）
- 15)West Nile Virus - Europe and North Africa, ProMed-mail, 20121025.1364837 (2012)
- 16)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)
- 17)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)

大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2012年度)

中田恵子* 山崎謙治* 左近直美* 加瀬哲男*

2012年度に無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナ疑いで大阪府公衆衛生研究所に病原体発生動向調査事業および医師からのウイルス同定依頼で搬入された188検体のうち、68検体(36%)からエンテロウイルスが検出された。それぞれの疾患で最も多く検出されたウイルス血清型は無菌性髄膜炎でEchovirus 7 (Echo7、13検体、32%)、手足口病でEnterovirus 71(EV71、4検体、36%)、ヘルパンギーナでCoxsackievirus A2(CA2、5検体、9%)であった。無菌性髄膜炎患者に由来する検体から分離培養した7株のEcho7、手足口病患者から得た1株のEV71、ヘルパンギーナ患者から得た4株のCA2に対し、viral protein 1(VP1)領域の核酸配列を決定してそれぞれ分子系統樹解析を実施した。その結果、Echo7とCA2はそれぞれの株間で相同性が高く、全てが同じ遺伝的クラスターを形成した。2012年に流行したEcho7とEV71に最も近縁なウイルスは、それぞれ2005年にフランスで検出された株と、2009年に中国で検出された株であった。一方、CA2は2010年度に当所で採取した株と最も近縁であった。Echo7とEV71は国内外で循環している可能性が、CA2は国内を循環している可能性が考えられた。

キーワード: 無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ、エコーウイルス7、コクサッキーA2、エンテロウイルス71

Key words: Aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease, Herpangina, Echovirus 7, Coxsackievirus A2, Enterovirus 71

エンテロウイルス感染症は夏季に主として小児で流行し、その臨床病型は多様性に富む。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の5類定点届出疾患に指定されているエンテロウイルス感染症は無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナである。いずれの疾患においても、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東アジアで流行した年には中枢神経系合併症の頻度が高くなると報告されている¹⁾。流行する血清型によって症状や重症度が異なるため、継続的なモニタリングが重要である。

大阪府立公衆衛生研究所では、病原体検索を目的に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病あるいはヘルパンギーナ患者の検体が搬入される。本稿では2012年4月1日から2013年3月31日に搬入された検体の病原体検索結果を総括し、2012年度におけるエンテロウイルスの流行状況を概観するとともに、分子疫学的アプローチによる流行実態の解析結果を報告する。

実験方法

1. 検体および情報収集

2012年4月1日から2013年3月31日の期間、大阪府立公衆衛生研究所に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病あるいはヘルパンギーナ疑い131名から採取された188検体を対象とした。検体種別の内訳は、髄液が65検体、呼吸器系検体(咽頭拭い液、うがい液、鼻汁等)が78検体、糞便(腸内容物含む)が43検体、尿

*大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2012 Report)

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

が2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（患者の年齢、性別、診断名、体温、発症日）は調査票より収集した。それ以外の検体情報は医師から提供された書面より収集した。

2. 検体からのウイルス遺伝子検出

糞便は LE 溶液（0.5%ラクトアルブミン水解物、2μg/ml アンホテリシン B、200U/ml 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。さらに上清を LE 溶液で10倍希釈したのち、0.45μm ミニザルトシリンジフィルター（sartorius 社）でろ過し培養細胞用検体（糞便溶液）とした。10%懸濁液の上清およびそれ以外の検体（未処理）の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 seminested RT-PCR²⁾を実施し、増幅産物の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。なお、ムンプスウイルスについては real-time PCR¹²⁾にて同定を行った。

3. 培養細胞および哺乳マウスによるウイルス分離

培養細胞によるウイルス分離には24ウェルプレートに播種した RD-18S 細胞および Vero 細胞を用いた。これらの細胞に糞便溶液および検体をそれぞれ200μl 接種し、37°CのCO₂インキュベーターで1週間培養し、CPE(cytopathic effect)を観察した。CPE が出現した場合に培養上清を回収した。

VP4-2 領域に対する RT-PCR でエンテロウイルスが陽性だった検体のうち、培養細胞で分離が困難な血清型が検出された場合は、培養細胞による分離に加えて ICR 哺乳マウスによるウイルス分離を実施した。生後72時間までの哺乳マウスの頸部皮下に糞便溶液および検体を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は-80°Cで保存した。

4. 培養上清およびマウスからのウイルス遺伝子検出

CPEが見られた RD-18S 細胞または Vero 細胞の培養上清からは、検体からの RNA 抽出と同法にて RNA を抽出した。

弛緩麻痺が見られた哺乳マウスについては、頭部、内臓、皮膚、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社）で約1分間振とうした。その後、15,000rpmで5分間遠心し、上清から同上の方法で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った。また、7株のEcho7（709bp）、1株のEV71（581bp）および4株のCA2（643bp）に対して、ClustalWを用いた系統樹解析を実施した。

結 果

1. 患者情報およびウイルスの検出状況

無菌性髄膜炎患者は70名で、年齢の中央値は4歳1カ月（範囲：16日齢-64歳）、性別は男性53名（76%）、女性17名（24%）、体温の中央値は39.0°C（37.4-40.4°C）であった。手足口病患者は10名で、年齢の中央値が2歳2カ月（4カ月-8歳9カ月）、性別は男性7名（70%）、女性3名（30%）、体温の中央値は38.2°C（37.6-40.1°C）であった。ヘルパンギーナ患者は51名で、年齢の中央値は4歳（1カ月-40歳）、性別は男性38名（74%）、女性13名（26%）、体温の中央値は38.5°C（36.5-40.0°C）であった。

全患者131名中、51名（39%）の検体からエンテロウイルスが検出された。検出方法別ではseminested RT-PCRでの検出率が高く、188検体中60検体（32%）であった（表1）。seminested RT-PCRでエンテロウイルス陽性であったが、細胞培養で陰性だった12検体について哺乳マウスによるウイルス分離を試みたところ、CA8 およびCA12が各1株分離された。哺乳マウスによるウイルス分離率は12検体中2検体（17%）であった（表2）。

表 1.対象 3 疾患患者検体における検体種別検出法別ウイルス検出結果

ウイルス血清型	無菌性髄膜炎											
	髄液 N=63			呼吸器検体 (咽頭拭液、鼻汁、うがい液等) N=15			糞便 (腸内容物含む) N=40			その他 (尿、血液等) N=2		
	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞
CA5	0	0	0	0	0	0	1	NT	NT	0	0	0
CA9	1	1	0	0	0	0	1	0		0	0	0
CB5	2	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0
EV71	1	1	0	1	0	1	1	0		0	0	0
Echo6	2	2	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Echo7	3	4	3	1	1	1	6	3	5	0	0	0
Echo9	2	0	0	1	0	1	4	3	5	0	0	0
Echo20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Rhino	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
mumps	3	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
合計	15	8	4	3	1	3	15	7	12	0	0	0
ウイルス血清型	手足口病											
	髄液 N=1			呼吸器検体 (咽頭拭液、鼻汁、うがい液等) N=9			糞便 (腸内容物含む) N=1			その他 (尿、血液等) N=0		
	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞
CA6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	No data		
CA9	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
CA16	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
EV71	0	0	0	3	1	1	1	1	0			
合計	0	0	0	6	1	1	1	1	0			
ウイルス血清型	ヘルパンギーナ											
	髄液 N=1			呼吸器検体 (咽頭拭液、鼻汁、うがい液等) N=51			糞便 (腸内容物含む) N=2			その他 (尿、血液等) N=0		
	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞
CA2	0	0	0	5	0	4	0	0	0	No data		
CA4	0	0	0	4	0	3	0	0	0			
CA8	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
CA9	0	0	0	2	2	2	0	0	0			
CA12	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
CB2	0	0	0	1	1	0	0	0	0			
EV71	0	0	0	1	1	1	0	0	0			
Echo7	0	0	0	2	2	2	1	1	1			
Rhino	0	0	0	2	0	0	0	0	0			
HSV1	0	0	0	NT	1	1	0	0	0			
合計	0	0	0	19	7	13	1	1	1			

*seminestedRT-PCR、ただしmumpsについてはrealtimeRT-PCR
NT:not tested

表 2.哺乳マウスによるウイルス分離

	*検体数	陽性
CA9	1	1
CA8	3	0
CA12	1	1
CA16	1	0
CB5	1	0
Echo7	2	0
Echo9	2	0
EV71	1	0

*検体数 (PCR陽性で細胞培養陰性の検体)

2. 疾患別患者割合および検出ウイルスタイプ

疾患別の患者の割合は無菌性髄膜炎が 53% (70/131 名) と最も多く、次いでヘルパンギーナが 39% (51/131 名)、手足口病が 8% (10/131 名) であった。各疾患でエンテロウイルスが検出された患者は無菌性髄膜炎で 37% (26/70 名)、そのうち Echo7 が 27%、次いで Echo9 が 15% を占めた (図 1)。ヘルパンギーナは 37% (19/51 名) からエンテロウイルスが検出され、そのうち CA2 が 27%、次いで CA4 が 21% であった (図 2)。手足口病は 60% (6/10 名) からエンテロウイルスが検出され、そのうち EV71 が 50% を占めた (図 3)。

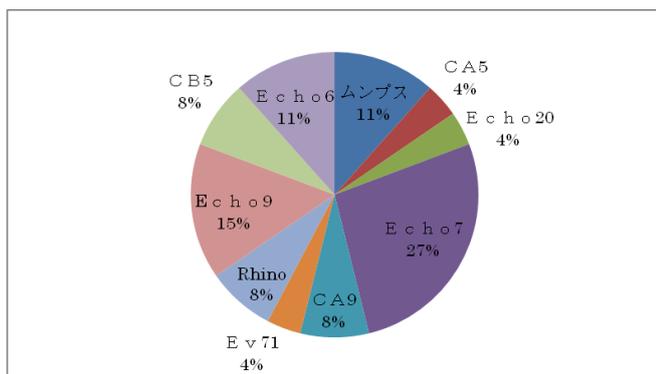


図 1. 無菌性髄膜炎患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=26)

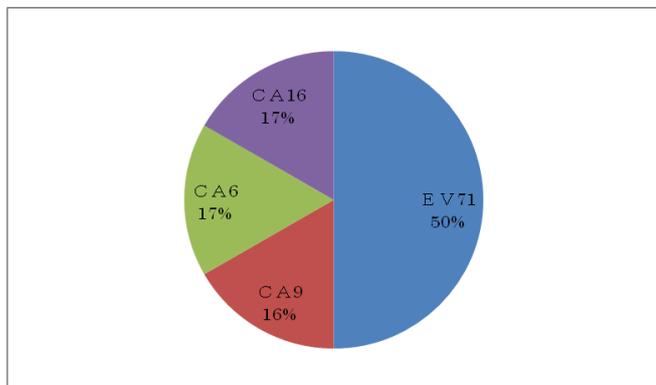


図 2. 手足口病患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=6)

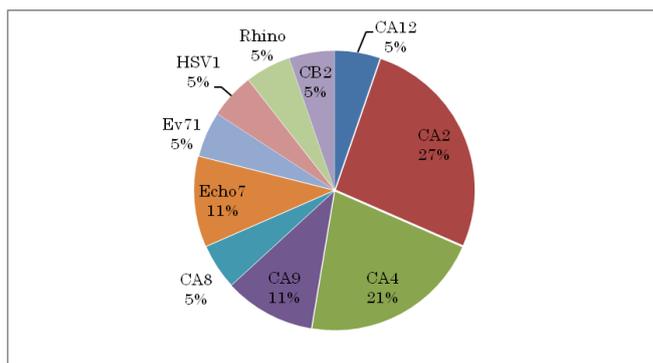


図 3. ヘルパンギーナ患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=19)

3. 疾患別月別の検出エンテロウイルス血清型

2011年はCA6の検出割合が突出して高かったが、2012年度のエンテロウイルス検出では各疾患患者検体から様々な血清型のエンテロウイルスが検出された。無菌性髄膜炎患者検体でウイルス検出数が最も多かったのは7月と9月であった。検出頻度が最も高かったEcho7は8月にピークとなった (図4)。手足口病患者検体からのウイルス検出は10月が最も多く、全てEV71が検出された (図5)。ヘルパンギーナ患者検体からのウイルス検出数は7月が最も多く、検出頻度が高いCA2やCA4は7月のみに検出された (図6)。

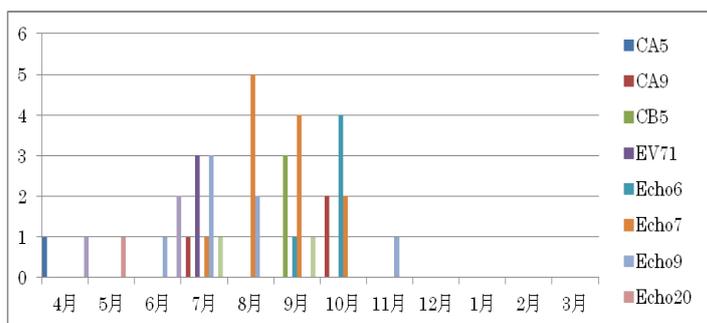


図4. 無菌性髄膜炎患者検体からの月別検出ウイルス血清型

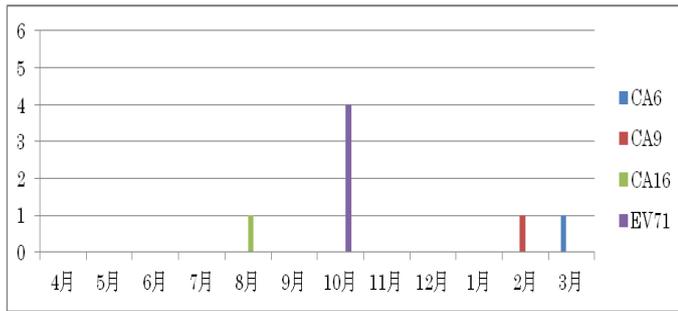


図5.手足口病患者検体からの月別検出ウイルス血清型

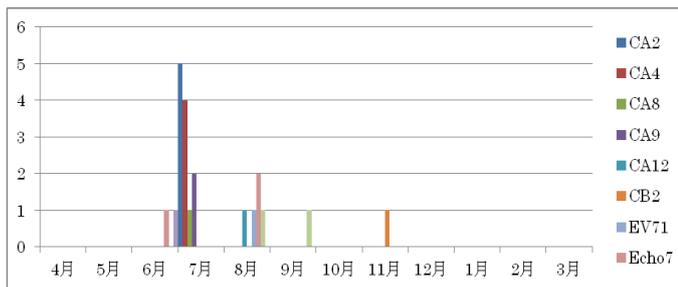


図6.ヘルパンギーナ患者検体からの月別検出ウイルス血清型

4. Echo7, EV71およびCA2の系統樹解析

7株のEcho7、1株のEV71および4株のCA2についてVP1領域（それぞれ、709bp、581bp、643bp）の系統樹解析を実施した。その結果、Echo7およびCA2については全てが同じクラスターを形成した（図7、9）。Echo7に最も近縁だったのはフランスで2005年に検出された株であり（図7）、EV71は2009年に中国で採取された株であった（図8）。CA2では2010年に当所で採取された株と同じクラスターを形成し、次に2003年に神奈川県で分離された株と近縁であった（図9）。

EV71の解析において2010年度に当所で採取された株（AB688662）は遺伝子型C2に属していたのに対し、今シーズンに採取された株（24037）は遺伝子型B型に属した（図8）。

考 察

2012年度、ヘルパンギーナおよび手足口病の流行は低レベルであったが、無菌性髄膜炎患者は例年並であった⁴⁾。CA6による手足口病が大流行した^{5) 6) 7)} 2011年度とは異なり、手足口病患者およびヘルパンギーナ患

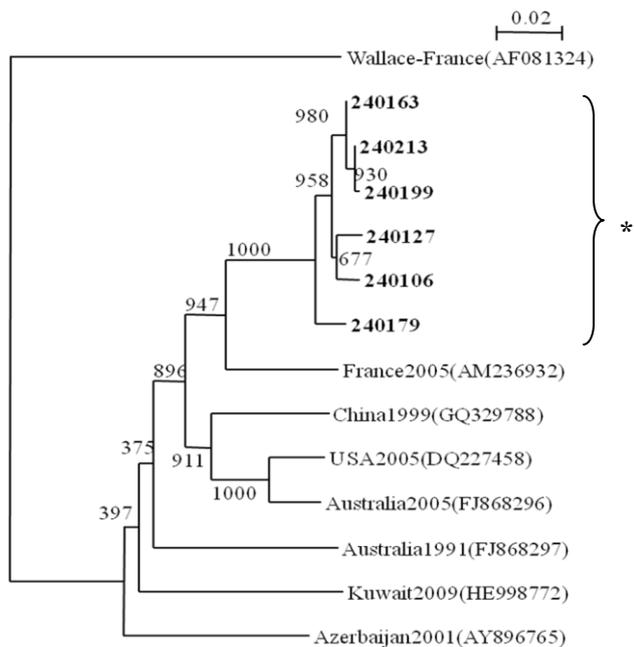
者検体からはほとんどCA6が検出されなかった。

今シーズンの無菌性髄膜炎患者において最も多く検出されたウイルス血清型はEcho7であった。病原体検出情報(NESID)によると、2003/2004シーズンに全国で比較的多く検出された後、Echo7は今シーズンに至るまでほとんど報告されていない。Echoウイルスは一般的に流行サイクルが数年から数十年であるとされている^{8) 9)} ¹⁰⁾。今シーズンの流行は前回の流行から約10年間の間隔であり、既報とよく一致する。これから約10年後のEcho流行の動向に注目したい。Echo7の系統樹解析によると、今シーズンに流行したウイルス株は2005年にフランスで採取された株と最も近縁であった。中にはフランスの株と100%の相同性を持つものも存在した。これは、今シーズンのEcho7が国外から流入した可能性を示唆すると思われる。

今シーズンの手足口病で最も多く検出されたEV71は、国内で2010年に流行した。NESIDによると我が国のEV71による手足口病流行は2～3年毎である。今シーズンの検出も通常のカイクルに一致すると思われるが、流行は非常に小規模であった。特筆すべきことは2010年に当所で検出されたEV71は遺伝子型がC2型であったのに対し、今シーズンの株はB型だったことである。しかし、新しいタイプに属する可能性も残されているため、さらに他の分離株を解析する必要がある。

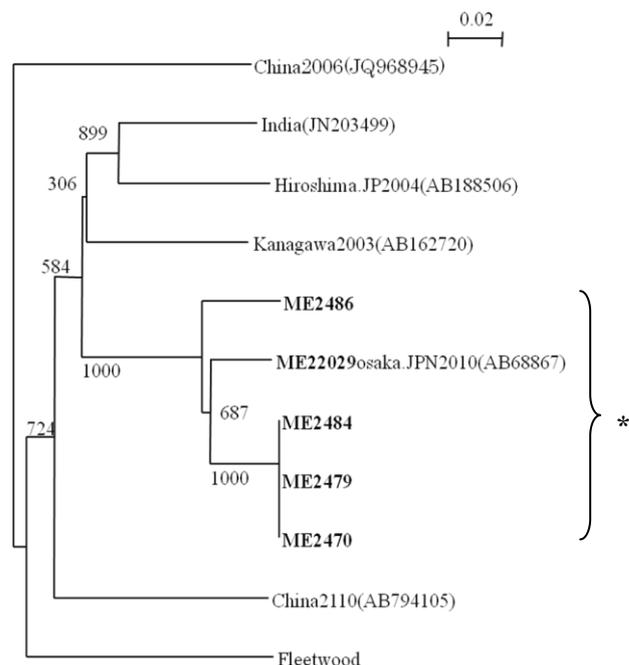
ヘルパンギーナではCA2およびCA4の検出が多かった。これは例年通りの傾向である。CAは培養細胞による分離培養が困難な場合が多く、今シーズン、遺伝子検索のみで検出があったCA8やCA12については哺乳マウスによる分離も実施した。その結果、培養細胞では出来なかったが、哺乳マウスでウイルス分離できた血清型があった。近年では生命倫理の観点から、動物によるウイルス分離を極力減らす方向にある。しかし、CAの分離においては代替法の開発が行われるまでは引き続き実施する必要があると思われる。CA2の系統樹解析においては2010年度に当所にて分離された株（ME22029osaka.JPN2010株）と同一のクラスターを形成し、次いで2003年に神奈川県で採取された株と近縁であった。このことから、CA2の遺伝的変化は比較的小さいと思われる。

Echo7およびEV71については国際的な伝播が、CA2については国内の伝播が大きな要因を占める可能性が示



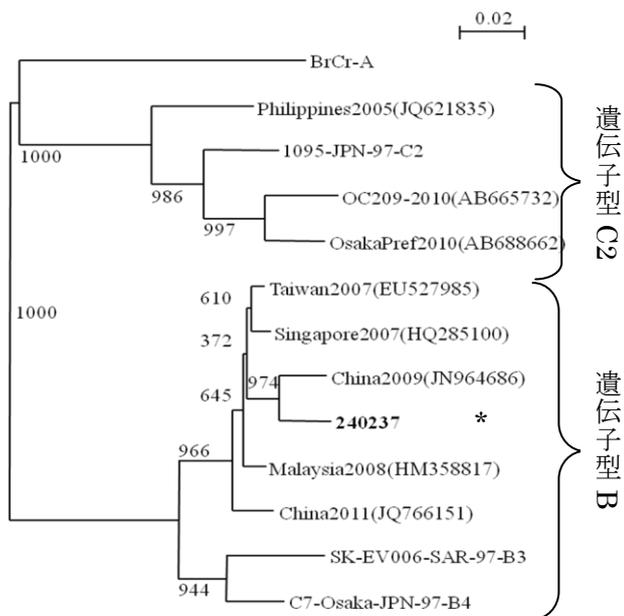
*太字:平成24年度大阪府分離株

図7. Echo7系統樹 (VP1領域,709bp)



*太字:平成24年度大阪府分離株

図9. CA2系統樹 (VP1領域, 643bp)



*太字:平成24年度大阪府分離株

図8. EV71系統樹 (VP1領域, 581bp)

唆された。しかし、本報告は単年度に分離された少数のウイルス株からの知見であるため、この傾向を指示するデータを今後も蓄積したい。

エンテロウイルスは血清型が数多く存在し、年毎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。Echo ウイルスが流行した際は無菌性髄膜炎等の集団発生が報告¹⁰⁾されていることや、EV71 による手足口病流行の際には重症化症例への警戒が必要である。今後も流行規模の予測や予防啓発に資するため、流行するエンテロウイルスの血清型を継続的にモニタリングしていくことが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、輿那覇麻理、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) 大阪府感染症発生動向調査事業報告書 第31報

5) 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).

6) 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)

7) 中田恵子、山崎謙治、左近直美、加瀬哲男；大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析（2011年度）大阪府立公衆衛生研究所所報（平成24年度）P8-13.

8) 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)

9) 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)

10) 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)

11) 無菌性髄膜炎関連エンテロウイルスの動向 2008年12月現在.IASR30-1(347)

12) Boddicker JD, Rota PA, Kerman T, Wangeman A, Lowe L, Hummel KB, Thompson R, Bellini WJ, Pentella M, and DesJardin LE. Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Mumps Virus RNA in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 45(9):2902-2908,(2007).

GC/MSを用いた漢方製剤に残留するピレスロイド系農薬の実態調査

青山愛倫* 武田章弘* 田上貴臣* 沢辺善之*

11種類の漢方製剤についてGC/MSを用いて、ピレスロイド系農薬の分析法の検討を行ったところ、良好な回収率と再現性を示し、分析法としての妥当性を確認した。さらに、既に分析法の妥当性を確認している漢方製剤を加えた20種類141品目の漢方製剤について残留するピレスロイド系農薬の分析を行った。その結果、残留するピレスロイド系農薬は検出限界未満であった。

キーワード：漢方製剤、残留農薬、ピレスロイド系農薬、GC/MS

Key Words : kampo products, pesticide residue, pyrethroid pesticide, GC/MS

漢方製剤の原料である生薬は、植物に由来するものが多く、栽培品と野生品がある。現在、我が国の生薬の主な輸入先である中国では6割程度が栽培品であるといわれている¹⁾。栽培品には農作物と同じく農薬が使用される可能性があり、野生品の場合にも土壌汚染による農薬の移行や収穫後の農薬散布などによる農薬の残留が考えられる。

国内では、平成15年に4種類の生薬からピレスロイド系農薬が検出されたという事例があり²⁾、生薬の安全性が問題となった。さらに、厚生労働省の研究班により、生薬中の残留農薬について調査研究が行われ、8種類の生薬からピレスロイド系農薬が検出されたという報告がある³⁾。生薬中の残留農薬は、日本薬局方において14種類の生薬を対象に、総BHC (benzenhexachloride : α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC の合計) と総DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane : o,p' -DDT, p,p' -DDT, p,p' -DDD [dichlorodipenyldichloroethane], p,p' -DDE [dichlorodipenyldichloroethylene] の合計) についてそれぞれ0.2 ppm以下という残留基準が定められている。また、法的な規制ではないが、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において、有機塩素系農薬(総BHC : 0.2 ppm以下、総DDT : 0.2 ppm以下)、有機リン

系農薬(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)、ピレスロイド系農薬(シペルメトリン : 1.0 ppm以下、フェンバレレート : 1.5 ppm以下)の自主基準を設定している。

生薬のほとんどは漢方処方として流通しており、通例、漢方処方は水で煎じられる⁴⁾。農薬の多くは脂溶性であり水への移行率は低いと考えられるが、漢方製剤は市場に広く流通し服用するものであるため、残留農薬の実態を把握する必要性があり、その分析は簡便・迅速に行われることが望ましい。

我々は既に質量分析計付きガスクロマトグラフ(Gas Chromatograph / Mass Spectrometry : GC/MS)の電子イオン化法(Electron Ionization : EI)⁵⁾及び負化学イオン化法(Negative Chemical Ionization : NCI)⁶⁾を用いた漢方製剤中のピレスロイド系農薬の簡便・迅速な分析法をそれぞれ報告している。

そこで今回、汎用性の高いEI法を用いて対象とする漢方製剤を拡大し、11種類の漢方製剤について代表的なピレスロイド系農薬であるシペルメトリン及びフェンバレレートの添加回収試験を行い、分析法の妥当性を確認した。また、20種類141品目の漢方製剤を対象として、実態調査を行った。また、一部の漢方製剤については、NCI法を用いた検討も行ったので報告する。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課

Survey of Pyrethroid Pesticide Residues in Kampo Products by
Gas Chromatography / Mass SpectrometryBy Airin AOYAMA, Akihiro TAKEDA, Takaomi TAGAMI and
Yoshiyuki SAWABE

実験方法

1、試料

添加回収試験：平成 22 年に購入した、我が国における販売及び輸入金額上位 20 位以内の医療用漢方製剤のうち 11 種類(当帰芍薬散、芍薬甘草湯、葛根湯、桂枝茯苓丸、八味地黄丸、十全大補湯、防風通聖散、柴朴湯、猪苓湯、釣藤散、温経湯)を用いた。

実態調査：平成 22 年に購入した、我が国における販売及び輸入金額上位 20 位以内の医療用漢方製剤 20 種類 141 品目(補中益気湯 9 品目、大建中湯 2 品目、柴苓湯 2 品目、加味逍遥散 10 品目、小柴胡湯 11 品目、麦門冬湯 6 品目、牛車腎気丸 1 品目、六君子湯 9 品目、当帰芍薬散 12 品目、小青竜湯 7 品目、芍薬甘草湯 7 品目、葛根湯 11 品目、桂枝茯苓丸 12 品目、八味地黄丸 9 品目、十全大補湯 9 品目、防風通聖散 10 品目、柴朴湯 1 品目、猪苓湯 10 品目、釣藤散 1 品目、温経湯 2 品目)を用いた。

2、対象農薬

ピレスロイド系農薬の中から、中国における日本向け食材を対象とした残留農薬検査⁷⁾で検出上位 1 位及び 2 位であるシペルメトリンとフェンバレレートを対象とした。

3、試薬

農薬標準品は、Dr. Ehrenstorfer GmbH.から購入した。その他の試薬については、和光純薬工業株式会社から購入した。

4、標準溶液の調製

各農薬標準品をヘキサンに溶解し、標準原液(500 ppm)を調製した。各標準原液を混合しヘキサンで希釈し添加用混合標準溶液(5 ppm)を調製した。さらに、添加用混合標準溶液をヘキサンで希釈し、混合標準溶液とした。

5、試料溶液の調製

試料溶液は、前報⁵⁾⁶⁾に従って調製を行った。

粉碎した漢方製剤 5.0 g を正確に秤量し、アセトン 10 mL 及びヘキサン 20 mL を正確に加えた後、30 分間振とうし、遠心分離(3000 rpm, 10 min)を行った。上澄み液に水 20 mL を加え、5 分間振とう後、上層 5 mL をとり、無水硫酸ナトリウム 1 g で脱水した。この液 2 mL を正確にとり、ヘキサン 3 mL を加えて混合し、試料溶液とした(試料換算 0.1 g/mL)。

