

大村市に造成した「ガラスの砂浜」における被覆網によるアサリの保護効果(2021年度)

古賀 彩子, 橋本 京太郎

Effect of Cover-Net Preventing Feeding Damage to Protect Short-necked Clam *Ruditapes philippinarum* on Artificial Tidal Flat in Omura Bay (2021)

Ayako KOGA, Kyotaro HASHIMOTO

キーワード: 大村湾、アサリ、食害防止

Key words: Omura Bay, Short-necked Clam, Prevention of feeding damage

はじめに

長崎県本土のほぼ中央に位置する大村湾では、長崎県が2014年度から「再生砂による浅場づくり実証試験事業」を開始しており、2016年6月には大村市森園町地先に廃ガラス砂を用いて1haの浅場を造成した(図1)。当センターは、この事業における覆砂効果の検証を実施しており、アサリ(*Ruditapes philippinarum*)の生息密度や底質環境に関するモニタリング調査を行っている。これまでの調査により、造成した浅場では、アサリ稚貝の生残が低いことがわかった¹⁾。アサリ稚貝の減耗要因については、底質環境の変化や貧酸素化、波浪等の物理環境に起因する減耗、食害が報告されており²⁾、このうち食害については、ナルトビエイやクロダイなどの生物による食害の防止策として被覆網の設置が有効であることが報告されている^{3,4)}。そこで、当センターが2019年度から実施している環境教育イベントの一環として、食害生物によるアサリの減耗を防止するための被覆網を用いた被食防止施設を造成浅場に設置し、その効果を検証した。

本稿では、2019年度から実施した調査結果から、当該施設におけるアサリの出現状況について報告する。

方法

被食防止施設の概要を図2および表1に示す。実験施設は覆砂した砂浜の低潮帯(A.P.±0~-0.2)に海岸と平行に全8試験区を設定し(図2a)、それ

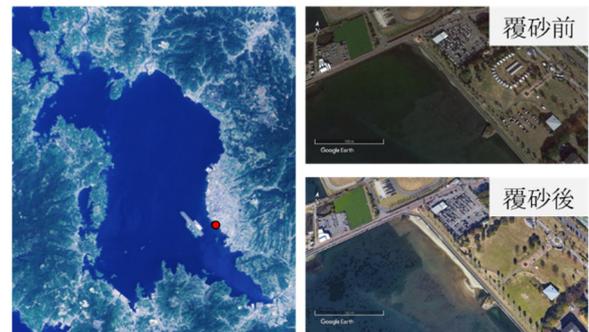


図1 「再生砂による浅場づくり実証試験事業」実施場所の覆砂前後の状況比較(大村市森園)

ぞれの試験区を1, 2, A, B, C, D, E, Fとして図2bのとおり設置した。施設に用いた被覆網(以下、ネット)は1辺が5mの正方形、目合い10~25mmのものを用い、2試験区(AおよびB)はネットを設置しない対照区とした(表1)。ネット設置区(6試験区; 1, 2, C, D, E, F)では、ネットの四隅およびその中間地点を杭で底質に固定し、ネットの4辺には浮上防止のためのステンレスチェーンを設置した。また、ネット中央には海底への埋没防止のためのフロートを付し、コンクリート平板と施設をロープで接続することで、施設の流出防止策とした。施設は、2019年8月に4試験区、2020年8月に2試験区を設置した(表1)。

アサリの個体数調査は、2019年度に2回(施設設置前(2019年8月)および設置後(2020年1月))、2020年度に4回(2020年5月、8月、11月、2021年2月)、2021年度に4回(2021年5月、8月、11月、2022年2月)行い、すべての調査は干潮時に実

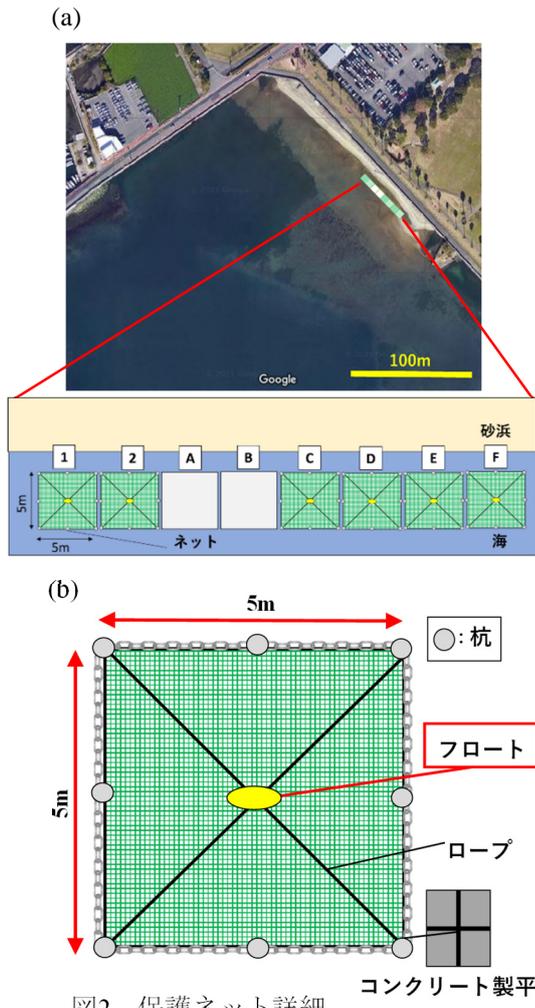


図2 保護ネット詳細
(a) 試験区平面図 (b) ネット平面図

施した。アサリの採集は枠取りで行い、試験区内の1辺30cmの方形枠内の底質を深さ10cm程度採集し、目合い1mmのふるいにかけて、残った底質から目視でアサリを取り出した。採集したアサリは、個体数

を計数するとともに殻長を計測した。

表1 全8試験区の条件詳細

試験区	1	2	A	B	C	D	E	F
ネット	あり	あり	なし	なし	あり	あり	あり	あり
目合	10mm	15mm	-	-	10mm	25mm	10mm	25mm
設置年月	2020年8月		-		2019年8月			

調査結果

1 個体密度

各試験区におけるアサリの個体密度の推移を図3に示す。

対照区(A, B)では2019年8月の個体密度はそれぞれ22個体/m²、33個体/m²であった。2020年5月にはそれぞれ2911個体/m²、1067個体/m²に増加し、2020年8月には44個体/m²、11個体/m²まで減少したが、2021年5月には1444個体/m²、1333個体/m²まで回復した後、56~311個体/m²で推移した。

目合い10mmのネットを用いた試験区CおよびEでは、施設設置前の2019年8月の個体密度はそれぞれ22個体/m²、44個体/m²であったが、施設設置後の2020年5月には1678個体/m²、1233個体/m²に増加し、設置前と比較してそれぞれ76倍、28倍以上の密度となった。調査期間中の最大密度は、試験区Cで2021年8月に4789個体/m²、試験区Eで2021年5月に1989個体/m²であった。

目合い25mmのネットを用いた試験区DおよびFでは、施設設置前の2019年8月の個体密度はそれぞれ44個体/m²、33個体/m²であった。施設設置後の2020年1月には456個体/m²、644個体/m²に増加し、施設設置前の10倍、19倍以上の密度となった。調査期間中の最大密度は、試験区Dで2021年5月に1256個体/m²、試験区Fで2021年5月

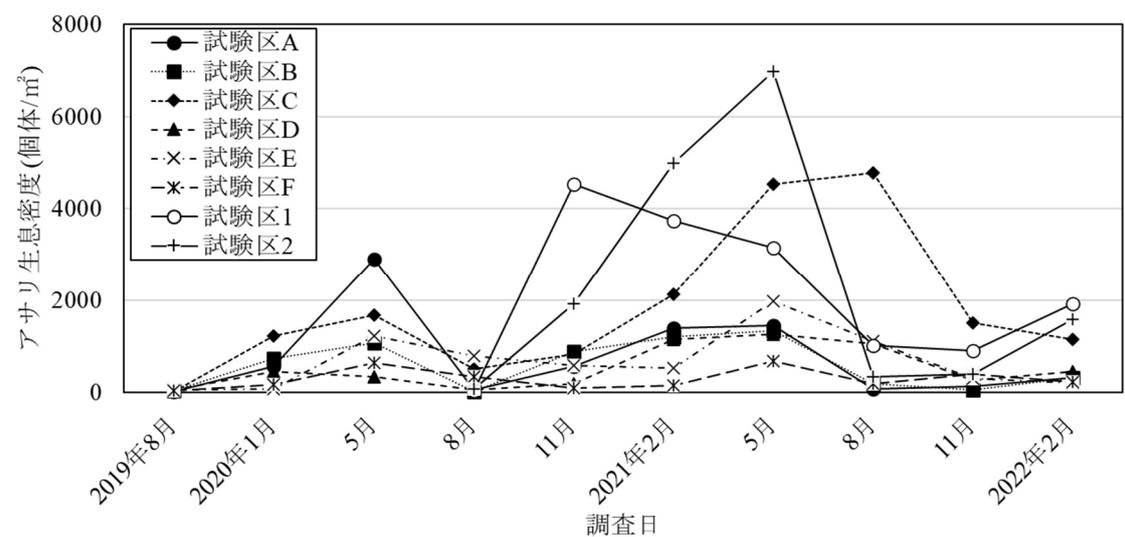


図3 アサリの個体密度

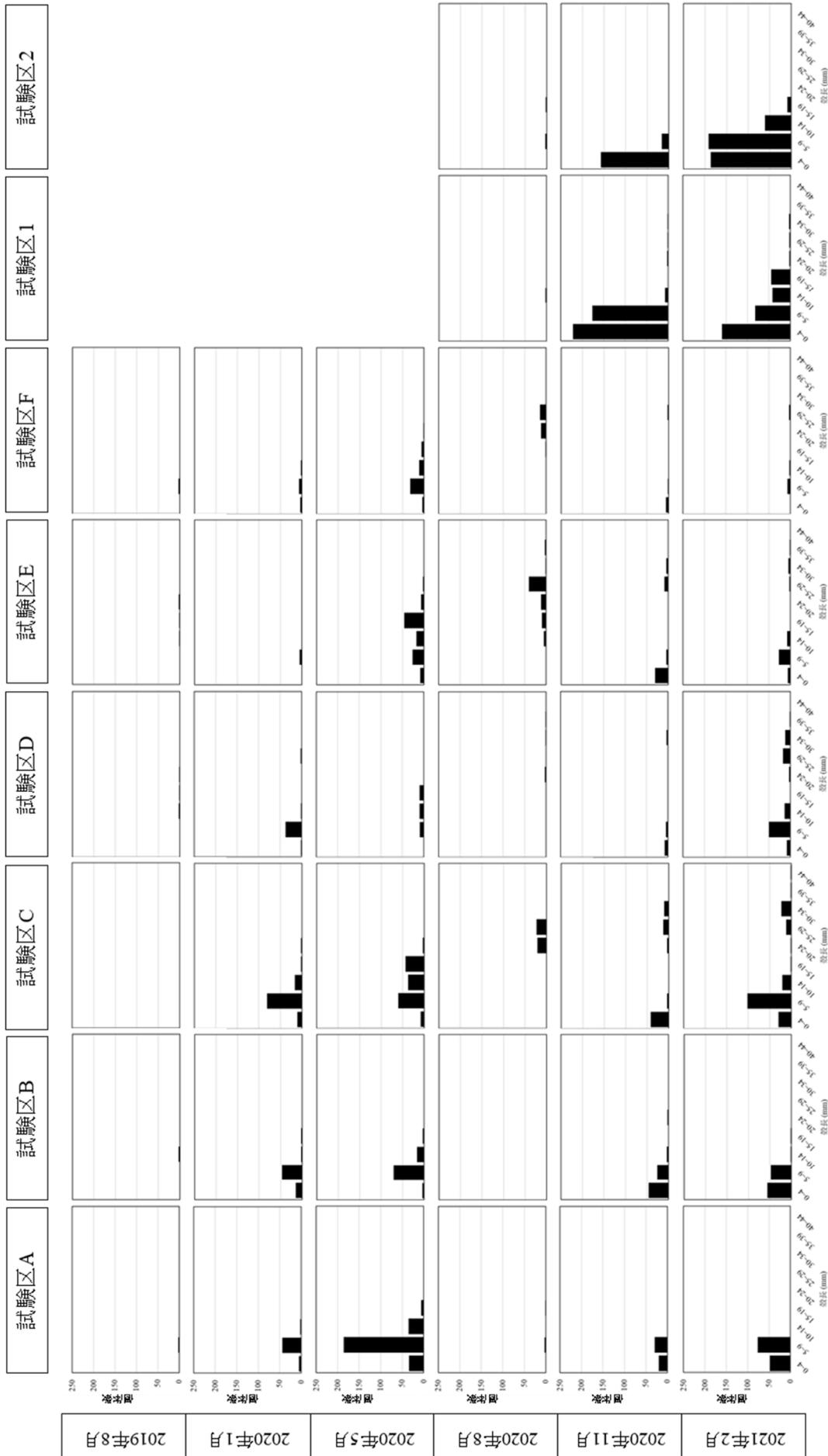


図4a アサリの殻長別個体数の推移

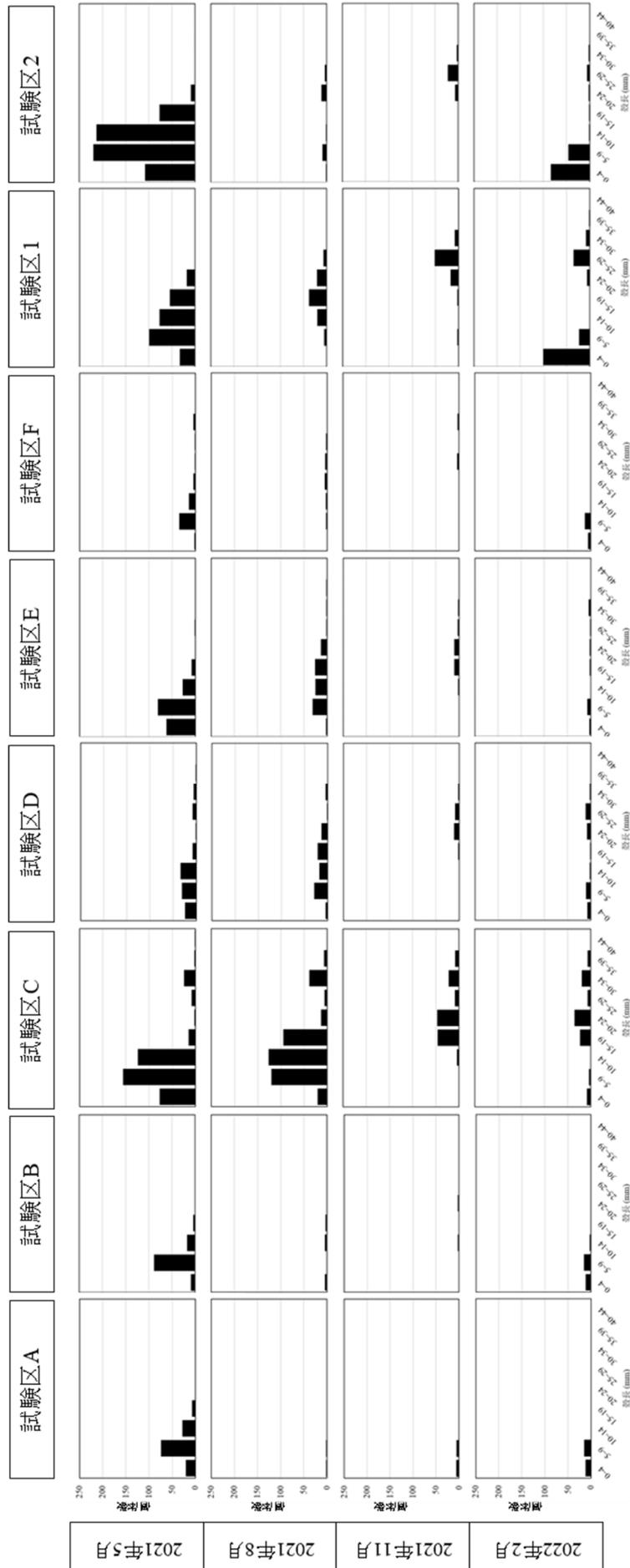


図4b アサリの殻長別個体数の推移

に 678 個体/m²であり、目合い 10 mm のネットを用いた試験区 (C, E) よりも低い傾向があった。

2020 年 8 月に目合い 10 mm のネットを用いて設置した試験区 1 では、施設設置前の個体密度が 33 個体/m²であったのに対し、設置後の 2020 年 11 月には 4544 個体/m²に増加し、施設設置前の 137 倍以上の密度となり、その後 900 個体/m²から 3733 個体/m²を推移している。2020 年 8 月に目合い 15 mm のネットを用いて設置した試験区 2 では、施設設置前の個体密度が 78 個体/m²であり、施設設置後の 2020 年 11 月には 1933 個体/m²に増加し、施設設置前の 24 倍以上の密度となった。さらに、2021 年 5 月には 6967 個体/m²まで増加した。

2 殻長組成

各試験区のアサリの殻長組成の推移を図 4 に示す。

試験区 A, B では、2020 年 1 月から殻長 10 mm 未満の個体群が出現したものの、2020 年 8 月には急激に減少し、2020 年 11 月には新たに 10 mm 未満の個体群が出現した。試験区 C, D, E, F では、2020 年 1 月から殻長 10 mm 未満の個体群が出現し、以降、時間経過とともに個体群の殻長が大きくなる傾向がみられた。また、2020 年 11 月には新たに 10 mm 未満の個体群が出現し、特に試験区 C では、殻長 20 mm 以上の個体も多く出現した。試験区 1, 2 では、2020 年 11 月および 2022 年 2 月に殻長 10 mm 未満の個体群が出現し、以降、時間経過とともに個体群の殻長が大きくなる傾向がみられた。

まとめ

2020 年 8 月から 2022 年 2 月の期間で、他の試験区で個体密度が増加したのに対し、試験区 E, F の個体密度は低い傾向があった。試験区 A ~ F 付近では、2020 年の 7 月豪雨や台風、波浪によって覆砂区の砂が北側に移動、海岸に堆積しており(図 6(a))、埋没していた礫が露出した状態となっている(図 6(b))。特に試験区 E, F では、2021 年 2 月から試料採集時再生砂がほとんど採取出来ない状態にまで悪化しており、再生砂の減少が試験区 E, F の個体密度減少の一因と考えられる。

試験区 C ~ F 及び試験区 1, 2 では時間の経過とともに個体群の殻長が大きくなる傾向がみられ、20 mm 以上の大きなアサリも多数出現した。一方、対照区 A, B では 20 mm 以上の個体はほとんど出現しなかったことから、造成浅場におけるネットの設置はア

サリの食害防止に一定の効果があることが示唆された。また、当該浅場のうち試験区以外の区域は、エイ類等の食害生物によってアサリに対する捕食圧が働いていることが示唆された。

被覆網によるアサリの食害対策では、ネットを設置した試験区はネットの無い対照試験区と比較すると残存率が高いことが報告されており^{5, 6)}、より小さい目合のネットの方がアサリの生残率に優れることも報告されている^{5, 7)}。本調査においても、目合 10 mm の試験区 C, E のほうが目合 25 mm の試験区 D, F よりも個体密度が高い傾向があった。また、試験区 1, 2 においても、目合 10 mm の試験区 1 の方が目合 15 mm の試験区 2 よりも殻長 20 mm 以上の個体の密度が高く、目合の小さい試験区の方がアサリの生残に有利であったことが推察された。

被覆網については、波浪軽減にも効果があり、アサリ稚貝の移動の抑制に効果があるとされる⁶⁾。再生砂の量が減少した試験区 A ~ F と比較して、試験区 1, 2 では砂の堆積量の多さとネットの波浪軽減効果によりアサリの幼生が着底しやすい状況であったと推測される。

以上の結果から、ガラスの砂浜における被覆網の設置は、アサリの生残性向上に有効な手段であることが確認された。

最後に、調査を進めるうえで有益な情報・助言をいただいた国立環境研究所と地方環境研究所との型共同研究「里海里湖流域圏が形成する生物生息環境と生態系サービスに関する検討」のメンバーに感謝の意を表す。



図5 (a)海岸線の変化 (b)試験区付近の変化

参考文献

- 1) 粕谷智之:再生砂による浅場づくり実証実験事業 平成30年度事後調査結果—ガラスの砂浜(大村湾)におけるアサリ生息密度の変遷—, *長崎県環境保健研究センター所報*, **64**, 43-52 (2018)
- 2) 水産庁増殖推進部:有明海漁場造成技術開発事業 二枚貝漁場環境改善技術導入のためのガイドライン, 2013
- 3) 薄浩則, 他:ナルトビエイによるアサリに対する食害の防除に関する水槽実験, *水産技術*, **5**(1), 57-66 (2012)
- 4) 後田俊直, 他:八幡川河口干潟におけるアサリ被覆網の有効性, *広島県立総合技術研究所 保健環境センター研究報告*, **27**, 35-42 (2019)
- 5) 角野浩二, 他:榎野川河口干潟における住民参加型アサリ再生活動の被覆網管理手法の検討, *山口県環境保健センター所報*, **54**, 74-76 (2011)
- 6) 柴田輝和, 他:干潟での被覆網によるアサリ人工稚貝の中間育成, *栽培技研*, **28**(2), 109-114 (2001)
- 7) 小林豊, 他:被覆網を用いた春から夏季におけるアサリ人工稚貝干潟育成試験, *水産技術*, **5**(1), 67-74 (2012)

