

# 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告

平成26年



BULLETIN  
OF  
OSAKA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

---

No.52(2014)

---

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（2013年度）	弓 指 孝 博 小 川 有 理 福 村 和 美 中 西 顕 一 郎 辻 野 悦 次 高 橋 和 郎	青 山 幾 子 松 本 治 子 松 井 陽 子 平 田 武 志 加 瀬 哲 男	1
大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析（2013年度）	中 田 恵 子 左 近 直 美 加 瀬 哲 男	山 崎 謙 治 駒 野 淳	7
牛乳中合成抗菌剤の同時分析法の開発と妥当性評価	内 田 耕 太 郎 山 口 貴 弘 起 橋 雅 浩 梶 村 計 志	柿 本 健 作 永 吉 晴 奈 小 西 良 昌	15
溶液中における合成抗菌剤の安定性	内 田 耕 太 郎 山 口 貴 弘 起 橋 雅 浩 梶 村 計 志	柿 本 健 作 永 吉 晴 奈 小 西 良 昌	21
特定原材料検査における「小麦」と「えび」の検出事例について — 平成21年度～平成25年度 —	清 田 恭 平 野 村 千 枝 山 口 瑞 香 柿 本 幸 子 梶 村 計 志	吉 光 真 人 栗 津 薫 岡本-柿本 葉 阿久津和彦	27
ウーロン茶葉中のインドキサカルブおよびフィプロニル試験法の検討	山 口 聡 子 北 川 陽 子 山 本 遥 菜 尾 花 裕 孝	高 取 聡 福 井 直 樹 梶 村 計 志	30
魚介類中ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の汚染実態調査について	山 口 貴 弘 永 吉 晴 奈 梶 村 計 志	柿 本 健 作 小 西 良 昌	35
ヒョウタンによる食中毒事例について	山 口 瑞 香 清 田 恭 平	野 村 千 枝 梶 村 計 志	41

遺伝子組換え大豆の検査結果 - 平成13年～平成25年 - . . . . .	吉 光 真 人 野 村 千 枝 山 口 瑞 香 阿 久 津 和 彦 梶 村 計 志	清 田 恭 平 粟 津 薫 柿 本 幸 子 高 取 聡 尾 花 裕 孝	44
大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点 -1,4-ジオキサン (平成23年度) - . . . . .	小 泉 義 彦	足 立 伸 一	49
大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点 -全有機炭素 (TOC) の量 (平成24年度) - . . . . .	小 泉 義 彦	足 立 伸 一	53
生活系排水余剰汚泥中の微生物の熱不活化の検討 . . . . .	中 野 仁	足 立 伸 一	58
大阪府における環境および食品中放射能調査 (平成25年度 報告) . . . . .	肥 塚 利 江 足 立 伸 一	東 恵 美 子	67
<b>—資料—</b>			
「第17回一日体験講座」レポート□ —楽しい科学実験の構築に 向けて— . . . . .	阿 久 津 和 彦 吉 田 俊 明 梶 村 計 志	清 田 恭 平 木 村 明 生 尾 花 裕 孝	75
<b>—抄録—</b>			
トランスフルトリン曝露における生物学的モニタリング指標： ラットにおけるトランスフルトリン代謝物の尿中排泄の動力学 的解析 (英文) . . . . .	吉 田 俊 明		91
大阪府内で捕獲された放浪犬の腸管寄生蠕虫保有調査 (英文) . . . . .	木 村 明 生 長 濱 信 也 枝 川 亜 希 子 杉 山 広	森 島 康 之 堀 越 敬 之 倉 田 貴 子 山 崎 浩	91
JATA (12)-VNTR型別による結核集団発生事例の菌株異同 調査 . . . . .	田 丸 亜 貴 岩 本 朋 忠	和 田 崇 之 長 谷 篤	92
エンテロウイルス . . . . .	宗 村 徹 也 西 村 公 志	中 田 恵 子 左 近 直 美	92
各種ウイルスに対する新規速乾性すり込み式手指消毒薬の 有効性評価 . . . . .	山 崎 謙 治	中 田 恵 子	93
大阪府における流行性角結膜炎由来D種アデノウイルスの			

分子疫学解析（2001-2010）（英文）	・ ・ ・ ・ ・	廣井 聡 高橋 和郎 加瀬 哲男	森川 佐依子 駒野 淳	93
顕著な臨床症状をともなう成人のワクチン関連麻疹の一例 （英文）	・ ・ ・ ・ ・	倉田 貴子 木下 瞳 松井 陽子 松本 治子 村田 綾子 山本 季代子 大原 俊剛 駒野 淳 高橋 和郎	上林 大起 新井 智 福村 和美 大平 文人 小西 真希 中野 麗羅 大鶴 榮史 加瀬 哲男	94
風疹診断後に麻疹と判明した一症例	・ ・ ・ ・ ・	倉田 貴子 駒野 淳 高橋 和郎 福村 和美 大平 文人 久保 弘美 津田 信子	上林 大起 加瀬 哲男 松井 陽子 松本 治子 有村 亜弥子 野田 昌宏 高林 弘の	94
大阪府内における風疹の流行状況と実験室診断	・ ・ ・ ・ ・	倉田 貴子		95
HBVの遺伝子解析により示された、リスクの高い行動をとる 集団におけるHIV感染の流行と疫学的特徴（英文）	・ ・ ・ ・ ・	小島 洋子 森 治代 谷口 恭一 谷口 幸一 駒野 淳	川畑 拓也 古林 敬一 岩佐 厚子 木村 博子	95
地方自治体における感染症発生動向調査関連業務の改善を 目的とした性感染症発生動向調査活用ガイドライン について	・ ・ ・ ・ ・	山岸 拓也 川畑 拓也 高野 つる代 堀 成美 中瀬 克己	尾本 由美子 白井 千香 多田 有希 山内 昭則	96
HIV急性感染期の診断における第4世代HIV迅速検査試薬の 性能評価	・ ・ ・ ・ ・	川畑 拓也 貞升 健志 森 治代	長島 真美 小島 洋子	96
京都府と大阪府における淋菌分離株の抗菌薬耐性変異と分子 タイピング（2010-2012、日本）：最初の高水準セフトリア キソン耐性株（H041）検出後の強化サーベイランス（英文）	・ ・	志牟田 健一 中山 周 道林 美里 大西 真	Magnus Unemo 石原 朋子 川畑 拓也	97

ヒト体外受精用の培養液およびタンパク製剤からのポリ 臭素化ジフェニルエーテルの検出 (英文) . . . . .	阿久津和彦 中澤裕之	高取 聡 牧野恒久	97
大阪における大気および食品経由デクロラン・プラス及び ポリ臭素化ジフェニルエーテル曝露量評価 (英文) . . . . .	柿本健作 高木総吉 小西良昌 早川和一	永吉晴奈 阿久津和彦 梶村計志 鳥羽 陽	98
照射食肉および照射加工食品中の2-アルキルシクロブタノンの 迅速簡便な分析法の開発 (英文) . . . . .	北川陽子 高取 聡 尾花裕孝 西山利正	起橋雅浩 梶村計志 古田雅一	98
LC-MS/MSを用いた迅速な野菜類および果実類中の残留農薬 一斉分析法の妥当性評価 . . . . .	高取 聡 福井直樹 北川陽子 小阪田正和 梶村計志	山本遥菜 山口聡子 柿本 葉 起橋雅浩 尾花裕孝	99
加工食品原材料中における残留農薬濃度の推定の試み . . . . .	福井直樹 北川陽子 梶村計志	高取 聡 起橋雅浩 尾花裕孝	99
LC-MS/MSによる農産物を主原料とした加工食品中の残留農薬 一斉分析法の検討 . . . . .	福井直樹 北川陽子 梶村計志	高取 聡 起橋雅浩 尾花裕孝	100
分散固相および固相カートリッジを用いたLC-MS/MSによる 食肉中の動物用医薬品一斉分析法 . . . . .	山口貴弘 永吉晴奈 起橋雅浩	柿本健作 山口瑞香 梶村計志	100
LC-MS/MSによる食品中のセレウス菌嘔吐毒セレウリドの 迅速分析法 (英文) . . . . .	山口瑞香 北川幹也	河合高生 久米田裕子	101
固相抽出を用いた生薬中のアリストロキア酸の簡便かつ 選択的な検出法 (英文) . . . . .	田上貴臣 淺田安紀子 土井崇広 梶村計志 尾花裕孝	武田章弘 青山愛倫 川口正美 沢辺善之 山崎勝弘	101
LC/MSを用いた健康食品中の18種類の違法添加物を対象とした			

一斉分析（英文）	・・・・・・・・・・・・・・・・	田上貴臣 武田章弘 土井崇広 沢辺善之	青山愛倫 浅田安紀子 梶村計志	102
LC/MSを用いた健康食品中のヒドロキシチオホモシルデナフィル、 アミノタダラフィル、チオシルデナフィル、ジメチルシルデナフィル、 チオジメチルシルデナフィルの一斉分析（英文）	・・・・・・・・	田上貴臣 浅田安紀子 土井崇広 沢辺善之	武田章弘 青山愛倫 梶村計志	102
大阪府水道水質検査外部精度管理－シアン化物イオン及び 塩化シアン（平成22年度）－	・・・・・・・・	中島孝江 田中榮次 木村直昭	宮野啓一 尾沼大輔 足立伸一	103
レジオネラ検査ろ過濃縮法におけるメンブランフィルター 材質の回収率比較	・・・・・・・・	枝川亜希子 三輪由佳 足立伸一	木村明生 田中榮次 宮本比呂志	103
低負荷家庭用浄化槽の間欠ばっ気運転による省電力化と 水質への影響	・・・・・・・・	中野仁 井上俊行	奥村早代子 近藤伊知朗	104
動物曝露実験用の亜硝酸ガス発生装置の開発（英文）	・・・	大山正幸 安達修一	岡憲司 竹中規訓	104
有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中の トリス（2,3-ジブロムプロピル）ホスフェイト分析法の改定 に向けた検討	・・・・・・・・	味村真弓 吉田仁 河上強志	中島晴信 吉田俊明 伊佐間和郎	105

# 大阪府におけるウエストナイルウイルスに対するサーベイランス調査 (2013 年度)

弓指孝博\*<sup>1</sup> 青山幾子 \*<sup>1</sup> 小川有理\*<sup>1</sup> 松本治子\*<sup>2</sup> 福村和美\*<sup>2</sup> 松井陽子\*<sup>3</sup>  
中西顕一郎\*<sup>4</sup> 平田武志\*<sup>5</sup> 辻野悦次\*<sup>5</sup> 加瀬哲男\*<sup>1</sup> 高橋和郎\*<sup>6</sup>

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 に対する検査を実施している。

2013 年度は 6 月末から 10 月初めにかけて府内 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 8 種 5702 匹で、そのうちアカイエカ群(45.1%)とヒトスジシマカ(48.8%)が大部分を占め、次いでコガタアカイエカ(5.8%)が多く採集された。その他にはシナハマダラカ、トウゴウヤブカ、キンパラナガハシカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカが捕集された。定点別、種類別に 384 プールの蚊について WNV の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、2013 年度中に当所へ搬入された死亡カラス 12 頭の脳について WNV の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、日本脳炎ウイルスやデングウイルスなどとともにフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、主に蚊の媒介によってヒト

に感染する。発症した場合、多くは熱性疾患(ウエストナイル熱)にとどまるが、高齢者などではしばしば脳炎(ウエストナイル脳炎)を引き起こして、死亡あるいは重い後遺症の原因となる。ウエストナイル熱(脳炎)は、アフリカ、ヨーロッパ、西アジア、中東などで散発的に流行してきた感染症であるが<sup>1)</sup>、1999 年にそれまで流行のなかった米国で初めて患者が発生し、それ以後北米での流行が毎年続いている。わが国では 2005 年に米国に渡航した邦人がウエストナイル熱に罹患した症例が初めて確認された<sup>2)</sup>。

ウエストナイルウイルスを媒介し得る蚊はわが国にも普通に分布しているため、国内への侵入、流行を監視する必要があり、国のガイドラインにおいても地方自治体における媒介蚊の調査体制が強く求められている<sup>3)</sup>。

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<sup>4,5)</sup>。

\*<sup>1</sup>大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

\*<sup>2</sup>大阪府健康医療部保健医療室地域保健感染症課(現医療対策課)

\*<sup>3</sup>大阪府健康医療部保健医療室地域保健感染症課  
(現大阪府茨木保健所検査課)

\*<sup>4</sup>元大阪府健康医療部保健医療室地域保健感染症課

\*<sup>5</sup>大阪府健康医療部環境衛生課

\*<sup>6</sup>大阪府立公衆衛生研究所

West Nile Virus Surveillance in Osaka Prefecture  
(Fiscal 2013 Report)

by Takahiro YUMISASHI, Ikuko AOYAMA, Yuri OGAWA, Haruko MATSUMOTO, Kazumi FUKUMURA, Yoko MATSUI, Kenichiro NAKANISHI, Takeshi HIRATA, Etsuji TSUJINO, Tetsuo KASE, and Kazuo TAKAHASHI

また、2004年にウエストナイル熱の対応指針が策定され、WNV侵入前の調査や、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<sup>6)</sup>、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。本稿では2013年度の調査結果について報告する。

## 調査方法

### 1. 捕集地点および調査実施期間

大阪府管内、東大阪市、高槻市及び豊中市の市街地域に、図1に示した計20カ所の定点を設定し、2013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ライトトラップを設置し、蚊の捕集調査を実施した。なお、地点Lは昨年度まで和泉市立教育研究所であったが、同施設の閉鎖に伴い、信太山青少年野外活動センターに変更した。

### 2. 蚊の捕集方法

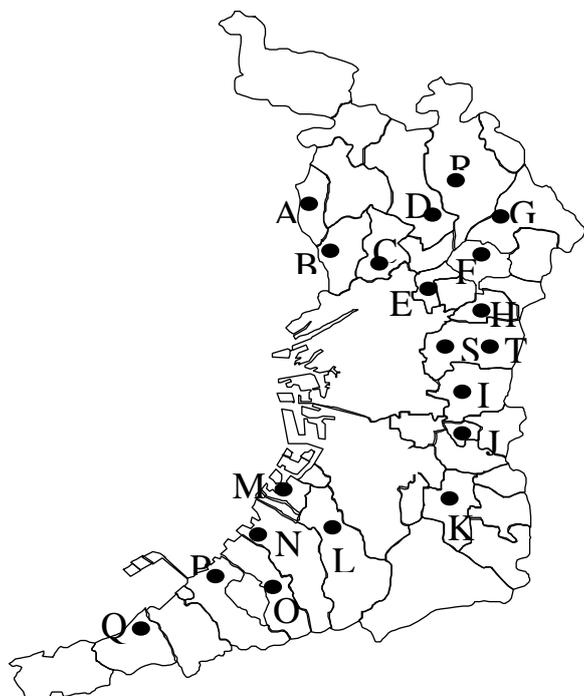
蚊の捕集にはCDCミニライトトラップ（John W.Hock Company）を使用し、蚊の誘引のためドライアイス（1～2kg）を併用した。ライトトラップは調査実施日の夕刻16～17時から翌朝9～10時までの約17時間設置した。

### 3. 蚊の同定

捕集した蚊は、各保健所で種類を同定した後、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ため、すべてアカイエカ群として分別した。

### 4. 蚊からのウイルス検出

各定点で捕集された蚊のうち、雌のみを検査の対象とし、定点毎、種類毎に乳剤を作成して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ュャーを入れ、0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）加



	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	信太山青少年野外活動センター	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 高槻市	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 豊中市	新豊高川親水水路	豊中市

図1 蚊の捕集地点定点

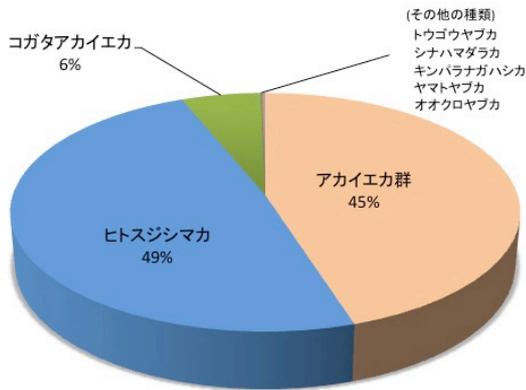


図2 捕集された蚊の比率

ハンクス液を 250 $\mu$ L 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社)で1分間振とうして作製した。破碎後のマイクロチューブは軽く遠心してからクラッシャーを除去し、0.2%BSA 加ハンクス液を 500  $\mu$ L 追加して攪拌した。それを 4 $^{\circ}$ C、12,000rpm で15分間遠心し、その上清を 0.45 $\mu$ m Millex フィルター(ミリポア社)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、サンプルに加えるハンクス液量を適宜増減させて調節した。検査材料のうち 150 $\mu$ L について E.Z.N.A. Viral RNA Kit (OMEGA bio-tek 社)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<sup>7-9)</sup>。

また、2005 年以降インド洋周辺から東南アジアにかけて流行が継続、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<sup>10)</sup>。

## 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は解剖して採脳し、その脳乳剤についてウイルス検査を実施した。カラスごとに 0.2%BSA 加ハンクス液を用いて 10%乳剤を作製し、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

捕集された蚊は 8 種 5702 匹で、そのうちアカイエカ群(45.1%)とヒトスジシマカ(48.8%)が大部分を占め、次いでコガタアカイエカ(5.8%)が多く採集された(図 2)。その他にはシナハマダラカ、トウゴウヤブカ、キンパ

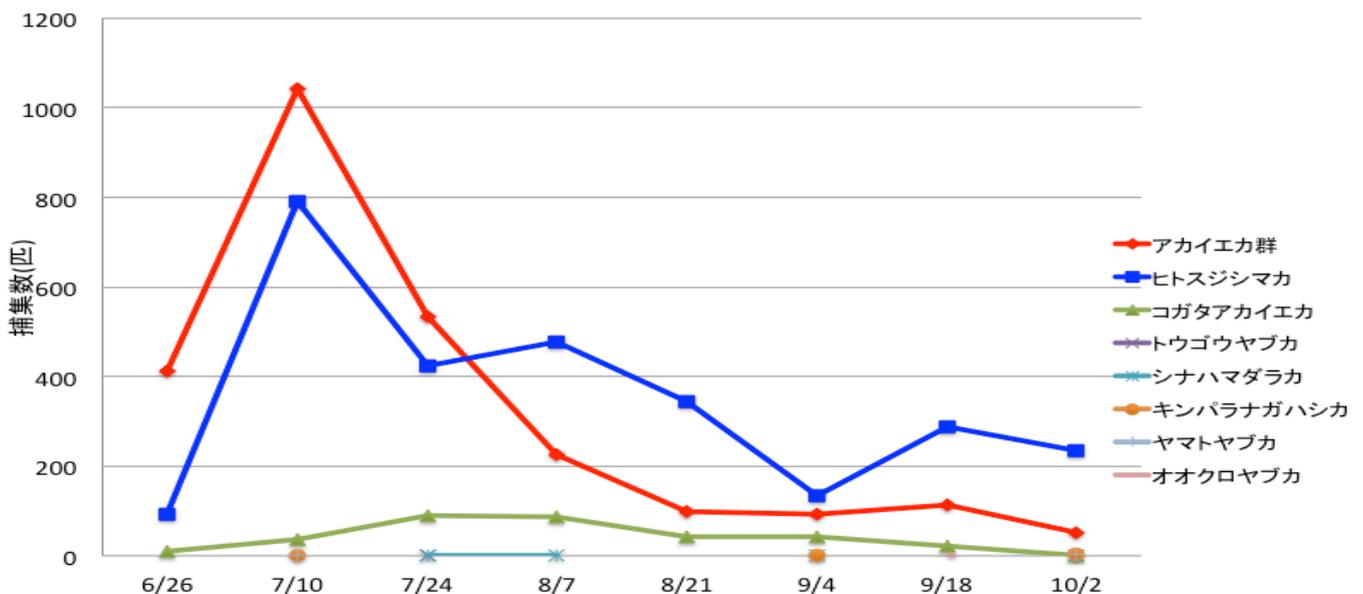


図3 蚊の捕集数の推移

ラナガハシカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカが捕集された。

調査期間を通じた捕集数の推移を見ると(図3、4)、最も多く捕集されたアカイエカ群とヒトスジシマカは調査期間中、常に捕集され、ともに7月初旬にピークに達した。アカイエカ群は、7月10日に東大阪東部(定点 T)において752匹が捕集され、全体の40%を占めた。また、ヒトスジシマカでは、7月10日に和泉保健所管内(定点 L)と高槻市(定点 R)において、それぞれ311匹と250匹が捕集され、両者を合わせると全体の30%を占めた。アカイエカ群はその後8月下旬にかけて減少する1峰性のピークを示したが、ヒトスジシマカではその減少傾向が緩やかで、9月には再び増加傾向が見られた。コガタアカイエカも調査期間中毎回捕集されたが、7月下旬から8月上旬にかけて最も多く捕集された。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にかなりの差が見られたが、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15カ所で捕集され、東大阪東部(定点 T)で最も多く捕集された。シナハマダラカは和泉保健所管内(定点 L)、岸和田保健所管内(定点 O)、泉佐野保健所管内(定点 P)の各定点で、トウゴウヤブカは和泉保健所管内(定点 L)及び東大阪西部(定点 S)で捕集された。また、キンバラナガハシカは和泉保健所管内(定点 L)で、ヤマトヤブカは和泉保健所管内(定点 L)及び岸和田保健所管内(定点 O)で、オオクロヤブカは高槻(定点 R)で捕集された(図4)。

## 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、計384プールの乳剤を作製してRT-PCR法による遺伝子検査を実施したが、すべての検体においてWNV及び他のフラビウイルスの遺伝子は検出されなかった。またチクングニヤ熱の媒介種となるヒトスジシマカについて実施したCHIKVの遺伝子検査についても陽性例はなかった。

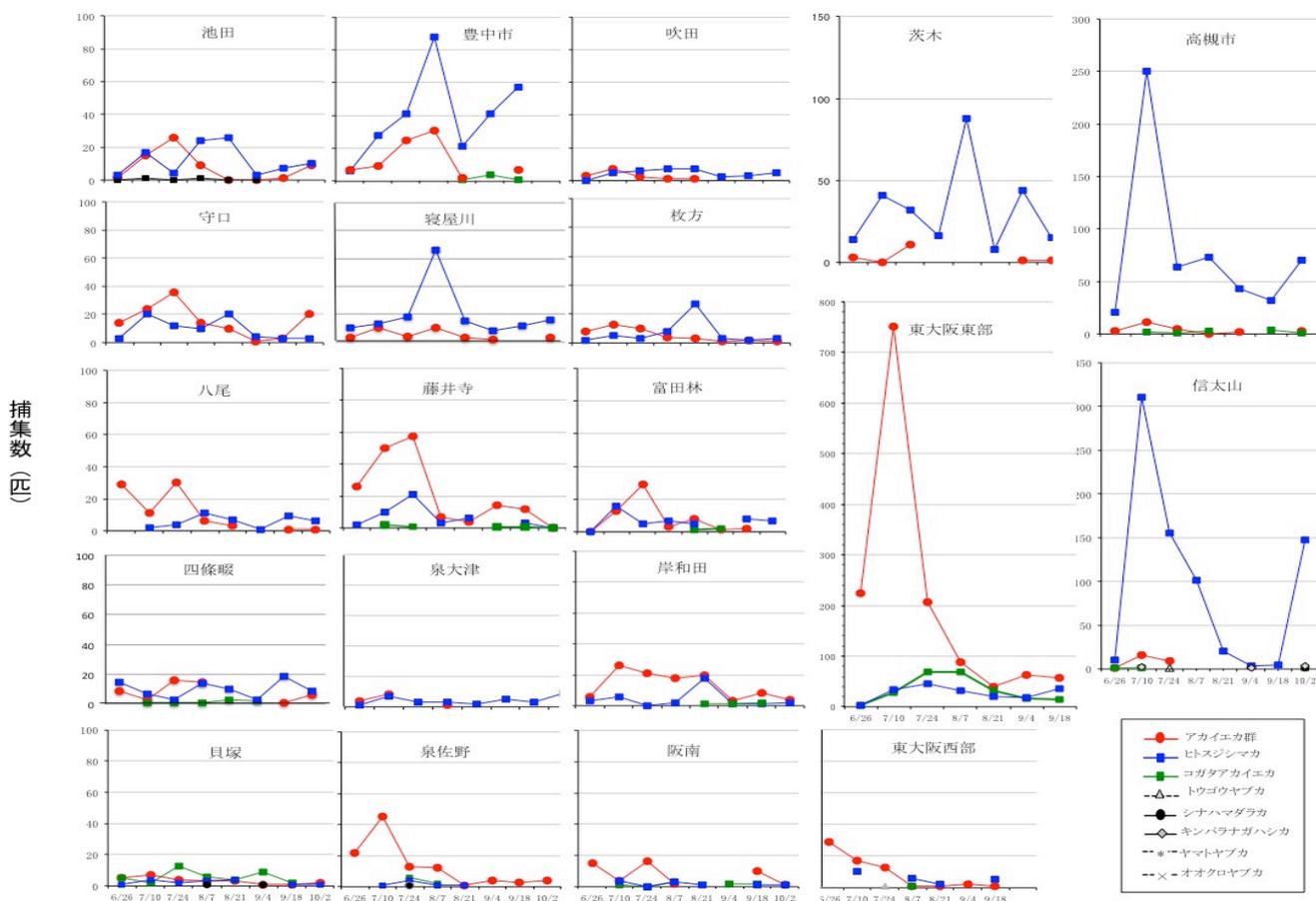


図4 定点別にみた蚊の捕集数の推移

### 3. 死亡カラスの回収数とウイルス遺伝子検査結果

今年度は、岸和田保健所管内から8頭、和泉保健所管内から2頭、八尾保健所管内から2頭、茨木保健所管内から1頭(2頭のうち1頭は回収不能で未回収)の計13頭のカラスが搬入され、それぞれのカラスについて検査を実施したが、WNV及び他のフラビウイルスの遺伝子は検出されなかった。

## 考 察

WNVは野外では蚊と鳥類との間に感染環を形成しており、ウエストナイル熱が流行している米国では非常に多種類の蚊によって保持、媒介されていることが明らかにされている<sup>11)</sup>。府内で捕集された蚊のほとんどを占めたアカイエカ及びヒトスジシマカはWNVに対して高い感受性を持つことが確かめられており、また、他に捕集されたコガタアカイエカ、ヤマトヤブカ、シナハマダラカ、オオクロヤブカも注意すべき種類とされている<sup>3)</sup>。その他にもキンイロヤブカなどのWNV媒介蚊が大阪府内に分布している可能性が考えられるが、現状では本サーベイランスで捕集される蚊のWNV保有状況をチェックすることでWNVの侵入に対応できると考えられる。

米国では1999年にWNVの侵入が確認されて以降、ウエストナイル熱の大きな流行が起こり、2003年には9862人の患者(死者264人)が記録された。その後、流行は徐々に収まり2011年には712人の患者数にまで減少した。しかし、2012年になって再び大きな流行となり、5674人の患者が発生して死者の数は286名にのぼった<sup>12)</sup>。このような米国での患者発生数の推移は、ウエストナイル熱のような蚊媒介性の感染症がいったん侵入してしまうと、有効なワクチンが実用化されていない現在、その根絶が困難になってしまうことを示唆している。

近年、ウエストナイル熱の他にも蚊が媒介する感染症が再興感染症として報告されることが多くなっており、チクングニヤ熱はアフリカからインド、東南アジアにかけて大きな流行が続いている。また、フランス領ポリネシアではジカ熱が流行し、オーストラリアで

はロスリバー熱が流行して、それぞれ邦人の感染帰国症例が報告されている<sup>13)14)</sup>。今後はこれらの感染症及び媒介蚊についても、情報収集などを行って注意していく必要があると思われる。

一方、蚊が媒介する感染症では、デング熱やマラリアがその患者数の多さから世界的な問題となっている。2012年の夏には、成田空港の敷地内において、東南アジアなどでデング熱の主な媒介種となっているネッタイシマカの幼虫及び蛹の生息が確認された<sup>15)</sup>。また、2013年には、我が国を訪れたドイツ人旅行者が日本国内でデング熱に感染したと考えられる症例が報告された<sup>16)</sup>。現在のところ、ネッタイシマカやデングウイルスの国内での定着は確認されていないが、今後のサーベイランス活動では、ウエストナイル熱にとどまらず、多様な蚊媒介性感染症について対応していく必要があると考えられる。

## 謝 辞

本調査は、大阪府立公衆衛生研究所、大阪府健康医療部環境衛生課および各保健所の協力のもとに大阪府健康医療部保健医療室地域保健感染症課(現医療対策課)の事業として実施されたものであり、調査に関与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) 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)
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課: ウエストナイル熱媒介蚊対策に関するガイドライン(2003)
- 4) 弓指孝博, 瀧幾子, 齋藤浩一ら: 大阪府におけるウエストナイル熱に関するサーベイランス(平成15年度報告), 大阪府立公衛研所報, 42, 65-70 (2004)

- 5) 青山幾子,弓指孝博,上林大起ら：大阪府におけるウエストナイル熱に対するサーベイランス調査(2012年度),大阪府立公衛研所報,51,1-6(2013)
- 6) 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)
- 7) 弓指孝博,青山幾子：ウエストナイル熱(脳炎),大阪府立公衆衛生研究所感染症プロジェクト委員会編 感染症検査マニュアル第Ⅲ集,1-13(2004)
- 8) 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 2014-6-8)
- 9) 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)
- 10) 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 2014-6-8)
- 11) CDC West Nile Virus:  
<http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/Mosquito%20Species%201999-2012.pdf>, (参照 2014-6-8)
- 12) CDC West Nile Virus:  
<http://www.cdc.gov/westnile/statsMaps/index.html>, (参照 2014-6-8)
- 13) Kutsuna S., et al: Two cases of zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014, Eurosurveillance, 19(6), 20697 (2014)
- 14) 石原ら：関西空港検疫所で経験したロスリバー熱の相談事例,病原微生物検出情報(IASR),34,378-380(2013)
- 15) 助廣ら：成田国際空港におけるネッタイシマカの侵入事例について,衛生動物,64,34(2013)
- 16) Schmidt-Chanasit J., et.al: Autochthonous dengue virus infection in Japan imported into Germany, September 2013, EuroSurveillance. 19(3), 20681 (2014)

# 大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2013 年度)

中田恵子\*1 山崎謙治\*1 左近直美\*1 駒野淳\*2 加瀬哲男\*1

感染症発生動向調査事業に基づいて、五類定点把握感染症の病原体定点から大阪府立公衆衛生研究所には検体が搬入される。本稿では、2013 年度に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナと診断された患者から採取された検体を対象に実施したエンテロウイルスに関する検査結果を総括する。全 156 検体のうち、90 検体 (58%) からエンテロウイルスが検出された。各疾患における主要なウイルス血清型の検出割合は以下の通りである：無菌性髄膜炎では、Coxsackievirus B5 (CB5、5/25 症例、20%)、手足口病では、Coxsackievirus A6 (CA6、19/38 症例、50%) および Enterovirus 71 (EV71、11/38 症例、29%)、ヘルパンギーナでは、Coxsackievirus A5 (CA5、4/15 症例、27%) および Coxsackievirus A8 (CA8、4/15 症例、27%)。無菌性髄膜炎患者で CB5 が検出された 5 症例中、4 例が生後 1 カ月齢以下の患者であった。このうち 2 例は生後 1 週間以内の発症であったことから垂直感染が疑われた。手足口病は CA6 および EV71 がシーズンの初めから最後まで検出される混合流行であった。CA6 と EV71 の分離株について viral protein 1 (VP1) 領域に対する系統樹解析を実施した。その結果、分離された CA6 の 3 株全て、CA6 による手足口病が大流行した 2011 シーズンの株よりも 2012 年に中国で検出された株や 2013 年にマレーシアで検出された株と近縁であった。また、分離された EV71 のうち、遺伝子解析が実施できた 5 株中 4 株が大阪市、広島県、台湾で近年検出された株と近縁であった。2011 年シーズン以降、手足口病の原因ウイルスとして CA6 が主要な血清型の一つとなりつつあるが、EV71 と同様に CA6 も国内だけでなく近隣諸国との間で流行を形成す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、コクサッキーウイルス B5、コクサッキーウイルス A6、エンテロウイルス 71

**Key words:** Aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease, Herpangina, Coxsackievirus B5, Coxsackievirus A6, Enterovirus 71

エンテロウイルス感染症は夏季に小児で流行するが、その血清型は年ごとに変動する。臨床病型は多様性に富み、中でも無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の 5 類感染症定点把握疾患に指定されている。疾患ごとに患者から検出されるウイルス血清型に特徴があり、血清型によって症状や重症度が異

なる。例えば、無菌性髄膜炎において Echovirus 13 や Echovirus 30 が検出されるシーズンは、その流行が大きくなる傾向にある<sup>1)</sup>。また、手足口病では EV71 が検出される場合、中枢神経系症状が合併する頻度が高くなると報告されている<sup>2)</sup>。従って、ウイルス血清型を継続的にモニタリングすることは、流行予測および重症化に対する注意喚起のために重要である。本稿では、2013 年 4 月 1 日から 2014 年 3 月 31 日の間に感染症発生動向調査事業に基づいて当所に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナと診断された患者検体からの病原体検出情報を集約し、2013 年シーズンに流行したウイルス血清型および分離ウイルスの分子疫学的解析を実施したので報告する。

\*1 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

\*2 国立病院機構名古屋医療センター統括診療部

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection  
in Osaka Prefecture (Fiscal 2013 Report)

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

## 調査方法

### 1. 検体および情報収集

2013年4月1日から2014年3月31日の期間、大阪府内の定点医療機関から当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と診断された114名から採取された156検体を対象とした（ただし、大阪市、東大阪市および堺市を除く）。検体種別の内訳は、髄液が41検体、呼吸器由来検体（咽頭拭い液、うがい液、鼻汁等）が83検体、消化器由来検体（糞便、腸内容物等）が26検体、血液が4検体、皮膚病巣由来検体が1検体、尿検体が1検体であった。感染症法に基づく感染症発生動向調査事業によって得られた検体情報（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。

### 2. 検体からのウイルス遺伝子検出

咽頭拭い液等の呼吸器由来拭い検体は、綿棒で咽頭等の病巣を擦過後、1mlの検体輸送用培地に浸漬したものから200 $\mu$ lを、髄液は無処理のまま200 $\mu$ l採取し、RNA抽出用検体とした。糞便は、緩衝液で10%懸濁液を作製し、15,000rpmで5分間遠心分離し、上清から200 $\mu$ l採取し、RNA抽出用検体とした。また、上清を10倍希釈したのち、0.45 $\mu$ mミニザルトシリンジフィルター（sartorius社）でろ過し、培養細胞によるウイルス分離用検体（糞便溶液）とした。RNA抽出は、Magtration®-MagaZorb® RNA Common Kit（PSS社）を用いて、全自動核酸抽出装置 Magtration® System 6GC および 12GC（PSS社）で行った。エンテロウイルスVP4-2領域に対する seminested RT-PCR<sup>3</sup>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。

### 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RDA、VeroE6、FL、LLCMK2、Caco-2細胞を用いた。これらの細胞に上記のように処理した検体をそれぞれ200 $\mu$ l接種し、37°CのCO<sub>2</sub>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。なお、3代盲継代を繰り返し、CPEが出現しなかった場合を

陰性と判定した。

VP4-2領域に対する seminested RT-PCR でエンテロウイルスが陽性だった検体のうち、培養細胞での分離が陰性でかつ、哺乳マウスに感受性を示す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または、それ以外の検体を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が認められた培養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。弛緩麻痺が認め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緩衝液を加えて、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-PCR<sup>4</sup>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、CA6(651bp)およびEV71(711bp)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

検体が採取された患者のうち、無菌性髄膜炎と診断されたのは49名で、年齢の中央値は1歳6か月（範囲：1日-72歳4ヶ月齢）、性別は男性29名（59%）、女性20名（41%）であった。手足口病と診断された患者は42名で、年齢の中央値が1歳9か月（10か月-14歳1ヶ月齢）、性別は男性28名（67%）、女性12名（29%）、不明2名（4%）名であった。ヘルパンギーナと診断された患者は23名で、年齢の中央値は2歳6ヶ月（11ヶ月-40歳齢）、性別は男性16名（70%）、女性7名（30%）であった。

対象3疾患と診断された患者114名中、80名（70%）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 での検出割合が高く、156 検体中 88 検体(56%)が陽性であった (表 1~3)。細胞培養で陰性だったが、seminested RT-PCR で CA6 が陽性であった 19 検体または、CA10 が陽性であった 1 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、CA6 および CA10 がそれぞれ 12 株および 1 株分離された。

## 2.疾患別ウイルス検出割合および検出ウイルスタイプ

無菌性髄膜炎患者由来の 51% (25/49 名) の検体からエンテロウイルスが検出され、そのうち CB5 が 20%、次いで Echo6 が 16%、Echo11 が 16%を占めた (図 1)。検出検体別にみると、髄液からエンテロウイルス遺伝子が検出された検体が 27% (11/41 検体) で、同定されたウイルスは頻度順に Echo6 が 4 検体 (36%)、CB5 が 3 検体 (27%) であった。また、培養細胞試験では 17% (7/41 検体) の検体からエンテロウイルスが分離され、CB5 が 43% (3 検体)、Echo6 が 29% (2 検体) を占めた。また、同一患者から髄液とともに呼吸器由来検体および消化器由来検体が同時に搬入された患者で、髄液からエンテロウイルスが検出された患者 (5 名) において呼吸器および消化器由来検体の両方から同一血清型のウイルスが検出された。手足口病では 90% (38/42 名) の患者からエンテロウイルスが検出され、そのうち CA6 が 47%、次いで EV71 が 26%を占めた (図 2)。同様に、ヘルパンギーナでは 65% (15/23 名) の患者検体からエンテロウイルスが検出され、そのうち CA8 および CA5 がそれぞれ 27%を占めた (図 3)。

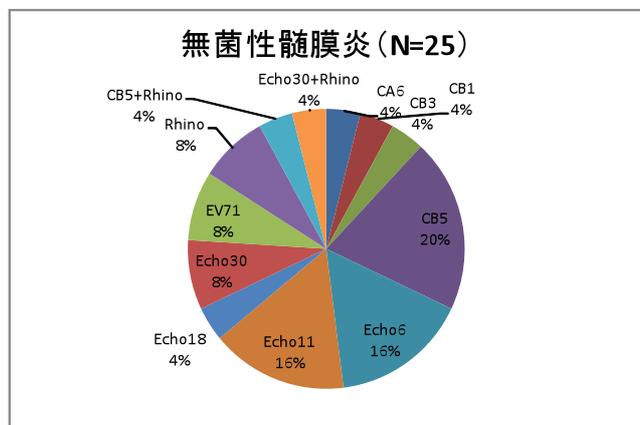


図 1.無菌性髄膜炎患者からの血清型別検出ウイルス割合

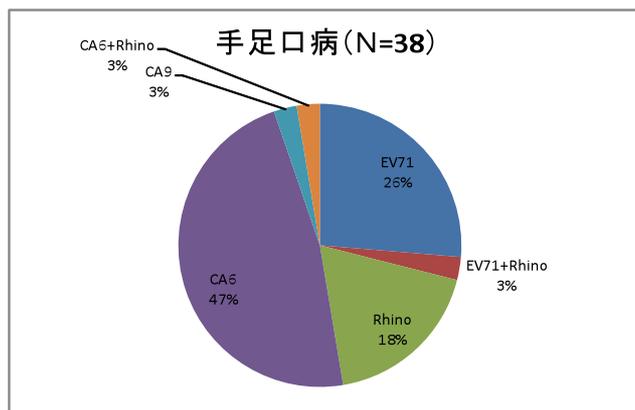


図 2.手足口病患者からの血清型別検出ウイルス割合

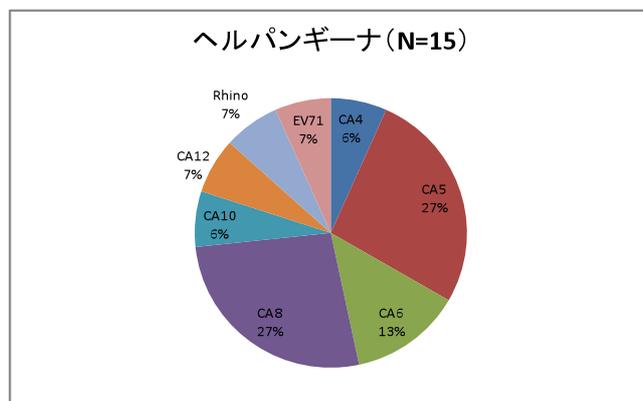


図 3.ヘルパンギーナ患者からの血清型別検出ウイルス割合

## 3.疾患別月別の検出エンテロウイルス血清型

無菌性髄膜炎患者由来検体から検出割合が高かった CB5 は全て 10 月に検出された。一方、同様に検出割合が高かった Echo6 は 7~9 月にかけて検出された (図 4)。手足口病患者由来検体で最も検出割合が高かった CA6 は 6~7 月に集中して検出され、次いで検出割合が高かった EV71 は 11 月に多く検出されたが、両血清型ともに、シーズンを通じて検出された (図 5)。ヘルパンギーナ患者由来検体からエンテロウイルスが検出された 80%の事例は 6~8 月に集中しており、今シーズンの主要な血清型である CA8 は 6 月と 7 月のみに検出された (図 6)。

#### 4.手足口病患者から検出された CA6 および EV71 の系統樹解析

患者検体から分離された株のうちウイルス抗原決定領域である viral protein 1(VP1)領域の遺伝子解析が実施可能であった CA6、3 株および EV71、5 株についてそれぞれ 651bp および 711bp の系統樹解析を実施した。その結果、CA6 の 3 株は全てが同じクラスターを形成した。また、今年度検出された CA6 の 3 株は、CA6 による手足口病が大流行した 2011 年シーズンに大阪府で分離された株 (230325) よりも 2012 年に中国で検出された株 (KF836581) や 2013 年にマレーシアで検出された株 (KF772909) と近縁であった (図 7)。一方、EV71 は、5 株中 4 株が遺伝子型 C2 型で、近年大阪市 (AB665746)、広島県 (AB560881)、台湾 (KF306101) で検出された株と近縁であった。残りの 1 株は遺伝子型 B 型であった (図 8)。

## 考 察

本事業の対象である 3 疾患を比較した場合、手足口病と診断された患者からのウイルス検出割合が最も高く、無菌性髄膜炎と診断された患者からのウイルスの検出割合が最も低かった。これは、手足口病では、手、足、口にエンテロウイルス感染症に特徴的な発疹が発現するのに対し、無菌性髄膜炎は症候群として診断されるため、エンテロウイルス以外のウイルスやその他の原因でも引き起こされるためであると考えられる。

2013 年シーズンの手足口病およびヘルパンギーナの流行は過去 5 年間の中で 2 番目に大きかったが、無菌性髄膜炎は例年並みであった<sup>5)</sup>。また、3 疾患全てで、ウイルス血清型の流行傾向が 2012 年シーズンと異なっていた<sup>6)</sup>。

手足口病に関しては、2013 年シーズンは 2011 年シーズンに大流行した CA6<sup>7) 8) 9)</sup> が最も多く検出されたほか、周期的に流行を繰り返す EV71 もシーズンを通じて検出された。これら 2 種類の血清型が存在したために流行が大きくなったと考えられる。系統樹解析の結果、2013 年シーズンに流行した CA6 は手足口病が大流行した 2011 年シーズンに大阪府で検出された株ではなく、2011 年以降に中国やマレーシアで検出された株により近縁であった。これは、CA6 がアジア地域で

広く循環している可能性を示唆する。また、今シーズン検出された EV71 は、遺伝子型 B 型と C2 型にクラスターを形成した。大阪府では 2011 年シーズンは C2 型が主流で、2012 年シーズンに B 型が検出された。従って、2013 年シーズンは遺伝子型 B とともに、国内外で循環していた C 型と混合して EV71 の流行を形成したと考えられた。

CA6 は 2011 年シーズン以前、ヘルパンギーナの主要な原因ウイルスの一つとして知られていた。しかし、2013 年シーズンは手足口病患者で最も多く検出された。2011 年以降、手足口病患者からの CA6 検出割合が増加していることから、口腔内の水疱性発疹が特徴的な症状であるヘルパンギーナから、手、足、口に広汎に水疱性発疹が発生する手足口病へと CA6 の病原性が変化してきた可能性が考えられる。

無菌性髄膜炎の流行は例年並みで小規模であった<sup>5)</sup>。患者年齢の中央値は 2012 年シーズンでは 4 歳 1 ヶ月齢であったが、2013 年シーズンでは 1 歳 6 カ月と低かった。これは、1 ヶ月齢未満の患者が 10 人と多かったことに由来すると考えられる。また、この 10 人中 6 人からエンテロウイルスが検出され、このうち 4 人が生後 1 週間以内に発症していた。国立感染症研究所感染症サーベイランスシステムから収集した情報によると、全国的にも 2013 年シーズンは、過去 10 年間で最も多く 1 カ月齢未満の無菌性髄膜炎患者からエンテロウイルスが検出されている。その半数以上から CB が検出された (データ未掲載)。発症が生後 1 週間未満の場合、感染経路としては院内での水平感染と垂直感染が考えられる。CB が原因となる新生児重症ウイルス感染症事例が複数報告<sup>10)11)</sup>されていることから、新生児からの病原体検出だけでなく、胎盤からの病原体検出および母親の抗体保有状況など、CB による新生児の無菌性髄膜炎における垂直感染の論拠となる系統的なデータの集積が重要であると思われた。

エンテロウイルスは血清型が多数存在し、年毎に流行血清型が入れ替わり、流行の規模も毎年変化する。近年、手足口病においては主な原因ウイルスとして知られていた EV71 や CA16 に加えて CA6 が流行するようになった。中枢神経系の合併症の頻度が高いとされている EV71<sup>2)</sup> だけではなく、皮膚症状が重症化する CA6<sup>12)</sup>の今後の流行状況にも注目する必要がある。

また、無菌性髄膜炎では今シーズンは新生児の患者

表 1. 無菌性髄膜炎患者由来検体における検体種別検出法別ウイルス検出結果

血清型	髄液		呼吸器由来検体 (咽頭拭い液・鼻汁・うがい液)		消化器由来検体 (糞便・直腸内容物)		その他 (血清・尿)	
	N=41		N=19		N=24		N=3	
	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞
CA6			1	0				
CB1			1	0				
CB3	1	1	1	1	1	1		
CB5	3	3	1	1	2	2	2	1
Echo6	4	2						
Echo11			2	0	2	1		
Echo18	1	0						
Echo30	2	1	1	0	1	0		
EV71			1	1	1	1		
Rhino			3	0	1	0		
合計(%)	11(27)	7(17)	11(85)	3(16)	8(33)	5(21)	2(67)	1(33)

表 2. 手足口病患者由来検体における検体種別検出法別ウイルス検出結果

血清型	呼吸器由来検体 (咽頭拭い液・鼻汁・うがい液)		消化器由来検体 (糞便・直腸内容物)		その他 (血清・皮膚病層拭い)	
	N=41		N=2		N=2	
	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞
CA6	17	3	1	1	1	0
CA9	1	1			1	1
EV71	11	9				
Rhino	9	0				
合計(%)	38(93)	13(32)	1(50)	1(50)	2(100)	1(50)