6、装置及び分析条件

装置は Agilent 社製 6890N GC-5973N MSD を用いた。分析条件は前報⁵⁾⁶⁾に従った。

[EI 法] カラム:DB-1701(Agilent 社製 0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 µm)、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°C、カラム温度：初期温度 50°C で 1 分間保持後、100°C まで 30°C/分で昇温し、270°C まで 25°C/分で昇温して 270°C で 20 分間保持した。インターフェイス温度 270°C、イオン源温度：230°C、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(*m/z*)：シペルメトリン(181 [定量イオン], 163)、フェンバレレート(167 [定量イオン], 125)を用いた。

[NCI 法] イオン源温度：180°C、試薬ガス：メタンガス、モニタリングイオン(*m/z*)：シペルメトリン(207 [定量イオン], 171)、フェンバレレート(211 [定量イオン], 213)。その他の分析条件は EI 法と同じ分析条件とした。

GC/MS を安定させるため試料溶液を 5 回注入後に行った後に分析を行った。

本分析法の漢方製剤におけるシペルメトリン及びフェンバレレートの検出限界は 0.1 ppm であった。

結果及び考察

1、添加回収試験

実験方法の 1、試料に示した 11 種類の漢方製剤を対象とし、EI 法による添加回収試験を行った。添加濃度は、1 ppm に設定した。添加回収試験の結果、回収率は 93.5～117.9%、相対標準偏差(RSD)は 14.8%以下であった(表 1)。設定した方法では、対象とした 11 種類の漢方製剤に残留するピレスロイド系農薬(シペルメトリン及びフェンバレレート)を十分な真度と精度で分析可能であると判断した。また、妨害ピークは認められず、特異性も満足できるものであった。

2、実態調査

実験方法 1、試料に示した 20 種類(添加回収試験で検討した 11 種類及び前報⁵⁾の 9 種類)の漢方製剤について実態調査を行った。EI 法で妨害ピークが認められる小青竜湯⁵⁾を除く 19 種類 134 品目について分析した結果、15 種類 116 品目について妨害ピークは認められず、残留するシペ

表1 添加回収試験(EI法)

漢方製剤	シペルメトリン		フェンバレレート	
	回収率 (%)	相対標準 偏差(%)	回収率 (%)	相対標準 偏差(%)
当帰芍薬散	116.9	3.8	108.0	5.3
芍薬甘草湯	96.3	8.6	93.5	8.2
葛根湯	114.4	5.7	112.5	4.1
桂枝茯苓丸	96.5	14.8	93.5	6.0
八味地黄丸	99.3	7.6	102.9	13.0
十全大補湯	114.1	5.5	117.9	6.0
防風通聖散	112.9	7.0	111.5	4.2
柴朴湯	101.4	7.6	99.8	6.9
猪苓湯	114.2	7.7	117.5	4.5
釣藤散	104.1	11.6	94.2	6.5
温経湯	114.3	4.7	109.8	9.2

(n=3)

ルメトリン及びフェンバレレートは検出限界(0.1 ppm)未満であることが確認できた。例として、芍薬甘草湯のEI法によるクロマトグラムを示す(図1-B)。残りの4種類18品目においては、いずれも $m/z=167$ のクロマトグラムのフェンバレレートの保持時間付近に妨害ピークが認められた。4種類18品目の内訳は、桂枝茯苓丸8品目、八味地黄丸2品目、十全大補湯6品目、温経湯2品目であった。例として、桂枝茯苓丸のクロマトグラムを示す(図1-C)。

小青竜湯7品目も含め、EI法で妨害ピークが認められた5種類の漢方製剤について、NCI法での分析法としての妥当性を添加回収試験により検討を行った。方法及び

表2 添加回収試験(NCI法)

漢方製剤	シペルメトリン		フェンバレレート	
	回収率 (%)	相対標準 偏差(%)	回収率 (%)	相対標準 偏差(%)
桂枝茯苓丸	93.9	7.4	86.2	10.4
八味地黄丸	87.4	8.1	90.3	7.4
十全大補湯	104.4	9.7	103.6	9.6
温経湯	115.3	9.2	111.1	11.3
小青竜湯	103.9	3.6	102.9	6.4

(n=3)

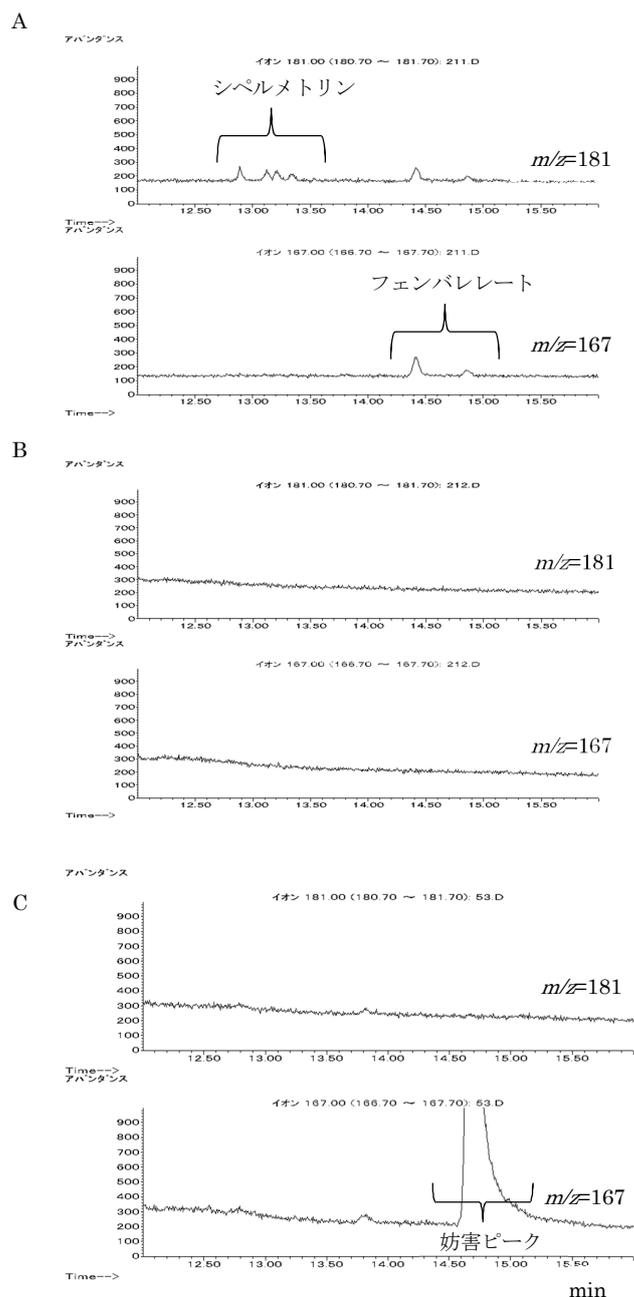


図1 シペルメトリン及びフェンバレレートのクロマトグラム(EI法)

A: 混合標準溶液(0.01 ppm) B: 芍薬甘草湯
C: 桂枝茯苓丸

添加濃度はEI法と同様である。結果として、回収率は86.2~115.3%、RSDは11.3%以下(表2)、妨害ピークは認められず、分析法として妥当であると判断した。5種類25品目の漢方製剤について、NCI法で再分析を行った結果、妨害ピークは認められず、残留するシペルメトリン及びフェンバレレートは検出限界未満であることが確認できた。例として、桂枝茯苓丸のNCI法によるクロマトグラ

ムを示す(図 2-b)。

今回の実態調査の結果より、対象とした 20 種類 141 品目の漢方製剤については、ピレスロイド系農薬による高濃度の汚染はなかったといえる。一般的に汎用性の高い EI 法を用いることで漢方製剤に残留するピレスロイド系農薬が分析可能であり、実態調査を行う時に有用であると考えられた。また、妨害ピークが認められる漢方製剤について汎用性は低いものの特異性に優れる NCI 法を用いることで分析可能な漢方製剤があり、EI 法を用いることができない際の代替法として有用ではないかと考えられた。今後も他の漢方製剤について残留するピレスロイド系農薬の実態調査を行う予定である。

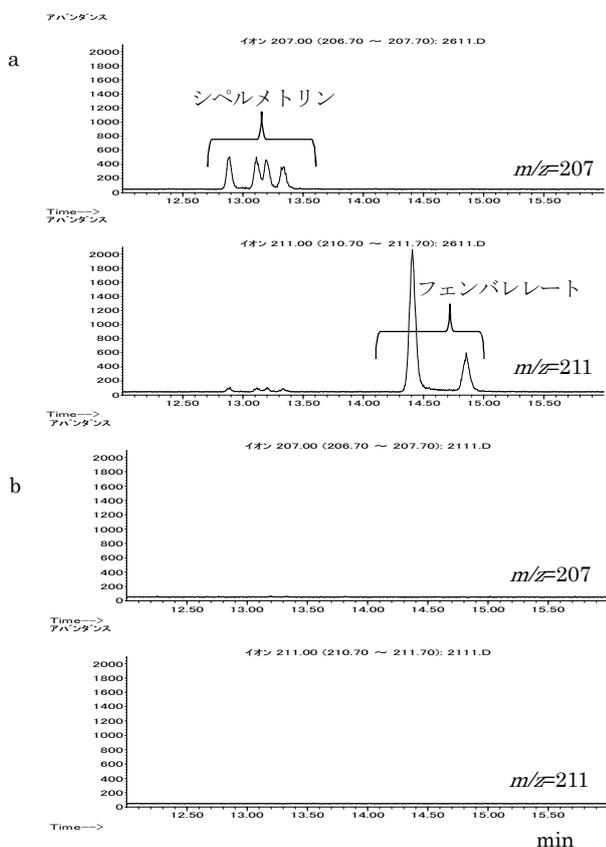


図 2 シペルメトリン及びフェンバレレートクロマトグラム (NCI 法)

a: 混合標準溶液 (0.01 ppm) b: 桂枝茯苓丸

結論

前報⁵⁾に加えて対象とする漢方製剤を拡大し、11 種類の漢方製剤に残留するピレスロイド系農薬が汎用性の高い EI 法で分析可能であることを確認した。EI 法及び NCI

法を用いて、20 種類 141 品目の漢方製剤のピレスロイド系農薬の分析を行ったところ、残留するピレスロイド系農薬は検出限界(0.1 ppm)未満であった。

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) 塩田寛子，浜野朋子，中嶋順一，下村壽一，末次大作，安田一郎：生薬及び煎出液に残存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)
- 3) 合田幸広ら：厚生労働科学特別研究事業「生薬中の農薬分析に関する研究」平成 15 年度総括・分担研究報告書(H15-特別-041)
- 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，医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，**41**，458-468(2010)
- 5) 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・迅速分析，大阪府立公衆衛生研究所所報，**50**，26-29(2012)
- 6) Takaomi Tagami, Keiji Kajimura, Katsuhiko Yamazaki, Yushiyuki Sawabe, Chie Nomura, Shuzo Taguchi, Hirota 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)
- 7) 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)

健康食品中のムタプロデナフィル検出事例とその酸処理条件の検討

青山愛倫* 浅田安紀子* 武田章弘* 土井崇広*
臯月由香* 田上貴臣* 沢辺善之*

平成22年度に大阪府にて実施した強壯効果を標榜する健康食品の試買調査において、1製品よりシルデナフィル構造類似成分であるムタプロデナフィルを検出した。HPLC/PDA及びLC/MSによる分析の結果、当該成分は酸処理をすることによりメチソシルデナフィルに分解されることを確認した。さらに、その酸処理条件について検討を行ったところ、温度や酸の濃度及び種類が検出に影響を与えることが確認された。また、特定の酸処理条件下において未知化合物を検出した。

キーワード：健康食品、勃起不全治療薬、ムタプロデナフィル、メチソシルデナフィル

Key words : dietary supplement, drugs for erectile dysfunction, mutaprodanafil, methisosildenafil

近年、健康や美容に対する意識の高まりやインターネットなどで容易に入手可能なことから健康食品の需要が増大している。しかし、一部の健康食品の安全性や品質は充分とはいえない。実際に、医薬品成分を含有した健康食品の服用による死亡例や重篤な健康被害が全国で報告されており、大きな社会問題となっている¹⁾。厚生労働省ホームページ「医薬品成分(シルデナフィル及び類似成分)が検出されたいわゆる健康食品について」²⁾によると、強壯効果を標榜した健康食品に医薬品成分が含有されていた製品は、354製品であった(平成25年5月31日時点)。検出された医薬品成分は、勃起不全(以下、ED)治療薬の有効成分であるシルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、及びこれらの構造の一部を変更した類似化合物である。強壯効果を標榜した健康食品において、これら医薬品成分及び類似化合物は頻繁に検出されているのが現状である^{3) 7)}。

大阪府では、健康食品による健康被害の未然及び拡大防止のため、強壯効果と痩身効果を標榜する健康食

品等の試買調査を行っている。平成22年度に試買した製品の中で1製品について、酸処理によりメチソシルデナフィルに分解されるムタプロデナフィル(当時、「酸処理するときメチソシルデナフィルを生じる推定分子量629の未知物質」として扱われた[表1])を検出したので報告する。また、その酸処理条件について検討を行い、特定の条件下において未知化合物を検出したので併せて報告する。

方法

1、試料

平成22年度の健康食品試買調査において試買した製品「スーパーエックス」(剤形:硬カプセル)を用いた。

2、試薬

メチソシルデナフィルは、千葉県衛生研究所より提供されたものを用いた。ホモシルデナフィルは、東京都健康安全研究センターより提供されたものを用いた。その他の試薬については、和光純薬工業株式会社製を用いた。

3、標準溶液の調製

メチソシルデナフィル：メチソシルデナフィルをメタノールで希釈し100 ppm溶液とした。この溶液をメタノールで希釈しLC/MS用標準溶液とした(0.1 ppm)。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課

Detection of Mutaprodanafil in Dietary Supplement and Examination of Its Acid Treatment Conditions

By Airin AOYAMA, Akiko ASADA, Akihiro TAKEDA, Takahiro DOI, Yuka SATSUKI, Takaomi TAGAMI and Yoshiyuki SAWABE

ホモシルデナフィル：ホモシルデナフィルをメタノールで希釈し 10 ppm 溶液とした。さらに、この溶液をメタノールで希釈して LC/MS 用標準溶液とした(0.1 ppm)。

4、試料溶液の調製

試料 10 mg を精密に秤量し、メタノール 5 mL を加えて、60 分間超音波抽出を行った。その後、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した。ろ液をメタノールで 100 倍希釈し HPLC/PDA 用試料溶液とし、さらにその 100 倍希釈液を LC/MS 用試料溶液とした。

5、酸処理試料溶液の調製

4、のろ液をメタノールで 10 倍及び 1000 倍希釈した溶液 1 mL をとり、ギ酸 200 μL を加えた後、メタノールで全量 10 mL にした(最終ギ酸濃度 2%)。さらに、55°C 水浴中で 4 時間加温をしたものをそれぞれ HPLC/PDA 用及び LC/MS 用酸処理試料溶液とした。

6、装置

HPLC/PDA は LC-10 及び LC-20AT、LC/MS は LCMS-2020(いずれも島津製作所製)を用いた。

7、分析条件

分析条件は、高橋ら⁴⁾の方法を参考に設定した。

[HPLC/PDA]

カラム：L-Column ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, 化学物質評価研究機構製)

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル/10 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH 10.0)混液(60 : 40)

流速：0.8 mL/min

注入量：10 μL もしくは 20 μL

PDA：波長 190-370 nm(モニタリング波長 292 nm)

[LC/MS]

カラム：Ascentis Express C18 (2.1 mm i.d. × 75 mm, 2.7 μm, SUPELCO 製)

カラム温度：40°C

移動相 A：アセトニトリル

移動相 B：10 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH 10.0)

グラジエント条件：0 分(20%B) 10 分(80%B)

流速：0.2 mL/min

注入量：5 μL

イオン化法：ESI ポジティブモード(Scan モード、マスレンジ $m/z=80-800$)

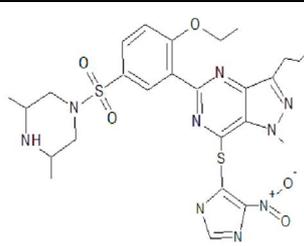
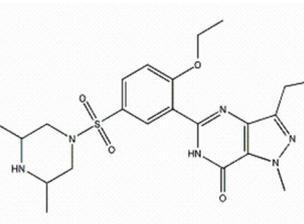
乾燥ガス流量：900 L/h(N₂)

コーンガス流量：90 L/h(N₂)

キャピラリー電圧：4.5 kV

コーン電圧：20 V

表 1 ムタプロデナフィル、メチソシルデナフィル

化学物質	分子量	構造
ムタプロデナフィル (C ₂₇ H ₃₅ N ₉ O ₅ S ₂)	629.755	
メチソシルデナフィル (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S)	488.607	

結果及び考察

1、試買調査

HPLC/PDA 用試料溶液について分析を行ったところ、未知化合物のピークが検出された。また、HPLC/PDA 用酸処理試料溶液については、未知化合物のピークに加えシルデナフィル様のスペクトルを持つピークが検出された。検出された 2 つの化合物について検討を行うため LC/MS で分析を行った。

LC/MS 用試料溶液について分析したところ、未知ピークの MS スペクトルにおいて $m/z=630$ と 316 にピークが検出され、それぞれ $[M+H]^+$ と $[M+2H]^{2+}$ であると推察された。また、LC/MS 用酸処理試料溶液では、シルデナフィル様のスペクトルを持つピークの MS スペクトルにおいて $m/z=489$ にピークが検出された。提供

されたホモシルデナフィルとメチソシルデナフィルを用いて確認したところ、メチソシルデナフィルであることが判明した。さらに、酸処理を行っていない試料溶液ではメチソシルデナフィルが検出されなかったことから、メチソシルデナフィルは検体そのものではなく酸処理により生成されたものであると考えられた。

以上の結果より、「酸処理するときメチソシルデナフィルを生じる推定分子量 629 の未知物質」を検出したとして、試買調査結果を報告した。

その後、大阪府以外に千葉県、神奈川県、浜松市の試買調査でも同様の化合物の検出が確認された。この化合物は、厚生労働省により「専ら医薬品成分として使用される成分本質」に該当するものされ、国立医薬品食品衛生研究所により構造の決定がされ、「ムタプロデナフィル」と命名された⁸⁾。厚生労働省及び4府県市では当該製品を使用しないように、また、使用後に体調に不安を感じる場合は医療機関または保健所に相談するように注意喚起を行った⁹⁾。

2、酸処理条件の検討

試買調査の結果より、ムタプロデナフィルはギ酸処理によりメチソシルデナフィルに分解されることが確認された。健康食品中のシルデナフィル類似化合物の構造が多様化している状況であることから、今回の事例のようなムタプロデナフィルからメチソシルデナフィルへの分解以外にも、別の化合物が生成する反応条件が存在する可能性が考えられた。そこで、酸処理条件についてHPLC/PDAを用いた検討を行い、その分解挙動を確認することとした。

反応温度及び反応時間の検討：反応温度として、4℃、20℃、37℃、55℃を、反応時間として、1時間、3時間、1日を検討した。4、試料溶液の調製のろ液をメタノールで10倍希釈した溶液1 mLに最終濃度が2%になるようにギ酸を加え、その溶液を設定した4種の温度条件下、3種の反応時間で静置した。その反応液を移動相(アセトニトリル/10 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液[pH 10.0]混液[60 : 40])で10倍希釈し、酸処理条件検討用試料溶液とした。

その際に得られたムタプロデナフィル、メチソシルデナフィルのクロマトグラム及びUVスペクトルを示す(図1)。検討の結果、反応温度が高温になるほどメチソシルデナフィルの生成量は増加し、また、反応時間が長くなるほどメチソシルデナフィルの生成量は増加した(図2)。

酸の種類及び酸濃度の検討：酸処理に用いる酸として、ギ酸及び塩酸を、酸濃度として2%及び5%を検討した。4、試料溶液の調製のろ液をメタノールで10倍希釈した溶液1 mLにギ酸及び塩酸をそれぞれの最終濃度が2%及び5%になるように加え、55℃の水浴上で1時間、3時間、1日静置した。その反応液を移動相(アセトニトリル/10 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液[pH 10.0]混液[60 : 40])で10倍希釈し、酸処理条件検討用試料溶液とした。

検討の結果、1時間、3時間の静置ではほとんど差が認められなかったのに対し、1日の静置では最終濃度5%のギ酸で最もメチソシルデナフィルの生成量が多かった(図3)。また、最終濃度2%及び5%の塩酸では未知化合物Cが見られ、スペクトルを確認したところメ

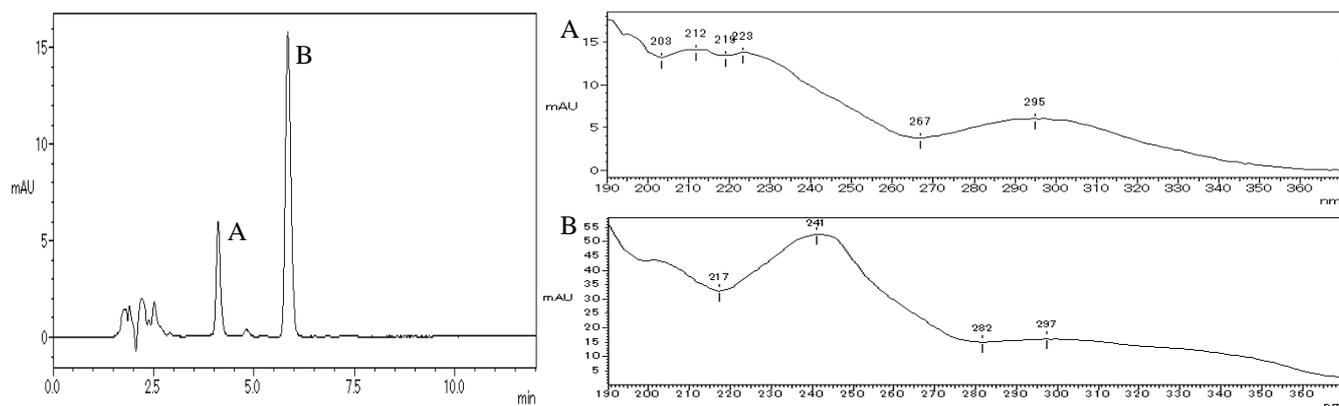


図1 HPLC クロマトグラム及びUV スペクトル(2% HCOOH , 55℃, 3h)

A メチソシルデナフィル B ムタプロデナフィル

大防止に寄与していきたいと考えている。

謝辞

今回の調査にあたり、標準品を提供していただきました、千葉県衛生研究所医薬品研究室 長谷川貴志研究員、高橋和長研究員、東京都健康安全研究センター薬事環境科学部医薬品研究科の皆様には深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 厚生労働省. 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報 . 厚生労働省. 2013-05-31.
http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/daietto/index.html, (参照 2013-05-31).
- 2) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課. 医薬品成分(シルデナフィル及び類似成分)が検出されたいわゆる健康食品 について . 厚生労働省. 2013-05-31.
<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>, (参照 2013-05-31).
- 3) 守安貴子、簗輪佳子、岸本清子、坂本美穂、門井秀郎、中嶋順一、濱野朋子、中江大：健康食品に含有される医薬品成分の分析、東京都健康安全研究センター研究年報， 62， 25-39(2011)
- 4) 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)
- 5) 安田一郎：健康食品中に含まれる医薬品類似成分，食品衛生学雑誌， 51， 402-407(2010)
- 6) 曾根聡子、武田亮、森崎澄江、溝腰利男、後藤成一、山下秀門：健康食品からのヒドロキシホンデナフィル検出事例について，大分県衛生環境研究センター年報， 35， 43-46(2007)
- 7) 伊達英代、井原紗弥香、寺内正裕、新井清、松尾健：健康食品中のムタプロデナフィルの検出事例，広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告， 19， 21-25(2011)
- 8) 厚生労働省：「専ら医薬品として使用される成分本質」に該当する物質の命名について(事務連絡)，平成 23 年 8 月 11 日

9) 独立行政法人国立健康・栄養研究所：「健康食品」の安全性・有効性情報、厚生労働省と千葉県、神奈川県、大阪府、浜松市が医薬品類似成分（シルデナフィル類似成分）を含むいわゆる健康食品に注意喚起 (<http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail1607.html>)，平成 22 年 12 月 21 日

平成 ・ 年度の違法ドラッグ買上調査について

武田章弘* 浅田安紀子* 田上貴臣*
土井崇広* 川口正美* 沢辺善之*

違法ドラッグの流通実態の把握及び取り締まりを行うために、大阪府内で流通している違法ドラッグの買い上げ調査を平成23年度から実施している。その結果、平成23・24年度に調査を実施した32検体のうち、31検体から19種類の指定薬物及び類似体と1種類の医薬品成分が検出された。

キーワード：違法ドラッグ、指定薬物、麻薬

Key words : illicit drug, designated substance, narcotics

違法ドラッグは麻薬や覚せい剤などと同様に多幸感、快感などを高めるために使用されており、店舗またはインターネット上で容易に入手することが可能である。近年、違法ドラッグによる健康被害及び死亡事故が後を絶たず、さらに第三者にまで危害が及ぶなど社会問題となっている。

大阪府では、違法ドラッグの流通実態の把握及び取り締まりを行うために、平成23年度から大阪府内で流通している違法ドラッグを買い上げ、その成分分析を行っている。本稿では、平成23・24年度に行われた大阪府における違法ドラッグ32検体の買上調査の結果について報告する。

調査方法

1) 検体

大阪府内の店舗で販売されているものを買い上げ、検体とした(表1)。

2) 標準物質及び試薬

α -PVTは大阪府警科学捜査研究所から提供を受けた。 α -PVP、MAM-2201、AB-FUBINACA、XLR-11、5-IAI、EAM-2201、N-Ethylbuphedrone、 α -PBP、Pentedrone、

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課
Inspection of Illicit Drugs in Osaka (Apr. 2011-Mar. 2013)
by Akihiro TAKEDA, Akiko ASADA, Takaomi TAGAMI,
Takahiro DOI, Masami KAWAGUCHI and Yoshiyuki
SAWABE

4-Methylbuphedrone、Pentyloneはcayman製、4-メチルエトカチノン、Methoxetamine、3,4-ジメチルメトカチノンはLGC製、リドカインは和光純薬工業製を使用した。NMRの測定溶媒には、ジメチルスルホキシド-d6(D、99.9%) (和光純薬工業)、クロロホルム-d(D、99.8%) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)を使用した。その他試薬類はすべて市販品を用いた。

3) 装置

指定薬物または指定薬物類似体の分析には、以下の装置を使用した。

GC/MS : GC6890/ 5973MSD (Agilent Technologies)

UPLC/MS : 1290 infinity/ 6530 Accurate-Mass Q-TOF
(Agilent Technologies)HPLC/PDA : Alliance HPLC e2695/ 2998 (Waters)、
LC-10 CLASS-VP システム / SPD-M10AVP (島津製作所)、
Prominence/ SPD-M20AVP (島津製作所)NMR : JMN-ECS400 (JEOL)、AVANCE II 800US2
型 (Bruker)

4) 試料溶液の調製

検体の性状ごとに以下の方法で試料原液を調製し、適宜、各分析装置用の希釈液により希釈し、試料溶液とした。

液体：検体15 μ Lをとり、メタノールで1500 μ Lとした。

粉末：検体約1.5 mgをとり、メタノール1.5 mLに溶かした。

植物片：検体約50 mgをとり、メタノール2.5 mLを

[テキストを入力]

加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、0.45 µm のメンブランフィルターでろ過した。

希釈液：GC/MS（メタノール）、UPLC/MS（0.1%ギ酸水溶液）、HPLC/PDA（50%メタノール）

また、必要に応じて、試料原液に水と酢酸エチルを加え、酢酸エチル層を -Methyl-bis-[trifluoroacetamide] (MBTFA) を用いて、トリフルオロアセチル化し、分析を行った。

5) 標準溶液の調製

標準物質約 1mg をとり、メタノールに溶かし、正確に 10 mL とし、標準原液とした。適宜、各分析装置用の希釈液により希釈し、標準溶液とした。

6) 測定条件

測定条件を以下に示した。また、注入口温度、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。

GC/MS¹⁾

キャリアガス：ヘリウム

カラム：HP-1 MS (Agilent Technologies, 30 m×0.25 mm、膜厚：0.25 µm)

注入口温度：200 °C

注入方法：スプリットレス法

注入量：1 µL

流量：1 mL/min

昇温条件：80 °C(1 min)→10 °C/min→320 °C(15 min)

イオン化法：EI, scan モード (m/z 41-550)

イオン源温度：230 °C

UPLC/MS (1)²⁾

検体の性状が液体または粉末の場合には、以下の測定条件を用いた。

移動相 A：0.1% ギ酸水溶液

移動相 B：0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

カラム：AQUITY UPLC HSS T3 (Waters, 100 mm×2.1 mm, 1.8 µm)

