

第3章 調査研究・報告

第3節 資 料

住居環境中エアロゾルから分離された *Aspergillus* 属菌が産生する マイコトキシンのLC/MS/MSによる分析法の検討

浅野勝佳・陰地義樹・小川里恵・仲澤喜代重

Study on Determination of Mycotoxins Produced by *Aspergillus* Fungus Isolated
from the Aerosol in Housing by LC/MS/MS

Katsuyoshi ASANO・Yosiki ONJI・Ogawa Rie・Kiyoshige NAKAZAWA

緒 言

近年、シックビル症候群の原因物質としてカビ（真菌）が注目されるようになった。カビに起因するアレルギー、真菌症については一般に良く知られているが、カビの有毒代謝物による健康被害については、不明な点が多く研究者の間でも十分に認識されていなかった。2005年の米国ニューオーリンズでのハリケーン被害による水没、漏水家屋における *Stachybotrys* 属菌とその毒素によると考えられる健康被害が報告されてから、諸外国で研究の気運がたかまってきた。我が国でも高温多湿な気候風土と近年の住宅構造の変化から同様の問題が考えられる。さらに近年、住環境において、いくつかの毒素産生型 *Aspergillus* 属の存在¹⁾が知られている。今回、*Aspergillus* 属菌の有毒代謝物について、分析方法を検討し若干の知見を得たので報告する。

方 法

1. 検討対象有毒代謝物

Aspergillus 属菌の有毒代謝物(Ochratoxin A 及び B, Verruculogen, Gliotoxin) を分析方法検討の対象物質とした。また、住環境空気由来の株式会社エフシージー総合研究所 (FCG 総研) 保存株である *A.ochraceus* と *A.fumigatus* を用い分析方法の妥当性を検討した。

2. 装置

LC/MS/MS は、高速液体クロマトグラフ部分を Waters 社製 Alliance 及び、質量分析装置部分を Applied Biosystems 社製 API3000 を用いた。

3. 前処理方法

米麦粒 5g に蒸留水 4mL とペプトン水 1mL を加え 3 時間吸水させた後、高圧蒸気滅菌を施し対象 *Aspergillus* 属菌を接種した。それを 20℃ で 10 日間培養し培養試料とし、この培養試料にメタノール 20mL

を加えて抽出したものを FCG 総研から入手した。この抽出液を濾過後 (Whatoman : 1PS), 適宜希釈し LC/MS/MS 試験液 (MeOH :H₂O =1:9) とした。

結果及び考察

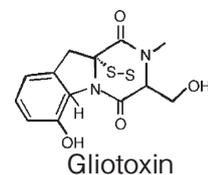
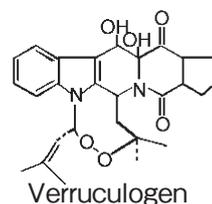
1. LC/MS/MS測定条件

1) MSの条件

今回、LC/MS/MS を用いた分析方法^{2) 3) 4)} を検討した。Ochratoxin A 及び B は Negative mode で行い、それぞれの親イオンが 402.1m/z 及び 368.1m/z, 子イオンが 357.9m/z 及び 324.0m/z で測定を行った。つぎに Verruculogen, Gliotoxin は Positive mode で行い、それぞれ親イオンが 534.3m/z 及び 326.8m/z, 子イオンが 392.0m/z 及び 263.0m/z で測定を行った。今回の Verruculogen 及び Gliotoxin の詳細な MS/MS 部分の測定条件を表 1 に示した。

表 1 Verruculogen, Gliotoxin の MS/MS 条件

Ionization	ESI Positive	
Ion Spray Voltage	+5500V	
Turbo Gas Temp	550℃	
	Verruculogen	Gliotoxin
DP (v)	+41V	+16V
FP (v)	+160V	+70V
EP (v)	+10V	+10V
CP (v)	+19V	+27V
CXP (v)	+22V	+38V
定量		
Precursor Ion [m/z]	534.3 [M+Na] ⁺	326.8 [M+H] ⁺
Product Ion [m/z]	392.0	263.0
確認		
Precursor Ion [m/z]	534.3	326.8
Product Ion [m/z]	435.0 (498.1)	244.6



2) LCの条件

今回検討した試料の前処理方法は十分なクリーンナップを施しておらずLC/MS/MSによる検出といえども、検討対象有毒代謝物 Ochratoxin A 及び B, Verruculogen と Gliotoxin の測定においては、クロマト部分で十分に分離させる必要があった。LC分離に際してはグラジエントをかけ、検討対象有毒代謝物に対するマトリックスの低減を試みた。その結果、Ochratoxin A 及び B の LC 部分の測定条件を表2に、Verruculogen と Gliotoxin の測定条件を表3に示した。

表2 Ochratoxin A及びBのLC条件

Column :	Inertsil ODS 3V (5 μ m, 2.1mm, I.D.×150mm)
Column Temp. :	40°C
Injection volume :	10 μ L
Flow rate :	0.2ml/min
Mobile phase	
Solvent A :	2mM Ammonium acetate
Solvent B :	Acetonitrile
Gradient profile	Time (min) 0 1 14 15 22
	A (%) 95 95 10 95 95

表3 Verruculogen, Gliotoxin のLC条件

Column :	Waters Symmetry C18 (5 μ m, 2.1mm, I.D.×150mm)
Column Temp. :	40°C
Injection volume :	10 μ L
Flow rate :	0.3ml/min
Mobile phase	
Solvent A :	H ₂ O
Solvent B :	Acetonitrile
Gradient profile	Time (min) 0 1 5 17 18 26
	A (%) 90 90 50 10 90 90

次に、表1及び表3において示した測定条件でVerruculogen及びGliotoxinを測定したときのクロマトグラフを図1に示した。前処理後得た測定用試料中の供雑物の影響も受けず良好なクロマトグラフを得た。

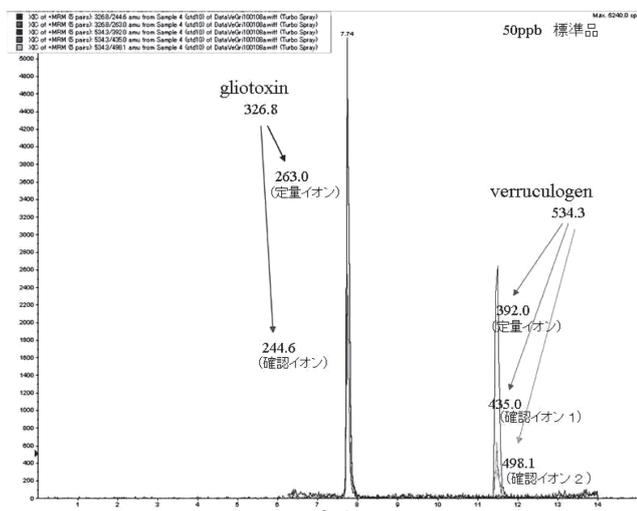


図1 VerruculogenとGliotoxinクロマトグラフ

2. 検討対象有毒代謝物の添加回収試験

今回、検討対象有毒代謝物非生産株を同様にして処理を行った後、それぞれの検討対象有毒代謝物を各希釈試料(13倍, 130倍, 1300倍希釈)に、それぞれ200ppb及び20ppbの濃度になるように添加し、その回収率を求めた。ただし、VerruculogenとGliotoxinは、あらかじめ実測用サンプルが高濃度であることがわかっていたので、1300倍濃縮時のみの添加回収試験とした。200ppbにおける回収率の結果を表4に示した。若干希釈倍率の低い試料においては、回収率は低かったが、全体的には回収率が71.2~118%であり概ね良好であった。

表4 検討対象有毒代謝物の回収率

200ppb試料の回収率		回収率 (%)		
希釈率		×13	×130	×1300
Ochratoxin A		77.1	94.6	97.2
Ochratoxin B		71.2	86.3	88.9
Verruculogen				118
Gliotoxin				94.1

次に20ppbにおける回収率の結果を表5に示した。回収率は79.2~108%, 変動係数(n=4)も4.8%~8.9%と良好であった。また、希釈倍率の下に米麦粒1gあたりの検討対象有毒代謝物量で表した場合の数値を示した。以上のことから今回の検討で、概ね米麦粒1gあたり、有毒代謝物0.1 μ g程度以上は測定が可能であることがわかった。

表5 検討対象有毒代謝物の回収率

20ppb試料の回収率と変動係数 (CV%)		×13 (0.1 μ g/g)		×130 (1 μ g/g)	×1300 (10 μ g/g)	
希釈率		回収率 (%) CV (%)		回収率 (%)	回収率 (%) CV (%)	
		Ochratoxin A	81.9		8.9	92.4
Ochratoxin B		79.2	7.5	83.8	92.5	5.4
Verruculogen				108	6.1	
Gliotoxin				89.8	4.8	

文献

- 1) K. F. Nielsen, et al : *Anal Bioanal Chem*, **395**, 1225-1242 (2009)
- 2) 飯田憲司, 他 : 化学生物総合管理第5巻第1号, 24-313, (2009)
- 3) 大橋正孝, 他 : 奈良県保健環境研究センター年報, 75-76, (2006)
- 4) Thomas Rundberget, Alistair L. Wilkins : *Journal of Chromatography A*, **964**, 189-197 (2002)

奈良県における環境放射能調査（第18報） （2010年4月～2011年3月）

奥野頼夫・大畑清嗣・仲澤喜代重

Environmental Radioactivity Survey Data in Nara Prefecture(18)
(Apr.2010-Mar.2011)

Yorio OKUNO・Kiyotsugu OHATA and Kiyoshige NAKAZAWA

緒 言

平成元年度から科学技術庁（平成13年1月からは文部科学省）委託環境放射能水準調査事業に参加し、環境放射能測定調査を継続実施している。平成22年度に実施した環境放射能水準調査測定結果について取りまとめたのでその概要を報告する。

なお、平成21年度から、環境試料（日常食）の γ 線核種分析、空間放射線量率測定（サーベイメータ）は業務内容見直しで廃止になった。また、平成23年3月11日の東日本大震災による福島原発事故以降はモニタリング強化となり、これに対応した。