表 3. ヘルパンギーナ患者由来検体における検体種別検出法別ウイルス検出結果

血清型	呼吸器由来検体 (咽頭拭い液・鼻汁・うがい液)	
	N=23	
	PCR	培養細胞
CA4	1	1
CA5	4	3
CA6	2	1
CA8	4	3
CA10	1	1
CA12	1	0
Rhino	1	0
EV71	1	1
合計(%)	15(65)	10(43)

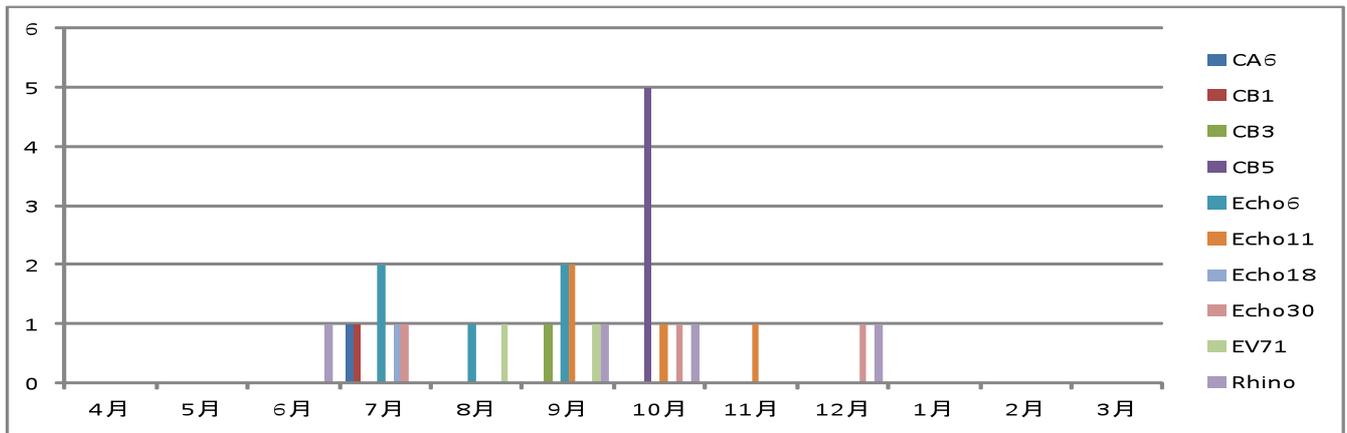


図 4. 無菌性髄膜炎患者検体からの月別検出ウイルス血清型

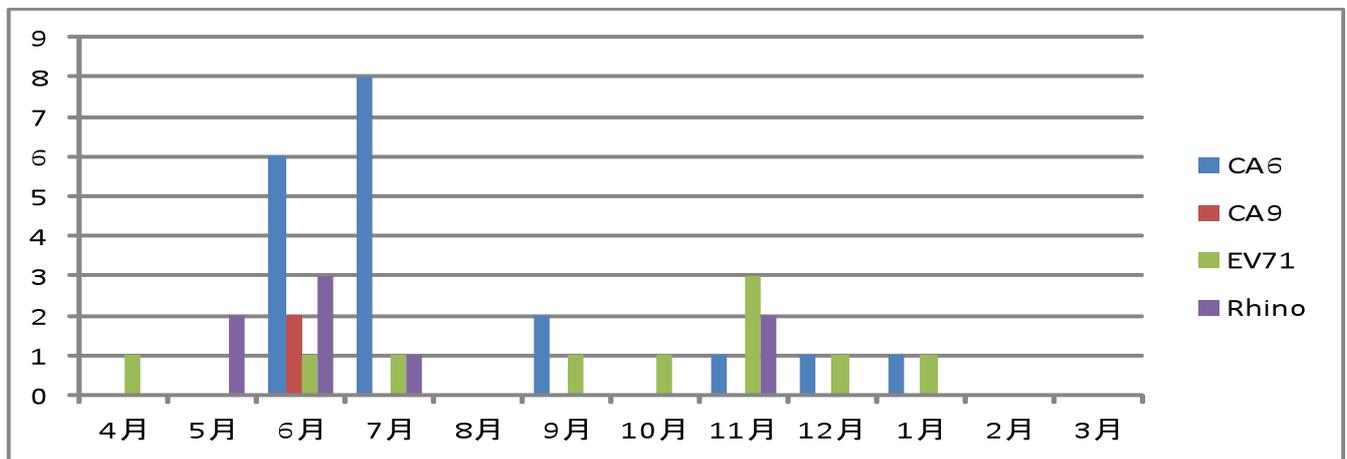


図 5. 手足口病患者検体からの月別検出ウイルス血清型

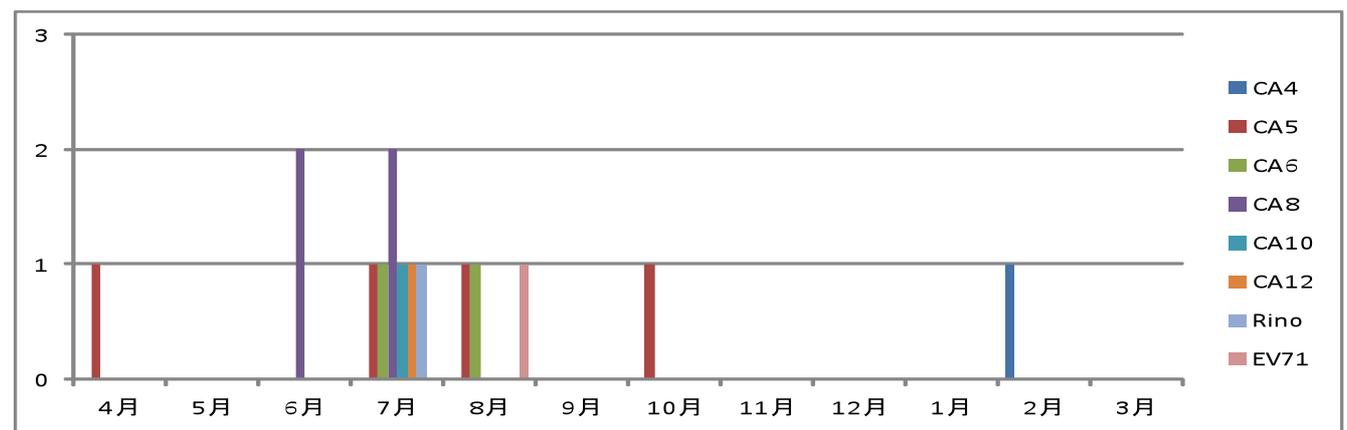


図 6. ヘルパンギーナ患者検体からの月別検出ウイルス血清型

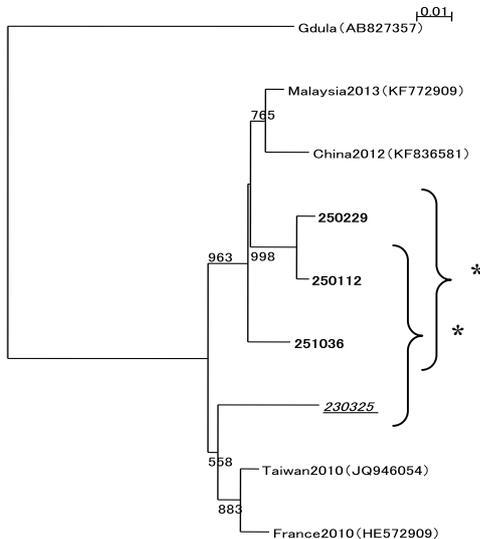


図 7. CA6 系統樹 (VP1 領域,651bp)

\*太字:平成 25 年度大阪府分離株、斜字下線:  
平成 23 年度大阪府分離株

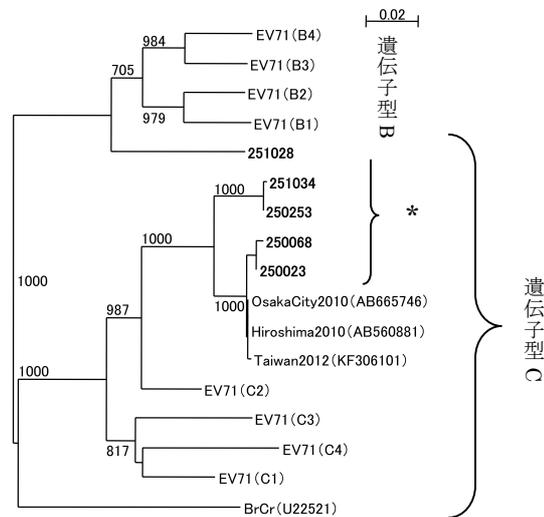


図 8. EV71 系統樹 (VP1 領域,711bp)

\*太字:平成 25 年度大阪府分離

の頻度が高く、ウイルスが検出された 6 人中、4 人から CB が検出された。垂直感染の事実確認および CB が新生児に及ぼす影響等を解明するためには、感染症発生动向調査事業に基づいた継続的な病原体モニタリングだけでなく積極的な疫学調査も必要である。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センターホームページ、病原微生物検出情報；エンテロウイルスグラフ (参照 2014-5-30)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)

- 5) 大阪府立公衆衛生研究所ホームページ；エンテロウイルス関連情報(参照 2014-5-30)
- 6) 中田恵子、山崎謙治、左近直美、加瀬哲男；大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2012 年度) 大阪府立公衆衛生研究所所報 51: 7-13 (2013)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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 50: 8-13 (2012)

10) Romero JR. Pediatric group B coxsackievirus infections. *CurrTop Microbiol Immunol.* 323: 223-39 (2008)

11) Cheng LL, Ng PC, Chan PK, Wong HL, Cheng FW, Tang JW. Probable intrafamilial transmission of

coxsackievirus b3 with vertical transmission, severe early-onset neonatal hepatitis, and prolonged viral RNA shedding. *Pediatrics.* 118(3): e929-33 (2006)

12) 渡部裕子 ; 手足口病後の爪変形・爪甲脱落症、病原微生物検出情報月報 (IASR) 33: 62-63 (2012)

## 牛乳中合成抗菌剤の同時分析法の開発と妥当性評価

内田耕太郎\* 柿本健作\* 山口貴弘\* 永吉晴奈\* 起橋雅浩\* 小西良昌\* 梶村計志\*

牛乳中の合成抗菌剤 37 種類の同時分析法を開発し妥当性評価を行った。アセトニトリルで抽出し、ヘキサノン分配、遠心式フィルターろ過で精製を行い、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) で測定する簡便な分析法を構築した。この分析法の選択性、真度、精度、定量限界について評価したところ、国の示すガイドラインの目標値を満たす良好な結果が得られた。

キーワード: 合成抗菌剤、牛乳、遠心式フィルター、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計、妥当性評価  
Key words: Antibiotics, Milk, Centrifugal filter, LC-MS/MS, Validation

家畜に投与された動物用医薬品が代謝、排泄されずに食品に残留すると、人の健康を害する恐れがある。そのため、薬事法で使用基準や休薬期間、食品衛生法で食品中の残留基準が定められている。全国の検疫所や地方衛生研究所では、食品中の動物用医薬品の検査を行っており、当所でも抗菌剤、駆虫剤、ホルモン剤など多系統の動物用医薬品を検査している<sup>1)</sup>。

同一の系統に属する動物用医薬品は、化学的性質が似ているため、同時に分析されることが多い。当所でもこれまで、サルファ剤<sup>2)</sup>、テトラサイクリン系抗生物質<sup>3)</sup>、駆虫剤<sup>4)</sup>、ホルモン剤<sup>5)</sup>など系統ごとに分析法を開発し検査を行ってきた。

一方、近年、高性能の測定機器を利用し、簡単な抽出、精製操作で多系統の医薬品を同時に分析する方法が多数報告されている<sup>6) 7) 8)</sup>。このような分析法を活用することで、より多くの医薬品の検査が可能となり、分析にかかる費用や時間も削減できる。

そこで、今回新たに牛乳中のサルファ剤、キノロン剤、代謝拮抗剤の同時分析法を開発し、ガイドライン<sup>9)</sup>に基づく妥当性評価を行ったので報告する。

## 方法

### 1. 試料

大阪府内で販売されていた牛乳を用いた。

### 2. 試薬、器具

2-1. 標準品: キノロン剤 13 種類、サルファ剤 20 種類、代謝拮抗剤 4 種類を対象とした (表 1)。市販の標準品および混合標準溶液を使用した。標準品は林純薬工業 (株)、関東化学 (株)、和光純薬工業 (株)、Dr Ehrenstorfer 社、Sigma-Aldrich 社、U.S. Pharmacopeial Convention 製の残留動物薬分析用またはその同等品を用いた。混合標準液は林純薬工業 (株) 製 PL 動物薬 LC/MS Mix1 (27 種類混合) および PL 動物薬 LC/MS Mix2 (14 種類混合) を用いた。

2-2. 標準溶液: 標準品をアセトニトリル、メタノール、アセトニトリル/メタノール (1:1) またはメタノール/ジメチルスルホキシド (1:1) に溶解し、標準溶液 (100 ~1000 µg/mL) を調製した。MS/MS 測定条件の検討にはこの標準溶液を用いた。添加回収試験は市販の混合標準溶液で行った。PL 動物薬 LC/MS Mix1 と Mix2 を混合希釈し、添加用混合溶液 (0.2、2 µg/mL、アセトニトリル溶液)、検量線用混合溶液 (5、10、20、50、100、200 µg/L、10%メタノール溶液) を調製した。混合溶液に含まれる 41 化合物のうち、37 化合物を対象とした。

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課  
Validation of Multi-residue Method for the Determination of Antibiotics in Milk by LC-MS/MS  
by Kotaro UCHIDA, Kensaku KAKIMOTO, Takahiro YAMAGUCHI, Haruna NAGAYOSHI, Masahiro OKIHASHI, Yoshimasa KONISHI and Keiji KAJIMURA

2-3. その他の試薬、器具：アセトニトリル、メタノール、ヘキサンは和光純薬工業（株）製の残留農薬 PCB 試験用を用いた。ギ酸は、抽出には和光純薬工業（株）製の試薬特級を、移動相には和光純薬工業（株）製の高速液体クロマトグラフ用を使用した。ジメチルスルホキシドは和光純薬工業（株）製ダイオキシン類分析用を使用した。水は Merck Millipore 社製 Milli-Q 純水製造装置（Elix Advantage、MilliQ Advantage A10）で精製した水（比抵抗値 18.2 MΩ・cm）を用いた。遠心式フィルターは Millipore 社製 AMICON ULTRA Centrifuge Filter Unit 0.5 mL 3K を用いた。ポリプロピ

レン（PP）製 50 mL 遠沈管は AGC テクノグラス（株）製を用いた。PP 製 1.5 mL 遠沈管は Eppendorf AG 社製を用いた。

### 3. 装置

遠心機：日立工業（株）製 Centrifuge CF7D2 または、久保田商事（株）製ユニバーサル冷却遠心機 5922 型、振盪機：東京理科機械（株）製 EYELA CUTE MIXER CM-1000、遠心エバポレーター：東京理化学器械（株）製 CYE-3100 型、LC：Waters 社製 ACQUITY UPLC I-Class System、MS/MS：Waters 社製 Xevo TQ-S Mass

表 1. MS/MS 測定条件

Compound	Transition	Cone (V)	Collision (eV)	Compound	Transition	Cone (V)	Collision (eV)
<i>Quinolones</i>				Sulfadimidine	279 → 186	44	16
Ciprofloxacin	332 → 231	6	20		279 → 92	44	28
	332 → 288	6	16	Sulfadoxine	311 → 156	40	16
Danofloxacin	358 → 340	6	20		311 → 92	40	28
	358 → 82	6	40	Sulfaethoxypyridazine	295 → 156	29	16
Difloxacin	400 → 356	6	18		295 → 92	30	35
	400 → 299	6	26	Sulfaguanidine	215 → 156	14	12
Enrofloxacin	360 → 316	4	18		215 → 92	14	22
	360 → 245	4	24	Sulfamerazine	265 → 108	4	16
Flumequine	262 → 244	34	16		265 → 92	4	26
	262 → 202	34	30	Sulfamethoxazole	254 → 156	24	14
Marbofloxacin	363 → 72	14	16		254 → 92	24	26
	363 → 320	14	14	Sulfamethoxypyridazine	281 → 92	4	26
Miloxacin	264 → 215	24	24		281 → 126	4	14
	264 → 246	24	12	Sulfamonomethoxine	281 → 92	4	28
Nalidixic acid	233 → 187	22	24		281 → 126	4	16
	233 → 215	22	12	Sulfapyridine	250 → 156	40	14
Norfloxacin	320 → 276	4	14		250 → 92	40	24
	320 → 233	4	18	Sulfaquinoxaline	301 → 156	6	14
Ofloxacin	362 → 318	4	16		301 → 92	6	28
	362 → 261	4	24	Sulfathiazole	256 → 156	32	14
Orbifloxacin	396 → 295	2	22		256 → 92	32	24
	396 → 352	2	16	Sulfatroxazole	268 → 92	12	24
Oxolinic acid	262 → 244	36	16		268 → 113	20	15
	262 → 216	36	26	Sulfisomidine	279 → 124	4	30
Sarafloxacin	386 → 342	6	16		279 → 186	4	14
	386 → 299	6	26	Sulfisoxazole	268 → 113	18	14
<i>Sulfonamides</i>					268 → 156	18	12
Sulfabenzamide	277 → 92	10	24	Sulfisozole	240 → 156	16	12
	277 → 156	10	10		240 → 92	16	22
Sulfabromomethazine	357 → 92	4	30	<i>Antimetabolites</i>			
	357 → 108	4	18	Diaveridine	261 → 245	26	26
Sulfachlorpyridazine	285 → 156	6	12		261 → 123	26	20
	285 → 92	6	26	Ormetoprim	275 → 259	26	26
Sulfadiazine	251 → 92	28	24		275 → 123	26	22
	251 → 156	28	12	Pyrimethamine	249 → 177	62	26
Sulfadimethoxine	311 → 156	38	18		249 → 233	62	26
	311 → 92	38	28	Trimethoprim	291 → 123	42	22
					291 → 261	42	22

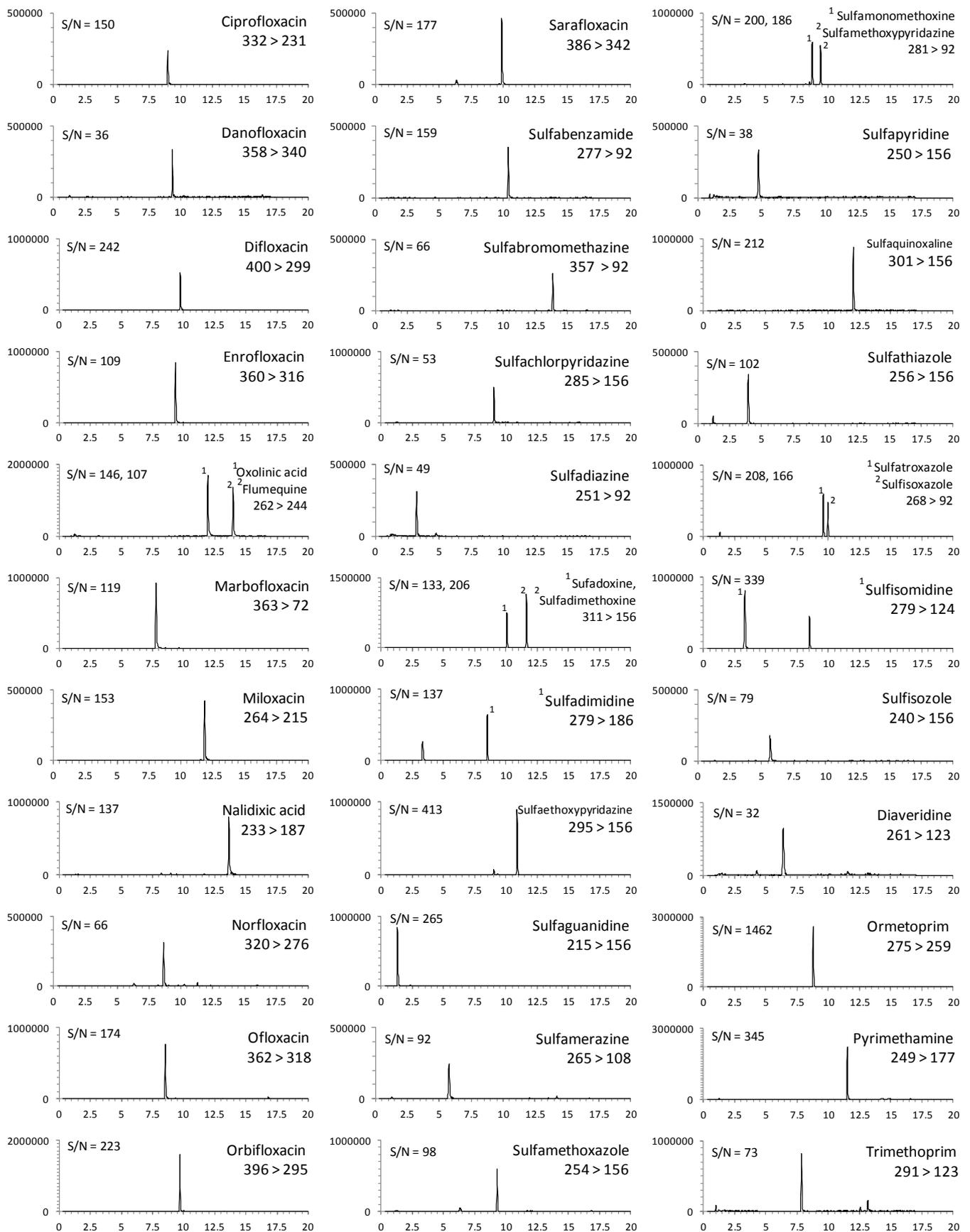


図 1. クロマトグラム (10 µg/kg 添加回収試験)

Spectrometer、分析カラム：Waters 社製 CORTECS UPLC  
C18 (1.6 μm、2.1×100 mm)

#### 4. 測定条件

4-1. 移動相：A液：0.1%ギ酸水溶液、B液：0.1%ギ酸メタノール、グラジエント条件：(%B)Initial (10) → 5 min (10) → 20 min (90)、流速：0.2 mL/min、

表 2. 妥当性評価結果 (真度、精度)

Compound	Spiked level: 10 μg/kg			Spiked level: 100 μg/kg		
	Recovery (%)	Repeatability (RSD%)		Recovery (%)	Repeatability (RSD%)	
		Intra day	Inter day		Intra day	Inter day
<i>Quinolones</i>						
Ciprofloxacin	86.8	4.2	6.0	84.6	3.7	4.4
Danofloxacin	88.9	5.5	6.0	89.5	2.6	3.8
Difloxacin	97.7	3.3	4.8	98.2	4.1	4.2
Enrofloxacin	94.3	1.6	4.4	97.4	3.7	3.6
Flumequine	101.6	6.0	8.2	99.8	5.0	5.1
Marbofloxacin	87.7	1.7	4.0	87.9	2.6	3.2
Miloxacin	99.9	6.1	7.0	95.4	4.6	5.8
Nalidixic acid	99.3	4.9	6.5	96.8	4.6	4.5
Norfloxacin	83.7	3.1	6.6	82.7	2.6	3.9
Ofloxacin	93.4	2.7	4.0	92.4	2.8	3.2
Orbifloxacin	95.9	2.5	6.2	94.2	2.0	2.9
Oxolinic acid	103.2	7.2	7.5	100.3	5.5	4.9
Sarafloxacin	90.3	4.0	6.1	90.4	3.1	3.4
<i>Sulfonamides</i>						
Sulfabenzamide	90.7	3.7	8.1	93.7	4.5	4.6
Sulfabromomethazine	93.2	5.8	9.2	96.0	5.2	5.6
Sulfachlorpyridazine	89.9	3.9	8.0	92.7	5.5	4.9
Sulfadiazine	92.5	2.8	7.6	92.8	5.6	5.4
Sulfadimethoxine	92.3	3.9	9.1	94.3	3.9	5.2
Sulfadimidine	90.3	2.3	8.0	90.8	4.9	6.8
Sulfadoxine	91.8	4.4	8.1	93.8	4.7	4.6
Sulfaethoxypyridazine	90.4	3.0	9.1	91.6	5.4	6.0
Sulfaguandine	83.4	4.1	8.3	89.2	4.6	10.0
Sulfamerazine	91.4	4.0	8.4	92.4	5.2	5.5
Sulfamethoxazole	91.6	2.8	7.8	95.3	4.9	5.4
Sulfamethoxypyridazine	89.5	3.2	9.2	93.9	5.3	5.8
Sulfamonomethoxine	89.1	2.3	11.1	91.6	5.0	7.0
Sulfapyridine	88.3	4.5	8.6	92.9	5.0	5.6
Sulfaquinoxaline	92.3	3.8	7.8	94.3	4.7	5.3
Sulfathiazole	86.0	3.8	9.5	91.6	5.4	5.9
Sulfatroxazole	91.1	3.7	8.4	93.8	4.6	4.2
Sulfisomidine	90.3	2.2	10.5	92.2	4.9	6.8
Sulfisoxazole	91.8	4.1	10.0	93.7	4.4	5.1
Sulfisozole	87.3	3.7	10.1	93.5	5.1	6.3
<i>Antimetabolites</i>						
Diaveridine	87.3	3.7	10.1	93.5	5.1	6.3
Ormetoprim	100.0	1.9	5.2	98.3	2.7	3.3
Pyrimethamine	101.1	3.3	5.3	100.5	1.7	4.8
Trimethoprim	102.1	3.5	5.5	97.8	2.0	3.9

表 3. 真度および精度の目標値

## 結果および考察

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%)	Repeatability (RSD%)	
		Intra day	Inter day
$\leq 1$	70 ~ 120	30 >	35 >
$1 < \sim \leq 10$	70 ~ 120	25 >	30 >
$10 < \sim \leq 100$	70 ~ 120	15 >	20 >
$100 <$	70 ~ 120	10 >	15 >

カラム温度：50°C、注入量：5  $\mu\text{L}$

4-2. MS/MS 測定条件：対象とした 37 化合物の定量用および確認用 MRM を同時に測定するメソッドを作成した。化合物ごとのパラメーターを表 1 に示した。

Ion mode：positive、Capillary：3.00 kV、Source temperature：150°C、Desolvation temperature：400°C、Cone gas flow：150 L/h、Desolvation gas flow：1000 L/h、Collision gas flow：1.15 mL/min

## 5. 抽出、精製

試料 2 g を PP 製 50 mL 遠沈管に採取した。これにヘキサン飽和アセトニトリル 8 mL を加え、激しく振り混ぜた。3000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を別の 50 mL 遠沈管に分取した。残渣に 2% ギ酸ヘキサン飽和アセトニトリル 8 mL を加え、激しく振り混ぜた。3000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を先程の 50 mL 遠沈管に合わせた。その後、ヘキサン飽和アセトニトリルを加え、正確に 20 mL とした。これにアセトニトリル飽和ヘキサン 10 mL を加え 10 分間振盪機で攪拌した。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層 0.5 mL を 1.5 mL 遠沈管に分取した。これにジメチルスルホキシド 25  $\mu\text{L}$  を加え、遠心エバポレーターで 1 時間濃縮した。残渣に 10% アセトニトリルを加え、0.5 mL とした。12000 rpm で 10 分間遠心し、遠心式フィルターを通過した溶液を試験液とした。

## 6. マトリックス標準溶液

試料 2 g を 50 mL 遠沈管に採取し、添加試料と同様の抽出、精製操作を行った。遠心エバポレーターで濃縮後、残渣に検量線用混合溶液 (5、10、20、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) 50  $\mu\text{L}$  と 10% メタノールを加え、0.5 mL とした。遠心式フィルターを通過させたものをマトリックス標準溶液とした。

## 1. 選択性

医薬品の残留が認められない牛乳から調製したブランク試料と、標準溶液を添加した同牛乳から調製した添加試料のクロマトグラフを比較したところ、定量を妨害する夾雑ピークは無かった。図 1 に 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  添加試料のクロマトグラムを示した。

## 2. 真度、精度

試料中濃度が 10 および 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  になるように標準溶液を添加し、30 分程度放置後、抽出、精製を行い濃度を測定した。それぞれ 2 併行の添加回収試験を 5 日間行い、真度、併行精度、室内精度を求めた。表 2 に示すように真度は 82.7~103.2% であった。試料中濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の場合、併行精度は 1.6~7.2%、室内精度は 4.0~11.1% であった。一方、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の場合、併行精度は 1.7~5.6%、室内精度は 2.9~10.0% であった。残留検査に用いる試験法の性能は告示<sup>10</sup>および通知<sup>11</sup>で規定されており、その妥当性を評価するためのガイドラインが策定されている。真度、精度ともに全ての化合物でこのガイドラインの目標値 (表 3) を満たす結果が得られた。

## 3. 定量限界

10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  添加試料の S/N 比を計算した。Waters 社の MS 用定量解析ソフトウェア MassLynx を用い、ピークの前または後、約 2 分間をノイズ範囲とし、ピークおよびノイズの振幅の最大値の比を算出した。図 1 のクロマトグラム中に S/N 比を示した。10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  添加試料においてはいずれの化合物も S/N 比は 10 以上であり、この濃度での定量性が確認できた。

## 結論

牛乳中の合成抗菌剤の分析法を新たに開発し妥当性を評価を行った。試料中濃度が 10 および 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  になるよう標準溶液を添加し、選択性、真度、精度、定量限界を評価した。いずれもガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。

## 文献

- 1) 大阪府立公衆衛生研究所年報-平成 24 年度版, 50-57 (2013)
- 2) 藤田瑞香, 柿本健作, 山口貴弘, 尾花裕孝 : LC/MS/MS による畜水産物中のサルファ剤一斉分析法の検討, 大阪府立公衆衛生研究所報, **47**, 13-15 (2009)
- 3) 藤田瑞香, 柿本健作, 田口修三, 田中之雄 : LC-MS/MS による食品中のテトラサイクリン系抗生物質の分析法の検討, 大阪府立公衆衛生研究所報, **45**, 77-81 (2007)
- 4) 柿本健作, 山口貴弘, 永吉晴奈, 山口瑞香, 尾花裕孝 : LC-MS/MS を用いた畜水産物中駆虫剤の分析, 大阪府立公衆衛生研究所報, **49**, 15-19 (2011)
- 5) 山口貴弘, 柿本健作, 永吉晴奈, 山口瑞香, 尾花裕孝 : LC/MS/MS による畜産食品中のホルモン剤一斉分析法の検討, 大阪府立公衆衛生研究所報, **49**, 20-23 (2011)
- 6) Sara Bogialli : Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395**, 947-966 (2009)
- 7) Xi Xia, Yuanyuan Wang, Xia Wang, Yun Li, Feng Zhong, Xiaowei Li, Yaoling Huang, Shuangyang Ding, Jianzhong Shen : Validation of a method for simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles and chloramphenicols in swine tissues by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Jornal of Chromatography A*, **1292**, 96-103 (2013)
- 8) M. Gbylik, A. Posymiak, K. Mitrowska, T. Bladek and J. Zmudzki : Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, **30**, 940-948 (2013)
- 9) 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号 (2007)
- 10) 「食品、添加物等の規格基準」昭和 34 年 12 月 28 日 厚生省告示第 370 号 (1962)
- 11) 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号 (2005)

## 溶液中における合成抗菌剤の安定性

内田耕太郎\* 柿本健作\* 山口貴弘\* 永吉晴奈\* 起橋雅浩\* 小西良昌\* 梶村計志\*

合成抗菌剤 41 種類のアセトニトリル溶液を対象に、長期間保存した場合の安定性、ガラス及びポリプロピレン製容器への吸着性、光に対する安定性について検討した。その結果、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存したアセトニトリル溶液、および  $4^{\circ}\text{C}$  で保存した 10% アセトニトリル溶液において、全ての化合物が 1 年間安定であること、また、キノロン剤の多くがガラスに吸着すること、さらに、キノロン剤とサルファ剤の一部が光照射下で分解することがわかった。これらのことから、今回検討した合成抗菌剤を取り扱う場合に、保存容器の材質と遮光に注意が必要であることが示された。

キーワード: 合成抗菌剤、安定性、吸着、光分解、高速液体クロマトグラフ

Key words: Antibiotics, Stability, Adsorption, Photodegradation, HPLC

当所では食品中の動物用医薬品の残留検査を行っており、アセトニトリルで調製した標準溶液を使用している。溶液中における合成抗菌剤の安定性について、いくつか報告があるが<sup>1) 2) 3)</sup>、当所の検査で適用している条件である、アセトニトリル溶液 ( $-20^{\circ}\text{C}$  保存)、10% アセトニトリル溶液 ( $4^{\circ}\text{C}$  保存) で、キノロン剤、サルファ剤、代謝拮抗剤の安定性を調査した報告はほとんどない。そこで、これらの条件での安定性を検討した。

医薬品の中にはガラスやプラスチックに吸着するものがある。例えば抗がん剤のフルオロウラシルや、糖尿病治療薬のインスリンはガラスやポリ塩化ビニルに吸着することが知られている<sup>4)</sup>。そこで、標準溶液の保管に用いることの多い、ガラスまたはポリプロピレン製容器に合成抗菌剤がどの程度吸着するか調べた。

また、医薬品の中には光に弱いため、暗所で取り扱わなければならないものもある。当所で検査を行っているキノロン剤も、光照射下で分解することが報告されているものがある<sup>5) 6)</sup>。そこで、光に対する安定性についても検討した。

## 方法

### 1. 試薬、器具

1-1. 標準品: キノロン剤 15 種類、サルファ剤 22 種類、代謝拮抗剤 4 種類を対象とした。林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)、Dr Ehrenstorfer 社、Sigma-Aldrich 社、および U.S. Pharmacopeial Convention 製の残留動物薬分析用もしくはその同等品を用いた。

1-2. 標準溶液: 標準品をアセトニトリルまたはメタノールに溶解し、標準溶液 ( $100\sim 1000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を調製した。標準溶液を適便、希釈し、アセトニトリル溶液 ( $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) と 10% アセトニトリル溶液 ( $0.1, 1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) の 3 種類を調製した。

1-3. その他の試薬、器具: パラヒドロキシン安息香酸エチルは関東化学(株) 製特級を用いた。水は Merck Millipore 社製 Milli-Q 純水製造装置 (Elix Advantage、MilliQ Advantage A10) で精製した水 (比抵抗値  $18.2\ \text{M}\ \Omega\cdot\text{cm}$ ) を使用した。アセトニトリルおよびメタノールは和光純薬工業(株) 製残留農薬 PCB 試験用を用いた。りん酸二水素ナトリウム水和物は和光純薬工業(株) 製試薬特級を使用した。ガラス製インサートはアジレント・テクノロジー(株) 製  $400\ \mu\text{l}$  透明ガラス平底インサートを用いた。ポリプロピレン (PP) 製インサートはアジレント・テクノロジー(株) 製  $400\ \mu\text{l}$  ポリプ

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Stability of Antibiotics in Solutions

by Kotaro UCHIDA, Kensaku KAKIMOTO, Takahiro YAMAGUCHI, Haruna NAGAYOSHI, Masahiro OKIHASHI, Yoshimasa KONISHI and Keiji KAJIMURA

ロピレン平底インサートを使用した。PP 製遠沈管 (15、50 mL) は AGC テクノグラス (株) 製を用いた。

## 2. HPLC

LC: Waters 社製 e2695 Separation Module、PDA 検出器: Waters 社製 2998 Photodiode Array Detector、分析カラム: SUPELCO 社製 Ascentis Express C18 (2.7  $\mu\text{m}$ 、4.6  $\times$  150 mm)

## 3. 測定条件

3-1. 移動相: A 液: 50 mmol/L リン酸二水素ナトリウム水溶液、B 液: アセトニトリル、グラジエント条件: (%B) Initial (10)  $\rightarrow$  10 min (70)、流速: 1 mL/min  
カラム温度: 40°C、注入量: 10  $\mu\text{L}$

3-2. PDA 検出器測定条件: それぞれの化合物の極大波長付近でピーク面積を求めた。表 1 に溶出時間と測定波長を示した。

## 4. 標準溶液の安定性

合成抗菌剤のアセトニトリル溶液 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 約 50 mL を PP 製遠沈管で、1 年間、-20°C、暗所で保存した。また、10%アセトニトリル溶液 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 4°C で同様に保存した。保存の前後のピーク面積を測定し、パラヒドロキシ安息香酸エチル (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  10%アセトニトリル溶液) に対するピーク面積比を算出した (式 1)。パラヒドロキシ安息香酸エチルは測定日による PDA 検出器の感度の違いを補正するために使用した。アセトニトリル溶液は水で 10 倍に希釈し、10%アセトニトリル溶液は直接測定した。保管の前後それぞれのピーク面積比から残存率 (%) を算出した (式 2)。

$$\text{式 (1) ピーク面積比} = \frac{\text{合成抗菌剤のピーク面積}}{\text{パラヒドロキシ安息香酸エチルのピーク面積}}$$

$$\text{式 (2) 残存率 (\%)} = \frac{\text{保存後のピーク面積比}}{\text{保存前のピーク面積比}} \times 100$$

表 1. 溶出時間と測定波長

Compound	Retention time (min)	Wavelength (nm)	Compound	Retention time (min)	Wavelength (nm)
<i>Quinolones</i>			Sulfadimethoxine	6.6	270
Ciprofloxacin	3.9	277	Sulfadimidine	4.6	265
Danofloxacin	4.2	282	Sulfadoxine	5.6	272
Difloxacin	5.3	279	Sulfaethoxy pyridazine	7.7	265
Enoxacin	3.7	270	Sulfaguanidine	1.7	260
Enrofloxacin	4.6	291	Sulfamerazine	4.1	266
Flumequine	7.7	234	Sulfamethoxazole	5.6	269
Marbofloxacin	3.8	298	Sulfamethoxy pyridazine	4.6	265
Nalidixic acid	7.5	256	Sulfamonomethoxine	5.0	272
Norfloxacin	3.8	277	Sulfanilamide	2.0	258
Ofloxacin	4.0	294	Sulfanitran	5.7	263
Orbifloxacin	4.4	277	Sulfaquinoxaline	6.5	247
Oxolinic acid	7.5	260	Sulfathiazole	3.6	285
Pipemidic acid	3.1	275	Sulfatroxazole	5.7	268
Piromidic acid	8.5	282	Sulfisomidine	2.9	283
Sarafloxacin	4.7	279	Sulfisoxazole	5.5	268
<i>Sulfonamides</i>			Sulfisozole	4.7	269
Sulfabenzamide	5.3	264	<i>Antimetabolites</i>		
Sulfabromomethazine	7.9	271	Diaveridine	3.5	200
Sulfacetamide	2.8	268	Ormethoprim	4.1	202
Sulfachlorpyridazine	5.2	270	Pyrimethamine	5.7	210
Sulfadiazine	3.3	268	Trimethoprim	3.8	204

## 5. 容器への吸着

ガラス製インサートおよび、PP製インサートに10%アセトニトリル溶液(0.1µg/mL)を入れ、遮光して、キノロン剤は1時間、サルファ剤、代謝拮抗剤は6時間放置した。ピーク面積を測定し、式(3)から残存率(%)を計算した。

$$\text{式(3) 残存率(\%)} = \frac{\text{ピーク面積}}{\text{PP製で保管直後のピーク面積}} \times 100$$

## 6. 光に対する安定性

合成抗菌剤の10%アセトニトリル溶液(1µg/mL)1mLをそれぞれPP製遠沈管に入れたものを2組用意し、室内(約22°C)に放置した。1つはアルミ箔で包み、もう1つは遮光せず、2週間放置した。HPLCでピーク面積を求め、式(1)、(2)から残存率を計算した。特に分解が進行したエノキサシン、マルボフロキサシン、オルビフロキサシンについては、1、3、6、24、48時間後の残存率も計算した。

## 結果および考察

### 1. 標準溶液の安定性

合成抗菌剤のアセトニトリル溶液を-20°C、10%アセトニトリル溶液を4°Cで1年間保存したところ、残存率は95.6~101.7%であった(表2)。今回検討した合成抗菌剤はこれらの条件で安定であり、溶液の状態でも問題ないと考えられた。

### 2. 容器への吸着

サルファ剤、代謝拮抗剤をガラスまたはPP製インサートに入れて放置したところ、6時間経過後の残存率は96.0~104.1%であった(表3)。一方、キノロン剤をガラス製インサートに入れた場合、ダノフロキサシンやノルフロキサシンなど、多くのキノロン剤がガラス製インサートに吸着した(表4)。このことから、キノロン剤を保存する場合には容器の材質に注意が必要であることが示された。

表2. 標準溶液の安定性

Compound	Residue (%)		Compound	Residue (%)	
	Acetonitrile (-20°C)	10% Acetonitrile (4°C)		Acetonitrile (-20°C)	10% Acetonitrile (4°C)
<i>Quinolones</i>			Sulfadimethoxine	99.3	99.9
Ciprofloxacin	97.7	95.7	Sulfadimidine	98.5	97.1
Danofloxacin	98.5	96.0	Sulfadoxine	98.8	96.7
Difloxacin	99.2	99.9	Sulfaethoxypyridazine	99.2	97.3
Enoxacin	96.5	96.2	Sulfaguanidine	96.1	97.2
Enrofloxacin	97.2	97.9	Sulfamerazine	99.5	99.3
Flumequine	97.5	99.1	Sulfamethoxazole	100.4	100.1
Marbofloxacin	96.4	98.1	Sulfamethoxy-pyridazine	99.2	99.6
Nalidixic acid	98.1	97.5	Sulfamonomethoxine	99.0	99.2
Norfloxacin	99.0	97.0	Sulfanilamide	96.4	95.7
Ofloxacin	96.2	96.2	Sulfantran	99.1	98.2
Orbifloxacin	98.4	98.9	Sulfaquinolaxaline	99.0	99.0
Oxolinic acid	97.4	97.9	Sulfathiazole	99.0	99.0
Pipemidic acid	97.2	96.8	Sulfatroxazole	99.4	99.6
Piromidic acid	100.3	99.3	Sulfisomidine	99.5	99.1
Sarafloxacin	99.4	99.4	Sulfisoxazole	99.7	99.0
<i>Sulfonamides</i>			Sulfisozole	100.2	99.9
Sulfabenzamide	99.5	99.1	<i>Antimetabolites</i>		
Sulfabromomethazine	101.7	100.8	Diaveridine	97.7	96.7
Sulfacetamide	100.6	99.0	Ormethoprim	98.8	97.3
Sulfachlorpyridazine	98.9	95.6	Pyrimethamine	97.8	96.5
Sulfadiazine	99.0	96.8	Trimethoprim	100.5	96.6

Test period: 1 year

### 3. 光に対する安定性

合成抗菌剤の10%アセトニトリル溶液をPP製遠沈管に入れ、室温、暗所で2週間保管したところ、いずれの化合物も分解しなかった。一方、遮光しなかったものでは、キノロン剤とサルファ剤の一部が減少し、分解していると考えられた(表5)。特に、エノキサシン、マルボフロキサシン、オルビフロキサシンは数時間で分解が進むことから(図1)、分析操作中も、遮光に注意する必要があることがわかった。

### 結論

キノロン剤15種類、サルファ剤22種類、代謝拮抗

剤4種類のアセトニトリル溶液中での安定性、ガラスおよびPP製容器への吸着性、光に対する安定性について検討した。これら合成抗菌剤はいずれも、-20℃で保存したアセトニトリル溶液および4℃で保存した10%アセトニトリル溶液中で1年間安定であった。しかし、キノロン剤の多くがガラス容器に吸着し、10%アセトニトリル溶液を6時間保管した場合、ダノフロキサシンやノルフロキサシンでは50%以下に減少した。また、光に対する安定性を検討したところ、キノロン剤とサルファ剤の一部が減少し照射下で分解していると考えられた。以上の結果から、合成抗菌剤の標準溶液を取り扱う場合には、保存容器の素材と遮光に注意が必要であることが示された。

表3. サルファ剤、代謝拮抗剤の容器への吸着

Compound	Residue (%)		Compound	Residue (%)	
	Glass	Polypropylene		Glass	Polypropylene
<i>Sulfonamides</i>			Sulfanilamide	101.9	100.6
Sulfabenzamide	100.6	101.5	Sulfanitrans	102.4	100.4
Sulfabromomethazine	104.1	100.0	Sulfapyridine	101.1	101.9
Sulfacetamide	101.0	102.3	Sulfaquinoxaline	101.5	101.6
Sulfachlorpyridazine	102.4	99.6	Sulfathiazole	100.1	99.7
Sulfadiazine	101.5	99.5	Sulfatroxazole	100.7	100.6
Sulfadimethoxine	98.8	98.8	Sulfisomidine	102.0	100.9
Sulfadimidine	99.6	99.5	Sulfisoxazole	100.1	99.1
Sulfadoxine	100.6	100.3	Sulfisozole	100.5	101.4
Sulfaethoxypyridazine	99.3	98.2	<i>Antimetabolites</i>		
Sulfaguanidine	98.9	101.3	Diaveridine	98.4	97.3
Sulfamerazine	103.3	100.9	Ormethoprim	100.5	99.7
Sulfamethoxazole	101.2	100.7	Pyrimethamine	98.7	96.0
Sulfamethoxypyridazine	101.7	100.9	Trimethoprim	100.2	99.4
Sulfamonomethoxine	100.0	101.7			

Test period: 6 hours

表4. キノロン剤の容器への吸着

Compound	Residue (%)		Compound	Residue (%)	
	Glass	Polypropylene		Glass	Polypropylene
Ciprofloxacin	54.5 ± 4.4	97.9 ± 2.7	Nalidixic acid	99.1 ± 0.7	98.2 ± 2.2
Danofloxacin	44.5 ± 4.2	98.8 ± 1.6	Norfloxacin	47.2 ± 4.2	96.2 ± 1.2
Difloxacin	66.8 ± 9.1	98.9 ± 0.8	Ofloxacin	69.1 ± 7.5	99.2 ± 1.6
Enoxacin	57.0 ± 5.2	98.0 ± 1.5	Orbifloxacin	92.8 ± 1.1	98.7 ± 1.6
Enrofloxacin	64.6 ± 5.5	98.3 ± 2.7	Oxolinic acid	100.9 ± 0.0	100.2 ± 0.4
Flumequine	100.0 ± 0.1	98.8 ± 0.7	Pipemidic acid	80.4 ± 4.7	100.8 ± 1.5
Marbofloxacin	80.5 ± 2.6	99.8 ± 0.3	Sarafloxacin	60.3 ± 7.5	95.0 ± 0.4

Test period: 1 hour Value are shown as average ± standard deviation (N=3)