カラム温度：40 °C

注入量：1 µL

流量：0.3 mL/min

アイソクラティック条件：A/B：80/20

イオン化法：ESI/ positive, scan モード (m/z 100-1000)

ネブライザー：50 psig

フラグメンター電圧：150 V

Vcap 電圧：3000 V

乾燥ガス流量：10 L/min

乾燥ガス温度：350 °C

コリジョンエネルギー：15, 35 V (m/z 50-1000)

UPLC/MS (2)²⁾

検体の性状が植物片の場合には、以下のグラジエント条件により測定を行った。

グラジエント条件：0-4 min (A/B：65/35) →16 min (A/B：25/75) →17-22min (A/B：10/90)

HPLC/PDA (1)³⁾

検体の性状が液体または粉末の場合には、以下の測定条件を用いた。

移動相 A：アセトニトリル/水/リン酸混液 (300：700：1, SDS 2.8 g/L 含有)

移動相 B：アセトニトリル：水：リン酸混液 (700：300：1, SDS 2.8 g/L 含有)

カラム：L-columnODS (化学物質評価研究機構、150 mm×4.6 mm, 5.0 µm)

カラム温度：40 °C

注入量：50 µL

流量：1 mL/min

グラジエント条件：0-10 min (A/B：75/25) →30 min (A/B：10/90)、測定波長：200-400 nm

HPLC/PDA (2)³⁾

検体の性状が植物片の場合には、以下のようにグラジエント条件を変更し、測定を行った。

グラジエント条件：0-10 min (A/B：75/25) →30-90 min (A/B：10/90)

HPLC/PDA (3)²⁾

上記の条件では違法ドラッグの含有成分を分離できない場合は、以下の移動相及びカラムを適宜使用した。

移動相 A：0.1% ギ酸水溶液または水

移動相 B：0.1% ギ酸アセトニトリル溶液またはアセトニトリル

カラム：L-columnODS (化学物質評価研究機構、150 mm×4.6 mm, 5.0 µm)、XTerraPhenyl (Waters, 250 mm×4.6 mm, 3.5 µm)、XSELECT HSS T3 (Waters, 150 mm×4.6 mm, 3.5 µm)

結果

1) スペクトルライブラリによる指定薬物及び類似体の探索

著者らが作成した GC/MS 用スペクトルライブラリ、Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) が提供する SWGDRUG Mass Spectral Library、Cayman が提供する Cayman Spectral Library 及び、著者らが作成した HPLC/PDA 用スペクトルライブラリを用い、各検体に含まれる指定薬物及び類似体のスクリーニングを行った。その結果、32 検体中 31 検体について指定薬物及び類似体の含有が疑われた。

2) 指定薬物及び類似体の確認

指定薬物及び類似体を含有している可能性がある 31 検体について、GC/MS、UPLC/MS、HPLC/PDA により確認を行った。その結果、大部分の検体については GC/MS における保持時間及び MS スペクトル、UPLC/MS における保持時間、精密質量及び MS/MS スペクトル、HPLC/PDA における保持時間及び吸収スペクトルが標準物質と一致し、指定薬物及び類似体の含有を確認した (表 2、図 1)。

3) 未知化合物の同定

指定薬物及び類似体の含有を疑ったが、標準物質を保有していないため同定できなかったものについては精製後、NMR により構造を決定した (ADB-FUBINACA、ADBICA、QUPIC、 α -PVT)。

考察

平成 23・24 年度に違法ドラッグの買上調査を行った 32 検体のうち、31 検体から指定薬物及び類似体を検出した。違法ドラッグは多幸感や快感を高めることを目的とした成分を含有していることがほとんどである。そのような化合物は人体への安全性が保障されておらず安易に摂取した場合、健康被害が生じる危険性がある。

また、平成 24 年度の買上調査において 6 月に買い上げた検体から α -PVP が検出された。しかし、 α -PVP が大臣指定薬物に指定された後に、同名の検体を買上げ、分析したところ、含有成分が α -PVP と構造が極め

て類似した α -PBP であった (表 2、図 1)。すなわち、違法ドラッグに含まれる成分は、法律の取り締まりの対象となれば、構造を少し変化させた成分に切り替えることで、即座に規制から逃れ、再び堂々と市場に出回ることを繰り返している。このような成分による府民の健康被害を未然に防止するために、今後も継続した違法ドラッグの流通実態を把握することが重要である。

本調査にあたり、*o*-メトキシアンフェタミンの分析、及び、 α -PVT を提供して頂き、有益なご助言を賜りました、大阪府警科学捜査研究所の関係者の方々に深謝いたします。

文献

- 1) 財津桂、片木宗弘、中西啓子、志摩典明、鎌田寛恵、鎌田徹、西岡裕、三木昭宏、辰野道昭、岩村樹憲、佐藤貴子、土橋均、鈴木廣一：違法ドラッグとして流通している合成カンナビノイド類の分析、日本法科学技術学会誌、**16**(2)、73-90(2011)
- 2) 内山奈穂子、河村麻衣子、花尻(木倉)瑠理、合田幸広：違法ドラッグ買い上げ製品の流通実態調査—合成カンナビノイドを中心に—、第 48 回全国衛生化学技術協議会年会講演集、284-285(2011)
- 3) 吉田正雄、鈴木仁、高橋美佐子、守安貴子、中嶋順一、金井千恵子、長嶋真知子、瀬戸隆子、清水雅子、濱野朋子、中江大：平成 22 年度指定薬物検出事例、東京都健康安全研究センター年報、**62**、107-114(2011)

[テキストを入力]

表1 平成23・24年度に買い上げた違法ドラッグ

性状	買上時期			計
	2012年 3月	2012年 5-6月	2012年 12月	
液体	2	17	6	25
粉末		1	2	3
植物片			4	4
計	2	18	12	32

表2 平成23・24年度の違法ドラッグ買上調査の結果

	買上時期			備考		
	2012年 3月	2012年 5-6月	2012年 12月	知事指定薬物 に指定	大臣指定薬物 に指定	麻薬 に指定
麻薬						
α-PVP		8			2012/10/17	2013/01/30
MAM-2201			2		2012/10/17	2013/04/26
指定薬物						
4-メチルエトカチノン			1		2011/09/20	
Methoxetamine	1	5			2012/06/01	
3,4-ジメチルメトカチノン	1	3			2012/06/01	
XLR-11			1		2012/10/17	
AB-FUBINACA			1		2012/12/17	
5-IAI			1		2012/12/17	
EAM-2201			2		2013/02/20	
N-Ethylbuphedrone	1	1	2	2013/03/08	2013/04/30	
α-PBP	1		1	2013/03/08	2013/04/30	
Pentdrone		2	2	2013/03/08	2013/04/30	
Pentylone		3		2013/03/08	2013/04/30	
ADB-FUBINACA			1		2013/04/30	
ADBICA			1		2013/04/30	
QUPIC			1		2013/04/30	
α-PVT			3		2013/04/30	
4-Methylbuphedrone		1	2		2013/04/30	
類似体及び医薬品成分						
o-メトキシアンフェタミン			1	p-メトキシアンフェタミン（麻薬）の類似体		
リドカイン		1		通例、局所麻酔薬として用いられる。		

[テキストを入力]

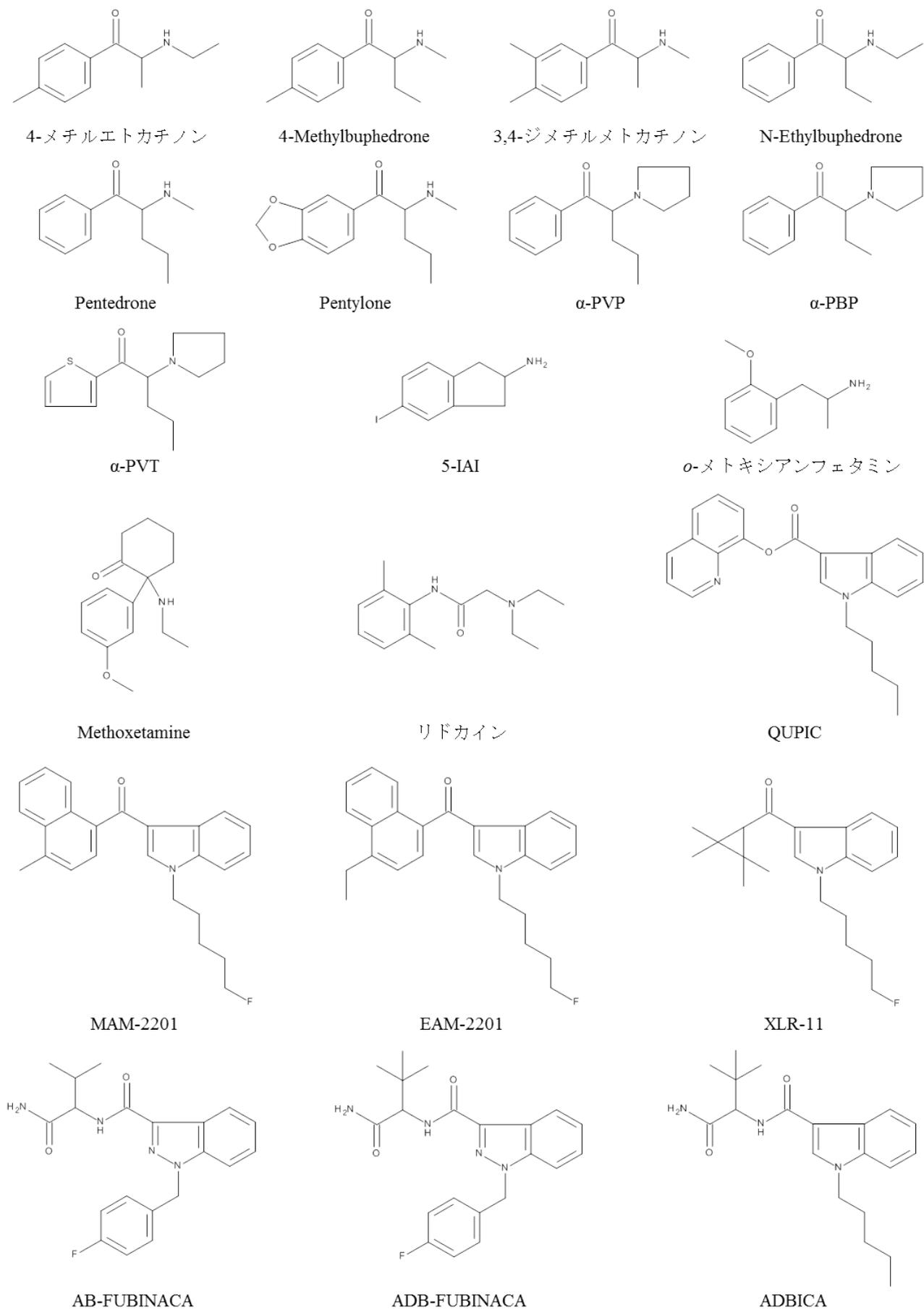


図1 平成23・24年度に検出した指定薬物及び類似体の構造式

大阪府内の7市の薬局における残薬に関するアンケート調査

岡村俊男*1 味村真弓*2

大阪府内7市の薬局を対象として残薬に関するアンケート調査を行った。業務形態については処方箋薬とOTC薬のみならず、食品や雑品などを販売している薬局が半数以上を占めた。医薬品等の廃棄に対する意識調査の結果から、医薬品類による環境汚染について、半数の人は知っているものの、まだまだ医薬品類による環境汚染についての認識が低いことがわかった。又、患者に対しての残薬の廃棄方法の指導を行っているのは半数以下で、麻薬などの法律で規定されているもののみ指導しているという回答であった。

キーワード：アンケート調査、医薬品、薬局、残薬

： questionnaire survey, medicine, drugstore, drug residue

日本各地の河川水等において、医薬品類の検出例が多く報告されており、大阪府内の水道水源河川等からも検出されている。^{1,2)}これらの医薬品類は代謝産物も含め微量で生理活性を示すことから、野生生物への生体影響が懸念されている。又、薬剤耐性菌についても、環境水中から検出されるようになり、大きな社会問題となっている。アメリカでは、環境水だけでなく河川に生息する魚が、微量の薬剤および化学物質に汚染されていることがUSEPA（米国環境保護庁）や大学の研究者らにより報告されている。³⁾既に、欧米では新薬申請時に、環境生物への影響評価資料の添付が義務づけられている。さらにアメリカでは処方医薬品の廃棄法がガイドラインとして示されている。⁴⁾しかし、日本の薬事法では医薬品による環境影響に関しては規則が設けられていないが、麻薬についてのみ不正利用防止の観点から廃棄方法が法律で規制されている。生理活性物質である医薬品類は、微量でもヒトに限らず生態系に何らかの影響を及ぼすことが懸念されることから早急な削減対策が必要と考える。

環境水から検出される特定の医薬品類の排出源としては、畜産、魚の養殖等に用いる動物用医薬品由来が

多いと考えられる。畜産に関しては、畜産関係の研究機関で家畜堆肥中の動物用医薬品による環境影響とその対策について検討されている。⁵⁻⁸⁾又、人に投与される医薬品は未変化体や代謝物として環境に排出される。さらに薬局や医薬品製造所からも環境に排出されることが考えられる。今回は薬局を対象として医薬品廃棄等に対する意識と、残薬量や容器・包装の処理方法の実態調査を行った。

実験方法

1. 調査方法

選択式で複数回答可能としたアンケートを作成し、郵送で実施した。薬局の業務の実態、環境中に廃棄される医薬品による環境への影響の意識調査、薬局の残薬管理、廃棄方法及び容器・包装の廃棄方法などに関するアンケートを行った。表にアンケートの例を示した。なお内容で個人を特定できないような無記名調査とした。

2. 調査期間

2009年11月20日から2010年12月22日まで調査を行った。

3. 対象

大阪府HPに薬局機能情報提供制度として掲載されている吹田市、豊中市、岸和田市、箕面市、池田市、

*1 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部薬事指導課

*2 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部生活環境課

高槻市、摂津市の7市のすべての薬局を対象としてアンケート調査を行った。

結果

吹田市 114、豊中市 142、岸和田市 68、箕面市 50、池田市 43、高槻市 126、摂津市 26、合計 569 事業所にアンケートを実施した。その結果、569 件中 326 件より回答（回収率は 57.3%）が得られた。以下に主な質問に対する回答を示す。

問 1. 薬局の業務内容について

「薬局の業務内容についてお答え下さい」の質問に対し全市における 323 回答（回答として無効なものは除く、以下同じ）が得られた。「処方せん応需のみ」は 41 件（12.7%）、「処方せん応需と OTC 薬（一般用医薬品）のみ販売」は 53 件（16.4%）、「処方せん応需と OTC

薬なども合わせて販売」は 221 件（68.4%）、「処方せん調剤は行っておらず OTC 薬などを販売」は 8 件（2.5%）であった。（図 1）7 市いずれにおいても「処方せん応需と OTC 薬なども合わせて販売」が一番多かった。

問 2. 河川水や水道水から医薬品等成分が検出されていることに関する認識度について

「最近、新聞等で『河川水や水道水から医薬品等の成分が検出されている。』という報道がされていますが、ご存じですか」と質問した結果、全市における 326 件の回答中、「はい」は 170 件（52.1%）「いいえ」は 156 件（47.9%）であった。「はい」の回答の中で知っているし、問題があると考えている人は 129 件であった。（図 2）報道内容を知っている人の大半は問題があると考えているという結果であった。つまり医薬品類による環境汚染について半数の人は知っており、その中の大半の人は問題があると認識している結果になった。

表 アンケート調査の例

質問	薬局の業務内容についてお答え下さい。
回答	a 処方せん応需のみ b 処方せん応需とOTC薬のみ販売 c 処方せん応需とOTC薬なども合わせて販売 d 処方せん調剤は行っておらず、OTC薬などを販売 e その他
質問	最近新聞等で「河川水や水道水から医薬品等の成分が検出されている」という報道がされていますが、ご存じですか。
回答	a はい b いいえ
質問	医薬品の直接の包装(PTPシート等)の廃棄はどのような方法でされていますか。(複数回答可)
回答	a 燃えるゴミとして廃棄する b プラスチックゴミとして廃棄する c 業者などに引き取ってもらう d その他 ()

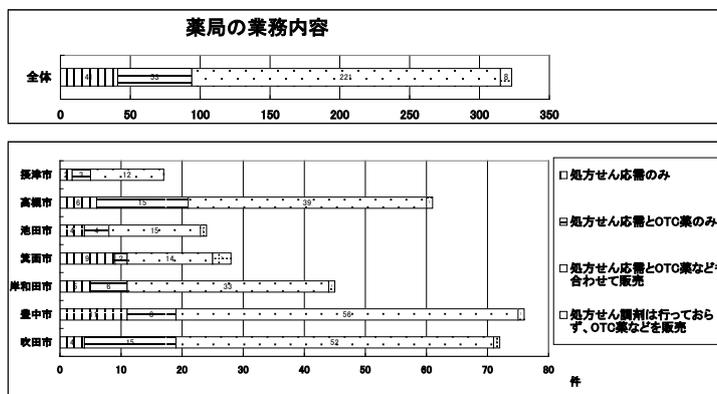


図 1 薬局の業務内容について

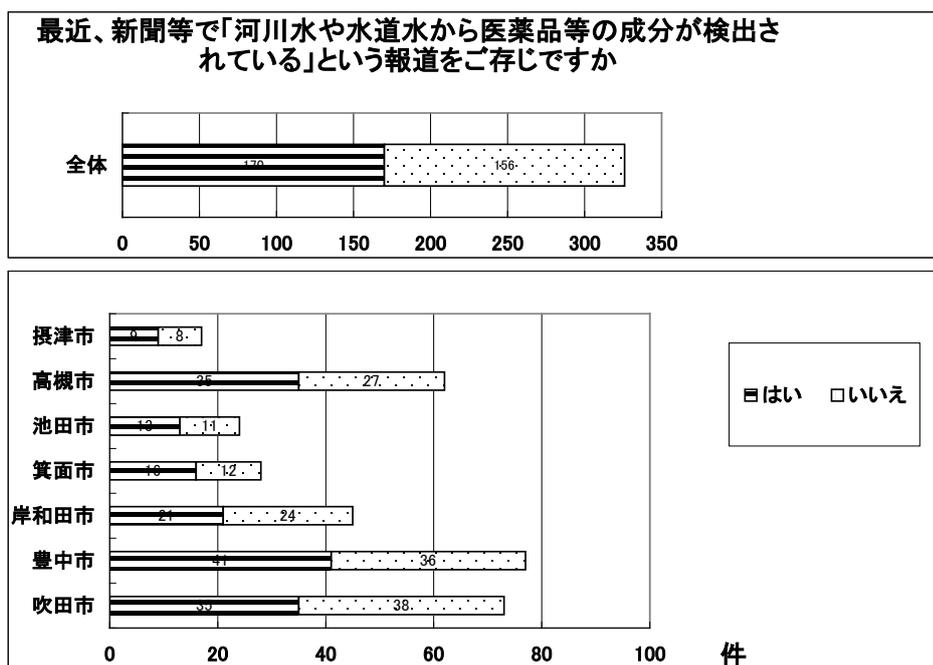


図2 河川水や水道水から医薬品等成分が検出されていることに関する認識度について

問3. 残薬の処理法について

「期限切れ医薬品、予調製した残薬、患者さんに処方後の残薬をどのような方法で処理されますか」と質問した結果、全市における321件の回答中（複数回答可能）、「燃えるゴミとして廃棄する」は192件（59.8%）、「水やエタノールなどに溶かして下水に流す」は186件（57.9%）、「業者などに引き取ってもらう」は158件（49.2%）、「予調製はほとんどしないようにしている」は80件（24.9%）、「残薬はほとんど出ない」は45件（14.0%）、「期限切れ医薬品はほとんど出ない」は29件（9.0%）であった。（図3）残薬の処理は燃えるゴミとして廃棄するのが一番多かった。下水に流すという回答が186件であり、大半が液剤であった。下水に廃棄する薬効群としては呼吸器管薬、中枢神経薬、アレルギー薬などが多かった。

問4. 直接の包装の廃棄について

「医薬品の直接の包装（PTPシート等）の廃棄はどのような方法でされていますか」と質問した結果、全市における341件の回答中（複数回答可能）、「燃えるゴミとして廃棄する」は144件（42.2%）、「プラスチック

ゴミとして廃棄する」は34件（10.0%）、「業者などに引き取ってもらう」は156件（45.8%）、「その他」は7件（2.1%）で（図4）、直接の包装の処理は燃えるゴミとして廃棄するのが一番多かった。

問5. 患者さんへの残薬等の廃棄法の指導について

「患者さんに残薬等の廃棄法について指導されていますか」と質問した結果、全市における321件の回答中、「はい」は117件（36.5%）、「いいえ」は204件（63.6%）であった。各市いずれにおいても「いいえ」の回答数が上回っていた。（図5）「はい」と回答した中で86件（73.5%）は「麻薬、毒物・劇物等法律に規定されているもののみ指導している」との回答であった。

次に「患者さんから残薬等の廃棄法について質問されたことがありますか」と質問した結果、全市における325件の回答中、「質問されたことがない」が188件（57.8%）で半数以上を占め、「質問されて困った」が87件（26.8%）であった。

「法律で廃棄法が示されている麻薬、毒劇物以外の処方医薬品、一般医薬品の廃棄法についてのルール化が必要と思われますか」と質問した結果、全市における

314 件の回答中、269 件(85.7%)が「はい」と答えている。又、「法律で廃棄法が示されている麻薬、毒劇物以外の処方医薬品、一般医薬品の廃棄法について資料及び情報をお持ちですか」と質問した結果、全市における 324 件の回答中、290 件(89.5%)が「いいえ」であった。さらに「どのような資料があれば役立ちますか」と質問した結果、全市における 319 件の回答(複数回答を含む)中 304 件(95.3%)が「具体的な廃棄法を記載した資料」、109 件(34.2%)が「毒性資料」であった。「国やメーカーの HP で情報提供されればその情報を利用

されますか」と質問した結果、全市における 322 件の回答中、「はい」が 304 件(94.7%)で大半であった。又、「情報提供されるならばどのような形態が利用しやすいですか」と質問した結果、全市における 320 件の回答(複数回答を含む)中 199 件(62.2%)が「個別に容器包装に記載する」、153 件(47.8%)が「厚生労働省等、国の機関でまとめて HP 等で報告する」、134 件(41.9%)が「各製品の製造メーカーでパンフレット、HP 等で情報提供する」であった。

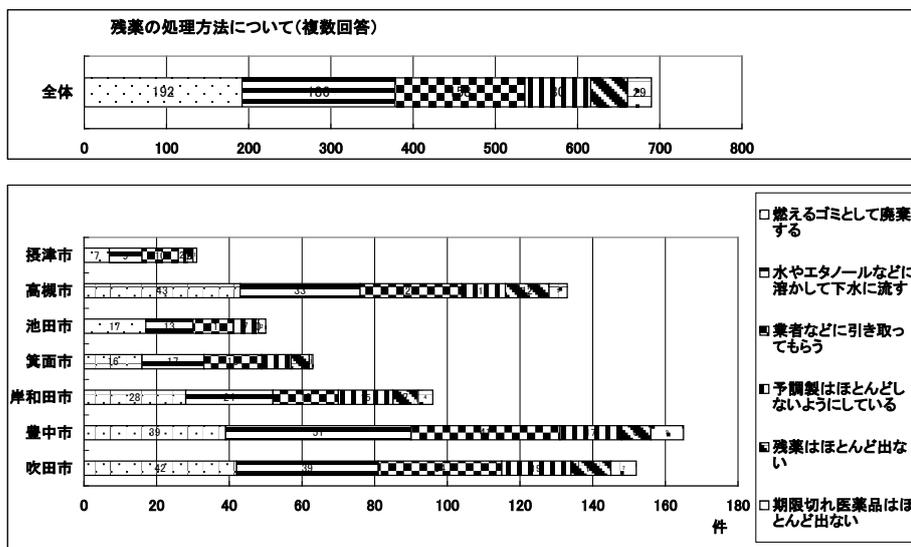


図 3 残薬の処理方法について

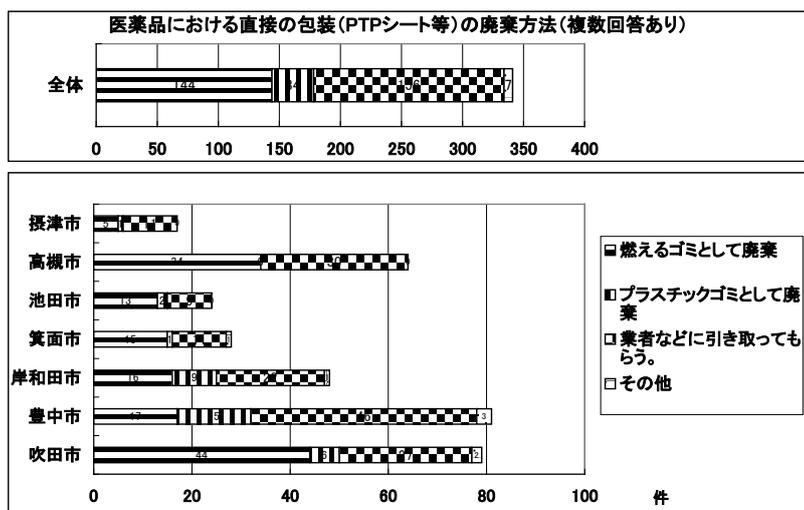


図 4 直接の包装の廃棄について

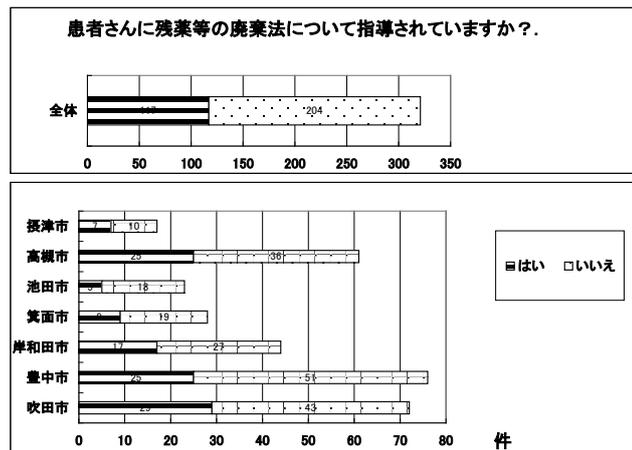


図5 患者さんへの残薬等の廃棄法の指導について

考察

医薬品はその薬理作用により人や家畜に利益をもたらすものである。又、過去に問題となった環境汚染物質と比べて代替が困難で使用を禁止することもできない。そのため、医薬品類による水環境汚染は消滅することはないと考えられる。今後、継続した水環境中の医薬品汚染がもたらすリスク評価と対処法の研究の進展がのぞまれる。

今回のアンケート調査結果から、医薬品等の廃棄に関する意識として医薬品類による環境汚染について半数の人は知っているものの、まだまだ認識が低いことがわかった。又、患者に対しての残薬の廃棄方法の指導を行っているのは半数以下で、麻薬などの法律で規定されているもののみ指導しているという回答であった。なお残薬の廃棄法に関して情報提供を求める声が多かった。さらに薬局内での残薬の処理法は燃えるゴミとして廃棄業者などによる引き取り、残薬が出ないような取り組みが大部分であり、残薬を下水に廃棄すると答えた薬局は半数程度でほとんど液剤であった。

一方、使用者のとりくみ例として横浜市の薬局で行われている医療廃棄物回収システム事業（在宅の使用済み注射針や不用医薬品の回収）がある。このような活動が全国の薬局に広まるとともに医薬品を使用する産業、企業、病院、家庭でそれぞれがとりくめることを実践することにより、効果的に医薬品廃棄の削減をはかるシステムをつくる必要がある。安齋⁹⁾ら

が主張するように一般向けの啓発活動を行い、医薬品あるいは医薬品使用における環境影響への意識の向上を促進することが必要であると考えられる。

謝辞

アンケート調査を行うにあたり、支援して頂いた大阪府薬剤師会及び大阪府健康医療部と泉保健所衛生課松田岳彦課長に深謝いたします。本研究は、ファルマ・フロンティア基金事業により実施したものです。

文献

- 1) 山本敦子, 益永茂樹: 水環境における医薬品類の挙動に関する研究の最新動向, 水環境学会誌, 29(4), 186-189 (2006)
- 2) 杉下寛樹, 山下尚之, 田中宏明, 田中周平, 藤井滋穂, 宝輪 勲, 小西千絵: 淀川流域の下水処理場放流水と支川における医薬品の存在実態, 環境工学研究論文集, 44, 307-312 (2007)
- 3) Ramirez, AJ., Brain, RA., Usenko, S., Mottaleb, MA., O'Donnell, JG., Stahl, LL., Wathen, JB., Snyder, BD., Pitt, JL., Perez-Hurtado, P., Dobbins, LL., Brooks, BW., Chambliss CK.: Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *o o o m*, 28(12),