植物プランクトン（藍藻類）増殖抑制手法の検討（現場試験）

豊村 誠, 神崎 正太, 浦 伸孝, 粕谷 智之

Examination of Phytoplankton (Cyanobacteria) Growth Suppression method (field test)

Makoto TOYOMURA, Syota KANZAKI, Nobutaka URA, Tomoyuki KASUYA

キーワード: 藍藻、遮光、現場試験

Key words: cyanobacteria, shading, field test

はじめに

全国各地の湖沼やため池などの淡水域において、アオコの発生により、景観悪化、悪臭、水道における施設障害や異味異臭、魚類のへい死といった問題が発生しており、長崎県内でもアオコの発生が確認されている。そのため、アオコ抑制対策の検討が必要であり、アオコ対策として「遮光」、「副ダム」、「バイパス」、「浚渫」、「分画フェンス」等の手法が挙げられる¹⁾。その中でも、「遮光」が他の方法と比べて容易に実施可能であることから、「遮光」によるアオコ抑制手法の検討を行うこととした。「遮光」による効果を検証するにあたって、野外に遮光施設を設置し、水位の変動への対応や資材の流出対策を含めた維持管理手法を検討する必要がある。本研究では、諫早市内にある小ヶ倉ダムにおいて小規模遮光施設（以下、「遮光施設」という）を設置して、維持管理手法の検討（以下、「実証試験」という）を行った。

材料と方法

1 調査地点

小規模遮光施設を設置する地点として小ヶ倉ダム内にある地点Aを選定した（図1）。選定理由としては、令和2年にアオコの発生が確認された地点であること、また、地点Aと同じような地形でアオコの発生が確認された地点B、Cに比べて水際へのアクセスが容易で設置作業の実施が可能であることである。また、対照地点として、地点Aと同様にアオコの発生が確認され、Aの近傍にある地点B、Cを選定した。

2 遮光施設の作製

遮光資材の種類によって必要となる維持管理手法の比較・検討のため、3つの異なる遮光資材（～）

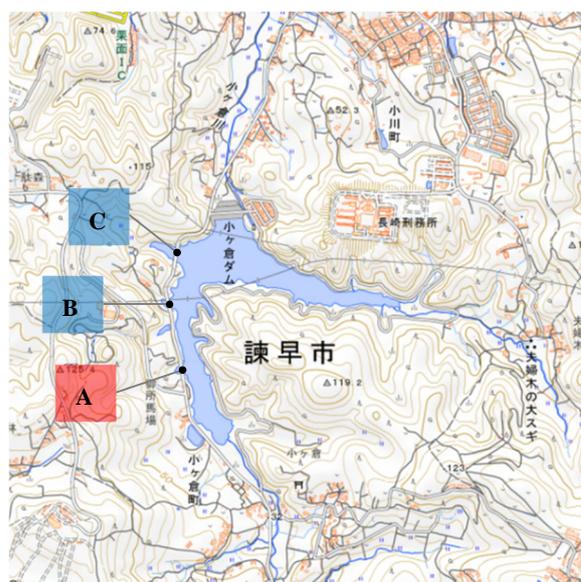


図1 調査地点

国土地理院地図（標準地図）より作成

を作製することとした（図2）。また、一つの遮光資材を2 m×2 mの大きさで作製した。遮光資材 は、漁業用に使用されているEVAフロートを用いて作製した。なお、上からの投影面積から遮光資材 の遮光率を概算すると、約50%である。遮光資材 は、農業用に使用されている遮光ネット（市販、2 m×2 m、遮光率：約75%）を用いて作製した。遮光資材 は、アオコ抑制のための部分遮光に使用されているシャロークリーン²⁾（株式会社クレハ環境製）を用いて作製した。シャロークリーンは、本来、固定せずに浮かべて使用するが、今回は、流出防止対策として、2枚のネットで挟み四辺をロープで閉じて使用した。なお、上からの投影面積から遮光資材 の遮光率を概算すると、約80%である。



図2 遮光資材

3 遮光施設の設置

設置作業は2021年6月2日に行った。遮光施設は、3つの遮光資材を連結して、2 m×6 mの大きさに設置した(図3～5)。遮光資材はそれぞれ予め作製しておき、現場へ搬入後にロープ及び支柱を使って各資材を連結し、遮光施設とした。遮光施設は流出防止のため、岸側から陸上の木や杭に固定したロープを結ぶとともに、沖側へはアンカーを沈めて固定した。また、水位変動に対応できるように固定用ロープは長めにした。

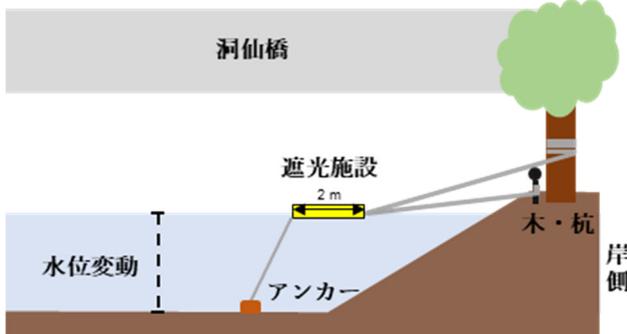


図3 現場設置状況の模式図(側面)

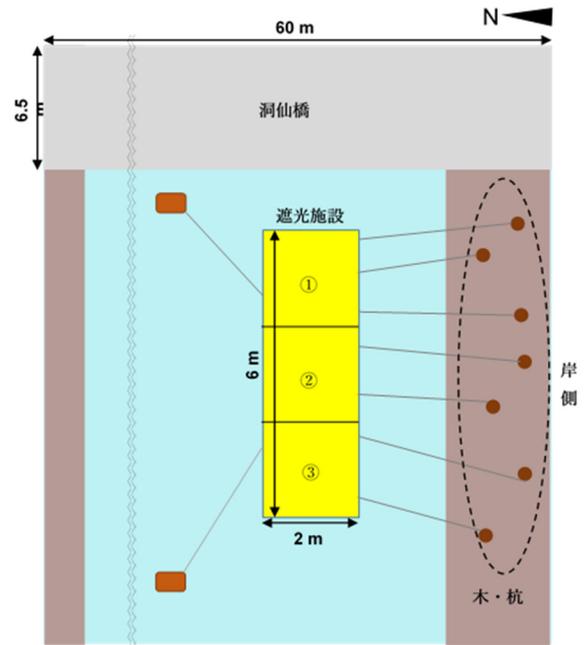


図4 現場設置状況の模式図(上面)

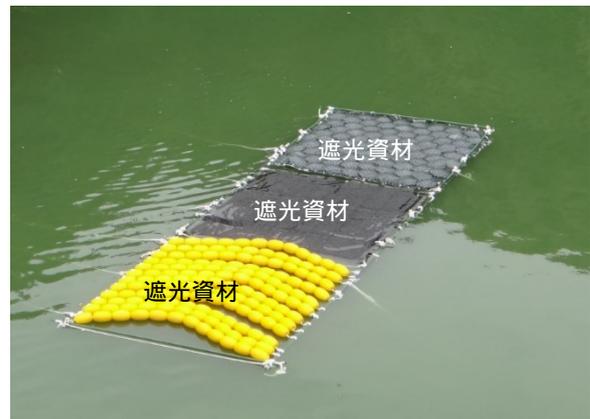


図5 遮光施設の設置状況

結果

遮光施設は2021年6月2日から12月15日まで設置した。その間、遮光施設の状況観察(現況調査)を定期的に行い、必要に応じて維持管理の対応を行った。小ヶ倉ダムにおいては、6月16日よりダム水の農地への取水が開始され、ダム内の水位が徐々に下がり始め、7月5日の現況調査時に遮光施設の一部が陸に揚がっているのを確認した。水面に戻す際に遮光施設を持ち上げたところ、連結用の支柱が遮光施設自体の重さに耐えきれず破損した。そこで、破損した支柱を取り外し、新しい支柱と入れ替えた。加えて、一部の固定用ロープが張っている状態であったため、新しいロープを継ぎ足し延長した。遮光施設の構造自体が複雑な構造ではないため、補修は容易にできた。その後の観察でダムの水位が下がり続ける様子が確認された。7月26日に遮光施設の大半が陸に揚がり、8月2日に遮光施設全体が陸に揚がった。8月10日には設置区画

全体が干上がり、遮光施設及びアンカーが全て陸に揚がった(図6)。その後、8月18日に直近の大雨の影響によりダムが満水の状態となった(図4)。その際、遮光施設は流出せずに水面上にあり、また、破損等は見られなかったことから、遮光施設が大きな水位変動に対応可能であることが確認された。一方で、遮光資材については、実験期間途中から遮光ネットがたるんで、水面下に沈んでいる様子が見られ、遮光能力に影響が出る可能性があることから、遮光資材や遮光資材のようなフロートで作製した遮光資材が遮光に適していると考えられる。その後、12月13日の現況調査において、アオコ発生を終息傾向が見られたことを受けて、12月15日に遮光施設の撤去を行った。



図6 遮光施設の状況
(上:8月10日、下:8月18日)

また、各地点における見た目アオコ指標レベル³⁾の観測状況を表1に示す。全ての地点でアオコが確認され、Aでレベル1~3、Bでレベル1~4、Cでレベル1~3が確認された。遮光施設の設置地点Aのレベルと比較して対照地点B、Cのレベルは低くなるが多く、地点Aのレベルが地点B、Cと比べて低くなる傾向は見られなかった。ダムの規模に対して遮光施設が小規模であることに加えて、風向きなどの気象条件、地形等の地理的条件によって周辺のアオコが集積している可能性がある。

表1 地点A、B、Cにおける見た目アオコ指標レベル

日	6/2	6/9	6/15	6/21	6/29	7/5	7/12
A		~3				0	0
B				~4		0	0
C		~3				0	0

日	7/19	7/26	8/2	8/10	8/18	8/23	8/30
A	0	3	3	2			
B	0	0		0			
C	2	3	3	2			

日	9/6	9/13	9/21	9/27	10/4	10/13	10/18
A	0	0	2	0	~3		3
B	0	0	1	0	2		
C	0	0	2	0			3

日	10/25	11/1	11/8	11/15	11/24	12/1	12/8
A				2	0	0	2
B		3		2	0	0	2~3
C		3		3	0	0	0

日	12/13	12/15	12/21	12/27	1/5
A	0	2	2	0	0
B	2	2	2	0	0
C	0			0	0

《表中の見た目アオコ指標レベル表記方法》

レベル：0~6段階で記載

数字：各地点において、アオコが部分的に発生(約7割未満)している場合

丸数字：各地点において、アオコが全体的に発生(約7割以上)している場合

まとめ

実証試験において、遮光施設を作製し、小ヶ倉ダム内に設置した後、遮光施設の状況及びアオコ発生状況を目視にて確認した。その結果、今回作製した遮光施設は、維持管理において、破損に注意する必要があるが、ダムの水位変動に対応可能であることが確認された。現況調査において、対照地点より設置地点の方が、レベルが低いといった傾向は見られなかった。遮光面積が小さいことに加えて、調査地点が風などによってアオコが集積しやすい場所である可能性がある。

施設の設置手法の検討のため、3つの異なる遮光

資材を連結して設置した。これらの遮光資材について、作製・設置・維持管理及び遮光能力、水位変動への対応について評価を行った。

遮光資材 については、フロートを連結して作製しているため、遮光率を調整しやすい。また、急激な水位変動が発生しても、地形に沿った形をとりやすく、壊れにくい。しかし、フロートの形状から隙間ができやすく遮光率の上限が低い。次に、遮光資材 については、作製は容易だが、ネットが水面下に沈みやすく、遮光能力を維持させることが難しい。また、遮光率の調整は出来ず、ネットに汚れがたまりやすいため、遮光率への影響が考えられる。最後に、遮光資材 については、複数のフロートを使って作製しているため、フロートの枚数を変えることで遮光率を調整しやすく、フロートの形状から最大限遮光率を調整することができる。また、水位変動への対応が可能であるが、フロートをネットで挟んで固定しているため、地形に沿った形にはならず、水底と接触した部分に負荷がかかりやすくなっている。ネット等の流出防止対策をせずにフロ-

ートを単体で使用すれば、水位変動への対応がより良くなると考えられるが、フェンスの設置など、別の流出防止策を考える必要がある。以上のことから、遮光資材としては、遮光率50%程度であれば遮光資材 、それ以上であれば遮光資材 が適していると考えられる。なお、施設を大規模化するには、資材や維持管理手法について更なる検討が必要と考えられる。

参 考 文 献

- 1) 農林水産省：農業用貯水施設におけるアオコ対応参考図書 (平成 24 年 3 月)
- 2) 小島貞夫, 他: 局部遮光による藻類 (アオコ) 制御の実証的研究, *用水と排水*, 42 (5), 389-396 (2000)
- 3) 国土交通省関東地方整備局霞ヶ浦河川事務所: アオコ日誌, <https://www.ktr.mlit.go.jp/kasumi/kasumi00313.html> (令和4年4月22日閲覧)

植物プランクトン (藍藻類) 増殖抑制手法の検討 (室内培養試験)

豊村 誠, 神崎 正太, 浦 伸孝, 粕谷 智之

Examination of Phytoplankton (Cyanobacteria) Growth Suppression method (laboratory culture test)

Makoto TOYOMURA, Syota KANZAKI, Nobutaka URA, Tomoyuki KASUYA

キーワード: 藍藻、遮光、室内培養試験

Key words: cyanobacteria, shading, laboratory culture test

はじめに

「植物プランクトン (藍藻類) 増殖抑制手法の検討 (現場試験)」において、小規模の遮光施設による実証試験では、遮光面積が小さく、遮光効果が確認できなかった。そこで、遮光による植物プランクトン (アオコ) の成長抑制効果を確認するために、遮光条件下での植物プランクトンの室内培養を行い、遮光効果を検証した。

材料と方法

1 植物プランクトンの培養

小ヶ倉ダムの洞仙橋で採取した *Microcystis aeruginosa* を単離培養して、実験に用いた。培地は、半造川の嘉一橋で採水した河川水をガラス繊維ろ紙 (GF/B 孔径1.0 μm) でろ過し、121 °Cで20分間高圧蒸気滅菌を行ったものであり、栄養塩類の添加は行わずに使用した。

2 培養条件

*M. aeruginosa*を添加した3 Lの培地から50 mLを61 mL容量の試験管10本それぞれに分注した後、インキュベータ内に静置して、一定の温度及び照度下で数日～2週間程度培養した。インキュベータ内の温度設定は、32°C、28°C、24°Cの3条件、照度設定は、2440 Lx (インキュベータ中心部における照度) で常時点灯状態とした。遮光は、寒冷紗 (遮光率: 約51%) を使用し、「遮光なし」、「寒冷紗1枚で被覆 (遮光率51%)」、「寒冷紗2枚で被覆 (理論上の遮光率76%)」の3条件とした (図1)。

実験開始時と終了時のChl.a及びその他の項目の水質分析を行い、実験途中にも適宜分析を行った。



図1 遮光条件 (右から 、 、)

3 水質分析

水質の分析方法は、表1に示したとおり。

表1 水質分析項目及び分析方法

項目	分析方法
COD	JIS K 0102
T-N	JIS K 0102
NO ₃ -N	Mullin-Riley法
NO ₂ -N	JIS K 0102
T-P	JIS K 0102
PO ₄ -P	JIS K 0102
Chl.a	海洋観測指針

4 細胞数の計数

培養した *M. aeruginosa* は群体とならずに1細胞ずつ単離していたため、試験管中の培養液を1 mL抽出し、その中の *M. aeruginosa* の細胞を光学顕微鏡 (200倍) で計数した。培養液はChl.a濃度に応じて最大50倍まで希釈した。

結果と考察

1 培養条件の検討

インキュベータ内の温度を32°Cに設定して、*M. aeruginosa*の初期濃度を見た目アオコ指標レベル¹⁾1程度に調整して培養した結果(培養試験)、最終的なChl.a濃度が > > の順に高い値を示すことを想定していたが、実際には、5日後の培養終了時のChl.a濃度は > > となった(表2)。培養液を攪拌する際の目視観察においては、培養途中までは が最も成長速度が速い様子であったが、次第に培養液の色が緑から黄緑、白へと変わっていき、培養終了時は白く脱色していた。目視観察及び分析結果を合わせて状況を考えると、遮光率が低い条件ほど*M. aeruginosa*の成長が速いため、成長に必要な栄養塩類を早く消費してしまい、結果として*M. aeruginosa*が死滅し、Chl.a濃度が減少していったものと考えられる。

表2 Chl.a分析結果(培養試験)

培養日数	Chl.a [µg/L]		
	0	73	73
5	22	79	160

そこで、遮光以外の増殖制限要因を排除するために、温度及び照度条件は同様で、*M. aeruginosa*の初期濃度をより低くして培養した(培養試験)。また、Chl.a濃度の変化を確認するために、5日後の培養終了時に加えて、培養3日後にもChl.a濃度の測定を行った(表3)。

目視観察において、培養3日後までの*M. aeruginosa*の成長速度は > > の順に速い様子であったが、培養3日後のChl.a濃度は、と が同等であった。また、培養終了後のChl.a濃度は、が最も低い値を示し、と が同等の値を示した。Chl.a濃度について、では増加した後に減少、では培養3日後まではと同程度増加し、そこから培養5日後まではほぼ横ばい、では培養5日後まで少しずつ増加し続ける、という結果が得られたことから、遮光率が低い条件ほどChl.a濃度の増加ピークを早く迎えているものと考えられる。つまり、培養試験と同様に遮光率が低い条件ほど*M. aeruginosa*の成長が速いため、成長に必要な栄養塩類を早く消費してしまい、*M. aeruginosa*が成長できなくなっている状況を示しているものと考えられる。

そこで、培養試験では、培養開始時と培養終了時における培養液中の栄養塩類(項目:全窒素(T-N)、硝酸態窒素(NO₃-N)、亜硝酸態窒素(NO₂-N)、全リン(T-P)、リン酸態リン(PO₄-P))の変化を確認した(表4)。その結果、T-N、T-Pについて、培養開始時と終了時でほとんど変化は見られなかった。これは、T-N、T-Pの分析が*M. aeruginosa*が生体内に貯留した窒素・リンを含めて培養液中の窒素・リンの測定を行うものであり、また、培養中に栄養塩類の添加を行っていないためと考えられる。

一方で、溶存態無機栄養塩類(NO₃-N、NO₂-N、PO₄-P)については、~ すべての培養条件で開始時から終了時にかけて、濃度が減少している状況が見られ、特にNO₂-Nについては、すべての培養条件で終了時に定量下限値未満(<0.02 mg/L)となった。NO₃-Nについては、と ではNO₃-Nはほとんど消費されて、定量下限値(0.02 mg/L)付近の値を示しているのに対して、では開始時の濃度の3割程度残っている状態(0.38 mg/L)であった。また、PO₄-Pについては、では定量下限値(0.003 mg/L)、では開始時の濃度の1割程度(0.009 mg/L)であるのに対して、では開始時の濃度の6割程度(0.062 mg/L)であった。よって、培養液中の栄養塩の枯渇が増殖の制限要因となっていることが示唆された。

表3 Chl.a分析結果(培養試験)

培養日数	Chl.a [µg/L]		
	0	14	14
3	110	110	64
5	82	120	120

表4 栄養塩類の分析結果(培養試験)

培養日数	T-N [mg/L]								
	0	1.3	1.3	1.3	1.1	1.1	1.1	0.03	0.03
5	1.2	1.3	1.2	0.02	<0.02	0.38	<0.02	<0.02	<0.02

培養日数	T-P [mg/L]			PO ₄ -P [mg/L]		
	0	0.12	0.12	0.12	0.10	0.10
5	0.12	0.12	0.11	0.003	0.009	0.062

そこで、温度及び照度は同様で、開始時の植物プランクトンの量をさらに減らして培養を実施するとともに（培養試験 ）、Chl.a濃度の測定を行う頻度を増やして、濃度変化を細かく確認した（図2）。

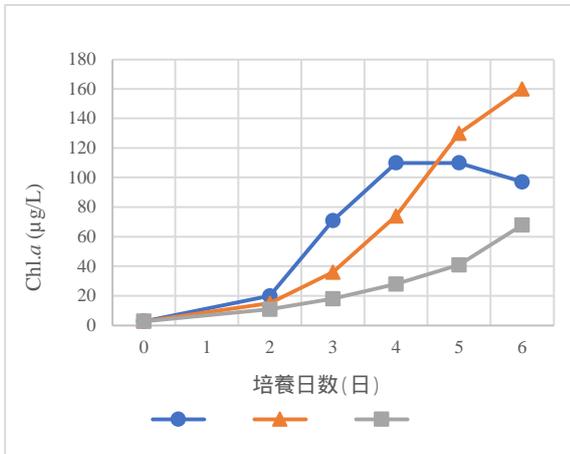


図2 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

Chl.a濃度の増加速度は、培養3日後まで遮光率が低い順に速く（ > > ）、培養4日後までは、
 が他の遮光条件と比べて最も高い値を示した。培養5日後以降、Chl.a濃度は、
 では減少し始めたが、
 と では増加し続けており、
 が最も高い値を示した。培養試験 では、*M. aeruginosa*の初期濃度を下げて、Chl.a濃度の測定頻度を増やしたことにより、各遮光条件間でのChl.a濃度の増加速度の差を確認することができた。よって、以後の培養試験は、培養試験 と同程度の*M. aeruginosa*の初期濃度 (Chl.a濃度 2.9 µg/L) で行うこととした。また、培養後4～6日目までの増加速度で水温の影響を比較する。