表 5. 光に対する安定性

Compound	Residue (%)		Compound	Residue (%)	
	Dark	Light		Dark	Light
<i>Quinolones</i>			Sulfadimethoxine	101.8	97.8
Ciprofloxacin	100.8	73.6	Sulfadimidine	100.8	95.9
Danofloxacin	102.2	23.8	Sulfadoxine	101.1	92.0
Difloxacin	101.0	34.3	Sulfaethoxypyridazine	100.6	100.5
Enoxacin	102.4	0.0	Sulfaguandine	102.2	103.4
Enrofloxacin	102.3	33.4	Sulfamerazine	99.8	93.3
Flumequine	100.8	95.7	Sulfamethoxazole	99.9	100.8
Marbofloxacin	102.7	0.0	Sulfamethoxypyridazine	99.3	82.6
Nalidixic acid	101.4	45.2	Sulfamonomethoxine	102.5	95.8
Norfloxacin	101.9	78.5	Sulfanilamide	102.6	103.2
Ofloxacin	102.1	97.1	Sulfantran	100.6	79.4
Orbifloxacin	101.2	0.0	Sulfaquinoxaline	99.1	95.1
Oxolinic acid	102.6	97.9	Sulfathiazole	99.8	99.4
Pipemidic acid	100.7	59.8	Sulfatroxazole	101.9	97.1
Piromidic acid	100.6	89.2	Sulfisomidine	99.8	99.9
Sarafloxacin	99.6	71.2	Sulfisoxazole	101.5	99.2
<i>Sulfonamides</i>			Sulfisozole	99.5	100.3
Sulfabenzamide	100.0	100.7	<i>Antimetabolites</i>		
Sulfabromomethazine	98.8	98.7	Diaveridine	102.6	103.8
Sulfacetamide	98.2	98.0	Ormethoprim	103.1	102.7
Sulfachlorpyridazine	100.8	66.1	Pyrimethamine	100.4	100.7
Sulfadiazine	101.1	91.1	Trimethoprim	102.7	102.6

Test period: 2 weeks

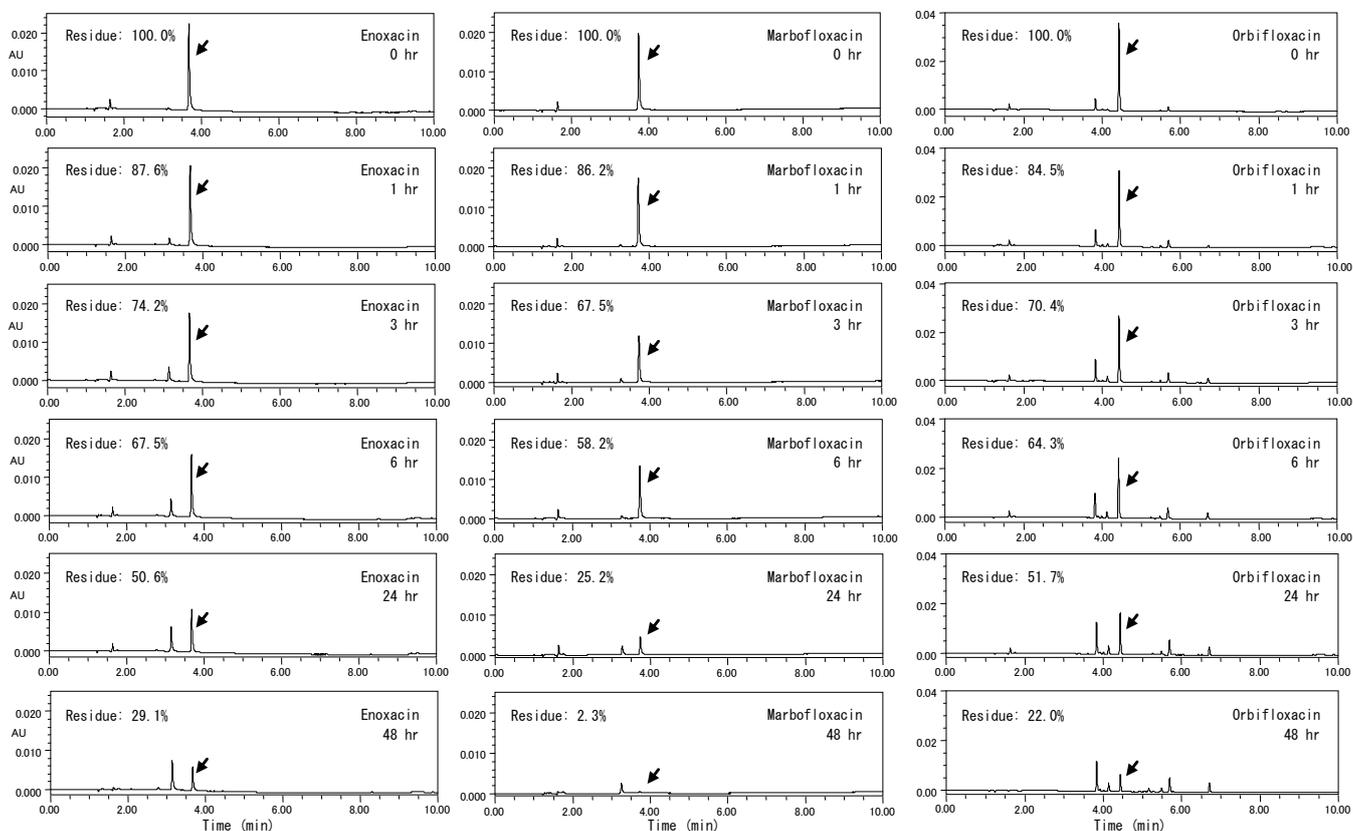


図 1. 光に対する安定性

## 文献

- 1) Lieve Okerman, Johan Van Hende, Lieven De Zutter : Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing, *Analytica Chimica Acta*, **586**, 284-288 (2007)
- 2) B.J.A. Berendsen , I.J.W. Elbers and A.A.M. Stolker : Determination of stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection, *Food Additives and Contaminants*, **28**, 1657-1666 (2011)
- 3) Ritva Karinen, Elisabeth Leere Oiestad, Wenche Andreassen, Anne Smith-Kielland, and Asbjorg Christophersen : Comparison of the stability of stock solutions of drugs of abuse and other drugs stored in a freezer, refrigerator, and at ambient temperature for up to one year, *Journal of Analytical Toxicology*, **35**, 583-590 (2011)
- 4) A. M. Yahya, J. C. McElnay, P. F. D'Arcy : Drug sorption to grass and plastics, *Drug Metabolism and Drug Interactions*, **6**, 1-45 (1988)
- 5) Eva-Maria Tiefenbacher, Ekkehard Haen, Bernhard Przybilla, and Hermann Kurz : Photodegradation of some quinolones used as antimicrobial therapeutics, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **83**, 463-467 (1994)
- 6) J. Burhenne, M. Ludwig and M. Spiteller : Polar photodegradation products of quinolones determined by HPLC/MS/MS, *Chemosphere*, **38**, 1279-1286 (1999)

## 特定原材料検査における「小麦」と「えび」の検出事例について

### —平成 21 年度～平成 25 年度—

清田恭平\*      吉光真人\*      野村千枝\*      栗津薫\*      山口瑞香\*  
岡本-柿本葉\*      柿本幸子\*      阿久津和彦\*      梶村計志\*

平成 21 年度から平成 25 年度までの 5 年間における特定原材料「小麦」および「えび・かに」を対象とした加工食品の検査結果についてまとめた。特定原材料「小麦」の検査では加工食品 41 検体のうち 1 検体、「えび・かに」の検査では加工食品 48 検体のうち 3 検体がそれぞれ陽性と判定された。

キーワード：食物アレルギー、特定原材料、酵素免疫測定法、ポリメラーゼ連鎖反応

Keywords: food allergy, specific raw materials, enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction

食物アレルギーの患者数は、最近増加傾向にあるとされている。現在、食物アレルギー疾患の根本的な治療はなく、食品に含まれるアレルギー物質の適切な除去が発症予防に重要な役割を果たしている。したがって、食品に表示されたアレルギー物質情報の有無や適切性は、食物アレルギー患者が日頃食品を選択する上で非常に重要である。この様な状況を背景として、平成 14 年 4 月からアレルギー物質を含む食品の表示制度が施行された。現在、この表示制度において、表示が義務づけられた品目は特定原材料と呼ばれ、えび、かに、小麦、そば、卵、乳、落花生、の 7 品目が指定されている<sup>1)</sup>。

表示制度の運用においては、表示との整合性を確認する必要がある。当所では、平成 16 年度より特定原材料の検査を開始した。平成 21 年度からは、特定原材料 7 品目に対し年間計 50 検体程度について検査を実施してきた。これらの検査は、検査対象の特定原材料を原

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課  
Detecting Unintentional Contamination of Wheat and Shrimp in Foods Examined in Fiscal Years 2009-2013  
by Kyohei KIYOTA, Masato YOSHIMITSU, Chie NOMURA, Kaoru AWAZU, Mizuka YAMAGUCHI, You KAKIMOTO-OKAMOTO, Sachiko KAKIMOTO, Kazuhiko AKUTSU and Keiji KAJIMURA

材料として使用していない食品を検体とし、その特定原材料の非意図的な混入の有無を明らかにすることを主な目的としている。

今回、平成 21 年度から平成 25 年度の 5 年間の特定原材料検査で得られた結果において、特定原材料「小麦」および「えび」の非意図的な混入がそれぞれ認められ、それらの検体についてまとめた。

## 方法

### 1. 試料

大阪府内の製造所および小売店で収去または買い上げされた検体で、検査項目を「小麦」とする加工食品 41 検体、「えび・かに」を検査項目とする加工食品 48 検体について検査を行った。

### 2. 試薬

#### (1) 定量検査法 (ELISA)

FASTKIT エライザ Ver. II シリーズ・小麦 (日本ハム社製)、FASPEK 特定原材料測定キット・小麦 (グリアジン) (森永生科学研究所製)、FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(日水製薬社製)、甲殻類キット「マルハ」(マルハニチロ食品社製)を用いた<sup>2)</sup>。

#### (2) 定性検査法 (PCR)

Genomic-Tip 20/G (QIAGEN 社製)、 $\alpha$ -アミラーゼ (Sigma-Aldrich 社製)、Proteinase K (QIAGEN 社製)、AmpliTaqGold DNA ポリメラーゼ (Life Technologies 社製)、えび検出用プライマー対、およびかに検出用プライマー対 (Life Technologies 社製)、NuSieve 3:1 アガロース (ロンザジャパン社製)、DynaMarker DNA Low D (バイオダイナミクス研究所社製)、制限酵素 Hae III (タカラバイオ社製) を用いた<sup>2)</sup>。

### 3. 検査方法

いずれも消費者庁からの通知法に従って行った<sup>2)</sup>。通知法は、スクリーニング検査として、定量検査法 (enzyme-linked immunosorbent assay、以下 ELISA 法とする) と確認検査として、定性検査法 (polymerase chain reaction、以下 PCR 法、またはウェスタンブロット法) から構成されている。「えび・かに」の定量検査で使用した ELISA キットは、甲殻類の指標タンパク質トロポミオシンを検出するため、「えび」と「かに」を区別できない。そのため、両者の区別は各々の特異的な DNA 配列を対象とする定性検査の PCR によって行った。最終的に、定量検査法と定性検査法の両方で陽性となった場合に、検査結果を陽性と判定した。

#### (1) 定量検査法 (ELISA)

検査は異なる 2 キットで実施した。個々の特定原材料等の総タンパク質量が数  $\mu\text{g/g}$  程度に満たない場合は、アレルギー症状を誘発する可能性が極めて低いとされる<sup>3)</sup>。検査では、1 つ以上のキットにおいて、試料重量 1 g あたりの指標タンパク質含量が 10  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{g/g}$ ) 以上であった試料については、微量を超える特定原材料が混入している可能性があるものとし、その検体を陽性と判定した。

#### (2) 定性検査法 (PCR)

定量検査法で陽性と判定された検体に対して、定性検査法を実施した。概要は、イオン交換樹脂タイプキット法として Genomic-Tip 20/G を用いて 1 試料につき 2 点並行で DNA を抽出精製し、PCR に供した。「小麦」では 3%、「えび」では 4% のアガロースゲルをそれぞれ用いて電気泳動後、増幅産物の有無を確認した。

検査結果を表 1 に示す。検査項目「小麦」の検査では、1 検体が陽性であった。この検体は団子 (和生菓子) であり、小麦は原材料として使用されていなかった。当該製造所において、他製品の製造時に小麦粉を採取するのに使用した器具を当該検体の製造時に使用した器具と共用していたことが判明し、これが混入の原因であると推測された。その後、保健所の指導を経て器具の使用状況が改善されたため、同製品の別ロット品を検査したところ、検査結果は陰性であった。製造所における器具等の洗浄不足・共用は、特定原材料の混入原因として他事例でも報告されており<sup>4)</sup>、混入防止対策を講じる際の要注意点と考えられる。

検査項目「えび・かに」の検査では、3 検体が「えび」陽性・「かに」陰性であった。これら 3 検体はすべて魚肉練り製品であり、「えび」は原材料に使用されていなかった。しかし、魚肉練り製品の場合は、「えび」を餌とする魚がすり身に使用され、その魚の消化管内容物のえびが製品に混入することが知られている<sup>4)</sup>。今回の 3 検体は、同一製造所で製造され、共通のすり身 (イトヨリとタチウオ) が使用されていた。他報告と同様に、すり身に「えび」を餌とする魚が使用され、当該製品に混入したことが推測された。また、すり身用魚が小型の魚に変更されれば、消化管内容物がより多く混入し、「えび・かに」の混入量が変動する可能性があり、注意が必要である<sup>5)</sup>。消費者庁ホームページのアレルギー Q&A<sup>6)</sup> によると、特定原材料が混入する可能性を完全に否定できない場合であっても、特定原材料が製品の原材料の一部を構成していないと判断される場合には、表示の義務はないとされる。今回の陽性検出事例では、加工食品の製造状況から、原材料として扱われないものによる「えび」の混入と考えられ、表示義務に違反するものではないとされた。

消費者の嗜好の変化や食品加工技術の進歩に伴い、加工食品の原材料や製造方法には多少の変更が生じるものであり、アレルギー物質の非意図的な混入を抑えるためには、検査の継続的な実施が必要である。また、食品に表示されたアレルギー物質情報の質を維持向上するために、検査技術の開発と発展が期待される。

おわりに

## 結果と考察

検体採取にご尽力いただき、また関連情報をご提供いただいた大阪府各保健所の担当者の方々に深謝いたします。

表 1. 定量および定性検査の各陽性率

検査項目	陽性率（陽性検体数/全検体数）			
	ELISA	小麦 PCR	えび PCR	かに PCR
小麦	1/41	1/1	—	—
えび・かに (甲殻類)	3/48	—	3/3	0/3

—：実施せず

## 文献

- 1) 平成 25 年 9 月 20 日, 消費者庁次長通知消食表第 257 号: アレルギー物質を含む食品に関する表示について
- 2) 平成 22 年 9 月 10 日, 消費者庁次長通知消食表第 286 号: アレルギー物質を含む食品の検査方法について
- 3) 平成 26 年 3 月, 消費者庁, アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック
- 4) 立野幸治, 藤原美智子, 津田元彦, 三浦 泉: 山口県内を流通する食品中のアレルギー特定原材料検査事例について (平成 16 年度~平成 18 年度), 山口県環境保健センター所報, 49, 52-55 (2006)
- 5) 酒井信夫, 安達玲子, 柴原裕亮, 岡道弘, 阿部晃久, 清木興介, 織田浩志, 吉岡久史, 塩見一雄, 宇理須厚雄, 穂山浩, 手島玲子: 食品原材料に含まれる「えび」、「かに」等の甲殻類タンパク質の実態調査, 日本食品化学学会誌, 15(1), 12-17 (2008)
- 6) 消費者庁ホームページ: アレルギー物質を含む食品に関する表示 Q&A, [http://www.caa.go.jp/foods/qa/allergy\\_01\\_qa.html#a\\_b-06-03](http://www.caa.go.jp/foods/qa/allergy_01_qa.html#a_b-06-03)

## ウーロン茶葉中のインドキサカルブおよびフィプロニル試験法の検討

山口聡子\*<sup>1</sup> 高取聡\*<sup>1</sup> 北川陽子\*<sup>1</sup> 福井直樹\*<sup>1</sup>  
山本遥菜\*<sup>1</sup> 梶村計志\*<sup>1</sup> 尾花裕孝\*<sup>2</sup>

ウーロン茶葉中に含まれるインドキサカルブおよびフィプロニルの試験法について、検討を行った。厚生労働省が通知する一斉試験法（通知一斉試験法）で得られる試験液は精製が不十分であると考えられたことから、3 種類の精製カラムを併用する改良試験法を検討した。妥当性評価ガイドラインに従い、LC-MS/MS および GC-MS を用いた分析法の真度、併行精度および室内精度を算出した結果、共に目標値を満たした。特に改良試験法では、通知一斉試験法の試験液で残存していた色素およびカフェインが除去されており、結果の信頼性を高めるために有効であると考えられた。

キーワード：ウーロン茶、インドキサカルブ、フィプロニル、妥当性評価試験

Key words: oolong tea, indoxacarb, fipronil, method validation study

2012 年 11～12 月にわたり、中国産ウーロン茶葉から食品衛生法に定められる残留基準を超過するインドキサカルブ、フィプロニルが茶製造業者の自主検査により検出され、製品の回収が相次いだ。これらの事例から、食品衛生法に適合しない中国産ウーロン茶葉が国内に流通している可能性が示唆された。これまで経験のなかったこれらの検査を行うため、茶葉の試験法について検討を行った。

インドキサカルブは個別試験法がなく、またフィプロニルは茶葉に対する個別試験法が定められていないため、厚生労働省が通知する「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」（以下、通知一斉試験法）<sup>1)</sup>の適用を試みた。その結果、試験液は黄色を呈しており、試料によっては白色沈殿物の生成が確認された。さらに農薬の残留基準値が低い（インドキサカルブ：0.01 µg/g、フィプロニル：0.002 µg/g）

ことから、分析機器の感度によっては通知一斉試験法を使用して残留基準への適合性を判定することが困難な場合も予測され、改良試験法の検討が必要と考えられた。

茶中の残留農薬一斉試験法の精製工程については、色素、カフェイン等の莢雑成分の多さから、複数の固相カラムを組み合わせた方法が検討されている<sup>2-6)</sup>。色素の除去では、グラファイトカーボン（GCB）/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル（PSA）積層カラムの下部に GCB カラムを連結した精製法が有効であると報告されている<sup>5)</sup>。また、カフェインの除去にはシリカゲルカラムによる精製が有効であることが報告されている<sup>3,4)</sup>。そこで、これらの精製工程を組み合わせたウーロン茶葉中のインドキサカルブおよびフィプロニルの試験法について検討した。

\*1 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

\*2 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Determination of Indoxacarb and Fipronil in Oolong Tea Leaves

by Satoko YAMAGUCHI, Satoshi TAKATORI, Yoko KITAGAWA,  
Naoki FUKUI, Haruna YAMAMOTO, Keiji KAJIMURA and Hirota  
OBANA

## 方法

### 1. 試薬

インドキサカルブ MP 標準品（純度 99.0%）およびフィプロニル標準品（純度 98.0%）は和光純薬工業（株）製を用いた。各標準品を 1000 µg/mL にな

るようにアセトンで溶解し、標準原液とした。各標準原液を、インドキサカルブおよびフィプロニルの濃度比が 5:1 (インドキサカルブ : 100 µg/mL、フィプロニル : 20 µg/mL) になるように混合し、混合標準溶液とした。混合標準溶液は、GC-MS 分析用にはアセトン/n-ヘキサン (1:1) を用い、LC-MS/MS 分析用にはメタノールを用いて希釈した。アセトニトリル、アセトン、トルエン、n-ヘキサンおよびメタノールは、和光純薬工業 (株) 製残留農薬試験用を使用した。塩化ナトリウム (残留農薬試験用)、無水硫酸ナトリウム (残留農薬試験用)、リン酸水素二カリウム (特級)、リン酸二水素カリウム (特級)、酢酸アンモニウム (特級) および LC/MS 用メタノールは、和光純薬工業 (株) 製を使用した。精製水の作成には Millipore 社製 Milli-Q システムを使用した。精製用カラムには、オクタデシルシリル化シリカゲル (C18) カラム (ENVI-18、1000 mg、SUPELCO)、GCB/アミノプロピルシリル化シリカゲル (NH<sub>2</sub>) 積層カラム (ENVI-Carb/NH<sub>2</sub>、500/500 mg、SUPELCO)、GCB/PSA 積層カラム (ENVI-CarbII/PSA、500/500 mg、SUPELCO)、GCB カラム (ENVI-Carb、500 mg、SUPELCO) およびシリカゲルカラム (InertSep SI、1000 mg、ジーエルサイエンス (株) 製) を使用した。

リン酸緩衝液は、リン酸水素二カリウム 52.7 g およびリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、水酸化ナトリウムを用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

## 2. 試料

試料はインドキサカルブおよびフィプロニルを含まないウーロン茶葉を大阪府内で入手した。

## 3. 器具および機器

ホモジナイザーは KINEMATICA 社製 Polytron PT10-35、遠心分離装置は日立工機 (株) 製 Himac CR20GIII を使用した。LC-MS/MS は LC 部分に (株) 島津製作所製 Nexera を備えた AB SCIEX 社製 4000QTRAP を使用した。GC-MS は Agilent 社製 5973 inert systems および Thermo Fisher Scientific 社製 Polaris-Q を使用した。

## 4. 分析条件

### 4.1 LC-MS/MS

[LC 部]

カラム : ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 µm; 2.1×100 mm; Waters 社製)、プレカラム : ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 µm; 2.1×5 mm ; Waters 社製)、移動相 (A) : 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、移動相 (B) : 0.5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液、流速 : 200 µL/min、カラム温度 : 50°C、注入量 : 5 µL、グラジエント (B%) : 0min (35%) →7-16min (95%) →16-26min (35%)

[MS/MS 部]

イオン化モード : ESI、乾燥ガス温度 : 500°C、測定モード : MRM、イオン化電圧 : インドキサカルブ (+4000 V)、フィプロニル (-4500 V)、トランジションおよびコリジョンエネルギー : インドキサカルブ (*m/z* 528/203, 55 V)、フィプロニル (*m/z* -435/-330, -22 V)

### 4.2 GC-MS (NCI)

カラム : HP-5MSI (0.25 µm; 30 m×0.25 mm; Agilent 社製)、カラム温度 : 50°C (1 min) →25°C/min→125°C (0 min) →10°C/min→300°C (8.5 min)、注入口温度 : 250°C、トランスファーライン温度 : 250°C、注入量 : 1 µL (スプリットレス)、キャリアガス : ヘリウム (コンスタントフロー、1.0 mL/min)、MS イオン源温度 : 150°C、四重極温度 : 150°C、イオン化法 : 負化学イオン化法 (NCI)、反応ガス : メタン、分析モード : SIM、モニタリングイオン : インドキサカルブ (*m/z* 497)、フィプロニル (*m/z* 366)

### 4.3 GC-MS (EI-SCAN)

カラム : VF-5MS (0.25 µm; 30 m×0.25 mm; Agilent 社製)、カラム温度 : 60°C (1 min) →8°C/min→280°C (5 min)、注入口温度 : 250°C、トランスファーライン温度 : 280°C、注入量 : 1 µL (スプリットレス)、キャリアガス : ヘリウム (コンスタントフロー、1.5 mL/min)、MS イオン源温度 : 250°C、イオン化法 : EI、イオン化電圧 : 70 eV、分析モード : SCAN (*m/z* 45~550)

## 5. 試験液の調製

## 5.1 通知一斉試験法

### [抽出、塩析および脱水]

通知一斉試験法<sup>1)</sup>に準じて行った。試料 5.00 g を遠心管に正確に秤量し、精製水 20 mL を加えて 15 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、遠心分離 (3000 rpm ; 10 分間) し、上清をメスフラスコに回収した。遠心管内の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、ろ過した。得られたろ液と先の上清を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした (粗抽出液)。次に粗抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液 20 mL を加えて 10 分間振とうした。30 分間静置した後、アセトニトリル層を抽出液とした。

### [精製]

抽出液を通知に従って GCB/NH<sub>2</sub> 積層カラムで精製した。精製後の残留物をアセトン/n-ヘキサン (1 : 1) に溶かして、正確に 2 mL にしたものを GC-MS 用試験液 (試料 0.5 g/mL 相当) とした。なお、定量は GC-MS (NCI) で行った。また、LC-MS/MS 分析については、GC-MS 用試験液 0.2 mL を正確に採取して窒素気流下で乾固し、メタノール 0.3 mL および精製水 0.7 mL を正確に加えて LC-MS/MS 用試験液とした (試料 0.1 g/mL 相当)。

## 5.2 改良試験法

操作手順を図 1 に示した。

### [抽出、塩析および脱水]

上記の通知一斉試験法と同様の操作により抽出液を得た。

### [精製]

精製 1 : C18 カラムにアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記で得られた抽出液全量を注入した後、アセトニトリル 5 mL で分液ろうとを洗浄して、併せてカラムに注入した。全溶出液を 40°C 以下で濃縮した。乾固する直前にアセトニトリル 3 mL を加えた後、超音波照射し、トルエン 1 mL を追加して不溶成分を溶解させた。

精製 2 : GCB/PSA 積層カラムおよび GCB カラムにアセトニトリル/トルエン (3:1) 10 mL をそれぞれ注入し、流出液は捨てた。GCB/PSA 積層カラムの下部に GCB カラムを接続し、バキュームマニホールド

### 抽出

試料 5.00 g 採取  
精製水 20 mL、15 分静置  
アセトニトリル 50 mL、ホモジナイズ 1 分  
遠心分離 (3000rpm、10 分)  
アセトニトリル 20 mL、ホモジナイズ 1 分  
アセトニトリル 100 mL 定容 (粗抽出液)

### 塩析・脱水

粗抽出液 20 mL 採取  
塩化ナトリウム 10 g、リン酸緩衝液 20 mL  
振とう 10 分、30 分静置、水層廃棄 (抽出液)

### 精製 1

C18 カラム (1000 mg)  
アセトニトリル 5 mL  
溶媒除去、アセトニトリル 3 mL、超音波 1 分、トルエン 1 mL

### 精製 2

GCB/PSA 積層カラム (500/500 mg) + GCB カラム (500 mg)  
アセトニトリル/トルエン (3:1) 40 mL  
溶媒除去、アセトン 10 mL  
溶媒除去、アセトン/ヘキサン (3:17) 5 mL  
溶媒除去、アセトン/ヘキサン (3:17) 4 mL、超音波 1 分

### 精製 3

シリカゲルカラム (1000 mg)  
アセトン/ヘキサン (3:17) 20 mL  
溶媒除去  
アセトン/ヘキサン (1:1) 2 mL 定容 (GC-MS 用試験液)  
メタノール/水 (3:7) (LC-MS/MS 用試験液)

### 分析

図 1 改良試験法の手順

に設置した。精製 1 で得られた試験液全量を注入した後、アセトニトリル/トルエン (3:1) 40 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮した。これにアセトン 10 mL を加えて 40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮し、次にアセトン/n-ヘキサン (3:17) 5 mL を加えて濃縮し、乾固する直前にアセトン/n-ヘキサン (3:17) 4 mL を加えて超音波照射し、不溶成分を溶解させた。

精製 3 : シリカゲルカラムにアセトン/n-ヘキサン (3:17) 10 mL を注入し、流出液は捨てた。精製 2 で得られた試験液全量を注入した後、アセトン/n-ヘキサン (3:17) 20 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以

## 結果および考察

下で 1 mL 以下に濃縮した。窒素気流下で乾固し、正確にアセトン/n-ヘキサン (1:1) 2mL を加えて GC-MS 用試験液 (試料 0.5 g/mL 相当) とした。LC-MS/MS 用試験液も上記と同様に調製した。

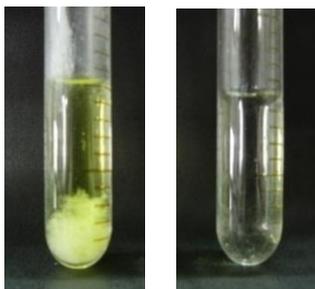
### 6. 検量線

LC-MS/MS 分析では、混合標準溶液を精製水で 10 倍に希釈したものを検量線に使用した。インドキサカルブおよびフィプロニルの検量線の範囲は、それぞれ 0.20~5.0 および 0.040~1.0 ng/mL とし、最低濃度においても S/N は 10 以上であることを確認した。

GC-MS 分析では、マトリックス添加標準溶液を使用した。マトリックス添加標準溶液は、インドキサカルブおよびフィプロニルが検出されないウーロン茶葉から調製した 1 g/mL 相当の試験液と混合標準溶液を 1:1 で混和した。インドキサカルブおよびフィプロニルの検量線の範囲は、それぞれ 1.0~10 および 0.20~2.0 ng/mL とし、最低濃度においても S/N は 10 以上であることを確認した。

### 7. 妥当性評価

妥当性評価は、基準値に相当するインドキサカルブおよびフィプロニルをそれぞれ 0.01 および 0.002  $\mu\text{g/g}$  になるように試料に添加し、妥当性評価ガイドラインに示される枝分かれ試験を実施した。すなわち、5.00 g のウーロン茶葉にインドキサカルブおよびフィプロニルをそれぞれ 0.10 および 0.020  $\mu\text{g/mL}$  含む混合アセトン溶液を正確に 0.5 mL 添加し、30 分間放置してから抽出した。試験で得られたデータから真度、併行精度および室内精度を算出した。なお、枝分かれ試験は、通知一斉試験法で分析者 2 名によって併行数 2 で 3 日間実施し、改良試験法では、分析者 1 名によって、併行数 2 で 6 日間実施した。



(A) 通知一斉試験法 (B) 改良試験法

図 2 GC-MS 用試験液 (試料 0.5 g/mL 相当)

### 1. 試験液の性状

通知一斉試験法で得られた GC-MS 用試験液には、莢雑成分が多く確認された。すなわち、試料 0.5 g/mL 相当になるようアセトン/n-ヘキサン (1:1) 溶液で調製した場合、上清は黄色を呈するとともに白色沈殿物が多く認められた (図 2A)。試料によっては、超音波照射を行っても沈殿物の溶解が困難なものもあったが、沈殿物が溶解し定量に支障がない場合、GC-MS 用には試料 0.5 g/mL 相当の試験液を用いた。LC-MS/MS 用試験液は、試料 0.1 g/mL 相当になるようにメタノールおよび水で調製した。当該試験液は薄い黄色で、白色沈殿物も認められなかった。

改良試験法で得られた GC-MS 用試験液 (試料 0.5 g/mL 相当) は、無色であり白色沈殿物も認められなかった (図 2B)。

色素の除去には GCB/PSA 積層カラムの下部に GCB カラムを追加する工程が有効であった。GCB/PSA 積層カラムのみでは、試験液に黄色色素が残存するが、当該色素は下部の GCB カラムで除去された。齊藤らは、色素除去効果は GCB カラムを GCB/PSA 積層カラムの下部に追加した場合に最も有効であると報告している<sup>5)</sup>。

上記の精製工程を経ても白色沈殿物は試験液に残存する。この除去にはシリカゲルカラムによるカフェイン除去工程が有効であった。改良試験法の試験液について、GC-MS (EI-SCAN) で分析したところ、カフェインに相当するピークが消失しており、その効果が確認された (図 3)。

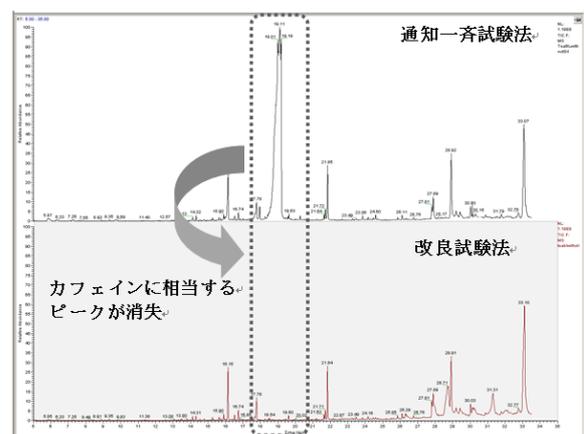


図 3 GC-MS (EI-SCAN) クロマトグラム

表1 妥当性評価結果

	通知一斉試験法				改良試験法			
	LC-MS/MS		GC-MS		LC-MS/MS		GC-MS	
	インドキサカルブ	フィプロニル	インドキサカルブ	フィプロニル	インドキサカルブ	フィプロニル	インドキサカルブ	フィプロニル
真度(%)	80.4	86.9	81.9	84.1	82.9	81.1	78.8	77.6
併行精度(%)	3.9	4.3	4.5	4.1	8.1	6.5	6.2	4.3
室内精度(%)	6.6	5.5	11.2	6.4	13.0	7.2	8.9	6.3

## 2. 妥当性評価

通知一斉試験法および改良試験法の妥当性評価の結果を示した(表1)。

両方法のクロマトグラムにおいて、選択性について問題となるピークは認められなかった。真度、併行精度および室内精度においても目標値を満たしており、いずれの方法においてもインドキサカルブおよびフィプロニルの基準適合性の判定に使用するうえでの妥当性が示された。

小林らは、1992～2010年の輸入茶中の残留農薬実態を取りまとめ、116検体のうち3検体に基準値超過が認められ、そのうち2検体が一律基準での超過であったと報告している<sup>7)</sup>。

このことから一律基準での適合性を判定できる方法は重要であると考えられる。一律基準あるいはそれ以下の濃度での基準適合性の判定において、茶は他の食品と比較して色素、カフェイン等の多量の莢雑成分を含むことから、試験液の精製工程を慎重に行う必要がある。改良試験法はこれら色素、カフェイン等の妨害成分が除かれており、分析機器への影響が軽微になる利点がある。

これらのことから、改良試験法はインドキサカルブおよびフィプロニル以外の農薬についても、一律基準あるいはそれ以下の濃度での基準適合性の判定に適用可能であると推定される。

## 文献

- 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」[平成17年11月29日食安発第1129002号]
- Kanrar, B., Mandal, S., and Bhattacharyya, A. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 67 pesticides in made tea, tea infusion, and spent leaves using ethyl acetate extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **93**, 411-424 (2010)
- 岩屋あまね, 下堂菌栄子, 福司山郁恵, 榎元清美, 佐久間弘匡: 茶の残留農薬一斉分析における精製法の検討, 鹿児島県環境保健センター所報, **11**, 102-108 (2010)
- 荒川正人, 佐野仁, 馬場吉武, 牛谷公郎, 加藤一郎: 超臨界流体抽出(SFE)およびGC-MSによる茶の残留農薬一斉分析法の検討, 食品衛生学雑誌, **53**, 139-145 (2012)
- 齊藤静夏, 根本了, 松田りえ子: LC-MS/MSによる緑茶中の残留農薬一斉試験法, 日本食品化学学会誌, **19**, 104-110 (2012)
- Pang, G.F., Fan, C.L., Chang, Q.Y., Li, Y., Kang, J., Wang, W.W., Cao, J., Zhao, Y.B., Li, N., Li, Z.Y., et al. High-throughput analytical techniques for multiresidue, multiclass determination of 653 pesticides and chemical pollutants in tea--Part III: Evaluation of the cleanup efficiency of an SPE cartridge newly developed for multiresidues in tea. *J. AOAC Int.* **96**, 887-896 (2013)
- 小林麻紀, 大塚健治, 田村康宏, 富澤早苗, 木下輝昭, 上條恭子, 岩越景子, 佐藤千鶴子, 永山敏廣, 高野伊知郎: 輸入茶中の残留農薬実態(1992年4月～2010年3月), 食品衛生学雑誌, **54**, 224-231 (2013)

# 魚介類中ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の 汚染実態調査について

山口貴弘\* 柿本健作\* 永吉晴奈\* 小西良昌\* 梶村計志\*

魚介類中のベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤についてガスクロマトグラフ/タンデム質量分析計 (GC-MS/MS) を用いて汚染実態調査を行った。その結果、複数の魚介類から UV-P、UV-326、UV-327 および UV-328 が検出された。

キーワード：紫外線吸収剤、ガスクロマトグラフ/タンデム質量分析計、魚介類

Key words : UV stabilizer, GC-MS/MS, seafood

紫外線吸収剤は劣化防止を目的として建材、雑貨や自動車部品等のプラスチック製品に使用されている。中でもベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 (BUVSs) は紫外線吸収能力が優れており、国内外で広く使用される化学物質である<sup>1)</sup>。2007 年に環境中における蓄積性や毒性により 2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール (UV-320) が化学物質の審査および規制に関する法律 (化審法) で第 1 種特定化学物質に指定され、製造および使用が禁止された<sup>2)</sup>。また 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール (UV-327) が監視化学物質に指定された<sup>2)</sup>。

UV-320 や UV-327 以外にも BUVSs には類似物質が多く存在し、現在でも国内外で使用されていることから河川水、海水や食品、特に魚介類の汚染が懸念されている<sup>3)-7)</sup>。

2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチルフェノール (UV-P) や 2-(tert-ブチル)-4-メチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール (UV-326) は酵母レポータージーンアッセイ系でヒトダイオキシン受容体 (AhR) 活性を有することが報告さ

れており<sup>8)</sup>、ダイオキシンや多環芳香族炭化水素類と同様に有害性を持つ可能性が示唆されている。食品中の BUVSs の汚染実態を解明することは、ヒトに対するリスクを評価するための有益な知見となると考えられる。

本研究では、GC-MS/MS を用いて魚介類中の BUVSs 分析し、汚染実態調査を行ったので報告する。

## 実験方法

### 1 試料

汚染実態調査には大阪府内で市販されている魚介類 (筋肉部) を使用した (表 1)。また添加回収試験にはサケ (筋肉部) を使用した

### 2 試薬および器具等

#### 2-1 標準品

UV-P、2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチル-6-(2-プロフェニル)フェノール (UV-9)、UV-326、2-(2-ヒドロキシ-5-tert-オクチルフェニル)ベンゾトリアゾール (UV-329)、2-[2-ヒドロキシ-5-[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]フェニル]-2H-ベンゾトリアゾール (UV-090) は Sigma-Aldrich 社製、UV-327、2-(3,5-ジ-tert-アミル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾール (UV-328) は東京化成工業 (株) 製を用いた (図 1)。内標準物質 (IS) としてクリセン-d12、ペリレン-d12 は和光純薬工業 (株)

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Surveillance of Benzotriazole UV Stabilizers in Seafoods

by Takahiro YAMAGUCHI, Kensaku KAKIMOTO, Haruna NAGAYOSHI, Yoshimasa KONISHI and Keiji KAJIMURA

製、ピレン-d10はCIL社製を用いた。

## 2-2 試薬および器具

ジクロロメタン、n-ヘキサン、シクロヘキサン、アセトン、ジエチルエーテル、無水硫酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製 残留農薬・PCB 試験用

シリカゲル：ワコーゲル C-200 和光純薬工業(株)製

円筒ろ紙：アドバンテック東洋(株)製 円筒ろ紙 (No. 86R、ガラス繊維)

## 3 装置

凍結乾燥機：東京理化工機(株)製 EYELA FDU-2100 を使用した。

GC-MS/MS: GCはAgilent社製7890A、MS/MSはWaters社製Quattro Microを用いた。

## 4 GC-MS/MS 測定条件

カラム: Agilent社製 VF-5ms (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)

注入量: 1 μL (スプリットレス)

キャリアーガス流量: 1 mL/min (ヘリウム)

測定モード: EI-Positive、選択反応モニタリング (SRM)

イオン化電圧: 70 eV

イオン源温度: 250°C

昇温条件: 80°C (1 min)-20°C/min→140°C-

8°C/min→300°C (6 min)

化合物ごとの保持時間およびモニターイオンは表2、各化合物のクロマトグラムは図2に示した。

表 1 試料情報

No.	魚種	採取海域
1	クロマグロ	トルコ
2	メバチマグロ	韓国
3	アトランティックサーモン	オーストラリア
4	タラ	アメリカ (アラスカ)
5	トラウトサーモン	チリ
6	カラスカレイ	デンマーク
7	エビ	ベトナム
8	赤魚 (アラスカメヌケ)	アイスランド
9	ツバス	島根県
10	ビンナガマグロ	和歌山県
11	タイ	愛媛県
12	ブリ	宮崎県
13	アジ	静岡県
14	タラ	北海道
15	サワラ	鳥取県
16	キハダマグロ	インドネシア
17	サワラ	韓国
18	サゴシ	京都府
19	アナゴ	大阪府
20	サバ	青森県

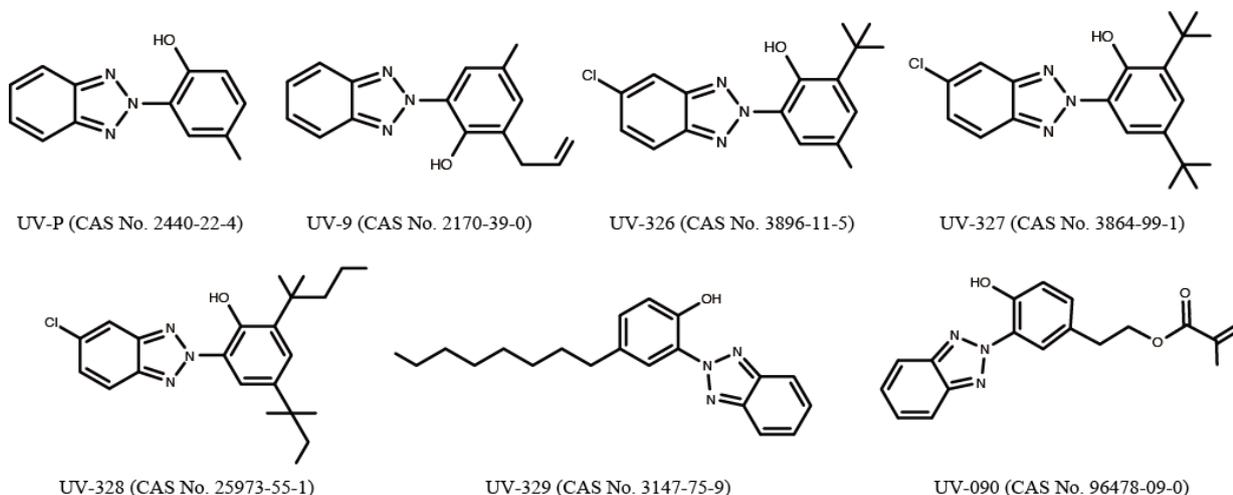


図 1 BUVSs 構造式

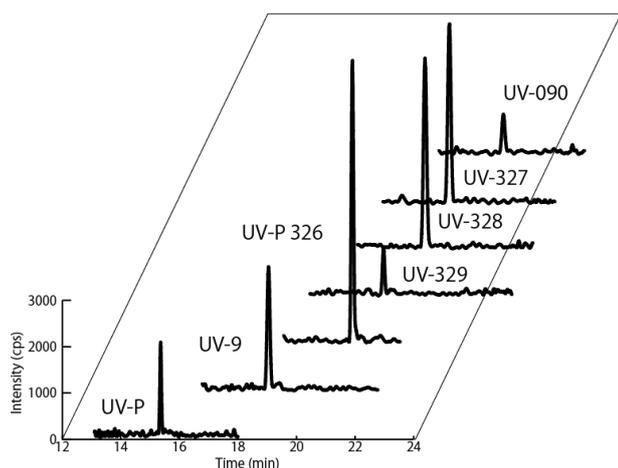


図 2 BUVSs のクロマトグラム (各 50 ng/mL)

## 5 抽出および精製方法

### 5-1 抽出

抽出法については中田らの方法を参考に実施した<sup>2)</sup>。粉碎した試料 10 g を凍結乾燥した。凍結乾燥した試料をガラス繊維製円筒ろ紙に入れ、各 IS を 40 ng 加えた後、ジクロロメタンとヘキサンの混合液 (4 : 1) によりソックスレー抽出を行った (5 時間)。

### 5-2 精製

抽出液を約 40°C で減圧濃縮し、残渣にシクロヘキサンとアセトンの混合液 (7 : 3) を加え 4 mL に定容した。定容した溶液を GPC 装置にかけ精製を行った。GPC カラムには昭和電工 (株) 製 Shodex EV-2000 AC を使用し、移動相はシクロヘキサン : アセトン (7 : 3)、

カラム温度は 40°C、流速は 5 mL/min、インジェクション量は 2 mL とした。フラクションは 12 min から 36 min の 120 mL を採取した。採取溶液は減圧下濃縮し溶媒を留去し、5 mL のヘキサンに溶解した。あらかじめ 5% エーテルヘキサン溶液 50 mL でコンディショニングを行った 5% 含水シリカゲル (5 g) のオープンカラムに負荷し、60 mL の 5% エーテルヘキサン溶液で溶出させ、ナス型フラスコに回収した。溶出液を窒素気流下で 200  $\mu$ L に濃縮し試験液とした。空試験も併せて実施し、空試験から検出される対象化合物については、検出した値から差し引きし濃度を算出した。検出限界 (LOD) および定量下限値 (LOQ) は各対象化合物の S/N が 3 および 10 の値とした (表 3)。

表 3 BUVSs の検出限界および定量下限値

化合物	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
UV-P	0.1	0.6
UV-9	0.2	0.4
UV-326	0.1	0.2
UV-327	0.2	0.4
UV-328	0.1	0.6
UV-329	0.4	1
UV-090	0.2	0.6

表 2 GC-MS/MS 測定条件

化合物	保持時間 (min)	プリカーサー	プロダクト	プロダクト	IS
		イオン (m/z)	イオン (定量) (m/z)	イオン (定性) (m/z)	
UV-P	15.4	225	154	196	ピレン d10
UV-9	18.3	265	250	132	クリセン d12
UV-326	20.4	315	300	272	クリセン d12
UV-327	21.4	357	342	286	クリセン d12
UV-328	21.3	322	252	133	クリセン d12
UV-329	20.7	253	133	225	クリセン d12
UV-090	22.2	237	180	78	ペリレン d12
ピレン d10	16.1	212	210	208	-
クリセン d12	19.7	240	236	212	-
ペリレン d12	23.7	264	236	232	-

## 結果および考察

### 1 空試験からの BUVSs の検出について

空試験において、BUVSs が検出されたため、使用する溶媒、ろ紙およびシリカゲルからの検出の有無について確認を行った。

① ソックスレー抽出溶媒

(ジクロロメタン：ヘキサン 4：1)

② 5%エーテルヘキサン溶液

③ GPC 移動溶媒 (シクロヘキサン：アセトン 7：3)

④ 円筒ろ紙 (セルロース製)

⑤ 5%含水シリカゲル

①～③についてはそれぞれの溶媒 100 mL を減圧濃縮下 1 mL に濃縮、④についてはソックスレー抽出溶媒 100 mL に浸し、20 分間超音波洗浄機にかけた後、減圧濃縮下 1 mL に濃縮、⑤はカラムに充填後、5%エーテルヘキサン溶液を通液したものを回収し、減圧濃縮下 1 mL に濃縮した。それらを GC-MS/MS を用いて測定を行った。

④を除き、BUVSs の検出は見られなかった。④については UV-P、UV-326、UV-328 の検出が見られた。円筒ろ紙をガラス繊維製のものに変更し、空試験を実施したところ UV-P、UV-326 および UV-328 の検出はセルロース製円筒ろ紙を使用した結果と比較して 1/10 程度に低減することができた。しかし、完全に除去することはできなかったため、本研究では空試験での検出値を差し引いて算出することとした。