調査方法

1. 調査対象

定時降水中の全 β 放射能、大気浮遊じん・降下物・土壌・陸水・牛乳・精米・野菜類・茶の γ 線核種分析ならびに環境中の空間放射線量率を調査対象とした。

なお、この調査の環境試料採取にあたり、農業総合センター、茶業振興センター、高原農業振興センターの協力を得た。

2. 測定方法

環境試料の採取法、前処理法及び全 β 放射能測定、 γ 線核種分析及び空間放射線量率測定は、文部科学省の「環境放射能測定調査委託実施計画書」（平成22年度）¹⁾「全 β 放射能測定法」、²⁾「Ge半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリ」等に準拠し実施した。

3. 測定装置

全 β 放射能測定は、全 β GM自動測定装置（アロカ LBC-4202型）。 γ 線核種分析は、Ge半導体核種分析装置（東芝NAIG IGC 16180SD型；12月からセイコー EG&G GEM-15P4-70型）。空間放射線量率測定は、モニタリングポスト（アロカ MAR-21型）によりそれぞれの測定を行った。

結果及び考察

1. 全 β 放射能調査（降雨ごと）

表1に定時降水試料中の全 β 放射能測定結果を示した。79検体の測定を行い、12検体で検出された。検出濃度はND～0.7 Bq/L、月間降水量はND～11.2MBq/km²の範囲にあった。積算の年間降水量でみると昨年と同程度の結果であった。

2. γ 線核種分析調査

表2に γ 線核種分析測定結果を示した。土壌の表層、下層からそれぞれ4.2、4.0 Bq/kg乾土の、Cs-137が検出された。しかし、それらの値は前年度までのデータ及び全国の測定結果³⁾と比較しても大きな差は認められなかった。I-131はいずれの試料からも検出されなかった。

3. 空間放射線量率調査（連続測定）

表3に各月における、モニタリングポストによる空間放射線量率測定結果を示した。連続測定結果は、45～75nGy/hの範囲にあり、平均値は49 nGy/hであった。全体として、月間に前年度までと大きな差は認められなかった。

結 論

平成22年度の調査結果において、環境放射能レベルは低いながら一定の濃度で推移し、また人工放射性核種も、土壌試料にCs-137が断続的に検出されている。福島原発事故以降、22年度内に於いては特異人工放射性核種の検出は認められなかった。しかしながら、原発事故の詳細が解明されるにつれて事故のすさまじさが浮き彫りにされてきており、今後も環境放射能の動態について継続した調査が必要と考える。

文 献

- 1) 文部科学省防災環境対策室：環境放射能測定調査

表1 定時降水試料中の全β線放射能調査結果

採取月 H22年度	降水量 (mm)	降水の定時採取 (定時降水)			
		放射能濃度 (Bq/L)			月 間 降下量 (MBq/ Km ²)
		測 定 数	最 低 値	最 高 値	
4月	203	10	ND	0.3	5.2
5月	223.4	9	ND	0.4	2.2
6月	298.3	9	ND	0.2	7.8
7月	415.3	11	ND	0.7	11.2
8月	98.8	3	ND	ND	ND
9月	208.4	7	ND	0.4	8.9
10月	242.6	7	ND	ND	ND
11月	26.3	4	ND	ND	ND
12月	121.5	5	ND	0.2	0.6
1月	1.4	2	ND	0.5	0.7
2月	135.7	6	ND	0.2	6.3
3月	113.6	6	ND	0.4	8.5
年間値	2088.3	79	ND	0.7	ND ～ 11.2
前年度までの 過去3年間の値		264	ND	2.1	ND ～ 54.0

表3 空間放射線量率調査結果

調査月 H22年度	モニタリング ポスト (nGy/h)		
	最 低 値	最 高 値	平 均 値
4月	47	67	49
5月	47	66	50
6月	48	64	50
7月	47	75	50
8月	48	55	50
9月	48	63	50
10月	47	64	50
11月	47	55	49
12月	46	67	49
1月	45	52	47
2月	46	66	48
3月	46	60	48
年間値	45	75	49
過去 3年間の値	46	80	50

表2 γ線核種分析調査結果 (Cs-137最高値)

試料名		採取地	本年度	過去3年間	単 位
大気浮遊じん		奈良市	ND	ND	mBq/m ³
降 下 物		奈良市	ND	ND	MBq/km ²
陸水(蛇口水)		奈良市	ND	ND	mBq/L
土 壤	表 層	橿原市	4.2 (410)	4.0 (368)	Bq/kg乾土
	下 層	橿原市	4.0 (960)	4.9 (476)	(MBq/km ²)
精 米		橿原市	ND	ND	Bq/kg精米
野 菜		宇陀市	ND	ND	Bq/kg生
茶		奈良市	ND	0.38	Bq/kg乾物
牛 乳		宇陀市	ND	ND	Bq/L

大和川水域における小河川の水質汚濁調査について

高木康人・山中秀則・高橋のぶ子・兎本文昭

Water Pollution Research of Small Rivers in the Yamato River Area

Yasuhito TAKAGI・Hidenori YAMANAKA・Nobuko TAKAHASHI and Fumiaki UMOTO

緒 言

奈良盆地を流域とする大和川は奈良県民の身近に存在する河川であり、その水質改善は快適な生活環境の保全にも重要である。今回、大和川水域における水質改善を目的に、水質データの蓄積が無い市街地小河川流末の水質調査を実施した。その結果、調査した41河川中、12河川でBOD 5mg/L（C類型環境基準値）を超過し、7河川でBOD 10mg/L以上を検出。この内、BOD 30mg/Lを検出した小河川について、その発生源を特定し、環境基準河川に及ぼしている影響について調査したので、その概要を報告する。

方 法

1. 市街地小河川汚濁調査

奈良県環境基準水域類型指定状況図に掲載されている環境基準未指定河川の内、市街地を流れ、水質データの蓄積が無い66河川について、その流末での外観等の調査を実施。その結果、環境基準指定河川に高負荷を与えると考えられた41河川流末について、後日、水質分析（pH：水素イオン濃度、COD：化学的酸素要求量、BOD：生物化学的酸素要求量、SS：浮遊物質量、T-N：全窒素、T-P：全リン）を行った。（調査日：平成22年8月16日～平成23年1月14日の内、13日間）

2. 汚濁河川（馬見川）発生源調査及びBOD負荷量の算出

河川外観により流末から遡り発生源を推定。その際、河川水、事業場排水等を採水し、水質分析（項目は同様）を実施。また、BOD負荷量は測定濃度及び水量から算出。水量は事業場排水については水質汚濁防止法の届出水量、その他は簡易測定によった。（調査日：平成22年11月25日）

結果及び考察

1. 市街地小河川汚濁調査

BOD10mg/L以上を検出した河川を表1に示した。

これらの河川についてはCOD、SS、T-N、T-Pも高い値であった。その原因は周辺流域の下水道普及率等により概ね下水道の未整備が原因と考えられた。

2. 汚濁河川（馬見川）発生源調査及びBOD負荷量の算出

調査地点を図1に、その結果を表2に示した。馬見川におけるBOD値は事業場排水合流前では3.8mg/Lであったが、合流により150mg/Lに上昇。その後、水量の増加に伴い濃度は下降し、流末で28mg/Lを検出。また、里合橋（高田川環境基準点、C類型）では6.0mg/Lであった。COD値はBOD値に比例して推移し、ほぼ同値となった。pH、SS、T-N、T-Pについては全地点で大きな変動は無かった。

算出したBOD負荷量は事業場排水で0.073t/日、馬見川流末で0.24t/日、里合橋で0.47t/日となった。この事業場排水のBOD負荷量は馬見川流末で30%、里合橋で16%を占めており、事業場排水が周辺河川へ高負荷を与えていることが判明した。

当事業場が排水基準値のBODを排水したと仮定した場合、BOD値は馬見川流末で5mg/L、里合橋で0.6mg/L低下すると推定された。また、下水道への接続では馬見川流末で8mg/L、里合橋で0.9mg/L低下すると推定された。

まとめ

今回の調査により市街地小河川からの汚濁が、合流先常時監視地点のBODを押し上げている一因と推定された。

市街地小河川のうち、馬見川について詳細な調査を実施したところ、汚濁発生源として事業場排水が特定できた。これは下流の環境基準河川である高田川の汚濁の一因になっていることがわかった。

今後、さらに小河川の詳細な調査を進め、汚濁原因を特定することを目指す。

文 献

1) 平成21年度環境調査報告書（水質編）（2010），奈良県

表1 小河川調査結果

河川名	住 所	BOD (mg/L)	合流先環境基準指定河川		
			河川名	下流監視地点	H21年度BOD75%値 (mg/L) ¹⁾
馬見川	広陵町寺戸	30	高田川	里合橋	5.0
熊谷川	香芝市瓦口	23	葛下川	新橋	6.2
初田川	香芝市下田東2丁目	22	葛下川	新橋	6.2
沖台川	大和郡山市新町	18	富雄川	弋鳥橋	7.2
鳥居川	香芝市下田東1丁目	13	葛下川	新橋	6.2
量川	大和郡山市筒井町	10	佐保川	井筒橋	3.3
甘田川	大和高田市春日町1丁目	10	高田川	細井戸橋	5.4