2 水温の影響

設定温度を32°Cとして、培養試験 と同様の条件で*M. aeruginosa*の培養試験を2回実施した（培養試験 、 ）。また、培養開始から終了にかけて、Chl.a濃度の測定を複数回行った（図3,4）。培養試験 では、培養4日後まで のChl.a濃度が最も高い値を示し、次に 、 の順であった。培養試験 についても、培養試験 と同様の傾向が見られた。これにより、遮光率が高い条件ほど*M. aeruginosa*の成長速度が抑制されている状況が確認された。

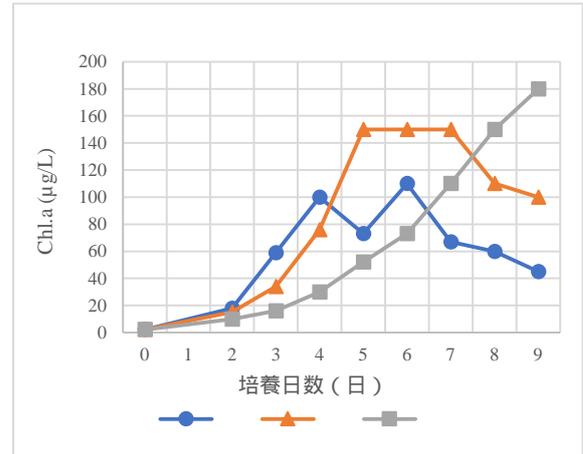


図3 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

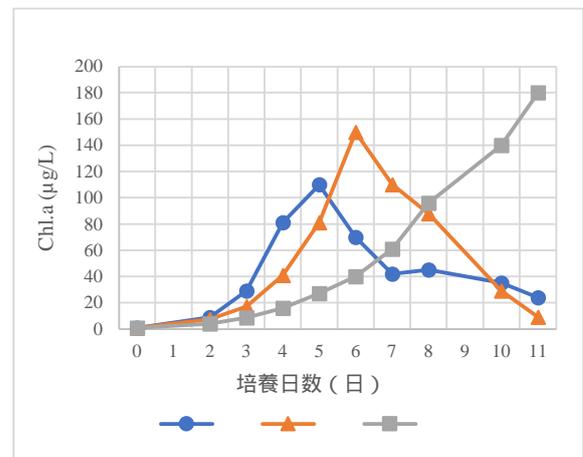


図4 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

次に、設定温度28°Cにおける培養試験を2回行った（培養試験 、 ）。培養試験 、 において、Chl.a濃度は、培養3日後までは遮光条件間で大きな差は見られなかった（図5,6）。培養3日後～6日後にかけては、
 のChl.a濃度が最も高い値を示し、次に 、 の順となったことから、設定温度32°Cの培養試験結果と同様に光が制限要因となっていると考えられる。しかし、32°Cの結果と比較すると、Chl.a濃度がピークに達するまでの日数が1～2日程度長いことから、温度が下がったことにより、*M. aeruginosa*の活性が落ちていることが影響しているものと考えられる。

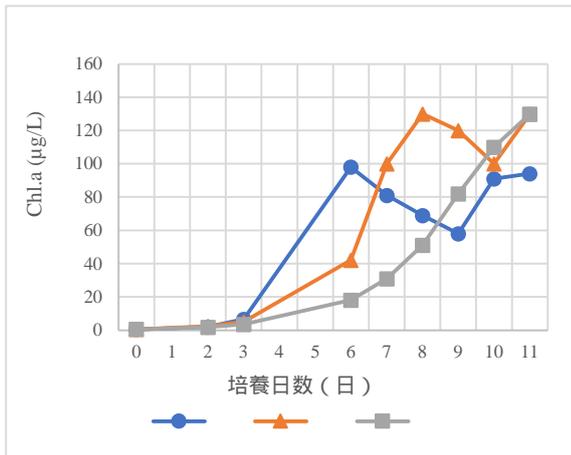


図5 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

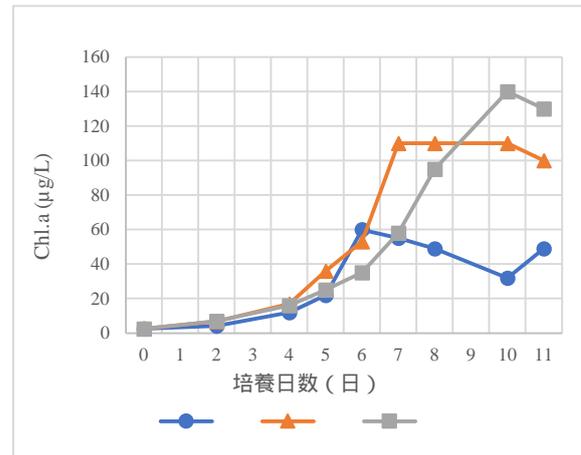


図8 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

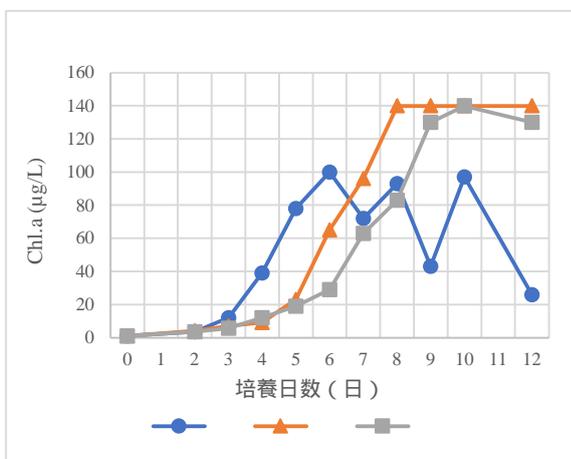


図6 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

そこで、インキュベータ内の設定温度をさらに下げて、24°Cで同様の試験を2回行った (培養試験、)。Chl.a濃度の測定結果を図7及び図8に示す。についてはChl.a濃度の増加が、と比べて大きな差は見られなかった。水温24では、遮光よりも水温が増殖を制限する要因となった可能性が考えられる。

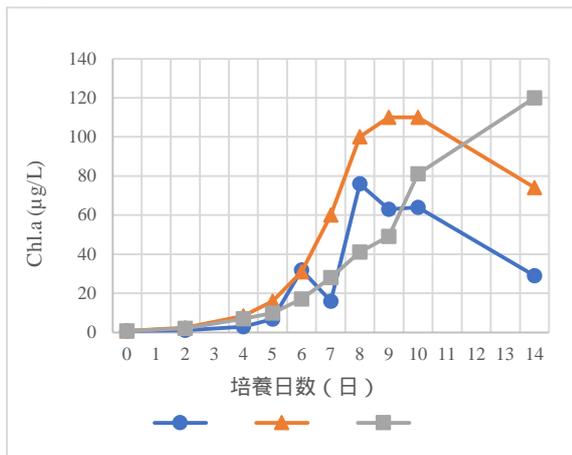


図7 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

3 細胞数とChl.a濃度の関係

インキュベータ内の温度を 32°Cとして、培養を行い、培養初日～4日後までの培養液について、藻類分析 (細胞密度) 及び水質分析 (Chl.a 分析等) を行った (培養試験)。

細胞密度の増加は、培養試験～におけるChl.a濃度の傾向と同様に、遮光率が低い順に細胞の増殖速度が速い傾向が見られた (>>) (図9)。

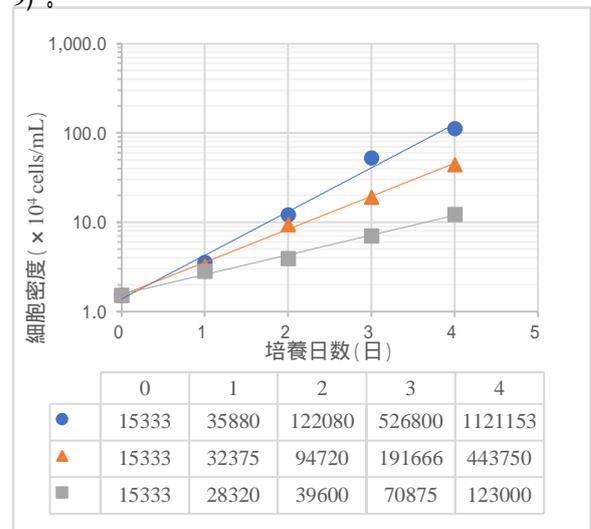


図9 細胞密度の変化 (培養試験)

表中の数値は細胞密度 (cells/mL) である。

培養試験で得られた細胞密度について、対数増殖期における各遮光条件での比増殖速度 μ を算出した²⁾ (は培養1～3日後、 μ は、では培養1～4日後を対数増殖期とした)。その結果、 μ は、が 1.34 day^{-1} 、が 0.87 day^{-1} 、が 0.48 day^{-1} であり、倍加時間 (世代時間) は、が 0.52 日 (約 12 時間)、が 0.79 日 (約 19 時間)、が 1.42 日 (約 34 時間) となった。

まとめ

培養開始から成長ピークまでの Chl.*a* 濃度の増加速度は、培養温度が28°C・32°Cの場合、(遮光なし) > (寒冷紗1枚) > (寒冷紗2枚) の順に速く、遮光による植物プランクトン (*M. aeruginosa*) の増殖抑制効果が確認された。また、培養温度が24°Cでは、遮光による抑制効果が見られなかったことから、遮光効果は水温が24°C以上となる期間に実施することが有効である。一方、
、
の培養条件では、長期にわたって培養を行っていくと、Chl.*a* 濃度は上がり続けた。これは、競争相手となる他の植物プランクトンがないことや、遮光の効果があくまで増殖速度の抑制であり、植物プランクトンを死滅させる効果ではないためであると考えられる。したがっ

て、遮光は、他の対策と合わせて実施する必要がある。

本年度の調査では、遮光による抑制効果を確認することを目的としていたため、明暗周期等は考慮せずに培養試験を行ったが、今後の調査では、実際の遮光施設を想定して、より細かい温度や照度(明暗周期等)の条件下での培養試験を行う必要がある。

参考文献

- 1) 農林水産省, 農業用貯水施設におけるアオコ対応参考図書 (平成24年3月)
- 2) 小西正朗, 他: 細胞の増殖を捉える 計測法から比速度算出まで, *生物工学会誌*, 93, 149-152 (2015)

感染症サーベイランスにおけるウイルス感染症（2021年度）

高木 由美香、松本 文昭、中峯 文香、吉川 亮

Annual Surveillance Report of Viral Infectious Diseases (2021)

Yumika TAKAKI, Fumiaki MATSUMOTO, Fumika NAKAMINE and Akira YOSHIKAWA

キーワード：サーベイランス、エンテロウイルス、RSウイルス、日本紅斑熱、日本脳炎

Key words: Surveillance, Enterovirus, Human respiratory syncytial virus, Japanese spotted fever, Japanese Encephalitis

はじめに

感染症発生動向調査（サーベイランス）は、1999年4月1日に施行された「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」（以下、感染症法）に基づき、県内の患者発生状況、病原体の検索等感染症に関する情報をITの活用により早期かつ的確に把握し、その情報を速やかに地域に情報還元（情報提供・公開）することにより、医療機関における適切な初期診断を推進することを目的に実施されている。その後、鳥インフルエンザ（H7N9）や中東呼吸器症候群（MERS）などの新たな感染症の海外における流行や、デング熱の国内感染例の発生¹⁾など、昨今の感染症の発生状況、国際交流の進展、保健医療を取り巻く環境の変化等を踏まえ、感染症に対応する情報収集体制を一層強化するために、2014年11月21日に改正感染症法が公布され、さらに2015年9月の感染症法施行規則（省令）の改正に伴い、「長崎県感染症発生動向調査実施要綱」¹⁾（以下、県要綱）の一部改正が行なわれた。

長崎県環境保健研究センターには改正された県要綱に基づき、県内の医療機関からウイルス性の感染症と診断された患者の検体が適宜採取、搬入されている。そこで、本調査では2021年度に搬入された検体について、ウイルス遺伝子の検索等を行ったのでその結果について報告する。

調査方法

1 検査材料

検査材料は、2021年度に県内の医療機関においてウイルス性の感染症と診断された167名の患者から採取された合計247検体を対象とした。

これらの医療機関は、県要綱に基づき、政令市保

健所（長崎市、佐世保市）、及び県立保健所管轄の10地域に基幹定点医療機関及び病原体定点医療機関として選定されている。

臨床検体の採取部位の内訳は、咽頭ぬぐい液60検体、鼻咽頭ぬぐい液15検体、鼻腔ぬぐい液3検体、糞便（直腸拭い液を含む）20検体、血液69検体、血清42検体、髄液2検体、尿3検体、痂皮29検体およびその他4検体であった。

2 検査方法

改正された感染症法の施行に伴い、国立感染症研究所が発行した病原体検出マニュアルや参考文献等^{2,3)}に準じて、検体の前処理、遺伝子検出、細胞培養、ウイルス分離・同定等について検査標準作業書を作成し、これらに基づき検査した。

調査結果及び考察

表1に疾病別の被検者数及び検体件数の内訳を示す。

1 インフルエンザ（インフルエンザ様疾患を含む）

インフルエンザと診断された5名分の患者検体において、遺伝子の検出を実施した結果、インフルエンザウイルスに特異的な遺伝子が1名から検出された。検出されたインフルエンザウイルスの亜型は、A/H1pdm09であった。

2020年1月以降、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の世界的な流行という特殊な状況下であり、長崎県を含む全国で患者の報告が極めて少なく、搬入検体数も少なかったが、流行を感知した

表1. 疾病別の被検者数及び検体件数内訳

疾病名	被検者数	検体数	検査材料(内訳)										
			咽頭拭い液	鼻咽頭拭い液	鼻腔拭い液	糞便 (直腸拭い液)	血液	血清	髄液	尿	痂皮	その他	
インフルエンザ	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
手足口病	44	44	42	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
感染性胃腸炎	17	17	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0
RSウイルス感染症	16	16	0	13	3	0	0	0	0	0	0	0	0
風疹	1	3	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
急性弛緩性麻痺	1	6	1	0	0	2	1	0	1	1	0	0	0
SFTS・リケッチア感染症	66	136	0	0	0	0	66	37	0	0	29	4	0
日本脳炎	1	3	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
A型肝炎	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
その他	15	15	11	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
計	167	247	60	15	3	20	69	42	2	3	29	4	0

際の迅速な注意喚起情報の提供等、まん延防止に向けた取り組みにつなげるために、引き続き保健所と協力しながら原因ウイルスの監視を継続していく必要がある。

2 手足口病

手足口病と診断された44名分の患者検体が搬入された。それらに対して、エンテロウイルス(Enteroviruses; 以下、EVs)の遺伝子検出を実施した結果、41名からEVsの遺伝子を検出した。検出したEVsの塩基配列の一部をダイレクトシーケンス法により決定し、ウイルス型別のためのウェブツール Enterovirus Genotyping tool⁴⁾により型別した結果、39検体はコクサッキーウイルス(以下、CV) A6、2検体はCV-A16と同定された。

エンテロウイルスが原因である手足口病およびヘルパンギーナは、例年夏頃流行するが、2021年は10月から11月にかけて手足口病の患者報告数の増加が認められ、流行期(採取日:10月20日~12月1日)に検体が搬入された。手足口病やヘルパンギーナは基本的に予後良好な疾患であるが、EV-A71のように中枢神経症状を伴う合併症を起こしやすい原因ウイルスの報告⁵⁾があり、実際に長崎県内でも流行が認められている⁶⁾。そのため、臨床的な診断で終わることなく今回のように遺伝子型別をすることにより危険なウイルス型の迅速な掌握と臨床現場への情報還元が可能となるために引き続き原因ウイルスの発生動向を注視していく必要がある。

3 感染性胃腸炎

感染性胃腸炎を疑う検体が、17名分17検体搬入された。それらに対し、検出マニュアル²⁾に準じてPCRによる遺伝子の検出を実施したところ、8検体からノロウイルスが検出された。検出されたノロウイルスの増幅産物に対し遺伝子解析を行い、タイピングツール⁴⁾を用いて遺伝子型別を試みた結果、7検体がGII.2、1検体がGII.4に分類された。9検体は、ノロウイルス、ロタウイルス、サポウイルスいずれの遺伝子も検出されなかった。

2021/2022シーズンにおける全国的なノロウイルスの遺伝子型別検出状況は、GII.4が最も多く、次いでGII.2であった⁷⁾。県内の流行状況を把握するためには、検査検体数を増やすとともに、県全域からの検体収集が必須である。

4 RSウイルス感染症

RSウイルス感染症は、県内において例年と異なる春ごろに流行のピークを迎えた(図1)。RSウイルス感染症と診断された16名分の患者検体が搬入され、すべての検体から、subgroupAのRSウイルス遺伝子が検出された。検出された遺伝子について、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、近隣結合法による系統樹解析を行った^{8,9)}(図2)。G蛋白の第二可変領域を使った遺伝子型別において、すべてgenotype ON1に分類された。ON1は、2010年に新たに確認された遺伝子型で、2014以降国内で主

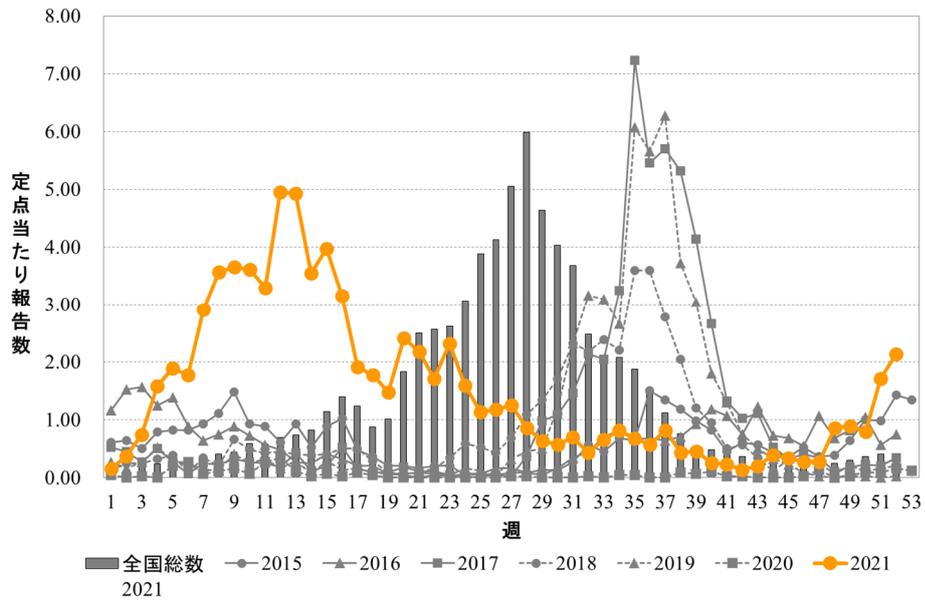


図1. RSウイルス感染症の定点あたり報告数の推移 (2015～2021年)

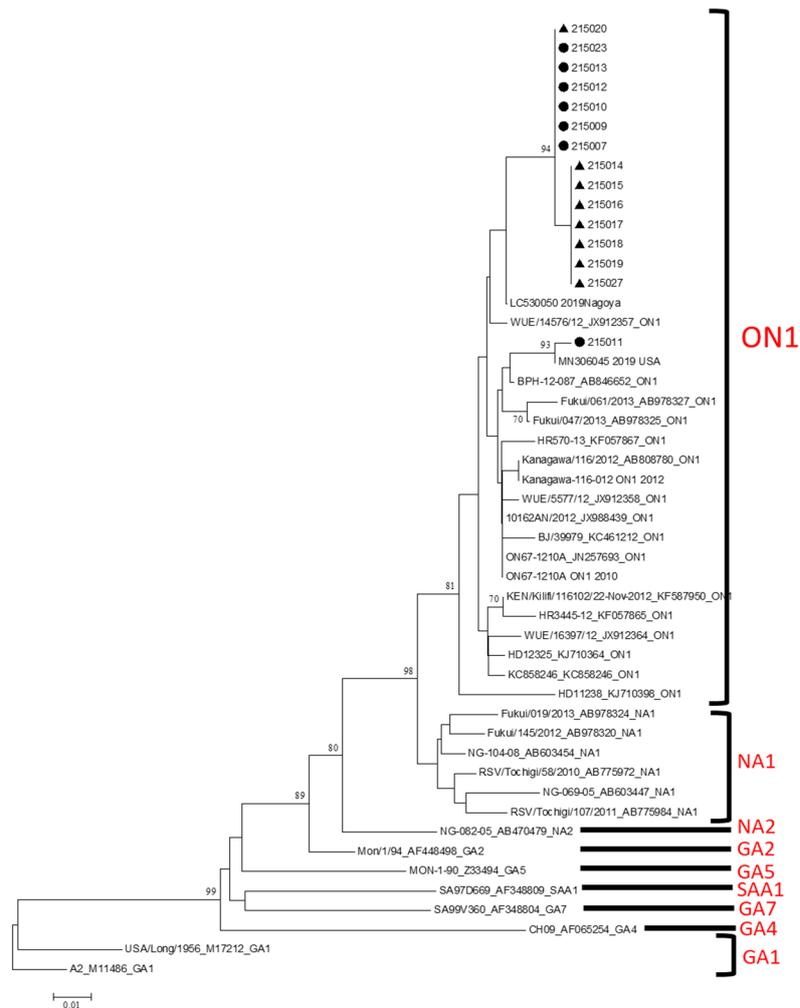


図2. RSウイルス Gタンパク質遺伝子の第2可変領域における系統樹 (近隣結合法)