### 2 添加回収試験

前述の方法で添加回収試験を実施した (試料：サケ、添加濃度 4 ng/g、試行数：3)。空試験および BUVSs を添加しないサケから検出された UV-P および UV-326 については差し引いて値を算出した (表 4)。UV-P および UV-090 を除き平均回収率が 82～98%、RSD は 13% となり良好な結果であった。ただし、UV-090 は 130%、UV-P では 170% を超える回収率となった。特に UV-P はサケから検出される UV-P 濃度 (5.1 ng/g) が添加濃度と近かったため影響が大きく良好な添加回収試験結果を得ることができなかった。

表 4 添加回収試験結果

	回収率(%)	RSD(%)
UV-P	173	93
UV-9	84	5
UV-326	98	13
UV-327	84	11
UV-328	88	3
UV-329	82	2
UV-090	130	7

### 3 検量線

検量線を 0.01、0.05、0.1 および 0.5 mg/L の範囲で、内標準法を用いて作成したところ、決定係数  $r^2=0.99$  以上の直線性が認められた (図 3)。

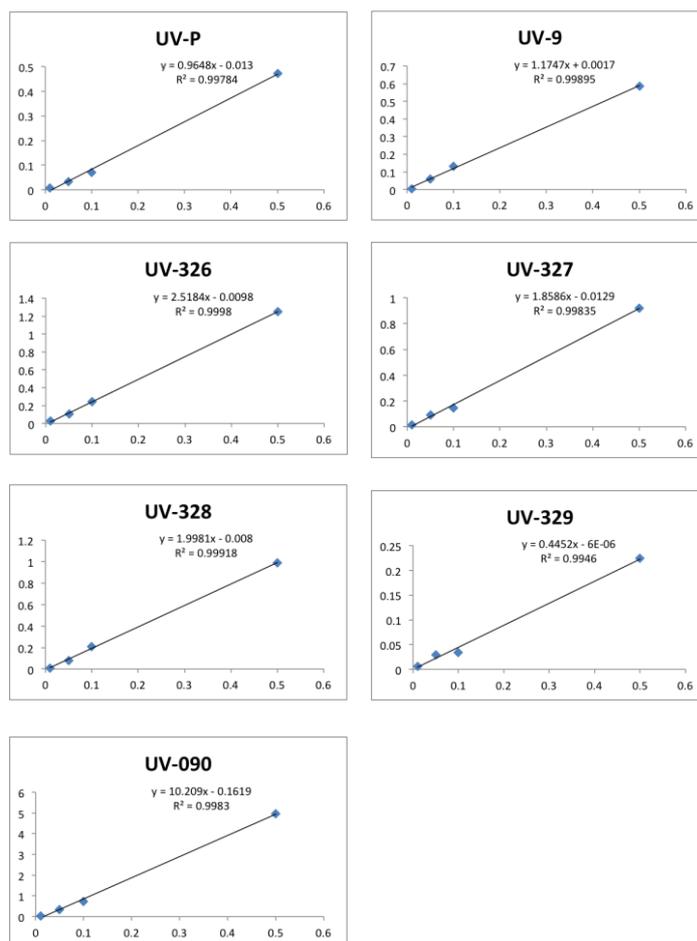


図 3 BUVSs 検量線

(縦軸：内標準物質との強度比，横軸：濃度  $\mu\text{g/mL}$ )

#### 4 魚介類の測定結果

表 1 に示した魚介類について BUVSs の汚染実態調査を行った (表 5)。ただし、測定結果において UV-P については添加回収試験結果が良好ではなかったため、測定値については参考値とした。

UV-9、UV-329 および UV-090 については、すべての試料が検出下限以下であった。UV-P は No. 2、4、7、8、9、10、11 および 13 以外の試料から、UV-326 は No. 2、3 および 16 以外の試料から検出された。UV-327 は No. 1 および 12 から、UV-328 は No. 1、6 および 12 から検出された。No. 1、2、10 および 16 はマグロであるが、No. 1 のみトルコ産の養殖マグロであり、その他は日本周辺や東南アジアで採取されたものであった。

サワラ (No. 15、17) およびサゴシ (No. 18) は同一魚種であり、採取海域が近いことため総検出濃度が類似していると考えられた。

多くの残留性有機汚染物質 (POPs) では魚介類中の脂肪重量に比例する傾向がみられるが、BUVSs 総検出量と脂肪重量との関係についても同様に脂肪重量に比例して増加する傾向が確認できた。これにより BUVSs は脂肪中に蓄積している可能性が示唆された (図 4)。

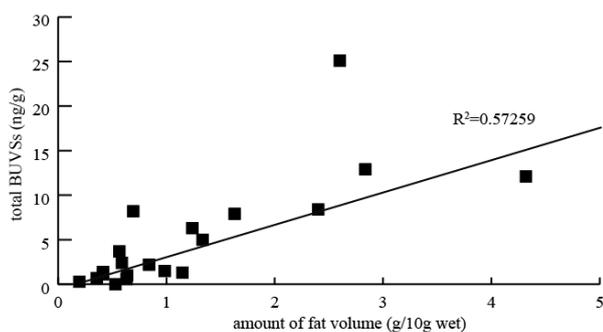


図 4 Total BUVSs と脂肪重量との関係

表 5 魚介類中の BUVSs 濃度 (ng/g)

No.	魚種	UV-P	UV-326	UV-327	UV-328	total BUVSs
1	クロマグロ	3.7	5.5	1.0	1.9	12
2	メバチマグロ	ND	ND	ND	ND	ND
3	アトランティックサーモン	6.3	ND	ND	ND	6.3
4	タラ	ND	0.3	ND	ND	0.3
5	トラウトサーモン	0.7	0.6	ND	ND	1.3
6	カラスカレイ	ND	2.1	ND	0.8	5.0
7	エビ	2.1	1.1	ND	ND	1.1
8	赤魚 (アラスカメヌケ)	ND	1.0	ND	ND	1.0
9	ツバス	ND	2.4	ND	ND	2.4
10	ビンナガマグロ	ND	1.9	ND	ND	2.2
11	タイ	ND	1.4	ND	ND	1.5
12	ブリ	6.2	5.1	0.8	0.7	13
13	アジ	ND	0.6	ND	ND	0.6
14	タラ	1.0	0.4	ND	ND	1.4
15	サワラ	7.1	0.8	ND	ND	7.9
16	キハダマグロ	0.7	ND	ND	ND	0.7
17	サワラ	6.9	1.5	ND	ND	8.4
18	サゴシ	7.9	0.3	ND	ND	8.2
19	アナゴ	3.1	0.6	ND	ND	3.7
20	サバ	20.4	4.7	ND	ND	25

ND: Not detected

#### 5 まとめ

魚介類中のベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の汚染実態調査を行った。UV-P、UV-326 については、空試験で除去が不十分であることが確認できた。今後、抽出・精製法を検討する。

魚介類中からは UV-P、UV-326、UV-327 および UV-328 が検出された。今後は食品からの BUVSs 曝露量を評価するため、魚介類を含め他の食品についても調査を実施したい。

## 参考文献

- 1) 経済産業省 HP  
([http://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/kaasinhou/1stkind.html](http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kaasinhou/1stkind.html))
- 2) 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (昭和 49 年 6 月 7 日政令第 202 号)
- 3) M. E. Balmer, H.-R. Buser, M. D. Müller, and T. Poiger. : Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish From Swiss Lakes. *Environmental Science & Technology*, 39 (4), 953–62 (2005)
- 4) H. Nakata, S. Murata, and J. Filatreau. : Occurrence and Concentrations of Benzotriazole UV Stabilizers in Marine Organisms and Sediments From the Ariake Sea, Japan. *Environmental Science & Technology*, 43 (18), 6920–26 (2009)
- 5) H. Nakata, R.-I. Shinohara, S. Murata, and M. Watanabe. : Detection of Benzotriazole UV Stabilizers in the Blubber of Marine Mammals by Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (GC-HRMS). *Journal of environmental monitoring*, 12 (11), 2088–92 (2010)
- 6) Zhang, Z. et al. : Determination of Benzotriazole and Benzophenone UV Filters in Sediment and Sewage Sludge. *Environmental Science & Technology*, 45 (9), 3909–16 (2011)
- 7) Y. Kameda, K. Kimura, and M. Miyazaki. : Occurrence and Profiles of Organic Sun-Blocking Agents in Surface Waters and Sediments in Japanese Rivers and Lakes. *Environmental pollution*, 159 (6), 1570–76 (2011)
- 8) 永吉晴奈, 吉田仁, 川西優喜, 原島小夜子, 椎崎一宏, 八木孝司, 松田知成, 高木総吉, 安達史恵, 柿本健作, 山口貴弘, 小西良昌, 酵母レポーター遺伝子アッセイを用いた紫外線吸収剤の核内受容体リガンド活性の評価, 第 21 回環境化学討論会講演要旨集, 957- 958 (2012)

## ヒョウタンによる食中毒事例について

山口瑞香\* 野村千枝\* 清田恭平\* 梶村計志\*

平成 25 年 7 月 2 日に大阪府内の小学校で、授業にて栽培したヒョウタンを喫食した児童 16 名が腹痛、吐気、嘔吐等の食中毒症状を呈した。この食中毒の原因は、ヒョウタンに含まれる植物性自然毒の一種で苦み成分であるククルビタシン類であると考えられた。そこで、試料をアセトンで抽出し、液液分配で精製を行った後、ククルビタシン類の一種であるククルビタシン B を高速液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC-MS)等を用いて分析した。その結果、検体のヒョウタンからククルビタシン B が検出され、食中毒の原因物質であると推定された。

キーワード：ヒョウタン、ククルビタシン、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計

Key words: gourd, cucurbitacin, LC-MS

ヒョウタンなどのウリ科植物には、植物性自然毒の一種で苦み成分であるククルビタシン類が含まれている。ククルビタシン類には多くの種類が存在し、過去の食中毒事例ではククルビタシン B または D が検出されている<sup>1)~3)</sup>。

平成 25 年 7 月 2 日に大阪府内の小学校で、授業にて栽培した非食用のヒョウタンを生のまま小さくスライスし、教員 1 名と児童 28 名が喫食した。その後、児童 16 名が腹痛、吐気、嘔吐等の食中毒症状を呈した。後の調査で、児童らは喫食時に強い苦味・辛味を感じたが飲み込んだと証言した。この食中毒の原因物質がククルビタシン類であると考え、過去の食中毒で検出事例のあるククルビタシン B の分析を実施した。

### 実験方法

#### 1 試料

喫食残品および同一圃場から採取した千成ヒョウタン、対照品としてキュウリおよびゴーヤーを使用した。

#### 2 試薬等

##### 2-1 標準品

ククルビタシン B：和光純薬工業(株)製を用いた。

##### 2-2 標準溶液等

標準品 5 mg をメタノールで溶解して全量を 10 mL とし標準原液とした(500 µg/mL)。LC-MS 測定では標準原液をメタノールで希釈し、0.1~2 µg/mL の標準溶液を作成した。TLC 測定では 1 スポットあたり 1、2.5、5 µg となるよう標準原液を希釈した。

##### 2-3 試薬等

酢酸エチル、ヘキサン、アセトン：和光純薬工業(株)製 残留農薬分析用、メタノール：和光純薬工業(株)製 HPLC 用、アセトニトリル：和光純薬工業(株)製 LC/MS 用、ギ酸アンモニウム：和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

#### 3 装置

(株)島津製作所製 Prominence UFLC および LCMS-2020 を使用した。

#### 4 測定条件

##### 4-1 LC-PDA/MS 条件

分析カラム：CERI L-Column ODS (2.1x150 mm、5 µm)、カラム温度：40°C、流速：0.2 mL/min、注入量：5 µL、移動相：A 液；10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B 液；ア

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Food-poisoning Outbreak Caused by Gourd

by Mizuka YAMAGUCHI, Chie NOMURA, Kyohei

KIYOTA and Keiji KAJIMURA

セトニトリル、グラジエント条件：B 液 50-50%(5 min), 50-90%(5 min)。

イオン化モード：ESI(+)、測定モード：SIM、m/z：576(定量イオン), 581(確認イオン)、PDA 測定波長：230 nm。

#### 4-2 TLC 条件

プレート：Merck Millipore製シリカゲル60F254、展開溶媒：クロロホルム/酢酸エチル(1:1)またはクロロホルム/メタノール(10:1)。

### 5 試験溶液の調製

大城らの報告<sup>1)</sup>を参考に試験溶液の調製を行った。細切した試料 5 g を量りとり、アセトン 10 mL を加えてホモジナイズ後、毎分 5,000 回転で 5 分間遠心分離を行い、上清をろ過してナスフラスコに採取した。残留物にアセトン 10 mL を加えて振とう後、同様に遠心分離して先の上清と合わせた。40°C以下で減圧濃縮し、酢酸エチル 5 mL を加えた。この液を 50 mL 遠心チューブに移して振とう後、5,000 回転で 5 分間遠心分離した。酢酸エチル層を採取し、下層に酢酸エチル 5 mL を加えて同様の操作を行い、先の酢酸エチル層と合わせた。酢酸エチル層を 40°C以下で減圧乾固し、残留物を 90%メタノール 5 mL で溶解した。この液を 50 mL 遠心チューブに移し、ヘキサン 5 mL を加えて

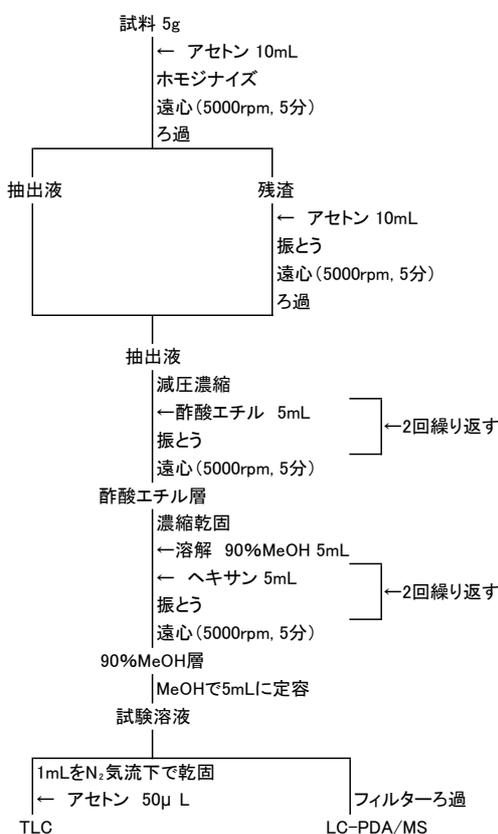


図1. 試験溶液の調製方法

振とう後、5,000 回転で 5 分間遠心分離した。90%メタノール層を採取し、さらにヘキサン 5 mL を加えて同様の操作を行った。90%メタノール層をメタノールにて 5 mL に定容し、試験溶液とした。この試験溶液をメンブランフィルターでろ過後、適宜希釈して LC-PDA/MS で測定した。

また、試験溶液 1 mL を N<sub>2</sub> 気流下で乾固し、アセトン 50 μL に溶解して 2 μL を TLC にスポットした(図 1)。

## 結果および考察

### 1 ヒョウタンの分析結果

LC-MS および LC-PDA 分析の結果、喫食残品および同一圃場から採取した千成ヒョウタンからククルビタシン B が検出された(表 1)。対照品のキュウリおよびゴーヤーからは検出されなかった。TLC においても、ヒョウタンからはククルビタシン B と一致する Rf 値のスポットが得られた。

表1. ククルビタシンB分析結果

	LC-MS結果 (μg/g)	LC-PDA結果 (μg/g)
喫食残品のヒョウタン	225	201
同一圃場のヒョウタン	235	229
対照品(ゴーヤー)	ND	ND
対照品(キュウリ)	ND	ND

ND:定量下限未満

### 2 LC-MS 条件の検討

大城ら<sup>1)</sup>は LC の移動相に 50%アセトニトリルを使用し、Na 付加体を測定イオンとして測定を行っていた。同様の移動相で測定を実施したが、十分な感度が得られなかった。Na 付加体の他にアンモニウム付加体が測定されたので、移動相にアンモニウム塩を加え、アンモニウム付加体を測定イオンとすることとした。これにより感度が向上し、安定してククルビタシン B の測定を行うことができた。

0.1~2 μg/mL の標準溶液を調製し、絶対検量線を作成した。決定係数( $r^2$ )=0.99 以上の良好な直線性が得られた。

定量下限は 0.1 μg/g とした。

### 3 添加回収試験

あらかじめククルビタシン B を含有しないことを確認したゴーヤーおよびキュウリ(各 n=3)に 1 μg/g の濃度となる

ようクルビタシン B を添加して分析を行った(表 2)。ゴーヤーでは良好な結果が得られたが、キュウリの回収率は 50%程度であった。同時測定した PDA の結果も同様であったため、キュウリでの抽出率が不良であったと考えられた。

表2. 添加回収試験結果

	測定機器	平均回収率(%)	RSD(%)
ゴーヤー	LC-MS	91	3
	LC-PDA	89	1
キュウリ	LC-MS	52	4
	LC-PDA	57	2

RSD: 相対標準偏差

#### 4 まとめ

食中毒の原因のヒョウタンからクルビタシン B を検出した。強い苦味・辛味および食中毒症状の原因はクルビタシンであることが推定された。

#### 謝辞

本分析にあたり、適切な助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所大城様、標準品を提供いただいた和歌山県環境衛生研究センター久野様に感謝の意を表します。

#### 参考文献

- 1) 大城直雅, 佐久川さつき, 沖縄県における化学物質と自然毒による食中毒および苦情事例—平成20 年度—. 沖縄県衛生環境研究所報, 43, p181-184 (2009)
- 2) 田村行弘, 真木俊夫他, 化学物質及び自然毒による食中毒事件例 (第1報) —昭和55年～昭和57年—. 東京衛研年報, 34, p171-177(1983)
- 3) 牛山博文, 観公子他, 化学物質及び自然毒による食中毒事件例 (第 17 報) —平成 11 年—. 東京衛研年報, 51, p166-169 (2000)

## 遺伝子組換え大豆の検査結果

- 平成13年～平成25年 -

吉光真人\*<sup>1</sup> 清田恭平\*<sup>1</sup> 野村千枝\*<sup>1</sup> 栗津薫\*<sup>1</sup> 山口瑞香\*<sup>1</sup> 柿本幸子\*<sup>1</sup>  
阿久津和彦\*<sup>1</sup> 高取聡\*<sup>1</sup> 梶村計志\*<sup>1</sup> 尾花裕孝\*<sup>2</sup>

平成13年度から平成25年度までの13年間の遺伝子組換え大豆 RoundupReady Soybean(RRS)の検査結果をまとめた。遺伝子組換えに関する表示義務のない、もしくは「遺伝子組換えでない」等の任意表示のある大豆および大豆加工食品を検査対象とした。総検体数294のうち、RRSが検出された検体数は42、検査不能とした2検体を減じた総検体数に対するRRSが検出された検体の割合は14.4%であった。非遺伝子組換え大豆の分別生産流通管理の適切さの基準となる、5%を超えるRRSが混入した検体はなかった。

キーワード：遺伝子組換え大豆、表示義務、定量ポリメラーゼ連鎖反応、DNA抽出

Keywords: genetically modified soybean, mandatory labeling, quantitative polymerase chain reaction, DNA extraction

平成13年4月から、遺伝子組換え食品に関する新たな表示制度<sup>1), 2)</sup>が導入された(表1)。この制度では、分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え農産物およびこれを原材料とする加工食品については、従来の食品と同等であることから、遺伝子組換えに関する表示の義務はない。さらに、大豆およびとうもろこしでは非意図的な場合に限り、分別生産流通管理された非遺伝子組換え農産物への遺伝子組換え農産物の5%以下の混入は許容される。一方、5%を超える混入が確認された場合には、非遺伝子組換え農産物の分別生産流通管理が適切に行われていない疑いが生じ、その検証が必要となる。

遺伝子組換えに関する表示のない、もしくは「遺伝子組換えでない」等の任意表示のある食品は、前述の表示義務のない食品に該当する(表1)。そのような食品の表示の正しさを検証するための手段の一つとして、通知<sup>3)</sup>記載の「安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査法」が挙げられる。当該検査法を用いれば、食品の原材料に含まれる検査対象の農産物中の遺伝子組換え農産物の混入率を算出できる。すなわち、遺伝子組換えに関する表示のない、大豆あるいはとうもろこしを原材料とする食品を検査し、原材料の遺伝子組換え農産物の混入が5%を超えるかどうかを確認することで、分別生産流通管理体制の適切さを検証することができる。

平成13年度より、当所では通知<sup>3), 4)</sup>に従い、遺伝子組換えに関する表示のない、もしくは「遺伝子組換えでない」等の任意表示のある大豆および大豆加工食品を対象に検査を行ってきた。検査の内容は、原材料の大豆に含まれる遺伝子組換え大豆 RoundupReady Soybean(以下 RRS)混入率が5%を超えるかどうかを確認するものである。今回、平成13年度から平成25年度までのRRSの検査結果をまとめたので報告する。

\*<sup>1</sup>大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課\*<sup>2</sup>大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Detection of Approved Genetically Modified Soybean in Foods (2001-2013)

by Masato YOSHIMITSU, Kyohei KIYOTA, Chie NOMURA, Kaoru AWAZU, Mizuka YAMAGUCHI, Sachiko KAKIMOTO, Kazuhiko AKUTSU, Satoshi TAKATORI, Keiji KAJIMURA and Hirota OBANA

表1. 遺伝子組換え食品に関する表示制度

表示の対象となる食品	表示の必要性	表示例
分別生産流通管理された非遺伝子組換え農産物およびそれらを原材料に使用した加工食品	表示義務なし (表示してもよい)	遺伝子組換えでない
分別生産流通管理された遺伝子組換え農産物およびそれらを原材料に使用した加工食品	義務表示	遺伝子組換え
分別生産流通管理されていない農産物およびそれらを原材料に使用した加工食品	義務表示	遺伝子組換え不分別

## 方法

### 1. 試料

平成 13 年から平成 25 年にかけて大阪府内の製造所および小売店で収去された 294 検体について検査を行った。

### 2. 試料の調製

固形試料はミルサーIFM-700G(イワタニ製)、もしくはファイバーミキサーMX-X103-D(Panasonic 製)を用いて粉碎した。粉末状、もしくは液体状試料はそのまま DNA 抽出に供した。

### 3. DNA 抽出法

A) CTAB-JAS : JAS 分析試験ハンドブック<sup>5)</sup>、3.3 CTAB を用いた DNA の抽出、の乳鉢での磨砕処理を省略した手順に従った。

B) CTAB-JAS 短縮 : CTAB-JAS の RNase A 処理以降の手順を省略し、RNase A 処理の代わりに 100 μL Tris-EDTA (TE) 緩衝液 [10 mmol/L 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris)-HCl (和光純薬工業 製), 1 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate (同仁化学研究所製), pH 8.0] を添加し、65°C、10 分間インキュベートした。

C)-a Genomic-tip : JAS 分析試験ハンドブック<sup>5)</sup>、3.2 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出、に従った。

C)-b Genomic-tip : 抽出操作前に、粉碎試料 2 g を 50 mL PP 遠沈管にとり、滅菌水 20 mL で振とう洗浄後、5,000rpm、10 分間遠心し、上清を除く操作を 3 回繰り返した。得られた沈澱を抽出に用いた。以降の操作は C)-a に従った。

C)-c Genomic-tip : カラム洗浄用の QC 緩衝液の通液量を通常の 3 倍量の 18 mL とした以外、C)-a に従った。

D) DNeasy Plant Mini Kit : 消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.1.2. シリカゲル膜タイプキット法」に従った。

E) Wizard DNA Clean-up System : 消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.1.6. シリカベースレジジンタイプキット法」に従った。

F) QIAamp® DNA Stool Mini Kit(キアゲン製) : キットのプロトコールに従った。

G) Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food(プロメガ製) : キットのプロトコールに従った。

H) CTAB : 消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.1.1. CTAB 法」に従った。

I) GM quicker : 消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.1.5. シリカゲル膜タイプキット法」に従った。

A)、B)、C)-a~c、D)~G)は大豆穀粒以外の試料、H)、I)は大豆穀粒に用いた。通常の検査では、A)、C)-a、H)、I)を用いた。

### 4. DNA 抽出液の評価

消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存」に従った。

### 5. 定量 PCR 法

消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.1.2. 定量 PCR 法」に従った。測定対象は RRS とした。リアルタイム PCR 装置は ABI PRISM™ 7900HT 384well(Life Technologies 社製)を用いた。黒豆茶からの DNA 抽出液については、DNA 抽出原液、および TE 緩衝液を用いて DNA 抽出原液を 10、100 倍希釈したものを測定した。味付け油揚げからの DNA 抽出液については、DNA 抽出法の C)-a 以外では、DNA 抽出原液、および DNA 抽出原液を TE 緩衝液で 2、10 倍希釈したものを測定した。

DNA抽出法のC)-aでは、DNA抽出原液をTE緩衝液で2、10倍希釈したものを測定した。

## 6. RRS混入率の算出

以下の式に従い、算出した。

$$\text{RRS混入率(\%)} = (\text{RRS遺伝子コピー数} / \text{レクチン遺伝子コピー数} \times \text{内標比} 1.00) \times 100$$

## 結果および考察

### 1. RRS検出率、混入率の傾向

表2.に年度別検体数とRRS検出検体数/検体数×100(RRS検出率)を示した。平成13年度を除き、検体数は21～27であった。RRS検出率は経年的な減少傾向を示した。平成23年度から25年度の検査ではRRSが検出されなかった。

表3.に検体の種類別RRS検出率を示した。検体数は豆腐、大豆穀粒、厚揚げ、豆乳、油揚げ、きな粉が10検体以上であった。大豆加工食品の中では豆腐および豆腐関連製品の検体数が多かった。検体数10以上の検体の中で、RRS検出率は豆腐、厚揚げ、油揚げ、きな粉が高く、大豆穀粒、豆乳が低かった。大豆穀粒や豆乳と比較し、豆腐、厚揚げ、油揚げ、きな粉にはRRSが含まれる確率が高いと考えられた。

RRSが検出された検体のRRS混入率の分布を調べた(図1.)。全体の90%が混入率0.5%未満であった。最も高い混入率を示した検体は豆腐の1.8%であった。当所で検査したすべての検体について、RRSは混入

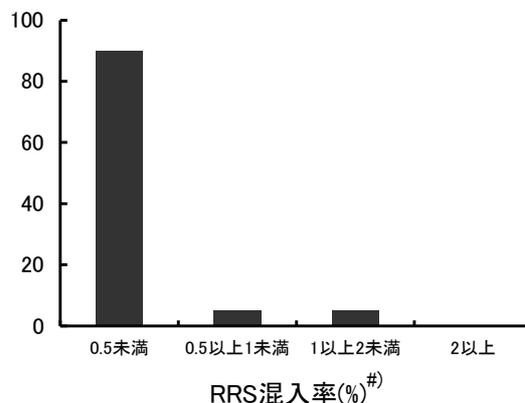


図1. RRS混入率の分布

<sup>#)</sup>: (RRS遺伝子コピー数/レクチン遺伝子コピー数 × 内標比1.00) × 100

していなかったか、あるいは混入していても基準となる5%よりも十分に低かった。

平成23年度から25年度の検査ではRRSは検出されなかった。また、現在までに当所や他の自治体の検査機関の検査において、遺伝子組換え食品に関する義務表示がない原材料を使用した食品でRRS混入率が5%を超えた事例はない。今後も同様の傾向が続くのであれば、遺伝子組換え食品に関する義務表示がない原材料を使用した食品で、表示義務違反が疑われる事例の発生の可能性は低いと考えられる。

### 2. 検査不能検体について

A) 黒豆茶：本検体は黒豆を煎り、粗挽きしたものをティーバッグに詰めたものであった。本検体の黒

表3. 検体の種類別RRS検出率

製品の種類	検体数	RRS検出検体数	RRS検出率 <sup>1)</sup> (%)
豆腐	115	18	15.7
大豆穀粒	49	2	4.1
厚揚げ	35	9	25.7
豆乳	24	1	4.2
油揚げ	22	8	36.4
きな粉	19	3	15.8
おから	7	1	14.3
凍豆腐	7	0	0
ゆば	7	0	0
大豆タン白	2	0	0
脱脂大豆	2	0	0
大豆水煮	1	0	0
大豆煮豆	1	0	0
納豆	1	0	0
黒豆茶	1	- <sup>2)</sup>	-
味付け油揚げ	1	-	-
計	294	42	14.4 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>: RRS検出検体数/検体数×100

<sup>2)</sup>: 検査不能

<sup>3)</sup>: 検体数合計から検査不能2検体を減じた検体数での検出率

表2. 年度別検体数とRRS検出率

年度	検体数	RRS検出検体数	RRS検出率 <sup>1)</sup> (%)
13	15	5	33.3
14	23	7	30.4
15	22	5	22.7
16	27	9	33.3
17	27	4	14.8
18	27	1	3.8 <sup>2)</sup>
19	22	2	9.1
20	22	2	9.1
21	22	4	18.2
22	22	3	13.6
23	22	0	0
24	21	0	0
25	22	0	0 <sup>2)</sup>
計	294	42	14.4

<sup>1)</sup>: RRS検出検体数/検体数×100

<sup>2)</sup>: 検査不能1検体を減じた検体数での検出率

豆は焦げた状態で、強く加熱された可能性が考えられた。DNA抽出法のA)、B)、C)-a、D)~G)を用いてDNA抽出を行ったが、得られたすべてのDNA抽出液で、DNA由来の260 nmをピークとする吸光度スペクトルは得られなかった。定量PCRで測定したところ、大豆の内在性遺伝子であるレクチン遺伝子は検出されなかった。本検体に含まれるDNAは加工時の加熱により、分解、断片化し<sup>6)、7)</sup>、鋳型DNAとしてPCRに必要なDNA鎖長を満たさなかったと考えられた。

B) 味付け油揚げ：本検体は油揚げを調味液中で加熱調理し、包装、加熱殺菌したものであった。DNA抽出法のA)、C)-a~cを用いて検査を行った。調味液中の糖類等のPCR阻害物質を除去する目的でC)-bを、PCR阻害物質等の除去効果を高める目的でC)-cを用いた。抽出はすべて3併行で行った。定量PCRでレクチン遺伝子を測定した。結果はすべて、3併行のデータを平均した値で示した(表4)。

DNA由来の260 nmをピークとする吸光度スペクトルはすべてのDNA抽出原液で確認された。DNAの精製度は260/280 nm吸光度比で判断され、1.7~2.0程度が望ましいとされている<sup>4)</sup>。抽出法C)-aで吸光度比が1.38であった以外は良好な結果であった。抽出法C)-b、C)-cで抽出法C)-aに追加した操作手順は吸光度比の改善に効果があったと考えられた。

抽出法C)-aは抽出原液を希釈することでレクチン遺伝子コピー数が増加し、他の抽出法では減少した。抽出法C)-aの抽出原液中にはPCR阻害物質が含まれていたことが推測された。また、抽出法C)-b、C)-cにおいて抽出法C)-aに追加した操作手順は、抽出原

液中に含まれるPCR阻害物質を減少させる効果があったと考えられた。

吸光度スペクトルおよび260 nmの吸光度値よりDNAが抽出されていることが示された。定量PCR溶液に添加したDNA量は規定量程度であった。しかし、レクチン遺伝子コピー数は他の大豆製品<sup>8)</sup>と比較して極めて低い値であった。大豆に含まれるDNAは加熱により分解、断片化する<sup>6)、7)</sup>。本検体の抽出原液に含まれるDNAは、検体由来のPCR阻害物質の影響に加え、前述の黒豆茶と同様に、加工工程により、定量PCRで検出困難な状態に分解、断片化していたと考えられた。

5%のRRS混入率を判定するために必要なレクチン遺伝子コピー数は、RRS遺伝子コピー数を定量下限値の16コピーとした場合に以下の式から算出される。 $5(\%) = (16 \text{ コピー} / \text{レクチン遺伝子コピー数} \times \text{内標比} 1.00) \times 100$

以上より、レクチン遺伝子のコピー数は320となる。本検体のレクチン遺伝子コピー数はすべての検討結果で320を下回った。5%のRRS混入率を判定不可能なため、検査不能とした。

遺伝子組換え大豆検査でのRRS検出率は低下傾向である。また、RRSが検出された検体のRRS混入率は、表示の基準となる5%よりも十分に低い検体がほとんどであった。今後、遺伝子組換え食品に関する義務表示がない原材料を使用した食品で、表示義務違反が疑われる事例の発生の可能性は低いと考えられる。一方、今回報告したような遺伝子組換え大豆検査が困難な食品は多種、存在する。これらの食品

表4. 味付け油揚げのDNA抽出法および大豆由来レクチン遺伝子定量結果

DNA抽出法	抽出原液中のDN濃度 (ng/μL)	260/280 nm 吸光度比	希釈率	レクチン遺伝子コピー数
CTAB-JAS : 抽出法A)	70	1.85	1	131
			2	82
			10	— <sup>#)</sup>
Genomic-tip : 抽出法C)-a	176	1.38	2	—
			10	179
			1	290
Genomic-tip : 抽出法C)-b	28	1.73	2	105
			10	—
			1	102
Genomic-tip : 抽出法C)-c	32	1.68	2	96
			10	—

#) : 16コピー未満

に対し、食品の安全性を担保し、あるいは表示の検証を行うため、継続的に検査法の検討、改良を行っていくことが重要である。

検査を立ち上げるにあたり、貴重なご助言、ご指導をいただいた、大阪市立環境科学研究所の中間昭彦研究主幹、紀雅美研究員に深謝致します。また、検体の搬入に御尽力いただいた、大阪府健康医療部食の安全推進課ならびに各保健所の食品衛生監視員の皆様に深謝致します。検査にご協力いただいた元食品化学課員の皆様に深謝致します。

## 文献

- 1) 食品衛生法第十九条第一項の規定に基づく表示の基準に関する内閣府令
- 2) 遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第七条第一項及び生鮮食品品質表示基準第七条第一項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準
- 3) 平成 13 年 3 月 27 日、厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第 110 号：組換え DNA 技術応用食品の検査方法について
- 4) 平成 24 年 11 月 16 日、消費者庁次長通知消食表第 201 号：安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法について
- 5) JAS 分析試験ハンドブック、遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 第 3 版、独立行政法人 農林水産消費安全技術センター、  
[http://www.famic.go.jp/technical\\_information/jashandbook/index.html](http://www.famic.go.jp/technical_information/jashandbook/index.html)
- 6) Ogasawara, T., Arakawa, F., Akiyama, H., Goda, Y. and Ozeki, Y. : Fragmentation of DNAs of processed foods made from genetically modified soybeans, *Jpn. J. Food Chem.*, **10**, 155-160 (2003)
- 7) Yoshimura, T., Kuribara, H., Matsuoka, T., Kodama, T., Iida, M., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Furui, S. and Hino, A. : Applicability of the quantification of genetically modified organisms to foods processed from maize and soy, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2052-2059 (2005)
- 8) 佐藤徳子, 杉浦義紹, 田中敏嗣 : GM サイズ検査における GM quicker の有用性について, *食品衛生学雑誌*, **53**, 39-44 (2012)

## 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点

## - 1,4-ジオキサン (平成 23 年度) -

小泉義彦\* 足立伸一\*

大阪府水道水質検査外部精度管理は、本府環境衛生課が公衆衛生研究所の協力を得て、府内の試験研究機関及び水道事業者を対象に実施している。平成 23 年度は有機物質項目として 1,4-ジオキサンを対象項目とし、28 機関から回答のあった 32 検査値を解析した。外れ値になった機関は 1 機関 (全体の 3.2%) であり、概ね良好な結果が得られた。外れ値になった機関に対してフォローアップを行ったところ、内部標準物質の自動添加装置に不良があり、サロゲートを使わずに定量していたことがわかった。また、検量線は 1 次回帰であったが、重み付け法で作成され、高濃度側において真の検量点との乖離を認めた。そこで重み付けを外し再計算すると、許容範囲に収まることがわかった。これらのことから、外れ値の原因はサロゲートの不使用及び検量線の作成ミスであることが判明した。

キーワード：水道水、外部精度管理、1,4-ジオキサン

Key words : drinking water, external quality control, 1,4-dioxane

大阪府水道水質検査外部精度管理は、水道水質検査精度の向上を図ることを目的として、平成 5 年度より大阪府健康医療部環境衛生課と共同で、府内水道事業者等の協力を得て実施してきた<sup>1-6)</sup>。平成 23 年度は 1,4-ジオキサンを有機物質の対象項目として実施した。

1,4-ジオキサンは、洗剤、合成皮革用、反応用の溶剤、塩素系溶剤用、医薬品用、農薬用等として広く用いられる化学物質であり、平成 22 年の生産量は約 4500 トン<sup>7)</sup>、平成 21 年の排出・移動量は約 1522 トンに上る<sup>7)</sup>。1,4-ジオキサンの毒性は、IARC (国際がん研究機関) により Group 2B (ヒトに対して発がん性がある可能性がある) に分類され<sup>8)</sup>、WHO では飲料水質ガイドライン値として 0.05 mg/L が設定されている<sup>8)</sup>。わが国では、平成 16 年 4 月より水道水質基準項目に追加され 0.05 mg/L の基準値が設定されている<sup>9)</sup>。

## 調査方法

1. 参加機関 表 1 に示す 28 機関であった。

表 1 外部精度管理参加機関

大阪市水道局	和泉市上下水道部
箕面市上下水道局	岸和田市上下水道局
豊中市上下水道局	貝塚市上下水道部
吹田市水道部	大阪広域水道企業団(水質管理センター)
茨木市水道部	大阪広域水道企業団(村野浄水場)
高槻市水道部	大阪広域水道企業団(庭窪浄水場)
島本町上下水道部	堺市衛生研究所
枚方市上下水道局	高槻市保健所
寝屋川市水道局	大阪市立環境科学研究所
守口市水道局	東大阪市環境衛生検査センター
八尾市水道局	大阪府茨木保健所
柏原市藤井寺市水質共同検査室	大阪府藤井寺保健所
河内長野市上下水道部	社団法人 大阪府薬剤師会
堺市上下水道局	大阪府立公衆衛生研究所

## 2. 実施方法

## 2-1. 精度管理試料の調製方法

平成 23 年 9 月 26 日 (月) に大阪府立公衆衛生研究所 (大阪市東成区中道 1 丁目 3 番 69 号) に給水されている水道水 110L をステンレス製タンクに採水した (水道水中の 1,4-ジオキサン濃度は 0.1 μg/L 未満)。ここに 1,4-ジオキサン標準液 (和光純薬: 水質試験用 1 mg/mL メタノール溶液) を設定濃度が 15.5 μg/L となるように、1.7 mL 添加した。その後、マグネチックスターラーで 30 分間攪拌し、褐色ガラス瓶 (1L) に分

\* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

Results of External Quality Control on the Analytical Measures for Tap

Water in Osaka Prefecture—1,4Dioxane (2011)—

by Yoshihiko KOIZUMI and Shinichi ADACHI

注したものを試料として、平成23年9月28日（水）に検査実施機関に配布した。

## 2-2. 試料の均一性及び安定性

試料の均一性を調べるために、分注した約100本の試料から、調製した順に5～10本間隔で10本の試料を抜き取り、固相抽出-ガスクロマトグラフ質量分析法（以下、SPE）を用いて2回ずつ測定した。一元配置分散分析の結果、各試料間に有意水準5%で差は認められなかった。安定性については4℃の冷蔵庫内で保管した試料を、配布から2週間後まで測定し、その濃度推移を図1に示した。その結果、全ての測定値の変動係数は2.9%であり、濃度変化は認められなかった。以上により、配布試料の均一性及び冷蔵庫にて保管した場合、2週間後まで安定であることを確認した。

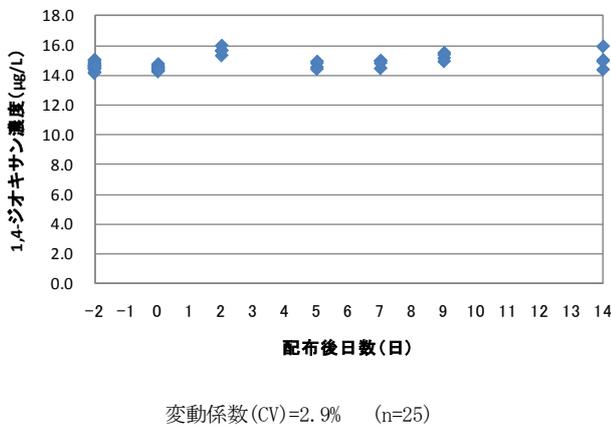


図1 精度管理試料の安定性の確認

## 2-3. 結果の検証方法

既報<sup>2)</sup>に従い、Zスコア及び誤差率の両方が許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価した。Zスコアによる許容範囲は、その絶対値が3未満であることとし、誤差率の許容範囲は、±20%以内であることとした。

## 結果及び考察

### 1. 分析方法

参加機関の分析法は、ページ・トラップ-ガスクロマトグラフ質量分析法（以下、PT）が12機関、ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析法（以下、HS）が11機関、固相抽出-ガスクロマトグラフ質量分析法（SPE）が9機関であった。4機関は2法を実施したため、検査結果は32となった。

### 2. 検査結果の検証

#### 2-1. 誤差率、Zスコア及び外れ値

28機関から報告された5回の検査値の平均値、変動

係数、真値に対する誤差率およびZスコアを表2に、度数分布を図2に示した。なお、表2の機関番号は表1と対応していない。また、同一機関で複数の測定方法により得られた結果には、検査値毎に機関番号を付与している。

検査値の最小値は14.2 µg/L、最大値は18.4 µg/L、平均値は15.4 µg/Lで、その標準偏差は0.908 µg/L、変動係数は5.9%であった。

誤差率及びZスコアの両方の許容範囲を超え、外れ値に該当する機関は1機関（No. 32）であった。その割合は、全体の3.1%（32機関中1機関）となり、結果は概ね良好であると考えられた。

表2 検査値と評価値

機関番号	検査値 (平均値) (µg/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率(%)	Zスコア
No. 1	14.2	1.9	-7.0	-1.62
No. 2	14.4	1.4	-6.0	-1.38
No. 3	14.4	0.3	-5.8	-1.32
No. 4	14.5	1.5	-5.1	-1.15
No. 5	14.7	1.4	-3.9	-0.84
No. 6	14.7	0.5	-3.9	-0.84
No. 7	14.7	3.9	-3.8	-0.81
No. 8	14.8	5.1	-3.2	-0.64
No. 9	14.8	1.0	-3.0	-0.61
No. 10	14.9	0.3	-2.5	-0.47
No. 11	14.9	2.2	-2.5	-0.47
No. 12	14.9	7.2	-2.4	-0.44
No. 13	15.0	5.6	-1.9	-0.30
No. 14	15.1	4.4	-1.2	-0.13
No. 15	15.1	1.2	-1.2	-0.13
No. 16	15.2	2.3	-0.9	-0.07
No. 17	15.2	2.5	-0.4	0.07
No. 18	15.3	6.6	-0.2	0.13
No. 19	15.3	2.0	0.0	0.17
No. 20	15.4	1.2	0.4	0.27
No. 21	15.4	3.0	0.5	0.30
No. 22	15.4	1.4	0.5	0.30
No. 23	15.5	2.4	1.5	0.57
No. 24	15.6	3.9	2.1	0.71
No. 25	15.7	5.3	2.5	0.81
No. 26	15.7	1.2	2.5	0.81
No. 27	16.1	1.2	5.2	1.52
No. 28	16.5	1.5	7.6	2.12
No. 29	16.7	2.7	8.9	2.46
No. 30	16.9	1.9	10.4	2.87
No. 31	17.3	2.6	13.0	3.54
No. 32 *	18.4	2.2	20.2	5.40
平均値	15.4			
最大値	18.4			
最小値	14.2			
標準偏差	0.908			
変動係数(%)	5.90			
n	32			

真値：15.3 µg/L

\* 真値に対する誤差率が±20%を超え、Zスコアが±3以上の機関

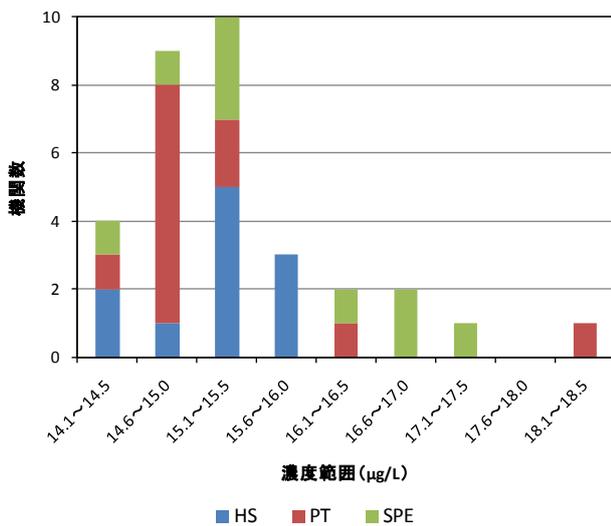


図2 検査値とその度数分布図

## 2-2. 外れ値になった原因

上記1機関の検査値が外れ値になった原因についてフォローアップした検証結果を以下に示す。

No. 32の検査値は18.4 µg/L、誤差率は20.1%、Zスコアは5.40、検査方法はPT法で、グラブズの棄却検定により棄却された。提出された資料をもとに検討したところ、内部標準物質の自動添加装置に不良があったため、内部標準を使わずに、絶対検量線法で定量していた。1,4-ジオキサンは水溶性が高いため、相対的に感度が低い。また分析機器の経路内で共存する水分の影響を受けやすい。このため、内部標準物質1,4-ジオキサン-d8（サロゲート）を用いなければ精度が低下する。告示に示された方法<sup>10</sup>では、分析にサロゲートを使用することが記され、他の機関は全て使用していた。これらのことから、定量にサロゲートを用いなかったことが、外れ値の原因の一つであると考えられた。

また、検量線には重み付け検量線を使用していた。これは濃度の低い検量点ほど重視して検量線を作成する方法である。今回の検量線は、濃度の大きい検量点ほど、検量線が離れていた。したがって、重み付けをしたことにより、傾きが小さくなり、結果として定量値が高くなったものと考えられた。