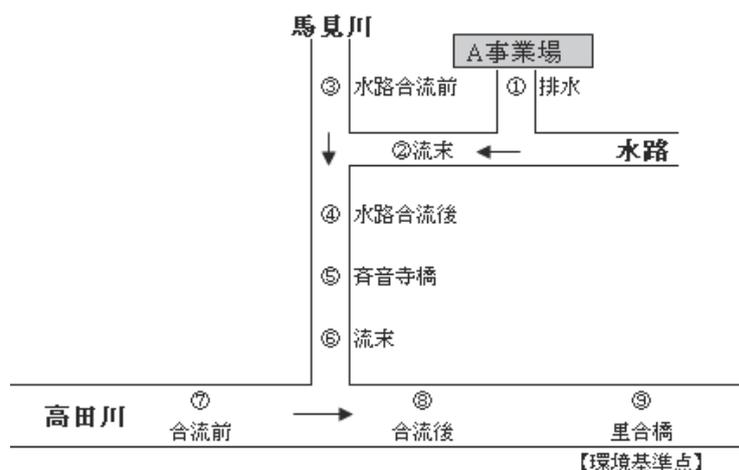


図1 馬見川調査地点

表2 馬見川調査結果

NO.	河川名等	地点	BOD (mg/L)	pH	COD (mg/L)	SS (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)
①	A事業場	排水	-	6.5	-	5	29	1.5
②	水路	流末	190	6.9	180	7	23	1.4
③	馬見川	水路合流前	3.8	8.9	6.7	7	1.6	0.86
④	馬見川	水路合流後	150	7.2	160	6	20	1.5
⑤	馬見川	斉音寺橋	88	7.0	100	12	8.9	0.65
⑥	馬見川	流末	28	7.4	40	10	4.3	0.39
⑦	高田川	馬見川合流前	5.0	7.8	8.0	9	2.9	0.36
⑧	高田川	馬見川合流後	14	7.6	19	9	3.5	0.37
⑨	高田川	里合橋	6.0	7.8	9.0	6	3.2	0.34

ICP/MSを用いた事業所排水の金属成分分析の検討について

中山義博・兎本文昭

Analysis of Metals in Industrial Wastewater by ICP/MS
Yoshihiro NAKAYAMA and Fumiaki UMOTO

緒 言

事業所排水中の金属類の分析では、含まれる金属によって前処理方法や測定機器も異なるので、時間と手間がかかっている。そこで簡単な前処理方法を用い、同時に多くの金属類を測定できるICP/MSによる方法¹⁾を検討した。ICP/MSは妨害物質の影響を受け易いので、それを最小限にする必要がある。そのため、定量下限値は上がるが、希釈法を用い、さらに標準添加、簡易な酸処理による方法で排水中の金属類の測定を検討したので、その概要を報告する。

方 法

1. 試薬等

硝酸には、関東化学(株)製微量分析用硝酸を用いた。金属標準液として、AccuStandard社製多元素混合標準液 ICP-MS-QC2-1(10 μ L/mL)を用いた(25種類成分のうちCr, Mn, Cu, Zn, As, Se, Cd, Pb, Co, Ni, Mo, Sb及びNa, K, Ca, Mgを含む)。イットリウム標準液には、和光純薬(株)製原子吸光分析用1000mg/Lを用いた。使用した水はミリポア製超純水製造装置で精製したものを用いた。その他、アルゴンガス及びヘリウムガスを用いた。

2. 使用機器・器具

Agilent社製 ICP-質量分析装置 7500ce
Thermo Elemental社製 原子吸光分析装置Sollar M6
SCPサイエンス社製 50mLDigitube

3. 分析対象元素

事業所排水基準が定められている金属のうち8種類Cr, Mn, Cu, Zn, As, Se, Cd, Pb及びその他4種類Co, Ni, Mo, Sbの計12種類とした。

4. 分析方法

1) 検量線の作成

対象とした12元素について、それぞれ0~1000 μ g/Lの範囲で8点の濃度の標準液(1%硝酸酸性溶液)を測定し、検量線を作成した。

2) 内標準法

いずれの測定においても内標準としてイットリウムの濃度が1mg/LとなるようにICP/MS導入直前に加えた。

3) 試料の前処理

実試料を最終的に100倍希釈となるように取り、また1%硝酸酸性となるように硝酸を加え、さらに0 μ g/L(n=2), 1 μ g/L(n=5), 5 μ g/L(n=1), 10 μ g/L(n=1)の濃度となるようにそれぞれ多元素混合標準液を加えて超純水で全量を50mLにした。これを密閉容器に移し替え、沸とう水浴中で2時間酸処理(以下、2時間加熱処理と略す。)し、室温に戻してからICP/MSで測定した。

4) ICP/MSの測定条件

プラズマ高周波出力	1500W
プラズマガス流量	15.0 L/min
補助ガス流量	0.90 L/min
S/N温度	2 $^{\circ}$ C
キャリアガス流量	0.78L/min
メイクアップガス流量	0.25L/min
ヘリウムコリジョンモード	
シールドトーチシステム	

結果及び考察

1. 検量線

いずれの元素についても0~1000 μ g/Lの範囲で検量線は良好な直線性を示した。

2. 希釈の効果

ICP/MSによる測定では、共存塩類の影響を受け易いとされているので、希釈による効果を検討するために、平成22年環境省統一精度管理の土壌溶出液を用いて、10倍希釈と100倍希釈、そして硝酸添加2時間加熱処理と硝酸分解処理の4種類の組み合わせ(繰り返し測定n=3)で検討した。なお、標準液は添加しなかった。その結果、ほとんどの金属元素で10倍希釈した場合は100倍希釈の65%程度の値となった。100倍希釈後の測定値は、精度管理対象となったPbとCuの濃度とほぼ一致した。硝酸添加2時間加熱処理の場合と硝

酸分解処理の比較では、測定値にあまり差はなかった。これにより硝酸添加2時間加熱処理と100倍希釈の組み合わせが前処理には適していると考えられ、以後の検討はこの組み合わせで行った。

3. 本法の定量下限値

本法の定量下限値は、目的金属濃度が $1.0\mu\text{g/L}$ になるように実試料に標準液を添加したもの ($n=7$) を前処理後、それぞれの金属を測定し、100倍希釈を考慮した上で、測定値の標準偏差を10倍して算出した。その結果を表1に示した。

表1に示すように12種類の金属とも 0.05mg/L 以下となり、各金属項目の定量下限値と排水基準値を比較すると、感度の点からは充分測定可能であった。

表1 測定対象とした金属の本法の定量下限値と排水基準値
単位：mg/L

元素名	Cr	Mn	Cu	Zn	As	Se
定量下限値	0.015	0.036	0.048	0.037	0.014	0.041
排水基準値	2	10	3	2	0.1	0.1

元素名	Cd	Pb	Co	Ni	Mo	Sb
定量下限値	0.025	0.025	0.015	0.016	0.016	0.025
排水基準値	0.1	0.1	—	—	—	—

4. 添加回収試験結果

マトリックス影響の有無を確認するために、事業所排水試料41件を対象に添加回収試験を行った。表2にそれらの業種の内訳を示した。

表2 立入事業所対象施設の対象件数

事業所の業種	件数
金属関係	12件
食品関係	9件
下水道処理関係	5件
検査・化学関係	6件
温泉・旅館	5件
繊維・染色関係	4件

添加回収試験は、回収率が概ね70%~120%の範囲内にあり、変動係数も小さく良好な結果であった。しかし、この範囲を超える場合が41検体中3検体あった。その内訳は金属関係、検査・化学関係、繊維・染色関係がそれぞれ1検体ずつであった。

5. 共存物質の影響

アルカリ金属等はICP/MSの測定においてマトリックス干渉を起こすことが知られているので、事業所排水中の濃度を把握しておくことは重要である。今回、測定した事業所排水中のアルカリ金属等の結果を表3

表3 アルカリ金属、アルカリ土類金属類及び塩素イオンの測定結果
単位：mg/L

元素名	濃度範囲	平均値
Na	10~800	110
K	0~100	10
Ca	0~200	40
Mg	0~20	6
Cl^-	10~1200	150

この結果より、事業所排水には高濃度のアルカリ金属等を含む場合があり、目的金属の測定に影響を与えることが考えられる。しかし、本法では100倍希釈を行うので、その影響はかなり抑えられる。ただ、希釈により目的金属濃度も希釈されることになるが、ICP/MSの感度の良さがそれを補ってくれる。低濃度での変動係数もほぼ10%以下と良好であったので、希釈により立入事業所排水のマトリックスの影響を低減して測定できることが分かった。

ただ、前述の回収率が良くなかった3検体についてはアルカリ金属等の濃度が特に高くはなく、これら以外のマトリックスの影響も考えられるが、今回は特定するには至らなかった。

6. 原子吸光光度法との比較

Cu, Mn, Znを 0.1mg/L (ICP/MS法で100倍希釈した試料では、その測定値は $1\mu\text{g/L}$) 以上検出した検体について、原子吸光光度法でも測定して比較した。なお、原子吸光光度法は希釈なしで硝酸分解処理したものについて測定した。

実試料のICP/MS測定で 0.1mg/L 以上検出されたものは、41検体のうち13検体あり、そのすべてがフレーム原子吸光測定値とほぼ一致した。

まとめ

1. 事業所排水の金属成分について、試料を希釈し沸とう水浴中で前処理を行い、ICP/MSで測定すれば多元素を迅速にスクリーニングすることができた。この方法は操作が簡単で、検査全体としての時間が短くて済み、汚染が少なかった。
2. 試料を希釈すればマトリックスを低減することができ、標準添加によりその定量が可能となった。

文献

- 1) 松本光弘, 他: 奈良県保健環境研究センター, **41**, 50-53 (2006)

HPLCによるパン中のプロピオン酸の簡易・迅速分析

田中 健・木本聖子・城山二郎・山本圭吾

Analysis of Propionic acid in Bread by HPLC

Takeshi TANAKA・Seiko KIMOTO・Jirou SHIROYAMA and Keigo YAMAMOTO

緒 言

プロピオン酸は細菌やカビなどの発育を抑制し、食品の保存性を良くし、食中毒を予防する保存料である。チーズ、パン、洋菓子に使用され、使用量はパンで2.5g/kg以下である。その分析法には、前処理に水蒸気蒸留法^{1~4)}や溶媒抽出法が、測定にはHPLC法^{1~2)}やGC法^{2~4)}がある。しかし、操作がやや煩雑である。そこで、日常検査にも使用可能で簡易・迅速なHPLC法の検討を行ったので以下に報告する。

方 法

1. 試薬等

アセトニトリルは和光純薬製高速液体クロマトグラフ用、リン酸、塩化ナトリウムは和光純薬製特級を用いた。

セップパックミニカラム：ウオーターズ社製Sep-Pak[®] Plus short tC18 Cartridge 500mgを、あらかじめメタノール10mL、水10mLでコンディショニングして使用した。