34株のリファレンス配列 (ON1 : 20、NA1 : 6、NA2 : 1、GA1 : 2、GA2 : 1、GA4 : 1、GA5 : 1、GA7 : 1、SAA : 1)、県内医療機関Aの7検体 () および県内医療機関Bの8検体 () から得た塩基配列を使用し、ブートストラップ値70%以上、p-distance 0.49以下を1つの遺伝子型とした。

流となっている¹⁰⁾。RSウイルス感染症については、近年当センターへの検体搬入がなく、県内の流行状況は解析できていない。今後は検体の確保に努め、ウイルスの流行状況を監視していきたい。

5 麻しん・風しん

麻しん・風しんを疑う患者検体は、1名分3検体(咽頭拭い液、血液、尿)が搬入された。これらの検体に対して麻しんウイルス、風しんウイルスの遺伝子検出を試みたが、いずれの遺伝子も検出されなかった。

2018年から2019年にかけて、全国的に風しんが流行し、県内でも患者の報告があったが、2020年、2021年は県内での患者報告はなかった。しかしながら、COVID-19の流行によるワクチン接種率の低下が懸念されており、患者の発生動向に注視していく必要がある。

6 急性弛緩性麻痺(AFP)

AFPは、ポリオ対策の観点から、世界保健機関より患者の把握と原因病原体の検索が求められている。日本でも2018年からAFP(急性灰白髄炎をのぞく)が5類感染症全数届出疾患となり、AFPの届出があった際、地方衛生研究所では、エンテロウイルスD68、A71等ポリオ以外の検査の実施およびポリオ検査のための感染研への便検体の送付する必要がある。

2021年は、AFPと診断された患者1名6検体の搬入があった。EVsの遺伝子検出を試みたが、いずれの検体からも遺伝子は検出されなかった。また、感染研に送付した便検体について、ポリオの分離試験は陰性であった。

7 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、リケッチア感染症

SFTS、リケッチア感染症(つつが虫病および日本紅斑熱)を疑う患者検体は、66名分136検体が搬入された。これらの3疾患は、臨床症状等により区別することが困難であるため、検査項目を限定することができない。そのため長崎県では3疾患のうちいずれか一つの診断名であっても3項目の検査を実施している。遺伝子の検出については、SFTSウイルス、*Orientia tsutsugamushi*、および*Rickettsia japonica*を対象として実施し、ペア血清による抗体価測定は*O. tsutsugamushi*と*R. japonica*を対象として検査を実施している。

遺伝子検出の結果、6名からSFTSウイルス、16名から*R. japonica*、8名から*O. tsutsugamushi*の遺伝子が検出された。*O. tsutsugamushi*については、血清型別のため、ダイレクトシーケンスにより、56 kDa type specific antigen geneの部分配列を決定し、MEGA6.0¹¹⁾を用いて近隣結合法¹²⁾による分子系統樹解析を行った。その結果、Kawasakiが4例、Gilliamが2例、Kurokiが1例、Karpが1例検出された。(図3参照)。

ペア血清による抗体価測定を行った4名のうち2名において*R. japonica*に対するペア血清での抗体価の有意上昇、抗体陽転が認められた。

SFTS及びリケッチア感染症は野外の藪や草むらに潜んでいる、病原体を保有しているマダニ類に咬まれることで感染が成立する。感染予防のためには咬まれないことが重要であり、具体的には長袖・長ズボンの着用や作業後の着替え、昆虫忌避剤の使用等があげられる。また、屋外活動後はシャワーや入浴で、マダニに刺されていないか確認を行なうことも重要である¹³⁾。

また、SFTSおよびリケッチア感染症疑いで搬入され、いずれの遺伝子も検出されなかった1名の患者について、症状から疑われた日本脳炎の検査を追加で実施した。日本脳炎ウイルスの遺伝子および特異的IgM抗体が検出され、2016年以来の県内での患者確認となった。追加で当該患者の3検体(急性期血清、回復期血清、髄液)が搬入され、検査を実施したところ、遺伝子は検出されなかったが、特異的IgM抗体は検出された。

8 A型肝炎

A型肝炎と診断された患者1名2検体の搬入があった。A型肝炎は厚生労働省の通知(平成31年2月6日付け健感発0206第1号および薬生食監発0206第2号 A型肝炎発生届受理時の検体確保等について)により、検体を確保し、分子疫学的手法による解析を実施するよう求められている。搬入された検体を用いて、A型肝炎ウイルスの遺伝子検出を試みたが、2検体とも遺伝子は検出されなかった。

A型肝炎は県内で年に数件しか発生しない希少な感染症であるため、検体の確保に努めるとともに、検査体制を維持していくことが重要である。

そのほか、県要綱に規定されていない診断名(不明熱、急性心筋炎等)の患者検体14名分が搬入

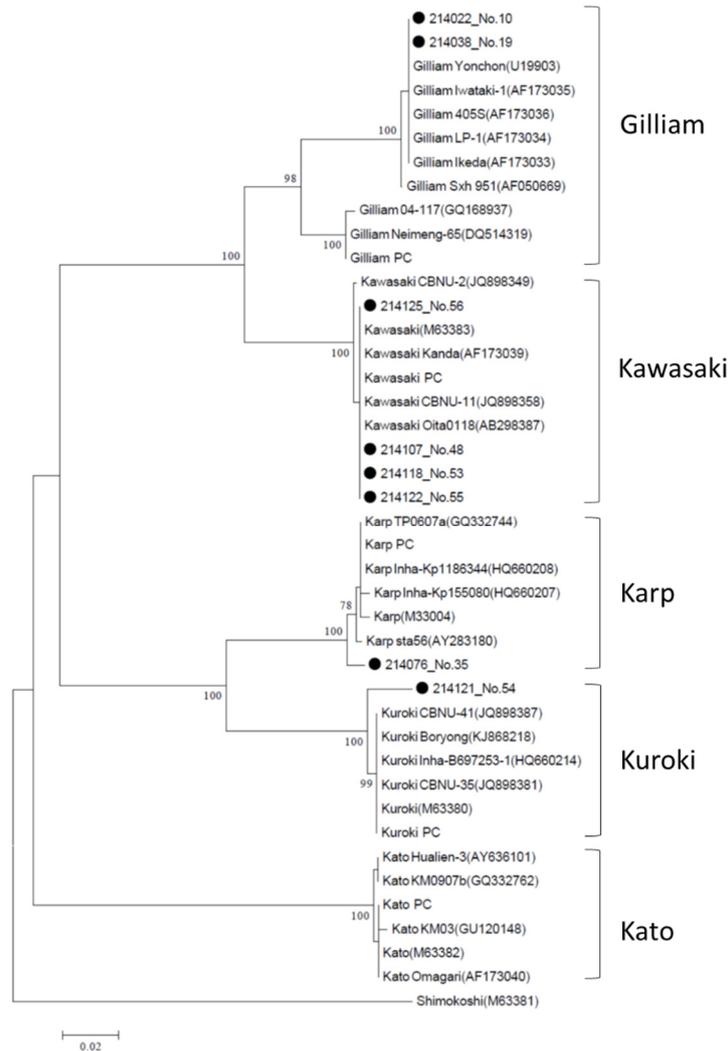


図3 . *O.tsutsugamushi* 56kDa type specific antigen geneの分子系統樹

解析には、34株のリファレンス配列 (Gilliam : 9株、Kawasaki : 6株、Karp : 6株、Kuroki : 6株、Kato : 6株、Shimokoshi : 1株) 県内の陽性となった8検体から得られた塩基配列 () を使用した。

され、それらに対しEVsの遺伝子検出を試みたが、いずれも遺伝子は検出されなかった。

以上のように、病原体サーベイランスにおいては、病原体リスクマネージメントの観点から、臨床症状に基づく診断に加えて、遺伝子検出等による病原体の同定と型別、並びにそれらの解析に基づく病原体発生動向の迅速な把握が重要であることは明らかである。本事業の適切かつ確実な遂行のためには、医療機関、保健所および地方衛生研究所が連携して本事業に取り組む必要があり、それらの達成が特殊な病原体に対する注意喚起等の行政施策、ひいては県民の感染症に対する意識向上につながると考えられる。

謝 辞

感染症発生動向調査にご協力頂いた各定点医療機関及び協力医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました長崎市、佐世保市、県立各保健所の関係諸氏に深謝する。

参 考 文 献 ・ 脚 注

- 1) 長崎県感染症情報センター: 長崎県感染症発生動向調査実施要綱, <https://www.pref.nagasaki.jp/bunrui/hukushi-hoken/kansensho/kansen-c/hasseidoukou/>
- 2) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル,

- <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>
(2022.4.26)
- 3) 国立感染症研究所 (厚生労働科学研究 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の対応方法に関する研究」班): SFTS ウイルス検出マニュアル, (2013).
 - 4) A Kroneman *et al.*: An Automated Genotyping Tool for Enteroviruses and Noroviruses, *J Clin Virol* 2011 Jun; **51**(2):121-5.
 - 5) Huang CC *et al.*: Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection, *N Engl J Med.* **341**, pp936-942 (1999)
 - 6) 松本 文昭 他: 長崎県環境保健研究センター所報 63, (2017) 資料 p.110-115
 - 7) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 感染性胃腸炎 シーズン別ウイルス検出状況 (2022年5月6日作成)
 - 8) Shama Parveen *et al.*: Genetic Variability in the G Protein Gene of Group A and B Respiratory Syncytial Viruses from India, *J Clin Microbiol*, **44**, 3055-64, (2006)
 - 9) Hibino *et al* : Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus among children in Japan during three seasons and hospitalization risk of genotype ON1. *PLoS One* 13(1): e0192085, 2018.
 - 10) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 <特集> RS ウイルス感染症 2018~2021年, *IASR* Vol.43 pp79-81:2022年4月号
 - 11) Tamura K, *et al.*: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol Biol Evol*, **30**(12), 2725-29, (2013).
 - 12) Saitou, N, *et al.*: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol Biol Evol*, **4**, pp406-425 (1987).
 - 13) 国立感染症研究所: マダニ対策、今できること, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/sfts/2287-ent/3964-madanitaisaku.html> (2022)

蚊媒介感染症に関する蚊の生息調査 (2021年度)

中峯 文香, 高木 由美香, 松本 文昭, 吉川 亮

Monitoring of Vector Mosquitoes concerning Dengue virus, Chikungunya virus and Zika virus in Nagasaki (2021)

Fumika NAKAMINE, Yumika TAKAKI, Fumiaki MATSUMOTO and Akira YOSHIKAWA

キーワード：蚊媒介感染症、デング熱、チクングニア熱、ジカ熱、アルボウイルス
Key words: Mosquito-borne Infection, Dengue Fever, Chikungunya Fever, Zika Fever, Arbovirus

はじめに

2014年8月、国内でデング熱に感染した患者が約70年ぶりに報告されたことを契機に、厚生労働省は2015年に「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針」策定、国立感染症研究所は「デング熱・チクングニア熱等蚊媒介感染症の対応・対策の手引き」を作成し、各ブロックで実地研修を行った。

これを受け、都道府県には平常時の予防対策として、大規模公園等のリスクエリアの抽出と定期的な蚊の密度調査(蚊密度モニタリング)が求められ、本県においても2015年度から平常時における媒介蚊の発生状況の定点調査を実施している。加えて本県では、捕集した蚊(ヒトスジシマカ)についてPCRによる遺伝子(デングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス)検出を実施することとした。

2015年調査開始当初の実施地点は、外国からの来日者数が多く高リスクと想定される平和公園(長崎市)と佐世保公園(佐世保市)を対象とし、長崎市および佐世保市と共同で調査を行った。翌2016年度からは県医療政策課、長崎市、佐世保市および当センターで協議し、平和公園の調査は、蚊の捕集から遺伝子検出までを長崎市が担当し、佐世保公園については蚊の捕集を佐世保市が行い遺伝子検出は当センターで実施するという体制となった。

また、2016年度からはデング熱の流行が報告されている中国、台湾に寄港するクルーズ船に着目し、停泊港に近い水辺の森公園(長崎市)を実施地点として追加し、併せて患者発生を想定した調査に伴う蚊の採取方法や分類方法について、長崎大学熱帯医学研究所病害動物学分野の協力を得て、保健所

職員への研修を行ってきた。

当センターでは、水辺の森公園における蚊の捕集から遺伝子検出までを実施しており、本報では、2021年度の調査内容、蚊密度モニタリングおよび遺伝子検出結果について報告する。

調査方法

1 蚊密度モニタリング

(1) 調査時期及び回数

6月～10月に計5回、午前9時頃から実施した。

(2) 調査地点

事前の調査で蚊密度が高いと推測される水辺の森公園内の図1に示す6地点で調査した。



図1 蚊密度モニタリング定点
メインゲート、北ゲート駐車場裏、宵待橋西、水の庭園トイレ、南ゲートプロム入口、森の劇場奥

表1 2021年度 蚊捕集結果(水辺の森公園)

調査日	6月17日		7月14日		8月23日		9月15日		10月13日		合計	
天気	曇り		晴れ		曇り		曇り		晴れ		-	
捕集数	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
地点				1							0	1
地点	6	4	1	7	5	4	9	19	1	1	22	35
地点		2		3	2	4	16	10	2	14	20	33
地点				1							0	1
地点								2			0	2
地点		1	1			2					1	3
合計	6	7	2	12	7	10	25	31	3	15	43	75

表2 2021年度 蚊密度モニタリング結果(水辺の森公園)

調査日	6月17日		7月14日		8月23日		9月15日		10月13日		合計	
雌 密度	雌	密度	雌	密度	雌	密度	雌	密度	雌	密度	雌	密度
地点			1	0.5							1	0.1
地点	4	3.4	7	3.5	4	2.4	19	3.7	1	0.4	35	2.8
地点	2	1.7	3	1.5	4	2.4	10	1.9	14	5.6	33	2.6
地点			1	0.5							1	0.1
地点							2	0.4			2	0.2
地点	1	0.9			2	1.2					3	0.2
平均数	1.2		2.0		1.7		5.2		2.5		12.5	

(3) 捕集方法

人囿法にて実施。捕集時間は各地点8分間とした。

(4) 蚊の種別・雌雄同定

地点ごとに捕集した蚊は、凍殺スプレーで凍殺後速やかに冷蔵保存した。帰所後、冷却しながらルーペで観察して、ヒトスジシマカとそれ以外の蚊に分類し、ヒトスジシマカは速やかに雌雄を判別した。

2 遺伝子検出

(1) 捕集蚊ホモジネイト処理

雌雄判別したヒトスジシマカを地点ごとに20匹を目安にプールを作製した。作製したプールをMEM/2HI-FBSを1.0 mLずつ分注した2 mLピーズ入りチューブに入れ、ピーズ式破砕機で蚊を破砕(5,000 rpm、20 sec)した。破砕後、速やかに2 mLピーズ入り破砕チューブを冷却遠心(12,000 rpm、3 min、4 °C)した。保存用の2 mLチューブにMEM/2HI-FBSを0.5 mL分注しておき、滅菌スポイ

トで遠心上清を注射筒に移し、0.22 μm孔径のメンブレンフィルターでろ過した。

(2) RNA抽出

メンブレンフィルターでろ過した捕集蚊ホモジネイト140 μLを用いて、QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) により添付文書に基づきRNA抽出した。

(3) PCR検査

RNA抽出液をDNase 処理後のRNAを、国立感染症研究所が発行した病原体検出マニュアルや参考文献に準じてPCRを実施した。PCR産物については電気泳動にて増幅を確認した。

調査結果および考察

1 蚊密度モニタリング

各地点の捕集数および雌雄分類結果について表1に示す。

調査日以前の天候や調査当日の風の強さにも影響されるが、調査時期別では、9月の捕集数が1番多く、次いで10月が多かった。すべての調査時期の

合計捕集数において、雌が雄よりも多く捕集された。雄は吸血することはなく、雌に誘引されてきているため多くの雄が捕集されていることは、多くの雌の存在が想定されるので注意が必要である。

地点別では、北ゲート駐車場裏、宵待橋西での捕集数が群を抜いて多かった。北ゲート駐車場裏は生垣近くの斜面上にあり、日中も日陰になりやすく、宵待橋西は道路が近く川沿いの斜面上であった。

各地点の雌成虫密度について表2に示す。

当センターでは、蚊の発生源や休息地となる場所を把握する目的で調査日別の雌捕集数平均を、地点ごとに比較して雌成虫密度のランク付けを行っている。雌成虫密度においても、地点 および は他の地点よりも高値となっていた。ヒトスジシマカは昼間吸血性であり、雌のみが吸血を行う。雌は、潜伏場所から4～5mの距離に人が近づくと、ヒトの接近に気づいて吸血のために飛来するため、地点 および は潜伏場所と非常に近かった可能性が高いと推測される。

また、公園全体の環境は2016年の調査開始時よりも整備が進んでおり、雨水桝や側溝、空き缶などの蚊の幼虫が生息できる場所や樹木が茂り下草のある風通しが悪い日陰等成虫が生息しやすい場所が全体的に少なくなっていた。

以上の調査結果から、蚊の幼虫対策や成虫に対する消毒等の対策の必要性はなかった。

2 遺伝子検出

すべての検体から、デングウイルス、チクングニアウイルスおよびジカウイルスの遺伝子は検出されなかった。

これまでの調査でも検出されることはなかったが、公園が整備されて蚊が生息しにくい環境になってきていることに加え、ここ数年の新型コロナウイルスの影響で海外からの来日者数が激減しており、人の動きが平時より少なくなったため各ウイルス遺伝子を検

出される可能性は低くなっていると考えられる。

まとめ

「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針」の策定以降、長崎県内ではジカウイルス感染症の患者発生報告はないが、デング熱が2015年に2名、2016年に1名、2017年に1名、2020年に1名の合計5名、チクングニア熱が2019年に2名発生している。これらデング熱の患者5名およびチクングニア熱の患者2名のすべてが海外への渡航歴があり、感染場所は海外と推定されている。このことから、海外での蚊媒介感染症に罹患し、日本に病原体を持ち帰り、媒介蚊をとおして新たな感染を引き起こす可能性が考えられる。

今後も、蚊密度モニタリング調査および病原体の遺伝子検出検査を継続することで、長崎県内の蚊媒介感染症の予防・発生対策に役立てていきたい。

謝辞

調査にご協力いただいた長崎大学熱帯医学研究所病害動物学分野の砂原先生、二見先生に感謝する。

参考文献

- 1) 厚生労働省: 蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針,
<https://www.mhlw.go.jp/content/000832570.pdf>
(2022.4.5アクセス)
- 2) 国立感染症研究所: デング熱・チクングニア熱・ジカウイルス感染症等の媒介蚊ヒトスジシマカの対策<緊急時の対応マニュアル>
<https://www.niid.go.jp/niid/images/ent/2019/manalbo20191024.pdf>
(2022.4.5アクセス)

長崎県における日本脳炎の疫学調査 (2021年度)

豚の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況調査

中峯 文香, 高木 由美香, 松本 文昭, 吉川 亮

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki (2021)

—Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus—

Fumika NAKAMINE, Yumika TAKAKI, Fumiaki MATSUMOTO and Akira YOSHIKAWA

キーワード：日本脳炎、アルボウイルス、豚感染、HI抗体陽性率

Key words: Japanese Encephalitis, Arbovirus, Swine Infection, HI Antibody Positive Rate

はじめに

日本脳炎は東アジアから東南アジア、南アジアさらにはオーストラリアにかけて広く分布しており、年間およそ68,000人の患者が報告されている¹⁾。感染者のほとんどは無症状に終わるが、発症すると定型的な脳炎を呈し、1～2日で40°C以上の高熱となり、頭痛、嘔吐、頸部硬直などの髄膜刺激症状が現れ、次いで意識障害、筋硬直、けいれん等の脳炎症状が出現する。致死率は約20%であり、回復してもその半数に精神障害、運動障害等の後遺症が残る。日本では、ワクチンの普及や媒介蚊の減少および生活環境の変化などにより1966年の2,017人をピークに患者数は減少しているが、毎年数名発生しており、本県においても2010年に1名、2011年に2名、2013年に1名(死亡例)2016年に4名(2名死亡)、2021年に1名の患者発生が報告されている。

日本脳炎はFlavivirus属に属する日本脳炎ウイルス(JEV)に感染して起こる。JEVは主にコガタアカイエカが媒介するアルボウイルス(節足動物媒介性ウイルス)であり、「蚊 豚(時にトリ) 蚊」のサイクルで生態環を形成している。ヒトはJEVに感染した豚から蚊を介して感染するが、終末宿主であるヒトでは、ヒト-ヒト感染はない。

そこで、厚生労働省では毎年初夏から秋にかけて豚のJEV抗体獲得状況から間接的にJEVのまん延状況を調べている。本県では、厚生労働省の定めた感染症流行予測調査実施要領に基づいて、豚を対象とした感染源調査を実施している。加えて本県では日本脳炎の発生予防とまん延防止を図ることを目的とした「感染症流行予測調査事業(日本脳炎感