そのため、重み付けを外した直線検量線を用いて再定量を依頼した。図3に両者の検量線を示す。再定量の結果、検査値は17.5 µg/L、誤差率は

14.6%、Zスコアは3.95となり、誤差率が20%以下になったため、外れ値ではなくなった。

以上の調査により、今回の外れ値の原因は、サロゲートを使用しなかったこと、及び、重み付け検量線法で定量したためであったと判断した。

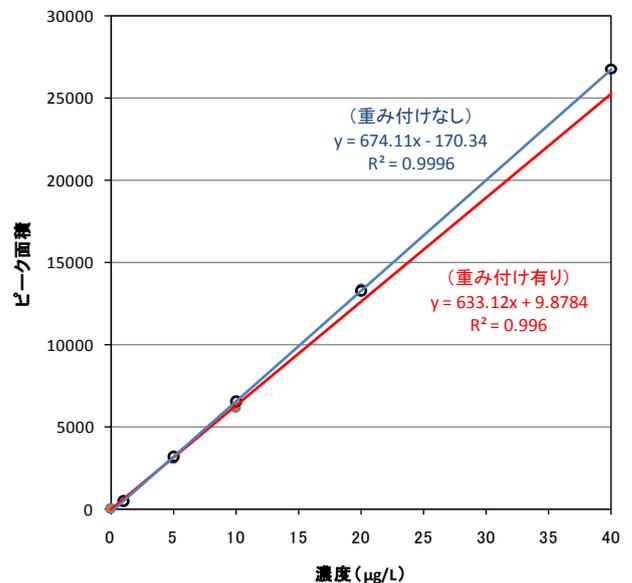


図3 No. 32の検量線

## 2-3. 検査法別による検討

検査方法別の各機関の濃度、平均濃度、標準偏差および変動係数を表3に示した。

### 1) PT

平均値は15.2 µg/Lとなり、真値(15.3 µg/L)と同程度の値であった。標準偏差は1.10 µg/L、変動係数は、7.2%であった。

### 2) HS

平均値は15.2 µg/Lとなり、真値と同程度の値であった。標準偏差は0.447 µg/L、変動係数は2.9%であった。

### 3) SPE

平均値は15.8 µg/Lとなり、真値と同様の値であった。標準偏差は1.04 µg/L、変動係数は、6.6%であった。

### 4) 検査法の比較

PT、HS及びSPEにおける測定方法の違いを検討するために、ノンパラメトリック多重比較法であるクラスカル・ウォリス検定を行ったところ、3法の間有意水準5%で有意差は認められなかった。

表3 検査方法別結果

検査方法	PT	HS	SPE
	14.2	14.4	14.4
	14.7	14.5	14.8
	14.7	15.0	15.1
	14.7	15.1	15.3
	14.8	15.2	15.4
検査値 ( $\mu\text{g/L}$ )	14.9	15.4	16.5
	14.9	15.4	16.7
	14.9	15.5	16.9
	15.2	15.6	17.3
	15.3	15.7	
	16.1	15.7	
	18.4		
平均値	15.2	15.2	15.8
最大値	18.4	15.7	17.3
最小値	14.2	14.4	14.4
標準偏差	1.10	0.447	1.04
変動係数(%)	7.20	2.94	6.56
n	12	11	9
PT	: パージ・トラップ-ガスクロマトグラフ-質量分析法		
HS	: ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ-質量分析法		
SPE	: 固相抽出-ガスクロマトグラフ-質量分析法		

### 3. まとめ

平成 23 年度大阪府水道水質検査外部精度管理として、1,4-ジオキサンを検査結果を真値に対する誤差率と Z スコアの 2 つの方法で評価を行った。報告された 32 検査値のうち、変動係数が 20% を超えた機関はなかった。32 検査値のうち、真値に対する誤差率が許容範囲を超えたのは 1 機関であった。また、Z スコアが許容範囲を超えたのは 2 機関であった。両方法で許容範囲を超えた検査値を外れ値と評価したが、この外れ値に該当したのは 1 機関であった。外れ値の存在率は、3.1% (32 機関中 1 機関) であり、1,4-ジオキサンに関する外部精度管理は概ね良好な結果であったと考えられた。

外れ値等の原因を検証した結果、検査精度の向上を図るため、以下の留意点が考えられた。

(1) 1,4-ジオキサンはサロゲートを用いなければ精度が低下する。サロゲートの添加を自動添加装置で行う場合は、装置の保守を十分にしておくことが重要であると考えられる。

(2) 検量線は直線回帰式を用いる。重み付け検量線は低濃度の検量点が重視されるので注意を要する。

### 参考文献

- 1) 小泉義彦, 宮野啓一, 足立伸一, 高木総吉, 安達史恵, 渡邊功: 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-フェノール類(平成 17 年度)-, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 46, 61-73 (2008)
- 2) 小泉義彦, 宮野啓一: 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-トリハロメタン(平成 19 年度)-, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 46, 75-90 (2008)
- 3) 宮野啓一, 小泉義彦, 高木総吉, 安達史恵, 渡邊功: 大阪府水道水質検査外部精度管理結果-陰イオン界面活性剤(平成 18 年度)-, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 47, 81-88 (2009)
- 4) 田中榮次, 安達史恵, 渡邊功: 大阪府水道水質検査外部精度管理結果-ナトリウム及びその化合物(平成 19 年度)-, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 48, 50-57 (2010)
- 5) 田中榮次, 安達史恵, 小川有理, 吉田直志, 木村直昭, 足立伸一: 大阪府水道水質検査外部精度管理-蒸発残留物(平成 21 年度)-, 水道協会雑誌, 80, 10, 12-22 (2011)
- 6) 小泉義彦, 宮野啓一, 足立伸一: 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-シス-1,2-ジクロロエチレン及びトランス-1,2-ジクロロエチレン(平成 21 年度)-, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 49, 61-72 (2011)
- 7) 化学工業日報社: 16112 の化学商品, 835-836 (2012)
- 8) 日本環境管理学会: 水道水質基準ガイドブック, 64-65 (2001)
- 9) 平成 15 年 5 月 30 日付け厚生労働省令第 101 号
- 10) 平成 15 年厚生労働省告示第 261 号

## 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点

## - 全有機炭素 (TOC) の量 (平成 24 年度) -

小泉義彦\* 足立伸一\*

大阪府水道水質検査外部精度管理は、本府環境衛生課が公衆衛生研究所の協力を得て、府内の試験研究機関及び水道事業者を対象に実施している。平成 24 年度は有機物質項目として全有機炭素 (TOC) の量を対象とした。38 機関から回答のあった検査値を解析したところ、誤差率及び Z スコアの両方が許容範囲を超えた「外れ値」はなく、良好な結果が得られた。添付資料を検証した結果、検量線に相当する補正に、機器で元来設定されている検量機能を使用している機関があった。告示に示された方法では、分析のたびに検量線を作成 (補正) しなければならない、分析法を逸脱しないように留意する必要がある。

**キーワード** : 水道水、外部精度管理、全有機炭素 (TOC) の量

**Key words** : drinking water, external quality control, total organic carbon (TOC)

大阪府水道水質検査外部精度管理は、水道水質検査精度の向上を図ることを目的として、平成 5 年度より大阪府健康医療部環境衛生課と共同で、府内水道事業者等の協力を得て実施してきた<sup>1-2)</sup>。平成 24 年度は全有機炭素 (TOC) の量を有機物質の対象項目として実施した。

環境水中に含まれる有機物質濃度は、土壌由来のフミン質、し尿・下水及び工場排水の流入、湖沼でのプランクトンの異常増殖等に影響され、その上昇は水道水における異臭味問題や消毒副生成物量増加の要因と考えられる。水中の有機物質量の指標として長年にわたり過マンガン酸カリウム消費量が用いられてきたが、有機物質の指標としては不十分であり、測定精度が悪い等の観点から不適切であるとされ、見直しが図られた。その結果、平成 16 年 4 月に水道水質基準として過マンガン酸カリウム消費量に代わり、性状に関する項目として全有機炭素 (TOC) の量として「5mg/L 以下」が施行された。その後、第 6 回厚生科学審議会生活環境水道部会において、以前の水道基準である過マンガン酸カリウム消費量 10mg/L に対応する TOC の量は 3~

4mg/L 程度であること、トリハロメタン対策の観点から 3mg/L 程度以下にすることが必要とされたことから、平成 21 年 4 月より TOC の量で「3mg/L 以下」に基準値が強化された<sup>3)</sup>。

## 調査方法

## 1. 参加機関

表 1 に示す 38 機関であった。

表 1 外部精度管理参加機関

大阪市水道局	大阪狭山市水道局
池田市上下水道部	堺市上下水道局
箕面市上下水道局	和泉市上下水道部
豊中市上下水道局	岸和田市上下水道局
吹田市水道部	貝塚市上下水道部
茨木市水道部	熊取町上下水道部
高槻市水道部	大阪広域水道企業団 (水質管理センター)
島本町上下水道部	大阪広域水道企業団 (村野浄水場)
枚方市上下水道局	大阪広域水道企業団 (庭窪浄水場)
寝屋川市水道局	堺市衛生研究所
守口市水道局	高槻市環境科学センター
門真市水道局	大阪市立環境科学研究所
交野市水道局	東大阪市環境衛生検査センター
東大阪市上下水道局	大阪府茨木保健所
八尾市水道局	大阪府四條畷保健所
柏原市藤井寺市水質共同検査室	大阪府藤井寺保健所
松原市上下水道部	大阪府泉佐野保健所
羽曳野市水道局	社団法人 大阪府薬剤師会
河内長野市上下水道部	大阪府立公衆衛生研究所

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

Results of External Quality Control on the Analytical Measures for Tap

Water in Osaka Prefecture—TOC (2012)—

by Yoshihiko KOIZUMI and Shinichi ADACHI

## 2. 実施方法

### 2-1. 精度管理試料の調製方法

平成 24 年 9 月 24 日（月）に大阪府立公衆衛生研究所（大阪市東成区中道 1 丁目 3 番 69 号）に給水されている水道水を用いて、以下の 2 種類の試料（低・高濃度用）を調製した。

（試料 A）

水道水 70 L をステンレス製タンク（90 L）に採取し、マグネチックスターラーで攪拌しながら亜硫酸ナトリウムで定量的に残留塩素を消去した。30 分間攪拌を続け、均一になったものを、550mL のガラス瓶に満水になるよう分注し試料 A とした。

当所による分析の結果より、0.770 mg/L を設定濃度とした。これは水道水質基準値の約 4 分の 1 の濃度である。

（試料 B）

水道水 70 L をステンレス製タンク（90 L）に採取し、マグネチックスターラーで攪拌しながら亜硫酸ナトリウムで定量的に残留塩素を消去した。ここに、フタル酸水素カリウム（和光純薬製 容量分析用標準物質ロット：TLP6237）より調製した標準原液（炭素濃度として 1000mg/L）を 50mL 添加した。30 分間攪拌を続け、均一になったものを、550mL のガラス瓶に満水になるよう分注し、試料 B とした。設定濃度は 1.49 mg/L とした。これは水道水質基準値の約 2 分の 1 の濃度である。

### 2-2. 試料の均一性及び安定性

試料 A、B とも、分注した約 90 本の試料から、調製順に 10 本ごと 9 試料を測定した。変動係数は、試料 A で 1.2%、試料 B で 0.3% であり、均一性を確認した（表 1）。また、当所において冷暗所に保管した試料について、燃焼酸化法を用いて 14 日後まで測定を行い、図 1 に示したように安定性を確認した。

表 1 試料の均一性 (n=9)

	試料A	試料B
平均値 (mg/L)	0.783	1.45
標準偏差 (mg/L)	0.00918	0.00413
変動係数 CV (%)	1.2	0.3

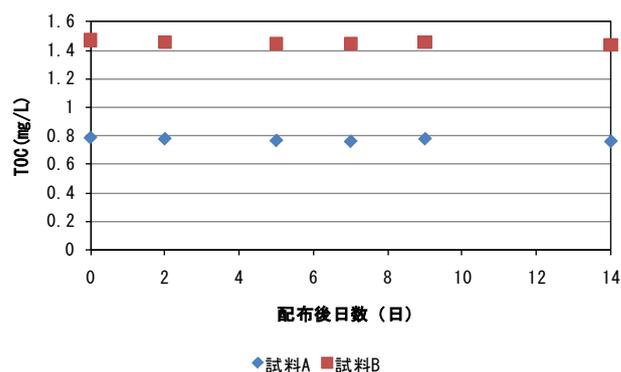


図 1 試料の安定性

### 2-3. 試料の検査方法

検査方法は「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」(平成 15 年 7 月 22 日付け厚生労働省告示第 261 号 [一部改正 平成 21 年 3 月 6 日付け厚生労働省告示第 386 号]) の別表第 30 (全有機炭素計測定法) とした。

配布試料については前処理を含めて 5 回の測定を行い、その結果と分析法の分析条件を「外部精度管理結果報告書」に記入し、平成 23 年 10 月 28 日までに、結果及び分析条件等に関する資料を回収した。

### 2-4. 結果の検証方法

最初に、各機関から報告された検査値 (n=5) の変動係数 (CV) 20% を許容範囲とし、20% を超えるものについては評価の対象外とした。

次に、Z スコアの許容範囲は ±3 (境界を含まない)、真値に対する誤差率の許容範囲は ±20% (境界を含む) とし、両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価した。

Z スコアは、四分位数法で算出し<sup>2)</sup>、誤差率は有意水準を 5% とした Grubbs の棄却検定<sup>2)</sup>で棄却された検査値を除外した後の平均を「真値」とし、次式で算出した。

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

## 結果及び考察

### 1. 分析方法

全有機炭素計測定法のうち、燃焼酸化法が 33 機関、湿式酸化-非分散型赤外線ガス分析法が 1 機関、湿式酸化-ガス透過膜式導電率測定法が 4 機関であった。

## 2. 検査結果の検証

38 機関から報告された検査値の平均値、変動係数、「真値」に対する誤差率及び Z スコアを表 2 及び表 3 に示した。機関番号の順番は表 1 の順番とは異なる。また、測定値のヒストグラムを図 2 に示した。

表 2 検査値と評価値 (試料 A)

機関番号	検査値 (平均値) ( $\mu$ g/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
T-1	0.751	0.9	-6.6	-1.42
T-2	0.755	2.7	-6.1	-1.32
T-3	0.759	1.9	-5.6	-1.21
T-4	0.769	0.6	-4.4	-0.93
T-5	0.770	2.0	-4.3	-0.90
T-6	0.770	0.2	-4.2	-0.89
T-7	0.771	5.1	-4.1	-0.85
T-8	0.773	4.7	-3.8	-0.80
T-9	0.777	0.8	-3.4	-0.71
T-10	0.778	0.8	-3.3	-0.68
T-11	0.781	0.5	-2.9	-0.59
T-12	0.781	1.3	-2.9	-0.59
T-13	0.781	1.9	-2.8	-0.57
T-14	0.784	2.7	-2.5	-0.49
T-15	0.789	0.5	-1.8	-0.35
T-16	0.790	1.2	-1.7	-0.33
T-17	0.796	3.7	-1.0	-0.16
T-18	0.800	0.7	-0.5	-0.06
T-19	0.801	1.2	-0.3	-0.02
T-20	0.802	2.1	-0.2	0.02
T-21	0.804	0.6	0.0	0.07
T-22	0.809	0.8	0.6	0.19
T-23	0.812	3.0	1.0	0.28
T-24	0.815	2.1	1.3	0.36
T-25	0.816	1.5	1.5	0.40
T-26	0.818	3.4	1.7	0.44
T-27	0.819	0.7	1.9	0.48
T-28	0.826	1.2	2.7	0.68
T-29	0.827	0.2	2.8	0.70
T-30	0.828	6.4	2.9	0.72
T-31	0.829	0.4	3.1	0.77
T-32 *	0.838	2.8	4.2	1.02
T-33	0.839	1.7	4.3	1.04
T-34	0.841	0.9	4.6	1.09
T-35	0.845	0.5	5.0	1.20
T-36	0.846	1.3	5.2	1.23
T-37	0.877	1.4	9.1	2.11
T-38	0.888	3.3	10.4	2.41
平均値	0.804			
最大値	0.888			
最小値	0.751			
標準偏差	0.033			
変動係数 (%)	4.0			
n	38			

真値 : 0.804mg/L

\* n=4の機関

### 2-1. 変動係数

試料 A では、検査を実施した 38 機関のうち変動係数 (CV) が 20% を超えた機関はなかった。

1 機関 (T-32) は n=4 の結果であった。この機関では 1 試料あたり 5 回の繰り返し測定を予定していたが、試料測定 4 回目まで機器が停止した (原因不明)。後日、再測定を試みたが、機器の不調と、高圧ガス残量の不足が重なり、報告期限内に再測定することができな

かった。しかし、4 つの値のバラツキは、CV (%) = 2.8 と小さかったため、T-32 も評価対象とした。

試料 B では、検査が実施された 38 機関のうち変動係数 (CV) が 20% を超えた検査値はなかった。1 機関 (T-32) は、前述に示した理由により n=4 の結果であったが、CV (%) = 0.9 と変動が小さかったため評価対象とした。

表 3 検査値と評価値 (試料 B)

機関番号	検査値 (平均値) ( $\mu$ g/L)	変動係数 (%)	真値に対する 誤差率 (%)	Zスコア
T-7	1.39	6.7	-6.8	-1.85
T-3	1.41	1.1	-5.2	-1.37
T-1	1.42	0.3	-4.8	-1.25
T-5	1.42	0.3	-4.8	-1.25
T-2	1.43	0.6	-3.9	-0.97
T-17	1.43	1.3	-3.9	-0.97
T-8	1.43	1.6	-3.8	-0.93
T-4	1.44	0.6	-3.2	-0.77
T-9	1.45	0.3	-2.8	-0.64
T-12	1.45	0.6	-2.6	-0.56
T-11	1.46	0.4	-2.3	-0.48
T-20	1.47	0.4	-1.6	-0.28
T-25	1.47	1.0	-1.6	-0.28
T-18	1.47	1.0	-1.3	-0.20
T-13	1.47	0.8	-1.1	-0.12
T-23	1.48	1.4	-0.9	-0.08
T-14	1.48	1.0	-0.9	-0.08
T-19	1.48	0.3	-0.8	-0.04
T-6	1.48	1.6	-0.7	0.00
T-16	1.48	0.0	-0.7	0.00
T-15	1.48	1.2	-0.5	0.04
T-21	1.50	0.5	0.7	0.40
T-30	1.50	1.0	0.8	0.44
T-26	1.50	1.6	0.9	0.48
T-32 *	1.51	0.9	1.0	0.50
T-27	1.51	0.9	1.2	0.56
T-10	1.51	0.5	1.3	0.60
T-34	1.52	1.0	2.0	0.81
T-22	1.52	0.7	2.0	0.81
T-28	1.53	0.7	2.4	0.93
T-33	1.54	0.7	3.2	1.17
T-31	1.54	0.3	3.2	1.17
T-29	1.54	0.0	3.4	1.21
T-35	1.54	0.5	3.4	1.21
T-24	1.54	0.6	3.6	1.29
T-37	1.54	1.0	3.6	1.29
T-36	1.55	1.4	4.0	1.41
T-38	1.58	1.0	6.0	2.01
平均値	1.49			
最大値	1.58			
最小値	1.39			
標準偏差	0.046			
変動係数 (%)	3.1			
n	38			

真値 : 1.49mg/L

\* n=4の機関

### 2-2. 誤差率

試料 A、B とも、Grubbs の棄却検定で棄却された検査値はなかった。誤差率でも許容範囲を超えた検査値はなかった。

### 2-3. Zスコア

試料 A、B とも、Z スコアが許容範囲を超えた検査値

はなかった。

#### 2-4. 外れ値

試料 A、B とも、誤差率と Z スコアとの両方の許容範囲を超えた「外れ値」に該当する機関はなかった。

以上のことから、有機物（全有機炭素（TOC）の量）は良好な外部精度管理結果が得られた。

#### 2-5. 検量線に関する検証

全有機炭素計の形式で燃焼酸化法を用いた機関では、すべての機関が検量線を作成し、いずれも次数は 1 次であった。寄与率（R<sup>2</sup>）はいずれも良好な結果で、直線性は良かった。また、検量点の最大濃度は、T-12 の 10mg/L であったが、ほとんどの機関において 3~5mg/L であり、適切な濃度範囲で検量線を作成していた。検量点数は、4~7 点であり、告示に示された点数（4 点）を満たしていた。

湿式酸化-ガス透過膜式導電率測定法を用いた 4 機関（T-10、T-25、T-29、T-31）においては、検量線を作成していなかった。

T-29、T-31 では、試料を測定する際に、確認用標準液（T-29 及び T-31 共に 2mg/L）を測定し、標準液濃度と測定濃度との間に乖離がないことを確認していた。

T-10 は平成 23 年 11 月に業者による校正、T-25 は、平成 24 年 9 月 10 日に業者による校正のみで、試料測定の際の確認をしていなかった。機器の安定性を過信せず、測定のために検量線に相当する補正をする必要があると考えられた。

なお、機器のメーカーに問い合わせたところ、決められた 5 点（1、5、10、25、50mg/L）を用い、各濃度の標準液測定における期待値と実測値から多項式を作成して検量線作成に用いる係数を新たに算出し、多点校正を行うことができるとの回答を得ている。また、この機種は、測定強度を外部へ出力することができないので、分析担当者が表計算ソフトで検量線を作成することはできない。

#### 2-6. 検査法別による検討

全有機炭素計の形式には、燃焼酸化法、湿式酸化法-ガス透過膜式導電率測定法、湿式酸化法-非分散型赤外線ガス分析法の 3 つが使用された。形式別の平均値、標準偏差及び変動係数を表 4 及び

表 5 に示した。

#### 1) 燃焼酸化法

燃焼酸化法を用いたのは 33 機関であった。

試料 A では、平均値は 0.804mg/L となり、真値と同じ値であった。また変動係数は 4.2%であった。

試料 B では、平均値は 1.49mg/L となり、真値と同じ値であった。また変動係数は 2.9%となった。

#### 2) 湿式酸化法-ガス透過膜式導電率測定法

湿式酸化法-ガス透過膜式導電率測定法を用いたのは 4 機関であった。

試料 A では、平均値は 0.812mg/L となり、真値より僅かに高かった。また変動係数は、2.9%となった。

試料 B では、平均値は 1.51mg/L となり、真値より僅かに高かった。また変動係数は 2.3%となった。

#### 3) 湿式酸化法-非分散型赤外線ガス分析法

湿式酸化法-非分散型赤外線ガス分析法を用いたのは 1 機関であった。

試料 A では、0.771mg/L となり、真値より低かった。

試料 B では、1.39mg/L となり、真値より低く、全体の中で最も低い値であった。

#### 4) 検査法の比較

燃焼酸化法以外の方法を用いた機関が少ないため、統計手法を用いて有意差を評価することはできなかった。

表 4 形式別統計値（試料 A）

	燃焼酸化法	湿式酸化-ガス透過膜式導電率測定法	湿式酸化-非分散型赤外線ガス分析法
n	33	4	1
平均値	0.804	0.812	0.771
標準偏差	0.034	0.024	-
変動係数	4.2	2.9	-

表 5 形式別統計値（試料 B）

	燃焼酸化法	湿式酸化-ガス透過膜式導電率測定法	湿式酸化-非分散型赤外線ガス分析法
n	33	4	1
平均値	1.49	1.51	1.39
標準偏差	0.04	0.03	-
変動係数	2.9	2.3	-

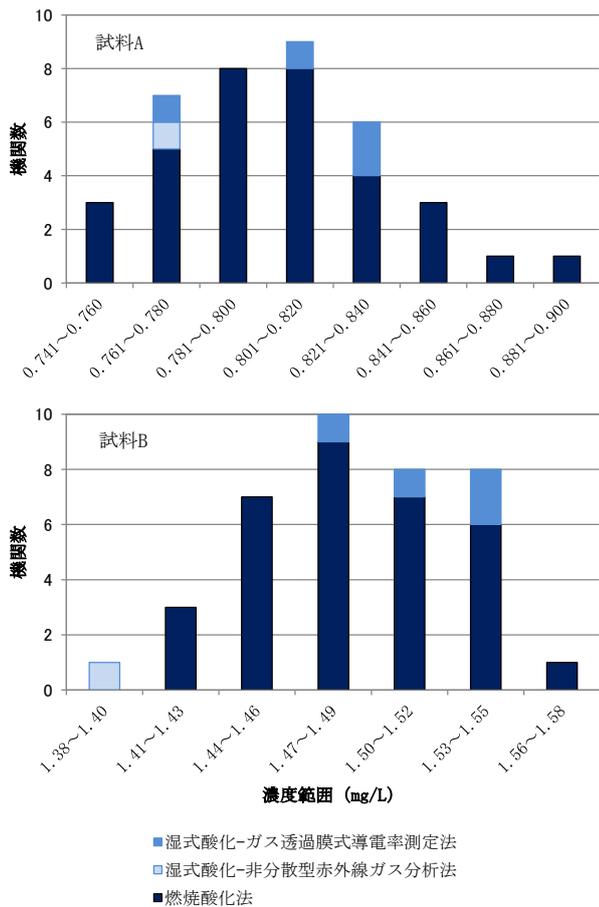


図2 試料A, Bの度数分布図  
(真値 試料A: 0.804mg/L 試料B: 1.49mg/L)

### 3. まとめ

平成24年度大阪府水道水質検査外部精度管理として、有機物(全有機炭素(TOC)の量)の検査結果を「真値」に対する誤差率とZスコアの2つの方法で評価を行った。2試料を調査したが、A・Bどちらの試料においても、検査が実施された38機関のうち変動係数(CV)

が20%を超えた検査値はなかった。全ての検査値に対して評価を行ったところ、Grubbsの棄却検定で棄却された検査値はなかった。「真値」に対する誤差率で許容範囲±20%を超えた検査値及びZスコアで許容範囲±3を超えた検査値はなく、「外れ値」に該当する機関はなかった。

以上のことから、有機物(全有機炭素(TOC)の量)に関して良好な外部精度管理結果が得られた。

なお、添付資料を検証した結果、検査精度を維持する上で、次の留意点が考えられた。

検量線に相当する補正を、元来設定されている機能を使用している機関においては、精度の維持を図るため、確認用標準液を用いる等、告示に従って分析ごとに補正を行う必要があると考えられた。

### 参考文献

- 1) 中島孝江, 宮野啓一, 田中榮次: 大阪府水道水質検査外部精度管理 シアン化物イオン及び塩化シアン(平成22年度), 水道協会雑誌 82(5), 11-18, (2013)
- 2) 小泉義彦, 足立伸一: 大阪府水道水質検査外部精度管理結果と分析の留意点-1, 4-ジオキササン(平成23年度)-, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 52, 49-52 (2014)
- 3) 日本環境管理学会: 水道水質基準ガイドブック, 130-132(2009)

## 生活系排水余剰汚泥中の微生物の熱不活化の検討

中野 仁\* 足立伸一\*

近年開発された電気浸透式汚泥脱水機は、その処理過程で汚泥が発熱することから、含まれている恐れがある病原性微生物の不活化に効果が期待された。そこで大腸菌、腸球菌、枯草菌、大腸菌ファージを指標微生物として、不活化におよぼす加熱温度と時間の関係を探るとともに、実際に稼働している脱水機の汚泥中の大腸菌や大腸菌群を測定した。

大腸菌は 65℃以上であれば容易に不活化できるが、腸球菌や大腸菌ファージは大腸菌に比べ熱耐性があつた。枯草菌は 80℃、5 分の加熱でも全く不活化しなかつた。稼働している脱水機の汚泥中では温度上昇の不均一があるが、汚泥 1g 中の大腸菌数は-2log~-5log 低減していた。

キーワード：微生物、汚泥、脱水、熱、不活化

key words : microorganism、sludge、dehydration、heat、inactivation

し尿を含んだ汚水中には多くの微生物が含まれているが、時として病原性を有する細菌や、感染症を引き起こすウイルスなどが含まれる。下水処理場や汚泥再生処理センター（し尿処理場）での病原性微生物の挙動に関しては多くの報告<sup>1)2)</sup>があり、これらのほとんどが生物反応槽（活性汚泥槽）で除去されていることが示されている。しかし、この除去は生物反応槽内で病原性微生物が不活化されたことよりも、活性汚泥に吸着されることにより低減しているとされている。すなわち、余剰汚泥として処分される汚泥中には病原性微生物が濃縮されている危険性があるが、これらを調べた文献<sup>3)</sup>は少ない。

余剰汚泥は濃縮処理や脱水処理を受けたあと、再利用の一つとして堆肥（コンポスト）として有効利用される。堆肥は肥料や土壌改良材の他に、土壌の病害予防にも効果があるとされている<sup>4)</sup>。堆肥化過程で汚泥中の有機物が分解されるとともに、その際の発酵熱（60～65℃）と時間（2 日程度）により有害な微生物の死滅が期待されるが、発酵が不十分で温度が上昇しなかつたり、不均一な発酵であった場合には残存する危険性がある。

これまで脱水処理技術としては真空脱水、ベルトプレス脱水、遠心脱水、多重円盤型脱水などがあつたが、近年、新たに電気浸透式汚泥脱水機が開発された。この脱水機の基本構造は、金属製の回転ドラム（陽極）と金属ベルト（陰極）、ろ布から構成されており、2 つの電極間に 40～45V の電圧が印加される。前濃縮された汚泥がろ布を介して 2 つの電極に挟まれながら約 50 秒間徐々に圧搾される間に、負の電荷を持っている汚泥粒子は陽極付近に集まり、正の電荷を帯びた水分子はろ布を通して陰極側に移動し脱水される。この時、2 つの電極間には汚泥を通じて電流が流れ、その結果ジュール熱が発生し汚泥が高温になることから、含まれている病原性微生物に対する不活化効果が期待できるのではないかと考えた。

そこで今回、大腸菌、腸球菌、枯草菌および大腸菌に感染するウイルスである大腸菌ファージを指標微生物として用い、実験室内で不活化に与える加熱温度と時間の関係を明らかにするとともに、平成 24 年度から大阪府内のし尿処理場で稼働している電気浸透式脱水機の汚泥を採取し、微生物の不活化状況を検討した。

### 実験方法

#### 1. 指標微生物の調製

実験に用いた微生物は下記の通りであり、入手先は（独）製品評価技術基盤機構である。

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部生活環境課

大腸菌：*Escherichia coli* (NBRC 番号 3301)

腸球菌：*Enterococcus faecalis* (NBRC 番号 100482)

枯草菌：*Bacillus subtilis* (NBRC 番号 3134)

大腸菌ファージ：*Escherichia coli phage Q $\beta$*

(NBRC 番号 20012)

### 1.1 大腸菌液と枯草菌液

大腸菌と枯草菌の培養には標準寒天培地を使用した。実験を実施する前日に、シャーレに入った標準寒天培地に冷蔵庫内の斜面保存菌株を画線した。36°Cで一晩培養後のコロニーをいくつか釣菌し、リン酸希釈液で洗菌したものを菌液として使用した。

### 1.2 腸球菌液

腸球菌は栄養要求性が高いため、培養には標準寒天培地より栄養リッチな下記の培地（大腸菌ファージ測定用<sup>2)</sup>）を調製した。

前日に寒天培地に画線し、36°Cで一晩培養後のコロニーを釣菌し、リン酸希釈液で洗菌したものを使用した。

ポリペプトン	10g	} 蒸留水 1L に溶解し 2%NaOH を加え pH 7.0 ± 0.2 に調整する
酵母エキス	5g	
ブドウ糖	1.5g	
NaCl	5g	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2g	
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.05g	

### 1.3 大腸菌ファージ液

宿主大腸菌は先に示した *Escherichia coli* を用いた。

高濃度のファージ液を得るための液体培地は、上記の組成の培地を用いた。

培養は以下の手順で行った。

- ① 試験管に入れた液体培地 8mL に斜面保存培地から掻き取った宿主大腸菌を接種
  - ② 36°C で 3.5～4 時間振盪培養
  - ③ 液体培地 100mL (200mL 三角マイヤ) に②の培養液全量を投入し、これに凍結乾燥から復元した Q $\beta$  ファージ液 1mL を添加
  - ④ 36°C で 3.5 時間振盪培養
  - ⑤ 培養液を 5°C、6,000rpm で 10 分間遠心分離
  - ⑥ 遠心上澄み液を滅菌 0.45 $\mu$ m フィルターでろ過滅菌し、大腸菌を除去
  - ⑦ ろ液を冷蔵庫に保存
- 以降の高濃度液の調製時には、⑦のろ液を③で添加

する Q $\beta$  ファージ液として用いた。

## 2. 脱水汚泥からの微生物誘出方法

### 2.1 細菌の誘出

50mL 遠沈管に脱水汚泥 1.0g (湿重量) と細菌測定用リン酸希釈液 20mL を加え、ステンレスブレードの付いたホモジナイザーを用いて 9,500rpm、30 秒間の分散処理を行う

↓

20°C の恒温槽で 20 分間振盪し細菌を誘出する

↓

この懸濁液を目開き 0.3mm (60 メッシュ) の金属製円筒でろ過し、夾雑物を除去する

↓

ろ液を細菌測定試料とする

### 2.2 大腸菌ファージの誘出

#### 2.2.1 誘出液

1 モル NaNO<sub>3</sub> 溶液にビーフエキストラクトを 3% 濃度になるよう添加した後、pH7 に調整したものを用いた<sup>5)</sup>。

#### 2.2.2 誘出操作

50mL 遠沈管に脱水汚泥 1.0g (湿重量) と誘出液 20mL を加え、ステンレスブレードの付いたホモジナイザーを用いて 9,500rpm、30 秒間の分散処理を行う

↓

20°C の恒温槽で 20 分間振盪しファージを誘出する

↓

これを 6,000rpm で 10 分間の遠心分離を行う

↓

デカンテーションする → 上澄み液①

↓

沈殿物に再度誘出液 20mL を添加する

↓

ホモジナイザー (9,500rpm) で 30 秒間の分散処理を行う

↓

20°C で 20 分間振盪しファージを誘出させる

↓

6,000rpm で 10 分間の遠心分離を行う

↓

この上澄み液と先の上澄み液①を注射筒にセットした 0.45 $\mu$ m のディスクフィルターでろ過する

↓  
ろ液をファージ測定試料とする

### 3. 測定方法

#### 3.1 細菌数測定

室内実験試料の大腸菌、枯草菌は標準寒天培地を、腸球菌は大腸菌ファージ測定用培地を用いて測定した。

リン酸希釈液で調整した試料 0.1mL を、前日にシャーレに固化させた標準寒天培地に入れ、コンラージ棒を用いて一面に塗抹したのち、36℃で 20～24 時間培養し、コロニー数をカウントした。通常、大腸菌は選択培地を用いて測定するが、熱損傷を受けた菌は選択培地上では増殖しにくいため、ここでは標準寒天培地を用いた。

脱水汚泥から誘出した一般細菌は標準寒天培地で、大腸菌、大腸菌群の測定は特定酵素基質培地 (IDEXX 社製 コリラート MPN テストキット) を用いた方法 (以降コリラート法と記載) と、Merck 社製のクロモカルトコリフォーム寒天培地 (以降クロモカルト法と記載) を用いて測定した。

#### 3.2 大腸菌ファージ数測定

大腸菌ファージ数を計測するための培地は、下層培地として「1.2 腸球菌液」の液体培地に 1.1% の寒天を加えたもので、前日に平板を作製した。重層用の上層培地は 0.8% の寒天と培地 100mL 当たり  $\text{CaCl}_2$  溶液 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.3g/100mL) を 2mL 加えたものを用いた。

測定手順を以下に示す。

- ① 試験当日、試験管に入れた液体培地に宿主大腸菌を接種し、36℃で 3.5～4 時間振盪培養する。
- ② 滅菌した試験管を 40℃に設定したブロックヒーターにあらかじめ差し込んでおく。
- ③ これに希釈調整した試料 1mL と振盪培養直後の宿主大腸菌 0.3mL、さらに上層用の軟寒天培地 3mL を入れ、取り出したあと試験管ミキサーで軽く混合したのち、試験管上部を火焰滅菌し下層寒天培地に全量注入 (重層) し、全面に広げる。
- ④ 36℃で 20 時間培養後、プラーク数をカウントする。

#### 3.3 菌種の同定

菌種の同定はシスメックス・ピオメリユー社製の

API 50CHB キットを用い、操作方法は添付文書に従った。

### 4. 実験方法

#### 4.1 室内実験

菌液が入った試験管とブロックヒーターを用い、微生物を高温の液に一気にさらし、一定の時間その温度を保持したあと、急速に下げるといった矩形の温度変化を与えた。

その具体的な手順を図 1 に示した。

- ① リン酸希釈液 4.5mL が入った試験管をブロックヒーターに差し込み、あらかじめ所定の温度に昇温しておく。同様にセットした温度確認用試験管で温度上昇を確認 (写真 1) したのち、添加実験を行う。
- ② 試験管をブロックヒーターから抜き、直ちに高濃度の細菌またはファージ液を液面近くから 0.1mL 添加 (この時点をも 0 秒) する。
- ③ 試験管ミキサーで 2 秒間回転混合する。
- ④ 直ちに再度ブロックヒーターに戻す (保持時間が 5 秒の場合は戻さない)。
- ⑤ 所定の保持時間の 1 秒前に試験管を引き抜き、上部を火焰滅菌したのち直ちに室温の 20mL のリン酸希釈液が入った 50mL 滅菌済み遠沈管に一気に注入 (ここまですべて保持時間とする) することにより液温を下げ、これを試料とした。

実験した加熱温度と保持時間の組み合わせを下記に示した。

各条件とも試験の安定性を確認するため、1 つの組合せにつき 3～5 回の試験を同時に行った。



写真 1 ブロックヒーター

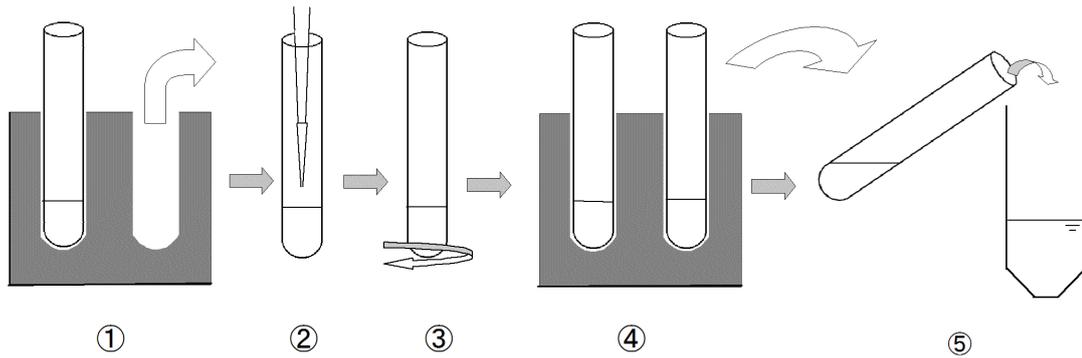


図1 実験室内での熱不活化実験手順

60℃：10秒・20秒・30秒・40秒  
 65℃：10秒・20秒・30秒  
 70℃：10秒・20秒・30秒  
 75℃：5秒・10秒・20秒  
 80℃：5秒・10秒

#### 4.2 フィールド実験

大阪府内の「膜分離高負荷脱窒素処理方式+高度処理設備」のし尿処理場で電気浸透式汚泥脱水機が稼働しており、脱水前後の汚泥を採取した。脱水時に発熱する汚泥の温度測定は、(株)日油技研工業製の以下の不可逆性示温材を用いた。示温材の裏面は粘着シートになっており、5cm四方のガーゼに張り付け、脱水前の汚泥で薄く挟み込んだ。これを脱水機の給泥部に挿入し、排泥部で回収した。

サーモラベル 5S-65：65～85℃の5℃刻みで示温

サーモラベル 4E-50：50～65℃の5℃刻みで示温

サーモラベル 4E-70：70～85℃の5℃刻みで示温

採取した脱水汚泥は持ち帰ったのち直ちに誘出操作を行い、細菌試験は当日に、大腸菌ファージの試験はろ過滅菌しているため、後日測定した。

### 実験結果

#### 1. 室内実験

大腸菌を用いた実験結果を図2に示した(加熱後の菌数が0 CFU/100mLの場合は1 CFU/100mLとして生残率をプロット)。調製した大腸菌液の濃度は1mL当たり10の8～9乗オーダーであったが、これを昇温した4.5mLのリン酸希釈液に0.1mL添加したため、菌添

加後の試験管内の初期濃度 ( $N_0$ )は1mL当たり10の6～7乗オーダーであった。

60℃でも保持時間とともに不活化したが、30秒後で生残率( $=\log_{10}(N/N_0)$ )は-3log程度であった。しかし、65℃では急激に不活化が進み、5秒後で約-4logの生残

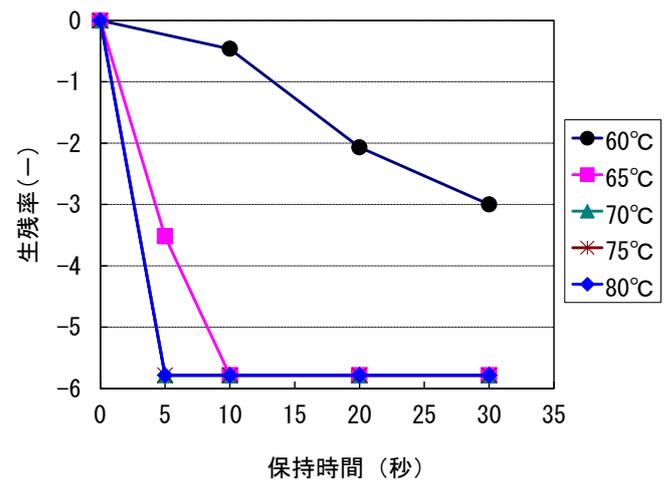


図2 大腸菌の熱不活化試験結果

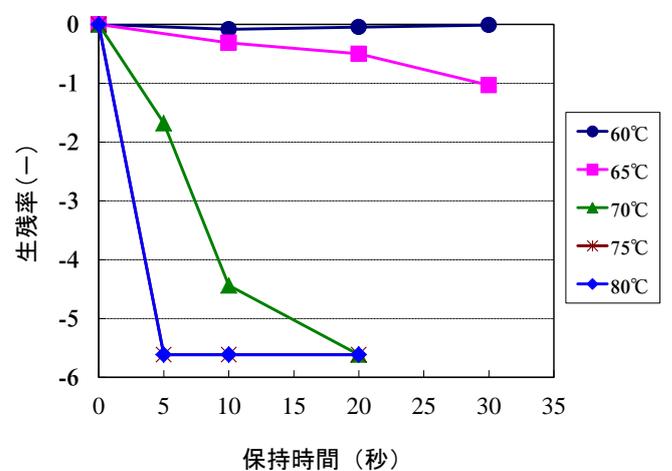


図3 腸球菌の熱不活化試験結果

率を示し、10 秒後以降では 0.1mL の試料液中では検出されなくなり、-6log 以下の生残率となった。同様に 70~80°C の 5 秒後でも検出されなかった。

腸球菌を用いた実験結果を図 3 に示した。培養した腸球菌液の濃度も 1mL 当たり 10 の 8 乗オーダーであり、菌添加時の試験管内の初期濃度 (N<sub>0</sub>) は 1mL 当たり 10 の 6~7 乗オーダーであった。

60°C では不活化はほとんど進まず、65°C でも 30 秒後で -1log の生残率であり、大腸菌に比べ熱耐性を有していた。しかし、75°C を超えると 5 秒で生残率は -5log より小さくなり、短時間で不活化が進んだ。

枯草菌を用いた実験結果を図 4 に示した。培養した枯草菌液の濃度は 1mL 当たり 10 の 8 乗オーダーであったが、菌添加時の試験管内の初期濃度 (N<sub>0</sub>) は 1mL 当たり 10 の 7 乗オーダーであった。

枯草菌は芽胞を形成するため耐熱性が強いとされ

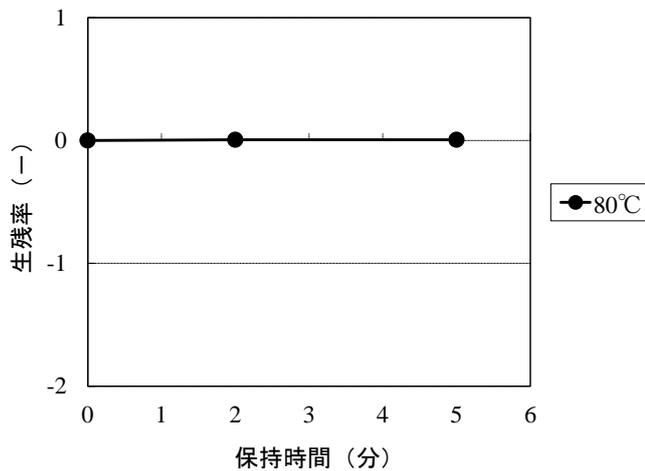


図 4 枯草菌の熱不活化試験結果

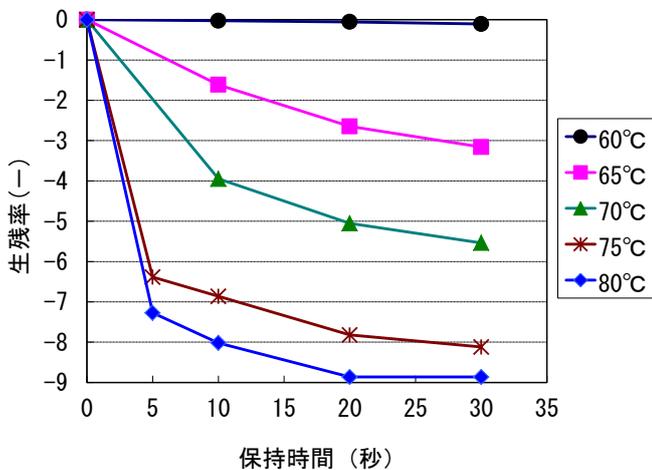


図 5 大腸菌ファージの熱不活化試験結果

ており、これを裏付けるように 80°C で 5 分の加熱でも不活化は認められなかった。

大腸菌ファージを用いた試験結果を図 5 に示した。ファージ添加時の試験管内濃度は 1mL 当たり 10 の 8 乗オーダーであった。60°C では不活化はほとんど進まず、65°C でも 30 秒後で -3log~-4log の生残率であり、大腸菌に比べ熱耐性を有していた。しかし、75°C を超えると 5 秒で生残率は -6log より小さくなり、短時間で不活化が進んだ。

## 2. フィールド実験

### 2.1 汚泥採取時の脱水污泥温度

脱水機の通常運転時の印加電圧 46V と、試験的に 50V に上昇させた時のサーモラベル写真を写真 2、写真 3 に示した。

46V 時では 55~60°C を示しており、50V 時では 1 種類のラベルは 65~70°C を、他方 (写真右側) は 80~85

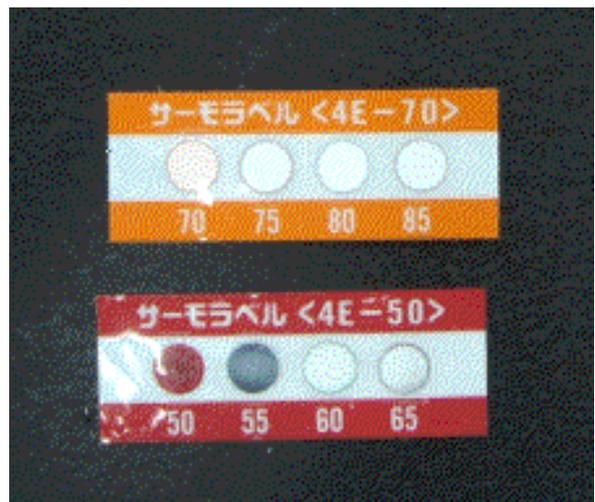


写真 2 46V 印加時のサーモラベルの示温

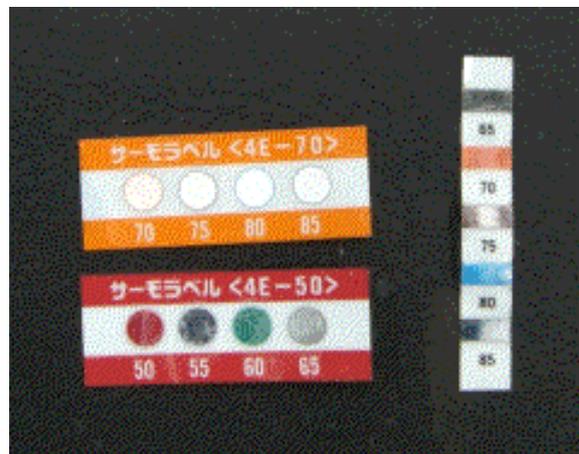


写真 3 50V 印加時のサーモラベルの示温

℃を示していた。これは脱水時に板状に排出される汚泥中に温度むらがあるのか、サーモラベルの熱応答速度の違いかは不明であった。

福島県内で稼働している同種の脱水機で、2009年に汚泥の温度測定を実施した時には75℃まで上昇していたが、本施設ではそれより温度は低かった。発熱は余剰汚泥中の有機物含有量によって左右されるとのことであった。