2587-97 (2009)

4) FDA Consumer Health Information. “How to Dispose of unused medicines”

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/>

[ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/UnderstandingOver-the-CounterMedicines/ucm107163.](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/UnderstandingOver-the-CounterMedicines/ucm107163.pdf)

pdf (accessed 2013-06-24)

5) 内田一成, 井上美紀, 中川潤子, 五十嵐 優, 小林 久, 高橋京子, 青木葉一, 平山紀夫: 家畜排泄物中動物用医薬品の堆肥化過程での消長及び作物への移行について, 日本薬学会第 129 年会講演要旨集, (2009)

6) 薄井典子, 大原匡人, 伴瀬恭平, 奥村悦子, 宇野明子, 青木葉一, 伊藤義彦, 平山紀夫: 堆肥化過程における動物用医薬品の消長に関する研究～牛・豚糞による堆肥化実験モデルによる減衰実験, 日本薬学会第 130 年会講演要旨集, (2010)

7) 薄井典子: 動物用医薬品は家畜排泄物中に残留するか? 薬は正しく使おう, デーリィ・ジャパン, 55(13), 81-87(2010)

8) 薄井典子: 動物用医薬品の環境中への残留を考える, 養豚界, 7, 60-63(2010)

9) 安齋享征, 佐藤哲男: 医薬品の環境リスクアセスメントー医療従事者が知っておくべき医薬品の環境リスクー, 臨床薬理, 41, 59-65 (2010)

大阪府における環境および食品中放射能調査

(平成24年度報告)

東 恵美子* 肥塚 利江*
足立 伸一*

平成24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及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β放射能測定、環境試料及び各種食品試料中のγ線放出核種分析、空間放射線量率について実施した。なお、本年度より、空間放射線量率は、福島第1原子力発電所の事故を受け、府下に5基のモニタリングポスト(MP)を増設し、既存とあわせ、計6基で行っている。

また、平成22年度より行っている福島第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行った。さらに、平成25年2月12日に北朝鮮が3回目となる地下核実験を行ったことを受け、当日から2月21日まで文部科学省の指示によりモニタリングの強化を行った。

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

: 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 (¹³⁴Cs), セシウム137 (¹³⁷Cs), ヨウ素131 (¹³¹I), カリウム40 (⁴⁰K) 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。モニタリングポストに関しては、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、ポストを大阪府内5ヶ所(茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、

泉佐野市)に新たに設置し、大阪市を加えた6ヶ所の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、モニタリング強化として、平日に上水(蛇口水)を採取し3ヶ月間貯水した上水のガンマ線核種分析、毎月第2週の水曜日に行う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。

また、平成25年2月12日に北朝鮮が地下核実験を行ったことによる大阪府内への影響の有無を調査するため、当日から2月21日までモニタリングの強化を行い、連日、降下物(定時降下物)および大気浮遊じんのガンマ線核種分析を行った。

本報告では、平成24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。

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

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	81	
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24年6月)	1	
	海水	蛇口水	大阪市東成区 当所本館1F	年1回(平成24年6月)	1	
	海底土	表面水	大阪港入口	年1回(平成24年7月)	1	
	土壌	表層	大阪港入口	年1回(平成24年7月)	1	
		0~5cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成24年7月)	1	
		5~20cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(平成24年7月)	1	
	牛乳	原乳(生産地)	大阪府羽曳野市	年1回(平成24年12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24年7月)	1	
	相互比較分析試料		キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(平成25年2月)	1
			模擬牛乳	(財)日本分析センターで調製	年1回(平成24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24年9月)	1
	寒天	(財)日本分析センターで調製	年1回(平成24年9月)	5		
モニタリング強化 (北朝鮮核実験)	大気浮遊じん		大阪市東成区 当所屋上	平成25年2月12日から21日まで	9	
	降下物	雨水・ちり	大阪市東成区 当所屋上	平成25年2月12日から21日まで	9	
モニタリング強化 (福島第1原発事故)	上水	蛇口水 (3ヶ月)	大阪市東成区 当所本館1F	3ヶ月毎	4	
	モニタリングポスト		大阪市東成区 当所屋上 茨木市大住町 茨木保健所 寝屋川市八坂町 寝屋川保健所 東大阪市西岩田 東大阪市環境衛生検査センター 富田林市寿町 富田林保健所 泉佐野市羽倉崎 市立佐野中学校	毎日/年間 毎日/年間 毎日/年間 毎日/年間 毎日/年間 毎日/年間	365 365 365 365 365 365	
空間線量率	モニタリングポスト		大阪市東成区 当所中庭	毎月	12	

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24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。

全ベータ放射能測定

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、平成25年2月12日から21日までは、北朝鮮の核実験による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。

測定方法

試料100mLにヨウ素担体(1mg I⁻/mL)1mL、0.1mol/L硝酸銀1mL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。

核種分析

測定試料

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。

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

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）。

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）。

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）。

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（ δ ）から δ 数を算出し、 $|\delta| \leq 1$ を基準値内（基準値と一致）とした。なお、 δ 数は下記の式により求められる。

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

測定方法

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

行った。

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既設のポスト（地上約 20m）に加え、平成 23 年 3 月に発生した福島第 1 原子力発電所の事故を受け、増設された 5 基（茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、泉佐野市：地上 1m）において、連続測定を行った（設置場所は表 1 を参照）。

なお、当所観測室屋上に設置したモニタリングポストを加えた 6 基の測定結果は、自動測定・配信システムにより文部科学省（平成 25 年度より原子力規制委員会）のホームページでリアルタイムで公表されている。

福島第 1 原子力発電所の事故によるモニタリング強化

ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析 測定試料

上水（蛇口水）：平成 24 年 1 月以降、平日毎に当所本館 1 階実験室内蛇口から採水した上水 1.5L 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。

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 80000 秒とした。

サーベイメータによる空間放射線量率調査

平成 24 年 1 月以降、毎月第 2 週の水曜日の午前 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-171B 型）で空間放射線量率を測定した。測定は、「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。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。

北朝鮮核実験によるモニタリング強化

平成 25 年 2 月 12 日に北朝鮮が地下核実験を行ったことを受け、文部科学省から「国外における原子力関係事象発生時の対応について」の協力依頼があり、当日から 2 月 21 日までモニタリングの強化を行い、連日、降下物（定時降下物）および大気浮遊じんのガンマ線核種分析を行った。

ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析

測定試料

降下物（定時降下物）

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、測定試料とした。

大気浮遊じん

上記の大気浮遊じんと同様の方法 [2-1(1)参照] で前日 9 時から当日 9 時までの 24 時間捕集を行った。1 日分のろ紙試料を円形（直径 50mm）に切り取り、U-8 容器に詰め、測定試料とした。

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 10 時までに、大気浮遊じんデータは 17 時までに文部科学省へ報告した。

結果および考察

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、81 試料中 8 例から検出されたが、異常値は検出されなかった。

核種分析

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

C および C : 今年度も例年同様、¹³⁷Cs 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。¹³⁴Cs は、どの試料からも検出されなかった。

I : ¹³¹I は、上水原水試料から微量（1.4mBq/L）検出された。他の環境試料および食品試料からは検出

表 2 降水中全ベータ放射能測定結果

年月	降水量 mm	件数 (検出数)	濃度 Bq/L	月間降下量 MBq/km ²
平成24年 4月	109	12 (2)	ND~1.11	6.53
平成24年 5月	25	6 (0)	ND	ND
平成24年 6月	276	8 (0)	ND	ND
平成24年 7月	201	9 (1)	ND~0.35	5.54
平成24年 8月	145	7 (1)	ND~0.48	19.49
平成24年 9月	129	8 (2)	ND~0.36	12.6
平成24年10月	148	7 (0)	ND	ND
平成24年11月	120	7 (1)	ND~0.34	0.37
平成24年12月	52	4 (0)	ND	ND
平成25年 1月	77	3 (0)	ND	ND
平成25年 2月	98	4 (0)	ND	ND
平成25年 3月	93	6 (1)	ND~0.72	3.23
平成24年度	1473	81 (8)	ND~1.11	47.8
過去3年間の値				
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
平成23年度 ¹⁾	1637	17(2)	ND~0.51	17.1

ND: 計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

1): モニタリング強化のため、平成23年4月~12月まで休止した。

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、既報³⁾に述べたように、その起源は医学利用によるものであろうと推定される。

上水中に存在する ¹³¹I による府民への健康影響については、既報³⁾でも論じたように、そのレベルは「飲食物の摂取制限に関する指標⁴⁾」（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。

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。

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 4-1 から表 4-6 に示す。

表 4-1 に示す大阪市の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 41~71 nGy/h の範囲で、平常値の範囲であり、過去 3 年間の結果と同程度であった。

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24年 4月～5月	H24.4.4 ～ H24.5.11	mBq/m ³	ND	ND	ND	0.24±0.039
7月～9月	H24.7.2 ～ H24.9.20	〃	ND	ND	ND	0.22±0.033
10月～12月	H24.10.9 ～ H24.12.18	〃	ND	ND	ND	0.22±0.035
平成25年 1月～3月	H25.1.7 ～ H25.3.20	〃	ND	ND	ND	0.23±0.034
平成24年度		mBq/m ³	ND	ND	ND	0.22～0.24
過去3年間の値		mBq/m ³	ND～0.63	ND～0.68	ND～0.016	ND～0.32
降下物						
平成24年4月	H24.3.30 ～ H24.5.1	MBq/km ²	ND	ND	ND	0.73±0.20
平成24年5月	H24.5.1 ～ H24.6.1	〃	ND	ND	ND	0.96±0.21
平成24年6月	H24.6.1 ～ H24.7.2	〃	ND	ND	ND	ND
平成24年7月	H24.7.2 ～ H24.8.1	〃	ND	ND	ND	ND
平成24年8月	H24.8.1 ～ H24.8.31	〃	ND	ND	ND	ND
平成24年9月	H24.8.31 ～ H24.10.2	〃	ND	ND	ND	ND
平成24年10月	H24.10.2 ～ H24.11.1	〃	ND	ND	ND	ND
平成24年11月	H24.11.1 ～ H24.12.3	〃	ND	ND	ND	ND
平成24年12月	H24.12.3 ～ H25.1.4	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年1月	H25.1.4 ～ H25.2.1	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年2月	H25.2.1 ～ H25.3.1	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年3月	H25.3.1 ～ H25.4.1	〃	ND	ND	ND	0.81±0.19
平成24年度		MBq/km ²	ND	ND	ND	ND～0.96
過去3年間の値		MBq/km ²	ND～8.3	ND～7.9	ND	ND～1.9
上水・原水	H24.6.14	mBq/L	ND	ND	1.4±0.11	76±2.5
過去3年間の値		mBq/L	ND～0.33	ND～0.23	0.38～1.0	70～92
上水・蛇口水	H24.6.20	mBq/L	ND	ND	ND	76±2.5
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND～0.42	60～85
上水・蛇口水(モニタリング強化)						
平成24年 4～6月	H24.4.2 ～ H24.6.29	mBq/L	ND	ND	ND	64±2.4
7～9月	H24.7.2 ～ H24.9.28	mBq/L	ND	ND	ND	73±2.5
10～12月	H24.10.1 ～ H24.12.28	mBq/L	ND	ND	ND	73±2.6
平成25年 1～3月	H25.1.4 ～ H25.3.29	mBq/L	ND	ND	ND	66±2.5
平成24年度		mBq/L	ND	ND	ND	64～73
海水	H24.7.10	Bq/L	ND	ND	ND	3.8±0.35
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	4.0～5.4
海底土	H24.7.10	Bq/kg dry	ND	2.2±0.29	ND	620±11
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	2.0～2.4	ND	620～670
土壌	H24.7.31	Bq/kg dry	ND	1.3±0.18	ND	670±9.7
0～5cm層		(MBq/km ²)	(ND)	(62±8.6)	(ND)	(32000±460)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	0.83～1.0	ND	680～770
		(MBq/km ²)	(ND)	(46～49)	(ND)	(34000～40000)
土壌	H24.7.31	Bq/kg dry	ND	3.0±0.23	ND	660±9.9
5～20cm層		(MBq/km ²)	(ND)	(520±39)	(ND)	(110000±1700)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	2.7～3.1	ND	670～730
		(MBq/km ²)	(ND)	(450～470)	(ND)	(110000～130000)
牛乳 原乳	H24.12.25	Bq/L	ND	ND	ND	49±0.94
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	47～49
農産物						
タマネギ	H24.7.12	Bq/kg生	ND	ND	ND	41±0.32
キャベツ	H25.1.31	〃	ND	ND	ND	72±0.47
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	42～81

ND:計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

表 4-1 モニタリングポストによる空間放射線量率
(大阪市 府立公衆衛生研究所:地上20m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h) (所在地:大阪市)		
		最高値	最低値	平均値
平成24年 4月	30	64	42	43
同 5月	31	58	41	43
同 6月	30	53	41	43
同 7月	31	63	41	43
同 8月	31	55	41	42
同 9月	30	52	41	43
同 10月	31	59	41	43
同 11月	30	62	42	44
同 12月	31	67	42	44
平成25年 1月	31	54	42	43
同 2月	28	71	42	44
同 3月	31	66	42	43
平成24年度	365	71	41	43
過去3年間の値				
平成21年度	365	63	40	43
平成22年度	365	61	40	43
平成23年度	366	66	41	43

表4-2 モニタリングポストによる空間放射線量率
(茨木市 茨城保健所:地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h)* (所在地:茨木市)		
		最高値	最低値	平均値
平成24年 4月	30	76	55	57
同 5月	31	80	55	58
同 6月	30	75	54	57
同 7月	31	82	54	57
同 8月	31	71	54	57
同 9月	30	68	55	58
同 10月	31	74	56	58
同 11月	30	79	56	58
同 12月	31	90	55	57
平成25年 1月	31	65	54	56
同 2月	28	93	54	57
同 3月	31	86	55	57
平成24年度	365	93	54	57

表4-3 モニタリングポストによる空間放射線量率
(寝屋川市 寝屋川保健所:地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h)* (所在地:寝屋川市)		
		最高値	最低値	平均値
平成24年 4月	30	95	71	73
同 5月	31	87	71	73
同 6月	30	86	71	73
同 7月	31	94	70	72
同 8月	31	84	70	72
同 9月	30	85	71	72
同 10月	31	90	71	73
同 11月	30	95	72	73
同 12月	31	105	71	73
平成25年 1月	31	85	71	73
同 2月	28	110	71	73
同 3月	31	102	71	73
平成24年度	365	110	70	73

表4-4 モニタリングポストによる空間放射線量率
(東大阪市 東大阪市環境衛生検査センター:地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h)* (所在地:東大阪市)		
		最高値	最低値	平均値
平成24年 4月	30	95	75	80
同 5月	31	97	78	80
同 6月	30	95	77	79
同 7月	31	104	76	79
同 8月	31	96	76	78
同 9月	30	90	76	78
同 10月	31	98	77	79
同 11月	30	105	77	79
同 12月	31	122	77	79
平成25年 1月	31	92	77	78
同 2月	28	120	77	79
同 3月	31	110	77	79
平成24年度	365	122	75	79

表 4-5 モニタリングポストによる空間放射線量率
(富田林市 富田林保健所:地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h)* (所在地:富田林市)		
		最高値	最低値	平均値
平成24年 4月	30	72	62	64
同 5月	31	74	62	64
同 6月	30	76	62	64
同 7月	31	83	61	63
同 8月	31	74	61	63
同 9月	30	72	61	63
同 10月	31	79	62	64
同 11月	30	80	62	64
同 12月	31	89	62	64
平成25年 1月	31	78	62	63
同 2月	28	89	62	64
同 3月	31	93	62	63
平成24年度	365	93	61	63

表 4-6 モニタリングポストによる空間放射線量率
(泉佐野市 佐野中学校:地上1m)

測定年月	測定回数	モニタリングポスト(nGy/h)* (所在地:泉佐野市)		
		最高値	最低値	平均値
平成24年 4月	30	59	49	51
同 5月	31	65	50	52
同 6月	30	63	49	51
同 7月	31	72	49	51
同 8月	31	65	50	52
同 9月	30	59	49	51
同 10月	31	80	49	51
同 11月	30	78	49	51
同 12月	31	94	49	51
平成25年 1月	31	61	49	50
同 2月	28	75	49	51
同 3月	31	79	49	51
平成24年度	365	94	49	51

表 5 サーベイメータによる空間放射線量率
(地上1m、当所中庭)

測定年月		サーベイメータ(nGy/h)	
		測定回数	測定値
平成24年	4月	1	81
同	5月	1	83
同	6月	1	79
同	7月	1	76
同	8月	1	81
同	9月	1	78
同	10月	1	72
同	11月	1	77
同	12月	1	78
平成25年	1月	1	80
同	2月	1	87
同	3月	1	74
平成24年度		12	79
過去の値 平成8～20年度		156	77～108(平均:92)

表 4-2 に示す茨木市の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 54～93 nGy/h の範囲であった。

表 4-3 に示す寝屋川市の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、70～110 nGy/h の範囲であった。

表 4-4 に示す東大阪市の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、75～122 nGy/h の範囲であった。

表 4-5 に示す富田林市の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、61～93 nGy/h の範囲であった。

表 4-6 に示す泉佐野市の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、49～94 nGy/h の範囲であった。

福島第 1 原子力発電所の事故によるモニタリング強化

ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析

平日に上水(蛇口水)を採取し 3 ヶ月間貯水して測定した結果を表 3 の中に示した。

3 ヶ月貯水した蛇口水からは、人工放射性核種は検出されなかった。

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 5 に示す。

当所中庭での値は、測定期間中 72～87nGy/h 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。

北朝鮮核実験によるモニタリング強化

ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析

ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析の結果、モニタリングの強化期間中、降下物(定時降下物)および大気浮遊じんから人工放射性核種は検出されなかった。

なお、2 月 12 日から 21 日まで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変動は、大阪市 42～71nGy/h、茨木市 54～93 nGy/h、寝屋川市 71～110 nGy/h、東大阪市 77～120 nGy/h、富田林市 62～89 nGy/h、泉佐野市 49～75 nGy/h の範囲であり、その他の期間に比べて特に高い値はなく、平常値の範囲内であった。

ま と め

核種分析により人工放射性核種である ^{131}I 及び ^{137}Cs が検出された。医学利用等に由来すると考えられる ^{131}I は上水(原水)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、そのレベルは低値であった。また、他の人工放射性核種はいずれの試料からも検出されなかった。空間放射線量率値にも異常値は検出されなかった。

福島第 1 原子力発電所事故によるモニタリング強化で実施された、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。

また、北朝鮮核実験時のモニタリング強化で実施された、ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析調査の結果でも異常値は認められず、大阪府内への影響は認められなかった。

謝 辞

本調査の遂行にあたり、調査試料の採取にご協力いただきました大阪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、大阪府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庁健康医療部環境衛生課の皆様には謝意を表します。また、北朝鮮核実験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致します。

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 24 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 24 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) 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 号，165-170 (1990)
- 4) 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 22 年 8 月改訂），5-3 (3)
- 5) 肥塚利江，東恵美子，大山正幸，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 23 年度報告），大阪府立公衛研所報，第 号，30-37 (2012)

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 (第2報)

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(界面活性剤)を鼻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報告した。今回、前回の実験で得られた結果の再現性を確認する実験を行い、病理組織学的検査(右肺、胸腺、脾臓、肝臓)に鼻を追加した。

その結果、前回の実験でコントロール群(「蒸留水群」、「界面活性剤群」と曝露群(「OVA群」、「界面活性剤+OVA群」)の間に有意差が見られた項目(左肺重量対体重比とOVA特異的IgG1濃度)に今回も有意差が見られたことから再現性のあることが確認された。しかし、これはOVAの吸入による生体への影響と考えられ、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、日本人の約2人に1人は何らかのアレルギー疾患に罹患していると報告¹⁾され、アレルギー疾患の増加が社会問題化している。急激に大きく変化している環境がその要因として重要ではないかと考えられている。環境要因には住環境の変化、室内空気の変化、スギなどの花粉の増加などが考えられるが、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²⁾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。

アレルギー疾患は多様性に富むが、これまでも石鹼やシャンプー、化粧品にアレルギーのある人が、石鹼などを使用した後に蕁麻疹や皮膚炎になるという現象はよく知られていた。しかし、2005年から2010年にかけて販売された「茶のしずく石鹼」を使用した人に、重いアレルギー症状が引き起こされる健康被害が社会問題となるまで、石鹼などにアレルギーのある人が食物アレルギーに関係するということは余り知られていなかった⁴⁾。

石鹼などの主成分は界面活性剤であり、皮膚などの

バリア機能を破壊しアレルギーが吸収されやすくなる可能性があることから、私達は、生活関連用品において広く使用されている界面活性剤に注目した。そして、アレルギー疾患にリスク要因としてどの程度関与しているのかを前回³⁾に引き続き検討することにした。

今回、病理組織学的検査に鼻を追加した。これは、鼻粘膜は粘膜下の毛細血管が豊富で物質の吸収性が高く、吸収された物質は直接全身循環血へ移行するため門脈系を経由しないと同時に呼吸器系への取りこみの入り口に当たる組織であることから、鼻への影響を確認することが必要であると考えたためによる。

実験方法

1. 試薬と器具

試薬と器具は、前回と同じものを用いた³⁾。

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。このことから、市販シャンプーの70%以上に使用されており配合率は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。

アレルギー: 卵白アルブミン(OVA)は、SIGMA製

*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 (II)

by Emiko AZUMA and Takae NAKAJIMA

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. 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31匹購入し、6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：吸入装置の構成を図1に示す。前回の実験に使用した吸入装置を用いた。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)を安全に除去するため、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。

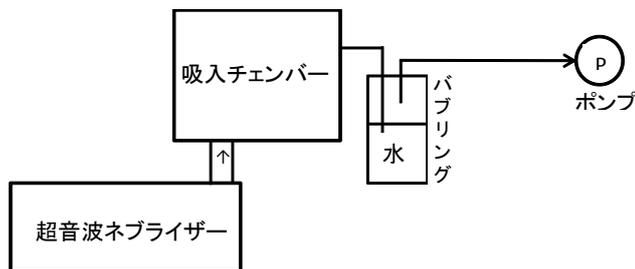


図1 吸入装置の構成

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100万倍希釈（ $\times 10^{-6}$ ）と10万倍希釈（ $\times 10^{-5}$ ）の2濃度とした。

実験群：蒸留水を吸入させる「蒸留水群」、 $\times 10^{-6}$ 界面活性剤を吸入させる「界面活性剤低濃度群」(L群)、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤を吸入させる「界面活性剤高濃度群」(H群)、1%OVAを吸入させる「OVA群」、 $\times 10^{-6}$ 界面活性剤と1%OVAを同時に吸入させる「界面活性剤低濃度+OVA群」(L+OVA群)、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤と1%OVAを同時に吸入させる「界面活性剤高濃度+OVA群」(H+OVA群)の6群で、1群5匹としたが、「H+OVA群」は6匹とした。

なお、今回用いた $\times 10^{-5}$ 界面活性剤の濃度は、前回

の実験で用いた界面活性剤の濃度と同じである。

感作と吸入の方法：7週齢で全マウスに10 μ g OVA/0.5ml 生理的食塩水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、 $\times 10^{-6}$ 界面活性剤、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤、1%OVA、 $\times 10^{-6}$ 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、左肺中 IL-4 濃度の測定：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、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の冷却したリン酸緩衝生理食塩水を加えて肺ホモジネートを作製した。これを遠心(2000 \times g、60分、4 $^{\circ}$ C)し、上清中のIL-4濃度をINSTRUCTIONS Mouse IL-4 ELISA Kit (Thermo SCIENTIFIC)で測定⁵⁾した。

血清中 OVA 特異的 IgE 濃度、OVA 特異的 IgG1 濃度の測定：OVA特異的IgE濃度は、anti-mouse IgE (PHARMINGEN R35-72)、biotinylated OVAを用い、PCAタイター $\times 320$ のマウスプール血清を標準としてELISA法で測定⁶⁾した。OVA特異的IgG1濃度は、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⁷⁾した。

臓器の病理組織学的観察：気管から右肺(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、気管とともに固定した。胸腺、脾臓、肝臓、頭部も10%中性緩衝ホルマリン液に入れ固定した。右肺、胸腺、脾臓、肝臓は、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。頭部は鼻を2か所の部位で切り出し⁸⁾た後にエタノール・クロロホルム混液で脱脂してから脱灰を行い、その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HE染色を行った。染色後に、光学顕微鏡で臓器の観察を行った。

実験のプロトコールを図2に示す。鼻は図3のAとBの部位で切り出した。切片をそれぞれ「鼻A」、「鼻

B) とする。

動物: BALB/cオスマウス

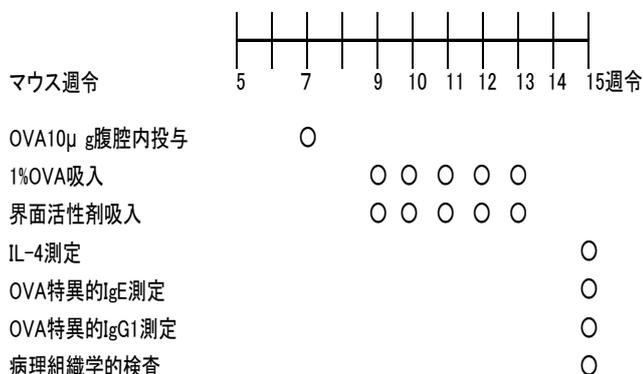


図2 実験のプロトコール

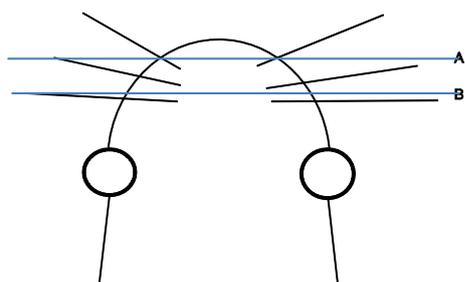


図3 鼻の切り出し部位

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」、「L群」、「H群」はそれぞれ「OVA群」と「L+OVA群」「H+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「L+OVA群」、「H+OVA群」の結果について主に比較した。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

OVAを投与してから8週間後におけるマウスの体重を図4に示す。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。

左肺重量対体重比を図5に示す。「OVA群」、「H+OVA群」の値が増加したことからそれぞれ「蒸留水群」、「H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。

胸腺重量対体重比を図6に示す。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。

脾臓重量対体重比を図7に示す。「蒸留水群」と「界面活性剤+OVA群」の間に有意な差が見られたが、「OVA群」と「界面活性剤+OVA群」との間に差は見られなかった。

肝臓重量対体重比を図8に示す。各コントロール群との間に差は見られなかったが、「OVA群」と「L+OVA群」の間に有意な差が見られた。

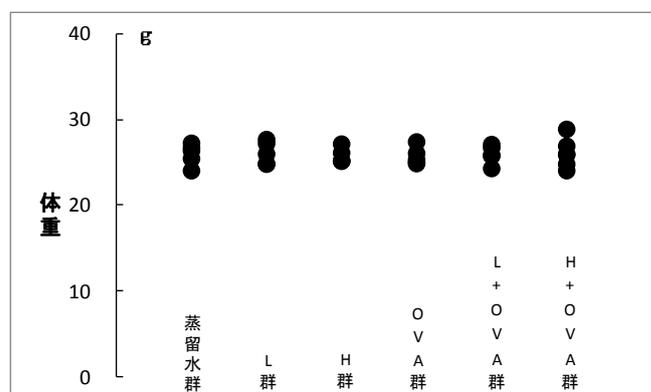
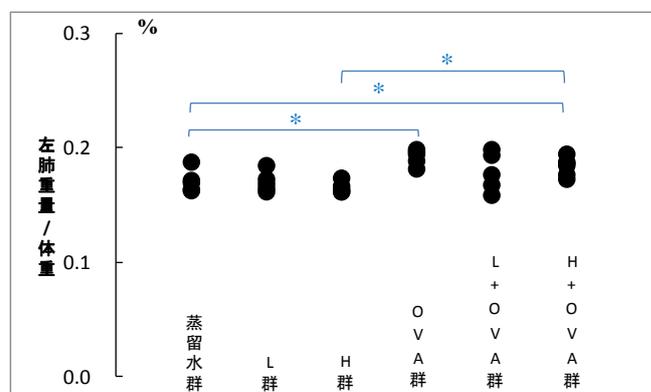