染源調査)における注意喚起等実施要領」に基づき、豚血清からのJEV遺伝子の検出ならびに豚血清中の抗JEV-IgM抗体を測定している。

本年度の上記調査の概要および患者発生に伴う確認試験について報告する。

調査方法

1 感染源調査

(1) 調査時期及び回数

6月～9月の上旬、下旬に計8回実施した。

(2) 調査対象及び検体

調査対象は、諫早市内で飼育され、佐世保市と畜場に出荷された生後約6ヶ月の肥育豚80頭とし、調査対象の放血液より得られた血清を検体とした。

(3) 調査事項

感染症流行予測事業検査術式に従い、JEVに対する赤血球凝集抑制(HI)抗体及び2-Mercaptoethanol(2-ME)感受性抗体を測定した。

2 JEV遺伝子検索

感染源調査で使用した豚血清について、JEV遺伝子検索を実施した。QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出し、JEVエンベロープ(E)領域を標的としたOne-Step RT-PCR及びNested PCR²⁾により326 bpの増幅産物が確認されたものを陽性とした。

3 JEVの分離

感染源調査で使用した豚血清について、既報に準じてウイルス分離を行った²⁾

表1 2021年度豚HI抗体陽性率および2-ME感受性抗体陽性率調査結果

採血 月日	採血 頭数	HI 抗体価 (倍)								HI抗体 陽性率 (%)	2-ME抗体 陽性率 (%)
		< 10	10	20	40	80	160	320	640		
6/9	10	2		8						80	0
6/23	10	10								0	0
7/7	10	3	1	6						70	0
7/21	10		5	5						100	0
8/4	10	1	3	5	1					90	100
8/25	10	3	1	6						70	0
9/8	10			5	2	1		2		100	80
9/22	10		1	1				7	1	100	100

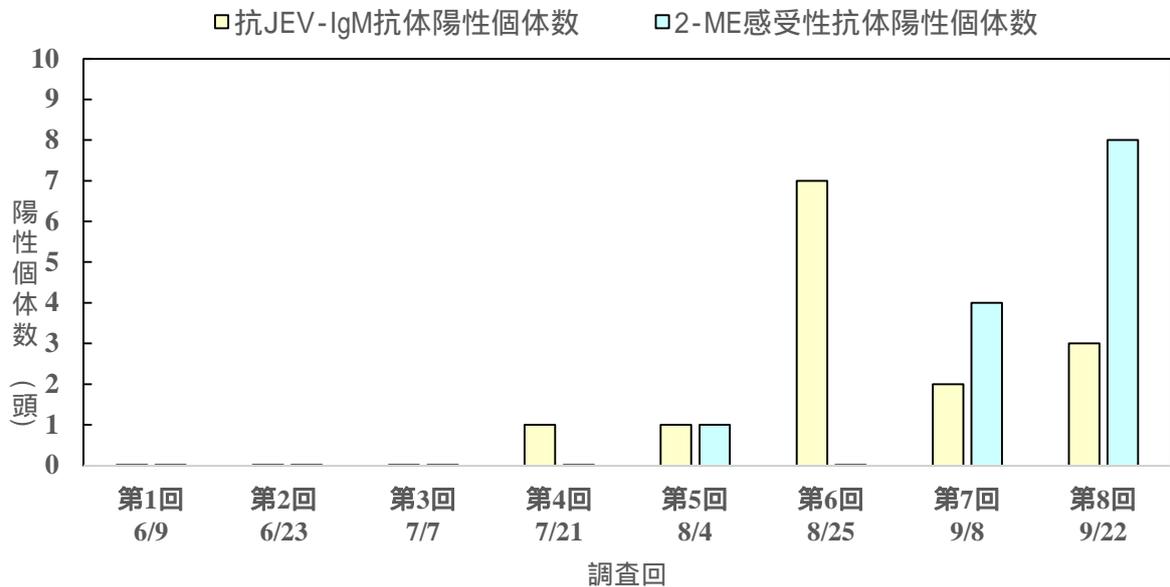


図1 豚の抗JEV-IgM抗体及び2-ME感受性抗体陽性個体数の推移

4 抗JEV-IgM抗体測定

感染源調査で使用した豚血清を用いて、初感染の指標とされる抗JEV-IgM capture ELISAにより血清中の抗JEV-IgM抗体を測定した。ELISAの条件および抗JEV-IgM抗体陽性の判定基準等は既報に準じた²⁾。

症状等: 発熱、頭痛、皮疹、全身倦怠感

(2)検体

血漿 (令和3年9月27日採取)

血清 (令和3年9月27日、令和3年10月8日採取)

髄液 (令和3年9月27日採取)

(3)検査項目

PCR による JEV 遺伝子の検出、抗JEV-IgM capture ELISAによる抗JEV-IgM抗体の検出

5 日本脳炎患者確認試験

(1)患者情報

居住地: 県北保健所管内 (平戸市)

患者: 女性 (70代)

発病年月日: 令和3年9月17日

初診年月日: 令和3年9月27日

診断年月日: 令和3年10月4日

調査結果及び考察

1 感染源調査

2021年度豚HI抗体陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率調査結果を表1に示す。

2021年度は、第1回目調査 (6月9日) でHI抗体

陽性の豚が確認されたが、第2回目調査では確認されなかった。その後の調査でHI抗体陽性率は増加し、陽性率は70～100%で推移した。直近の感染の指標となる2-ME感受性抗体については、第5回目調査（8月4日）の1頭から検出され、その後第7回目調査（9月8日）の4頭および第8回目調査（9月22日）の8頭で検出された。

保毒蚊が生後4～6ヶ月の免疫のない豚を吸血することで豚はJEVに感染し、2～3日の潜伏期を経て約3日間持続するウイルス血症を起こす。このウイルス血症時に吸血した蚊がウイルスに感染し、10～13日の潜伏期を経てウイルスを媒介する³⁾。このことから2021年度本県ではJEVを保有した蚊が6月には活動を既に開始し、9月以降もウイルスを媒介しながら感染を拡大していたと推察される。

例年、7月末から8月初旬に豚のJEV感染が始まり、8月中旬にはほとんどの豚が感染し、その後2-ME感受性抗体陽性豚は減少していくが、今回の調査では、9月以降に2-ME感受性抗体陽性率が8月と比較して急増しており、明らかに異なる推移を示している。その原因として、夏季のJEV活動状況は種々の気候要因によって影響される⁴⁾ことが推察される。気象庁のデータによると、過去10年間に月降水量が1,000 mmを超えた月は2020年7月と2021年8月のみだった。特に2021年8月は、中旬に日降水量が100 mmを超える日が数日間あったことから媒介蚊の発生に影響を与え、8月中旬の大雨以降から活発に活動し、9月以降の調査で日本脳炎に初感染した豚が多数検出された可能性が考えられた。

2 JEV遺伝子検索

第7回目調査（9月8日）の1頭の豚血清からJEV遺伝子が確認された。

3 JEVの分離

現在、ウイルス分離中である。

4 抗JEV-IgM抗体測定

豚の抗JEV-IgM抗体および2-ME感受性抗体陽性数の推移を図1に示す。

第4回目調査（7月21日）で1頭が抗JEV-IgM抗体陽性であった。第4回目調査（7月21日）で抗JEV-IgM抗体陽性個体が確認されたため、注意喚起等実施要領に基づき医療政策課へ報告した。

2-ME感受性抗体陽性個体の確認が第5回目調

査からであることから、いち早くその地域におけるJEVに感染した蚊の活動を把握するうえでは、IgM capture ELISAによるIgM抗体検出がより有用である。

5 日本脳炎患者確認試験

本県で2016年以来日本脳炎患者1名が発生した。この患者の発病日は9月17日となっており、感染源調査の結果のとおり、9月以降も蚊がウイルスを媒介していたことが確認された。また、検出された遺伝子の塩基配列からGenotype IのJEVであることが分かった。

まとめ

- 1 2021年度は第1回目調査（6月9日）の8頭からHI抗体が、第5回目調査（8月4日）の1頭から2-ME感受性抗体が最初に確認された
- 2 抗JEV-IgM抗体陽性豚は第4回目調査（7月21日）に1頭最初に確認され、医療政策課から日本脳炎の注意喚起がおこなわれた。
- 3 第7回目調査（9月8日）の1頭の豚血清からJEV遺伝子が確認された。
- 4 各抗体の測定結果をみると例年とは大きく異なり、天候の影響が考えられた。
- 5 2016年以来5年ぶりに日本脳炎患者1名が発生した。

謝辞と付記

感染症 日本脳炎流行予測調査事業にご協力いただいた長崎県央農業協同組合、佐世保食肉センター株式会社及び佐世保市食肉衛生検査所の関係各位に感謝する。

参考文献

- 1) World Health Organization : Japanese encephalitis (2019), <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis> (2021.5.19アクセス)
- 2) 山下 綾香, 他: 長崎県環境保健研究センター所報63号, 103-107(2017)
- 3) 小早川 隆敏: 改定・感染症マニュアル, 株式会社マクガイヤ, 239～240(1999)
- 4) 倉根 一郎: 平成26年度_環境研究総合推進費 終了成果報告書(S-8-1(8))

長崎県における食中毒病因物質の概要 (2021年度)

山口 結奈, 右田 雄二, 高木 由美香, 松本 文昭, 中峯 文香, 井原 基, 吉川 亮

Prevalence and Etiological Agents of Food Poisoning in Nagasaki (2021)

Yuina YAMAGUCHI, Yuji MIGITA, Yumika TAKAKI, Fumiaki MATSUMOTO, Fumika NAKAMINE
Motoki IHARA and Akira YOSHIKAWA

キーワード：食中毒、カンピロバクター属菌、ノロウイルス、アニサキス
Key words : Food poisoning, *Campylobacter* spp., Norovirus, *Anisakis*

はじめに

1997年5月30日の食品衛生法施行規則改正でノロウイルス (2003年8月29日同規則改正で小型球形ウイルスから名称変更) 及びその他のウイルスと腸管出血性大腸菌 (VT産生) が、1999年12月28日には同規則改正によりコレラ菌、赤痢菌、チフス菌、パラチフス A 菌が、2012年12月28日にはクドア、ザルコシステイス、アニサキス及びその他の寄生虫が食中毒事件票に病因物質として追加された。これらの施行規則改正により、ウイルス性食中毒が位置づけられるとともに、コレラ菌等の4菌種についても飲食に起因する健康被害発生時は、他の食中毒病因物質と同じ措置がとられるようになった。当センターでは保健所との協力体制の下、ノロウイルスおよび細菌学的検査を同時に実施している。

本報告では、2021年度に発生した本県食中毒事例で検出された病因物質について報告する。

調査方法

長崎県生活衛生課が取りまとめた2021年度の食中毒発生状況 (長崎市及び佐世保市の発生届出分含む) より、主要病因物質 (細菌、ウイルス、寄生虫、自然毒及び化学物質等) ごとに事件数及び患者数を集計した。

各々の食中毒事例について、患者からの聞き取り情報、喫食状況及び細菌検査情報を県内の所轄保健所から収集した。

結果及び考察

長崎県内では食中毒が10事例発生した。発生事

例の内訳を表1に示す。

1 細菌性食中毒

長崎市においてカンピロバクター属菌による食中毒が2事例発生した (No.1, No.3)。検査は長崎県保健環境試験所で行われた。

事例 No.1 は、保育園の園児と職員130名のうち44名が主に下痢などの症状を呈した。そのうち、11名の便からカンピロバクター属菌が検出された。原因施設は保育所内の給食施設であった。

事例 No.3 は、飲食店において提供された食事 (焼き鳥、ささみのたたき、から揚げなど) を喫食した6名中2名からカンピロバクター属菌が検出された。

2 ウイルス性食中毒

ノロウイルスによる食中毒は、県内で4事例発生した (No.5, No.6, No.7, No.8)。

事例 No.5 の原因と推定された弁当製造施設は県内の複数の施設に弁当を提供していた。県央保健所から従事者30名、有症者9名の検体及び食材8検体が搬入され、当センターで検査を実施した。その結果、従事者30名中6名、有症者9名中6名の計12名からノロウイルスG が検出された。当該12名の検体からあらためてシーケンス解析を行ったところ12名中11名からノロウイルスG .2を検出した。従事者1名から検出されたノロウイルスG は遺伝子量が少なく、解析できなかった。搬入された食材8検体からノロウイルス遺伝子は検出されなかった。

表1 長崎県内の食中毒発生状況および病因物質 (Apr.2021 ~ Mar.2022)

事例 No.	発生年月日	発生場所	摂食者数	患者数	原因施設	原因食品	病因物質	検出 / 検体数	検体	備考
1	2021/4/3	長崎市	130	44	給食施設 (保育所)	4/1に調整・提供された給食	カンピロバクター			
2	2021/10/5	長崎市	不明	1	不明	不明	アニサキス			医療機関で患者からアニサキスを抽出
3	2021/10/31	長崎市	6	2	飲食店	当該施設で調理・提供された食品	カンピロバクター			
4	2021/11/8	長崎市	2	1	家庭	サバ(刺身、シメサバ)	アニサキス			医療機関で患者からアニサキスを抽出
5	2021/11/20	諫早市	425	21	飲食店	11/19に製造した弁当	ノロウイルスG およびノロウイルスG	.2 6/9 6/30 0/8	有症者便 従事者便 食材	遺伝子量が少なく型別不能
6	2021/12/16	佐世保市	100	16	飲食店	12/15に調理・販売したサンドイッチ	ノロウイルス			
7	2021/12/20	大村市	19	5	飲食店	12/18に提供した食事	ノロウイルスG およびノロウイルスG	.2 5/18 0/3	喫食者便 従事者便	遺伝子量が少なく型別不能
8	2021/12/25	島原市	11	8	飲食店	12/24に提供した食事	ノロウイルスG	.2 8/8 1/8 1/6	有症者便 従事者便 施設拭き取り	
9	2022/1/29	長崎市	不明	1	不明	不明	アニサキス			医療機関で患者からアニサキスを抽出
10	2022/2/7	長崎市	1	1	家庭	家庭で調理したイワシの刺身	アニサキス			医療機関で患者からアニサキスを抽出

本表は、県民生活部生活衛生課の食中毒発生状況一覧表(長崎市、佐世保市発生分含む)から作成した。
病因物質の検出数は、環境保健研究センター保健科対応事例のみとした。

事例 No.6 は佐世保市内の飲食店で発生した。有症者は共通して当該施設で調理・販売されたサンドイッチを喫食していた。検査は佐世保市保健所で行われ、有症者および調理従事者の検体からノロウイルスが検出された。

事例 No.7 は大村市内にある飲食店で発生した。県央保健所から有症者を含む喫食者18名、従事者3名の検体が搬入され、当センターで検査を行った。その結果、喫食者18名中4名からノロウイルスG が、1名からノロウイルスG およびG が検出された。当該5名の検体からあらためてシーケンス解析を行ったところ喫食者1名から検出されたノロウイルスG は遺伝子量が少なく、解析できなかったが、検出されたノロウイルスG はすべてG .2であった。

事例 No.8 は島原市内の飲食店で発生した。県南保健所から有症者8名、従事者8名の検体及び施設拭き取り6検体が搬入され、有症者8名中8名、従

事者8名中1名の計9名および施設拭き取り6検体中1検体からノロウイルスG が検出された。有症者8名と従事者1名の検体からあらためてシーケンス解析を行い、施設拭き取り検体から検出されたG 遺伝子断片を用いてシーケンス解析を行ったところすべてノロウイルスG .2であった。

3 寄生虫性食中毒

アニサキスによる食中毒は長崎市保健所管内で4事例発生した。いずれも医療機関でアニサキスが確認された。

謝 辞

本調査を遂行するにあたり、種々の情報を提供していただいた長崎県生活衛生課、長崎市保健環境試験所、長崎市、佐世保市及び長崎県立各保健所の関係各位に深謝する。

食品等の急性毒性物質の生物学的検査 (2021年度)

蔡国喜, 井原基, 川野みどり, 吉川亮

Biological examination of acutely toxic substances in food (2021)

Guoxi CAI, Motoki IHARA, Midori KAWANO and Akira YOSHIKAWA

キーワード：生物学検査、ナシフグ、毒化、テトロドトキシン、麻痺性貝毒

Key words: Biological examination, Nashifugu (Fugu vermicularis), Toxicity, Tetrodotoxin, Paralytic shellfish poison

はじめに

長崎県においてナシフグは古くより一般に食用にされてきた。昭和58年12月の「フグの衛生確保について」(昭和58年12月2日付け環乳第59号厚生省環境衛生局長通知)において、その筋肉及び精巢が食用可能な部位とされてきたが、昭和63年から平成元年にかけて発生した輸入ナシフグの食中毒や本県産のナシフグから毒性が検出されたことにより、平成5年2月3日付け環乳第23号によりナシフグは販売可能なフグの種類から削除された。

しかし、県内産ナシフグによる食中毒事例は発生していないため調査したところ、ナシフグの産卵期にはフグ毒規制値を超過する個体があったもののそれ以外の時期では規制値以下であった¹⁾。これらの調査結果より漁協関係者からの販売解禁の要望に応え、厚生省は専門者会議を開催し、平成7年12月7日付け衛乳第270号「長崎及び熊本県産のナシフグに関する局長通知」により、有明海及び橘湾で漁獲されるナシフグについては有毒部位から筋肉部への毒の移行を確実に防止するための措置が適切に実施されるものに限り、販売が認められることとなった。なお、平成12年12月19日付生衛発第1821号厚生省生活衛生局長通知により精巢についても解禁され、長崎県「ナシフグによる食中毒防止対策要領」に基づき処理され産地確認証紙が貼付されるナシフグ精巢(ただし、3月から7月に漁獲されたものに限る。精巢重量10 gに満たないもの及び雌雄の判別がつかないものは流通できない)が流通することとなった。

本センターでは食品の安全性の確保を図るため、食品中に残留する毒性物質の検査を行っており、ナシフグや貝類(アサリやカキ)などを対象として定期的にマウス急性毒性試験を実施し、モニタリングする

ことにより、基準値を超える食品の流通を防いでいる。

本資料は1999年度²⁾及び2000 - 2003年度³⁾の調査資料の続報であり2021年度に実施したフグ毒及び麻痺性貝毒の検査結果を報告する。

調査方法

1 検査材料

県内保健所が収去した当該海域で漁獲されたものを対象とし、ナシフグは精巢と筋肉を、麻痺性貝毒はアサリとカキを検体とした。

ナシフグは、5月に精巢1検体、6月に筋肉3検体および11月(検体採取は5月、冷凍保存)に1検体の計5検体の検体搬入があった。

麻痺性貝毒は、4月にアサリ4検体、1月にカキ 8検体の計12検体の検体搬入があった。

2 検査方法

ふぐ毒(ナシフグ精巢・筋肉)の検査は、「フグの衛生確保について」(平成12年12月19日付生衛発第1821号)別添「ナシフグによる食中毒防止対策要領」に基づき検査を実施した。

麻痺性貝毒(アサリ・カキ)の検査は、「貝毒の検査法等について」(昭和55年7月1日環乳第30号厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知)別添「麻痺性貝毒検査法」に基づき検査を実施した。

調査結果

2021年度の年間検体数は、ナシフグ5検体および麻痺性貝毒12検体の計17検体で、いずれの検体からも規制値以上の毒力は検出されなかった(表1、表2)。

参 考 文 献

- 1) 梅原芳彦 他:長崎県衛生公害研究所報, 40, 141 - 142 (1994).
 2) 濱野敏一 他:長崎県衛生公害研究所報, 45, 119 - 120 (1999).
 3) 山崎省吾 他:長崎県衛生公害研究所報, 49, 111 - 112 (2003).