2. 標準溶液

プロピオン酸カルシウム314.22mgを水に溶かして全量を50mLとし、プロピオン酸5000 μ g/mL標準原液を作製した。水で適宜希釈して5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 μ g/mL溶液を作製した。

3. 装置及び測定条件

1) 蒸留装置：BÜCHI社製、ケルダール蒸留装置K-360
蒸留条件：反応時間；5秒，スチームパワー；100%，蒸留時間；625秒

2) HPLC：島津製作所製（ポンプ；LC-10ADvp型，システムコントローラー；SCL-10Avp型，カラムオープン；CTO-10Avp型，オートサンプラー；SIL-10Avp型，PDA検出器；SPD-M10Avp型）

測定条件：カラム；InertsilODS-3V (4.6mmid×150mm)，移動相；水-アセトニトリル (94：6) をリン酸でpH2.5に調整した。カラム温度；40℃，流速；

1mL/min，検出波長；210nm，注入量；20 μ L

4. 試験溶液の調整

1) 蒸留：細断した試料約30gを精密に量り、500mLの試料管に入れ、水60mL、塩化ナトリウム50g、リン酸溶液 (1→10) 10mLを加えて水蒸気蒸留を行う。あらかじめ (1→100) 水酸化ナトリウム20mLを入れた受器に冷却器の先端を浸し、留液が280~290mLになったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に300mLとする。

2) 精製：この液5mLを正確に量り、あらかじめ用意したセップパックミニカラムに注入し、流出させ、水でセップパックミニカラムを洗浄し、流出液と合わせて10mLとし、HPLC試験溶液とした。

結果及び考察

1. 蒸留前の水量とプロピオン酸回収量の関係

水蒸気蒸留を行う場合、蒸留前の試料管中の水の量がプロピオン酸の蒸留に及ぼす影響を見た。方法は、プロピオン酸15mg (5000 μ g/mLを3mL) を500mLの試料管に入れ、水を加えて、50mL, 100mL, 150mLとしたもの及び、パン30gと水150mLを加えたものに、

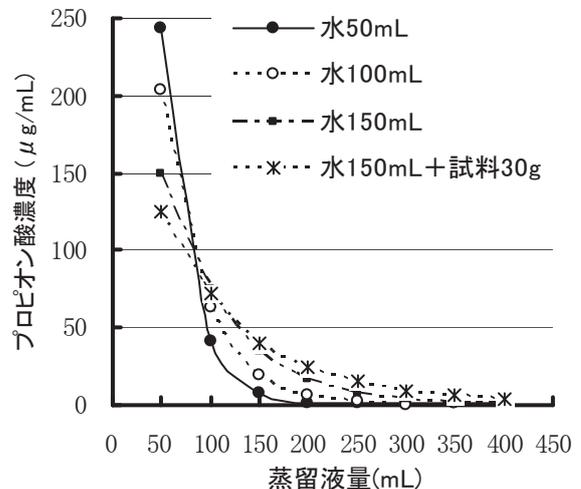


図 蒸留前の水量とプロピオン酸回収量

塩化ナトリウム50g, リン酸溶液10mLを加えて蒸留した。

結果を図に示した。プロピオン酸は蒸留前の水量の少ないほど速く流出し、水量が最も少ない50mLでは、蒸留液量100mLで95.5%の回収率であった。また、いずれの場合にも蒸留液量300mLでは95%以上が回収された。しかし、少量の蒸留量で回収率を上げるために、試料量は30gに対し、加える水の量は60mLとした。

2. 精製法の検討

水蒸気蒸留した留液は、そのままでHPLC測定できるが、夾雑物の影響が有るようで、測定値は若干高めであった。そこで、夾雑物の影響を除くために、迅速な精製法を検討した。精製にはミニカラムを用いた。セップパックミニカラムと陽イオン交換樹脂(BOND ELUTE JR-SCX, 500mg)を用いた。あらかじめメタノール10mL, 次いで水10mLでコンディショニングしたセップパックと陽イオン交換樹脂に流出液5mLを通し、次いで少量の水でカラムを洗い、全量を10mLとして、HPLC測定した。セップパック及び陽イオン交換樹脂でもHPLC測定妨害となるものは除去されていた。特にセップパックは留液がアルカリ性のためか、ベースラインは良好であった。そこで、簡易にカラムを通すことのできるセップパックミニカラムを使用することにした。なお、陽イオン交換樹脂を通した試験溶液はガスクロマトグラフ用試験溶液として、使用可能である。

3. 添加回収実験

食パン30gにプロピオン酸が100 μ g/g, 500 μ g/gとなるように加えて、4. 試験溶液の調整に従ってHPLC測定した。100 μ g/g添加した場合、回収率は99.3 \pm 5.0%, 500 μ g/gで96.6 \pm 2.0%と良好な結果を示した。

表 プロピオン酸の添加回収率

添加濃度 (μ g/g)	測定値 (μ g/mL)	試料濃度 (μ g/g)	回収率 (%)
0	2.30	46.0	
100	6.88	137.7	91.7
100	7.21	144.3	98.3
100	7.56	151.3	105.3
100	7.26	145.3	99.3
100	7.39	147.7	101.7
		平均回収率	99.3 \pm 5.0
0	2.20	44.1	
500	26.66	533.1	97.8
500	26.70	533.9	98.0
500	26.77	535.3	98.3
500	25.79	515.8	94.3
500	25.81	516.1	94.4
		平均回収率	96.6 \pm 2.0

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局安全部基準審査課長通知, 平成22年5月28日, 食安基発0528第3号
- 2) 衛生試験法・注解2010, 日本薬学会編集, 323-327, (2010), 金原出版株式会社
- 3) 衛生試験法・注解2005, 日本薬学会編集, 304-306, (2005), 金原出版株式会社
- 4) 厚生省生活衛生局食品化学課: 食品中の食品添加物分析法2000 第2版, 21-23

はるさめと小麦粉中の過酸化ベンゾイルのHPLC分析

田中 健・木本聖子・城山二郎・山本圭吾

Analysis of Benzoyl peroxide in Green gram and Wheat flour by HPLC

Takeshi TANAKA・Seiko KIMOTO・Jirou SHIROYAMA and Keigo YAMAMOTO

緒 言

過酸化ベンゾイル (BPO) は小麦粉の熟成期間の短縮や漂白を目的に使用され、使用基準は0.30g/kgである。試験方法には溶媒抽出-HPLC法¹⁾や溶媒抽出後、BPOを安息香酸 (BA) に変換しGCで測定する方法 (以下GC法)²⁾ 等がある。また、その確認には、BPOの消失を見る方法やLC/MS/MS法がある。GC法はBPOをBA変換後測定するのでBPAの確認法としても使用できる。しかし、前処理が煩雑である。そこで、若干の検討を加えて、簡易な前処理後、HPLC測定する方法を検討したところ良好な結果が得られたので以下に報告する。

方 法

1. 試薬

エチルエーテル、メタノール、エタノール、アセトン、硫酸、塩化ナトリウム、ヨウ化カリウム、チオ硫酸ナトリウム、無水硫酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、BAは和光純薬製特級を用いた。BPOは和光純薬製の75% in waterを用いた。

2. 標準液

BA : BA100mgをエタノールで20mL (5000 μ g/mL) とした標準原液を、逐次、エタノールで希釈して0.5~10 μ g/mL標準液を作製した。

BPO : あらかじめ標準試薬のBPA含量を求めて、BPOとして100mg相当量をエタノールで20mL (5000 μ g/mL) とした。この標準原液を、逐次、エタノールで希釈して50 μ g/mL標準液を作製した。

3. 装置及び測定条件

1) HPLC装置 (島津製作所製) はLC-10Aシステムを使用した。

2) HPLC分析条件 : カラム ; ジーエルサイエンス (株) 製 Inertsil ODS-3V, 4.6 \times 150mm, カラム温度 ; 40 $^{\circ}$ C, 測定波長 ; 230nm, HPLC移動相 ; メタノール-アセトニトリル-5mmol/Lクエン酸緩衝液 (1:2:7),

流速 ; 0.8mL/min, 注入量 ; 20 μ L

4. 試験溶液の調整

1) BPOの抽出

はるさめ : 細断試料5gに飽和食塩水 (-20 $^{\circ}$ Cで冷却したもの) 20mL, エチルエーテル50mLを加え、ポリトロンで1分間、高速ホモジナイズする。エチルエーテル層は200mLの分液ロートに脱脂綿ろ過する。残さにエチルエーテル40mLを加え同様に操作し、分液ロートに合わせる。次いで、1%炭酸水素ナトリウム溶液を50mL加え、激しく振り混ぜる。水層は捨て、エチルエーテル層を硫酸ナトリウムで脱水し、200mLナスフラスコにろ紙ろ過する。次いで、40 $^{\circ}$ C以下で5mL以下に濃縮し抽出液とする。

小麦粉 : 試料10gにエチルエーテルを50mL加え、ポリトロンで20秒間、高速ホモジナイズする。数分間、静置し、上澄液を200mL分液ロートにろ紙ろ過する。残さにエチルエーテル40mLを加え同様に操作する。以下、はるさめと同様に操作する。

2) BPOのBAへの転換

抽出液を100mL三角フラスコにメタノール5mLで洗い入れ、クエン酸溶液 (10W/V%, メタノール溶液) 0.5mL及びヨウ化カリウム溶液 (10W/V%) 1mLを加え、スターラーで10分間攪拌する。

3) BAの抽出

転換液を水40mLで200mLの分液ロートに洗い入れ、チオ硫酸ナトリウム溶液 (1 \rightarrow 10) 1mLを加えて振り混ぜ、過剰なヨウ素を分解する。次いで、硫酸 (1 \rightarrow 10) 5mL, エチルエーテル50mLを加えて、30秒間激しく振とうする。エチルエーテル層は100mLビーカーに移し、少量の無水硫酸ナトリウムを加える。水層にエチルエーテル50mLを加え、30秒間激しく振とうする。エチルエーテル層を100mLビーカーに合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水する。エチルエーテル層を200mLナスフラスコに移し、40 $^{\circ}$ C以下で乾固しない程度に濃縮し、エタノールで5mLとする。0.45 μ mのメン