図4 体重の比較



*p<0.05

図5 左肺重量対体重比の比較

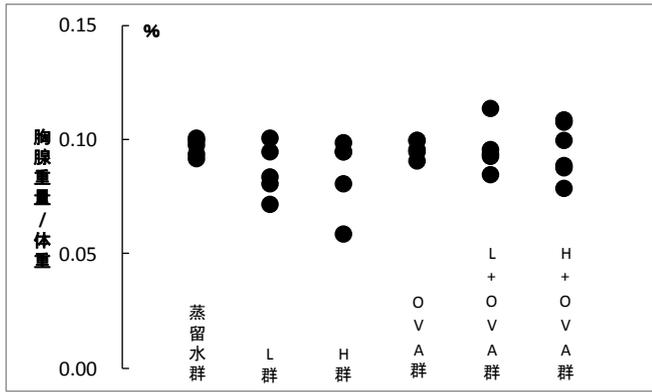


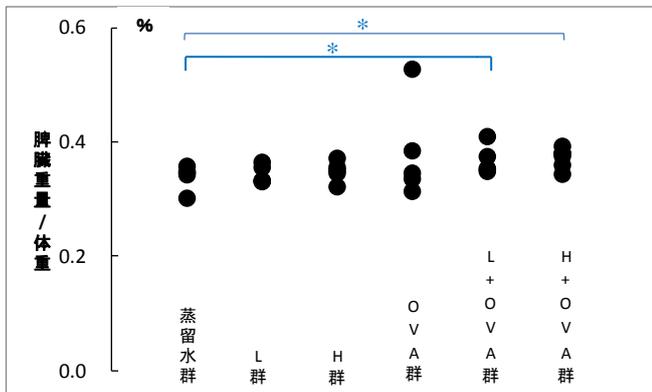
図 6 胸腺重量対体重比の比較

2. 左肺中 IL-4 濃度と血清中 OVA 特異的抗体濃度

IL-4 濃度 : 左肺ホモジナイズ上清中 IL-4 濃度を図 9 に示す。「L 群」と「OVA 群」の間に有意差が見られたが、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」との間に差は見られなかった。

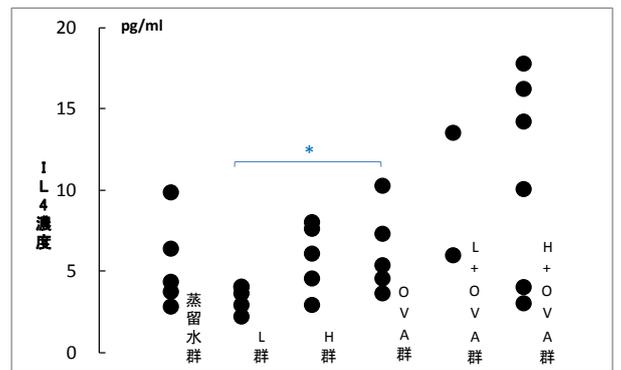
OVA 特異的 IgE 濃度と OVA 特異的 IgG1 濃度 : 血清中 OVA 特異的 IgE 濃度を図 10 に示す。縦軸は、陽性標準血清値を 100%とした場合の血清中 OVA 特異的 IgE 濃度である。「L 群」と「L+OVA 群」、「OVA 群」と「L+OVA 群」の間に有意差が見られた。

血清中 OVA 特異的 IgG1 濃度を図 11 に示す。「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」はそれぞれのコントロール群と比較して有意に高くなったが、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に差は見られなかった。



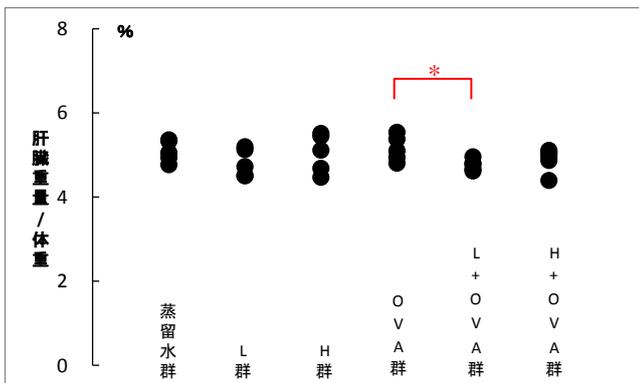
*p<0.05

図 7 脾臓重量対体重比の比較



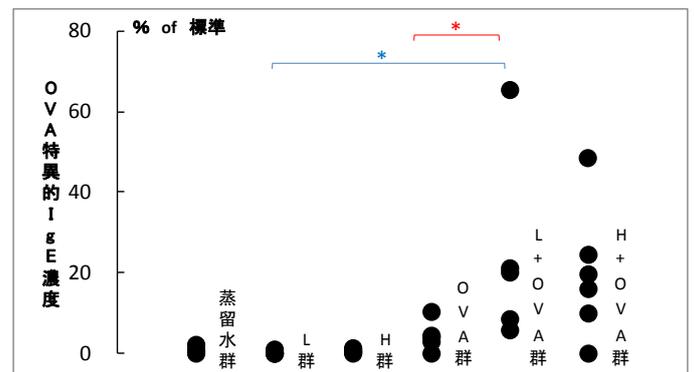
*p<0.05

図 9 左肺ホモジナイズ上清中 IL-4 濃度の比較



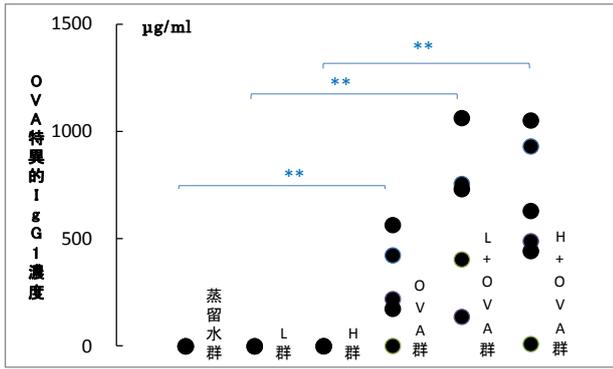
*p<0.05

図 8 肝臓重量対体重比の比較



*p<0.05

図 10 血清中 OVA 特異的 IgE 濃度の比較



**p<0.01

図 11 血清中 OVA 特異的 IgG1 濃度の比較

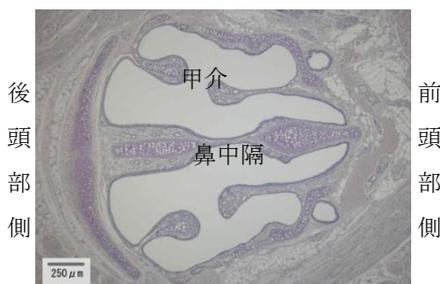
3. 病理組織学的検査

鼻：鼻 A の組織像を図 12 に示す。鼻腔は鼻中隔で左右に分かれており、側面からは甲介が突き出ているのが見られる。「蒸留水群」、「界面活性剤群」の鼻 A を図 13 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の鼻 A を図 14 に示す。鼻 B の組織像を図 15 に示す。ここでは、呼吸粘膜（多列線毛上皮細胞）が見られる。「蒸留水群」、「界面活性剤群」の鼻 B を図 16 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の鼻 B を図 17 に示す。

「蒸留水群」と「界面活性剤群」、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の 6 群のマウスの鼻 A、鼻 B の病理組織学的所見に差は見られなかった。

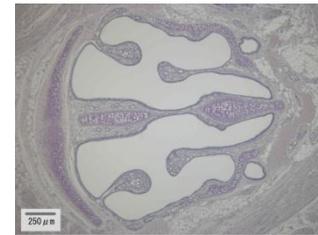
右肺：「蒸留水群」、「界面活性剤群」の肺気管支を図 18 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の肺気管支を図 19 に、「蒸留水群」、「界面活性剤群」の肺胞道を図 20 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の肺胞道を図 21 に、「蒸留水群」、「界面活性剤群」の肺胞を図 22 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の肺胞を図 23 に示す。

「蒸留水群」と「界面活性剤群」、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の 6 群のマウスの肺気管支、肺胞道、肺胞の病理組織学的所見に差は見られなかった。

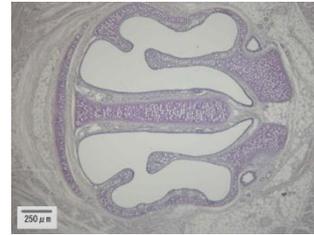


蒸留水群 HE 染色 ×40

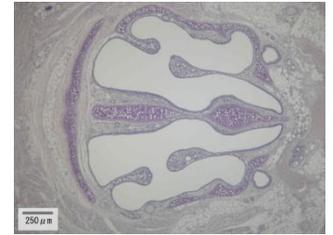
図 12 鼻 A の組織像



蒸留水群 HE 染色 ×40



L 群 HE 染色 ×40

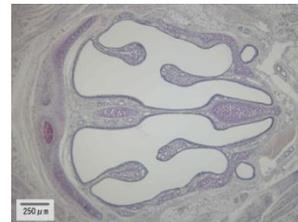


H 群 HE 染色 ×40

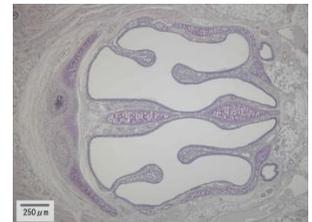
図 13 蒸留水群（上）、界面活性剤群（下左：L 群、下右：H 群）の鼻 A の光学顕微鏡写真



OVA 群 HE 染色 ×40

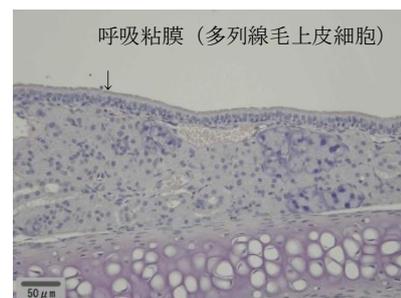


L+OVA 群 HE 染色 ×40



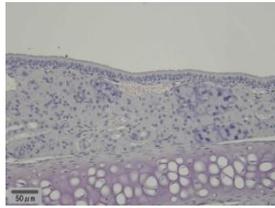
H+OVA 群 HE 染色 ×40

図 14 OVA 群（上）、界面活性剤+OVA 群（下左：L+OVA 群、下右：H+OVA 群）の鼻 A の光学顕微鏡写真

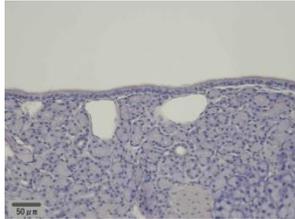


蒸留水群 HE 染色 ×200

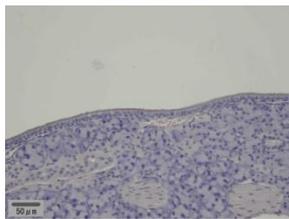
図 15 鼻 B の組織像



蒸留水群 HE 染色 ×200

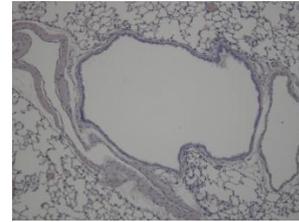


L 群 HE 染色 ×200

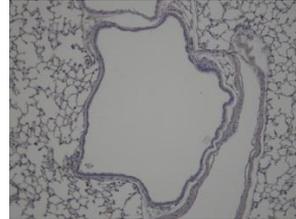


H 群 HE 染色 ×200

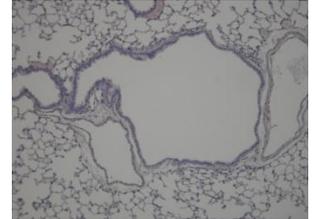
図 16 蒸留水群(上)、界面活性剤群 (下左 : L 群、下右 : H 群) の鼻 B の光学顕微鏡写真



蒸留水群 HE 染色 ×100

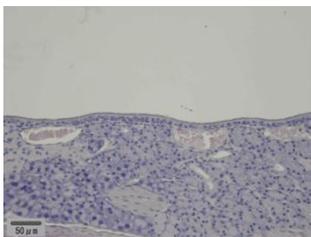


L 群 HE 染色 ×100

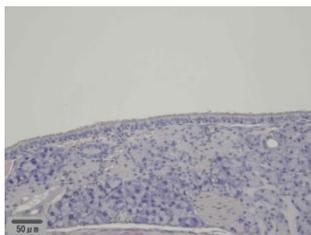


H 群 HE 染色 ×100

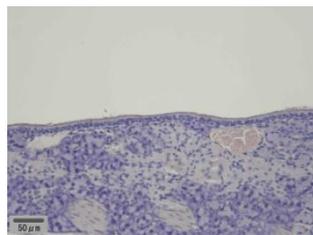
図 18 蒸留水群 (上)、界面活性剤群 (下左 : L 群、下右 : H 群) の肺気管支の光学顕微鏡写真



OVA 群 HE 染色 ×200

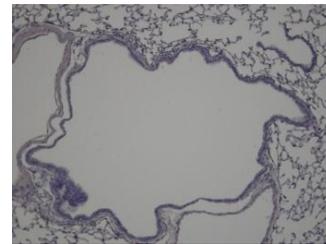


L+OVA 群 HE 染色 ×200

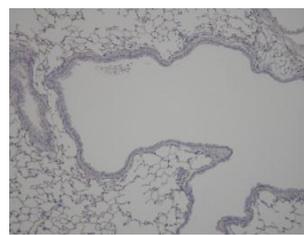


H+OVA 群 HE 染色 ×200

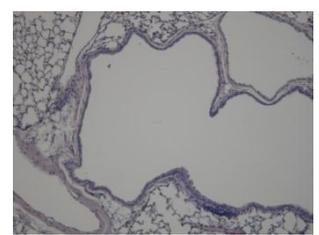
図 17 OVA 群(上)、界面活性剤+OVA 群(下左:L+OVA 群、下右:H+OVA 群) の鼻 B の光学顕微鏡写真



OVA 群 HE 染色 ×100

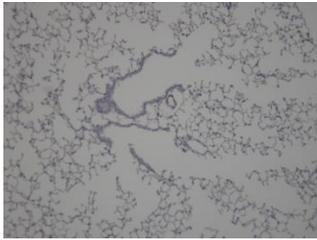


L+OVA 群 HE 染色 ×100

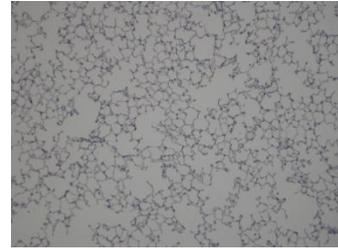


H+OVA 群 HE 染色 ×100

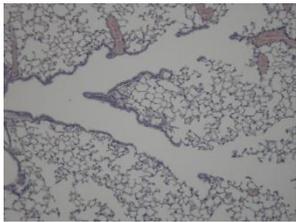
図 19 OVA 群(上)、界面活性剤+OVA 群(下左:L+OVA 群、下右:H+OVA 群) の肺気管支の光学顕微鏡写真



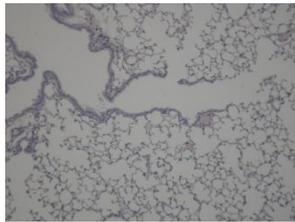
蒸留水群 HE 染色 ×100



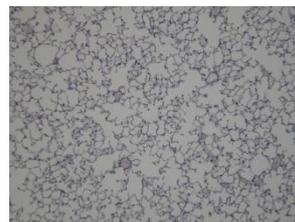
蒸留水群 HE 染色 ×100



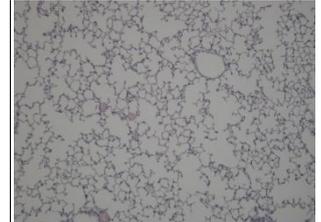
L 群 HE 染色 ×100



H 群 HE 染色 ×100



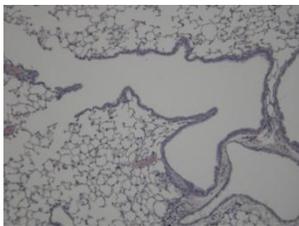
L 群 HE 染色 ×100



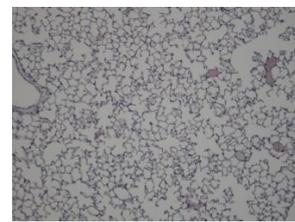
H 群 HE 染色 ×100

図 20 蒸留水群（上）、界面活性剤群（下左：L 群、下右：H 群）の肺胞道の光学顕微鏡写真

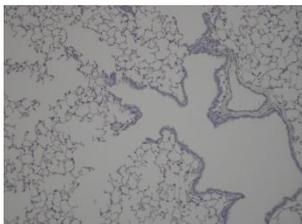
図 22 蒸留水群（上）、界面活性剤群（下左：L 群、下右：H 群）の肺胞の光学顕微鏡写真



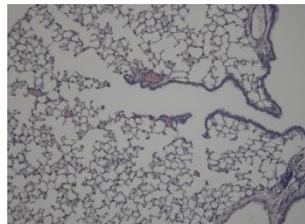
OVA 群 HE 染色 ×100



OVA 群 HE 染色 ×100



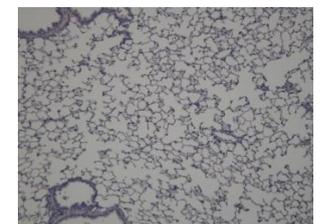
L+OVA 群 HE 染色 ×100



H+OVA 群 HE 染色 ×100



L+OVA 群 HE 染色 ×100



H+OVA 群 HE 染色 ×100

図 21 OVA 群(上)、界面活性剤+OVA 群(下左:L+OVA 群、下右：H+OVA 群)の肺胞道の光学顕微鏡写真

図 23 OVA 群(上)、界面活性剤+OVA 群(下左:L+OVA 群、下右：H+OVA 群)の肺胞の光学顕微鏡写真

右肺にリンパ球の浸潤が見られたマウスの割合を表 1 に示す。「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であった。しかし、「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図 24 に示したように多く見られた。

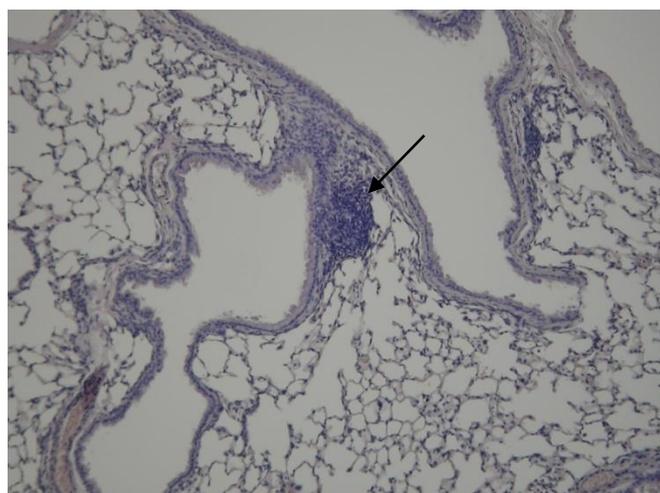


図 24 H+OVA 群のリンパ球浸潤 (←) HE 染色 ×100

表 1 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	L 群	H 群	OVA 群	L+OVA 群	H+OVA 群
0/5	2/5	1/5	2/5	3/5	4/6

(リンパ球の浸潤が見られたマウスの数/匹数)

他の臓器：光学顕微鏡写真で示していないが、6 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。

考察および結論

吸入実験の「蒸留水群」、「界面活性剤群」とそれぞれ「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」とを比較すると、

- 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 濃度の上昇が見られた。

4) OVA を吸入した群で、血清中の OVA 特異的 IgE 濃度と OVA 特異的 IgG1 濃度の上昇が見られた。また、

- 1) 6 群間の鼻 (A、B)、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 (左肺、胸腺、脾臓) に差は見られなかった。「OVA 群」と「L+OVA 群」の肝臓重量対体重比の間に有意差が見られたが、「L+OVA 群」の値の分散が他群と比べ小さかったためと考えられる。
- 2) 血清中の OVA 特異的 IgE 濃度は、「OVA 群」と「L+OVA 群」の間に有意差が見られたが、「L+OVA 群」の中に 1 匹だけ高い値を持つマウスがいたためと考えられる。
- 3) OVA 特異的 IgG1 濃度の測定値に差は見られなかった。

前回と今回の実験結果を比較すると、

- 1) 前回有意差が見られた項目 (左肺重量対体重比と OVA 特異的 IgG1 濃度) に今回の実験でも有意差が見られ再現性のあることが確認された。
- 2) IL-4 濃度、OVA 特異的 IgE 濃度、OVA 特異的 IgG1 濃度は今回の測定値の方が低くなった。「OVA 群」の IL-4 濃度が前回と比較して約 1/4~1/5 程度、「OVA 群」の OVA 特異的 IgE 濃度が前回と比較して約 1/4 程度、「OVA 群」と「H+OVA 群」の OVA 特異的 IgG1 濃度が前回と比較してそれぞれ約 1/6 程度、約 1/5 程度となった。これは実験に使用したマウスのロット差 (個体差) による感受性の違いによるものと推測された。
- 3) 前回と今回、ともに 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見られたが、今回の方が浸潤しているリンパ球の数が少なかった。このことも実験に使用したマウスのロット差 (個体差) による感受性の違いによるものと推測された。

前回の実験と同様に、今回の実験でも OVA の吸入による生体への影響が見られたが、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影響は見られなかった。

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) 厚生科学審議会疾病対策部会 リウマチ・アレルギー対策委員会：リウマチ・アレルギー対策委員会報告書、平成 23 年 8 月
- 2) 環境省：平成 13 年度版環境白書、平成 13 年 5 月
- 3) 東恵美子, 中島孝江：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, 大阪府立公衆衛生研究所報, 第 50 号, 38 - 44 (2012)
- 4) リウマチ・アレルギー情報センター：小麦加水分解物含有石鹼「茶のしずく」を使用したことにより発症する小麦アレルギーに関する情報センター, <http://www.allergy.go.jp/allergy/flour/001.html>
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 環境省：平成 13 年度本態性多種化学物質過敏状態の調査研究 研究報告書、平成 13 年 8 月

モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン塗布の

マウスに対する生体影響

中島孝江* 東恵美子*

化粧品等に使用されているモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween80) をアレルゲンと混合してマウスの耳に塗布した場合に、アレルゲンの経皮吸収を促進するか否かを、惹起後にアレルゲン特異的抗体価を測定して調べた。Tween80 濃度 1%以下では、アレルゲン特異的抗体の産生亢進はみられなかったが、5%以上では、アレルゲン特異的抗体の産生亢進がみられた。5%以上では、塗布 1 日後に耳に軽度の紅斑を示す刺激性が観察され、刺激反応がアレルゲンの経皮吸収を促進したと考えられた。

キーワード：マウス、アレルギー、Tween80、塗布、特異的抗体

key words : mouse, allergy, tween80, application, specific-antibody

近年、日本の全人口の約 2 人に 1 人が何らかのアレルギー疾患に罹患しており、罹患者数は急速に増加していると報告されている¹⁾。その原因として、急激に変化している環境要因が重要であると考えられている^{2,3)}。

一方、アレルゲンに対する特異的 IgE 抗体が陽性であることは、アレルギー疾患発症の危険因子と考えられている⁴⁾。しかし、1971 年以降に生まれた人の 88%がなんらかのアレルゲンに対する特異的 IgE 抗体が陽性であったのに対し、1971 年以前に生まれた人では 44%のみが陽性であったという報告⁵⁾がある。そのため、近年のアレルギー疾患罹患者の増加には、特異的 IgE 抗体陽性者の増加が関与している可能性があると考えられる。

生活環境中に存在している化学物質の種類と使用量が増加しており⁶⁾、これらの化学物質の中にアレルギー疾患に関与するものがあるのではないかと懸念される。平成 22 年には、実際に小麦由来成分を含んだ洗顔石けんの使用による小麦アレルギーの発症が報告⁷⁾された。

我々は、他にもアレルギー疾患に関与する化学物質があるのではないかと考え、これまでに、シャンプーに使

用されている陰イオン界面活性剤のラウレス硫酸ナトリウムを鼻から吸入した場合にアレルゲンによるアレルギー反応を増強するか否かを調べた。しかし、アレルゲン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影響は見られなかった⁸⁾。

今回は、化粧品等に使用されている非イオン界面活性剤のモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween80) に注目した。

モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンは、ソルビトール及び無水ソルビトール (多価アルコール) の水酸基の一部を主としてオレイン酸でエステル化し、エチレンオキシド約 20 分子を縮合させたもので、安全性の高い非イオン界面活性剤として、Tween80 や Polysorbate80 という商品名で一般的に知られている。Tween80 は、低刺激性であるため軟膏剤や化粧品等皮膚に塗布する製品に広く使用されており、化粧品 (化粧水、乳液、クリーム) に乳化剤として 2~20%配合されている。医薬品での使用量は、一般外用剤 100 mg/g、経皮剤 (全身作用) 30 mg/g となっている⁹⁾。

今回、Tween80 をアレルゲンと混合して皮膚に塗布した場合のアレルギー反応への影響について検討した。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課
Effects of Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate on Mice
by Applied to Skin
by Takae NAKAJIMA and Emiko AZUMA

実験方法

1. 試薬

アレルギーとしては、SIGMA 製 卵白アルブミン Grade V (分子量 44,287) (OVA) を用い、Tween80 (分子量 1,300) は、和光純薬製 (化学用) を用いた。

2. 実験動物と飼育条件

BALB/c 雄マウス (SPF、日本エスエルシー、静岡) を 5 週齢で 50 匹購入し、10 群に分け、飼育ケージに 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。

3. 実験手順

実験手順を図 1 に示した。

マウスを 1 週間飼育環境に慣らした後、6 週齢で右側耳介背面に表 1 に示した試験溶液 20 μ l をワイドポアポリプロピレン製チップを用いてピペットで塗布した (感作)。1 日後に蒸留水を含ませたカット綿を用いて、擦らないようにして試験溶液を拭き取り、再度蒸留水を含ませたカット綿を交換して拭き取った。塗布の 2 週間後、右側耳介根部背面に 0.5%OVA を含んだ滅菌生理食塩水 20 μ l を皮内注射し (惹起)、その 2 週間後に検査を行った。検査項目は、耳介腫脹試験、臓器重量測定、右耳の病理組織学的観察、血清中 OVA 特異的抗体測定である。感作、惹起、検査は、ソムノペンチル麻酔薬腹腔内投与 (60mg/kg) により麻酔をして行った。また、実験期間を通じ、右耳皮膚の肉眼的観察を行った。

4. 実験群

実験群を表 1 に示した。

陰性対照は、感作時に蒸留水を塗布し、惹起時に生理食塩水を皮内注射する、感作も惹起も行わない DW-生食群、感作時に蒸留水を塗布し、惹起時に 0.5%OVA を皮内注射する、惹起のみ行う DW 群、感作時に OVA を塗布しないで 10%Tween80 のみを塗布し、惹起時に 0.5% OVA を皮内注射する 10TW 群の 3 群とした。

主となる実験群は、感作時に OVA のみを塗布する OVA 群 (対照)、感作時に OVA と混合して塗布する Tween80 の濃度が、0.5%の 0.5TWOVA 群、1%の 1TWOVA 群、5%の 5TWOVA 群、10%の 10TWOVA 群、20%の 20TWOVA 群とし、惹起時に 0.5%OVA を皮内注射した 6 群とした。

また、感作時に 0.5%OVA20 μ l を皮内注射し、惹起時に 0.5%OVA を皮内注射する、感作と惹起を確実にを行う OVA 投与群を陽性対照とした。計 10 群で各群 5 匹 (0.5TWOVA 群のみ 4 匹) で実験を行った。

表 1 実験群

実験群	試験溶液 (右耳に塗布) 感作 0日	惹起 2週間後 (右耳に皮内投与)
DW-生食 (陰性対照)	蒸留水20 μ l	生食20 μ l
DW (陰性対照)	蒸留水20 μ l	0.5% OVA / 生食20 μ l
10TW (陰性対照)	10% Tween80 / 蒸留水20 μ l	0.5% OVA / 生食20 μ l
OVA (対照)	2.5% OVA / 蒸留水20 μ l	0.5% OVA / 生食20 μ l
0.5TWOVA	2.5% OVA・0.5% Tween80 / 蒸留水20 μ l	0.5% OVA / 生食20 μ l
1TWOVA	2.5% OVA・1% Tween80 / 蒸留水20 μ l	0.5% OVA / 生食20 μ l
5TWOVA	2.5% OVA・5% Tween80 / 蒸留水20 μ l	0.5% OVA / 生食20 μ l
10TWOVA	2.5% OVA・10% Tween80 / 蒸留水20 μ l	0.5% OVA / 生食20 μ l
20TWOVA	2.5% OVA・20% Tween80 / 蒸留水20 μ l	0.5% OVA / 生食20 μ l
OVA投与 (陽性対照)	0.5% OVA/生食20 μ l (皮内投与)	0.5% OVA / 生食20 μ l

5. 検査 (耳介腫脹試験、臓器重量) と採血

耳介の厚さは、左右の耳介の端部中央で DIAL THICKNESS GAUGE (PEACOCK G-1A)を用いて計測し、右側耳介厚/左側耳介厚を算出した。体重測定後、開腹、開胸して心臓から採血し、胸腺、脾臓、肝臓の重量測定を行った。各臓器重量から、それぞれ体重当たりの百分率を算出した。血液から血清を分離し、OVA 特異的抗体を測定するまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