表1 ナシフグ精巢及び筋肉の毒性実験検査結果

番号	部位	採取日	海域	重量(g)	結果(MU/g)
F01	精巢	5月10日	有明海	> 10	ND
F04	筋肉	6月15日	有明海	103.8	ND
F05	筋肉	6月15日	有明海	112.3	ND
F06	筋肉	6月15日	有明海	104.7	ND
F07	筋肉	5月25日	有明海	107.7	ND

(備考) MU/g:体重20gのマウスを30分で死亡させる毒量

ND(Not Detection):検出せず、30分経過後もマウスが生存

表2 麻痺性貝毒の毒性実験検査結果

番号	検体	採取日	海域	重量(g)	結果(MU/g)
K01	アサリ殻つき	4月22日	有明海	2000.0	ND
K02	アサリ殻つき	4月22日	有明海	2000.0	ND
K03	アサリ殻つき	4月26日	有明海	2000.0	ND
K04	アサリ殻つき	4月26日	有明海	2000.0	ND
K001	カキむき身	1月13日	西彼町地先	300.0	ND
K002	カキむき身	1月12日	有明海	300.0	ND
K003	カキむき身	1月27日	有明海	300.0	ND
K004	カキむき身	1月11日	平戸市 木ヶ津地先	300.0	ND
K005	カキむき身	1月7日	久賀湾	763.8	ND
K006	カキむき身	1月7日	戸岐湾	436.8	ND
K007	カキむき身	1月11日	若松瀬戸宿ノ浦 郷姥ヶ浦地先	365.0	ND
K008	カキむき身	1月11日	壱岐市内海湾	300.0	ND

(備考) MU/g:体重20gのマウスを30分で死亡させる毒量

長崎県における三類感染症の発生状況の概要 (2021年度)

右田 雄二, 山口 結奈, 吉川 亮

Occurrence of Category III Infectious Diseases in Nagasaki (2021)

Yuji MIGITA, Yuina YAMAGUCHI and Akira YOSHIKAWA

キーワード: 腸管出血性大腸菌、MLVA法

Key words: EHEC, MLVA

はじめに

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」により三類感染症に分類される。コレラ、細菌性赤痢、腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) 感染症、腸チフスおよびパラチフスについては、感染源の究明と感染拡大防止のため、長崎県感染症発生動向調査事業に基づき、菌の検索および疫学調査を実施している。今回、2021年度に長崎県内で発生した三類感染症の発生状況および分離同定された菌株に対する分子疫学解析結果をまとめたので報告する。

調査方法

1 発生状況

2021年度に長崎県において医師の届出に基づき感染症サーベイランスシステムに報告された三類感染症について取りまとめた。

2 分子疫学解析

県立保健所管内および佐世保市保健所管内で発生した腸管出血性大腸菌感染症から分離同定されたEHECについては当センターにて血清型別、Vero毒素検査 [Polymerase Chain Reaction (PCR) 法、real-time PCR法もしくはReversed Passive Latex Agglutination (RPLA) 法] を実施、確認後、分子疫学解析のため国立感染症研究所 (以下、感染研) に送付し、解析結果の還元を受けた。長崎市保健所管内分については長崎市保健環境試験所から還元情報の提供を受けた。

感染研では、2014年シーズンより EHEC O157、O26、およびO111について、2017年からはO103、O121、O145、O165およびO91の菌株について反復配列多型解析法 (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis, MLVA)¹⁾による解析を開始し

ている。これらの8血清型以外の菌株については、パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) 法によるRFLP解析を実施している。

結果および考察

1 発生状況

長崎市保健所、佐世保市保健所および各県立保健所 (西彼、県央、県南、県北、壱岐、五島および上五島) において、EHECは44事例、83名発生した。腸チフス、パラチフスおよび赤痢患者の発生はなかった。

県内EHEC感染症の月別届出人数は、2021年4月2名、5月10名、6月6名、7月2名、8月7名、9月15名、10月14名、11月2名、12月22名、2021年1月2名および2月1名と推移した (図1)。届出は毎年、夏季 (6~8月) に多く、冬季 (12~2月) に少ないが、今年度は夏季に少なく (15名)、冬季に多かった (25名) (表1)。

年齢階級別に届出件数をみると、9歳未満で5割 (39名) を占めた。有症者は低い年齢階級で高い割合であった (図2)。

管轄保健所地域別にみると、県北地域が9事例25名と最も多く、県央7事例13名、五島2事例13名、長崎市8事例12名、県南8事例8名、佐世保市3事例5名、壱岐2事例2名、西彼と上五島はそれぞれ1事例1名であった。今年度の春季から秋季にかけては、9月に発生した県北O103保育園事例 (No.6) をのぞき大部分が散発事例であった。12月には、五島の幼稚園で12名のO157集団感染事例 (No.28) が、長崎市・佐世保市ではO157の散発事例 (No.33, 37-41) が相次いで発生した。(表1)。

EHECのO血清型別については、O157が57名、O103が15名、O111が3名、O26が2名、O115、O150

およびO174はそれぞれ1名であった(表1)。この他3名については、血清中の抗体測定により溶血性尿毒症症候群(HUS)として届出された。

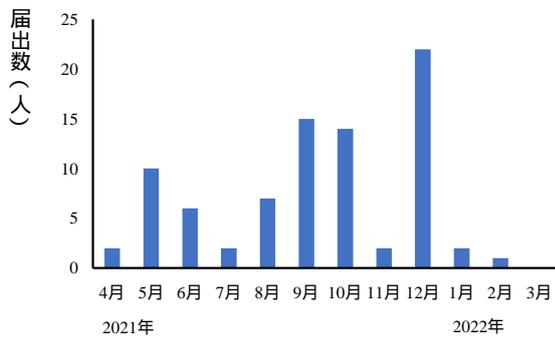


図1 EHEC月別届出件数

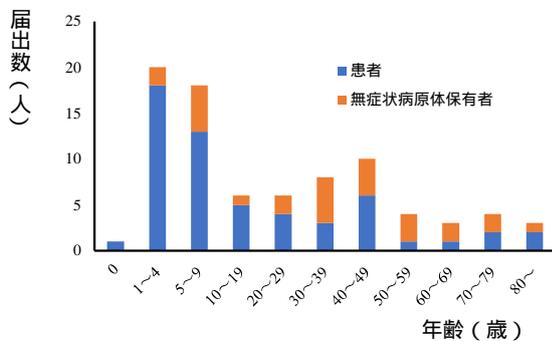


図2 EHEC年齢階級別届出件数

2 分子疫学解析

MLVA法ではリピート数が完全に一致すると「密接に関連あり」、相違する部位数が1部位であると「関連の可能性あり」と判断する²⁾。全国の分離株のMLVA解析結果と比較し、相違する部位数が1部位である株 (Single locus variant, SLV) 同士については、同じ遺伝子型として扱われ、MLVA型とあわせてMLVA complexとして表記される。

2021年度に県内で発生したEHEC41事例の疫学情報とMLVA型を示した(表1)。さらに本県の分離株が全国の自治体の分離株との間でMLVA (MLVA complex) 型が一致(類似)した事例についてとりまとめた(表2)。

「21c004」、「18m0282」、「21c013」、「21m0172」、「20m0407」、「20m0287」、「18m4005」および「21c305」のMLVA型については、県内および多くの自治体の分離株とMLVA型が一致(類似)していたが、疫学的な関連は不明であった。

五島の幼稚園におけるO157集団発生事例

(No.28)とその後発生した散發事例(No.29)のMLVA型は「21m0414」と一致していたが、保健所の疫学調査では関連は認められなかった。この遺伝子型は島内にも出現したことから、共通の感染源が島内に存在する可能性が示唆された。

さらに、県内飲食チェーン店の複数店舗で喫食歴のある7名から散發的にO157が検出された事例(No.33、37-40)では、7名のMLVA型は「21c034」と一致(類似)していた。保健所の調査によると、食品および従業員から菌が検出されなかったこと、他にも共通食があることから食中毒と断定するに至らなかったと報告を受けた。

県内でみると、2021年4～10月にかけて県南で発生したO157の3事例(No.17、18、24)では長期にわたりMLVA型「21c004」が検出された。さらに2021年8月に発生したO157の4事例(No.5、21、22、35)では県北、県南および長崎市と広域に同じMLVA型「20m0287」が検出された。このように地域内に共通の感染源が存在する可能性、EHECに汚染された食材が流通により拡散された可能性など、広域散發事例(diffuse outbreak)を疑わせるようなケースがみられた。

EHEC感染症は通常の細菌性食中毒の潜伏期間は数時間から3日程度に対し、4～8日(最長14日)と長い。そのため感染から症状が出るまでに個人差があり、食中毒の探知は困難となっている。よって、保健所において感染症として取り扱う場合であっても食中毒を想定した患者情報の収集が必要であり、感染症部門と食品衛生部門のさらなる連携が必要と思われた。当所においては、保健所からの情報で食中毒や広域散發事例を疑う場合には、自らMLVA解析を実施し、解析結果を早期に還元できるよう体制整備を進めているところである。

謝 辞

本調査を遂行するにあたり、情報を提供いただいた長崎市、長崎県立各保健所および長崎市保健環境試験所の担当者、並びに長崎県医療政策課感染症対策班の担当者に深謝する。

参 考 文 献

- 1) Izumiya H, et al., Microbiol Immunol 54: 569-577, (2010).
- 2) Ishihara T, et al., IASR Vol.35:129-130, 2014

表 1 長崎県において分離された腸管出血性大腸菌株 (2021年度)

事例 No.	管轄 保健所	発生時期	発生規模	血清型	毒素型	菌株数	解析結果
							MLVA型 (MLVA complex)
1		2021年5月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	21m0046
2		2021年5月	散発 (家族内)	O103:H2 O150:H-	VT1 VT1 VT2	2 1	16m4003 -
3		2021年6月	散発 (家族内)	O157:H7 O157:H7	VT1 VT2 VT1 VT2	3 1	21m0041 (21c013) 21m0104 (21c013)
4	県北	2021年6月	散発	O157:H-	VT1	1	21m0105
5		2021年8月	散発 (家族内)	O157:H-	VT1 VT2	2	20m0287
6		2021年9月	散発 (保育園)	O103:H2 O174:H21	VT1 VT2	7 1	18m4005 -
7		2021年9月	散発	O103:H2	VT1 VT2	1	18m4005
8		2021年10月	散発 (家族内)	O157:H-	VT1 VT2	4	21m0317
9		2021年11月	散発	O26:H11	VT1	1	21m2108
10		2021年5月	散発 (家族内)	O157:H7	VT1 VT2	3	18m0282
11		2021年7月	散発 (家族内)	O157:H7	VT2	2	21m0172
12		2021年7月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	20m0407
13	県央	2021年9月	散発	O157:H7	VT1 VT2	1	21m0315
14		2021年9月	散発 (家族内)	O157:H-	VT1 VT2	4	21m0316
15		2021年10月	散発	O111:H-	VT1 VT2	1	21m3051 (21c305)
16		2022年2月	散発	O103:H2	VT1 VT2	1	22m4002
17	県南	2021年4月	散発	O157:H7	VT2	1	21m0044 (21c004)
18		2021年4月	散発	O157:H7	VT2	1	20m0445 (21c004)
19		2021年5月	散発	O111:H-	VT1	1	21m3012
20		2021年5月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	21m0045
21		2021年8月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	20m0287
22		2021年8月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	20m0287
23		2021年10月	散発	O157:H7	VT2	1	21m0318
24		2021年10月	散発	O157:H7	VT2	1	21m0389 (21c004)
25	西彼	2022年1月	散発	O157:H7	VT1 VT2	1	21m0222 (21c034)
26	舌岐	2021年10月	散発	O111:H-	VT1	1	21m3038
27		2021年10月	散発	O115:H10	VT1	1	-
28	五島	2021年12月	集発 (幼稚園)	O157:H-	VT1 VT2	12	21m0414
29		2021年12月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	21m0414
30	上五島	2021年8月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	19m0334
31	佐世保市	2021年5月	散発	O26:H11	VT1	1	21m2040
32		2021年8月	散発 (家族内)	O103:H2	VT1	3	21m4019
33		2021年12月	散発	O157:H7	VT1 VT2	1	21m0222 (21c034)
34	長崎市	2021年5月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	21m0070
35		2021年8月	散発 (家族内)	O157:H-	VT1 VT2	2	20m0287
36		2021年10月	散発	O157:H-	VT2	1	21m0366
37		2021年12月	散発	O157:H7	VT1 VT2	1	21m0222 (21c034)
38		2021年12月	散発	O157:H7	VT1 VT2	1	21m0222 (21c034)
39		2021年12月	散発 (家族内)	O157:H7 O103:H2	VT1 VT2 VT1	1 1	21m0222 (21c034) -
40		2021年12月	散発 (家族内)	O157:H7	VT1 VT2	1	21m0406 (21c034)
				O157:H7	VT1 VT2	1	21m0222 (21c034)
41		2021年12月	散発 (家族内)	O157:H7	VT1 VT2	2	21m0222 (21c034)

表2 長崎県EHEC感染事例とMLVA型が一致(類似)した事例(2021年度)

MLVA型 (MLVA complex)	長崎県分離株				血清型 (毒素型)	MLVA型が一致(類似)した自治体
	事例No.	発生時期	管轄保健所	菌株数		
20m0445	17	2021年4月	県南	1		[2021年] 4月(山口県) 6月(北九州市、滋賀県)
21m0044 (21c004)	18	2021年4月	県南	1	O157:H7 (VT2)	7月(東京都、滋賀県、大阪府、広島県、熊本市) 8月(滋賀県、広島県、福岡市) 9月(福岡市、岡山県)
21m0389	24	2021年10月	県南	1		10月(大阪府、兵庫県、尼崎市、新潟市、福岡県) 11月(神戸市、熊本市)
18m0282 -	10	2021年5月	県央	3	O157:H7 (VT1+2)	[2021年] 2月(札幌市) 5月(愛知県) 7月(堺市) 8月(堺市、大阪府、群馬県) [2022年] 1月(福島県)
21m0041 (21c013)	3	2021年6月	県北	3	O157:H7 (VT1+2)	[2021年] 5月(香川県) 7月(熊本市)
21m0104		2021年6月		1		
21m0172 -	11	2021年7月	県央	2	O157:H7 (VT2)	[2021年] 7月(兵庫県) 8月(北九州市) 9月(大阪府、大阪市、枚方市)
20m0407 -	12	2021年7月	県央	1	O157:H- (VT1+2)	[2021年] 8月(東京都、川崎市、横浜市、長野県)
20m0287 -	5, 21, 22, 35	2021年8月	県北, 県南, 長崎市	1, 1, 2	O157:H- (VT1+2)	[2021年] 8月(埼玉県) 10月(佐賀県)
18m4005 -	6, 7	2021年9月	県北	7, 1	O103:H2 (VT1+2)	[2021年] 3月(静岡県) 8月(福岡県) 11月(福岡市)
21m3051 (21c305)	15	2021年10月	県央	1	O111:H- (VT1+2)	[2021年] 10月(久留米市)
21m0414 -	28, 29	2021年12月	五島	12, 1	O157:H- (VT1+2)	
21m0222	33	2021年12月	佐世保市	1		[2021年] 6月(北九州市) 8月(北九州市、滋賀県、埼玉県) 12月(久留米市、佐賀県) [2022年] 1月(福岡県)
21m0222	37	2021年12月	長崎市	1		
21m0222	38	2021年12月	長崎市	1		
21m0222 (21c034)	39	2021年12月	長崎市	1	O157:H7 (VT1+2)	
21m0222	41	2021年12月	長崎市	2		
21m0406	40	2021年12月	長崎市	1		
21m0222	25	2022年1月	西彼	1		

農産物中の残留農薬の検査結果 (2021 年度)

吉村 裕紀, 谷口 香織, 松永 尚子, 松尾 広伸, 辻村 和也

Survey of Pesticide Residues in Agricultural Products (2021)

Hiroki YOSHIMURA, Kaori TANIGUCHI, Naoko MATSUNAGA,
Hironobu MATSUO and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: 残留農薬、一斉分析、農産物

Key words: Pesticide residues, Simultaneous determination, Agricultural products

はじめに

長崎県食品衛生監視指導計画に基づき、県内で流通する農産物中の残留農薬検査を実施した。

調査方法

1 試料及び試薬

表 1 に示す 48 試料について検査を行った。なお、みかんについては果皮を除いたもののみ検査した。

農薬標準溶液は、関東化学製農薬混合標準溶液 48、54、58、63、70、77、78 及び 79 を使用した。試薬に関しては、超純水及びメタノールは関東化学製の LC/MS 用、試料の前処理に用いたアセトニトリル、アセトン、ヘキサン及びトルエンは関東化学製の残留農薬試験・PCB 試験用(5000 倍濃縮)、その他の試薬は残留農薬試験用又は特級を用いた。検体の前処理における精製には、スペルコ製 ENVI-Carb/LCNH2 (500 mg/500 mg、6 mL)を用いた。

2 検査対象農薬

検査対象農薬は、表 2 に示す 242 農薬の中から農産物の種類に応じ A~J のグループ分けをし、186~216 農薬を選択した。報告下限値はアセタミプリドのみ 0.05 ppm、他は全て 0.01 ppm とした。

3 装置

(1) ガスクロマトグラフタンデム質量分析法 (GC/MS/MS)

島津製作所製 GCMS-TQ8040 を使用した。

(2) 液体クロマトグラフタンデム質量分析法 (LC/MS/MS)

LC 部は株式会社島津製作所製 LC-10ADvp システム、MS/MS 部は株式会社イービー・サイエックス製 API2000 を使用した。

4 分析方法

分析は、厚生労働省通知¹⁾「GC/MS による農薬等の一斉分析法(農産物)」及び「LC/MS による農薬等の一斉分析法 I(農産物)」に準じて行った。

検査結果

2021 年度残留農薬検査の結果、農薬を検出した農産物の一覧を表 3 に示す。全 48 試料のうち 5 試料から報告下限値以上の農薬が検出された。全ての試料が食品衛生法に基づく残留基準値以内であった。

参考文献

1) 食安発第 1129002 号 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(一部改正).” (2015 年 11 月 29 日).

表 1 検査対象農産物

区分	検査項目 グループ	農作物名	検体数	区分	検査項目 グループ	農作物名	検体数	
県内産	A	かんしょ	5	県内産	E	スイートスプリング	1	
		さといも	2			はっさく	2	
		だいこんの根	2		H	キャベツ	1	
		れんこん	1		I	ばれいしょ	6	
	B	みかん ¹	3		J	なす	6	
	C	きゅうり	8			ニガウリ	2	
		トマト	1		県外産	A	かんしょ	1
		ミニトマト	1			C	ミニトマト	1
	D	にんじん	4		D	にんじん	1	

1 一部の農薬については検査対象外とした(残留基準値が果皮を含むもの対象となったため)

表 2 検査対象農薬

No	項目名	機器	A 根菜 1	B 酸性 果実	C ナス 科ウ リ科 1	D 根菜 2	E 柑橘 類	F その 他果 実	G 緑黄 色 葉菜 花菜	H 淡色 葉菜 未成 熟豆 類	I 根菜 3	J ナス 科ウ リ科 2	他 グル ープ 外
1	1,1 - ジクロロ - 2,2 - ビス(4 - エチルフェニル)エタン	GC											
2	2 - (1 - ナフチル)アセタミド	GC											
3	EPN	GC											
4	XMC	GC											
5	アザコナゾール	GC											
6	アジンホスメチル	GC											
7	アセタミプリド	GC											
8	アセトクロール	GC											
9	アゾキシストロピン	LC											
10	アトラジン	GC											
11	アニロホス	LC											
12	アメリリン	GC											
13	アラクロール	GC											
14	イサゾホス	GC											
15	イソキサチオン	GC											
16	イソキサチオンオキシソ	GC											
17	イソフェンホス	GC											
18	イソプロカルブ	GC											
19	イソプロチオラン	GC											

No	項目名	機器	A 根菜 1	B 酸性 果実	C ナス 科ウ リ科 1	D 根菜 2	E 柑橘 類	F その 他果 実	G 緑黄 色 葉菜 花菜	H 淡色 葉菜 未成 熟豆 類	I 根菜 3	J ナス 科ウ リ科 2	他 グル ープ 外
20	イプロバリカルブ	LC											
21	イプロベンホス	GC											
22	イミダクロプリド	LC											
23	イミベンコナゾール	GC											
24	インダノファン	LC											
25	インドキサカルブ	LC											
26	ウニコナゾール - P	GC											
27	エスプロカルブ	GC											
28	エチオン	GC											
29	エディフェンホス	GC											
30	エトキサゾール	GC											
31	エトフェンブロックス	GC											
32	エトフメセート	GC											
33	エボキシコナゾール	GC											
34	オキサジアゾン	GC											
35	オキサジキシル	GC											
36	オキサジクロメホン	LC											
37	オキサミル	LC											
38	オキシカルボキシ	LC											
39	オキシフルオルフェン	GC											
40	カズサホス	GC											
41	カフェンストール	GC											
42	カルバリル	LC											
43	カルフェントラゾンエチル	GC											
44	カルプロバミド	LC											
45	キナルホス	GC											
46	キノキシフェン	GC											
47	キノクラミン	GC											
48	クミルロン	LC											
49	クレソキシムメチル	GC											
50	クロキントセットメキシル	LC											
51	クロチアニジン	LC											
52	クロマゾン	GC											
53	クロマフェノジド	LC											
54	クロメブロップ	LC											
55	クロリダゾン	LC											
56	クオルタールジメチル	GC											

No	項目名	機器	A 根菜 1	B 酸性 果実	C ナス 科ウ リ科 1	D 根菜 2	E 柑橘 類	F その 他果 実	G 緑黄 色 葉菜 花菜	H 淡色 葉菜 未成 熟豆 類	I 根菜 3	J ナス 科ウ リ科 2	他 グル ープ 外
57	クロルピリホス	GC											
58	クロルピリホスメチル	GC											
59	クロルフェナビル	GC											
60	クロルフェンソン	GC											
61	クロルフェンピンホス	GC											
62	クロルブファミ	GC											
63	クロルプロファミ	GC											
64	クロルベンシド	GC											
65	クロロクスロン	LC											
66	クロロベンジレート	GC											
67	シアナジン	GC											
68	シアノホス	GC											
69	ジウロン	LC											
70	ジエトフェンカルブ	GC											
71	ジクロシメット	GC											
72	ジクロトホス	GC											
73	ジクロフェンチオン	GC											
74	ジクロホップメチル	GC											
75	ジクロラン	GC											
76	シニドンエチル	GC											
77	シハロホップブチル	GC											
78	ジフェナミド	GC											
79	ジフェノコナゾール	GC											
80	シフルフェナミド	LC											
81	ジフルフェニカン	GC											
82	シプロコナゾール	GC											
83	シプロジニル	LC											
84	シマジン	GC											
85	シメコナゾール	LC											
86	ジメタメトリン	GC											
87	ジメチピン	GC											
88	ジメチルピンホス	GC											
89	ジメテナミド	GC											
90	ジメトエート	GC											
91	ジメトモルフ	LC											
92	シメトリン	GC											
93	ジメビペレート	GC											