ブランフィルターでろ過し、HPLC試験溶液とした。

結果及び考察

1. BPOの抽出

BPOは加熱されると容易に分解してしまうことが知られている。そこで、はるさめにはあらかじめ-20℃で冷却した飽和食塩水20mLを使用した。飽和食塩水20mLは、はるさめを軟化させるのに十分な量であり、抽出時の発熱も防ぐことができた。小麦粉は、エチルエーテルを加えて静置するだけでも脂溶性であるBPOは十分な回収率が得られると考えられるが、ポリトロンで高速粉碎後、数分間静置することにした。数分間静置すると大部分の小麦粉が沈殿し、ろ紙ろ過が容易であった。

2. BAの除去

本法は、BPOをBAに変換して測定するので、試料中のBAが妨害となる。そこで、1%炭酸水素ナトリウム溶液での除去を検討した。方法は、実試料の前処理時とほぼ同量のエチルエーテル100mLにBA5000μgを加えたものに、①1%炭酸水素ナトリウム溶液50mLを加えて激しく攪拌し、水層を捨てたもの。②1%炭酸水素ナトリウム溶液50mLで抽出除去後、さらに、水50mLを加えて同様に操作したもの。③1%炭酸水素ナトリウム50mLで2回抽出したもの。を試験溶液の調整に従ってエチルエーテル中のBA量を測定した。

BAが除去されていない場合には、試験液中濃度は1000μg/mLとなるが①で0.075μg/mL、②で0.044 μg/mL、③で0.013μg/mLと、いずれも除去率は99.99%以上であった。実試料では試験溶液1.0μg/mLが定量下限値であることから、①の1回の除去操作で十分なことがわかった。

3. BPOのBAへの変換

①100mL共栓付き三角フラスコにエチルエーテル：ヘキサン（1：9）10mL、BPO 5000μg/mLを200μL、メタノール5mL、クエン酸溶液0.5mL、ヨウ化カリウム溶液1mLを加え、スターラーで10分間攪拌。②三角フラスコの代わりに100mLの分液ロートを用い、5分間振とう。③添加物分析法²⁾に準じた。すなわち、200mLナスフラスコにエチルエーテル：ヘキサン（1：9）100mL、BPO 5000μg/mLを200μL、メタノール20mL、クエン酸溶液1mL、ヨウ化カリウム溶液2mLを加え、時々振り混ぜながら、室温で10分間静置し、40℃以下で10mLに濃縮した。これらの溶液を3) BAの抽出に従って操作し、エタノールで5mLとし、HPLC試験溶液とした。その結果、どの方法でも容易に、BPAからBAに変換されることがわかった。そこで、器具汚染が

少なく、ヨウ素の遊離等が最も少なく、簡易で迅速な①の方法を用いることにした。

4. 検量線

BAを用いた。0.5~10μg/mL溶液を作製し、その20μLをHPLC測定した。外部標準法でピーク面積から検量線を作成した。相関係数0.999以上の良好な直線性を示した。試料中のBPA濃度はBAに0.992を乗じて求めた。

5. 添加回収実験

はるさめ5.0gにBPO10μg/g、1 μg/g、小麦粉10gに1 μg/g、0.5μg/gとなるように加え、上記の方法で、添加回収実験を行った。結果を表に示した。はるさめでは回収率は85%以上、小麦粉では回収率がやや低く60%以上であった。また、クロマトグラムを図に示した。

表 BPOの回収率 (n=5)

試料	試料量(g)	添加量(μg/g)	平均回収率(%)
はるさめ	5.0	1.0	86.1 ± 4.8
		10.0	89.9 ± 2.7
小麦粉	10.0	0.5	70.1 ± 7.1
		1.0	64.4 ± 1.2

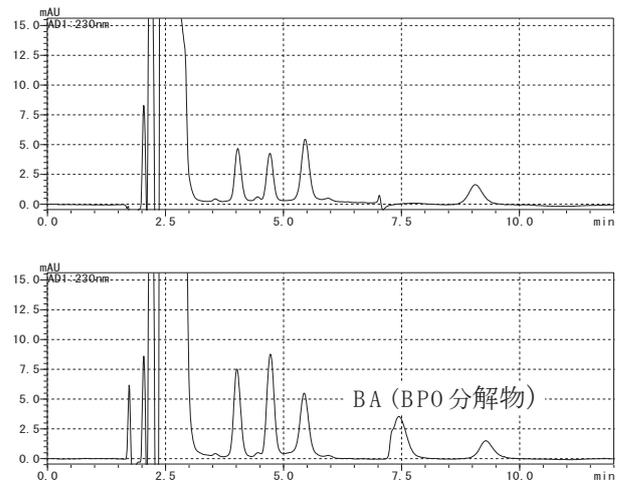


図 小麦粉にBPO 0.1μg/g添加したクロマトグラム

まとめ

比較的簡易な方法でBPOをBAに変換後、低濃度まで感度良くHPLC測定することができた。本法は、BPOの消失を見る方法と共にBPOの確認法としても使用可能であった。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局安全部基準審査課長通知、平成16年5月13日、食安基発0513003号
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課：食品中の食品添加物分析法2000 第2版、230-233

奈良県におけるノロウイルス胃腸炎集団発生について－2009/2010シーズン－

米田正樹・井上ゆみ子・岡山明子・北堀吉映

Outbreaks of Gastroenteritis Caused by Norovirus in Nara Prefecture, 2009/2010 Season

Masaki YONEDA, Yumiko INOUE, Akiko OKAYAMA and Yoshiteru KITAHORI

緒言

ノロウイルス (Norovirus, 以下NoV) は、冬季に多く発生がみられるウイルス性急性胃腸炎の主な原因ウイルスである。当センターにおいても冬季に行政依頼検査が集中し、県内の保育園、小学校、老人福祉施設等で原因病原体としてNoVを検出してきた(図1)。NoVは経口感染によりヒトの小腸で増殖し、吐物や糞便とともに排泄される。患者から排泄されたNoVが、手指やドアノブ等を介してヒトからヒトへ感染する。また、NoVは食中毒の原因ウイルスとしても知られており、加熱不十分な二枚貝やウイルスに汚染された食品の喫食により引き起こされる。NoVは遺伝子学的多様性に富むことから、その感染予防には幅広い疫学的知見の蓄積が不可欠である。

当センターでは奈良県におけるNoVの流行状況を詳細に把握するため、2009/2010シーズンに発生した食中毒および集団感染事例を対象とし、NoVの遺伝子学的、疫学的解析を実施した。その結果、新たな知見を得たので報告する。

対象事例

2009年9月から2010年8月の間に当センターにおいてNoVの検査を実施した食中毒(有症苦情を含む)

事例および集団感染事例の39事例のうち奈良県内が発生源である32事例を対象事例とした。

方法

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い添付のプロトコールに従って10%糞便懸濁上清140 μ lからウイルスRNAを抽出し、プライマーCOG1F/G1-SKRおよびCOG2F/G2-SKR¹⁾を用いたRT-PCR法によりNoV遺伝子Capsid領域の増幅を行った。得られた遺伝子増幅産物について、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、Kageyamaら²⁾、及びKatayamaら³⁾の遺伝子型番号に従って遺伝子型の分類を行った。

結果と考察

1. NoVによる集団胃腸炎事例の発生状況

2009/2010シーズンに県内が発生源のNoVによる食中毒・集団感染症事例は2008/2009シーズンの11事例から32事例へと急増した。このことは、2008/2009シーズンの集団感染症が5事例/11事例(45%)であったのに対し、2009/2010シーズンは25事例/32事例(78%)であり、集団感染症の多発によるものであったことを示している。

検体採取月別では2009年9月：1事例、11月：2事例、

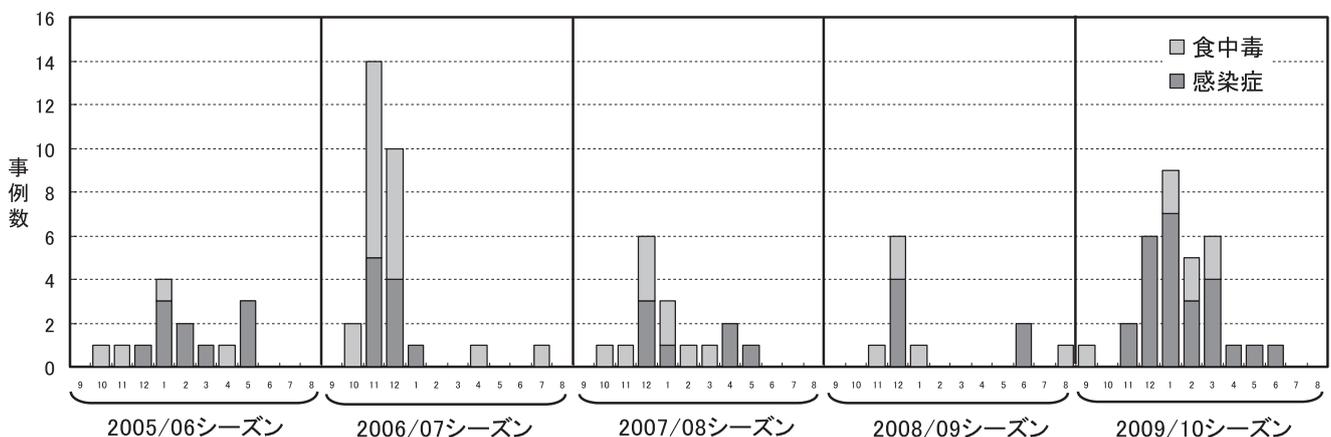


図1 ノロウイルスによる食中毒・集団胃腸炎事例数(当センター検出事例数)