## 2.2 汚泥の含水率

脱水前の汚泥の含水率は85.9%であり、46V印加時で含水率71.8%、50V印加時で69.2%であった。

## 2.3 細菌数の変化

脱水前汚泥と通常運転時(46V)、および50Vに上昇させたときの汚泥誘出液中の菌数と、汚泥の含水率から換算した乾重量1gあたりに残存していた菌数を求め、表1に示した。

一般細菌数は脱水前汚泥1gに $2.7 \times 10^8$ 個存在していた。印加電圧50V時でも菌数は $1.4 \times 10^8$ 個と、ほとんど減少していなかった。

そこで、50V脱水時汚泥の誘出液で、菌数測定時の希釈倍率が最も高いシャーレに形成したコロニーを5個釣菌し、試験管に入った滅菌リン酸希釈液に懸濁させた。これをブロックヒーターに差し込み、80℃20分の加熱処理を行った。この処理液を再度標準寒天培地に塗抹したところ、20時間培養後に、加熱処理前と同様の形状で、粘りけのあるコロニーを形成した(写真4)。

このコロニーをAPI50 CHBキットで同定したところ、各チューブ番号の色の変化は表2の通りとなり、ID 99.9%で *Bacillus subtilis* (枯草菌) と同定された。

コリラートMPN法は36℃で20時間培養後、試料水が入った溶液が黄色に発色した場合(写真5)を大腸菌群陽性として、最確数を求める。同じ溶液にブラックライトを照射し、蛍光を発したものを大腸菌陽性(写真6)として、最確数を求める。

一方、大腸菌数は脱水前で1gあたり $1.1 \times 10^5$ 個を示したものの、脱水後の汚泥は写真7に示したように、大腸菌群陰性(黄色に発色せず)にもかかわらず、蛍光のみを発する(大腸菌陽性)という現象(写真8)が、希釈率の低い上位3段階の各5本すべてで生じた。そのため、本試料をコリラート法で大腸菌の不活化を評価することはできなかった。



写真4 80℃20分加熱処理液のコロニー

黄色に発色せず、蛍光のみを発した培養管液を標準寒天培地に塗抹し、1晩培養した。翌日、写真4と同様の形状で粘りけのあるコロニーが形成されたため、これを釣菌して同じコリラート法で測定したが、黄色の発色も蛍光も発しなかった。すなわち、枯草菌と考えられる菌が発色に関与したとは考えられなかった。蛍光を発した培養管には共通して希釈試料中の汚泥が沈殿しており、汚泥中に含まれている何らかの成分が発色に関与していると考えられた。

クロモカルト法では脱水前の大腸菌群数は1gあたり $2.7 \times 10^5$ 個であったが、46V時では $4.3 \times 10^3$ 個と、 $-2\log$ の不活化率を示した。50V時でも $6.5 \times 10^2$ 個残存し、不活化率は約 $-3\log$ であった。この結果はコリラートMPN法と異なるところがあり、測定方法による差がどのような菌種によってもたらされるか、今後の検討課題である。

脱水前の大腸菌数は1gあたり $1.3 \times 10^5$ 個であったが、46V時では $7.1 \times 10^3$ 個に減少し、50V時では検出されず、 $-5\log$ 以上の不活化率を示した。

## 2.4 大腸菌ファージ数の変化

これまで数回、脱水前の汚泥に関して大腸菌ファージ数の測定を行ったが、いずれも誘出液1mL中に10PFU未満しか測定されなかった。柿本<sup>6)</sup>は、し尿が流入主体の施設ではファージの検出数は少ないと報告している。

今回の実験では、脱水前の汚泥と脱水後の汚泥ともにファージは測定されず、不活化効果を評価することはできなかった。

表1 脱水汚泥の乾重量1g当たりの細菌数

試料	含水率	一般細菌数	コリラート法		クロモカルト法	
			大腸菌群数	大腸菌数	大腸菌群数	大腸菌数
脱水前	85.9%	$2.7 \times 10^8$	$4.7 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$
46 V	71.8%	$2.9 \times 10^8$	$1.2 \times 10^3$	偽発色	$4.3 \times 10^3$	$7.1 \times 10^3$
50 V	69.2%	$1.4 \times 10^8$	0	偽発色	$6.5 \times 10^2$	0

表2 API50 CHB キットの各チューブ番号の色の变化

チューブ番号	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
色の变化	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
チューブ番号	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
色の变化	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



写真5 コリラート MPN 法 (大腸菌群陽性呈色)

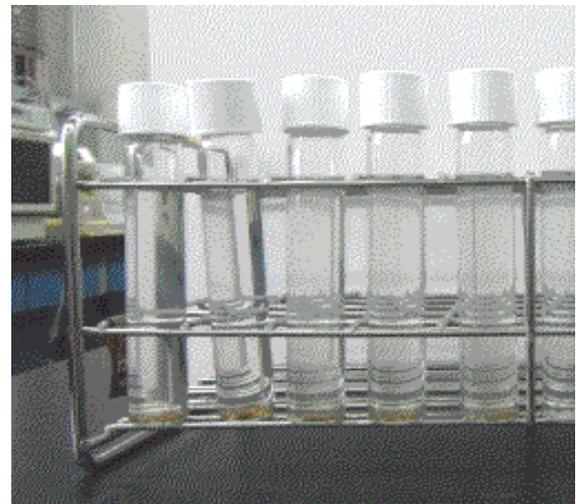


写真7 汚泥誘出液のコリラート試験 (発色なし)

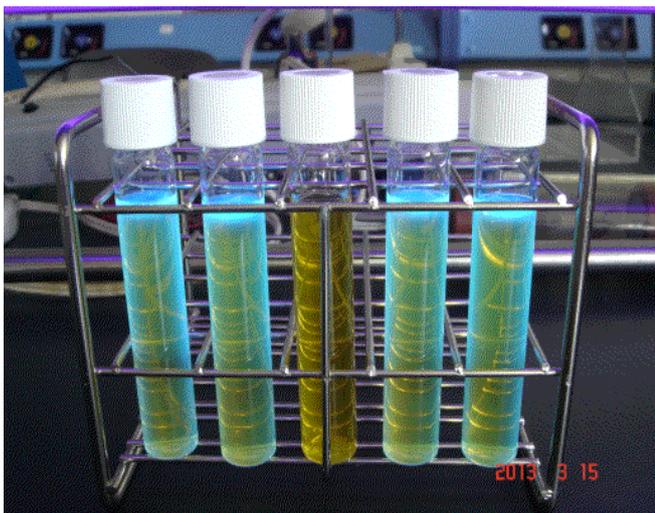


写真6 大腸菌陽性試験管 (蛍光を発する)

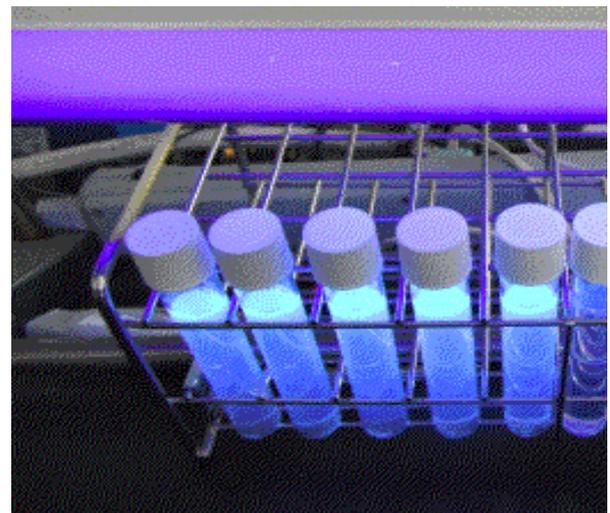


写真8 ブラックライト照射時

## まとめ

近年開発された電気浸透式汚泥脱水機は、高い脱水能力に加え処理過程内でジュール熱の発生により、汚泥の温度が上昇する。もし、余剰汚泥中に病原性微生物が含まれていた場合、この温度上昇によってこれらが不活化されるのではないかと考え、指標微生物として大腸菌、腸球菌、枯草菌と大腸菌に感染するウイルスである大腸菌ファージを用い、加熱温度と保持時間を変え室内実験で検討した。

大腸菌を用いた実験では、65℃、10秒の保持時間で-6logの生残率となっていることから、この方式の脱水機を用いた場合、大腸菌には有効な不活化処理が期待できることが示唆された。

腸球菌は大腸菌に比べ熱耐性を有しており、65℃で30秒の加熱でも、-1logの生残率に留まった。しかし、70℃では10秒で-4log以下、75℃では5秒で-5log以下の生残率になっており、本方式の脱水機で70℃を超える温度まで上昇すれば、微生物学的な安全性が高まることが期待された。

枯草菌は80℃、5分の加熱でも不活化されず、残存した。枯草菌は有機物に対する分解力の強さから、農業や生活の中で有害な微生物の不活化や分解に利用されるようになってきていることから、堆肥として利用する場合には残存することがむしろ好都合となる。

一方、ウイルスである大腸菌ファージは大腸菌に比べ熱耐性を有しており、生残率を-6logにするには70℃では30秒以上を必要としたが、75℃では5秒で達成されることから、本方式の脱水機は脱水時の温度上昇によってはウイルスの不活化にも効果があることが期待された。

大阪府内のし尿処理場で稼働している電気浸透式汚泥脱水機を対象に、脱水前後の汚泥中の微生物の不活化状況を検討した。

通常、脱水後の汚泥の含水率が70%になるよう印加電圧を調整しており、汚泥採取時は46Vに設定されていた。この時、汚泥の温度は55～60℃程度にしか上昇していなかったため、一時的に50Vまで上昇させ、併せて測定を行った。

標準寒天培地を用いた一般細菌の測定では、脱水前と脱水後とも乾重量1g当たり $10^8$ 個オーダー存在し、菌数の大きな変化は認められなかった。その原因の一

つとして、耐熱性の枯草菌がほとんどを占めていたからと考えられた。

大腸菌群と大腸菌は、特定酵素基質培地を用いたコリラートMPNキットと、クロモカルトコリフォーム寒天培地の2種類を用いて測定した。

脱水前の大腸菌群数はいずれの測定方法とも1g当たり $10^5$ 個存在しており、55～60℃程度の発熱で $10^3$ 個まで減少し、-2log程度の不活化率を示した。しかし、65～70℃程度の発熱では、コリラート法では検出されなかったが(-5log以上の不活化率)、クロモカルト法では $10^2$ 個残存(-3logの不活化率)した結果となった。

脱水前の大腸菌数は、いずれの測定方法とも1g当たり $10^5$ 個の存在を示した。脱水後試料のコリラート法では、大腸菌群の存在を示す黄色の発色を呈しないにもかかわらず、大腸菌の存在を示す蛍光を発した。この発色が何に起因するかは不明であったが、残存している主な菌は耐熱性の枯草菌であった。クロモカルト法では、65～70℃程度の発熱でも検出されなかった(-5log以上の不活化率)。

大腸菌ファージは脱水前汚泥でも誘出液1mL中に10PFU未満しか測定されず、不活化効果を評価することはできなかった。汚泥からの誘出率が低かったのか、元々存在量が少なかったのか、それを明らかにするまでには至らなかった。

感染症の流行等により、余剰汚泥中に病原性を有する微生物が高濃度に含有する恐れがある場合には、脱水機への印加電圧を調整し発熱温度をあげることにより、さらなる不活化効果を得ることができ、脱水汚泥を扱ったり再利用する際の安全性を高めることが期待される。

## 文献

- 1) 原本英司,片山浩之,大垣眞一郎: 下水処理場における病原ウイルスの低減効果の解明,水環境学会誌,32,315-320(2009)
- 2) 梨田 実,田中ひろみ,寺師政廣: 下水の処理過程における大腸菌ファージの消長について,用水と廃水,35,233-238(1993)
- 3) T.Watanabe,D.Sano and T.Omura: Risk evaluation for pathogenic bacteria and viruses in sewage sludge compost, Water Science and Technology ,46,325-330(2002)

- 4) 青井 透,宮里直樹 : バチルス菌優占連作障害抑止型土壌改良材の試作と実農地への適用,平成 19 年度土木学会学術講演会講演集 (広島,2007)
- 5) 金 台東,本田裕之,白神直弘,矢野一好,海野 肇 : 活性汚泥に移行したポリオウイルスの誘出条件について,水環境学会誌,17,509-516 (1994)
- 6) 柿本明紘 : 大腸菌ファージをウイルス指標にした浄化槽内でのウイルス活動形態,第 26 回全国浄化槽技術研究集会講演集 (岩手,2012)

## 大阪府における環境および食品中放射能調査

## (平成 25 年度報告)

肥塚 利江\* 東 恵美子\*  
足立 伸一\*

平成 25 年度の原子力規制庁委託（文部科学省より業務移管）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、降水中の全ベータ放射能測定、環境試料（降水物、大気浮遊じん、上水、海水、土壌、海底土）および各種食品試料中のガンマ線放出核種分析および空間放射線量率（モニタリングポスト）について実施した。

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に伴い、3 ヶ月ごとの蛇口水のガンマ線放出核種分析および 1 ヶ月ごとの地上 1 m におけるサーベイメータによる空間放射線量率の測定を引き続き行った。

**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

**Key words**: environmental radioactivity, gross  $\beta$  activity, radionuclide analysis, environmental  $\gamma$  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、人工放射性降水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、主として原子力規制庁の委託（本年度より文部科学省から業務移管）によるものである。

降水（雨水）については全ベータ放射能測定、その他の環境試料および食品試料についてはガンマ線核種分析 [セシウム 134 ( $^{134}\text{Cs}$ ) , セシウム 137 ( $^{137}\text{Cs}$ ) , ヨウ素 131 ( $^{131}\text{I}$ ) , カリウム 40 ( $^{40}\text{K}$ ) 等] を行った。

また、モニタリングポストによる空間放射線量率調査を行った。なお、モニタリングポストに関しては、平成 24 年度より、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て増設された 5 ヶ所（茨木市、寝屋川市、東大阪市、富田林市、泉佐野市）に既

設の大阪市を加えた 6 ヶ所において調査を行っている。

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 ヶ月間貯水したもののガンマ線核種分析、毎月第 2 週の水曜日にサーベイメータによる地上 1 m における空間放射線量率調査を行った。

本報告では、平成 25 年度に実施した上記の放射能調査結果を、過去の測定結果との比較も含め報告する。

## 実験方法

試料の採取、処理および測定は、「環境放射能水準調査委託実施計画書（平成 25 年度）」<sup>1)</sup> に基づいて行った。表 1 に調査項目および試料等を示す。

\* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture  
(Fiscal 2013 Report)

by Toshie HIZUKA, Emiko AZUMA and Shin-ichi ADACHI

表1 放射能調査項目および試料等

調査項目	試料名	種別	採取場所	採取回数等	件数
全ベータ放射能	定時降水	雨水	大阪市東成区 当所屋上	降雨毎	82
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(6月)	1
		蛇口水	大阪市東成区 当所本館1F	年1回(6月)	1
	海水	表面水	大阪港入口	年1回(7月)	1
	海底土	表層	大阪港入口	年1回(7月)	1
	土壌	0~5cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(7月)	1
		5~20cm	大阪市中央区 大阪城公園内	年1回(7月)	1
	牛乳	原乳(生産地)	大阪府羽曳野市	年1回(8月)	1
	野菜	タマネギ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(7月)	1
		キャベツ(生産地)	大阪府泉南郡熊取町	年1回(1月)	1
	相互比較分析試料 (標準試料)	模擬牛乳	(財)日本分析センターで調製	年1回(8月)	1
		模擬土壌	(財)日本分析センターで調製	年1回(8月)	1
寒天		(財)日本分析センターで調製	年1回(8月)	5	
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
空間線量率	モニタリングポスト		大阪市東成区 当所屋上	毎日/年間	365
			茨木市大住町 茨木保健所	毎日/年間	365
			寝屋川市八坂町 寝屋川保健所	毎日/年間	365
			東大阪市西岩田 東大阪市環境衛生検査センター	毎日/年間	365
			富田林市寿町 富田林保健所	毎日/年間	365
			泉佐野市羽倉崎 市立佐野中学校	毎日/年間	365
	モニタリング強化 (福島第1原発事故)	サーベイメータ		大阪市東成区 当所中庭	毎月

## 1. 全ベータ放射能測定

### 1-1 降水(雨水)試料

当所(大阪府立公衆衛生研究所:大阪市東成区)観測室屋上(地上約20m)に設置したデポジットゲージ(表面積1000cm<sup>2</sup>)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。

### 1-2 測定方法

試料100mLにヨウ素担体(1mg I<sup>-</sup>/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(U<sub>3</sub>O<sub>8</sub>:日本アイソトープ協会製, 35.3dps)を用いた。測定は試料採取6時間後に行った。測定時間は、比較試料5分、降水試料30分とした。

## 2. 核種分析

### 2-1 測定試料

(1) **大気浮遊じん**: 当所観測室屋上(地上約20m)に設置したハイボリウム・エアサンプラー(紀本電子工業製, 121型または、柴田科学社製, HV-1000R)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10000m<sup>3</sup>)とした。

(2) **降下物(雨水・ちり)**: 当所観測室屋上(地上約20m)に設置した水盤(表面積5000cm<sup>2</sup>)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(柴田理化工機製)を用いて蒸発濃縮した。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固した後、残留物をU-8容器に移し測定用試料とした。

(3) **上水**: 原水(淀川河川水)は大阪府庭窪浄水場(守口市)原水取水口から、蛇口水は当所本館1階実験室内蛇口から採取した。採取試料各100Lを上水自動濃縮装置を用いて蒸発濃縮した。濃縮物を蒸発皿に移して蒸発乾固した後、残留物をそれぞれU-8容器に移し測定用試料とした(時期および測定数は表1を参照)。

(4) **食品**: 牛乳は、2Lを直接マリネリビーカー(2L容)に入れ測定用試料とした。野菜類は食用部約4kgを80℃の乾燥器で乾燥後、それぞれ石英製容器に移して電気炉(450℃)で灰化した。灰試料を0.35mmメッシュのふるいを通し、U-8容器に移して測定用試料とした(試料採取場所、時期および測定数は表1を参照)。

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

入れ、測定用試料とした（試料採取場所、時期および測定数は表 1 を参照）。

**(6) 標準試料法による相互比較分析：**（財）日本分析センターが数核種を添加して調製した放射能標準容積線源（寒天）（以下「寒天」という）および放射能標準容積線源（模擬土壌（アルミナ））（以下「模擬土壌」という）ならびに分析比較試料（模擬牛乳）（以下「模擬牛乳」という）について、寒天（U-8 容器：5 試料）および模擬土壌（U-8 容器：1 試料）は U-8 容器のまま、また、模擬牛乳（1 試料）は全量（2L）を直接マリネリピーカー（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）と比較し、評価を行った。評価は、当所（分析機関）の分析値と基準値の拡張不確かさ（ $U$ ）から  $En$  数を算出し、 $|En| \leq 1$  を基準値内（基準値と一致）とした。なお、 $En$  数は下記の式により求められる。

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

## 2-2 測定方法

あらかじめエネルギーの異なる核種を含んだ標準線源を用いてエネルギー校正および検出効率校正を行ったゲルマニウム半導体検出器（キャンベラ製 GC2018）を用い、試料中の核種より放出されるガンマ線量を測定した。測定時間は原則 80000 秒とし、寒天のみ 20000 秒から 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（ $^{134}\text{Cs}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{131}\text{I}$  および  $^{40}\text{K}$  等）の定性定量分析を行った。

## 3. 空間放射線量率測定

モニタリングポスト（NaI シンチレーション式、エネルギー補償型、アロカ製 MAR-22 型）による空間放射線量率は、当所観測室屋上に設置したポスト（地上約 20m）、および、その他の 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）。結果は、メモリーカードから 1 時間平均値による 1 日の変動を読み取った。

なお、モニタリングポスト 6 基の測定結果は、自動

測定・配信システムにより 10 分間の平均値が原子力規制委員会のホームページでリアルタイム公表されている（<http://radioactivity.nsr.go.jp/map/ja/>）。

## 4. 福島第 1 原子力発電所の事故によるモニタリング強化

### 4-1 ゲルマニウム半導体検出器を用いた核種分析

#### (1) 測定試料

**1) 上水（蛇口水）：**平成 24 年 1 月以降、土日祝日を除く平日に毎日、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。

#### (2) 測定方法

2-2 と同様の方法でガンマ線核種分析を行った。測定時間は 80000 秒とした。

### 4-2 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）」<sup>2)</sup> 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（現、原子力規制庁）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。

## 結果および考察

### 1. 全ベータ放射能

表 2 に降水中の全ベータ放射能測定値を示す。

降水中の全ベータ放射能は、82 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。

### 2. 核種分析

環境試料および食品試料中の  $^{134}\text{Cs}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{131}\text{I}$  および  $^{40}\text{K}$  の分析結果を表 3 に示す。なお、それ以外の人工放射性核種は検出されていない。

**(1)  $^{134}\text{Cs}$  および  $^{137}\text{Cs}$ ：**今年度も例年同様、 $^{137}\text{Cs}$  が土壌、海底土の各試料から検出されたが、そのレベルは過去の値と同程度であった。 $^{134}\text{Cs}$  は、どの試料からも検出

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	降下量 MBq/km <sup>2</sup>
平成25年 4月	101	6 (0)	ND	ND
平成25年 5月	47	5 (0)	ND	ND
平成25年 6月	264	6 (0)	ND	ND
平成25年 7月	46	8 (1)	ND ~ 0.31	0.32
平成25年 8月	122	3 (0)	ND	ND
平成25年 9月	263	6 (0)	ND	ND
平成25年 10月	198	8 (0)	ND	ND
平成25年 11月	78	7 (1)	ND ~ 0.32	0.75
平成25年 12月	49	8 (2)	ND ~ 0.90	2.4
平成26年 1月	56	8 (1)	ND ~ 0.35	1.0
平成26年 2月	52	7 (2)	ND ~ 0.87	4.6
平成26年 3月	148	10 (1)	ND ~ 0.30	4.0
平成25年度	1424	82 (8)	ND ~ 0.90	13.1
過去3年間の値				
平成22年度	1436	78 (13)	ND ~ 0.7	36.9
平成23年度 <sup>1)</sup>	1637	17 (2)	ND ~ 0.5	17.1
平成24年度 <sup>2)</sup>	1473	81 (8)	ND ~ 1.1	47.8

ND: 計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

1): 福島第1原子力発電所事故に伴うモニタリング強化のため、平成23年4月～12月まで休止。  
2): 北朝鮮核実験に伴うモニタリング強化のため、平成25年2月13日～22日まで休止。

されなかった。

(2) <sup>131</sup>I : <sup>131</sup>I は、上水原水および蛇口水試料から微量（それぞれ 3.8 および 0.63mBq/L）検出された。他の環境試料および食品試料からは検出されなかった。上水中の <sup>131</sup>I については、原水が平成元年度から上水が平成2年度から検出されており、そのレベルも過去の値（原水：0.4～4.9、蛇口水：0.4～1.4mBq/L）<sup>3-13)</sup>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、その起源は医学利用によるものであろうと推定される。

なお、上水中に存在する <sup>131</sup>I による府民への健康影響については、そのレベルは「飲食物の摂取制限に関する指標<sup>14)</sup>」（飲料水中 <sup>131</sup>I 濃度：300Bq/kg 以上）の30万分の1程度の低値であり、問題はないと考えられる。

(3) <sup>40</sup>K : 天然放射性核種である <sup>40</sup>K レベルは過去の値と同程度であり、特に異常値は認められなかった。

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

試料	採取年月日	単位	<sup>134</sup> Cs	<sup>137</sup> Cs	<sup>131</sup> I	<sup>40</sup> K
大気浮遊じん						
平成25年 4月～6月	H25.4.2 ~ H25.6.18	mBq/m <sup>3</sup>	ND	ND	ND	0.23 ± 0.033
7月～9月	H25.7.2 ~ H25.9.18	〃	ND	ND	ND	0.19 ± 0.032
10月～12月	H25.10.2 ~ H25.12.17	〃	ND	ND	ND	0.30 ± 0.039
平成26年 1月～3月	H26.1.7 ~ H26.3.18	〃	ND	ND	ND	0.22 ± 0.040
平成25年度		mBq/m <sup>3</sup>	ND	ND	ND	0.19 ~ 0.30
過去3年間の値		mBq/m <sup>3</sup>	ND ~ 0.63	ND ~ 0.68	ND ~ 0.016	ND ~ 0.32
降下物						
平成25年4月	H25.4.1 ~ H25.5.2	MBq/km <sup>2</sup>	ND	ND	ND	0.93 ± 0.20
平成25年5月	H25.5.2 ~ H25.5.31	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年6月	H25.5.31 ~ H25.7.1	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年7月	H25.7.1 ~ H25.8.2	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年8月	H25.8.2 ~ H25.8.30	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年9月	H25.8.30 ~ H25.10.1	〃	ND	ND	ND	0.70 ± 0.19
平成25年10月	H25.10.1 ~ H25.11.1	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年11月	H25.11.1 ~ H25.12.2	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年12月	H25.12.2 ~ H26.1.6	〃	ND	ND	ND	ND
平成26年1月	H26.1.6 ~ H26.2.3	〃	ND	ND	ND	ND
平成26年2月	H26.2.3 ~ H26.3.3	〃	ND	ND	ND	ND
平成26年3月	H26.3.3 ~ H26.4.1	〃	ND	ND	ND	ND
平成25年度		MBq/km <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND ~ 0.93
過去3年間の値		MBq/km <sup>2</sup>	ND ~ 8.3	ND ~ 7.9	ND	ND ~ 1.9

ND: 計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

表3(続き) 環境および食品試料中の<sup>134</sup>Cs、<sup>137</sup>Cs、<sup>131</sup>Iおよび<sup>40</sup>K濃度

試料	採取年月日	単位	<sup>134</sup> Cs	<sup>137</sup> Cs	<sup>131</sup> I	<sup>40</sup> K
上水 原水	H25.6.10	mBq/L	ND	ND	3.8 ± 0.19	96 ± 2.8
過去3年間の値		mBq/L	ND ~ 0.33	ND ~ 0.23	0.55 ~ 1.4	70 ~ 80
上水 蛇口水	H25.6.18	mBq/L	ND	ND	0.63 ± 0.11	71 ± 2.4
過去3年間の値		mBq/L	ND	ND	ND	60 ~ 76
上水・蛇口水 (モニタリング強化)						
平成25年 4月~6月	H25.4.1 ~ H25.6.28	mBq/L	ND	ND	ND	76 ± 2.6
7月~9月	H25.7.1 ~ H25.9.30	"	ND	ND	ND	84 ± 2.6
10月~12月	H25.10.1 ~ H25.12.27	"	ND	ND	ND	75 ± 2.6
平成26年 1月~3月	H26.1.6 ~ H26.3.31	"	ND	ND	ND	69 ± 2.5
平成25年度		mBq/m <sup>3</sup>	ND	ND	ND	69 ~ 84
過去(平成24年度)の値		mBq/m <sup>3</sup>	ND	ND	ND	64 ~ 73
海水	H25.7.2	Bq/L	ND	ND	ND	4.7 ± 0.37
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	3.8 ~ 5.4
海底土	H25.7.2	Bq/kg dry	ND	2.1 ± 0.25	ND	670 ± 12
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	2.0 ~ 2.4	ND	620 ~ 670
土壌	H25.7.24	Bq/kg dry	ND	2.0 ± 0.20	ND	650 ± 10
0~5cm層		(MBq/km <sup>2</sup> )	(ND)	(85 ± 8.8)	(ND)	(28000 ± 450)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	0.83 ~ 1.3	ND	670 ~ 720
		(MBq/km <sup>2</sup> )	(ND)	(46 ~ 62)	(ND)	(32000 ~ 40000)
土壌	H25.7.24	Bq/kg dry	ND	3.5 ± 0.25	ND	670 ± 10
5~20cm層		(MBq/km <sup>2</sup> )	(ND)	(530 ± 37)	(ND)	(100000 ± 1600)
過去3年間の値		Bq/kg dry	ND	2.8 ~ 3.1	ND	660 ~ 700
		(MBq/km <sup>2</sup> )	(ND)	(450 ~ 520)	(ND)	(110000 ~ 110000)
牛乳 原乳	H25.8.21	Bq/L	ND	ND	ND	48 ± 0.94
過去3年間の値		Bq/L	ND	ND	ND	48 ~ 49
農産物 タマネギ	H25.7.12	Bq/kg生	ND	ND	ND	42 ± 0.34
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	41 ~ 45
農産物 キャベツ	H26.1.14	Bq/kg生	ND	ND	ND	95 ± 0.57
過去3年間の値		Bq/kg生	ND	ND	ND	72 ~ 81

ND: 計数値がその計数誤差の3倍を下回るもの

(3) 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<sup>15)</sup>によると、当所の分析結果は、基準値(添加値)とよく一致しており、かつ、En数も「1」以下であり、ガンマ線核種分析の精度は確保されている事が認められた。

### 3. 空間放射線量率

モニタリングポストによる空間放射線量率調査の結果を表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41~63 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53~88

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、70~92 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、75~112 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、60~82 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、48~77 nGy/hの範囲であった。

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25年 4月	30	54	41	43
同 5月	31	55	41	43
同 6月	30	57	41	43
同 7月	31	51	41	42
同 8月	31	63	41	43
同 9月	30	54	41	43
同 10月	31	49	41	43
同 11月	30	62	42	44
同 12月	31	60	42	43
平成26年 1月	31	56	41	43
同 2月	28	51	41	43
同 3月	31	58	41	43
平成25年度	365	63	41	43
過去3年間の値				
平成22年度	365	61	40	43
平成23年度	366	66	41	43
平成24年度	365	71	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 茨木保健所: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25年 4月	30	73	55	57
同 5月	31	73	55	58
同 6月	30	81	54	58
同 7月	31	76	54	58
同 8月	31	72	55	58
同 9月	30	69	53	56
同 10月	31	63	55	57
同 11月	30	88	55	57
同 12月	31	78	55	57
平成26年 1月	31	71	54	57
同 2月	28	65	53	56
同 3月	31	78	54	57
平成25年度	365	88	53	57
過去の値				
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25年 4月	30	86	71	73
同 5月	31	84	71	72
同 6月	30	91	71	73
同 7月	31	91	70	72
同 8月	31	91	71	73
同 9月	30	91	70	72
同 10月	31	79	71	73
同 11月	30	88	71	73
同 12月	31	92	71	72
平成26年 1月	31	84	71	72
同 2月	28	87	71	72
同 3月	31	90	70	72
平成25年度	365	92	70	72
過去の値				
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25年 4月	30	97	77	79
同 5月	31	95	77	79
同 6月	30	100	77	80
同 7月	31	94	77	79
同 8月	31	112	77	79
同 9月	30	90	75	78
同 10月	31	86	76	79
同 11月	30	106	76	79
同 12月	31	103	77	78
平成26年 1月	31	95	77	79
同 2月	28	91	75	78
同 3月	31	99	76	78
平成25年度	365	112	75	79
過去の値				
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25年 4月	30	80	62	64
同 5月	31	74	62	63
同 6月	30	81	62	64
同 7月	31	72	61	63
同 8月	31	73	62	64
同 9月	30	71	61	63
同 10月	31	71	62	63
同 11月	30	78	62	64
同 12月	31	82	62	63
平成26年 1月	31	79	62	63
同 2月	28	72	60	63
同 3月	31	82	62	64
平成25年度	365	82	60	63
過去の値				
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25年 4月	30	71	49	51
同 5月	31	64	50	51
同 6月	30	74	49	52
同 7月	31	58	49	51
同 8月	31	66	49	52
同 9月	30	69	49	51
同 10月	31	61	49	51
同 11月	30	75	49	51
同 12月	31	77	49	51
平成26年 1月	31	76	49	51
同 2月	28	65	48	51
同 3月	31	72	49	51
平成25年度	365	77	48	51
過去の値				
平成24年度	365	94	49	51

#### 4. 福島第1原子力発電所の事故によるモニタリング強化

##### (1) 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。

##### (2) 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74～88nGy/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。

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25年 4月	1	78
同 5月	1	80
同 6月	1	79
同 7月	1	76
同 8月	1	74
同 9月	1	78
同 10月	1	88
同 11月	1	78
同 12月	1	74
平成26年 1月	1	76
同 2月	1	77
同 3月	1	80
平成25年度	12	78
過去の値		
平成24年度	12	72～87(平均:79)
平成8～20年度	156	77～108(平均:92)

### ま と め

核種分析により人工放射性核種である<sup>131</sup>I及び<sup>137</sup>Csが検出された。医学利用等に由来すると考えられる<sup>131</sup>Iは上水（原水および蛇口水）に極低レベルで検出された。<sup>137</sup>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。

### 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原子力規制庁監視情報課放射線環境対策室、日本分析センター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。

注：本報告は、電源開発促進対策特別会計法に基づく原子力規制庁からの受託事業として、大阪府立公衆衛

生研究所が実施した平成25年度「環境放射能水準調査」の成果です。

### 文 献

- 1) 原子力規制庁 監視情報課放射線環境対策室：環境放射能水準調査委託実施計画書、平成25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) 肥塚利江，渡邊 功：大阪府における環境および食品中放射能調査（平成14年度報告），大阪府立公衛研所報，第41号，51-58（2003）
- 4) 肥塚利江，渡邊 功：大阪府における環境および食品中放射能調査（平成15年度報告），大阪府立公衛研所報，第42号，77-83（2004）
- 5) 肥塚利江，安達史恵，渡邊 功：大阪府における環境および食品中放射能調査（平成16年度報告），大阪府立公衛研所報，第43号，93-99（2005）
- 6) 肥塚利江，安達史恵，渡邊 功：大阪府における環境および食品中放射能調査（平成17年度報告），大阪府立公衛研所報，第44号，31-39（2006）
- 7) 味村真弓，肥塚利江，渡邊 功：大阪府における環境および食品中放射能調査（平成18年度報告），大阪府立公衛研所報，第45号，15-22（2007）
- 8) 肥塚利江，味村真弓，渡邊 功：大阪府における環

- 境および食品中放射能調査（平成 19 年度報告）,  
大阪府立公衛研所報, 第 46 号, 27-33 (2008)
- 9) 味村真弓, 肥塚利江, 渡邊 功: 大阪府における環  
境および食品中放射能調査（平成 20 年度報告）,  
大阪府立公衛研所報, 第 47 号, 53-59 (2009)
- 10) 肥塚利江, 味村真弓, 足立伸一: 大阪府における  
環境および食品中放射能調査（平成 21 年度報告）,  
大阪府立公衛研所報, 第 48 号, 33-39 (2010)
- 11) 東恵美子, 肥塚利江, 大山正幸, 味村真弓, 足立  
伸一: 大阪府における環境および食品中放射能調  
査（平成 22 年度報告）,大阪府立公衛研所報, 第  
49 号, 24-30 (2011)
- 12) 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 50 号, 30-37  
(2012)
- 13) 東恵美子, 肥塚利江, 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 24 年度報告）, 大  
阪府立公衛研所報, 第 51 号, 34-41 (2013)
- 14) 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)
- 15) 公益財団法人日本分析センター: 標準試料法によ  
る相互比較分析（機器校正）, 25R27, 平成 26 年 3  
月

# 「第 17 回一日体験講座」レポート

## —楽しい科学実験の構築に向けて—

阿久津和彦<sup>\*1</sup>      清田恭平<sup>\*1</sup>      吉田俊明<sup>\*2</sup>  
木村明生<sup>\*2</sup>      梶村計志<sup>\*1</sup>      尾花裕孝<sup>\*3</sup>

平成 25 年 10 月に、大阪市立環境科学研究所がこれまで実施してきた市民向け一日体験講座に共同参加する機会を得た。今後の当所における参考情報として、今回の体験講座の概要をまとめた。

キーワード：着色料、タール色素、毛糸染色、薄層クロマトグラフィー

Keywords: food colors, coal-tar colors, wool dyeing, thin-layer chromatography

大阪市立環境科学研究所(環科研)では、以前から、市民や学生など様々な層を対象とした参加型の実習、観察会、環境調査、講座、教室等の数多くの企画を実施してきている。一日体験講座は、簡単な実験を通じて市民に研究所の業務と役割を身近に感じてもらうことを目的として、17 年前から毎年の実施を定着させている参加型企画の一つである。

当所(公衛研)では、市民向けの参加型企画の実施経験がこれまでなかったが、昨年、環科研が実施してきた一日体験講座に初めて共催の形で参加する機会を得た。実験室や実験資材・器具類の提供等、環科研からの全面的支援により実現した今回の取り組みは、環科研にこれまでに蓄積された講演と参加型実習の複合形式手法、内容設定、時間配分、配布資料の作成方法、受付等の手順、進行方法と役割分担、アンケート実施方法等に関する様々なノウハウを得る機会ともなった。今後、当所において市民向けの参加型企画に取り組む際の参考とするため、今回の一日体験講座への参加で得られた情報等を整理した。

## 方法

### 1. 開催日時および場所

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

<sup>\*2</sup> 大阪府立公衆衛生研究所 企画総務部 企画調整課

<sup>\*3</sup> 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Report of 17th one-day workshop — toward the development of enjoyable science experiments

by Kazuhiko AKUTSU, Kyohei KIYOTA, Toshiaki YOSHIDA, Akio KIMURA, Keiji KAJIMURA, and Hirota OBANA

開催日時、場所、時間配分は全て環科研が企画・決定した。今回の体験講座は、平成 25 年 10 月 26 日(土)の 13 時～16 時に環科研にて開催された。環科研が A コース「測ってみよう! 果汁のビタミン C」、公衛研が B コース「食品中の天然色素と合成色素の違いを確認してみよう」を担当した。12 時半～13 時が受付時間、13 時～14 時が環科研の所長挨拶および両コース合同での講義、14 時～16 時が実習という時間配分であった。

### 2. 対象者

対象者および申込・受付方法については環科研が設定して関連作業を実施した。高校生以上の一般市民を対象として参加者を募集した。開催日の約 4 ヶ月前から両組織関連のホームページ、広報誌、メルマガ等で体験講座の開催を告知した。受入数は各コース 20 名までとし、希望者が 20 名を超過した場合は、申込順ではなく抽選方式により参加者を決定することとした。

### 3. スタッフ

B コースでは、体験講座当日の講義および実験操作のデモンストレーションを担当する講師スタッフ 1 名の他、会場設営準備や各班の実験補助を担当するサポートスタッフ 5 名を含む計 6 名のチーム編成で体験講座に臨んだ。今回の講師スタッフは食品化学課員(食品安全室グループリーダー)が担当した。サポートスタッフの内訳は、食品化学課・企画調整課から各

2名（うち2名は課長）および衛生化学部長であり、比較的年齢層の高い人員構成であった。

#### 4. 試料

市販品の2銘柄の粒チョコレートを用いた。これらの製品はいずれも着色コーティングされており、一方の製品（A社、7色）は天然色素、もう一方の製品（B社、6色）は合成色素が使用されている。体験講座では、各班にこれらの製品を未開封状態で1包装単位ずつ配布した。A社の製品から桃色の粒チョコレートを除くと、2社の製品に含まれる粒チョコレートの色の種類は、いずれも近似的に「茶・赤・橙・黄・緑・青」の6色に分類可能である。これらの6色の粒チョコレートを色別に2銘柄の製品から取り分けて計12種類の試料とした。

また、天然色素に関連する追加実験素材として、ブルーマロウ（ウスベニアオイ）乾燥ハーブを用意した。

#### 5. 試薬類

酢酸、25%アンモニア水、エタノール、メタノール、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウムは和光純薬工業製または関東化学製の試薬一級または同等以上のグレードの製品を用いた。また、試薬調製と試料抽出用の水にはイオン交換水を用いた。食用赤色40号（赤40）、食用黄色4号（黄4）、食用黄色5号（黄5）、食用青色1号（青1）は、日本公定書協会製の食品添加物公定書標準品を用いた。これらの標準品を水/メタノール（1:1）に溶解・混合して各0.25 mg/mLの濃度としたものを合成色素の混合標準溶液とした。

薄層クロマトグラフィー（TLC）用のC18プレートは、メルクミリポア製のRP-18F<sub>254S</sub>アルミプレートを各辺10 cmの正形状になるようにカッターで切り取って用いた。TLC展開条件の事前検討や体験講座でのスポットティングの練習には、上記プレートをさらに短冊状（1 cm×10 cm）に切り取ったものを用いた。染色実験用の毛糸は、脱脂・乾燥処理を行った東洋紡製の羊毛毛糸（中細、白色）を約15 cmずつの長さに切り取ったものを用いた。

#### 6. 装置・器具

溶液加熱用のホットプレート調理器およびTLCプレート乾燥用のヘアドライヤーは汎用品を用いた。色素の粗抽出操作には使い捨ての紙コップを用いたが、その他の器具類は理化学実験用の製品を用いた。

#### 7. TLC展開条件の検討

体験講座に備えて、劇物の有機溶媒を使用せずに4種類の酸性タール色素（黄4、黄5、赤40、青1）を分離判別できる展開条件を事前検討した。短冊状に切り取った計12枚のC18プレートの下端2 cmの位置に合成色素の混合標準溶液をスポットティングした。各プレートについて、4通りの比率（2:3、1:2、2:5、1:3）でエタノールと水、またはエタノールと無機塩の水溶液（1%硫酸ナトリウム溶液または5%塩化ナトリウム溶液）を混合した溶液を用いて、アルミホイルで密封した10 mL容の試験管内で35分間展開した後、各色素の分離状況を観察した。

#### 8. 体験講座の目的と概要

Bコースでは、講義および実習を通じて食品中の着色料やその初歩的な定性検査技術について理解を深めてもらうと共に、研究所職員との直接的な交流を通じて市民に研究所を身近に感じてもらうことを目的とした。

講義では、配布資料とスライドを用いて、着色料に関する基礎知識および今回の実習の流れと注意事項について約20分間解説した。

実習では、まず、食品試料から抽出した天然色素と合成色素を用いて酸性条件下で毛糸染色を行い、毛糸の染まり具合を比較して天然色素と合成色素の性質の違いを確認した。次に、染色した毛糸をアルカリ性溶液中で加熱して合成色素を抽出し、毛糸に対する合成色素の挙動が液性（pH）によって異なることを確認した。さらに、濃縮した抽出液を逆相TLCに供して、試料に含まれる合成色素の種類を判別した。判別結果から、B社の6色の粒チョコレートのコーティングが、包装表示通りの4種類の合成色素の組み合わせにより調色されていることを確認した。

簡単な追加実験として、アントシアニン系の天然色素を含む乾燥ハーブを水抽出して、液性の違いにより、抽出液の色調が変化することを確認した。

#### 9. アンケート調査

アンケート調査は環科研が企画して実施した。参加者にアンケート用紙を配布して、講義と実習のわかりやすさ、内容の良否、今回参加したきっかけ、その他自由意見を回答してもらい、実習終了後に用紙を回収して後日回答を集計した。参加したきっかけと自由意見以外の設問については5段階評価の選択肢から一つを選んで回答する形式であった。環科研が実施した

アンケート結果についてグラフ化および点数化を行った。

## 結果および考察

### 1. TLC 展開条件の検討

TLC を用いた酸性タール色素の定性検査では、TLC 展開溶媒として、順相系では酢酸エチルとメタノール、逆相系ではアセトニトリルとメタノールを含有する混合溶液が使用されることが多い。一方、これらはいずれも劇物指定の有機溶媒であり、市民向けの体験講座での使用は避けたいところである。そこで今回、市民向け体験講座での利用を前提とした、劇物を使用しない安全性の高い TLC 条件の検討を行った。

文献調査を行ったところ、C18 プレートおよびエタノール/硫酸カリウム水溶液を展開溶媒として用いる逆相 TLC で酸性タール色素の分離を試みた海外の報告例があった<sup>1)</sup>。当所の検査で使用している TLC 条件と比較すると、各色素のスポット形状や分離は全体的に良くないものの、エタノールと水溶液のみのシンプルな組成の展開溶媒であり、安全性や簡便性の観点から有望な条件であるので、この条件を参考に検討を行った。

その結果、単純にエタノールと水を混合しただけの展開溶媒では、対象とする 4 種類の酸性タール色素（黄 4、黄 5、赤 40、青 1）の分離が良くないが、塩化ナトリウム等の無機塩類を溶解することにより、分離が良くなることが分かった。また、塩化ナトリウムは食塩成分として一般的な認知度が高く、水に容易に溶解するので、体験講座での使用に適していると考えられた。検討の結果、C18 プレートおよびエタノール/5%塩化ナトリウム溶液（1：2）を用いることで、上記 4 種類の色素を良好に分離判別できることが分かった。そこで、この展開条件を体験講座で使用することにした。

### 2. 体験講座の実施

前日に台風 27 号が近畿地方南部を通過しており、参加者数の減少が懸念されたが、幸いに当日は天候も良く、当日の参加キャンセルは 3 名のみに留まった。

まず、本館の会議室で A コースおよび B コースの参加者に対して合同で両コースの講義を行った。その後、別棟の附設栄養専門学校の実験室に移動し、B コースの 17 名の市民参加者を 3 名または 4 名ずつ、5 つの班に分けて実習を行った（図 1）。実験室内の 3

つの実験台を、半面ずつ計 6 つのスペースに分け、中央の 1 スペースを講師スタッフが単独で使用した。残りの 5 つのスペースを各班に割り当て、各班につき 1 名のサポートスタッフを配置した。なお、理科実験においては 4 名のグループが自然な人数構成と言われており<sup>2)</sup>、今回の班分け（サポートスタッフを含めて各班 4 名または 5 名）は人数面からも妥当であったと考える。

毛糸染色および TLC のいずれについても、全ての班で期待通りの結果が得られた。追加実験では、アントシアニン系の天然色素の色調が pH により変化する現象を希望者に体験してもらった。いずれの班も時間内に予定通り実験操作を完了し、体験講座を無事に完了することができた。各班で染色した毛糸については、今回の記念作品として、配布資料に貼付したものを参加者全員に持ち帰ってもらった。展開後の TLC プレ



環研究所長の開会挨拶



講義 (A コース)



講義 (B コース)



物品の最終チェック



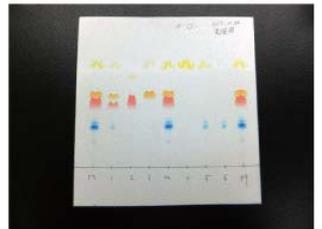
試料の抽出



毛糸染色



加熱操作の観察



展開後の TLC プレート例

図 1 体験講座当日の様子

ート（計6枚）は、チャック付きポリ袋に入れたものを一部の希望者に譲渡した。

これらの成果物（染色後の毛糸や展開後の TLC プレート）は、実験の成功を裏付ける客観的資料となるものであったが、当日はその点に思い至らなかった。各班の成果物をデジタルカメラで撮影して記録化しておかなかったことは、非常に悔やまれる点であった。