6. 右耳の病理組織学的観察

右耳を 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) 染色と、トルイジンブルー(TB) 染色を行い、染色後、光学顕微鏡に

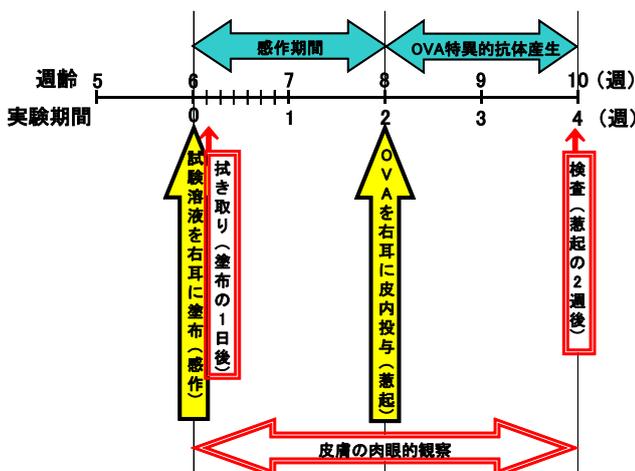


図 1 実験手順

よる観察を行った。耳介表皮厚は、HE 染色の顕微鏡写真で、塗布面の一番外側の角質層を除いた表皮の厚さをノギスで計測して求めた。マスト細胞数は、TB 染色標本により表皮の長さ 0.5 mm 当たりの数をカウントし、10 箇所での平均値を求めた。

7. OVA 特異的 IgE、OVA 特異的 IgG1 の測定

血清中の OVA 特異的 IgE は、抗-マウス IgE 抗体 (PHARMINGEN R35-72)、ビオチン化 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¹⁰⁾した。

OVA 特異的 IgG1 は、HRP 標識した抗-マウス IgG1 抗体 (ZYM610120) を用い、抗卵白アルブミン マウス モノクローナル抗体 (ANTIBODY SHOP HYB 099-01) を標準として ELISA 法で測定¹¹⁾した。

8. 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

DW-生食群、DW 群、10TW 群を陰性対照、OVA 投与群を陽性対照とし、OVA 群と、OVA と Tween80 を混合して塗布した、0.5TWOVA 群、1TWOVA 群、5TWOVA 群、10TWOVA 群、20TWOVA 群との結果を比較した。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、耳介厚、臓器重量

惹起 2 週後の体重、耳介厚、臓器重量を表 2 に示す。

表 2 耳介厚と臓器重量の平均値

実験群	右側耳介厚 (mm)	左側耳介厚 (mm)	右側耳介厚/左側耳介厚	体重 (g)	胸腺 (g)	脾臓 (g)	肝臓 (g)	胸腺重量体重比 (%)	脾臓重量体重比 (%)	肝臓重量体重比 (%)
DW-生食	0.264	0.263	1.00	25.0	0.0346	0.1086	1.31	0.139	0.435	5.26
DW	0.257	0.253	1.02	25.2	0.0362	0.0988	1.33	0.143	0.391	5.29
10TW	0.257	0.253	1.02	25.5	0.0316	0.1004	1.24	0.124	0.395	4.86
OVA (対照)	0.262	0.254	1.03	24.3	0.0352	0.0956	1.16	0.145	0.393	4.78
0.5TWOVA	0.256	0.254	1.01	24.4	0.0350	0.0993	1.35	0.143	0.406	5.50
1TWOVA	0.257	0.250	1.03	23.9	0.0362	0.0964	1.23	0.152	0.404	5.14
5TWOVA	0.259	0.254	1.02	24.9	0.0324	0.0994	1.21	0.131	0.399	4.87
10TWOVA	0.263	0.252	1.04	23.2	0.0358	0.0978	1.08	0.154	0.421	4.65
20TWOVA	0.264	0.255	1.04	24.0	0.0348	0.0960	1.10	0.145	0.399	4.57
OVA投与(陽性対照)	0.257	0.252	1.02	23.9	0.0378	0.0916	1.17	0.159	0.382	4.89

胸腺重量体重比には有意な差は認められなかった。

脾臓重量体重比は、DW-生食群と比較して、OVA の惹起を行ったほとんどの群で減少していた。OVA 群との比較では 10TWOVA 群で増加していたが、Tween80 の濃度が異なる他の群では差がなく系統的な変化ではなかった (図 2)。

肝臓重量体重比も DW-生食群と比較して OVA の惹起を行ったほとんどの群で減少していた。OVA 群との比較では 0.5TWOVA 群で増加し、10TWOVA 群で減少しており、Tween80 濃度が低いと増加し、高いと減少する傾向があった (図 3)。

右側耳介厚/左側耳介厚は、有意な差はみられなかった。

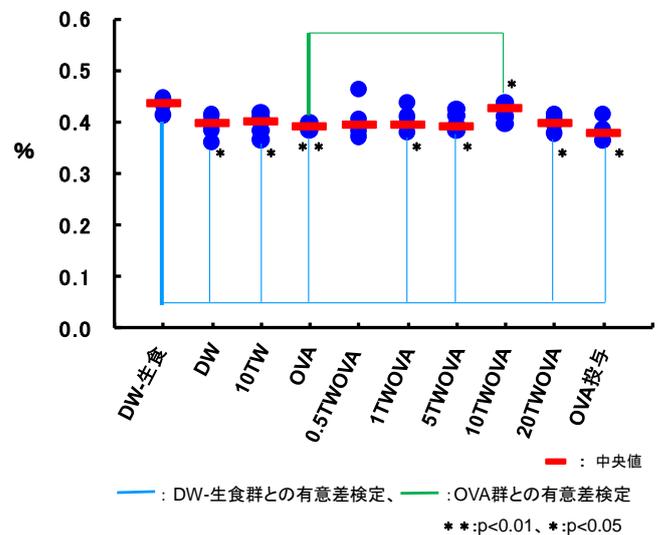


図 2 脾臓重量体重比

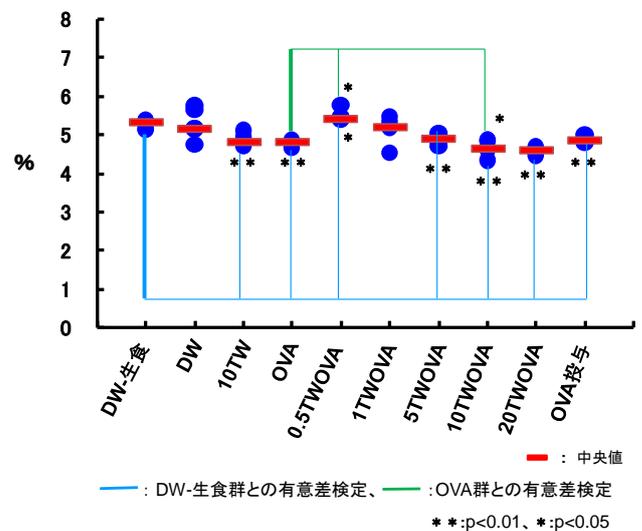


図 3 肝臓重量体重比

2. 右耳の病理組織学的観察

図4に惹起2週後の右耳の光学顕微鏡写真を示す。いずれの群も、耳介表皮厚に有意な差はみられなかった。また、マスト細胞数は、OVA群と比較して5TWOVA群のみで有意に増加していたが、Tween80の濃度が異なる他の群では差がなく系統的な変化ではなかった(図5)。

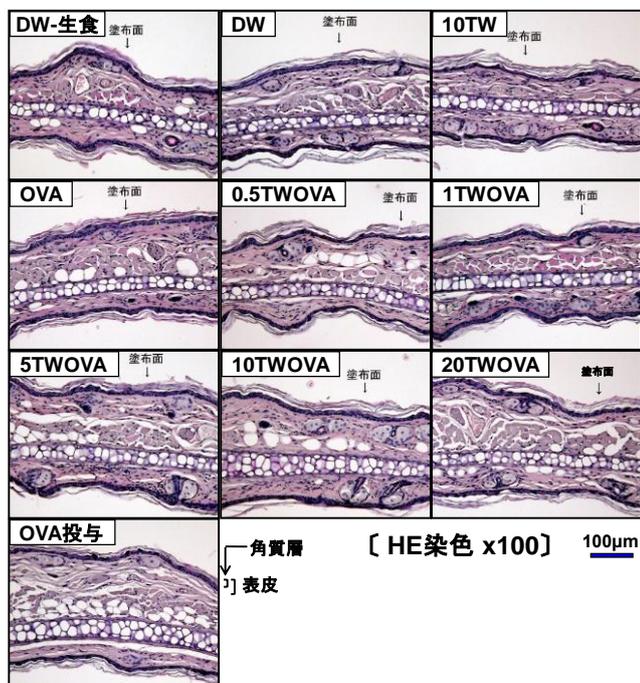


図4 惹起2週後の右耳の光学顕微鏡写真

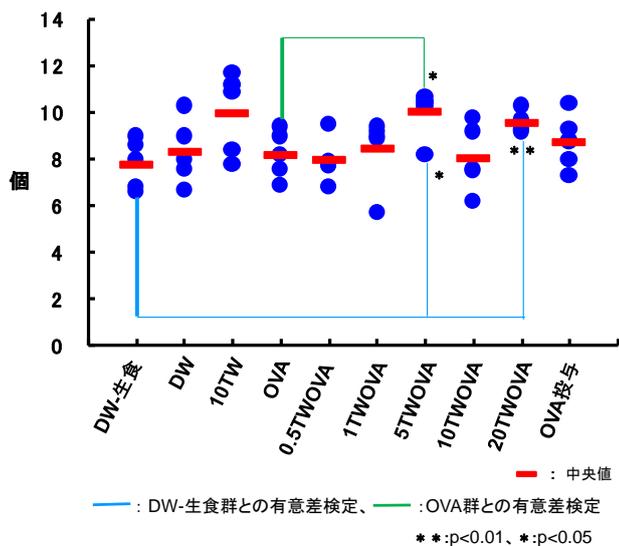


図5 マスト細胞数

3. 右側耳介背面の外観

試験溶液塗布後の右側耳介に赤味(紅斑)を生じるも

のがあったが、浮腫の形成はみられなかった。紅斑の程度を経済協力開発機構(OECD)ガイドライン¹²⁾における急性皮膚刺激性の判定基準に準じて5段階(0:紅斑なし、1:非常に軽度な紅斑、2:はっきりした紅斑、3:中等度ないし高度紅斑、4:高度紅斑から紅斑の採点を妨げる痂皮の形成)に評価した結果を表3に示す。塗布1日後では、感作時にOVAと共に5%以上の濃度のTween80を塗布した群で右耳介が「非常に軽度な紅斑」を示した。

塗布1日後および4日後の代表的マウスの右側耳介背面の写真をそれぞれ図6、図7に示す。紅斑の強度は、塗布4日後に最大となり、以後徐々に軽減した。

表3 塗布後の右側耳介背面の紅斑スコア

検体名	塗布後の日数																						
	1	2	4	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
DW-生食1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DW-生食2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DW-生食3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DW-生食4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DW-生食5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DW1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DW2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DW3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DW4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DW5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TW1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TW2	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TW3	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TW4	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TW5	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5TWOVA1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5TWOVA2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5TWOVA3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5TWOVA4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1TWOVA1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1TWOVA2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1TWOVA3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1TWOVA4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1TWOVA5	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5TWOVA1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5TWOVA2	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5TWOVA3	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5TWOVA4	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5TWOVA5	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TWOVA1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TWOVA2	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TWOVA3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TWOVA4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10TWOVA5	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20TWOVA1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20TWOVA2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20TWOVA3	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20TWOVA4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20TWOVA5	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA投与1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA投与2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA投与3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA投与4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OVA投与5	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0: 紅斑なし、1: 非常に軽度な紅斑、2: はっきりした紅斑、3: 中等度ないし高度紅斑、4: 高度紅斑から紅斑の採点を妨げる痂皮の形成

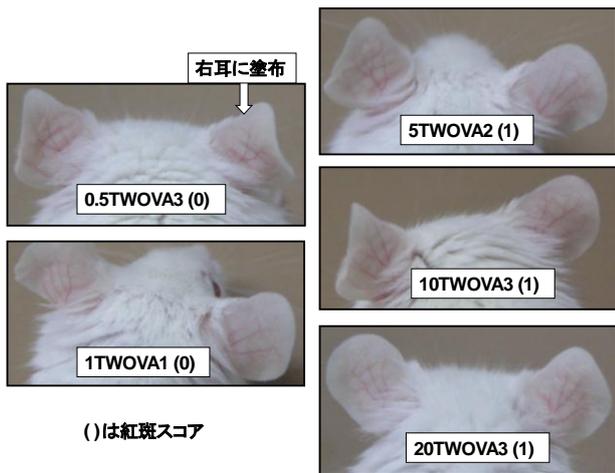


図6 塗布1日後の右側耳介背面

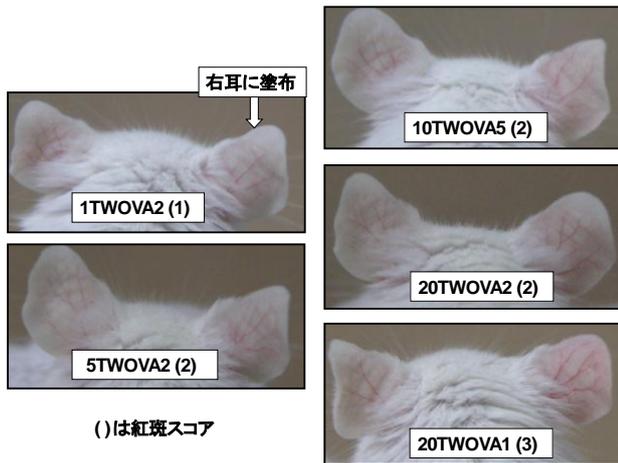


図7 塗布4日後の右側耳介背面

4. 血清中 OVA 特異的抗体

OVA 特異的 IgE: アレルギー疾患に関与すると考えられている血清中 OVA 特異的 IgE は、陽性対照の OVA 投与群でも検出限界以下の値があり、他の群ではほとんどの測定値が検出限界以下で、抗体価に有意差は無かった。

OVA 特異的 IgG1: 各群の血清中 OVA 特異的 IgG1 の測定値を図8に示す。

特異的 IgG1 は、マウスではアレルギー疾患に関与すると考えられている¹³⁾。OVA 特異的 IgG1 は、OVA の感作も惹起も行わない DW-生食群と比較して OVA の惹起を行った群で産生が亢進していた。

DW 群と比較して、OVA 群は差がなく、OVA 群の抗体

産生は惹起のみによるものと考えられた。

OVA 群との比較では、感作時に OVA と共に塗布した Tween80 濃度が 1%以下の群では OVA 群と同程度の抗体価で、有意差はなかった。

感作時に OVA と共に塗布した Tween80 濃度が 5%以上の群では、OVA 群と比較して抗体価が有意に高く、抗体価の中央値は 5TWOVA 群、10TWOVA 群、20TWOVA 群でそれぞれ OVA 群の 12.5 倍、6.4 倍、20.6 倍であった。

感作と惹起を投与で行った OVA 投与群も、OVA 群と比較して抗体価は有意に高かった (17.3 倍)。

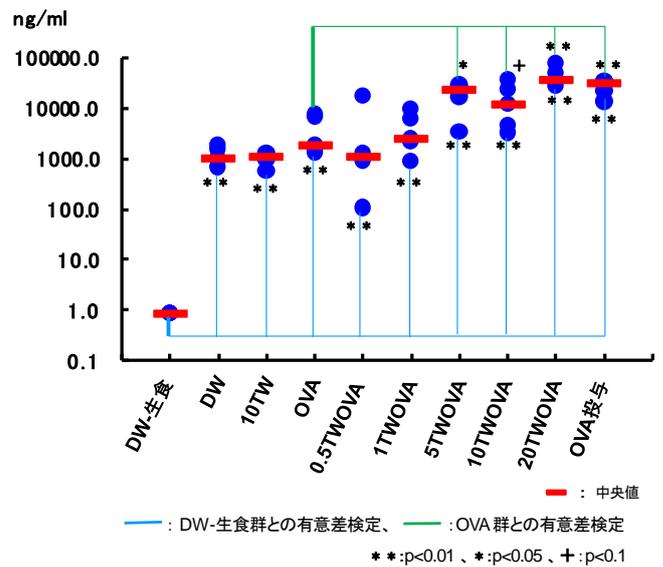


図8 血清中 OVA 特異的 IgG1

考察

実験は、感作時に OVA と混合して塗布した Tween80 が、OVA の経皮吸収を促進した場合、惹起した後の OVA 特異的抗体産生が亢進すると考え実施した。

また、耳は、毛が少ないので塗布前に毛をそる必要が無く、皮膚を傷つける心配が無いので、塗布の場所として適当であると考え採用した。

今回の実験では、OVA 特異的 IgE の産生は、ほとんど無かった。

OVA 特異的 IgG1 の産生は、DW-生食群との比較で OVA の惹起を行ったすべての群で亢進がみられ、惹起のみで亢進すると考えられた。これらの群では脾臓重量体重比

と肝臓重量体重比が減少する傾向がみられた。OVA 群と比較して抗体産生が亢進していた 10TWOVA 群で、肝臓重量体重比はさらに減少しており、抗体産生量との関係が示唆された。

OVA 群との比較で、OVA と共に Tween80 を耳に 1 日塗布した場合、1%以下の Tween80 では OVA 特異的抗体の産生亢進はみられず、OVA の経皮吸収促進はおこらなかったと考えられる。5%以上の Tween80 では OVA 特異的抗体の産生亢進がみられ、OVA の経皮吸収が促進され感作に必要な量が侵入したと考えられた。

OVA 特異的抗体産生亢進がみられなかった 1%以下の Tween80 の群では、塗布 1 日後の肉眼所見では耳に紅斑がみられなかったが、Tween80 濃度 5%以上の群では、塗布 1 日後から肉眼所見で耳に紅斑がみられ、軽度の刺激性が観察された。軽度の刺激反応が、OVA の経皮吸収を促進したと考えられた。

耳の紅斑は、塗布 19 日以降みられなくなった。塗布 4 週後（惹起 2 週後）の病理組織学的観察でも、耳介表皮厚は、いずれの群も DW-生食群と差がなく、マスト細胞数にも系統的な変化がみられなかった。これらの結果から、塗布 4 週後（惹起 2 週後）には Tween80 の刺激性の影響は認められず、改善したものと考えられた。

Tween80 の刺激性については、ヒトでは原液でも無い¹⁴⁾という報告があり、種差により感受性に差があると考えられる。

ヒトでは 5%Tween80 には刺激性が無いと考えられるので、今回のマウスの結果がそのままヒトに当てはまるとは考えられないが、刺激性に対する感受性には個人差もあり、アレルゲンになる可能性がある物質と混合して Tween80 を塗布する場合は注意が必要であると考えられる。

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) 厚生科学審議会疾病対策部会 リウマチ・アレルギー対策委員会: リウマチ・アレルギー対策委員会報告書, 平成 23 年 8 月
- 2) 近藤直実: アレルギー発症における遺伝子と環境, ア

- レルギー, **56**, 94-100 (2007)
- 3) 斉藤博久: 衛生仮説, 呼吸, **25**, 373-377 (2006)
- 4) 吉田龍太郎: マウスの IgE 産生機構-アレルギー疾患が重なり合う理由を求めて, アレルギー, **59**, 1619-1624 (2010)
- 5) H. Saito: Translation of the human genome into clinical allergy, *Allergology International*, **52**, 65-70(2003)
- 6) 環境省: 平成 13 年度版環境白書, 平成 13 年 5 月
- 7) 千貫祐子, 崎枝薫, 金子栄, 中村千春, 村田将, 澄川靖之, 新原寛之, 吉田雄一, 東儀君子, 森田栄伸: 石鹼中の加水分解小麦で感作され小麦依存性運動誘発アナフィラキシーを発症したと思われる 3 例, 日皮会誌, **120**, 2421-2425 (2010)
- 8) 東恵美子, 中島孝江: 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, 大阪府立公衆衛生研究所報, 第 50 号, 38-44 (2012)
- 9) 医薬品添加物事典 2005
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) OECD: OECD guidelines for testing of chemicals Acute dermal irritation/corrosion.404, Paris. France (1992)
- 13) Y. Miyabara, R. Yanagisawa, N. Shimojo, H. Takano, HB. Lim, T. Ichinose, M. Sagai :Murine strain differences in airway inflammation caused by diesel exhaust particles, *European Respiratory Journal*, **11**, 291-298 (1998)
- 14) A. Blondeel, J. Oleffe, G. Achten :Contact allergy in 330 dermatological patients, *Contact Dermatitis*, **4**, 270-276 (1978)

Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC
 β -Lactamase-Producing *Salmonella enterica*
Strains Isolated from Domestic Retail
Chicken Meat from 2006 to 2011

M. TAGUCHI*, R. KAWAHARA*, K. SETO*,
T. HARADA* and Y. KUMEDA*

Jpn. J. Infect. Dis., 65, 555-557 (2012)

近年世界各国で、食品および食用動物から第三世代セファロスポリン系抗菌剤に耐性の大腸菌やサルモネラ属菌の分離が報告されており、ヒトの感染症との関連性の監視が求められている。本発表では2006年から2011年の6年間に国内産鶏肉から分離したESBLおよびAmpC産生菌検出状況の年次変化を調べて、鶏肉での現状を報告する。

供試した1252検体中584検体(46.6%)から628株のサルモネラを分離した。そのうちESBL産生菌が31株、AmpC産生菌が78株であった。ESBL/AmpC産生サルモネラは増加傾向が認められ、2006年では3.7%のみであったものが、2011年は44.1%になった。最も多く検出されている血清型の*S. infantis*でESBL産生菌とAmpC産生菌に分けて年次変化をみると、ESBL産生菌が3.2%から8.0%と徐々に増加しているのに対して、AmpC産生菌は2009年から急増し、2009年22.7%、2011年には45.3%になった。

日本国内では、鶏肉でのESBL/AmpC産生サルモネラの増加と患者発生との相関関係は認められていない。しかし、鶏肉の消費段階で耐性菌との接触頻度が高くなっていることが推察できる。これらの鶏肉由来薬剤耐性菌がヒトに健康被害を及ぼすかどうかに関して、今後も継続的な調査が必要であると考えられる。

保育園で発生した細菌性赤痢の集団感染事例—大阪府

岡本優^{*1}、宇治田尚子^{*1}、漕江由佳^{*1}、田代由希子^{*1}、
芝田元子^{*1}、北島信子^{*1}、笹井康典^{*1}、大平文人^{*2}、
松井陽子^{*2}、伊達啓子^{*2}、熊井優子^{*2}、勢戸和子^{*3}、
原田哲也^{*3}、田口真澄^{*3}

病原微生物検出情報, 33, 245-247 (2012)

大阪府枚方保健所管内の保育園において *Shigella sonnei* による集団感染事例が発生したので、概要を報告する。

2012年3月2日、管内の医療機関からA保育園に通園する4歳男児の*S. sonnei*発生届けがあり、保健所は直ちにA保育園に対する積極的疫学調査を開始した。検便は医療機関と保健所検査課で行い、検出された菌株について府立公衆衛生研究所で薬剤感受性試験を、国立感染症研究所でMLVAを行った。

分離された19株は全てABPC, SM, TC, ST, Su耐性であった。3月12日までに発生届があった16株のMLVAの結果は、12株は完全に一致し、4株は互いに異なるsingle locus variantが認められたが、同一の遺伝子型であると考えられた。

患者は4歳児クラスに限局しており、流行曲線からもこのクラスにおける二次感染、三次感染による広がりであると考えられた。感染源は不明であった。探知時にはすでに感染が拡大していることを想定して、早期に遡り調査、接触者の検便等を実施し、全体像を迅速に把握し対応する必要性を感じた事例であった。

*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

2006年～2011年に国内産小売り鶏肉から分離したサルモネラの基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生およびAmpC型 β -ラクタマーゼ産生性

^{*1}大阪府枚方保健所

^{*2}大阪府健康医療部保健医療室地域保健感染症課

^{*3}大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

Outbreak of dysentery due to *Shigella sonnei* in a nursery school, February-March 2012-Osaka

Clinical Significance of *Escherichia albertii*

T. OOKA^{*1}, K. SETO^{*2}, K. KAWANO^{*3}, H. KOBAYASHI^{*4}, Y. ETOH^{*5}, S. ICHIHARA^{*5}, A. KANEKO^{*6}, J. ISOBE^{*7}, K. YAMAGUCHI^{*8}, K. HORIKAWA^{*5}, T. A. T. GOMES^{*9}, A. LINDEN^{*10}, M. BARDIAU^{*10}, J. G. MAINIL^{*10}, L. BEUTIN^{*11}, Y. OGURA^{*1} and T. HAYASHI^{*1}

Emerg. Infect. Dis., 18, 488-492 (2012)

グラム陰性菌の病原性にかかわるインチミン遺伝子 (*eae*) を保有する菌としては、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、*Citrobacter rodentium* が知られていたが、近年、*Escherichia albertii* もそのメンバーに加わった。しかし、*E. albertii* の一般的な生化学的性状や遺伝的特性は明らかになっておらず、他の腸内細菌科細菌との鑑別は困難であった。そこで、EPEC または EHEC としてヒトおよび動物から分離された 275 株について、*eae* サブタイプ型別と Multi-Locus Sequence 解析を用いた進化系統解析を実施したところ、まれなあるいは新規の *eae* サブタイプを示す 26 株は、*E. albertii* であると同定され、このうちの 2 株は *stx2f* 陽性株であった。共通の遺伝学的特性や、キシロース非発酵など特徴的な性状も明らかになったことから、これらを利用して *E. albertii* の生態やヒト疾患への関与をさらに解明することができる。

^{*1} 宮崎大学

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*3} 宮崎県衛生環境研究所

^{*4} 動物衛生研究所

^{*5} 福岡県保健環境研究所

^{*6} 山形県衛生研究所

^{*7} 富山県衛生研究所

^{*8} 北海道立衛生研究所

^{*9} サンパウロ連邦大学

^{*10} リージェ大学

^{*11} ドイツ連邦リスク評価研究所

臨床における *Escherichia albertii* の重要性

O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌の重要性

勢戸和子*

FFI ジャーナル, 217, 67-75 (2012)

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は、二次感染を引き起こすこと、溶血性尿毒症症候群 (HUS) などの合併症を併発することから、公衆衛生上重要な腸管感染症原因菌である。世界的にヒトから最もよく分離される STEC の血清群は O157 であるが、日本ではこれ以外に O26、O111、O103、O121、O145 が集団発生の原因菌となっている。これらの主要な STEC はインチミンと呼ばれる外膜タンパク質によって腸管上皮細胞に密着し、微絨毛を破壊するなどの細胞障害を引き起こす。志賀毒素 (Stx) は *Shigella dysenteriae* 1 の産生する毒素とアミノ酸配列が同一の Stx1 とアミノ酸配列の同一性が約 60% の Stx2 に大別されるが、HUS 患者から分離される STEC の多くは、Stx2 産生性でインチミン遺伝子を保有している。

2011 年は、日本で O111 による集団食中毒が、ヨーロッパで O104 による大規模なアウトブレイクが起こった。O111 事例では、患者の 17.7% が HUS を発症し、急性脳症の発症率も高かったと報告されている。O104 事例でも HUS 発症率は約 22% と高く、50 名もの死者を出した。O104 は非常に珍しい血清群であるだけでなく、これまで HUS など重要化のリスク因子と考えられていたインチミン遺伝子を保有せず、細胞凝集付着性に関わる遺伝子を保有していた。

STEC の検出は、選択分離培地を用いて疑わしいコロニーを釣菌し、大腸菌であることを同定するとともに Stx 産生あるいは Stx 遺伝子を確認して同定する。O157 については特徴的な性状を利用した選択培地が市販されているが、O157 以外の STEC を分離するのは容易ではなく、感染者数が低く見積もられている可能性がある。

*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

Public Health Importance of Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*

腸管出血性大腸菌の迅速診断法と確定診断

勢戸和子^{*1}、伊豫田淳^{*2}、寺嶋淳^{*2}

小児科臨床, 65, 2583-2587 (2012)

腸管出血性大腸菌感染症の確定診断には、臨床検体からの志賀毒素（ベロ毒素; VT）またはVT遺伝子を保有する大腸菌（EHEC）の分離が必要である。分離頻度の高いO157とO26については特徴的な性状を利用した選択培地があるが、すべてのEHECを効率よく分離できる選択培地はなく、選択培地に発育した菌がすべてEHECであるとは限らない。免疫学的にVTを検出する方法は、イムノクロマト法（IC）法、逆受身ラテックス凝集反応（RPLA）法、酵素抗体（EIA）法がある。IC法は迅速で簡便な方法として優れているが、検出感度はRPLA法に比べ4倍程度低い。また、IC法やEIA法では菌の濃度が極端に濃いと偽陽性を示す場合がある。PCRによるVT遺伝子の検出法は感度が高く、VTの有無を確認するには有効な手段である。いずれの方法を用いても、EHECの同定には早くても3日を要することから、腹痛や血便など疑わしい症例では、選択分離培地からVTまたはVT遺伝子の検出を実施し、推定的な判定を行うことが望ましい。

検査法の進歩により、どの国でもO157以外のEHECの分離報告が増加し、重症例や集団事例の原因となっている。しかし、O157以外のEHECの多くは非病原性の大腸菌と同じ性状を示し、その分離には手間がかかる。日本では、食品従事者等の保菌者検便はもちろん、散発下痢症患者の検査でも一般的には検出対象とされない場合が多いと考えられる。

大腸菌のO抗原凝集抗体価は発症後2～6日目に上昇することがわかっており、EHECが分離されないHUS症例では血清診断が有効な確定診断の手法となる。O157のLPS抗体はラテックス・スライド凝集反応を用いた市販試薬で検出できる。

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*2}国立感染症研究所

Rapid Diagnosis and Confirmed Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in Dogs in Osaka, Japan

C. KATSUKAWA^{*1}, T. KOMIYA^{*2}, H. YAMAGISHI^{*3},
A. ISHII^{*3}, S. NISHINO^{*3}, S. NAGAHAMA^{*4},
M. IWAKI^{*2}, A. YAMAMOTO^{*2} and M. TAKAHASHI^{*2}

J. Med. Microbiol., 61, 266-273 (2012)

*Corynebacterium ulcerans*にはジフテリア毒素を産生する株があり、人に感染しジフテリア様疾患を引き起こすことがある。わが国ではこれまで8例の人の感染発症報告があり、いずれもジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が検出され診断が確定している。*C. ulcerans*は自然界では多くの動物に感染が認められ、動物から人への感染例として、過去には未殺菌の牛乳を原因とする感染報告があり、最近ではイヌやネコなどのコンパニオンアニマルの関与が指摘されている報告もある。

われわれは人の周囲で生活をし、また自然環境との接触機会も多いイヌが人の *C. ulcerans* 感染に関与する可能性を検討するため、大阪のイヌについて13ヶ月間の継続した保菌状況調査を行った。

総計 583 頭のイヌから呼吸器材料を採材し、44 頭 (7.5%) のイヌから *C. ulcerans* を分離した。すべてのイヌは外観上異常を認めなかった。分離菌について菌の解析を行ったところ分離菌は4グループに分けられ、そのうちの2グループはヒト分離菌と近縁であり、イヌがヒトへの感染源となっている可能性が示唆された。薬剤感受性試験を実施したところニューキノロン系の薬剤に対して感受性が低下している菌が一部に認められ、生体からの除菌の困難な本菌の治療についてさらなる注意を喚起する。

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*2}国立感染症研究所 細菌第2部

^{*3}大阪府犬管理指導所

^{*4}大阪府環境農林水産部動物愛護畜産課

大阪府のイヌにおける *Corynebacterium ulcerans* 保有状況調査

Dominant Incidence of Distinct Multidrug and Extensively Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clones in Osaka Prefecture, Japan.