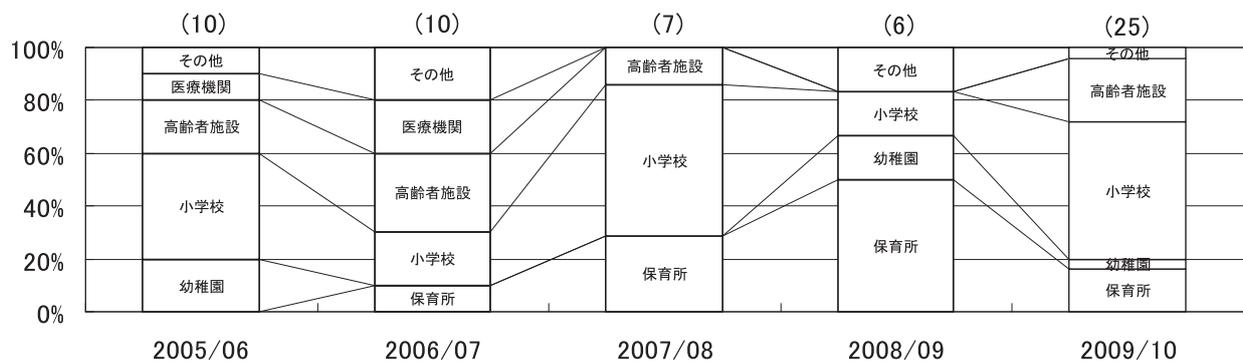


図2 ノロウイルスによる集団感染症事例の発生施設別内訳

図上段の()内の数字は事例総数を示す

表1 検出されたノロウイルスの遺伝子型 (2009/2010シーズン)

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	合計
G I /4					2	1		1					4
G I (Genotype未同定)				1							1		1
G II /2			2	5		1	3						11
G II /4					3	1	3			1			8
G II /13									1				1
G II (Genotype未同定)	1			1	4	3							9
合計	1	0	2	6	9	5*	6	1	1	1	0	0	32*

※：複数の遺伝子型が検出された混合事例2事例を含む。

12月：6事例，2010年1月：6事例，2月：5事例，3月：6事例，4月，1事例，5月：1事例，6月：1事例であった。2009/2010シーズンは12月から3月にかけての発生が26事例と84%を占め，冬季に明確な発生ピークが見られた。

集団感染症の25事例について発生施設別に区分すると，保育園：4事例（16%），幼稚園：1事例（4%），小学校：13事例（52%），介護老人保健施設等の高齢者施設：6事例（24%），その他：1事例（4%）と，2009/2010シーズンは小学校での発生が52%と過半数を占めたのが特徴的であった（図2）。

2. 検出遺伝子型について

2009/2010シーズンに検出されたNoVの遺伝子型を表1に示した。全32事例の内訳は，GIによるものが3事例（9%），GIIによるものが27事例（84%），GI，GIIの混合事例が2事例（6%）とGIIによるものが圧倒的優位であった。ダイレクトシーケンスによる遺伝子解析が可能であった20事例のうち，GIIの内訳はGII/2が11事例（55%）と最も検出頻度が高く，次いでGII/4が8事例（40%）となった。国立感染症研究所，および厚生労働省による全国の同シーズンのデータでも，GII/2が36%，GII/4が42%となっている4)。全国的にGII/2の検出が急増した状況下において，本県での集団胃腸炎についても，全国と同様の流行状

況であったと考えられた。一方，GII/4は過去に大規模な流行を繰り返し，近年では2006/2007シーズンに2006b亜株による大流行を引き起こした4)。

全国的にGII/4の発生頻度は低下しつつあるが，依然として他の遺伝子型より高く，2008/2009シーズンに新しい亜株である2008aが報告されるなど5)，GII/4についての詳細な解析が継続的に行われている。

最後に，本県におけるNoVの流行状況を詳細に把握するため，今後ともNoVの新しい遺伝子型の出現と，GII/4の新亜株の発生動向に注意を払う必要があると考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食安全部監視安全課長通知食安監発第1105001号「ノロウイルスの検出法について」，平成15年11月5日
- 2) Kageyama T, et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2988-2995, 2004.
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センターホームページ：ノロウイルスの遺伝子型 (<http://idsc.nih.gov.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>)
- 4) 国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課：病原微生物検出情報，**31** (11), 369, 2010
- 5) Motomura K, et al.: *J. Virol.*, **84**, 8085-8097, 2010.

奈良県における腸管出血性大腸菌検出状況：2010年度

田邊純子・吉田孝子・榮井毅・橋田みさを

Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* detected in Nara Prefecture, 2010

Sumiko TANABE・Takako YOSHIDA・Takeshi SAKAI and Misao HASHIDA

緒言

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染症は、感染症法で三類感染症に指定され、診断した医師の全数届出が義務付けられている。患者から検出された菌株は、保健所協力のもと地方衛生研究所に搬入されて性状や血清型及び毒素型等を確認した後、厚生労働省通知に基づき国立感染症研究所 (以下、感染研) へ送付される。感染研では全国から集められた菌株についてパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子解析を実施し、全国状況を把握するとともにその結果を還元している。

2010年4月から2011年3月に当センターへ搬入されたEHEC菌株は、ヒト由来54株 (54名分) と食品由来3株の計57株であった。これら菌株の概要及び細菌学的検査の結果などをまとめたので報告する。

材料と方法

1. 材料

菌株57株は、病院や民間検査所及び保健所検査課で検出・分離された後、当センターに搬入された。疫学情報は、保健所の調査結果に基づいている。

2. 血清型別及びベロ毒素 (VT) 型別

血清型別には、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研) を使用した。VT型別は、Cebulaら¹⁾ のプライマーを用いたPCRにより実施し、合わせてWangら²⁾ のプライマーを用いたPCRにより変異型VT2遺伝子 *stx2c*, *stx2d*, *stx2e* 及び *stx2f* の保有状況を調査した。

3. 薬剤感受性試験

アンピシリン (ABPC), セフトキシム (CTX), セフトキシム (CPDX), ゲンタマイシン (GM), カナマイシン (KM), ストレプトマイシン (SM), テトラサイクリン (TC), シプロフロキサシン (CPFX), ナリジクス酸 (NA), ST合剤 (ST), クロラムフェニコール (CP) 及びホスホマイシン (FOM) の12薬剤について、センシ・ディスク (日本BD) を用いた感受性試験

をCLSIに準拠して実施した。

4. PFGE, IS-printing System及びMLVA

ヒト由来の血清型O157株について、分子疫学解析を実施した。IS-printing Systemは東洋紡績の解析キットを使用し、MLVAは感染研プロトコルを保有シーケンサー (310 Genetic Analyzer) に合わせて変更した方法³⁾ により実施した。PFGEは感染研で行われ、パターンごとに付けられた番号が情報提供された。

結果

1. 菌株の検出状況

当センターに搬入されたヒト由来菌株は、6月から9月に45株 (83%) が検出されており、例年同様、夏期に多い傾向が見られた。

患者年齢は0歳から91歳まで幅広く見られ、年代別では10歳以下からの検出が最も多く27株 (50%) であった (内11株は保育所での集団発生事例株)。有症者の割合は71歳以上で100%、10歳以下で56%と、高齢者と若年層で高い傾向を示した。性別では男性32株 (59%)、女性22株 (41%) であった (図1)。

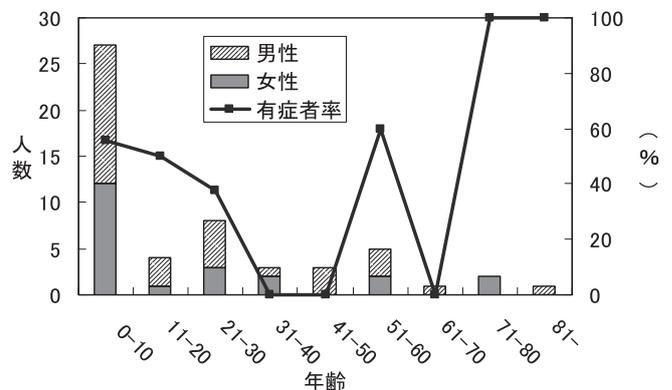


図1 菌株の情報：年齢，性別，有症者率

2. 血清型・毒素型と症状

ヒト由来菌株54株のうち最も多い血清型はO157:H7 (33株) であった。O血清群で見ると、2010年度はO157

以外にO26とO145も検出された。毒素型は、O157ではVT1&VT2保有株が最も多く、O26はVT1単独保有株のみ、O145はVT2単独保有株のみであった(表1)。

O血清群別に症状を見ると、O157で多い症状は腹痛、下痢、血便及び発熱で、有症率は54%であった。O26では下痢及び血便が多く、有症率は40%であった。O145の有症者は1名で、腹痛、下痢及び血便の症状を示した。

表1 ヒト由来菌株の血清群及び毒素型

	VT1	VT2 (<i>stx2c</i>)	VT1&2 (<i>stx2c</i>)	計
O157 : H7	0	10 (3)	23 (1)	33
O157 : H-	1	0 (0)	1 (0)	2
O26 : H11	1	0 (0)	0 (0)	1
O26 : H-	14	0 (0)	0 (0)	14
O145 : H-	0	4 (0)	0 (0)	4
計	16	14 (3)	24 (1)	54

変異型VT2遺伝子の調査では、4株で*stx2c*遺伝子を確認した。内訳は、O157:H7:VT1&VT2の1株及びO157:H7:VT2の3株であった。

3. 薬剤感受性試験

菌株57株について実施した結果を表2に示した。ヒト由来菌株54株のうち20株(37%)が1剤以上に耐性を示し、O26は15株全てが耐性株であった。食品由来菌株は3株全てが2剤以上に耐性を示した。

表2 薬剤感受性試験

由来	血清型	耐性	耐性薬剤名	菌株数
ヒト	O157	3剤	ABPC, SM, ST	4
		3剤	ABPC, SM, TC	1
		なし	-	30
	O26	2剤	ABPC, SM	14
		1剤	CP	1
	O145	なし	-	4
	(合計)			54
食品	O157	3剤	ABPC, SM, ST	2
		2剤	ABPC, SM	1
	(合計)			3

4. 分子疫学解析

ヒト由来のO157菌株35株について、IS-printing System及びMLVAを実施し、感染研から還元されたPFGE型別結果との比較を行った。

IS-printing System解析において、2株以上一致したパターンは5種類あった。このうち2種類(各2株)は、PFGE型別もMLVAパターンも一致せず、疫学情報からも関連性はそれぞれ見当たらなかった。3種類のISパターン(4株、6株、8株が一致)は、1株を除いて、家族であったり共通する行動があるなどそれぞれ関連性を示唆する疫学情報があった。ISパターンが一致した8株ではMLVAパターンが4株ずつ2種類に分かれ