### 3. 参加者の評価

アンケート調査による B コースの参加者の評価を図2に示した。講義および実習のわかりやすさや内容の良否について、マイナス評価の選択肢（すこしわかりにくかった、わかりにくかった、あまりよくなかった、よくなかった）を選んだ回答者は皆無であった。参加者の自由意見も好意的なものも多く、成功と言える調査結果であった。より客観的に結果を解析するために、5段階評価の選択肢を点数化（最高5点～最低1点）して集計し、各評価項目に関する1人あたりの平均点を5点満点で算出した（表1）。その結果、4.5～4.9点となり、いずれも4点台の得点であった。また、各評価項目の点数を比較すると、実習の方が講義より高い得点となる傾向が認められた。この結果は、実体験を伴う実習が講義より直感的かつ刺激的であること、また、講義と実習ではアンケート対象者の範囲が異なること\*の2点を反映したものと考えられた。

(\*B コースの講義内容に対するアンケートは A コースへの参加者も対象としているが、B コースの実習内容に対するアンケートは同コースの実習参加者のみが対象。)

なお、参加のきっかけとしては、メールマガジンや知人の紹介が多く、合わせて回答の8割以上を占めており、ホームページや広報誌は比較的少数であった。

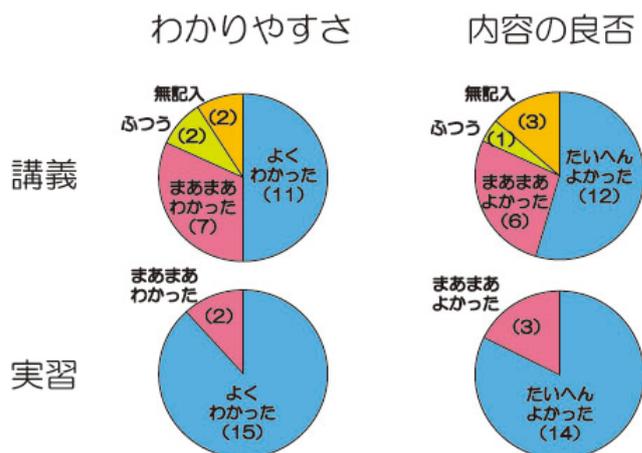


図2 Bコースに関するアンケート調査結果（括弧内の数字は回答者数）

「わかりやすさ」について「すこしわかりにくかった」または「わかりにくかった」と回答した参加者、「内容の良否」について「あまりよくなかった」または「よくなかった」と回答した参加者はいずれも0名であったため、上のグラフには表示していない。環科研実施のアンケート調査結果を利用。

### 4. 体験講座の準備作業に関する情報および考察

#### 4.1. タイムスケジュール

体験講座に関連する作業のタイムスケジュールを表2に示した。体験講座の約5か月前にはテーマが決定しており、本来であれば比較的余裕のあるタイムスケジュールであったと言える。ただし、実際にはこれらの各作業の必要性やスケジュールを事前に十分に把握できていたとは言い難く、締切間際の至急対応が必要となる場面もあった。

各作業をより効率的かつ円滑に進めるために、今後は全体的なタイムスケジュールを早めに明示・共有化して準備を進めることが望ましいと考えられた。

#### 4.2. テーマ設定

表1 Bコースに関するアンケート評価点の集計結果

評価項目	対象	有効回答数	得点（配点×回答者数）					計	1人あたり平均
			評価5	評価4	評価3	評価2	評価1		
わかりやすさ	講義	20	55	28	6	0	0	89	4.5
	実習	17	75	8	0	0	0	83	4.9
内容の良否	講義	19	60	24	3	0	0	87	4.6
	実習	17	70	12	0	0	0	82	4.8

配点および集計方法：いずれの項目も、1～5の5段階で配点した。「わかりやすさ」では、最高評価の「よくわかった」を5、最低評価の「わかりにくかった」を1とした。また「内容の良否」では、最高評価の「たいへんよかった」を5、最低評価の「よくなかった」を1とした。配点不能な無記入の回答は集計から除外した。環科研実施のアンケート調査結果を利用。

表2 関連作業のタイムスケジュール

月	日	作業内容
5	30	スタッフおよびテーマの決定
	31	Bコース案内文案の作成
6	14	両コース案内文の最終確認
8	30	シナリオの提案
9	30	両組織スタッフによる打ち合わせ※
10	4	試薬・器具準備リストの送付
	18	配布資料原稿の送付
	22	会場設営および実地リハーサル※
	25	講義スライドの最終確認
	26	体験講座当日
	28	アンケート集計結果の確認
11	29	物品引き取り※
	14	当所HPへの開催報告の掲載

※物品輸送等に公用車を利用

今回は食品化学課が主体となって B コースの実習内容を企画するという方向性が定まっていたこともあり、食品中の着色料に関連するテーマとした。これは、着色料であれば視覚的に鮮やかで分かりやすい実験が可能であることや、具体的な事例資料<sup>3)</sup>が公開されていることを考慮した上での判断である。最終的に B コースでは「食品中の天然色素と合成色素の違いを確認してみよう」というテーマを設定した。

体験講座の時間配分は実習が 14 時～16 時であり、デモンストレーションも含めて 2 時間以内に完了する実習内容を構築する必要があった。作業フローの過密化を避けて糸染色のみの実施とすべきか判断に迷うところであったが、最終的に「方法」の部に示した実習計画を構築し、TLC も含めることにした。なお、色素溶液の吸光スペクトルを測定して光の波長と色との関係について学習する案や、糸染色のバリエーションとして、ナイロンやセルロース等、羊毛以外の素材の繊維製品を染色する比較実験を実施する案もあったが、時間や設備の都合から今回は実施を見送ることとした。

参考資料として過去の体験講座のテーマ一覧を表3に示した。環科研主催により実施された平成9年度～24年度の計32テーマを大別すると、飲料水の水質(硬度等)が6件、食品栄養成分(ポリフェノール、ビタ

表3 過去に環科研が実施した一日体験講座のテーマ一覧

年度	タイトル
H9	おいしい水ってどんな水
	目で見ると話題の栄養成分
H10	おいしい水ってどんな水
	魚の寄生虫を見よう
H11	知らないうちに損するプラスチックの特性
	部屋の空気の汚れを調べよう
H12	プラスチックの種類判別
	気になる”におい”の測定
H13	香りを楽しもう～あなたはどんな香りをお好みですか～
	食品の正しい知識～食品中の油の酸化について～
H14	部屋の空気の汚れを調べよう
	食品の正しい知識～食品中の油の酸化について～
H15	遺伝子(DNA)を見よう
	部屋の空気の汚れを調べよう
H16	あなたの蛇口からの水道の水質は?
	遺伝子(DNA)を見よう
H17	あなたの蛇口からの水道の水質は?
	ビフィズス菌を見よう
H18	あなたの唾液のデンプン消化力実験
	私たちの生活を考えてみようごみの減量とリサイクル
H19	ビフィズス菌を見よう
	私たちの生活を考えてみようごみの減量とリサイクル
H20	唾液で判る?あなたのストレス -唾液のデンプン消化力実験-
	あなたの家のホルムアルデヒド濃度を測ってみませんか
H21	あなたの家のホルムアルデヒド濃度を測ってみませんか
	緑茶のポリフェノールを測ってみよう
H22	ミネラルウォーターの硬度を測定しよう。 あなたは軟水派or硬水派
	お茶のポリフェノール(カテキン)を測ってみよう
H23	測ってみよう!果汁のビタミンC
	ミネラルウォーターの硬度を測定しよう。 あなたは軟水派or硬水派
H24	リンを測ってみよう。日常生活で捨てられているリン
	測ってみよう!果汁のビタミンC(中止)
H25	測ってみよう!果汁のビタミンC
	食品中の天然色素と合成色素の違いを確認してみよう※

※公衛研側が今回担当したテーマ

ミンC)が5件(うち1件は中止)、屋内大気(ホルムアルデヒド、空気の汚れ)が5件、生化学物質(消化酵素、DNA)が4件、生体内生物(寄生虫、ビフィズス菌)が3件、環境問題(ごみ問題、リン)が3件、臭い・香り成分が2件、家庭用品(プラスチック)が2件、油脂の酸化が2件の内訳となり、食品中の着色料については過去の一日体験講座では前例のないテーマであった(ただし、環科研の別の参加型企画では実施例あり)。

なお、体験講座の準備に必要な労力を考慮すると、過去に実施したテーマとの重複は特に否定すべきものではなく、毎回新たなテーマや実習内容を一から企画する必要性は特にないと考える。

#### 4. 3. 試料

当初の企画段階では、粒チョコレートとグミキャンデーを用いて毛糸染色を行う方向で検討を進めていたが、時間の都合により、今回は抽出が容易な粒チョコレートのみを試料とすることにした。なお、用いた2銘柄の粒チョコレートについては、あらかじめスタッフ側で3粒ずつ色分けして各班に配布した方が当日の作業時間をより短縮できたのであるが、あえて未開封の包装品を各班に配布した。その意図は2つあり、1つは試料が市販菓子そのものであること（小細工がないこと）を参加者に得心してもらうことであり、もう1つは、包装品の開封や中身の色分けという簡単なウォームアップ作業からスタートすることで、班分け直後の参加者の緊張感や不安感を和らげ、より積極性を引き出すことであった。当日は講師スタッフより先に色分け作業を終えて次の実験操作を開始していた班もあり、期待した効果が得られたのではないと思う。

その他、空き時間が生じた際に備えて、乾燥ハーブとして市販されているブルーマロウを準備した。ブルーマロウは紫キャベツ（赤キャベツ）と同様にアントシアニン系の天然色素を含んでおり、水で抽出した溶液に弱酸・弱アルカリ溶液を加えて液性を変えると瞬時に色が変化する。この性質を利用して、短時間でインパクトのある実験を行うことが可能である。また、乾燥品であるため、室温下で長期保存が可能である点や、軽量で場所を取らずに手軽に運搬できる点が、予備的な実験素材として優れていると考える。

#### 4. 4. 試薬類および装置・器具類

今回、Bコースでは「科学検査の一端に触れてもらう」ことをコンセプトとして、TLCプレートや展開槽等、実際の着色料検査で用いるグレードの製品を準備した。

一方、各家庭での追試や自由研究への応用性を重視して、一般市民が入手可能な日用品のみを用いて「家庭でもできる」実習を構築するのも一案であろう。今回のBコースの実習内容についても「家庭でもできる」をコンセプトにして簡易化することが可能である。まず、液性調整用の酸・アルカリ溶液には、市販の食酢

および薬用アンモニア水を使用できる。また、ビーカー、ガラス棒、毛細管等の器具類は、各々使い捨ての紙コップ・耐熱プリンカップ、割り箸・竹串、つまようじ等の日用品で代用可能であろう。抽出溶液の加熱装置に、ホットプレートより手軽な電子レンジを用いる手法もある<sup>4)</sup>。着色料の分離判別に関しては、牛乳パッククロマトグラフィー<sup>5)</sup>のアイデアが活用できるかと思う。

#### 4. 5. 配布資料およびスライド

体験講座の資料については、Aコースと一括して環科研側でコピー製版したものを配布するため、カラー印刷の利点を活用できない制限があった。そこで、操作の解説には写真を用いず、線画イラストを用いることにした（参考資料1-1～1-5）。線画イラストの特長として、（1）コントラストが明瞭で複写時の画質の変化が少ない、（2）背景がシンプルで補足・解説用の文字情報との相性が良い、（3）操作のポイントを抽象化して強調しやすい等が挙げられる。

一方、実際の講義で使用するスライドには特にカラー制限が無いため、参加者の興味を引き付け、実際の操作や使用物品のイメージをより直接的に伝えることを目的として、配布資料とは対照的にカラー画像を多用することにした（参考資料2-1～2-3）。なお、一部の画像は「改訂原色食品衛生図鑑」<sup>6)</sup>または大阪市Webページ<sup>7)</sup>、著作権フリー素材集等から、適宜出典を明記して引用した。スライドの配色やレイアウトについては「伝わるデザイン 研究発表のユニバーサルデザイン」のWebサイト<sup>8)</sup>の情報を参考にした。

#### 4. 6. 安全面への配慮

今回の実習では酸・アルカリ溶液やエタノールを使用した実験操作を行うことから、身体保護具として保護眼鏡、簡易活性炭マスク、使い捨てエプロン、使い捨て手袋を参加者に配布し、実習中はこれらの保護具を原則着用することとした。また、軍手を各班に一双ずつ配布し、加熱溶液の取扱時など必要に応じて着用することとした。酢酸やアンモニアを含有する溶液の加熱操作はドラフトチャンバー内で行った。なお、配布資料原稿の提出時点ではTLC条件が未定（劇物使用の可能性あり）だったため、展開操作をドラフトチャンバー内で実施する旨の注釈を記載したが（参考資料1-4上段）、その後、有害性の低い展開条件（劇物不使用）を構築できたことから、当初の方針を変更して、より参加者が観察しやすい各班の実験台上でTLC

を行った。実習中は飲食禁止である旨を周知し、余った食品試料は全て回収処分した。

#### 4. 7. リハーサル

体験講座の4日前に、必要な物品や試薬類の最終チェックを兼ねて実習のリハーサルを行った。各スタッフから幾つかの時間短縮のためのアイデアや細部の修正意見が提案され、開催当日に向けて効果的なリハーサルを実施することができた。今回の参画スタッフには着色料検査の未経験者も含まれていたため、より一般市民（初心者）に近い視点で各実験操作を検証することができた。体験講座では、基礎知識や技術レベルが異なる集団に柔軟に対応する必要がある。そのため、横断的なスタッフ混成チームを編成してリハーサルに臨むことは有用であろう。

#### 5. 情報の共有化

今回、スタッフ間の情報伝達は、主として口頭およびメールにて行った。この方法は一般的なものであるが、中長期的なプロジェクトにおいては伝達内容の遡及や全体的な俯瞰が難しい面がある。また、基本的に当事者以外には情報が伝達されない方法でもある。

今後の体験講座において、新参スタッフが過去の一連の作業過程を容易に把握できるような情報共有方法を早い段階で仕組み化しておくことは有用であろう。また、市民参加者の満足度の向上を目指し、体験講座の一層の充実を図るためには、各回の体験講座で得られた知見やアイデアを風化させず、形に残る文書や情報リンクとして体系的に残す仕組みの存在が不可欠と考える。

そのための記録媒体として、今回著者らが試みたように所報の活用も選択肢の一つではあるが、手軽さに欠け、発行までに時間が掛かる難点がある。また、可能であれば、著者側からの一方的な情報発信ではなく、読者側からの気づきやアイデアをリアルタイムで顕在化・共有化し、体験講座への各職員の積極的な協力を後押しするような仕組みが欲しいところである。

一案として、例えばブログや Wiki の仕組みを利用すれば、手軽で双方向的な情報提供が可能であり、上記課題をクリアできる。ページの作成や編集に際して HTML 文書に関する専門的な知識は不要であり、各スタッフやチームによる主体的な情報発信が可能である。これらの仕組みの公式導入は、両組織職員の情報交流の促進や、市民に顔の見える研究所としての雰囲気づくりにも役立つであろう。ブログ形式であれば、

市民に対しても体験講座の雰囲気を伝えやすく、市民がより気軽に体験講座に参加しやすくなる効果も期待できる。

#### 6. おわりに

以上、参考情報として今回の経験をまとめた。今後の開催に向けた議論やイメージトレーニングに役立てていただければ幸いである。

第 17 回一日体験講座にご参加下さり、アンケート調査にご協力下さった市民の皆様に感謝いたします。

B コースについては申込者数が上限の 20 名を超過したため、環科研で実施した抽選により一部の方のご参加をお断りさせていただきました。ご参加できなかった皆様、この場を借りて改めてお詫び申し上げます。

実習計画の立案に際しては、文献 3 に示した神奈川県衛生研究所の「かながわサイエンスサマー」の資料を参考にさせていただきました。今回の実験内容および配布資料の大枠は上記資料によるものであり、ここに記して深く感謝いたします。

最後になりましたが、一日体験講座に参加する貴重な機会および御助言を賜り、実験室、実験資材、器具類、アンケート集計結果をご提供下さり、その他の実務面での各種作業（案内・配布資料等の作成、参加申込の事前調整（抽選、連絡）、当日の受付、事後の器具洗浄、会場の清掃、アンケート集計等）の労を担い、全面的にご支援下さった大阪市立環境科学研究所の皆様、誠に感謝いたします。

#### 文献

- 1) Măruțoiu, O.F., Gogoășă, I., Măruțoiu, C., Tofană, M., Moigrădean, D., Gergen, I., Separation and identification of some synthetic food colorants from foods through thin-layer chromatography – “UV-VIS” Spectrometry, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 17, 46-53 (2011)
- 2) 西川純, 理科だからできる本当の「言語活動」, 東洋館出版社 (2014)
- 3) 神奈川県衛生研究所, 「かながわサイエンスサマー 身近な食品をテストする ―着色料を調べてみよう―」 (2006)  
[http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/001\\_event/0102\\_summer/images/summer\\_text.pdf](http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/001_event/0102_summer/images/summer_text.pdf)

- 4) 石田裕, 食品添加物の測定—合成着色料, 日本調理科学会誌, **29**, 160-165 (1996)
- 5) 谷口博士, 堀内和夫, 牛乳パッククロマトグラフィー, 化学と教育, **53**, 496-497 (2005)
- 6) 辺野喜正夫, 細貝祐太郎, 春田三佐夫, 菅原龍幸, 改訂原色食品衛生図鑑, 建帛社 (1981)
- 7) 大阪市 Web ページ, 「食品添加物「アカネ色素」は使用できなくなりました」(2012年9月7日)  
<http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/page/0000005963.html>
- 8) 高橋佑磨, 片山なつ, 「伝わるデザイン 研究発表のユニバーサルデザイン」  
<http://tsutawarudesign.web.fc2.com/index.html>

## 公衛研担当Bコース

テーマ：「食品中の天然色素と合成色素の違いを確認してみよう」

日時：平成25年10月26日（土）13時～16時

場所：大阪市立環境科学研究所

定員：20名（各班4名×5班）

講義・実験説明：阿久津和彦

実験サポート：尾花裕孝、梶村計志、木村明生、吉田俊明、清田恭平

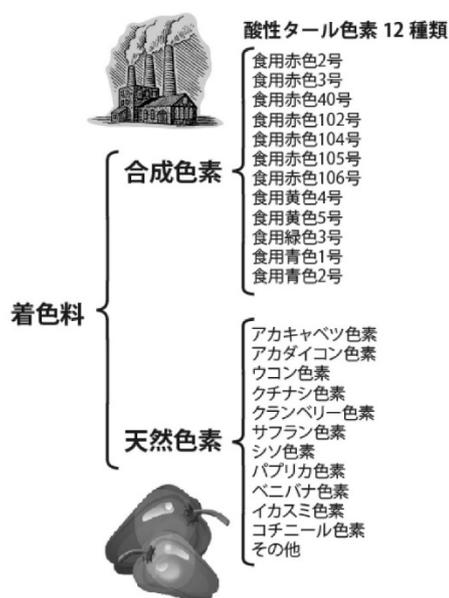
### 【目的】

食品を選ぶ時には、味や品質だけでなく、見た目も気になります。食品の外観では色は重要で、食品を加工するときに「着色料」と呼ばれる安全な色素を使って色を付けることがあります。これらの着色料には、天然の植物などから取る成分と人工的な合成品の2種類があります。

Bコースでは、粒チョコレートから抽出した色素で毛糸を染色して、天然色素と合成色素の性質の違いを確認していただきます。さらに、「薄層クロマトグラフィー」という手法を用いて、取り出した合成色素の種類を判別していただきます。

これらの体験を通じて、皆さんに「色」や「着色料」についての理解を深めていただければと思っています。

### 着色料の種類



### 食用の合成色素（タール色素）の歴史

19世紀の有機化学の発達により、石炭タールから各種の化学物質が合成されるようになった。

1856年、イギリスの研究者パーキンが、世界で初めて人工染料（モーブ、紫色）の合成に成功。

繊維の染色目的で、各種の人工染料（タール色素）が工業的に製造されるようになった。

食品工業の発達に伴い、食品を着色する傾向が強まる。天然色素より安価なタール色素が次第に食品に使用されるようになった。

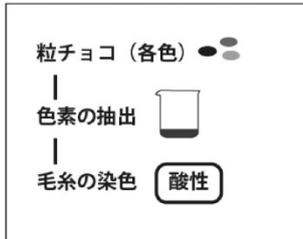
初期には急性毒性のあるタール色素（塩基性タール色素等）も使用されたが、次第に淘汰。

20世紀には、我が国でも24種類の食用タール色素が使用されるようになった。

その後、発がん性や慢性毒性の問題により、一部の食用タール色素は不許可となった。

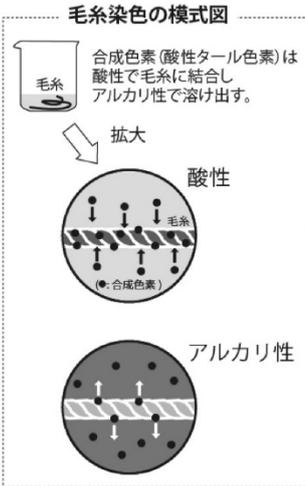
現在では食用の合成色素として、12種類の酸性タール色素のみが許可されている。

実験1 (天然・合成色素共通)

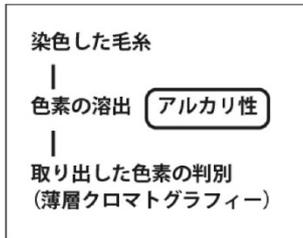


食品から色素を取り出して毛糸を染めてみよう！

【ポイント】  
天然色素と合成色素の毛糸の染まり具合の違いに注目。



実験2 (合成色素のみ)

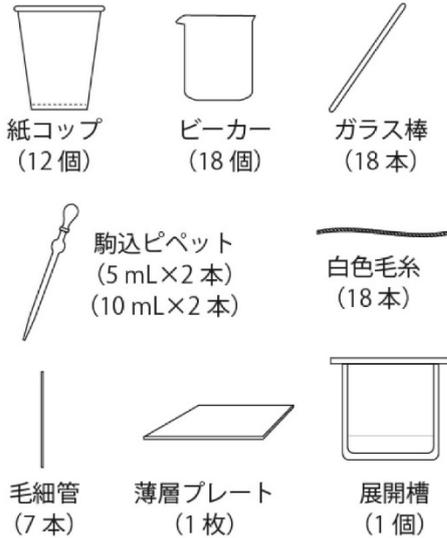


染めた毛糸から色素を取り出して判別してみよう！

【ポイント】  
実験1とのpHの違いに注目。

(補足) 粒チョコの色について  
今回の実験では、MJ社とMM社の粒チョコ市販品を使用する。  
2社の粒チョコの色合いは微妙に異なっているが、比較しやすいように、いずれの製品も「①茶、②赤、③橙、④黄、⑤緑、⑥青」の6色※で表す。  
※MJ社の製品は7色だが、桃色(ピンク)を除く6色を使用する。

実験で使用する主な物品  
括弧内は1班あたりの配付数



予備を用意していますので、  
破損等で物品が不足した場合は  
お気軽にスタッフに声を掛けて下さい。

【その他】

- 粒チョコ (2 銘柄)
- 合成色素混合標準溶液
- 10%酢酸溶液
- 0.5%アンモニア水
- 展開溶媒
- 精製水
- pH 試験紙
- 沸騰石
- 鉛筆・定規
- ホットプレート
- ドライヤー
- 紙皿・アルミホイル
- インデックスシール
- ペーパータオル
- スポイト
- ハサミ

【身体保護具】

- 保護眼鏡
- 使い捨てエプロン
- 使い捨て手袋
- 活性炭マスク
- 軍手



安全第一  
SAFETY FIRST

実験 1-1 粒子チョコからの色素の抽出 (同じ操作を計 12 セット行う (6 色 × 2 銘柄))

粒子チョコ

同じ色の粒子チョコを 3 つ選んでコップに入れる。

水を 20 mL 入れて 1 分間放置する。

コップを緩やかに振って 粒子チョコの表面の色素を 溶かす。

色の付いた液 (抽出液) をビーカーに移す。 粒子チョコは移さない。

実験 1-2 毛糸の染色 (同じ操作を計 12 セット行う (6 色 × 2 銘柄))

10%酢酸 1 mL

10%酢酸を駒込ピペット (またはスポイト) で 1 mL 加える。

酸性

ガラス棒で液を混ぜて、ガラス棒の先の液滴を pH 試験紙に付けて、pH3 ~ 4 の色 (橙色) に変化することを確認する。

毛糸

毛糸は浮かびやすいので 先に水に濡らしておくが良い。

毛糸を入れて約 10 分間加熱する。 天然色素の抽出液には 1 本、合成色素の抽出液には 2 本\*の毛糸を入れる。 \*保存用・分析用、各 1 本

毛糸を取り出して 水で洗い、毛糸の色を観察する。

実験 2-1 染色した毛糸からの色素の溶出 (同じ操作を計 6 セット行う (6 色 × 1 銘柄))

合成色素の抽出液で 染色した毛糸 1 本を ビーカーに入れる。

0.5%アンモニア水 5 mL を駒込ピペットで 加えて約 10 分間加熱する。 (念のため 0.5%アンモニア水を pH 試験紙に付けて、pH10 ~ 11 の色 (紫色) に変化 することを確認する。)

アルカリ性

ガラス棒でかき混ぜて、 液に色が移ったことを確 認してから毛糸を取り出 す。(毛糸に少し色が残っ ても OK。)

沸騰石を入れて液を加熱 して水分とアンモニアを 蒸発させる。完全に乾く 直前でホットプレートか ら下ろす。

実験 2-2 薄層クロマトグラフィー (濃縮液のスポットティング)

1 cm

2 cm

毛細管

注意! 毛細管から液が流れ出したら、 すぐに毛細管を上げる。

スポット例 「M」は混合標準溶液

濃縮液 濃縮液

M 茶 赤 橙 M 黄 緑 青 M

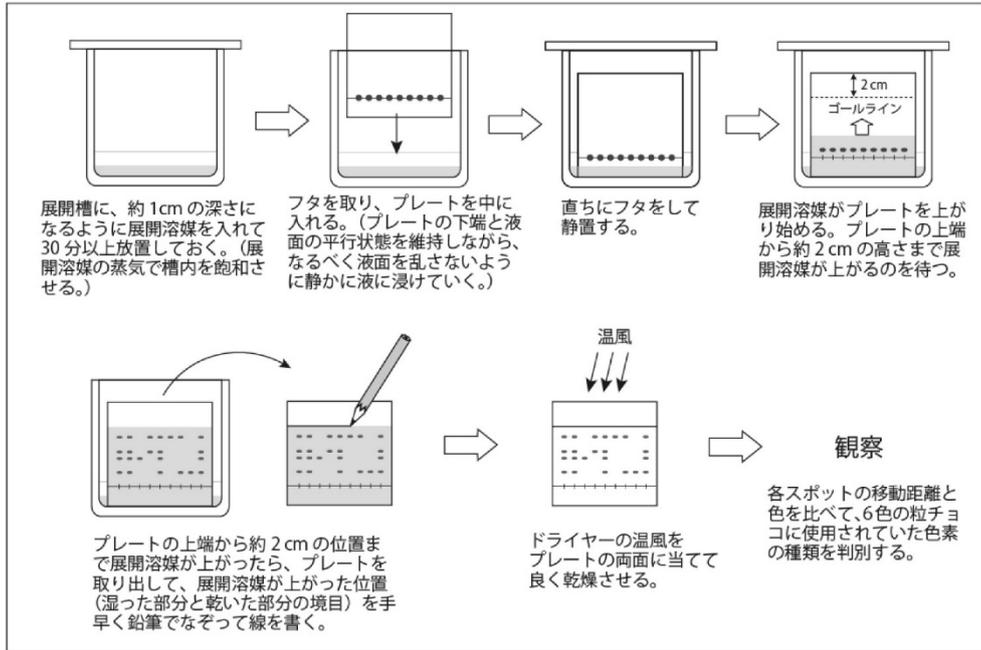
① ② ③ ④ ⑤ ⑥

定規と鉛筆を用いて、 プレートにスタートライン (原線) を書き、その ラインと交差する短い線 を 1cm 刻目で書き入れる。

毛細管の先をビーカー 内の濃縮液に浸ける。 (少量の濃縮液が自然 に吸い上げられる。)

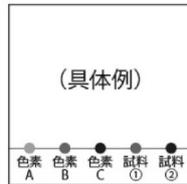
プレートに書いた「+」状のマークの中心 (原点) に毛細管の先 を付けて「少量」の液を付着させる。 色が薄い場合は、ドライヤーを用いてスポットを乾燥させてから、同様の操 作を数回繰り返す。スポットは直径 5mm 以内の大きさに収めるのが良い。

実験 2-3 薄層クロマトグラフィー（展開） ドラフトチャンバー（局所排気装置）内で作業



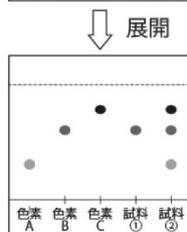
合成色素の判別方法

毛糸から取り出した色素の濃縮液を標準色素と一緒に展開してスポットの移動距離と色を見比べて色素の種類を判別する。



注：左図では、標準色素として 3 種類の色素溶液（A、B、C）を個別にスポットした場合の展開例を示している。

実際の体験講座では、4 種類の色素を「混合」した標準溶液を使用する。

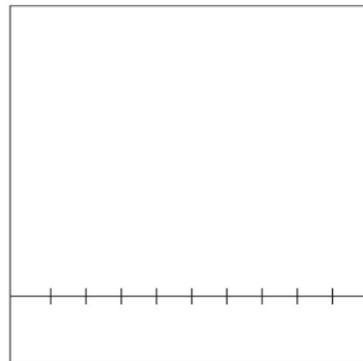


試料①には色素B  
試料②には色素A、B、C  
が含まれる。

【豆知識】

より詳しく比較する場合には、色素のスポットの移動距離を溶媒先端の移動距離で割った数値（Rf 値）を算出する。同一の展開条件で、かつ試料中の共存成分の影響が小さい場合、同じ色素の Rf 値はほぼ一定の値を示す。

展開結果（スケッチ）



合成色素の判別結果  
(該当する色素にチェック)

- ①茶→黄 4 黄 5 赤 40 青 1
  - ②赤→黄 4 黄 5 赤 40 青 1
  - ③橙→黄 4 黄 5 赤 40 青 1
  - ④黄→黄 4 黄 5 赤 40 青 1
  - ⑤緑→黄 4 黄 5 赤 40 青 1
  - ⑥青→黄 4 黄 5 赤 40 青 1
- 注：黄 5 の色調は黄色より橙色に近い

毛糸貼付・自由メモ欄

MJ社（天然色素を使用）

① 茶      ② 赤      ③ 橙      ④ 黄      ⑤ 緑      ⑥ 青

MM社（合成色素を使用）

① 茶      ② 赤      ③ 橙      ④ 黄      ⑤ 緑      ⑥ 青

Bコース 5ページ

参考資料 1-5 配布資料（毛糸貼付欄）

## 講義内容

- 食用色素について
- 本日の実験について



## 食用色素について

### 食用色素の用途

- **食品の色（彩り）**は、味・香りとともに重要な要素 
- 食品に好ましい色調を与えるために**食用色素（着色料）**が添加される
  - ✓ 安全性に問題があるものは不許可
  - ✓ **生鮮食品への使用は禁止**
  - ✓ 表示義務あり 

### 天然色素

主として生物（特に植物）由来



他にも多数

画像出典：「糖食食用天然色素」光祥社

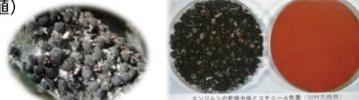
### 変わり種の天然色素

#### ラック色素（赤橙色）

ラックカイガラムシの分泌する樹脂状物質から抽出したもの（インドや東南アジアで養殖）

#### コチニール色素（赤色）

エンジムシ（コチニールカイガラムシ）から抽出したもの（南米で養殖）



画像出典：Wikipedia

画像出典：「糖食食用天然色素」光祥社

### 使用禁止となった天然色素の例

食品添加物「アノキサ色素」は使用できなくなりました。

平賀氏1月15日付付アノキサ色素が既存の動物由来から検出され、厚生労働省告示第77号「動物由来以外のアノキサ色素の抽出からアノキサ色素は食品添加物として使用することができなくなりました。このため、アノキサ色素がこれまでも食品添加物として使用されていたアノキサ色素は、食品添加物として使用することができなくなりました。」

① 畜業者の方へ

- ・平成28年10月1日付付アノキサ色素及びこれらを含む食品の製造・輸入・輸入品の出荷は、食品添加物として認められず、アノキサ色素を含む食品を製造した場合は罰則です。お近くの保健所までお問い合わせください。

② 一般消費者の方へ

- ・アノキサ色素を使用した食品を製造した場合は罰則です。お近くの保健所までお問い合わせください。

【アノキサ色素を製造した食品には、「着色料（アノキサ）」や「アノキサ色素」などの表示が求められます。】

【賢識アノキサ色素とは】アノキサ色素はアノキサ色素の抽出から得られる色素で、黄色～赤色を呈する。

画像出典：Wikipedia

### 合成色素

- 石油が原料
- 全て**酸性タール色素**（12種類）
- 「食用赤色2号」など



酸性タール色素  
タール色素のうち、酸性溶液中で羊毛などを染める色素。スルホン酸基、カルボキシル基など酸性の基を分子内にもつ。

### 英国 合成色素のはじまり

- 1856年、イギリスの化学者パーキン（当時18歳）が、マラリアの特効薬キニーネの合成方法を検討している途中で、絹を**紫色**に染める色素（**モーブ**）を発見。
- この発見が、**合成色素**の研究開発と工業的生産の幕開けとなり、次第に**食品**にも**合成色素**が添加されるようになった。

## 使用禁止となった合成色素の例



動物実験で慢性毒性や発がん性が確認され、  
食品添加物としての指定が解除された

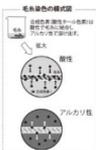
## 本日の実験について

### 実験の目的

#### 【実験1】

- 毛糸を用いて合成色素（酸性タール色素）特有の性質を確認

✓酸性条件で毛糸に結合して、  
アルカリ性条件で毛糸から離れる。



#### 【実験2】

- 色素の分析法を体験

✓実際の食品検査の現場で使用されている  
薄層クロマトグラフィーという手法を体験。  
✓特殊なプレートと溶媒を用いて色素を見分ける。



### 使用する食品試料

#### 天然色素を使用

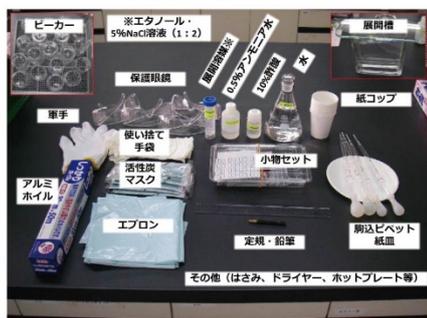


#### 合成色素を使用



実験室内は飲食禁止ですので、  
試料をうっかり食べてしまわないようにして下さい。  
(余った粒チョコは実験終了後に全て回収します。)

### 試薬・物品



### 小物セットの内訳



### 身体保護具の装着例



今回の実験では、酸、アルカリ、アルコールを使用します。

また、ホットプレートを使用した加熱操作を行います。

「安全確保」および「衣服の汚損防止」のため、実験中は、左の例に従って、身体保護具を装着して下さい。

### 実験1 スタート

メーカーごとに各色の粒チョコを紙コップに入れ、  
水を加えて色素を溶かす。

- |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|
| ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ |
| 茶 | 赤 | 橙 | 黄 | 緑 | 青 |



## 参考資料 2-2 講義スライド（実習内容の解説—導入部—）

(注) 実際の講義では、ほかし加工をしていない試料画像を示した。

色素が溶けた水をビーカーに移し、**10%酢酸**を加えて**酸性溶液**にする。

毛糸を色素抽出液に加えてホットプレート上で**加温**する。

毛糸を取り出して水で洗い色調を確認・比較する。

**実験1 完了**

**実験2 スタート**

合成色素で染色した毛糸をビーカーに入れる。0.5%アンモニア水を加えて**アルカリ性溶液**にして、ホットプレート上で**加熱**する。色素が溶出する。

溶液が着色したことを確認して、毛糸を取り出す。沸騰石を入れて、さらに加熱して着色液を濃縮する。

色素混合標準溶液と各色の濃縮液を薄層プレートにスポットする。Bコース配付資料の3ページ下段参照。

ドライヤーでスポットを乾かす際には、プレートが飛んでいかないように注意。

M ① ② ③ M ④ ⑤ ⑥ M  
茶 赤 橙 黄 緑 青  
M:色素混合標準溶液

プレートを展開槽に入れて**薄層クロマトグラフィー**を行う。時間が無い場合は4種類の色素を概ね分離できた時点で展開終了とする。

濃縮液の展開結果（移動距離、色調）を標準色素のスポットと比較して、各色の粒子ヨコで使用されている合成色素を判別（推定）してみる。

染色した毛糸をはさみで4等分して配布資料の最終ページに貼付する。

**実験2 完了**

参考資料 2-3 講義スライド（実習内容の解説—実験操作の流れ—）

Biomarkers for monitoring transfluthrin exposure: Urinary excretion kinetics of transfluthrin metabolites in rats

Toshiaki YOSHIDA \*

Environ. Toxicol. Pharmacol., 37, 103-109 (2014)

一般住宅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近年増加している。これら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含フッ素ピレスロイド剤の一種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、吸収量の指標となり得る尿中代謝物を動物実験により検索した。

ラットの腹腔内に一定量のトランスフルトリンを投与 (26, 64, 160 及び 400 mg/kg) した後定期的に採尿した。主要な 3 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(FB-AI)、2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸(FB-Ac)、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(DCCA)を定量し、薬物動学的に解析した。吸収されたトランスフルトリンの消失過程において最も重要な経路は尿中排泄であると示唆された。いずれの代謝物においても、投与量に対する尿中排泄率に、投与量による差異は認められなかった。したがって、各代謝物の尿中排泄量は、広範なトランスフルトリン曝露濃度レベルにおいて、その吸収量に比例すると推定された。DCCA は他の多くのピレスロイド剤曝露時にも尿中に代謝物として排泄されることが知られているが、FB-Ac および FB-AI はトランスフルトリン曝露時に特徴的な代謝物である。吸収されたトランスフルトリンの約半量は FB-Ac として尿中に排泄されることから、FB-Ac はトランスフルトリン曝露における最適な吸収量の指標となり得ると考えられた。

本研究成果は、住民におけるトランスフルトリン吸収量把握のための基礎的資料として役立つものと考えられる。

\* 大阪府立公衆衛生研究所 企画総務部 企画調整課

トランスフルトリン曝露における生物学的モニタリング指標：ラットにおけるトランスフルトリン代謝物の尿中排泄の動学的解析

A Coprological Survey of Intestinal Helminthes in Stray Dogs Captured in Osaka Prefecture, Japan

A. KIMURA\*<sup>1</sup>, Y. MORISHIMA\*<sup>2</sup>, S. NAGAHAMA\*<sup>3</sup>, T. HORIKOSHI\*<sup>3</sup>, A. EDAGAWA\*<sup>1</sup>, T. KAWA BUCHI-KURATA\*<sup>1</sup>, H. SUGIYAMA\*<sup>2</sup> and H. YAMASAKI\*<sup>2</sup>

J. Vet. Med. Sci., 75, 1409-1411 (2013)

大阪府内に生息する放浪犬の腸管寄生蠕虫保有状況を調査する目的で、2006年から2011年の間に大阪府内で捕獲された放浪犬212頭の糞便検査を実施した。その結果、39.2%に腸管寄生蠕虫の感染が確認された。検出された蠕虫種はイヌ回虫(25.0%)、イヌ鞭虫(8.0%)、マンソン裂頭条虫(3.3%)、テニア科条虫(2.4%)、イヌ鉤虫(1.9%)およびイヌ小回虫(0.5%)であった。5頭の放浪犬から検出されたテニア科条虫卵は12SrRNA およびcox1遺伝子の配列により豆状条虫3例、ネコ条虫2例、胞状条虫および連節条虫各1例と同定され、エキノコックス感染は否定された。これらの結果は大阪府内に生息する放浪犬が、イヌ回虫等の人畜共通蠕虫感染症のリザーバーとして重要であることを示唆するものであった。

\*<sup>1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所

\*<sup>2</sup> 国立感染所研究所

\*<sup>3</sup> 大阪府農林水産部動物愛護畜産課

大阪府内で捕獲された放浪犬の腸管寄生蠕虫保有調査

JATA (12)-VNTR 型別による結核集団発生事例の  
菌株異同調査

<sup>1</sup>田丸亜貴, <sup>2</sup>和田崇之, <sup>3</sup>岩本朋忠, <sup>2</sup>長谷篤

Kekkaku. 88(4) :399-403 (2013)

【目的】結核菌遺伝子型別法として日本国内で標準法となりつつある JATA (12)-VNTR 型別の、結核患者複数発生事例における菌株異同調査法としての有用性を検討した。【方法】1999 年 4 月から 2011 年 12 月に菌株異同調査依頼のあった結核患者複数発生事例のうち 270 事例 643 株を対象とした。菌株の異同の基準には詳細な型別能を有する 26loci-VNTR を用いた。【結果と考察】非集団感染 64 事例で JATA(12)-VNTR 型が一致したものは見られなかった。集団感染 206 事例のうち 185 事例 (89.8%) で JATA(12)-VNTR 型が一致した。JATA(12)-VNTR 型別で菌株の異同の判別が不能だったのは、12 領域中 1 領域だけの挿入数が異なっていた事例で、このような事例は集団感染事例の 10.2%、集団感染ではなかった事例の 1.6%みられた。全体として、結核患者複数発生 270 事例中 248 事例 (91.9%) の菌株異同は JATA(12)-VNTR 型別だけで正しく判定され、2 領域以上の相違に起因する判定の齟齬は生じなかった。以上のことから、1 領域違いの事例や地域的に多発する遺伝子型に注意して用いれば、JATA(12)-VNTR 型別は結核患者複数発生事例の異同調査に十分有用であると示された。

エンテロウイルス

宗村徹也<sup>\*1</sup>, 中田恵子<sup>\*2</sup>, 西村公志<sup>\*2</sup>, 左近直美<sup>\*2</sup>

ウイルス・細菌・真菌・寄生虫同定便覧(2014)  
電子版

エンテロウイルスのウイルス学的基礎知識に加えて検査・同定・培養に関する具体的な手技と留意点について下記の項目手で解説した。

1. 属種名
2. 分類
3. 形態と特徴
4. 生育環境
5. 検査ならびに培養条件
6. 死滅条件 (衛生管理)
7. 発生が考えられる分野とその影響
  - ・医薬品          ・食品
  - ・化粧品          ・畜産
  - ・医療機器      ・医療機関 など
8. 想定される汚染経路 (考えられる混入経路)
9. 参考文献

<sup>\*1</sup>大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課

<sup>\*2</sup>大阪市立環境科学研究所 調査研究課 微生物保健グループ

<sup>\*3</sup>神戸市環境保健研究所 微生物部

Evaluation of JATA(12)-Variable Number of Tandem Repeat for Identification of the Source of Tuberculosis Outbreaks in Osaka.

<sup>\*1</sup>横浜市立食肉衛生検査所

<sup>\*2</sup>大阪府立公衆衛生研究所

Enterovirus

各種ウイルスに対する新規速乾性すり込み式手指消毒薬の有効性評価

山崎謙治\*, 中田恵子\*

医学と薬学, 71, 117-125 (2014)

近年、ノロウイルス等のノンエンベロープウイルスに対して有効なゲル状および液状の速乾性すり込み式手指消毒薬（以下、ラビング剤）が開発された。新規ラビング剤はいずれもエタノールを有効成分とし、添加物によりpHが酸性に調整された製剤である。これらの新規ラビング剤とこれまで医療機関で汎用されてきたゲル状および液状のラビング剤の計14製剤を用い、消毒用エタノールを対照としてウイルス不活化効果について比較検討した。新規ラビング剤はノンエンベロープウイルスおよびエンベロープウイルスの各種ウイルスに対して高い不活化効果を示し、特にノンエンベロープウイルスに対しては、他のラビング剤や消毒用エタノールよりも優れた効果を示した。

Molecular epidemiology of human adenoviruses D associated with epidemic keratoconjunctivitis in Osaka, Japan, 2001-2010

S. HIROI\*, S. MORIKAWA\*, K. TAKAHASHI\*, J. KOMANO\* and T. KASE\*

Japanese Journal of Infectious Disease, 66, 436-438 (2013)

近年、流行性角結膜炎の患者から新型のD種アデノウイルスの検出が報告されている。そこで我々は、2001年から2010年の間に大阪府の病原体サーベイランスで流行性角結膜炎患者の検体から分離された39株のD種アデノウイルスについて分子疫学的な解析を行った。

ヘキソンloop1領域およびファイバー領域の塩基配列を決定し系統解析を行った結果、19型が14株(35.9%)、37型が13株(33.3%)、53型が4株(10.3%)、54型が8株(20.5%)であった。新型である53型は2001年に、54型は2003年に分離された。従来型の19型は2003年以降、37型は2005年以降2010年まで分離されなかった。

過去に大阪府で分離された新型の53型および54型アデノウイルスは、当時、血清型として8型や37型と判定されていたことから、新型アデノウイルスを補足するためには遺伝子解析が重要であることが示された。大阪では2000年代の初期には新型アデノウイルスが存在していたことが確認された。分子疫学解析によりアデノウイルスの流行実態を正確に把握することができると考えられる。

\*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

Investigation of the new quick-drying hand sanitizer against various viruses

\*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部

大阪府における流行性角結膜炎由来D種アデノウイルスの分子疫学解析 (2001-2010)

Late onset of vaccine-associated measles in an adult with severe clinical symptoms: a case report.