No	項目名	機器	A 根菜 1	B 酸性 果実	C ナス 科ウ リ科 1	D 根菜 2	E 柑橘 類	F その 他果 実	G 緑黄 色 葉菜 花菜	H 淡色 葉菜 未成 熟豆 類	I 根菜 3	J ナス 科ウ リ科 2	他 グル ープ 外
94	シラフルオフェン	LC											
95	スピノサド	LC											
96	スピロキサミン	GC											
97	スピロジクロフェン	GC											
98	ターバシル	GC											
99	ダイアジノン	GC											
100	チアクロプリド	LC											
101	チアベンダゾール	LC											
102	チアメトキサム	LC											
103	チオジカルブ及びメソミル	LC											
104	チオベンカルブ	GC											
105	チフルザミド	GC											
106	テトラクロルピホス	LC											
107	テトラコナゾール	GC											
108	テトラジホン	GC											
109	テニルクロール	GC											
110	テブコナゾール	GC											
111	テブチウロン	LC											
112	テブフェノジド	LC											
113	テブフェンピラド	GC											
114	テフルトリン	GC											
115	テルブトリン	GC											
116	トリアジメノール	GC											
117	トリアジメホン	GC											
118	トリアゾホス	GC											
119	トリアレート	GC											
120	トリシクラゾール	GC											
121	トリチコナゾール	LC											
122	トリデモルフ	LC											
123	トリブホス	GC											
124	トリフルラリン	GC											
125	トリフロキシストロピン	GC											
126	トルクロホスメチル	GC											
127	トルフェンピラド	GC											
128	ナプロバミド	GC											
129	ニトロタールイソプロピル	GC											
130	ナルフルラゾン	GC											

No	項目名	機器	A 根菜 1	B 酸性 果実	C ナス 科ウ リ科 1	D 根菜 2	E 柑橘 類	F その 他果 実	G 緑黄 色 葉菜 花菜	H 淡色 葉菜 未成 熟豆 類	I 根菜 3	J ナス 科ウ リ科 2	他 グル ープ 外
131	パクロブトラゾール	GC											
132	パラチオン	GC											
133	パラチオンメチル	GC											
134	ハルフェンブロックス	GC											
135	ピコリナフェン	GC											
136	ピテルタノール	GC											
137	ピフェノックス	GC											
138	ピフェントリン	GC											
139	ピペロニルブトキシド	GC											
140	ピペロホス	GC											
141	ピラクロストロピン	LC											
142	ピラクロホス	GC											
143	ピラゾホス	GC											
144	ピラフルフェンエチル	GC											
145	ピリダフェンチオン	GC											
146	ピリダベン	GC											
147	ピリフェノックス	GC											
148	ピリプチカルブ	GC											
149	ピリプロキシフェン	GC											
150	ピリミカーブ	LC											
151	ピリミノバックメチル	GC											
152	ピリミホスメチル	GC											
153	ピリメタニル	GC											
154	ピロキロン	GC											
155	ピンクロゾリン	GC											
156	フィプロニル	GC											
157	フェナミホス	GC											
158	フェナリモル	GC											
159	フェントロチオン	GC											
160	フェノキサニル	GC											
161	フェノキシカルブ	LC											
162	フェノチオカルブ	GC											
163	フェノブカルブ	GC											
164	フェンアミドン	GC											
165	フェンクロールホス	GC											
166	フェンスルホチオン	GC											
167	フェンチオン	GC											

No	項目名	機器	A 根菜 1	B 酸性 果実	C ナス 科ウ リ科 1	D 根菜 2	E 柑橘 類	F その 他果 実	G 緑黄 色 葉菜 花菜	H 淡色 葉菜 未成 熟豆 類	I 根菜 3	J ナス 科ウ リ科 2	他 グル ープ 外
168	フェントエート	GC											
169	フェンピロキシメート	LC											
170	フェンブコナゾール	GC											
171	フェンプロバトリン	GC											
172	フェンプロピモルフ	GC											
173	フサライド	GC											
174	ブタクロール	GC											
175	ブタフェナシル	LC											
176	ブタミホス	GC											
177	ブピリメート	GC											
178	ブプロフェジン	GC											
179	フラムプロップメチル	GC											
180	フラマトビル	LC											
181	フルアクリピリム	GC											
182	フルジオキシニル	GC											
183	フルシラゾール	GC											
184	フルチアセツメチル	GC											
185	フルトラニル	GC											
186	フルトリアホール	GC											
187	フルフェノクスロン	LC											
188	フルフェンビルエチル	GC											
189	フルミオキサジン	GC											
190	フルマイクロラックペンチル	GC											
191	フルリドン	GC											
192	ブレチラクロール	GC											
193	プロシミドン	GC											
194	プロチオホス	GC											
195	プロバキサホップ	LC											
196	プロバジン	GC											
197	プロバニル	GC											
198	プロバホス	GC											
199	プロバルギット	GC											
200	プロピコナゾール	GC											
201	プロビザミド	GC											
202	プロヒドロジャスモン	GC											
203	プロフェノホス	GC											
204	プロボキスル	GC											

No	項目名	機器	A 根菜 1	B 酸性 果実	C ナス 科ウ リ科 1	D 根菜 2	E 柑橘 類	F その 他果 実	G 緑黄 色 葉菜 花菜	H 淡色 葉菜 未成 熟豆 類	I 根菜 3	J ナス 科ウ リ科 2	他 グル ープ 外
205	プロマシル	GC											
206	プロメトリン	GC											
207	プロモブチド	GC											
208	プロモプロピレート	GC											
209	プロモホス	GC											
210	プロモホスエチル	GC											
211	ヘキサコナゾール	GC											
212	ヘキサジノン	GC											
213	ヘキシチアゾクス	LC											
214	ベナラキシル	GC											
215	ベノキサコール	GC											
216	ベルメトリン	GC											
217	ベンコナゾール	GC											
218	ベンシクロン	LC											
219	ベンダイオカルブ	LC											
220	ベンディメタリン	GC											
221	ベンフレセート	GC											
222	ホサロン	GC											
223	ボスカリド	LC											
224	ホスチアゼート	GC											
225	ホスファミドン	GC											
226	ホレート	GC											
227	マラチオン	GC											
228	マイクロブタニル	GC											
229	メカルバム	GC											
230	メタベンズチアズロン	LC											
231	メタラキシル	GC											
232	メチダチオン	GC											
233	メキシクロール	GC											
234	メキシフェノジド	LC											
235	メミノストロピン	GC											
236	メラクロール	GC											
237	メフェナセット	GC											
238	メフェンピルジエチル	GC											
239	メプロニル	GC											
240	ラクトフェン	LC											
241	リニューロン	LC											

No	項目名	機器	A 根菜 1	B 酸性 果実	C ナス 科ウ リ科 1	D 根菜 2	E 柑橘 類	F その 他果 実	G 緑黄 色 葉菜 花菜	H 淡色 葉菜 未成 熟豆 類	I 根菜 3	J ナス 科ウ リ科 2	他 グル ープ 外
242	レナシル	GC											
検査項目数			201	211	216	214	186	193	185	201	213	212	134

表3 残留農薬検査結果

グループ	農産物名	検出数/検体数	区分	検出農薬	検出値 ¹ ppm	分析値 ² ppm	基準値 ppm
B	みかん	1/3	県内産	メチダチオン	0.01	0	5
C	きゅうり	2/8	県内産	アゾキシストロピン	0.02	0	1
				チアマトキサム	0.02	0.0	0.5
				クロチアニジン	0.08	0	2
				クロルフェナビル	0.02	0.0	0.5
				プロシミドン	0.05	0	4
H	キャベツ	1/1	県内産	クロルフェナビル	0.02	0	1
J	なす	1/6	県内産	アセタミプリド	0.09	0	2

2 報告下限値 0.01 ppm の桁数に合わせた値を検出値とする

3 告示に定める食品に残留する農薬等の成分である物質の量の限度(基準値)の桁数に合わせた値を分析値とする

県内流通食品の成分規格基準および食品添加物の使用基準に関する検査結果(2021年度)

山口 恵里果, 松永 尚子, 吉村 裕紀, 山口 結奈, 右田 雄二, 辻村 和也, 吉川 亮

Survey Report in Commercially Available Food on Ingredient Standards of Food and Criteria for the Use of Food Additives (2021)

Erika YAMAGUCHI, Naoko MATSUNAGA, Hiroki YOSHIMURA, Yuina YAMAGUCHI, Yuji MIGITA, Kazunari TSUJIMURA and Ryo YOSHIKAWA

キーワード: 食品添加物, ソルビン酸, 亜硝酸根, 大腸菌群, 酸価, 過酸化値, 魚肉ねり製品, 揚げ麺, 食肉製品

Key words: food additive, sorbic acid, nitrite, coliform bacteria, acid value, peroxide value, fish paste products, fried noodles, meat products

はじめに

2021年度食品一斉収去検査として、理化学検査と細菌検査を実施した。

対象食品および検査項目は、魚肉ねり製品について添加物使用基準(ソルビン酸)および成分規格基準(大腸菌群)、加熱食肉製品について成分規格基準(亜硝酸根および大腸菌群などの細菌検査)、即席めん類について成分規格基準(酸価及び過酸化値)である。

これらの検査結果について報告する。

調査方法

1 魚肉ねり製品の理化学検査及び細菌検査

魚肉ねり製品を対象に、保存料(ソルビン酸)定量検査および大腸菌群検査を実施し、それぞれ添加物使用基準および成分規格基準に適合しているかを確認した。

試料は、県内に流通する魚肉ねり製品のうち、県内産を中心に計19検体(ソルビン酸使用表示あり:13検体、なし:6検体)とした。また、魚肉すり身1検体については、保存料(ソルビン酸)定量検査のみを行った。

(1) 保存料(ソルビン酸)定量検査

(a) 試薬

ソルビン酸標準品は、関東化学株式会社製のものを使用した。

試薬に関しては、メタノールは関東化学株式会社製

のLC/MS用を使用し、その他の試薬は特級品以上のものを使用した。

(b) 検査方法

食品中のソルビン酸について、均質化試料を水蒸気蒸留装置(宮本理研工業株式会社製 型式:STC-5D)を用いて蒸留することにより、試験溶液を得た。これを高速液体クロマトグラフ装置(アジレント・テクノロジー株式会社製 型式:Agilent 1260 Infinity LC)を用いて、絶対検量線法により定量した。装置の測定条件を表1に示した^{1), 2)}。

表1 高速液体クロマトグラフ装置条件

カラム	Inertsil ODS-3V, 4.6 mmID × 150 mm (ジーエルサイエンス社製)
ガードカラム	Inertsil ODS-3, 4.6 mmID × 150 mm (ジーエルサイエンス社製)
移動相	メタノール-水-0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 4.0) (36:59:5)
流速	1.0 mL/min
カラム温度	40°C
測定波長	230 nm

(2) 大腸菌群検査

(a) 試薬

試薬に関しては、ペプトンはサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製、菌の培養には日水製薬株式会社製のBGLB培地、EMB培地、乳糖ブイヨン培地を使用し、その他の試薬は特級品以上のものを

使用した。

(b) 検査方法

検体を細切して滅菌ペプトン加生理食塩水を加えた 10 倍希釈液を倍濃度 BGLB 発酵管に接種し、35°C 48 時間培養後にガス発生の有無を確認した。ガス発生を認めた場合には確定試験として EMB 培地、完全試験として乳糖ブイヨン発酵管を用いて追加で培養を実施し、完全試験でガスの発生を認めるものを「大腸菌群陽性」と判定した^{3), 4)}。

2 加熱食肉製品の理化学検査および細菌検査

加熱食肉製品を対象に、発色剤(亜硝酸根)定量検査および細菌検査(包装後加熱食肉製品について大腸菌群およびクロストリジウム属菌、加熱後包装食肉製品について E.coli、黄色ブドウ球菌およびサルモネラ属菌)を実施し、それぞれの成分規格基準に適合しているかを確認した。

試料は、県内に流通する加熱食品製品のうち、県内産を中心に包装後加熱食肉製品 5 検体および加熱後包装食肉製品 5 検体の計 10 検体(亜硝酸根使用表示あり:8 検体、なし:2 検体)とした。

(1) 発色剤(亜硝酸根)定量検査

(a) 試薬

標準品として、関東化学株式会社製の亜硝酸ナトリウムを使用した。試薬に関しては、特級品以上のものを使用した。

(b) 検査方法

検査は、食品中の亜硝酸ナトリウムについて、亜硝酸イオンとジアゾ化反応によって発色する赤紫色を分光光度計(日本分光株式会社 V-730)を用いて、波長 540 nm の吸光度を測定し、亜硝酸根として定量した^{3), 5), 6)}。

(2) 細菌検査

(a) 試薬

使用した試薬に関して、表 2 に示した。表中にないその他の試薬は特級品以上のものを使用した⁷⁾。

(b) 検査方法

大腸菌群

魚肉練り製品と同様に行った。

クロストリジウム属菌

検体を細切して滅菌ペプトン加生理食塩水を加えた 10 倍希釈液および、100 倍希釈液を作製し、各々を滅菌パウチに 10 ml ずつ接種し、クロストリジア測定用培地を加え溶封し 35°C 24 時間培養した。発育した培地上的の黒色集落の数と希釈倍数から検体 1 g あたりの

菌数を求めた。^{3), 4), 8)}

E.coli

検体を細切して滅菌ペプトン加生理食塩水を加えた 10 倍希釈液を作製し、EC 発酵管 5 本に接種し、44.5°C 24 時間培養後にガス発生の有無を確認した。ガス発生を認めた場合には確定試験として EMB 培地、完全試験として乳糖ブイヨン発酵管を用いて追加で培養を実施し、完全試験でガスの発生を認め、グラム染色でグラム陰性無芽胞桿菌の場合を「E.coli 陽性」と判定した^{3), 4)}。

黄色ブドウ球菌

検体を細切して滅菌緩衝ペプトン水を加えた 10 倍希釈液と 100 倍希釈液、1000 倍希釈液を作製し、各段階の希釈液を卵黄加マンニツ食塩寒天培地で培養した。発育した疑わしい集落 2~5 個を TSA 培地で純培養し、グラム染色、コアグラゼ試験を実施した。グラム陽性球菌、コアグラゼ試験陽性のものを黄色ブドウ球菌と判定し、培地上的の集落数と希釈倍数から試料 1 g あたりの菌数を求めた^{3), 4), 8)}。

サルモネラ属菌

検体を細切して滅菌緩衝ペプトン水を加えた 10 倍希釈液を 37°C 22 時間培養後、ラパポートバシリアデイス培地、テトラチオネート培地に接種し 42°C 22 時間増菌した。これを DHL 寒天培地、クロモアガーサルモネラに塗抹して培養し、菌を分離した。今回の試験でサルモネラ属菌を疑う集落は確認されなかった。疑わしい集落が観察された場合には、生化学性状試験を実施する。

生化学性状として TSI 寒天培地で高層部黄変・黒変・ガス産生(高層部における気泡または亀裂の発生)および斜面部が鮮やかに赤変したものおよび、LIM 培地で培地全体が紫変(リジン陽性)、運動性陽性、インドール反応陰性を確認した菌を定型的なサルモネラ属菌と判断する。それらの菌株についてサルモネラ診断用血清で O 抗原の群別を決定した。また、非定型的なサルモネラ属菌が疑われる場合は、生化学性状試験を追加する^{3), 4), 8)}。

3 即席めん類の理化学検査

即席めん類を対象に、酸価油脂の試験として、酸価および過酸化値の測定を行い、成分規格基準に適合しているかを確認した。

試料は、県内に流通する即席めん類のうち、揚げ麺について県内産を中心に 14 検体とした。

(1) 試薬

県内に流通する

試薬に関しては、ジエチルエーテルは関東化学株式会社製の油脂試験用、0.1 mol/L エタノール性水酸

化カリウム溶液及び 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液は富士フィルム和光純薬株式会社製の容量分析用、フェノールフタレイン溶液は関東化学株式会社製の滴定用指示薬、でんぷん（溶性）は関東化学株式会社製の鹿一級を使用し、その他の試薬は特級品以上のものを使用した。

(2) 検査方法

検査は、試料より石油エーテルで抽出した油脂を用いて行った。酸価は、抽出した油脂をエタノール・ジエチルエーテル混液に溶解後、1%フェノールフタレイン溶液を指示薬とし、0.1 mol/L エタノール性水酸化カリウム溶液で滴定することで求めた。過酸化物価は、抽出した油脂をイソオクタン・酢酸混液に溶解後、でんぷん溶液を添加し、0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定することで求めた^{6), 9), 10)}。

規格基準および使用基準¹¹⁾

1 魚肉ねり製品

- (1) ソルビン酸使用基準: 2.0 g/kg 以下
(定量下限: 0.01 g/kg)
- (2) 大腸菌群の成分規格基準: 陰性であること

2 加熱食肉製品

- (1) 亜硝酸根規格基準: 0.070 g/kg 以下
(定量下限: 0.0002 g/kg)
- (2) 微生物の成分規格基準:
 - ・包装後加熱食肉製品
大腸菌群: 陰性
クロストリジウム属菌: 1000/g 以下
 - ・加熱後包装食肉製品
E.coli: 陰性
黄色ブドウ球菌: 1000/g 以下
サルモネラ属菌: 陰性

3 即席めん類

即席めん類（めんを油脂で処理したものに限る）の成分規格基準は、含有油脂の酸価が 3 以下、かつ過酸化物価が 30 以下である。

検査結果

1 魚肉ねり製品の理化学検査及び細菌検査

(1) 保存料(ソルビン酸)定量検査

原材料表示に保存料（ソルビン酸）の記載が無い6検体および魚肉すり身 1 検体については定量下限値未満であること、ソルビン酸の表示が有る 13 検体については使用基準の範囲内であることを確認した。また、すべての検体について使用表示との整合性を確認し

た。

(2) 大腸菌群検査

すべて陰性で、規格基準に適合していた。

2 加熱食肉製品の理化学検査および細菌検査

(1) 発色剤(亜硝酸根)定量検査

検査した 10 検体のうち、「発色剤」の表示のない 1 検体から亜硝酸根 0.087 g/kg(使用基準 0.070 g/kg)が検出された。

(2) 細菌検査

すべて規格基準に適合していた。

3 即席めん類の理化学検査

すべて規格基準に適合していた。

参考文献

- 1) 薬生食基発 0628 第 1 号 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長通知及び薬生食監発 0628 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長通知: 「『食品中の食品添加物分析法』の改正について」, (2019 年 6 月 28 日).
- 2) 日本食品衛生協会編: 食品衛生検査指針(食品添加物編) 追補 2020, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京(2020).
- 3) 厚生省生活衛生局長通知: 衛乳第 54 号「食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について」(1993 年 3 月 17 日).
- 4) 日本食品衛生協会編: 食品衛生検査指針(微生物編) 2018, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京(2018).
- 5) 日本食品衛生協会編: 食品衛生検査指針(食品添加物編) 2003, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京(2003).
- 6) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 2020, 金原出版株式会社, 東京(2020).
- 7) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部基準審査課 事務連絡: 「食品、添加物の規格基準に定めるサルモネラ属菌および黄色ブドウ球菌の試験法にかかる留意事項について」, (2016 年 1 月 28 日).
- 8) 食安発 0729 第 4 号厚生労働省医薬食品局食品安全部部長通知: 「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」, (2015 年 7 月 29 日).
- 9) 食安発 0328 第 1 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部部長通知: 「食品、添加物等の規格基準の一部

を改正する件について」, (2016年3月28日).
10) 日本食品衛生協会編: 食品衛生検査指針 (理
化学編), 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京

(2015).
11) 厚生省告示第370号: 食品、添加物等の規格基
準, (1959年12月28日).

畜水産食品中の残留動物用医薬品の検査結果(2021年度)

松尾 広伸, 井原 基, 吉川 亮, 辻村 和也

Survey Report of Veterinary Drug Residues in Livestock Products and Sea foods (2021)

Hironobu MATSUO, Motoki IHARA, Akira YOSHIKAWA
and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: 畜水産食品、動物用医薬品、高速液体クロマトグラフ - タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)

Key words: Livestock products and Sea foods, veterinary drug residues, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

はじめに

2021年度厚生労働省畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の一環として、県内産の畜水産食品(養殖魚介類、乳)中の抗生物質、合成抗菌剤、内寄生虫用剤の検査を行ったので報告する。

調査方法

1 試料及び試薬

検査に供した試料は、表1に示す。

標準品に関しては、富士フィルム和光純薬(株)のものを使用した。

試薬に関しては、アセトニトリル及びメタノールは関東化学(株)製のLC/MS用を、ギ酸は富士フィルム和光純薬(株)製のLC/MS用を使用した。その他の試薬は、残留農薬用及び特級品以上のものを使用した。

2 検査項目及び残留基準

検査項目及び残留基準は、表2に示す。

3 検査方法

(1) 抗生物質の微生物学的検査

1994年7月1日付け衛乳第107号「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改定)別添2」及び食品衛生検査指針(理化学編)、ペーパーディスク法(IDF standard)[関連法規:1951年12月27日付け厚生省令第52号「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」]に準じた。

(2) 抗生物質、合成抗菌剤及び内寄生虫用剤の理化学検査

厚生労働省通知試験法 HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法(畜水産物)及び文献2)を参考に、分析法を検討し、「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」(2007年11月15日付け食安発第1115001号)及び「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(2010年12月24日付け食安発1224第1号)に従い、試験法妥当性を評価し、標準操作手順書を作成し、その方法を適用した。その概要を以下に示す。

当該前処理は、均質化検体から0.3%ギ酸メタノール/アセトニトリル(7/3)混液及び0.2M EDTA-2Na水溶液で対象成分を2回粉碎抽出し、さらに残渣にEDTA含有クエン酸緩衝液を加えて粉碎抽出を行う。それらの上清を合わせたものを定容後、0.22µmフィルターでろ過し、試験溶液とした。分析装置は、高速液体クロマトグラフ - タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)として、アジレントテクノロジー株式会社製1290 Infinity LC/6460を使用した。

検査結果及び考察

養殖魚介類15検体、乳9検体の検査を行った。結果、抗生物質、合成抗菌剤、内寄生虫用剤について基準値を超える検体は無かった。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ：畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査結果.
- 2) 松本理世、他：LC/MS/MS を用いた畜水産物中動物用医薬品等の迅速一斉分析法の検討(第3報), *熊本県保健環境科学研究所報*, 44, 28-37, (2014).
- 3) 食安発第 1115001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(2007年11月15日).
- 4) 食安発 1224 号第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(2010年12月24日).