A. TAMARU^{*1}, C. NAKAJIMA^{*2}, T. WADA^{*3}, Y. WANG^{*4}, M. INOUE^{*4}, R. KAWAHARA^{*1}, R. MAEKURA^{*5}, Y. OZEKI^{*7}, H. OGURA^{*4}, K. KOBAYASHI^{*6}, Y. SUZUKI^{*2} and S. MATSUMOTO^{*4}

PLoSOne, 7 (8), e42505 (2012)

多剤耐性結核の感染経路を調べるため、2000年から2009年に大阪府とその周辺自治体で分離された89株の多剤耐性結核菌と1011株の多剤耐性ではない結核菌について調査した。多剤耐性結核の薬剤感受性を調べると48.5%が超多剤耐性結核であった。遺伝子型別を実施したところ、多剤耐性結核のうち24株(27.0%)が6群の同一遺伝子型群を形成し、そのうち4群(OM-V02群、OM-V03群、OM-V04群、OM-V06群)の遺伝子型は感受性結核菌にはみられない遺伝子型であった。これら4群の同一遺伝子型群を形成する結核菌のうち、OM-V02群のすべての株、OM-V03群のすべて、OM-V04群のうち2株が、薬剤感受性パターン、薬剤耐性関与遺伝子変異の位置から、それぞれクローンであることが示された。これら3群のうち、OM-V02群は11株からなる大きな同一遺伝子型群であり、結核既往歴のない患者から分離されたこと、研究期間後にも2名の患者から分離されたことから、感染性の高い結核菌株であることが示唆された。

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*2}北海道大学 人獣共通伝染病リサーチセンター 国際防疫部

^{*3}長崎大学 熱帯医学研究所 国際保健学分野

^{*4}大阪市立大学医学部細菌学講座

^{*5}国立病院機構刀根山病院 内科

^{*6}国立感染症研究所 免疫部

^{*7}園田学園大学女子大学 食品栄養学科

大阪府における特定遺伝子型多剤耐性結核菌の優勢な発生

Identification of *Kudoa septempunctata* as the Causative

Agent of Novel Food Poisoning Outbreaks in Japan by Consumption of *Paralichthys olivaceus* in Raw Fish

T. KAWAI^{*1}, S. SEKIZUKA^{*2}, Y. YAHATA^{*3}, M. KURODA^{*2}, Y. KUMEDA^{*1}, Y. IJIMA^{*4}, Y. KAMATA^{*5}, Y. SUGITA-KONISHI^{*5} and T. OHNISHI^{*5}

Clin. Infet. Dis., 54, 1046-1052 (2012)

日本では2003年から生鮮魚の生食が関連する食中毒事件が増加していた。この食中毒では、患者は喫食後2~20時間で下痢や嘔吐を発症するのが特徴で、喫食残品から細菌やウイルス、細菌性毒素など既知の病因物質が検出されないため、原因が不明であった。そこで、2008年から2010年に発生した原因不明食中毒事例の疫学解析、事例由来のヒラメを使った網羅的DNA配列解析、リアルタイムPCR解析および事例由来ヒラメの鏡検解析を行い、推定された病因物質の病原性を乳のみマウス試験とスunksを使った催吐試験により調べた。疫学解析によりヒラメが食中毒の原因食品であることが関連づけられ、網羅的DNA配列解析、リアルタイムPCR解析および事例由来ヒラメの鏡検解析の結果から、事例由来のヒラメには、粘液胞子虫の1種である*Kudoa septempunctata*が存在することがわかった。さらに、*K. septempunctata*は、乳のみマウスの腸管に液体を貯留させて水様便を発症させること、スunksに嘔吐を発症させることがわかった。以上の結果から、*K. septempunctata*はヒラメの生食を原因とする新規食中毒の病因物質であると同定した。これは、*Kudoa*属粘液胞子虫がヒトに対して病原性を有することを初めて明らかにした報告である。

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*2}国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

^{*3}国立感染症研究所 感染情報センター

^{*4}神戸市環境保健研究所 微生物部

^{*5}国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

生食用ヒラメの喫食により起こる新規食中毒事件の病因物質は*Kudoa septempunctata*である

Production and Characterization of a Monoclonal Antibody
against Recombinant Thermolabile Hemolysin and its
Application to Screen for *Vibrio parahaemolyticus*
Contamination in Raw Seafood

J. SAKATA^{*1}, K. KAWATSU^{*1}, R. KAWAHARA^{*1},
M. KANKI^{*1}, T. IWASAKI^{*2}, Y. KUMEDA^{*1},
and H. KODAMA^{*2}

Food Control, 23, 171-176 (2012)

新たに作出した腸炎ビブリオ易熱性溶血毒 (TLH) に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法 (TLH-ELISA) による食品中の腸炎ビブリオ汚染をスクリーニングする方法を開発した。

添加実験を行った結果、TLH-ELISA を用いたスクリーニング法は、基準レベル (100 MPN/g) の腸炎ビブリオ汚染を検出できる感度を有していると考えられた。

さらに市販の生食用鮮魚介類 119 検体について、MPN 法と TLH-ELISA を行い、それらの結果を比較することで TLH-ELISA を用いたスクリーニング法の有用性を評価した。その結果、MPN 法で 100 以上を示した 1 検体は、TLH-ELISA でも陽性を示した。一方、MPN 法で 100 以下を示した 118 検体については、TLH-ELISA を用いたスクリーニング法では、117 検体が陰性を示した。

これらのことから、開発した TLH-ELISA を用いたスクリーニング法は、食品中の腸炎ビブリオ汚染を迅速に判定するスクリーニング法として有用であることが示唆された。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*2} 大阪府立大学 生命環境科学科

易熱性溶血毒に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法による生食用鮮魚介類中の腸炎ビブリオ汚染をスクリーニングする方法の開発

Production and Characterization of a Novel Monoclonal
Antibody against *Vibrio parahaemolyticus* F₀F₁ ATP
Synthase's Delta Subunit and its Application for Rapid
Identification of the Pathogen

J. SAKATA^{*1}, K. KAWATSU^{*1}, T. IWASAKI^{*2},
K. TANAKA^{*2}, S. TAKENAKA^{*2}, Y. KUMEDA^{*1},
and H. KODAMA^{*2}

J. Microbiol. Methods, 88, 77-82 (2012)

新たに作出した腸炎ビブリオの F₀F₁-ATP 合成酵素 δ サブユニットに対するモノクローナル抗体 (VP34 抗体) を用いて、Dot-blotting 法による腸炎ビブリオの迅速同定法を開発した。

特異性を酵素免疫測定法で検証した結果、VP34 抗体は、供試した腸炎ビブリオ 140 株全てに陽性反応を示し、一方で腸炎ビブリオ以外の株は、*Vibrio natriegens* を除いた 56 菌種 96 株全てに陰性を示した。

次に VP34 抗体を用いて、TCBS 平板上に形成された疑わしいコロニーが腸炎ビブリオかどうかを迅速に判別できる Dot-blotting 法 (VP-Dot 法) を開発した。この VP-Dot 法の精度を調べるために、腸炎ビブリオ 20 株と腸炎ビブリオ以外の 19 株それぞれについて、腸炎ビブリオ種特異的な PCR 法と VP-Dot 法を行い、それらの結果を比較した。その結果、VP-Dot 法と PCR 法の結果は一致し、VP-Dot 法は TCBS 平板上の腸炎ビブリオのコロニーを同定するのに十分な精度を有していると考えられた。

VP-Dot 法による分離菌の同定にかかる時間は 40 分程度で、特別な機器も必要としないことから、VP-Dot 法は腸炎ビブリオの迅速・簡便な同定法として有用であると考えられた。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*2} 大阪府立大学 生命環境科学科

腸炎ビブリオ F₀F₁-ATP 合成酵素 δ サブユニットに対するモノクローナル抗体の作製とそれを用いた腸炎ビブリオ迅速同定法の開発

Isolation and Characterization of *vanA* Genotype
Vancomycin-resistant *Enterococcus cecorum* from Retail
Poultry in Japan

T. HARADA*, R. KAWAHARA*, M. KANKI*,
M. TAGUCHI* and Y. KUMEDA*

Int. J. Food Microbiol., 153, 372-377 (2012)

2009年9月に大阪府内で流通する鶏肉22検体からバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の分離を行った。その結果、国産トリムネ肉1検体より *vanA* 遺伝子を保有する *Enterococcus* 属菌が分離された。生化学的性状、16SrRNA 遺伝子および *sodA* 遺伝子配列により分離株は *Enterococcus cecorum* であることが明らかとなった。薬剤感受性試験の結果、分離株はバンコマイシンに耐性を示したが、テイコプラニンには感受性であった。また、本菌は染色体上に Tn1546 様トランスポゾンを持有することが、シーケンスおよびサザンハイブリダイゼーションにより示された。さらに、Tn1546 様トランスポゾンの塩基配列をプロトタイプ Tn1546 と比較したところ、8か所の点変異が存在し、このうち3か所は *vanS* 遺伝子内で確認された。*vanS* 遺伝子の3か所の点変異は、養鶏場でのアポパルシン使用が禁止される前に分離された VRE 株でも報告されており、本トランスポゾンが養鶏場あるいはその周囲環境で長期間にわたり保持されている可能性が示された。

vanA 遺伝子を保有する *E. cecorum* の分離はこれまでに報告がなく、新たな VRE が日本で流通する鶏肉より分離されたことは、現在でも鶏が VRE あるいはバンコマイシン耐性遺伝子のレゼルボアであることを示すものである。

*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

日本で流通する鶏肉からの *vanA* 遺伝子保有 *Enterococcus cecorum* の分離および性状

Development of a Quantitative Polymerase Chain Reaction
Assay for Detection of *Kudoa septempunctata* in Olive
Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

T. HARADA*¹, T. KAWAI*¹, H. SATO*², H.
YOKOYAMA*³ and Y. KUMEDA*¹

Int. J. Food Microbiol., 156, 161-167 (2012)

Kudoa septempunctata 18S rDNA 領域を標的とした、種特異的 QPCR 法によるヒラメからの *K. septempunctata* 検出法の確立を目的とした。*K. septempunctata* 18S rRNA gene リファレンス配列より設計した probe および primer を用いて、QPCR 法の検討を行った。また、感染ヒラメ10検体を用いて、加熱法、アルカリ法および2つの市販キットによる *K. septempunctata* DNA の抽出を行い、抽出効率を相対的に比較した。検体採取部位による定量性への影響を調べるため、別の感染ヒラメ10検体を用いて、有眼側および無眼側各2ヶ所から検体を採取し、それぞれについて定量試験の結果を比較した。

組換えプラスミドによる QPCR 法の検討では、 2.2×10^1 から 2.2×10^7 コピー/反応の範囲で良好な直線性を示す検量線が得られ、増幅効率は99.91%を示した。本法の検出下限は 1.1×10^1 コピー/反応であった。DNA 抽出法の検討では、DNeasy® Blood&Tissue kit (QIAGEN)を用いた場合が最も抽出効率が高く、定量試験に適していると考えられた。検体採取部位の検討では、鏡頭による孢子数が 8.4×10^5 個/g以下であった6検体中5検体で採取部位による定量結果にばらつきが認められた。一方、鏡頭による孢子数が $1.1 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^7$ 個/gの4検体では、採取部位によるばらつきは認められなかった。本研究で確立した方法を用いることで、わずかな喫食残品からも高感度で種特異的な定量試験が可能になると考えられた。

*¹大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

*²山口大学

*³東京大学

ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検出用定量リアルタイム PCR 法の確立

Detection of *Kudoa septempunctata* 18S Ribosomal DNA
in Patient Fecal Samples from Novel Foodborne Outbreaks
Caused by Consumption of Raw Olive Flounder
(*Paralichthys olivaceus*)

T. HARADA^{*1}, T. KAWAI^{*1}, M. JINNAI^{*1}, T. OHNISHI^{*2},
Y. SUGITA-KONISHI^{*2} and Y. KUMEDA^{*1}

J. Clin. Microbiol., 50, 2964-2968 (2012)

我々が開発した *Kudoa septempunctata* 18S rDNA を標的としたリアルタイム PCR 法を用いて、ヒラメ食中毒患者由来検体からの *K. septempunctata* の検出を目的とした。

K. septempunctata 孢子添加糞便を用いて、3つの市販 DNA 抽出キットによる DNA 抽出効率を相対的に比較し、さらに、検出下限を検討した。ヒラメ食中毒 13 事例に由来する 43 の糞便および 2 つの嘔吐物を検体として、リアルタイム PCR 法を実施した。

DNA 抽出法の検討では、Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)を用いた場合で最も抽出効率が高く、糞便試験に適していると考えられた。本法の検出下限は、糞便 1g 当たりおおよそ 1.6×10^1 孢子で高感度の検出が可能であった。食中毒事例由来検体の検討では、23 の糞便検体および 2 つの嘔吐物から *K. septempunctata* 18S rDNA が検出された。今回示した一連の方法は患者由来検体から高感度で特異的に *K. septempunctata* を検出することができるため、ヒラメ食中毒の原因究明と拡大防止に有用であると考えられる。

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

^{*2}国立医薬品食品衛生研究所

ヒラメ生食による食中毒の患者便からの *Kudoa septempunctata* 18S rDNA の検出

低濃度オゾン水によるノロウイルスの不活化

山崎謙治^{*1}, 中室克彦^{*2}

防菌防黴誌, 40, 199-204 (2012)

低濃度オゾン水によるネコカリシウイルスおよびノロウイルスの不活化効果を調べた。8°Cおよび 19°Cにおいてネコカリシウイルスは初期濃度 0.133 mg/L のオゾン水により 30 秒以内に 99.9%以上不活化された。またノロウイルスは初期濃度 0.174 mg/L のオゾン水により 30 秒以内に 99.9%以上不活化された。

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所 感染症部

^{*2} 摂南大学 理工学部

Inactivation of norovirus by low levels of dissolved ozone

低濃度オゾン水による新型インフルエンザウイルスの
不活化効果の評価法

中室克彦^{*1}、中田英夫^{*2}、市川和寛^{*2}、小阪教由^{*3}、
山崎謙治^{*4}

防菌防黴誌, 40, 485-491 (2012)

低濃度オゾン水による 2009 新型インフルエンザウイルスの不活化効果およびオゾン水によるウイルスの不活化効果に及ぼすふ化鶏卵しょう尿の影にについて調べた。A 型インフルエンザウイルスは初期濃度 0.35 mg/L のオゾン水により 10 秒以内に感染価が 5 log₁₀ 以上低下した。また新型インフルエンザウイルスは初期濃度 0.76 mg/L のオゾン水により感染価が 3 log₁₀ 以上低下した。しょう尿とオゾンの反応によってウイルスを不活化する物質は産生されなかった。今回の方法によりオゾン水のインフルエンザウイルス不活化効果を簡便、迅速に評価しうることを認めた。

インフルエンザウイルス抗体価測定に関する問題点
-2006/07 シーズンワクチン株 A/広島/52/2005 (H3N2) の非特異的凝集抑制物質 (nonspecific inhibitor) 感受性に関する検討-

前田章子^{*1}、森川佐依子^{*2}、加瀬哲男^{*2}、入江伸^{*3}、
廣田良夫^{*1}

感染症学雑誌 86 (4) 400-404, 2012)

インフルエンザウイルスに対する血清反応、即ち抗体価測定には赤血球凝集抑制 (HI) 抗体や中和 (NT) 抗体価測定が汎用されている。しかし、ヒトや動物血清中にはインフルエンザウイルスに対する非特異的凝集抑制物質 (normal inhibitor : 以下インヒビター) が存在し、抗体価測定の手技上、これらの物質を除去する前処理が必要である。通常、ヒト血清中に含まれるインヒビターはムコイドを主成分とする α 型インヒビターが多く、RDE (Receptor Destroying Enzyme) 処理で除去され、これが標準法として採用されている。一方、測定抗原であるウイルスのインヒビター感受性に変異を生じることがあり、この場合には、新たなインヒビター除去法について検討が必要となる。

本報告は、2006/7 インフルエンザシーズン ワクチン含有株 A/広島/52/2005 (H3N2) のインヒビター感受性に変異が生じたこと、その後の抗体価測定についての対応を報告するものであり、同時に、今後の血清反応の精度管理についても注意を促すものである。

*1 摂南大学 理工学部

*2 荏原実業計測器 医療本部

*3 ハネマツ オゾン営業部

*4 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部

Inactivation of the 2009 pandemic influenza virus by low-level dissolved ozone

*1 大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生

*2 大阪府立公衆衛生研究所

*3 相生会九州薬理臨床クリニック

Characterization of a nonspecific inhibitor found in human sera raised against the 2006/07 influenza vaccine strain A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) virus.

IgG3 deficiency and severity of 2009 pandemic H1N1
influenza

E.SAKAI^{*1}, T.YAMAMOTO^{*1}, K.YAMAMOTO^{*1},
Y.MIZOGUCHI^{*1}, H.KANENO^{*1}, M.IHASHI^{*1},
M.TAKANO^{*1}, K.ANZAI^{*1}, T.KASE^{*2},
T.SHIMOTSUJI^{*1}

Pediatr Int. 2012;54(6):758-61.

新型インフルエンザ感染症では、急速な呼吸器障害を呈する重症肺炎例があり、その病態にはアレルギー素因がおよび血中 IgG2 値低下の関連が考えられている。今回、われわれは IgG3 欠損症を合併した新型インフルエンザ肺炎を経験し、その臨床経過および新型インフルエンザで入院した 45 症例における血中 IgG3 値と入院期間に関連する因子、喘息の有無、外来治療内容、入院時検査、血液検査、尿検査、X 線所見について検討したので報告する。統計解析は、決定木分析で変数選択し、重回帰分析を用いた。血中 IgG3 値に対して気管支喘息の既往の有無は有意な負の相関を示し、入院期間に関して気管支喘息の既往の有無は有意な正の相関を示した。IgG3 欠損症の入院期間が延長した原因として、新型インフルエンザ肺炎に気管支喘息発作を併発したことが示唆される。

^{*1} 箕面市立病院小児科

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所

パンデミックインフルエンザ 2009 H1N1 における IgG3 欠損と重症度の関係

ウイルス感染症検査診断の新しい展開
-インフルエンザの診断-

森川佐依子*、加瀬哲男*

臨床と微生物、39、663-667 (2012)

インフルエンザの診断方法について、一般的な注意と各診断法それぞれの詳細、特長、注意点について以下の項目にまとめた。

■はじめに

■インフルエンザの診断に際して

1. ウイルス分離
2. 抗原検出
3. 遺伝子検出
4. 血清学的診断

■おわりに

*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

Diagnosis of influenza

Isolation and characterization of a novel recombinant
human adenovirus species D.

S. HIROI^{*1}, M. IZUMI^{*2}, K. TAKAHASHI^{*1},
S. MORIKAWA^{*1} and T. KASE^{*1}

J. Med. Microbiol., **61**, 1097-1102 (2012)

病原体サーベイランスにおいて、リコンビナントアデノウイルスが分離されたため、そのウイルス株の特徴を明らかにするために複数領域の遺伝子解析を行った。

その結果、ペントンベース遺伝子およびヘキソン遺伝子のうちアデノウイルスのエピトープであるループ1およびループ2領域の塩基配列は、近年新たに同定されたアデノウイルス56型と完全に一致した。また、ヘキソン遺伝子全長の塩基配列はアデノウイルス56型に高い相同性を示したが、ヘキソン遺伝子C4領域はアデノウイルス37型に相同性を示した。さらに、ファイバー遺伝子およびE3領域の塩基配列はアデノウイルス37型と100%一致した。

以上の結果から、分離されたウイルス株は、アデノウイルス37型および56型に関与している、新しいD種リコンビナントアデノウイルスであることが明らかとなった。

大阪府内における2011年の風疹患者発生状況

倉田貴子^{*}、井澤恭子^{*}、
西村公志^{*}、加瀬哲男^{*}、高橋和郎^{*1}

病原微生物検出情報, **32**, 255-257 (2011)

2010年の大阪府内の風疹報告数は10例であったが、2011年第1～28週に府内で確認された風疹症例は54例で、昨年より大きく増加した。患者の発生は第5週からみられ始め、第14週までは1週間に1～3人の発生で推移したが、第16週以降5～8人と患者数が増加した。患者数は20代で最も多く(35%)、次いで30代(30%)、40代(17%)の順であったが、いずれの年齢層でも男性の患者が多くみられた。風疹ワクチン接種歴の記載が確認できた40例のうち、ワクチン歴有り(1回)3例、無し6例、不明31例で、ほとんどの事例がワクチン接種歴について詳細な情報が得られなかった。また、3例の患者では罹患したと思われる時期に海外渡航歴があり、渡航先はそれぞれ中国および東南アジア(ベトナム、タイ)であった。

大阪府立公衆衛生研究所および堺市衛生研究所では、麻疹疑いで麻疹が否定された82症例の中で、23症例について風疹ウイルス感染を確認した。このうち、ウイルスの遺伝子型が決定できたのは3例で、いずれも遺伝子型2Bであった。遺伝子型2Bウイルスは、本来は南～東南アジアを中心に全世界で流行しているウイルスであり、昨年までは日本での報告は輸入例を除いてなかったことから、ウイルスの起源は海外に由来していると思われる。しかしながら、大阪では2～5月にかけて同じ遺伝子型のウイルスが検出されたことから、このウイルスが定着した可能性も考えられた。

*1 大阪府立公衆衛生研究所

*2 松下記念病院

新しいD種リコンビナントアデノウイルスの分離および解析

*大阪府立公衆衛生研究所

京都府と大阪府における 2010-2011 年に分離された淋菌株の性状解析

志牟田健^{*1}、飛田収一^{*2}、伊東三喜雄^{*3}、藤原光文^{*4}、
上田朋宏^{*5}、亀岡 博^{*6}、古林敬一^{*7}、川畑拓也^{*8}、
大西 真^{*1}

日本性感染症学会誌, **23**, 83-89 (2012)

2010 年 4 月から 2011 年 12 月の 21 ヶ月間に京都府と大阪府で分離同定された淋菌 151 株について、薬剤感受性試験及び分子型別を行った。これら分離株の薬剤感受性試験の結果シプロフロキサシン (CPFX)、ベンジルペニシリン (PCG)、セフィキシム (CFIX) 及びアジスロマイシン (AZM) に対してそれぞれ 78.8%、43.0%、2.0%、2.6% が耐性株であった。CTRX に対する耐性株はなかった。CFIX、AZM、CTRX に対する低感受性株は 66.2%、23.8%、17.9% であった。Multi-locus sequence typing 法解析では分離株の 65% 程度が MLST 1901、MLST 7363 及び MLST 7359 で占められた。Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing (NG-MAST) 解析では NG-MAST 1407 が 17.9% を占め優先型であった。更に今回分離された NG-MAST 1407 菌株は複数の薬剤に対する感受性の低下が示された。

^{*1} 国立感染症研究所細菌第一部

^{*2} 飛田医院

^{*3} 伊東泌尿器科

^{*4} 藤原医院

^{*5} 泌尿器科上田クリニック

^{*6} 亀岡クリニック

^{*7} そねざき古林診療所

^{*8} 大阪府立公衆衛生研究所

Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Kyoto and Osaka, 2010-2011

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ポリソルベート 80 の品質に関する研究

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**(7),
650-655(2012)

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ポリソルベート 80 (PS80) 試薬の理化学的な品質について検討した。

市販の PS80 試薬 (10 種類) の色調は、無色～褐色であり、同一ではなかった。5w/v% 水溶液を作製し pH を測定したところ、5.7～6.7 の値を示した。油脂試験を行い、酸価、けん価、ヨウ素価を比較したところ、酸価の値に差違が認められた。

次に、25w/v% メタノール溶液を調製し、HPLC による分析を行ったところ、全ての PS80 試薬のクロマトグラムから、複数のピークが確認された。市販の PS80 のクロマトグラフのパターンは、概ね 3 種類に分類された。さらに、PS80 試薬の赤外吸収スペクトルを比較したところ、他とは、スペクトルが異なるものが存在した。本研究における検討から、市販の PS80 試薬の品質は大きく異なっていることが明らかとなった。

以上の結果をふまえ、3 種類の理化学的品質が異なる PS80 試薬を使用し、ナブメトン錠、酪酸リボフラビン錠、アリルエストレノール錠について溶出試験を行った。しかし、PS80 試薬の違いによる溶出挙動の著しい差は確認できなかった。

^{*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

Effect of Variation in Quality of Polysorbate 80 Used in the Dissolution Test as a Surfactant for the Poorly Water Soluble Drug

食品中ポリソルベートの迅速分析法

野村千枝*、山口瑞香*、阿久津和彦*、尾花裕孝*

日本食品化学学会誌, **19**, 23-31 (2012)

平成 20 年 4 月に乳化剤のポリソルベート (PS) 類が食品添加物として指定され、国内での使用及び流通が可能となった。厚生労働省より通知された PS 類の分析法 (食安基発第 0430001 号) はアセトニトリル・ヘキサン・メタノール混液で抽出しアルミナオープンカラムおよびシリカゲル固相抽出カラムで精製する。しかし、回収率の低い食品がある他、塩析や 4 回の液-液分配等、煩雑な工程を含むため結果が得られるまで長時間を要する。

そこで操作の簡略化と精製度および回収率の改善を目指し市販の固相抽出カラム (シリカ、ジオール、銀、アルミナ B、グラファイトカーボンブラック) を用いて検討を行った結果、Diol と ALB を組み合わせた方法が有効であった。

本法では、PS 類を酢酸エチル-メタノール混液で抽出し、Diol と ALB を組み合わせて精製を行った後、TLC を用いた定性、比色法により定量値を算出した。

5 種類の食品における添加回収試験 (0.05-5g/kg) の結果、回収率は 47-89%、定量下限値は 0.05g/kg であった。

LC-MS/MS を用いた迅速で簡便な飲料中の残留農薬一斉分析法の実用化に向けての検討

福井直樹*、高取 聡*、北川陽子*、起橋雅浩*、小阪田正和*、中辻直人*、中山裕紀子*、柿本 葉*、尾花裕孝*

食品衛生学雑誌, **53**(4), 183-193(2012)