T. KURATA<sup>\*1</sup>, D. KANBAYASHI<sup>\*1</sup>, H. KINOSHITA<sup>\*2</sup>, S. ARAI<sup>\*2</sup>, Y. MATSUI<sup>\*3</sup>, K. FUKUMURA<sup>\*3</sup>, H. MATSUMOTO<sup>\*3</sup>, F. ODAIRA<sup>\*3</sup>, A. MURATA<sup>\*4</sup>, M. KONISHI<sup>\*4</sup>, K. YAMAMOTO<sup>\*4</sup>, R. NAKANO<sup>\*4</sup>, T. OHARA<sup>\*4</sup>, E. OTSURU<sup>\*5</sup>, J. KOMANO<sup>\*1</sup>, T. KASE<sup>\*1</sup> and K. TAKAHASHI<sup>\*1</sup>

American Journal of Medicine, 127(4), e3-e4 (2013)

麻疹は感染力が強い熱性発疹性疾患であるが、有効な生ワクチンが開発されて以来、患者数は全世界で年々大きく減少している。麻疹ワクチンは、感染予防に有効である一方、副反応がある事が知られている。国内においては、定期接種の副反応は報告されているが、任意接種の副反応はほとんど報告されていない。今回任意接種を受けた健康な成人におけるワクチン由来麻疹を経験したので報告する。

接種前に抗体を測定し、麻疹抗体を保有しないことが明らかであった23歳の健康な男性が、麻疹ワクチン接種18日後に発熱(40°C)、発疹、コプリック斑を伴う典型的な麻疹症状を示した。患者の血液、咽頭ぬぐい液、尿からはいずれもPCRにより麻疹ウイルスが検出され、シーケンスの結果、遺伝子型はワクチン株であるA型であった。国立感染症研究所の報告では、遺伝子A型の麻疹ウイルスは2006年から2013年5月までの間に71例報告されており、患者の年齢中央値は1歳(範囲1-14歳)で成人は報告されていない。成人の麻疹ワクチンは任意接種となるため接種機会が少ないが、臨床現場においては小児のみならず成人においても麻疹ワクチン由来の麻疹について留意すべきである。

麻疹診断後に麻疹と判明した一症例

倉田貴子<sup>\*1</sup>, 上林大起<sup>\*1</sup>, 駒野 淳<sup>\*1</sup>, 加瀬哲男<sup>\*1</sup>, 高橋和郎<sup>\*1</sup>, 松井陽子<sup>\*2</sup>, 福村和美<sup>\*2</sup>, 松本治子<sup>\*2</sup>, 大平文人<sup>\*2</sup>, 有村亜弥子<sup>\*3</sup>, 久保弘美<sup>\*3</sup>, 野田昌宏<sup>\*3</sup>, 津田信子<sup>\*3</sup>, 高林弘の<sup>\*3</sup>

病原微生物検出情報, 34, 347-348 (2013)

2013年は大阪府内で大規模な麻疹流行がみられており、第36週現在において患者数は3,000名を超えている。このような状況下において、麻疹と診断された後に麻疹であることが判明した症例を経験したので概要を報告する。

症例: 29歳の女性で、2013年4月に発熱、発疹、麻疹様発疹を来し近医で麻疹と診断された。コプリック斑およびカタル症状はみられず、発疹性疾患患者との接触歴、海外渡航歴はなかった。

症例の子(4ヶ月、女兒)が症例の発症後10日後に発熱、発疹、コプリック斑がみられ、麻疹の血清IgM 9.37となり麻疹と診断された。衛生研究所におけるPCRおよびシーケンスの結果、D8型の麻疹ウイルスが検出された。患児の接触者調査で母親(本症例)の病歴から家庭内における母から子への麻疹伝播の可能性が疑われたため、本症例の血液、咽頭拭い液、尿を用いてPCRを行った結果、子と同様に遺伝子型D8の麻疹ウイルスが検出された。本症例は過去に麻疹ワクチン接種歴があったため麻疹が典型的な症状を示さない修飾麻疹であったと考えられた。大阪府では2013年に麻疹が流行しており、発疹が麻疹様でカタル症状もない修飾麻疹が麻疹と臨床診断されたと推察される。麻疹排除の観点からみても、麻疹流行対策の立場からも、発疹性疾患の鑑別には積極的なIgMおよびPCR検査を行うことが肝要と思われる。

<sup>\*1</sup>大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

<sup>\*2</sup>国立感染症研究所 感染症情報センター

<sup>\*3</sup>大阪府健康医療部 保健医療室 地域保健感染症課

<sup>\*4</sup>大阪府 和泉保健所

<sup>\*5</sup>医療法人栄寿会上田医院

顕著な臨床症状をとまなう成人のワクチン関連麻疹の一例

<sup>\*1</sup>大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

<sup>\*2</sup>大阪府健康医療部 保健医療室 地域保健感染症課

<sup>\*3</sup>大阪府守口保健所

Measles misdiagnosed as rubella: a case report

大阪府内における風疹の流行状況と実験室診断

倉田貴子\*

臨床とウイルス, 42, 52-55 (2014)

2012年から2013年にかけて、全国的に風疹が大流行している。大阪府内においても、風疹患者数は2011年から徐々に増加し始め、2013年には患者数が3000人にも及ぶ大流行がみられている。患者の大部分は全国的な傾向と同様に20-30歳代の男性で、風疹ワクチン未接種世代である。この風疹の流行に伴い発生する先天性風疹症候群 (Congenital Rubella Syndrome: CRS) 予防のために、大阪府内では第20週から風疹のワクチン接種に対する助成が始まり、感染拡大阻止のための取り組みが行われている。府内では風疹だけにとどまらず、麻疹の散発的な発生もみられており、その中には風疹と診断された後に麻疹であることが明らかになった事例も見られた。麻疹と風疹は臨床症状からの判別が困難な場合もあるため、国内からの麻疹と風疹排除にむけて、今後は検査診断と実験室診断が重要になるものと考えられる。

Prevalence and epidemiological traits of HIV infections in Populations with high-risk behaviours as revealed by genetic analysis of HBV

Y. KOJIMA<sup>\*1</sup>, T. KAWAHATA<sup>\*1</sup>, H. MORI<sup>\*1</sup>, K. FURUBAYASHI<sup>\*2</sup>, Y. TANIGUCHI<sup>\*3</sup>, A. IWASA<sup>\*4</sup>, K. TANIGUCHI<sup>\*5</sup>, H. KIMURA<sup>\*6</sup> and J. KOMANO<sup>\*1</sup>

Epidemiology and Infection, 141, 2410-2417 (2013)

2006年から2011年に大阪府内の性感染症関連診療所5箇所に来院したHIV感染に関してリスクが高い行動をとっていると思われる受診者を対象にHIV、HBV、TPの血清学的診断を行った。7,898例の検体について血清学的診断を行った結果、HIV陽性は1.7%(133例)であった。そのうち24.1%(32例)は医師がHIV検査を勧奨して陽性が判明した例であった。また、HIV陽性例の63.2%はHBVに、44.4%はTPに感染歴があることが明らかとなった。HIV陽性群におけるHBV陽性率はHIV陰性対照群と比べて有意に高かった(P<0.001)。また、HIV陽性例の11.3%(15例)がHBs抗原陽性であり、core領域に基づくHBVジェノタイプはAeが9例(60%)、Gが3例(20%)と外国型のHBV割合が高い事も示された。

これらのことより、問診や性感染症の有無により性感染症関連診療所の医師が積極的に検査勧奨を行う事により、HIVの早期発見・早期治療に貢献する事が明らかとなり、HIV検査を行っていく上での具体的な数値が示されたと考える。

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課

<sup>\*2</sup> そねざき古林診療所

<sup>\*3</sup> 太融寺町谷口医院

<sup>\*4</sup> 岩佐クリニック

<sup>\*5</sup> 谷ロレディースクリニック

<sup>\*6</sup> 木村クリニック

HBVの遺伝子解析により示された、リスクの高い行動をとる集団におけるHIV感染の流行と疫学的調査

\*大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課

Rubella outbreak and laboratory diagnosis in Osaka prefecture, 2013.

地方自治体における感染症発生動向調査関連業務の改善を目的とした性感染症発生動向調査活用ガイドラインについて

山岸拓也\*1, 尾本由美子\*2, 川畑拓也\*3, 白井千香\*4, 高野つる代\*5, 多田有希\*1, 堀 成美\*6, 山内昭則\*7, 中瀬克己\*8

日本性感染症学会誌、Vol.24, No.1 57-62 (2013)

性感染症発生動向調査は国レベルの性感染症サーベイランスであり、異動が多い地方自治体担当者は、疾患や業務に関する十分な知識や経験が無いまま業務を開始することが多い。そこで彼ら向けに性感染症発生動向調査活用ガイドラインを作成した。ガイドラインでは担当になった時や報告受理時の確認点、図表の作成や提示、疾患毎の特殊性、地域での結果利用方法等に加え、性感染症の検査を取り上げた。公開1カ月後に行った地方自治体のエイズ・性感染症対策担当者向けアンケートでは、本ガイドラインは約半数に認知されており、項目の中では疾患毎のデータの特殊性、報告受理時にすること、還元情報について、などが参考になった項目に挙げられた。また、今後まだ認知が進んでいない保健所などへの普及を図ることが重要であると考えられた。本ガイドラインの利用は、性感染症に取り組む関係者間での理解を深め、性感染症のまん延防止に寄与すると考えられた。

HIV 急性感染期の診断における第4世代 HIV 迅速検査試薬の性能評価

川畑拓也\*1, 長島真美\*2, 貞升健志\*3, 小島洋子\*1, 森 治代\*1

感染症学雑誌、87(4)、431-434 (2013)

エスプライン HIV Ag/Ab の HIV 急性感染期における検査性能を評価するため、第4世代 ELISA 法、第3世代 PA 法、WB 法および核酸増幅法と比較した。25例の急性感染期患者検体を検査したところ、エスプライン HIV Ag/Ab は18例(72%)を陽性と判定し、他の検査は第4世代 ELISA 法25例(100%)、第3世代 PA 法17例(68%)、核酸増幅法25例(100%)であった。WB 法では7例が陰性、18例が判定保留であった。エスプライン HIV Ag/Ab で陽性となった18例のうち、16例(64%)は抗体のみに反応した。抗原に反応したものは2例(8%)で、それらのウイルスコピー数は共に  $10^7$  コピー/mL 以上であった。これは非常に高いレベルのウイルス血症を呈した場合のみエスプライン HIV Ag/Ab で抗原が検出可能であることを示唆する。以上をまとめると、エスプライン HIV Ag/Ab の急性感染期における検出感度は第4世代 ELISA 法よりも低く、第3世代 PA 法と同程度であり、急性 HIV 感染診断への応用には十分な検討が必要と思われた。

\*1 国立感染症研究所感染症疫学センター

\*2 江東区城東保健相談所

\*3 阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

\*4 神戸市保健所

\*5 横浜市磯子区役所福祉保健センター

\*6 国立国際医療研究センター

\*7 三重県保健環境研究所

\*8 岡山市保健所

Guidelines for making the best use of the national sexually transmitted infection surveillance system by local governments in Japan

\*1 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

\*2 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

\*3 同 微生物部

Evaluation of Immunochromatographic Fourth Generation Test for the Rapid Diagnosis of Acute HIV Infection

Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance.

K. SHIMUTA<sup>\*1</sup>, M. UNEMO<sup>\*2</sup>, S. NAKAYAMA<sup>\*1</sup>,  
T. MORITA-ISHIHARA<sup>\*1</sup>, M. DORIN<sup>\*1</sup>,  
T. KAWAHATA<sup>\*3</sup> and M. OHNISHI<sup>\*1</sup>,  
ANTIBIOTIC-RESISTANT GONORRHEA STUDY  
GROUP.

Antimicrob. Agents Chemother. , **57**(11), 5225-5232  
(2013)

2009年に最初のセフトリアキソン高度耐性淋菌株 H041 が検出された京都府と、近隣の大阪府で検出後開始された強化サーベイランスにおいて、2010～2012年の間に193の淋菌分離株を集め、セフトリアキソンを含む6つの抗菌薬へのMICを決定した。全ての分離株はセフトリアキソンとセフィキシムとスペクチノマイシンに対して感受性を示し、アジスロマイシン、ペニシリンGとシプロフロキサシンに対する耐性（低感受性）の率は、3.6%（19.7%）、24.4%（71.0%）と78.2%（0.5%）であった。MLST型別は、分離株の40.9%、19.2%、17.1%がST1901、ST7359、ST7363にそれぞれ属していることを示し、さらにNG-MAST型別により、セフトリアキソンに対して感受性が低下した19株のうち12株（63%）が、分離株で最も一般的（31/193, 16.1%）なST1407であることが分かった。

京都府と大阪府の強化サーベイランスではH041の伝播を全く認めず、H041が散发例だけを引き起こし、拡大しなかったことが示唆された。

<sup>\*1</sup> 国立感染症研究所

<sup>\*2</sup> WHO Collaborating Centre for Gonorrhoea and other STIs

<sup>\*3</sup> 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

京都府と大阪府における淋菌分離株の抗菌薬耐性変異と分子タイプリング（2010-2012、日本）：最初の高水準セフトリアキソン耐性株（H041）検出後の強化サーベイランス

Detection of Polybrominated Diphenyl Ethers in Culture Media and Protein Sources Used for Human In Vitro Fertilization

K. AKUTSU<sup>\*1</sup>, S. TAKATORI<sup>\*1</sup>, H. NAKAZAWA<sup>\*2</sup> and  
T. MAKINO<sup>\*3</sup>

Chemosphere, 92, 864-869 (2013)

ポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）は、過去に難燃剤として広く使用されてきたが、現在では残留性有機汚染物質として野生生物やヒトへの悪影響が懸念されている化学物質である。今回、厚生労働科学研究（牧野班）の一環として、市販の体外受精用培養液および培養液に添加する血漿タンパク製剤を対象にPBDEsの分析を行った。

その結果、血漿タンパク製剤およびこれらを配合した培養液から微量レベルではあるが高頻度でPBDEsを検出した。検出されたPBDEsの異性体組成比は、PBDEsの代表的な市販工業原体のパターンとは一致せず、ヒト血液試料からの一般的な検出パターンに類似していた。したがって、今回検出されたPBDEsは、培養液や血漿タンパク製剤の製造工程で新たに混入したものではなく、血漿タンパク製剤の原料となるヒト血液の汚染（血液提供者のPBDEs汚染）に由来するものと結論した。

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所

<sup>\*2</sup> 星薬科大学

<sup>\*3</sup> 公益社団法人 有隣厚生会 東部病院（現所属：公益社団法人 有隣厚生会 富士小山病院）

ヒト体外受精用の培養液およびタンパク製剤からのポリ臭素化ジフェニルエーテルの検出

Inhalation and Dietary Exposure to Dechlorane Plus and Polybrominated Diphenyl Ethers in Osaka, Japan

K. KAKIMOTO<sup>\*1</sup>, H. NAGAYOSHI<sup>\*1</sup>, S. TAKAGI<sup>\*1</sup>,  
K. AKUTSU<sup>\*1</sup>, Y. KONISHI<sup>\*1</sup>, K. KAJIMURA<sup>\*1</sup>,  
K. HAYAKAWA<sup>\*2</sup> and A. TORIBA<sup>\*2</sup>

Ecotoxicol. Environ. Saf., 99, 69-73 (2014)

デクロラン・プラス(DP)は、殺虫剤や難燃剤として用いられ使用禁止となった Mirex (Dechlorane) の代替品として登場し 1960 年代から生産されている塩素系難燃剤である。近年、DP が生体内においてまた環境中において残留性を有する事、また生物に対して悪影響を有することが判明している。

今回、トータルダイエツトスタディー (TDS) 試料及び大気粉塵試料中の難燃剤 (DP、ポリ臭素化ジフェニルエーテル PBDE) を調査した結果 TDS 試料中から最大でおよそ 3 pg/g の DP および 300 pg/g の PBDE が、大気粉塵試料中から最大でおよそ 15 pg/m<sup>3</sup> の DP および 20 pg/m<sup>3</sup> の PBDE が検出された。本研究により、初めて国内の吸入および喫食経路による DP 曝露量を算定することができた。それらは海外における既知の報告と大差なく、ヒトに影響を与える濃度ではないことが明らかとなった。

A Rapid and Simple Method for the Determination of 2-Alkylcyclobutanones in Irradiated Meat and Processed Foods

Y. KITAGAWA<sup>\*1,3</sup>, M. OKIHASHI<sup>\*1</sup>,  
S. TAKATORI<sup>\*1</sup>, K. KAJIMURA<sup>\*1</sup>, H. OBANA<sup>\*1</sup>,  
M. FURUTA<sup>\*2</sup> and T. NISHIYAMA<sup>\*3</sup>

Food Analytical Methods, 7, 1066-1072 (2014)

放射線照射により食品中の脂肪酸から特異的に生成する 2-アルキルシクロブタノンを指標とした食品の放射線照射履歴の迅速かつ簡便な検知法の開発を行った。現在厚生労働省が通知する公定法は、抽出にソックスレー抽出装置、精製には含水フロリジルを充填したカラムを用いるため、前処理に長時間有し、多検体の処理が困難であった。本研究では、振とう抽出、脱脂、およびシリカゲルカラム精製を組み合わせた分析法を構築した。検知指標としては、パルミチン酸由来の 2-ドデシルシクロブタノン

(DCB) およびステアリン酸由来の 2-テトラデシルシクロブタノン (TCB) を用いた。本分析法を用いて、牛肉、豚肉、チーズ、ハンバーグ等 7 種の食品を対象とした添加回収試験を行った結果、DCB および TCB の平均回収率は、それぞれ 67-88%、70-86% であった。また、実際に 1kGy および 2.6kGy の放射線を照射した照射試料を測定した結果、全ての照射試料から DCB および TCB が検出され、線量依存的な生成量の増大が認められた。本方法を用いて前処理に必要な時間は約 8 時間であり、通知法の約 2 日に比較して迅速な方法であった。また、特殊な装置も必要でないことから、簡便性、汎用性にも優れた方法であると考えられた。以上のことから本法は、食品の放射線照射履歴の検知法として有用であると考えられた。

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

<sup>\*2</sup> 金沢大学

大阪における大気および食品経路デクロラン・プラス及びポリ臭素化ジフェニルエーテル曝露量評価

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所

<sup>\*2</sup> 大阪府立大学

<sup>\*3</sup> 関西医科大学

照射食肉および照射加工食品中の 2-アルキルシクロブタノンの迅速簡便な分析法の開発

LC-MS/MS を用いた迅速な野菜類および果実類中の  
残留農薬一斉分析法の妥当性評価

高取 聡\*, 山本遥菜\*, 福井直樹\*, 山口聡子\*,  
北川陽子\*, 柿本 葉\*, 小阪田正和\*, 起橋雅浩\*,  
梶村計志\*, 尾花裕孝\*

食品衛生学雑誌, 54, 237-249 (2013)

独自に開発した残留農薬一斉分析法について、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(以下、ガイドライン) に則って評価を行った。本法は、ポリプロピレン製遠心管に採取した試料をアセトニトリルで抽出後、塩化ナトリウム、無水硫酸マグネシウムおよびクエン酸塩を添加して塩析・脱水し、得られたアセトニトリル相をグラファイトカーボン/PSA 積層カラム(かんきつ類ではC18カラムを追加する)で精製し、LC-MS/MSで分析する。本法を8種類の野菜類および果実類に適用した。各食品に0.01および0.05 µg/gになるように161種類の農薬を添加して、各濃度において分析者1名が併行数2で5日間の枝分かかれ試験を行い、真度、併行および室内精度を算出した。その結果、両濃度で8種類全ての野菜類および果実類についてガイドラインに示される目標値を満たした農薬は127種類であった。

加工食品原材料中における残留農薬濃度の  
推定の試み

福井直樹\*, 高取 聡\*, 北川陽子\*,  
起橋雅浩\*, 梶村計志\*, 尾花裕孝\*

食品衛生学雑誌, 54, 392-396 (2013)

加工食品から一律基準値を超えて残留農薬が検出された場合、その基準適合性を判断するために、製品を構成する原材料の残留基準への適合性を検証する必要がある。しかし、製品に使用された原材料を入手することが困難であることが多い。

本研究では実際にパクロブトラゾールが検出された2種類の高菜漬けを用いて、原材料である加工前の高菜中のパクロブトラゾール濃度の推定を試みた。

当該高菜漬けは製品重量の99.8%以上を占める高菜および漬け汁と、ごまの種子または唐辛子が混在していた。

高菜漬けを原材料ごとに分別し、高菜および漬け汁中のパクロブトラゾールを分析した。漬け汁中には、高菜中の約1/10倍濃度のパクロブトラゾールが検出された。

また、高菜漬け中の高菜は、加工により水分が減少している。その割合を加工係数として、日本食品成分表から算出した。

分析により得られた高菜漬け中の高菜のパクロブトラゾール濃度から、加工係数を考慮して、加工前の高菜に含まれていた濃度を推定した。

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Validation Study on a Rapid Multi-residue Method for Determination of Pesticides Residues in Vegetables and Fruits by LC-MS/MS

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Trial for Estimating the Concentration of Pesticide Residues in the Ingredients of Processed Foods

LC-MS/MS による農産物を主原料とした加工食品中の残留農薬一斉分析法の検討

福井直樹\*, 高取 聡\*, 北川陽子\*,  
起橋雅浩\*, 梶村計志\*, 尾花裕孝\*

食品衛生学雑誌, 54, 426-433 (2013)

農産物を主原料とした加工食品を対象として、迅速な農薬の一斉分析法を検討した。

均一化した試料 5 g に水 5 mL を加えて室温で 30 分間放置後、アセトニトリル 20 mL を加えてホモジナイズ抽出した。塩化ナトリウム 1 g および無水硫酸マグネシウム 4 g を加えて塩析・脱水した。分離した有機層をグラファイトカーボン/PSA カートリッジを用いて精製し、LC-MS/MS で測定した。

93 農薬について、白菜キムチ、マーマレード、レーズン、梅干しおよびウスターソースで添加回収試験 (0.02 および 0.1  $\mu\text{g/g}$  添加、5 試行) を実施した。

その結果、すべての食品において平均回収率 70 ~120% (併行精度 20%以下) を満たした農薬数は、61 農薬であった。

本法により市販の加工食品 74 品目について実態調査を行ったところ、2 品目で食品衛生法の一斉基準値を超過した。

分散固相および固相カートリッジを用いた LC-MS/MS による食肉中の動物用医薬品一斉分析法

山口貴弘\*, 柿本健作\*, 永吉晴奈\*, 山口瑞香\*,  
起橋雅浩\*, 梶村計志\*

食品衛生学雑誌, 54, 290-297 (2013)

分散固相および固相カートリッジカラムを用いた LC-MS/MS による食肉中の動物用医薬品一斉分析法を開発した。試料に 85%アセトニトリル水溶液を加えて分析対象成分を抽出し、ODS 分散固相およびポリマー系固相カートリッジカラムを用いて精製を行うことにより多成分の一斉分析が可能となった。牛肉、豚肉、鶏肉を用いて添加濃度(0.002  $\mu\text{g/g}$ 、0.01  $\mu\text{g/g}$ )での妥当性評価を実施した。その結果、動物用医薬品妥当性評価対象 70 成分に対し、牛肉が 64 成分、豚肉が 58 成分、鶏肉が 49 成分で妥当性ガイドラインの目標値を満した。各動物用医薬品の定量下限は 0.001  $\mu\text{g/g}$  または 0.005  $\mu\text{g/g}$  であった。

---

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Study of Multi-residue Method for Determining Pesticide Residues in Processed Foods Manufactured from Agricultural Products by LC-MS/MS

---

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Simultaneous Determination of Veterinary Drugs in Livestock Products Using Dispersive and Cartridge Column Solid-Phase Extraction by LC-MS/MS

A New method for Rapid and Quantitative Detection of the *Bacillus cereus* Emetic Toxin Cereulide in Food Products by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Analysis

M. YAMAGUCHI<sup>\*1</sup>, T. KAWAI<sup>\*2</sup>, M. KITAGAWA<sup>\*3</sup> and Y. KUMEDA<sup>\*2</sup>

Food Microbiology, 34, 29-37 (2013)

LC-MS/MS を用いた食品中のセレウス菌嘔吐毒セレウリドの迅速分析法を構築した。食品中から抽出したセレウリドをシリカゲル固相抽出カラムで精製し、LC-MS/MS にて分析した。検出下限および定量下限は 0.1、0.5 ng/g であった。9 種類の食品を用いた添加回収試験では、平均回収率は 67% 以上であった。米飯を用いた日間併行精度試験の結果は真度 87%、併行精度 4%、室内精度 7% であった。本研究で開発した方法と HEp-2 細胞空胞化試験には高い相関性が認められた。

以上の結果より、本法はセレウリドの迅速定量分析に有用な方法であると考えられた。

A Simple and Selective Detection Method for Aristolochic Acid in Crude Drugs using Solid-Phase Extraction

T. TAGAMI<sup>\*1</sup>, A. TAKEDA<sup>\*1</sup>, A. ASADA<sup>\*1</sup>, A. AOYAMA<sup>\*1</sup>, T. DOI<sup>\*1</sup>, M. KAWAGUCHI<sup>\*1</sup>, K. KAJIMURA<sup>\*1</sup>, Y. SAWABE<sup>\*1</sup>, H. OBANA<sup>\*1</sup>, K. YAMASAKI<sup>\*2</sup>

J. Nat. Med, 67, 838-843 (2013)

サイシン中のアリストロキア酸 I を分析するための HPLC を用いる公定法は日本薬局方に記載されている。HPLC を用いた分析では、アリストロキア酸 I が含まれていない場合においても、アリストロキア酸 I 付近に妨害となるピークが出現する場合がある。このことから、アリストロキア酸が含まれているかどうかを判定するための選択的な分析法が求められている。本研究では、LC/MS と固相抽出法を組み合わせた選択的な分析法を開発した。本分析法は、生薬の品質管理に有用であると考えられる。

---

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

<sup>\*2</sup> 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部

<sup>\*3</sup> テルモ山口株式会社

LC-MS/MSによる食品中のセレウス菌嘔吐毒セレウリドの迅速分析法

---

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

<sup>\*2</sup> いわき明星大学

固相抽出を用いた生薬中のアリストロキア酸の簡便かつ選択的な検出法

Simultaneous Identification of 18 Illegal Adulterants  
in Dietary Supplements by using High-Performance  
Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

T. TAGAMI\*, A. AOYAMA\*, A. TAKEDA\*,  
A. ASADA\*, T. DOI\*, K. KAJIMURA\*,  
Y. SAWABE\*

Food Hyg. Saf. Sci. 55, 34-40 (2014)

強壯効果を標榜したいいわゆる健康食品からは、医薬品成分が検出された事例がある。また、近年では摘発を逃れるために、強壯効果のある医薬品成分の構造の一部を変えた医薬品成分類似体が検出される事例がしばしば見受けられる。健康食品中の多数の成分を効率的に分析するためには、一斉分析法が必要である。そこで、LC/MSを用い、強壯効果を標榜する健康食品に添加される恐れのある18種類の化合物の一斉分析法について検討した。

その結果、今回検討した分析法は、強壯効果を標榜する健康食品に添加される恐れのある18種類の医薬品成分を分析することが可能であると考えられた。このことから、今回検討した分析法は、健康食品中の医薬品成分の効率的な検査法の一つとして有用であると考えられる。

Simultaneous Identification of  
Hydroxythiohomosildenafil, Aminotadalafil,  
Thiosildenafil, Dimethylsildenafil, and  
Thiodimethylsildenafil in Dietary Supplements using  
High-performance Liquid Chromatography-mass  
Spectrometry

T. TAGAMI\*, A. TAKEDA\*, A. ASADA\*,  
A. AOYAMA\*, T. DOI\*, K. KAJIMURA\*,  
Y. SAWABE\*

Food Hyg. Saf. Sci. 54, 232-236 (2013)

LC/MSを用い、5種類の医薬品成分（ヒドロキシチオホモシルデナフィル、アミノタダラフィル、チオシルデナフィル、ジメチルシルデナフィル、チオジメチルシルデナフィル）が添加された強壯用健康食品中に存在する全ての医薬品成分を一斉に分離、同定できる分析法を確立した。本分析法は、5種類の医薬品成分にバルデナフィル、ホモシルデナフィルを加えた7成分を一斉に分析することも可能であった。以上のことから、本分析法は、強壯用健康食品に添加された医薬品成分の分析に有用であると考えられた。

---

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

LC/MSを用いた健康食品中の18種類の違法添加物を対象とした一斉分析

---

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

LC/MSを用いた健康食品中のヒドロキシチオホモシルデナフィル、アミノタダラフィル、チオシルデナフィル、ジメチルシルデナフィル、チオジメチルシルデナフィルの一斉分析

大阪府水道水質検査外部精度管理  
-シアン化物イオン及び塩化シアン（平成 22 年度）-

中島孝江\*<sup>1</sup>、宮野啓一\*<sup>1</sup>、田中榮次\*<sup>1</sup>、尾沼大輔\*<sup>2</sup>、  
木村直昭\*<sup>2</sup>、足立伸一\*<sup>1</sup>

水道協会雑誌,82(5),11-18(2013)

平成 22 年度大阪府水道水質検査外部精度管理として、シアン化物イオン及び塩化シアンの検査値を、「真値」に対する誤差率が±10%以内と Z スコアの絶対値が 3 未満であるの 2 つの方法で評価した。報告された 28 検査値の内、「真値」に対する誤差率が±10%を超過した機関は 3 機関であった。また、Z スコアの絶対値が 3 を超過した機関は 2 機関であった。両方法で許容範囲を超えた検査値を「外れ値」と評価したが、この「外れ値」になったのは 2 機関であった。これらのことからシアン化物イオン及び塩化シアンに関する外部精度管理は概ね良好な結果であったと考えられた。

「外れ値」の原因等を検証した結果、検査精度を向上するためには、以下の留意点が考えられた。

- (1) シアン化物イオン標準原液は検査する前に標定を行う。
- (2) シアン化物イオンからの塩化シアンの生成は適切な条件（反応温度と時間）で行う。
  - ・クロラミン T を 0°C で加える場合は 2 時間以上反応させる。
  - ・塩化シアンの減少を避けるため、反応時間は 4 時間以内とする。

レジオネラ検査ろ過濃縮法におけるメンブレンフィルター材質の回収率比較

枝川亜希子\*<sup>1</sup>、木村明生\*<sup>2</sup>、三輪由佳\*<sup>3</sup>、田中榮次\*<sup>1</sup>、  
足立伸一\*<sup>1</sup>、宮本比呂志\*<sup>4</sup>

防菌防黴, 41(2), 63-66(2013)

レジオネラ検査ろ過濃縮法におけるメンブレンフィルター材質の回収率について、比較検討を行った。その結果、検討した 6 材質 10 種のメンブレンフィルターのうち、ポリカーボネートの回収率（80.9-89.8%）が他の材質（20.1- 62.0%）に比べて有意に高い回収率を示した。本研究により、メンブレンフィルター材質によって水試料からのレジオネラ回収率に影響があることが明らかとなり、ポリカーボネートが有用であることが示唆された。

\*<sup>1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部 生活環境課

\*<sup>2</sup> 大阪府健康医療部環境衛生課

Results of External Quality Control on the Analytical Measures for Tap Water in Osaka Prefecture - Cyanide ion and Cyanogen chloride (2010) -

\*<sup>1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

\*<sup>2</sup> 大阪府立公衆衛生研究所 企画総務部

\*<sup>3</sup> 大阪府立環境農林水産総合研究所 食の安全研究部

\*<sup>4</sup> 佐賀大学 医学部

Comparison of Various Membrane Filter Materials for the Recovery of *Legionella pneumophila* from Water Samples.

低負荷家庭用浄化槽の間欠ばっ気運転による  
省電力化と水質への影響

中野 仁<sup>\*1</sup>、奥村早代子<sup>\*1</sup>、井上俊行<sup>\*2</sup>、  
近藤伊知朗<sup>\*2</sup>

浄化槽研究,25(3),1-7(2013)

少子高齢化にともない、家庭用小型浄化槽の設置人槽に対し、実使用人員が少なくなっている施設が増えてきている。このような場合でも 24 時間連続ばっ気を行っているのが実状であるが、これを間欠ばっ気運転にすることにより、浄化槽の機能にどのような影響があるのかについて、担体流動生物ろ過方式で人槽に対して実使用人員の割合が 0.4 程度までの 4 基を対象に、次回清掃時期までの約 1 年間調査した。

断続的に 1 日 10 時間のばっ気停止を行ったが、4 施設、処理水計 37 試料のすべてで透視度が 50cm 以上と良好で、BOD が 10mg/L を超えたのは 1 試料 (11mg/L) だけであった。このことから、今回調査対象とした浄化槽では、間欠ばっ気が処理機能に与える影響はほとんどないと考えられた。また、今回調査した浄化槽で 7 人槽 (ブロワ消費電力 51W) の場合、消費電力量は 10 時間のブロワ停止を行うと、本来必要な 36.7kWh/月に対し 15.3kWh/月が削減でき、これを二酸化炭素の排出量に換算すると、関西電力の排出量算定係数を用いた場合 6.33kg/月 (= 0.414kg-CO<sub>2</sub>/kWh × 15.3kWh/月) (76.0kg/年) が削減された。

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部 生活環境課

<sup>\*2</sup> 大阪府豊能町 上下水道部 工務課

Effect of Intermittent Aeration on Power Consumption and Water Quality in the Case of Low-loading Household Johkasou

Development of a Gaseous Nitrous Acid Generation  
System for Animal Exposure Experiments

M. OHYAMA<sup>\*1</sup>, K. OKA<sup>\*2</sup>, S. ADACHI<sup>\*3</sup> and  
N. TAKENAKA<sup>\*4</sup>

J Clin Toxicol, 3, 165 (2013)

ppb レベルの亜硝酸を発生させる装置はすでに開発されており、様々な実験に用いられている。しかし、それらのシステムを ppm レベルで 20 L/min 程度の風量で連続的に発生させる必要がある動物曝露実験に用いることは困難であった。

我々はすでに動物曝露実験用の亜硝酸ガス発生装置を開発し、モルモットに 3.6 ppm の亜硝酸を 4 週間連続曝露し、肺の組織学的検索を行ったが、0.3 ppm の二酸化窒素と 1.6 ppm の一酸化窒素の副生を伴っていた。

今回、二酸化窒素や一酸化窒素の副生割合を削減することを目的に動物曝露実験用の新たな亜硝酸ガス発生装置を開発したので報告する。装置は亜硝酸ナトリウム水溶液と乳酸水溶液を混合し、多孔質のポリテトラフルオロエチレンチューブ内腔に噴霧し、そのチューブ外側に通過したガスを動物曝露チェンバーに送るものである。装置作製の注意点を含め、装置の具体的な構造を記載した。

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所

<sup>\*2</sup> 大阪府環境農林水産総合研究所

<sup>\*3</sup> 相模女子大学

<sup>\*4</sup> 大阪府立大学大学院工学研究科

動物曝露実験用の亜硝酸ガス発生装置の開発

有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中のトリス（2,3-ジブロムプロピル）ホスフェイト分析法の改定に向けた検討

味村真弓\*1、中島晴信\*1、\*2、吉田 仁\*1、  
吉田俊明\*1、河上強志\*2、伊佐間和郎\*2

YAKUGAKU ZASSHI, 134(2), 259-268(2014)

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」により繊維製品への使用が禁止されている TDBPP の公定法を改定するために、キャピラリー GC/MS を用いた分析法の検討を行った。検討の過程で、TDBPP はキャピラリーカラムによる GC/MS 測定時に分解する現象が観察された。しかし、メガボアカラムを用いた、直接導入法による GC/FPD 測定では分解現象が観察されなかった。2.0~100 µg/mL の範囲で、 $Y=2572X^{1.416}$  の 2 次曲線を示す検量線が得られた。検出限界は、 $S/N=3$  として 1.0 µg/mL で、繰り返し注入の再現性も良好であった。メタノール抽出後、シクロヘキサンー精製水で液液分配し、フロリジルカラムによる精製を行う前処理法を確立した。市販製品への添加回収率実験を行い、100%前後の良好な回収率を得た。この分析法で、市販製品 5 製品を分析したが、いずれの製品からも TDBPP は検出されなかった。次に、TDBPP が GC/MS 測定時に分解する原因を究明するため、化学イオン化法での GC/MS 測定、GC/FPD や GC/FID 測定を行った。TDBPP は、GC の注入時、特にスプリットレス注入法で熱分解すること、さらにカラム及びイオン源内でも分解する可能性が示唆された。そこで、注入口に石英ライナーを用い、カラムの長さを半分（15m）としたところ、1つのピークとなった。

---

\*1 大阪府立公衆衛生研究所

\*2 国立医薬品食品衛生研究所

Study for the Revision of Analytical Method for

Tris (2,3-dibromopropyl) phosphate with Restriction in Textiles

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

**CONTENTS**

**—RESEARCH REPORTS—**

West Nile Virus Surveillance in Osaka Prefecture (Fiscal 2013 Report)

T.YUMISASHI, I.AOYAMA, Y.OGAWA, H.MATSUMOTO, K.FUKUMURA, Y.MATSUI,  
K.NAKANISHI, T.HIRATA, E.TSUJINO, T.KASE and K.TAKAHASHI ..... 1

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture  
(Fiscal 2013 Report)

K. NAKATA, K. YAMAZAKI, N. SAKON ,A. KOMANO and T. KASE ..... 7

Validation of Multi-residue Method for the Determination of Antibiotics in Milk by LC-  
MS/MS

K. UCHIDA, K. KAKIMOTO, T. YAMAGUCHI, H. NAGAYOSHI, M. OKIHASHI,  
Y. KONISHI and K. KAJIMURA ..... 15

Stability of Antibiotics in Solutions

K. UCHIDA, K. KAKIMOTO, T. YAMAGUCHI, H. NAGAYOSHI, M. OKIHASHI,  
Y. KONISHI and K. KAJIMURA ..... 21

Detecting Unintentional Contamination of Wheat and Shrimp in Foods Examined in Fiscal  
Years 2009-2013

K. KIYOTA, M. YOSHIMITSU, C. NOMURA, K. AWAZU, M. YAMAGUCHI,  
Y. KAKIMOTO-OKAMOTO, S. KAKIMOTO, K. AKUTSU and K. KAJIMURA ..... 27

Determination of Indoxacarb and Fipronil in Oolong Tea Leaves

S. YAMAGUCHI, S. TAKATORI, Y. KITAGAWA, N. FUKUI, H. YAMAMOTO,  
K. KAJIMURA and H. OBANA ..... 30

Surveillance of Benzotriazole UV Stabilizers in Seafoods

T. YAMAGUCHI, K. KAKIMOTO, H. NAGAYOSHI, Y. KONISHI and K. KAJIMURA ..... 35

Food-poisoning Outbreak Caused by Gourd

M. YAMAGUCHI, C. NOMURA, K. KIYOTA and K. KAJIMURA ..... 41

Detection of Approved Genetically Modified Soybean in Foods (2001-2013)

M. YOSHIMITSU, K. KIYOTA, C. NOMURA, K. AWAZU, M. YAMAGUCHI, S. KAKIMOTO, K. AKUTSU, S. TAKATORI, K. KAJIMURA and H. OBANA .....	44
Results of External Quality Control on the Analytical Measures for Tap Water in Osaka Prefecture—1,4-Dioxane (2011)—	
Y. KOIZUMI and S. ADACHI .....	49
Results of External Quality Control on the Analytical Measures for Tap Water in Osaka Prefecture—TOC (2012)—	
Y. KOIZUMI and S. ADACHI .....	53
The Study about Heat Inactivation of Microorganism Contained in the Excess Sludge generated from Domestic Wastewater Treatment	
H. NAKANO and S. ADACHI .....	58
Survey of Environmental and Food Radioactivity in Osaka Prefecture (Fiscal 2013 Report)	
T. HIZUKA, E. AZUMA and S. ADACHI .....	67
—DATA—	
Report of 17th one-day workshop — toward the development of enjoyable science experiments	
K. AKUTSU, K. KIYOTA, T. YOSHIDA, A. KIMURA, K. KAJIMURA and H. OBANA .....	75
—ABSTRACTS—	
Biomarkers for monitoring transfluthrin exposure: Urinary excretion kinetics of transfluthrin metabolites in rats	
T. YOSHIDA .....	91
A Coprological Survey of Intestinal Helminthes in Stray Dogs Captured in Osaka Prefecture, Japan	
A. KIMURA, Y. MORISHIMA, S. NAGAHAMA, T. HORIKOSHI, A. EDAGAWA, T. KAWABUCHI-KURATA, H. SUGIYAMA and H. YAMASAKI .....	91
Evaluation of JATA(12)-Variable Number of Tandem Repeat for Identification of the Source of Tuberculosis Outbreaks in Osaka (in Japanese)	
A. TAMARU, T. WADA, T. IWAMOTO and A. HASE .....	92
Enterovirus (in Japanese)	
T. MUNEMURA, K. NAKATA, H. NISHIMURA and N. SAKON .....	92

Investigation of the new quick-drying hand sanitizer against various viruses (in Japanese)	
K. YAMAZAKI and K. NAKATA .....	93
Molecular epidemiology of human adenoviruses D associated with epidemic keratoconjunctivitis in Osaka, Japan, 2001-2010	
S. HIROI, S. MORIKAWA, K. TAKAHASHI, J. KOMANO and T. KASE .....	93
Late onset of vaccine-associated measles in an adult with severe clinical symptoms: a case report	
T. KURATA, D. KANBAYASHI, H. KINOSHITA, S. ARAI, Y. MATSUI, K. FUKUMURA, H. MATSUMOTO, F. ODAIRA, A. MURATA, M. KONISHI, K. YAMAMOTO, R. NAKANO, T. OHARA, E. OTSURU, J. KOMANO, T. KASE and K. TAKAHASHI .....	94
Measles misdiagnosed as rubella: a case report (in Japanese)	
T. KURATA, D. KANBAYASHI, T. KASE, K. TAKAHASHI, Y. MATSUI, K. FUKUMURA, H. MATSUMOTO, F. ODAIRA, A. ARIMURA, H. KUBO, M. NODA, N. TSUDA and H. TAKABAYASHI .....	94
Rubella outbreak and laboratory diagnosis in Osaka prefecture, 2013 (in Japanese)	
T. KURATA .....	95
Prevalence and epidemiological traits of HIV infections in populations with high-risk behaviours as revealed by genetic analysis of HBV	
Y. KOJIMA, T. KAWAHATA, H. MORI, K. FURUBAYASHI, Y. TANIGUCHI, A. IWASA, K. TANIGUCHI, H. KIMURA and J. KOMANO .....	95
Guidelines for making the best use of the national sexually transmitted infection surveillance system by local governments in Japan (in Japanese)	
T. YAMAGISHI, Y. OMOTO, T. KAWAHATA, C. SHIRAI, T. TAKANO, Y. TADA, N. HORI, A. YAMAUCHI and K. NAKASE .....	96
Evaluation of Immunochromatographic Fourth Generation Test for the Rapid Diagnosis of Acute HIV Infection (in Japanese)	
T. KAWAHATA, M. NAGASHIMA, K. SADAMASU, Y. KOJIMA and H. MORI .....	96
Antimicrobial resistance and molecular typing of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> isolates in Kyoto and Osaka, Japan in 2010-2012: intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance	

K. SHIMUTA, M. UNEMO, S. NAKAYAMA, T. MORITA-ISHIHARA, M. DORIN, T. KAWAHATA and M. OHNISHI; ANTIBIOTIC-RESISTANT GONORRHEA STUDY GROUP .....	97
Detection of Polybrominated Diphenyl Ethers in Culture Media and Protein Sources Used for Human In Vitro Fertilization	
K. AKUTSU, S. TAKATORI, H. NAKAZAWA and T. MAKINO .....	97
Inhalation and Dietary Exposure to Dechlorane Plus and Polybrominated Diphenyl Ethers in Osaka, Japan	
K. KAKIMOTO, H. NAGAYOSHI, S. TAKAGI, K. AKUTSU, Y. KONISHI, K. KAJIMURA, K. HAYAKAWA and A. TORIBA .....	98
A Rapid and Simple Method for the Determination of 2-Alkylcyclobutanones in Irradiated Meat and Processed Foods	
Y. KITAGAWA, M. OKIHASHI, S. TAKATORI, K. KAJIMURA, H. OBANA, M. FURUTA and T. NISHIYAMA .....	98
Validation Study on a Rapid Multi-residue Method for Determination of Pesticides Residues in Vegetables and Fruits by LC-MS/MS (in Japanese)	
S. TAKATORI, H. YAMAMOTO, N. FUKUI, S. YAMAGUCHI, Y. KITAGAWA, Y. KAKIMOTO, M. OSAKADA, M. OKIHASHI, K. KAJIMURA and H. OBANA .....	99
Trial for Estimating the Concentration of Pesticide Residues in the Ingredients of Processed Foods (in Japanese)	
N. FUKUI, S. TAKATORI, Y. KITAGAWA, M. OKIHASHI, K. KAJIMURA and H. OBANA .....	99
Study of Multi-residue Method for Determining Pesticide Residues in Processed Foods Manufactured from Agricultural Products by LC-MS/MS (in Japanese)	
N. FUKUI, S. TAKATORI, Y. KITAGAWA, M. OKIHASHI, K. KAJIMURA and H. OBANA .....	100
Simultaneous Determination of Veterinary Drugs in Livestock Products Using Dispersive and Cartridge Column Solid-Phase Extraction by LC-MS/MS (in Japanese)	
T. YAMAGUCHI, K. KAKIMOTO, H. NAGAYOSHI, M. YAMAGUCHI, M. OKIHASHI and K. KAJIMURA .....	100
A New method for Rapid and Quantitative Detection of the Bacillus cereus Emetic Toxin Cereulide in Food Products by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Analysis	

M. YAMAGUCHI, T. KAWAI, M. KITAGAWA and Y. KUMEDA .....	101
A simple and selective detection method for aristolochic acid in crude drugs using solid-phase extraction	
T. TAGAMI, A. TAKEDA, A. ASADA, A. AOYAMA, T. DOI, M. KAWAGUCHI, K. KAJIMURA, Y. SAWABE, H. OBANA and K. YAMASAKI .....	101
Simultaneous identification of 18 illegal adulterants in dietary supplements by using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry	
T. TAGAMI, A. AOYAMA, A. TAKEDA, A. ASADA, T. DOI, K. KAJIMURA and Y. SAWABE .....	102
Simultaneous Identification of Hydroxythiohomosildenafil, Aminotadalafil, Thiosildenafil, Dimethylsildenafil, and Thiodimethylsildenafil in Dietary Supplements using High-performance Liquid Chromatography-mass Spectrometry	
T. TAGAMI, A. TAKEDA, A. ASADA, A. AOYAMA, T. DOI, K. KAJIMURA and Y. SAWABE .....	102
Results of External Quality Control on the Analytical Measures for Tap Water in Osaka Prefecture — Cyanide ion and Cyanogen chloride (2010) — (in Japanese)	
T. NAKAJIMA, K. MIYANO, H. TANAKA, D. ONUMA, N. KIMURA and S. ADACHI .....	103
Comparison of Various Membrane Filter Materials for the Recovery of <i>Legionella pneumophila</i> from Water Samples (in Japanese)	
A. EDAGAWA, A. KIMURA, Y. MIWA, H. TANAKA, S. ADACHI and H. MIYAMOTO .....	103
Effect of Intermittent Aeration on Power Consumption and Water Quality in the Case of Low-loading Household Johkasou (in Japanese)	
H. NAKANO, S. OKUMURA, T. INOUE and I. KONDO .....	104
Development of a Gaseous Nitrous Acid Generation System for Animal Exposure Experiments	
M. OHYAMA, K. OKA, S. ADACHI and N. TAKENAKA .....	104
Study for the Revision of Analytical Method for Tris (2,3-dibromopropyl) phosphate with Restriction in Textiles (in Japanese)	
M. MIMURA, H. NAKASHIMA, J. YOSHIDA, T. YOSHIDA, T. KAWAKAMI,	

---

OSAKA PREFECTURAL INSTITUTE of PUBLIC HEALTH  
1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025 JAPAN

大阪府立公衆衛生研究所 研究報告  
第 52 号

---

発行年月日	平成26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