たが、それぞれ家族が異なっていた。PFGE型別では、1バンド違いでも別のパターン番号が付けられるため、更に細かく9種類に型別された。

まとめ

EHEC感染症は、全国で年間3,000から4,000件の届出がある。検出されるO血清群は毎年O157が最も多く、次いでO26であり、当センターに搬入された菌株も同様の傾向であった。

薬剤感受性試験は、耐性菌出現の動向を調査・把握する目的である一方、薬剤感受性パターンにより菌株の関連性を示す有効な指標にもなりえる。保育所での集団発生事例において検出されたO26:H-の13株は、全てABPCとSMの2剤に耐性を示し、阻止円径パターンもよく類似していた。感染研によるPFGE型別番号も12株は一致し、1株はそれらと1バンド違いであった。

PFGEは、集団感染事例やdiffuse outbreakの探知に有効な分子疫学的解析手法であるが、EHEC O157に限ればIS-printing Systemは迅速・簡便なスクリーニングとして有用とされている⁴⁾。今回、疫学情報から関連性があると思われた菌株はISパターンが一致し、PFGE型別はさらに細分化されており、PFGEを行うスクリーニングとしての有用性を確認できたと考えられる。近年は食中毒患者が複数の自治体で探知される事例も増え、迅速で信頼性のある分子疫学解析の結果が求められる中、これからも複数の解析技術を実施できる環境を維持する必要性を感じている。

今後も、EHEC菌株についてデータを収集・蓄積して科学的解析を行い、その結果を還元することで感染症の予防と拡大防止に寄与していきたいと考えている。

謝 辞

菌株の収集にご協力いただいている関係機関の方々に、またPFGE解析結果を還元していただいている国立感染症研究所の皆様に、深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Cebula T, et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 248-250 (1995)
- 2) Wang G, et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3613-3619 (2002)
- 3) 榮井毅, 他:平成22年度総括・研究分担報告書(厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業), 110-115 (2011)
- 4) 研究代表者 寺嶋淳:平成21年度総括・研究分担報告書(厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業), (2010)

第3章 調査研究・報告

第4節 他誌掲載論文の要旨

New Modified Method of Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157

Takeshi SAKAI, Hisako OHMAE and Yoshiteru KITAHORI

Jpn. J. Infect. Dis., 63, 217-219, 2010

Previously, we reported that multiple-locus variable-number tandem repeat analysis was useful for epidemiological investigations of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 outbreaks. Our MLVA method was a modification of the CDC method and NIID method to suite an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Compared with the conventional method using a single capillary sequencer, on which three PCR products are analyzed separately, our method analyzing three PCR products together using five-dye system can reduce electrophoresis run time by one third. The results of size measurement showed so good precision that it would be hard to mis-discriminate alleles due to errors of size measurement. To verify the results of the fragment analyses, several fragments of each locus were sequenced. This modified method is more efficient for performing using ABI PRISM 310 Genetic Analyzers that are equipped in many prefectural and municipal public health institutes.

第3章 調査研究・報告

第5節 報告書の要旨

2008/2009 における奈良県の A 群ロタウイルスの分子疫学的解析： G 型及び P 型

岡山明子

財団法人 大同生命厚生事業団 平成21年度地域保健福祉研究助成

2008/2009年に奈良県で検出されたA群ロタウイルスのGおよびP型の詳細な流行疫学状況を明らかにし、1999年以降に蓄積したデータも併せて分子疫学的解析を行った。流行の主体はG1P[8]型およびG3P[8]型であったが、患者年齢分布には大きな相違はなかった。また、既に免疫を獲得していると推定される7歳児からG2P[4]型を検出した。奈良県北部でG1型が77%、中部ではG3型が66%と検出されるウイルス型種に地域差がみられた。1999年以降の全体的な解析ではG1型が主体で、いずれのシーズンでも複数種の遺伝子型が共存した。

腸管出血性大腸菌 O157 の MLVA 解析の改良法

榮井毅, 田邊純子, 橋田みさを

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)平成22年度分担研究報告書

MLVA法は、PFGE法に比べて迅速性や解析結果のデジタル性というメリットを有し、近年注目されている遺伝子解析手法である。腸管出血性大腸菌O157のMLVA解析を開始するにあたり、当センターのABI PRISM 310 Genetic Analyzer(キャピラリ1本型)を用いて効率よく解析を行うため、国立感染症研究所プロトコールの一部を変更した。3種類のPCR反応液を混合して1回の電気泳動で解析するために、4色蛍光系から5色蛍光系に変更し、プライマーの蛍光色素その他いくつかの条件を変更した。保存菌株の解析を行った結果、この条件によりMLVA解析が精度よく実施できることを確認した。

検査機関の信頼性確保に関する研究

小島幸一（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所）・尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所）

畠山えり子（岩手県環境保健研究センター）・土田由里子（新潟県保健環境科学研究所）

上野英二（愛知県衛生研究所）・山下浩一（奈良県保健環境研究センター）・上田泰人（神戸市環境保健研究所）

佐々木珠生（広島市衛生研究所）・中村秋香（高知県衛生研究所）・山口理香（北九州市環境科学研究所）

厚生労働科学研究補助金（食の安心・安全確保推進研究事業）平成22年度総括・分担報告書

平成21年度に引き続き、9機関による加工食品を用いた外部精度管理試験を実施し、加工食品中の残留農薬分析への適応状況を検証した。試料として冷凍餃子に農薬5種類を添加したものを、農薬名、添加濃度を通知せずにブラインドテストとして各機関に配布し、各機関のGC/MSおよびLC/MS/MSによる測定結果を比較検討した。

その結果、全機関とも誤検出はなく、報告値も160農薬（農薬×試料×検出器×機関）中の150農薬は回収率として70～120%の範囲となり、良好な結果が得られた。また、全体を通じて変動係数も小さく、各検査機関で測定機器の維持管理が適正に行われていると考えられた。

第3章 調査研究・報告

第6節 研究発表の抄録

310 Genetic Analyzer による腸管出血性大腸菌 O157 の MLVA について

○榮井毅, 田邊純子, 橋田みさを, 北堀吉映

平成22年11月5日(神戸市) 第37回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会

MLVAはPFGEと同等の識別能を有するといわれ, より迅速性のある分子疫学的手法である. 腸管出血性大腸菌O157の集団感染事例等における検査対応において, 当センターに対応した効率的なMLVA解析手法を検討するにあたり, 保有するシーケンサー(310 Genetic Analyzer)に合わせて国立感染症研究所(感染研)プロトコルをモディファイした. その結果, 1検体約40分の電気泳動で9領域のVNTRを精度よく解析する系を確立することができた.

奈良県で発生したノロウイルス散発事例の遺伝子学的解析調査

○米田正樹, 大畑清嗣, 井上ゆみ子, 岡山明子, 北堀吉映

平成22年11月18日(橿原市) 第31回奈良県公衆衛生学会

全国的に大流行した2006/2007シーズン以降4シーズンのウイルス遺伝子型の変遷を把握するため, ノロウイルスの遺伝子解析および詳細な疫学的調査を行った. その結果, GⅡ型は, 2, 3, 4, 6, 7, 13の6つのgenotypeが検出された. 最も出現頻度が高かったものはGⅡ/4で, 06/07シーズンおよび07/08シーズンの2シーズンにおいて90%以上の高頻度であったが, 08/09シーズンでは64%, 09/10シーズンでは53%と明らかな減少が観察されたことから, GⅡ/4の影響から脱するに少なくとも2シーズンを要したと考えられた. genotypeの地域的な分布や変遷に極端な偏りはなく, 県下で一様にみられた現象であった.

キッチンにおける黄色ブドウ球菌の汚染状況

○橋田みさを, 田邊純子, 榮井毅, 北堀吉映

平成22年11月18日(橿原市) 第31回奈良県公衆衛生学会

一般家庭におけるキッチンの汚染状態を把握するため, 調理者, その家族とキッチン周辺のふき取り調査を実施した結果, ヒトの手指ふき取りから黄色ブドウ球菌を検出したのは30件中14件(46.7%)あり, 調理者に限定した場合は10件中5件(50.0%)であった。キッチンにおけるふき取りについては, 冷蔵庫の取手や包丁の柄からも検出した。調理者から検出した菌株と, その家族やキッチンのふき取りから検出した菌株は, 同じエンテロトキシン遺伝子型, 及びコアグラゼ型であったことは, 調理者が家族やキッチンに汚染を広めている可能性を示唆するものであり, 調理者が周囲におよぼす影響の大きいことが明らかになった。

河川水の一日内における溶存酸素量の変化について

○山中秀則, 高橋のぶ子, 高木康人, 兎本文昭

平成22年11月18日(橿原市) 第31回奈良県公衆衛生学会

河川水中の溶存酸素量(以下DOと表記)は, 水温, 流水状況, 汚濁物, そこに棲息する生物等によって変動しており, その濃度の低下は魚類へい死の一因となっている。

今回, 国が調査した大和川本流の奈良県側最下流測定地点でのDOの一日の数時間ごとの経時変化を解析した。その結果, 昼間のDOの増加, 夜間におけるDOの減少が見られた。DOの上昇時にpHの上昇も見られたことから, これは植物による光合成と呼吸に起因するものと考えられた。

キャニスター捕集・マイクロパージトラップ GC/MS による MVOC 測定とカビ汚染調査方法の検討

○浅野勝佳¹, 陰地義樹¹, 小川里恵¹, 中島大介², 影山志保², 白石不二雄², 高鳥浩介³, 後藤純雄⁴

¹奈良県保健環境研究センター, ²国立環境研究所, ³東京農業大学, ⁴麻布大学

平成22年12月10日(横浜市) 平成22年度 室内環境学会学術大会

キャニスター捕集・マイクロパージトラップGC/MSを用いて15種類の代表的な微生物由来揮発性有機化合物(MVOC)の一斉分析法を検討した。今回検討した15種類のMVOCは、VVOCからSVOCに相当する広範囲な化合物群であることから、新たに分析方法とその分析条件を検討した。マイクロパージトラップ部においては、2つのシステムを検討し、それぞれの最適条件を導いた。その結果、今回検討したMVOCの定量下限値は、概ね0.08 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、この分析方法を用いて家屋調査を行った結果、1-octen-3-ol (最高10.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) とそのケトン体である3-octanone (最高3.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) が高濃度で検出された。これらの物質は、真菌由来の可能性を強く示唆しているものと考えられた。