LC-MS/MS を用いた迅速で簡便な飲料中の残留農薬一斉分析法の実用化に向けて検討を行った。

試料にアセトニトリルを混合し、塩析・脱水処理を経て固相カラム (グラファイトカーボン/PSA) で精製し LC-MS/MS で定量した。

35 種類の飲料で検討した結果、アルコール度数の高い飲料以外は適用可能であった。

一方、アルコール飲料の回収率は低下した。

この原因は、塩析・脱水後の有機相へのエタノール混入による液量増加と推測された。

そこで、ぶどう果汁に任意の量のエタノールを添加して作成した模擬アルコール飲料を用いて検証し、本法が適用可能なエタノール濃度を 10%未満とした。

アルコール度数の高い飲料は水で希釈を行い適用できた。

本法により 1 試料当たり前処理から定量まで約 2 時間で可能で、スクリーニング分析法として活用できる。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Rapid analytical method of polysorbates in foods

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Application of a Rapid and Simple Multi-residue Method for Determination of Pesticide Residues to Drinking Water and Beverages Using Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

Characterization of the Decomposition of Compounds
Derived from Imidazolidinyl Urea in Cosmetics and Patch
Test Materials

T. DOI*, A. TAKEDA*, A. ASADA*, K. KAJIMURA*
Contact Dermatitis, 67(5), 284-292 (2012)

イミダゾリジニル尿素 (IU) は、化粧品中に配合され、分解によりホルムアルデヒド (FA) を遊離する「ホルムアルデヒドドナー型防腐剤」の一種である。IU や類縁化合物ジアゾリジニル尿素 (DU) は接触皮膚炎の原因物質としても知られている。IU と DU の間には FA を介さない交叉反応性を示唆する報告があり、FA 以外に共通の分解物が存在することが一因として考えられた。IU の分解についてはこれまでほとんど報告が見られないため、IU の分解物を同定し DU と比較することとした。

緩衝液やパッチテスト試料では、HPLC による分析で多くの試料において少なくとも 7 本のピークを与え、LC-MS による分析からこのうち 3 化合物は、アラントイン、(4-hydroxymethyl-2,5-dioxo-imidazolidine-4-yl)-urea (HU) および(3,4-bis-hydroxymethyl-2,5-dioxo-imidazolidine-4-yl)-urea (3,4-BHU)であることが示された。このうち HU、3,4-BHU については化粧品における DU の主要な分解物と共通であり、IU と DU の高い交叉反応性の原因となる可能性が考えられた。

Quantification of 1,3-Dimethylol-5,5-dimethylhydantoin
and Its Decomposition Products in Cosmetics by
High-performance Liquid Chromatography

A. ASADA*, T. DOI*, A. TAKEDA* and K. KAJIMURA*
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 67-68,
163-168 (2012)

1,3-ジメチロール-5,5-ジメチルヒダントイン (DMDMH) は化粧品中に配合され、分解によりホルムアルデヒド (FA) を遊離するホルムアルデヒドドナー型防腐剤のひとつである。ドナー型防腐剤およびそれより遊離する FA は接触性皮膚炎の原因として知られている。

DMDMH は塩基性条件下や水溶液中で容易に分解し、3種類の分解物を生成する。そのため化粧品中に配合された DMDMH を分析するにはその分解物も同時に定量する必要がある。しかしながら、これまでに簡便かつ正確な DMDMH 定量法の報告はなかった。そこで、本研究では高速液体クロマトグラフィーを用いて、DMDMH とその分解物 3 種類を同時に分析、定量できる手法を確立した。

これにより、防腐剤として添加された DMDMH が化粧品サンプル中で分解した場合でも、元の配合量を正確に定量することが可能となった。この分析法のバリデーションは検量線の作成、添加回収実験、および室内再現性の確認によって担保された。また、DMDMH が配合された市販化粧品を用いて本分析法の有用性を確認した。

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

化粧品およびパッチテスト試料におけるイミダゾリジニル尿素由来分解物の解析

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

高速液体クロマトグラフィーによる、化粧品中の 1,3-ジメチロール-5,5-ジメチルヒダントインとその分解物の定量

大阪府における水道水およびヒト血清中
有機フッ素化合物の濃度について

S. TAKAGI^{*1}, J. YOSHIDA^{*1} and F. ADACHI^{*1}

Proceedings of International Symposium on Advanced
Studies by Young Scientists on Environmental Pollution
and Ecotoxicology, 245-251 (2012)

水溶性の高い有機フッ素化合物 (PFCs) が水道水から世界規模で検出されており、ヒトへの曝露源の一つとし懸念されている。そこで、水道水中の 17 種類の PFCs について分析を行い、存在実態の把握およびその摂取量を推定した。また、大阪府に在住または在勤のヒト血清中の PFCs も同時に分析し、汚染状況を調べた。

水道水からはパーフルオロアルキルカルボン酸では PFOA が最も高く検出され、PFHxA、PFHpA、PFNA が続いた。また、パーフルオロアルキルスルホン酸では PFOS が最も検出濃度が高かった。水道水からの摂取量は PFOS が 1.4 ng/day、PFOA が 25 ng/L であった。

一方、ヒト血清からは PFOA、PFNA、PFUdA、PFDA、PFOS、PFHxS が検出された。

水道水とヒト血清中 PFCs を比較したところ、水道水から検出される短鎖 PFCs が血清からは検出されなかった。また、水道水からは検出されない長鎖 PFCs が血清からは検出された。このことは炭素鎖の違いによる蓄積性の違いが考えられた。また、長鎖 PFCs については水道水以外の曝露源が存在している可能性が示唆された。

Association between Occupational Exposure and Control
Measures for Antineoplastic Drugs in a Pharmacy of a
Hospital

J. YOSHIDA^{*1}, S. KODA^{*2}, S. NISHIDA^{*3},
H. NAKANO^{*3}, G. TEI^{*3} and S. KUMAGAI^{*4}

Ann. Occup. Hyg., 57, 251-260 (2013)

抗がん剤は細胞毒性を有しており適切な取り扱いが必要とされている。これまでのところ、クローズドシステムなど一種類の改善についてその有用性を評価した報告はあるが、設備や訓練、マニュアルの作成など総合的な安全対策について客観的に有用性を評価した報告はほとんどなされていない。そこで本研究の目的は、病院が行う総合的な安全対策の効果を客観的に評価し、より効率的に安全な職場環境を構築することである。本研究では、大阪府内の病院 A における安全対策の実施状況をチェックリストを用いて数値化した。2007 年から 2011 年 2 月にかけて職場環境中抗がん剤 (シクロホスファミド、フルオロウラシル、ゲムシタビン、白金化合物) のモニタリング調査の結果とチェックリスト点数の変化について関連性を調べた。次に、抗がん剤を調製する薬剤師の尿中シクロホスファミド量とフルオロウラシルの尿中代謝物であるアルファフルオロベータアラニン量を測定し、安全対策の進捗状況との関連を調べた。これらの結果を踏まえ、病院 A が実施してきた安全対策の有用性の評価を行った。その結果、環境中および尿中抗がん剤濃度は、2007 年から 2011 年にかけて減少したが、そのパターンは薬剤ごとに異なっていた。薬剤ごとの容器や安全対策が異なるためと考えられた。そして、チェックリストのすべての項目の点数を上げることが、環境汚染を減少させるのに有効であることが示唆された。

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

Concentrations of Perfluorinated Compounds in Tap Water and Human Serum from Osaka, Japan

^{*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} 大阪府立成人病センター

^{*4} 産業医科大学

抗がん剤調製における安全対策の点数化と職業性曝露指標との関連について

フルオロウラシルのバイアル化に伴う調製環境中への
漏出量の減少および調製時間の短縮

吉田 仁^{*1}、中野寛之^{*2}、丁元鎮^{*2}、西田升三^{*3}、
甲田茂樹^{*4}、熊谷信二^{*5}

医療薬学, 38, 409-413 (2012)

本研究の目的は、フルオロウラシル (5FU) のバイアル製剤の有用性を評価することである。調製業務の中で調製者に対する負担が大きい業務の一つであるインフューザーポンプ調製に着目し、5FU の環境中への漏出量および調製者の手袋への付着量を測定し、同時に調製に必要な作業時間を計測した。そして、バイアル使用時とアンプル使用時における比較を行った。アンプル使用時におけるステンレストレイ漏出量の中央値は 61 ng/cm²であったが、バイアルを使用することにより中央値が検出下限値未満となり、有意に減少した (P = 0.003、Mann-Whitney の U 検定)。調製時間も同様に、中央値が 347 秒から 169 秒となり、有意に減少した (P < 0.001、Mann-Whitney の U 検定)。以上より、バイアル製剤の有用性が確認された。

Occurrence of Fluoroquinolones and
Fluoroquinolone-resistance Genes in the Aquatic
Environment

F. ADACHI^{*1}, A. YAMAMOTO^{*2}, K. TAKAKURA^{*2},
and R. KAWAHARA^{*3}

Sci. Total Environ., 444, 508-514 (2013)

水環境中のフルオロキノロン類 (FQs) の測定を行った。また FQs 耐性大腸菌を水環境試料から分離し、FQs 耐性について表現型および遺伝子型で評価を行った。その結果、大阪府内水環境中から 6 種の FQs が 0.1 to 570 ng/L で検出された。また FQs 耐性大腸菌も存在していた。FQs の濃度と FQs 耐性大腸菌の検出数には明確な関係は存在しなかった。多くの FQs 耐性大腸菌がキノロン耐性決定領域 (QRDRs) に変異をもっており、これらの分離株におけるアミノ酸変異は臨床分離株の変異パターンとよく類似していた。

また、6 株がプラスミド性キノロン耐性 (Plasmid-mediated quinolone resistance :PMQR) 因子 qnrS1 を持っており、それらは CPFX とナリジクス酸に対して低い感受性を示した。すなわち CPFX に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.25 µg/mL、NA に対しては 8~16 µg/mL であった。プラスミドが保有する qnr 遺伝子は、それ自体がキノロン系抗菌剤に対して強い耐性を与えないことが確認された。しかしながら、今回、水環境中からはじめて qnrS1 を検出し、環境中に PMQR 因子が伝播される可能性が示唆された。この本調査は、大阪の水環境における耐性菌に関する貴重な基礎データとなると考えられる。

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所

^{*2}大阪府立成人病センター

^{*3}大阪府立公衆衛生研究所近畿大学薬学部

^{*4}独立行政法人労働安全衛生総合研究所

^{*5}産業医科大学

Use of a Vial Form of Fluorouracil to Reduce Occupational Contamination
in the Hospital Work Environment and Increase the Efficiency of Mixing
Operation

^{*1}大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

^{*2}大阪市立環境科学研究所

^{*3}大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

水環境中のフルオロキノロン類抗菌剤とその耐性遺伝子の分布について

揮発性有機化合物による乗用車室内空気の汚染

吉田俊明 *

環境技術, 41, 212-217 (2012)

現代の車社会では、乗用車の室内で長時間過ごす人も多く、車室内は重要な生活環境の一部として位置づけられる。近年の自動車用エアコンの普及により、窓を開放して走行する車の数は減少しているように見られる。窓の閉鎖により車室内は密室となり、乗員は車室内の内装品等から放散される化学物質に長時間曝露される。車室内は、一般住宅室内に比較して、容積に対して占める内装品等の割合が大きく、また、夏季では室温が上昇しやすい。したがって、車室内の空气中化学物質濃度は住宅室内よりもかなり高いと推定され、乗員への健康影響が懸念される。しかし、車室内の内装品等から放散される化学物質による車室内空気の汚染に関する情報は少なく、その実態は十分把握されていないのが現状である。

本稿では、国産乗用車の室内空气中に存在する化学物質の種類とその濃度、新車納入後の化学物質濃度の経年的な推移、車両の仕様や使用状況による室内空気汚染の違い等に関して、我々が実施した調査結果を紹介するとともに、車室内空气中化学物質の低減化にむけた自動車産業界の取り組みについて記述した。

Identification of Urinary Metabolites in Rats Administered the Fluorine-Containing Pyrethroids Metofluthrin, Profluthrin, and Transfluthrin

T. YOSHIDA *

Toxicol. Environ. Chem., 94, 1789-1804 (2012)

近年、一般住宅内において蚊取りや衣料の防虫を目的としたピレスロイド系殺虫剤の使用が増加している。これらの薬剤を使用する住民への健康影響が懸念され、その吸収量の把握は重要である。体内に吸収された化学物質の量は、一般に尿中に排泄されるその物質の代謝物の量から推定される。

本研究では、最近特に使用頻度の高い3種の含フッ素ピレスロイド剤（メトフルトリン、プロフルトリン、トランスフルトリン）の住民における吸収量を把握する目的で、まず、動物実験により尿中に排泄されるこれらの代謝物を同定した。

各ピレスロイド剤を腹腔内に投与したラットから採取した尿をガスクロマトグラフ/質量分析計により分析した。メトフルトリン投与ラットの尿からは3種（4-メトキシメチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール、4-ヒドロキシメチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール、2,2-ジメチル-3-(1-プロペニル)-シクロプロパンカルボン酸）、プロフルトリン投与ラットでは4種（4-メチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール、4-メチル-2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸、4-ヒドロキシメチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール、2,2-ジメチル-3-(1-プロペニル)-シクロプロパンカルボン酸）、トランスフルトリン投与ラットでは3種（2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール、2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸、3-(2,2-ジクロロビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパンカルボン酸）の代謝物がそれぞれ尿中より同定された。各代謝物の大部分は抱合体として尿中に排泄されると考えられた。

* 大阪府立公衆衛生研究所 企画総務部 企画調整課

Air Pollution in Automotive Cabins by Volatile Organic Compounds Diffusing from Interior Materials.

* 大阪府立公衆衛生研究所 企画総務部 企画調整課

ラットにおける含フッ素ピレスロイド剤 メトフルトリン、プロフルトリンおよびトランスフルトリンの尿中代謝物の同定

Analytical Method for Urinary Metabolites of the Fluorine-Containing Pyrethroids Metofluthrin, Profluthrin and Transfluthrin by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

T. YOSHIDA *

J. Chromatogr. B, 913-914, 77-83 (2013)

近年殺虫剤や衣料用防虫剤として住居内での使用量が増加している含フッ素ピレスロイド剤メフトリン、プロフトリンおよびトランスフトリンについて、一般生活環境下の住民における吸収量を尿中に排泄される代謝物量から把握することを目的とし、既報においてラットにおける各ピレスロイド剤の主要な尿中代謝物を同定した。

本研究では、同定された合計8種の代謝物(2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール、2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸、4-メチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール、4-メチル-2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸、4-メキシメチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール、4-ヒドロキシメチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール、2,2-ジメチル-3-(1-プロペニル)-シクロプロパノカルボン酸、3-(2,2-ジクロロビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパノカルボン酸)のガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)による定量方法について検討した。

尿中に排泄された代謝物は、酵素(β -グルクロニダーゼおよびスルファターゼ)で抱合を加水分解したのち、酸性下トルエンで抽出した。抽出液を濃縮したのち、代謝物を誘導体化(アルコール類代謝物:トリメチルシリル化、カルボン酸類代謝物:tert-ブチルジメチルシリル化)し、GC/MS(電子衝撃イオン化法)により定量(内部標準法)した。

各代謝物は、20 $\mu\text{g/ml}$ 以下の尿中濃度において正確に再現性よく定量可能であった(定量下限濃度:0.01-0.03 $\mu\text{g/ml}$)。採取した尿試料は1ヵ月間-20°Cにて冷凍保存可能であった。

Possible Link between Nitrous Acid and Asthma Induced by Fine Particles

M. OHYAMA *1, N. TAKENAKA *2 and H. BANDOW *2

J. Clinic. Toxicol., 2, 1000e107 (2012)

大気中のファインパーティクル(PM2.5)は喘息と関連すると疫学調査で示されている。また、二酸化窒素と喘息との関連が疫学調査で示されている。一方、二酸化窒素は大気中でスス(PM2.5を含む浮遊粒子状物質)にぶつかれば、亜硝酸が生成されることが知られている。亜硝酸は未規制であり、環境測定局などで常時濃度監視がされておらず、亜硝酸と喘息との関連を調べた疫学調査は少ない。しかし、亜硝酸や二酸化窒素と喘息との関連を調べた疫学調査では、従来二酸化窒素の影響とされていた喘息影響は、実際は亜硝酸が原因だったと考察されている。つまり、大気汚染物質による喘息の重要な原因物質は亜硝酸である可能性があり、亜硝酸を生成促進する物質としてPM2.5や二酸化窒素が関与している可能性がある。

従って、大気汚染物質と喘息との関連を調べる疫学調査では、亜硝酸濃度も測定することが望ましい。

* 大阪府立公衆衛生研究所 企画総務部 企画調整課

ガスクロマトグラフィー/質量分析による含フッ素ピレスロイド剤メフトリン、プロフトリンおよびトランスフトリンの尿中代謝物の定量法

*1 大阪府立公衆衛生研究所

*2 大阪府立大学大学院工学研究科

PM2.5の喘息影響における亜硝酸の関与の可能性

人口減少を踏まえた
生活排水処理施設整備評価システムの構築

小川浩*1、細井由彦*2、城戸由能*3、関川貴寛*4、
奥村早代子*5、樽林茂夫*6

用水と廃水, 54(5), 376-383 (2012)

人口密度が低く、かつ減少が進む地域においては、社会基盤整備において集積のメリットが働きにくく、経済的効率性も低く、整備や施設利用の期間が長期に及ぶにもかかわらず、その間に人口減少が進捗するという現象が生じてきている。さらに、地方自治体の財政状況も悪化し、従来の生活排水処理施設整備計画の遂行に対しても大幅な変更あるいは修正が求められてきている。これまでの生活排水処理施設整備計画は、人口増を前提として検討されてきたが、少子高齢化社会に向けた取組みでは、地域によって著しく人口減少を伴うことが予測されている。とくに、評価対象地域における集合処理と個別処理の選択においては、将来の人口推移も事業費に影響を及ぼすことから、対象地区の人口と世帯数の将来予測を考慮する必要がある。これらの状況を踏まえて、本研究では人口減少を考慮した生活排水処理施設整備にかかわる事業費の評価に活用可能な整備計画財政支援ソフトウェアを構築し、その仕様を検討した。

*1 富士常葉大学社会環境学部

*2 鳥取大学大学院工学研究科

*3 京都大学防災研究所

*4 静岡県立大学環境科学研究所

*5 大阪府立公衆衛生研究所 生活環境課

*6 日本環境安全事業（株）

The Construction of Wastewater Treatment Facility's Evaluation
System on the Basis of a Population Decline

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

CONTENTS

—RESEARCH REPORTS—

West Nile Virus Surveillance in Osaka Prefecture
(Fiscal 2012 Report)

I. AOYAMA, T. YUMISASHI, D. KANBAYASHI, Y. KUMAI, Y. MATSUI,
K. NAKANISHI, Y. UEZAWA, T. HIRATA, T. KASE and K. TAKAHASHI 1

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture
(Fiscal 2012 Report)

K. NAKATA K. YAMAZAKI N. SAKON and T. KASE 7

Survey of Pyrethroid Pesticide Residues in Kampo Products by Gas Chromatography / Mass
Spectrometry

A. AOYAMA, A. TAKEDA, T. TAGAMI and Y. SAWABE 14

Detection of Mutaprodenafil in Dietary Supplement and Examination of Its Acid Treatment
Conditions

A. AOYAMA, A. ASADA, A. TAKEDA, T. DOI, Y. SATSUKI, T. TAGAMI
and Y. SAWABE 18

Inspection of Illicit Drugs in Osaka (Apr. 2011-Mar. 2013)

A. TAKEDA, A. ASADA, T. TAGAMI, T. DOI, M. KAWAGUCHI and Y. SAWABE 23

Questionnaire Survey on Drug Residue at Drugstores in the Seven Cities of Osaka Prefecture

T. OKAMURA and M. MIMURA 28

Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2012 Report)

E. AZUMA, T. HIZUKA and S. ADACHI 34

Effects of Sodium Laureth Sulfate on Mice by Inhalation Exposure (II)

E. AZUMA and T. NAKAJIMA 42

Effects of Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monooleate on Mice by Applied to Skin

T. NAKAJIMA and E. AZUMA 51

—ABSTRACTS—

Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC β -Lactamase-Producing Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011	57
M. TAGUCHI, R. KAWAHARA, K. SETO, T. HARADA and Y. KUMEDA	
Outbreak of Dysentery Due to <i>O157</i> in a Nursery School, February-March 2012- Osaka (in Japanese)	57
Y. OKAMOTO, N. UZITA, Y. SOUE, Y. TASHIRO, M. SHIBATA, N. KITAZIMA, Y. SASAI, F. OHDAIRA, Y. MATSUI, K. DATE, Y. KUMAI, K. SETO, T. HARADA and M. TAGUCHI	
Clinical Significance of	
T. OOKA, K. SETO, K. KAWANO, H. KOBAYASHI, Y. ETOH, S. ICHIHARA, A. KANEKO, J. ISOBE, K. YAMAGUCHI, K. HORIKAWA, T. A. T. GOMES, A. LINDEN, M. BARDIAU, J. G. MAINIL, L. BEUTIN, Y. OGURA and T. HAYASHI	58
Public Health Importance of Non-O157 Shiga Toxin-Producing <i>E. coli</i> (in Japanese)	58
K. SETO	
Rapid Diagnosis and Confirmed Diagnosis of Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (in Japanese)	59
K. SETO, S. IYODA and J. TERAJIMA	
Prevalence of <i>O157</i> in Dogs in Osaka, Japan	59
C. KATSUKAWA, T. KOMIYA, H. YAMAGISHI, A. ISHII, S. NISHINO, S. NAGAHAMA, M. IWAKI, A. YAMAMOTO and M. TAKAHASHI	
Dominant Incidence of Distinct Multidrug and Extensively Drug-resistant <i>E. coli</i> <i>O157</i> Clones in Osaka Prefecture, Japan	60
A. TAMARU, C. NAKAJIMA, T. WADA, Y. WANG, M. INOUE, R. KAWAHARA, R. MAEKURA, Y. OZEKI, H. OGURA, K. KOBAYASHI, Y. SUZUKI and S. MATSUMOTO ..	
Identification of <i>O157</i> as the Causative Agent of Novel Food Poisoning Outbreaks in Japan by Consumption of <i>O157</i> in Raw Fish	60
T. KAWAI, S. SEKIZUKA, Y. YAHATA, M. KURODA, Y. KUMEDA, Y. IJIMA, Y. KAMATA, Y. SUGITA-KONISHI and T. OHNISHI	
Production and Characterization of a Monoclonal Antibody against Recombinant Thermolabile Hemolysin and its Application to Screen for <i>O157</i> Contamination in Raw Seafood	

J. SAKATA, K. KAWATSU, R. KAWAHARA, M. KANKI, T. IWASAKI, Y. KUMEDA, and H. KODAMA	61
Production and Characterization of a Novel Monoclonal Antibody against <i>o</i> <i>p mp</i> F ₀ F ₁ ATP Synthase's Delta Subunit and its Application for Rapid Identification of the Pathogen	
J. SAKATA, K. KAWATSU, T. IWASAKI, K.TANAKA, S. TAKENAKA, Y. KUMEDA and H. KODAMA	61
Isolation and Characterization of Genotype Vancomycin-resistant <i>o o</i> <i>o m</i> from Retail Poultry in Japan	
T. HARADA, R. KAWAHARA, M. KANKI, M. TAGUCHI and Y. KUMEDA	62
Development of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of <i>o</i> <i>p mp</i> in Olive Flounder (<i>o</i>)	
T. HARADA, T. KAWAI, H. SATO, H. YOKOYAMA and Y. KUMEDA	62
Detection of <i>o p mp</i> 18S Ribosomal DNA in Patient Fecal Samples from Novel Foodborne Outbreaks Caused by Consumption of Raw Olive Flounder (<i>o</i>)	
T. HARADA, T. KAWAI, M. JINNAI, T. OHNISHI, Y. SUGITA-KONISHI and Y. KUMEDA ..	63
Inactivation of Norovirus by Low Levels of Dissolved Ozone (in Japanese)	
K. YAMAZAKI and K. NAKAMURO	63
Inactivation of the 2009 Pandemic Influenza Virus by Low-Level Dissolved Ozone (in Japanese)	
K. NAKAMURO, H.NAKADA, K. ICHIKAWA, N. KOSAKA and K. YAMAZAKI	64
Characterization of a nonspecific inhibitor found in human sera raised against the 2006/07 influenza vaccine strain A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) virus. (in Japanese)	
A. MAEDA, S. MORIKAWA, T. KASE, S. IRIE, Y. HIROTA	64
IgG3 deficiency and severity of 2009 pandemic H1N1 influenza.	
E. SAKAI, T. YAMAMOTO, K. YAMAMOTO, Y. MIZOGUCHI, H. KANENO, M. IHASHI, M. TAKENO, K. ANZAI, T. KASE, T. SHIMOTSUJI	65
Diagnosis of influenza (in Japanese)	
S. MORIKAWA, T. KASE	65
Isolation and characterization of a novel recombinant human adenovirus species D.	
S. HIROI, M. IZUMI, K. TAKAHASHI, S. MORIKAWA and T. KASE	66

Epidemiology of Rubella virus in Osaka Prefecture, 2011 (in Japanese)	
T. KURATA, K. IZAWA, H. NISHIMURA, T. KASE and K. TAKAHASHI	66
Characterization of <i>o o o</i> strains isolated in Kyoto and Osaka, 2010-2011 (in Japanese)	
K. SHIMUTA, S. HIDA, M. ITOH, M. FUJIWARA, T. UEDA, H. KAMEOKA, K. FURUBAYASHI, T. KAWAHATA and M. OHNISHI	67
Effect of Variation in Quality of Polysorbate80 Used in the Dissolution Test as a Surfactant for the Poorly Water Soluble Drug (in Japanese)	
K. KAJIMURA, M. KAWAGUCHI and C. YOMOTA	67
Rapid Analytical Method of Polysorbates in Foods (in Japanese)	
C. NOMURA, M. YAMAGUCHI, K. AKUTSU and H. OBANA	68
Application of a Rapid and Simple Multi-residue Method for Determination of Pesticide Residues to Drinking Water and Beverages Using Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (in Japanese)	
N. FUKUI, S. TAKATORI, Y. KITAGAWA, M. OKIHASHI, M. OSAKADA, N. NAKATSUJI, Y. NAKAYAMA, Y. KAKIMOTO and H. OBANA	68
Characterization of the Decomposition of Compounds Derived from Imidazolidinyl Urea in Cosmetics and Patch Test Materials	
T. DOI, A. TAKEDA, A. ASADA, K. KAJIMURA	69
Quantification of 1,3-Dimethylol-5,5-dimethylhydantoin and Its Decomposition Products in Cosmetics by High-performance Liquid Chromatography	
A. ASADA, T. DOI, A. TAKEDA and K. KAJIMURA	69
Concentrations of Perfluorinated Compounds in Tap Water and Human Serum from Osaka, Japan	
S. TAKAGI, J. YOSHIDA and F. ADACHI	70
Association between Occupational Exposure and Control Measures for Antineoplastic Drugs in a Pharmacy of a Hospital	
J. YOSHIDA, S. KODA, S. NISHIDA, H. NAKANO, G. TEI and S. KUMAGAI	70
Use of a Vial Form of Fluorouracil to Reduce Occupational Contamination in the Hospital Work Environment and Increase the Efficiency of Mixing Operation (in Japanese)	
J. YOSHIDA, H. NAKANO, G. TEI, S. NISHIDA, S. KODA and S. KUMAGAI	71

Occurrence of Fluoroquinolones and Fluoroquinolone-resistance Genes in the Aquatic Environment	
F. ADACHI, A. YAMAMOTO, K. TAKAKURA, and R. KAWAHARA	71
Air Pollution in Automotive Cabins by Volatile Organic Compounds Diffusing from Interior Materials (in Japanese)	
T. YOSHIDA	72
Identification of Urinary Metabolites in Rats Administered the Fluorine-Containing Pyrethroids Metofluthrin, Profluthrin, and Transfluthrin	
T. YOSHIDA	72
Analytical Method for Urinary Metabolites of the Fluorine-Containing Pyrethroids Metofluthrin, Profluthrin and Transfluthrin by Gas Chromatography/Mass Spectrometry	
T. YOSHIDA	73
Possible Link between Nitrous Acid and Asthma Induced by Fine Particles	
M. OHYAMA, N. TAKENAKA and H. BANDOW	73
The Construction of Wastewater Treatment Facility's Evaluation System on the Basis of a Population Decline (in Japanese)	
H. OGAWA, Y. HOSOI, Y. KIDO, T. SEKIKAWA, S. OKUMURA and S. KUREBAYASHI ..	74

大阪府立公衆衛生研究所 研究報告
第 51 号

発行年月日	平成25年10月
編集兼 発行者	大阪府立公衆衛生研究所 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