エルゴステロールを指標とした住環境のカビ汚染調査について

○浅野勝佳, 小川里恵, 陰地義樹, 仲澤喜代重

平成22年11月18日(橿原市) 第31回奈良県公衆衛生学会

分子マーカーとしてエルゴステロールを用いた微量分析方法により住居環境中のエルゴステロール調査を行った。その結果、濃度範囲は0.016~4.2 ng/m^3 , 平均 0.90 ng/m^3 であった。Millerの変換係数を用い今回調査したエルゴステロール濃度から推定孢子数を求めた結果、一般家屋において報告されている孢子数(CFU)と同程度の範囲を示した。今回調査のエルゴステロール濃度をもとに推定した孢子数と実際のCFUの関係は、0.4~4.0 (推定孢子数/CFU) と概ね対応していた。これらのことから、エルゴステロールを用いた新たな浮遊真菌調査方法としての妥当性が確認された。

喫煙による体内化学物質（ニコチン、コチニン、カフェイン、カドミウム）濃度の変化

田中 健

平成22年11月18日（橿原市） 第31回奈良県公衆衛生学会

ラット血清及び脳中ニコチン濃度は、喫煙後、急激に減少し、1時間で半減した。コチニンはニコチンの減少とともに増加し、2～4時間でピークに達した。喫煙群の尿中平均濃度はニコチン1.31mg/gクレアチニン、コチニン0.83mg/gクレアチニンであった。非喫煙群はニコチン0.001mg/gクレアチニン未満、コチニン0.0011mg/gクレアチニンであった。カフェイン180mgを飲用した場合、喫煙群は、飲用前0.96 μ g/mL、飲用後40分で5.01 μ g/mLと上昇し、軽い喫煙習慣でも非喫煙者の1.3倍と有意に血清カフェイン濃度を上昇させた。尿中カドミウム濃度は年齢と共に高くなるが、いずれの年齢層でも喫煙群は非喫煙群より高く、非喫煙群より1.2～2.4倍高かった。

誘導結合プラズマ質量分析計（ICP/MS）による清涼飲料水中のヒ素、鉛、カドミウムおよびスズの分析

森居京美・城山二郎・木本聖子・山本圭吾

平成22年11月11～12日（神戸市） 第47回全国衛生化学技術協議会年会

清涼飲料水をマイクロウェーブ分解装置で分解し、成分規格であるAs, Pb, Cd, SnをICP-MSで一斉に分析する方法を検討した。分解にはマイクロウェーブ分解装置を使用した。試料に硝酸と過酸化水素を加え、150℃まで徐々に温度を上げ、10分間保持したとき分解できた。このままではスズの回収率が低かったので、塩酸を最終検液として500ppmになるように分解容器を洗浄しながら加えたところ、回収率が向上した。今回の方法での定量下限値は公定法検出下限値の概ね1/10以下であった。市販の清涼飲料水4種類に標準を添加し、回収率を求めた。標準を0.1ppm添加した回収率は84-107%、1.0ppm添加した回収率は85-110%と良好な結果が得られた。また、スズの標準を5ppm添加したときの回収率は89-103%であった。この方法で市販の清涼飲料水20検体を測定したところ、Asで1検体、Snで5検体検出されたが、公定法の検出下限値以下であった。今回検討した方法は酸などの試薬が少量ですみ、分解時間、測定時間ともに大幅に短縮されエコでクリーンな分析法であるといえる。

奈良県保健環境研究センター年報投稿規定

1. 奈良県保健環境研究センター年報は、研究センターにおいて行った研究・調査の業績を掲載する。
2. 投稿者は、本研究センター職員とする。ただし、共同研究者はこの制限を受けない。
3. 原稿の種類と内容
 - (1) 原著

調査研究などで、独創性に富み、新知見を含むまとまったものは、原著として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、要旨（200字程度）、緒言、方法、結果、考察、文献とする。
 - (2) 報告

調査研究、事業に係る技術等検討などでまとめておく必要のあるものは、報告として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、緒言、方法、結果、考察、文献とする。
 - (3) 資料

事業に係る技術等検討及び特に記載してまとめておく必要のあるものは、資料として投稿できる。記述の順は、表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、本文とする。本文には緒言、方法、結果、考察に相当する内容を含め、体裁にとらわれず自由に記述することができる。資料の長さは刷り上がり2ページを超えない。
 - (4) 他誌掲載論文の要旨

他誌に掲載した論文の内容を紹介する。記述の順は、表題、著者名、掲載誌名、要旨（欧文も可）とする。
 - (5) 研究発表の抄録

学会（研究会を含む）に発表した内容を紹介する。記述の順は、表題、発表者名、学会名（研究会名）、抄録（欧文も可）とする。抄録の内容は400字以内（欧文は10行以内）にまとめる。
4. 原稿作成要領
 - (1) 執筆要領
 - i) 本文は日本語を用いる。
 - ii) すべての原稿はワープロソフトで作成し、句読点は「,」「.」とする。
 - iii) 原稿はA4版用紙を使用する。表題（和文、欧文）、著者名（和文、欧文）、要旨は、1行46文字、緒言以下は、1行24文字、1頁46行の2段組とする。
 - iv) 見出しおよび小見出しはゴシック体を用いる。見出しには「1., 2., …」を、細文見出しには「1), 2), …」を、さらなる細文見出しには「(1), (2) …」「①, ② …」「i), ii) …」等の番号をつける。
 - v) 単位は国際的に慣用されているものを使用し、末尾にはピリオドをつけない。
 - (2) 表題、著者名、所属機関名
 - i) 表題の和文はゴシック体とし、欧文は冠詞、前置詞・副詞、接続詞以外の単語は第1字目を大文字にする。
 - ii) 著者名の欧文は、名は最初の1文字のみを大文字とし、姓はすべて大文字とする。
 - iii) 本研究センター職員以外の著者名については、その右肩に「*、**」の記号をつけ、それぞれの所属機関名をその頁の最下段に脚注として記載する。
 - (3) 図・表および写真
 - i) 図・表および写真は原則として白黒とする。
 - ii) 図・写真では下にタイトルと説明を、表では上にタイトル、下に説明を記載する。
 - iii) 図はそのまま写真印刷されるので、線の太さ、文字の大きさなど縮尺を考慮し作成する。
 - iv) 本文中に図・表及び写真の挿入箇所を示す。
 - (4) 脚注および引用文献

- i) 脚注は「*」を用い、欄外に入れる。
- ii) 引用文献は¹⁾, ²⁾, …のように一画をあたえて右肩に示し、最後に一括して番号順に列記する。
- iii) 文献は下記のように著者名(3名まで)、雑誌名、巻、ページ、年号(西暦)の順に記載し、巻数はゴシック体、欧文雑誌名はイタリック体とする。以下に例を示す。

- 1) 佐藤恭子, 山田隆, 義平邦利, 他: 食衛誌, **27**, 619-623 (1986)
- 2) J. Hine, A. Dowell, J. E. Singley, et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 479-483 (1956)
- 3) “食品衛生検査指針理化学編” 厚生省生活衛生局監修, 212-216 (1991), (社)日本食品衛生協会

5. 原稿の提出について

- (1) A4版用紙に印字した原稿と図・表を各1部とする。なお、紙情報にあわせて原稿・図・表の電子情報の形で提出のこと(添付メール形式)。無理な場合は原稿だけでも電子情報で提出のこと。
- (2) 原稿は所属担当統括主任研究員を経て編集委員に提出する。
- (3) 提出期限は編集委員会で定める。

6. 審査

原稿は編集委員会において審査し、採否を決定する。また編集委員会は必要に応じて、種類・内容の変更を求めることができる。

7. 校正

校正はすべて著者の責任とするが、編集委員会は編集の都合上変更を求めることができる。

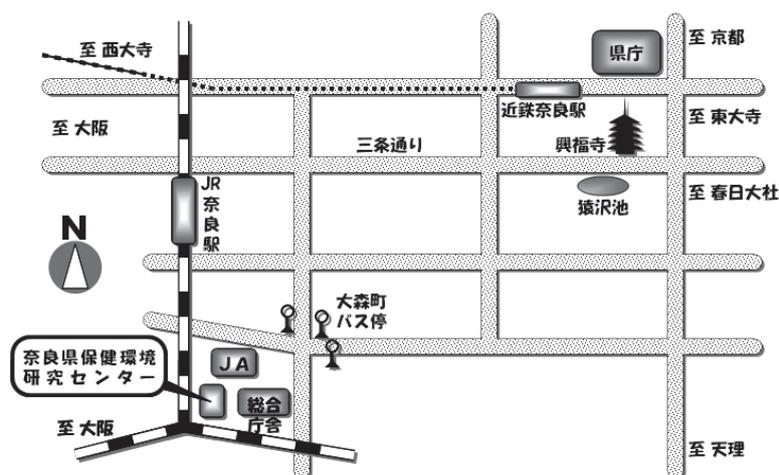
8. その他

- (1) 年報編集に関し必要な事項は、すべて編集委員会において決定する。なお編集委員会はセンター所長(編集委員長)、副所長及び各担当1名の編集委員で構成する。
- (2) 編集委員の任期は2年とし、業務は年報の発送をもって終了する。なお、再任を認める。
- (3) 編集委員は上記の業務終了後、速やかに次期編集委員に業務の引継ぎを行う。

9. 附則

- (1) この奈良県保健環境研究センター年報投稿規定は、平成19年4月12日から施行(改正)する。

【奈良県保健環境研究センター】



- ・ 近鉄奈良駅より 市内循環バス内回り, 大森町バス停下車
JR奈良駅より 徒歩7分
- ・ http://www.pref.nara.jp/dd_aspx_menuid-4827.htm