表1 試 料

搬入機関	養 殖 魚 介 類		乳
	ぶり (はまち)	まだい	
西彼保健所	1		
県央保健所			1
県南保健所	3	2	8
県北保健所	1	2	
五島保健所	1	1	
上五島保健所		1	
対馬保健所	2		
壱岐保健所		1	
合 計	8	7	9

表2 検査項目及び残留基準 (単位: ppm)

検査項目	養殖魚介類		乳
	ぶり (はまち)	まだい	
(抗生物質)			
テトラサイクリン類	0.2 ^{*1}	0.2 ^{*1}	0.1 ^{*2}
スピラマイシン類 ^{*3}	0.2	0.2	0.2 ^{*2}
ベンジルペニシリン (合成抗菌剤)			0.004
スルファメラジン	0.01	0.01	
スルファジミジン	0.01	0.01	0.025
スルファモノメキシン	0.1	0.1	
スルファジメキシン	0.1	0.1	
スルファキノキサリン	0.01	0.01	
オキシリン酸	0.06	0.06	
チアンフェニコール	0.02	0.02	
(内寄生虫用剤)			
チアベンダゾール類 ^{*4}			0.10

*1: 魚介類におけるオキシテトラサイクリンのみの値を記載。

検査においてテトラサイクリン、クルテトラサイクリンに、一律基準(0.01 ppm)を適用した。

*2: オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、クルテトラサイクリンの和

*3: スピラマイシン、ネオスピラマイシンの和

*4: チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾールの和

*5: 残留基準の設定されていないものは、一律基準を記載

GC-ECDによる血中PCB分析法最適化の検討(2020-2021年度)

松永 尚子, 谷口 香織, 辻村 和也

Studies on Optimization of PCB Analysis Method in Human Blood by GC-ECD (2020-2021)

Naoko MATSUNAGA, Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: PCB、血液、油症、GC-ECD

Key words: PCB, human blood, Yusho, GC-ECD

はじめに

1968年に発生したカネミ油症発生当時から長崎県は「長崎油症研究班」を組織し、毎年、五島市及び長崎市で油症検診を実施し、油症の診断と治療法に関する研究等を行っている。

当センター(旧、長崎県衛生公害研究所)においても1973年から血液中のポリ塩化ビフェニル(PCB)の分析を開始し、各年度の分析結果をカネミ油症認定審査の基礎資料として認定審査会に提供してきた。血中PCB分析は少量の血液量で安定した結果が求められる。今後限られた採血量採取および再分析を想定し、本検討では使用血液量の少量化によるPCB分析結果に与える影響について検討を行った。また、前処理方法の効率化を図り、分析結果の正確性、精度についても検討を行った。これまでは、ヘキサン抽出による前処理後、シリカゲルミニカラムとフロリジルミニカラムによる2段階の精製(以下、従来法)を行っている。本検討は、シリカゲル-フロリジルー一体型ミニカラムにより精製し、従来法との回収率等について比較検証し妥当性評価を行った。これらの検討結果について報告する。

試験方法

1 試薬等および器具

(1) PCB標準液

・カネクロールKC-300、KC-400、KC-500、KC-600、ジーエルサイエンス(株)製(1:1:1:1)より調製したPCB標準原液400 ppmを使用した。

・ヘキサン5,000: 関東化学(株)製、残留農薬・PCB分析用

(2) 試薬

・ヒト全血A型(個別別)、コスモ・バイオ(株)製
・蒸留水(ヘキサン洗浄品): 関東化学(株)製、残留農薬試験用

・エタノール(99.5): 富士フィルム和光純薬(株)製、残留農薬・PCB試験用

・無水硫酸ナトリウム: 富士フィルム和光純薬(株)製、残留農薬・PCB試験用

・水酸化カリウム: 林純薬工業(株)製、試薬一級

(3) 器具

・シリカゲルミニカラム(SPE DSC-Si Silica tube 6 mL(500 mg))、シグマアルドリッチ(株)製

・フロリジルミニカラム(Sep-Pak Vac Florisil 6 mL(500 mg))、Waters社製

・シリカゲルフロリジルー一体型ミニカラム(以下、一体型ミニカラム)(SI/FL(500 mg/500 mg/6 mL)カスタムメイド品)、ジーエルサイエンス(株)製

(4) PCB標準溶液の調製

PCB標準液400 ppmをヘキサン5,000で希釈し調製した。

2 分析方法及び分析機器

(1) 前処理法

血液5.0 g使用する、血中PCBの分析法(従来法)については山ノ内¹⁾の報告を参考にし、血液2.0 gを使用する前処理法は従来法を参考に実施した(図1)。また、一体型ミニカラム法は、血液5.0 gを用い、図1の方法で実施し、従来法(血液5.0 g)と比較した。

(2) 添加回収試験

血液5.0 gにPCB標準溶液(0.1 ppm)を血液量の

表1 GC-ECD測定条件

GC	GC-2014((株)島津製作所)
検出器	電子捕獲検出器(ECD)
カラム	SiliconOV-1 Uniport HP60/80 mesh (2.1 m x 3.2 mmI.D.)
カラム温度	200
注入口温度	250
検出器温度	290
キャリアガス、流量	N ₂ 40 mL/min
注入量	2 μL

1/10量の0.5 mLを添加して前処理を行い最終試料溶液を0.5 mLとした(図1 従来法)。血液2.0 gの場合は蒸留水(ヘキサン洗浄品)3.0 gを加え合わせて5.0 gを試料とし、血液量5.0 gと同様の前処理を行い最終試料溶液を0.2 mLとした。

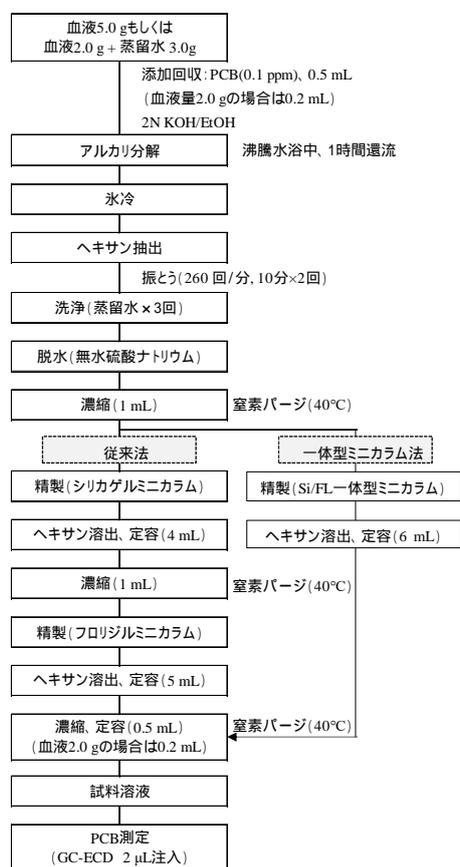


図1 血中PCB前処理法

(3) 分析機器、測定条件

表1の方法で行った。

(4) データ解析

PCBの定量はピーク面積値と同じ数値化法²⁾により行った。

表2 使用血液量と回収率の比較

血液量	回収率(%)	
	2020年度	2021年度
5.0 g	89.5% (n=37)	87.9% (n=24)
2.0 g	88.0% (n=17)	86.7% (n=5)

3 実施項目

(1) 使用血液量少量化によるPCB分析への影響
血液量5.0 gと2.0 gについて、PCB添加回収試験の回収率により比較した。

(2) 前処理法の違いによる血中PCB分析への影響

従来法と一体型ミニカラム法による精製法との比較をPCB添加回収試験(血液量5.0 g)により行い、各精製法のクロマトグラムについて標準品とのピーク形状を確認し、真度、精度について妥当性評価を実施した。妥当性評価の性能パラメータは、真度、精度(n=3、1濃度、3日間)とした。

結果と考察

1 血液量少量化によるPCB分析への影響

2020年度に実施した血液量5.0 gおよび2.0 gを用いた添加回収試験の結果は、それぞれ89.5%、88.0%であり、血液量2.0 gにおいても5.0 gと同等の回収率が得られた(表2)。クロマトグラムについても同様のピーク形状を示した。2021年度の回収率は血液量5.0 gは87.9%、2.0 gは86.7%であった。しかしながら、血液量2.0 g測定時に妨害ピークが検出されることがあり、今後血液量2.0 gの実用化に向けてさらなる検証が必要である。

2 従来法と一体型ミニカラム法の各ピークの添加回収率への影響比較

一体型ミニカラム法の各ピーク形状は従来法と同様のピーク形状を示した(図2)。各ピークの回収率についてもほぼ同等の回収率が得られた。各ピークの平均値(n=3)は、従来法は86.4%、一体型ミニカラム法は90.6%であり一体型ミニカラム法は従来法と比較し同等以上であった(表3)。

また、クロマトグラムによるパターン判定等に使用するピークNo.15、No.16、No.20、No.21(図2 1. PCB標準液のクロマトグラム参照)の一体型ミニカラム法の真度、精度は医薬品開発のガイドラインの目標値³⁾(真度:理論値の±15%以内、精度:目標値:±15%以下)を満たした(表4)。

表3 前処理の精製法の違いによる各ピークの添加回収率の影響比較

ピークNo.	従来法					一体型ミニカラム法				
	回収率(%) (n=3)					回収率(%) (n=3)				
	1回目	2回目	3回目	平均%	RSD%	1回目	2回目	3回目	平均%	RSD%
No.15	80.6	83.2	83.6	82.5	2.0	88.8	91.0	88.4	89.4	1.6
No.16	78.3	83.8	85.0	82.4	4.3	83.5	88.8	88.1	86.8	3.4
No.17	76.1	86.5	87.1	83.2	7.4	82.4	94.4	86.0	87.6	7.0
No.18	80.3	83.5	85.1	83.0	2.9	84.8	90.8	88.1	87.9	3.4
No.19	77.9	84.5	86.3	82.9	5.3	85.3	92.0	88.2	88.5	3.8
No.20	85.7	86.5	84.8	85.7	1.0	86.3	89.7	89.1	88.4	2.0
No.21	81.8	87.5	90.9	86.7	5.3	85.8	90.1	90.0	88.6	2.8
No.22	94.0	94.1	83.9	90.7	6.5	98.3	104.5	92.0	98.2	6.4
No.23	80.3	91.1	96.9	89.4	9.4	93.8	107.4	87.5	96.2	10.5
No.24	93.7	93.2	82.1	89.7	7.3	94.0	84.5	78.9	85.8	8.9
No.25	87.4	95.6	98.3	93.8	6.1	100.5	99.4	97.5	99.1	1.5
総ピーク平均値	83.3	88.1	87.6	86.4	3.1	89.4	93.9	88.5	90.6	3.1

表4 妥当性評価試験結果

	従来法			ミニカラム精製法			評価
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	
No.15	82.5	4.4	4.1	89.4	1.2	1.9	
No.16	82.4	5.2	6.1	86.8	1.8	3.7	
No.20	85.7	6.0	5.0	88.4	2.9	3.1	
No.21	86.7	4.8	6.6	88.6	2.8	3.6	
総ピークの平均値	86.4	4.1	4.6	90.6	1.5	3.4	

まとめ

血液少量化によるPCB濃度測定については、妨害ピークの解消と実検体による検証が必要である。また、前処理法の妥当性評価試験の結果、一体型ミニカラム法は従来法と同等の性能を示し、代替の精製法として実用化できる可能性が示唆された。今後、実検体による検討を蓄積してさらなる検証を実施していきたい。

参考文献

- 1) 山之内公子: 油症研究II-治療と研究の最前線-長崎県における油症患者の血液中PCB/PCQ濃度の測定, pp.40-45, 九州大学出版会, 福岡(2010).
- 2) 鶴川昌弘, 他: PCBの数値化方法に関する研究, 食衛誌, 14, 415 (1973).
- 3) 薬食審査発0711第1号「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」について(2013年7月11日).

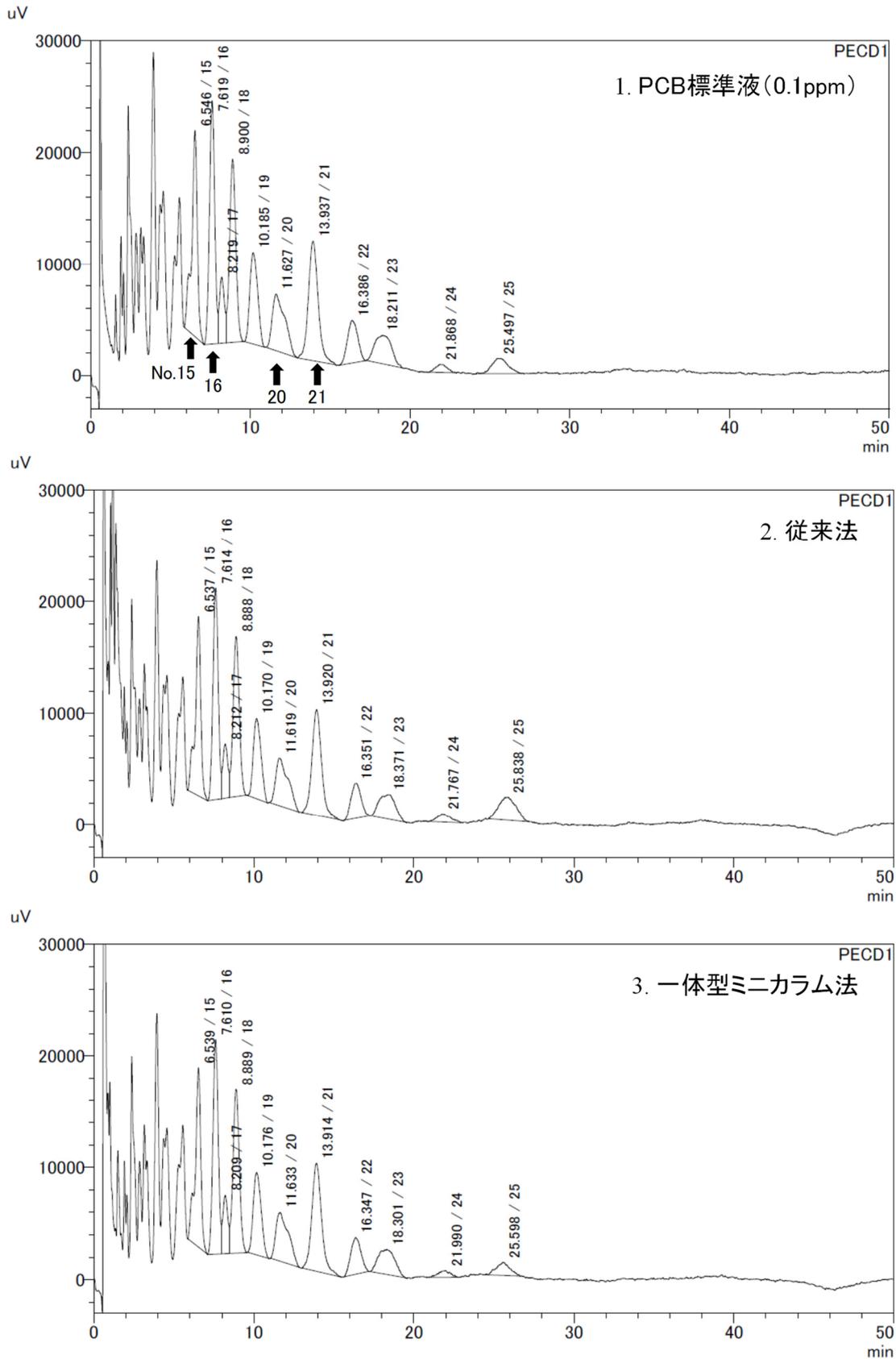


図2 精製法の違いによるクロマトグラムの比較
 1. PCB標準液(0.1 ppm)、2. 従来法、3. 一体型ミニカラム法

繊維製品中のホルムアルデヒドの検査結果(2021年度)

山口 恵里果, 谷口 香織, 辻村 和也

Survey Report of Formaldehyde in Textile Goods (2021)

Erika YAMAGUCHI, Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: ホルムアルデヒド、繊維製品

Key words: formaldehyde, textile goods

はじめに

例年、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づき県内の各地域において販売されている衣料品等の検査を行なっている。2021年度は対馬地区において販売されている衣料品等に含まれるホルムアルデヒドの検査を実施したので報告する。

調査方法

1 検体及び試薬

24月以内の乳幼児用の衣料品 15 検体、24月を超えるもの 5 検体の検査を行なった(表 1)。

ホルムアルデヒド標準品は関東化学株式会社製、アセチルアセトン(2,4-ペンタンジオン)は富士フィルム和光純薬株式会社製のものを使用した。

分光光度計は日本分光株式会社製 V-730 を用いた。

表 1 検体一覧

	検体数
24月以内のもの	15 検体
中衣	4
下着	4
よだれ掛け	2
くつした	2
手袋	2
寝衣	1
24月を超えるもの	5 検体
下着	4
くつした	1
合計	20 検体

2 分析方法

試験は、「有害物質を含有する家庭用品の規制に

関する法律」に規定する方法に準じて行なった。

身体と接触する部分を細かく切り、24月以内のものは 2.50 g を正確に、それ以外のは約 1 g を精密に量りとり、精製水 100 mL を正確に加えて 40°C で 1 時間抽出を行なった。これをガラスろ過器 G2 によりろ過し、試験溶液とした。この試験溶液の波長 412 nm^{*1} におけるホルムアルデヒドによる吸光度^{*2}A-Ao を、分光光度計を用いて測定した。

*1: 事前に、ホルムアルデヒド 0.4 ppm 標準溶液の吸光度を、波長 412、413、414、415 nm で各 3 回測定し、平均値が最も大きかった 412 nm を測定波長として採用した。

*2: ホルムアルデヒドによる吸光度 A-Ao について、吸光度 A とは、試験溶液 5 mL に対してアセチルアセトン試薬 5 mL を加え、40°C で 30 分加熱後、30 分室温にて放置した溶液の吸光度から、対照として試験溶液の代わりに精製水を用いた同様の操作により得られた溶液の吸光度を引くことで求められる値である。吸光度 Ao とは、吸光度 A におけるアセチルアセトン試薬の代わりに酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 5 mL を用いた操作により得られた溶液の吸光度である。ホルムアルデヒドによる吸光度 A-Ao について、吸光度 A とは、試験溶液とアセチルアセトン試薬の反応により生じる吸光度であり、吸光度 Ao とは、吸光度 A の対照としてアセチルアセトン試薬の代わりに酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液を用いた溶液の吸光度である。操作方法は、現行「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則」に従った。

検査結果

表 1 に示した全ての検体は基準値以下であり、ホル

ムアルデヒドは検出されなかった。

(家庭用品中のホルムアルデヒド基準値)

(1) 24 月以内の乳幼児用のもの

A-A₀ の値が 0.05 以下又は下式により計算する
試料 1 g についてのホルムアルデヒド溶出量が 16
μg 以下でなければならない。

(2) 24 月を超えるもの

下式により計算する試料 1 g についてのホルムアル
デヒド溶出量は 75 μg 以下でなければならない。

ホルムアルデヒド溶出量(μg)

= C (μg/ml) × (A-A₀) / A_s × 100 × 1 / 試料採取量(g)

C: ホルムアルデヒド標準液の濃度

A_s: ホルムアルデヒド標準液の吸光度

参 考 文 献

- 1) 厚生省令第 34 号:「有害物質を含有する家庭用品の
規制に関する法律施行規則」.(1974 年 9 月 26 日).
- 2) 厚生労働省令第 124 号:「有害物質を含有する家
庭用品の規制に関する法律施行規則の一部を改
正する省令」 (2015 年 7 月 9 日).

健康食品中の強壯用無承認無許可医薬品の検査結果(2021 年度)

松尾 広伸, 辻村 和也

Survey Report of Pharmaceuticals Illegally Added to Dietary Supplements for the Enhancement of Sexual Performance (2021)

Hironobu MATSUO and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: 無承認無許可医薬品, 強壯効果, 健康食品, LC-QTOF/MS

Key words: Illegal Pharmaceuticals, Enhancement of Sexual Performance, Dietary Supplements, LC-QTOF/MS

はじめに

近年、強壯効果を標榜している健康食品に無承認無許可医薬品が含まれている事例が相次いで報告されている¹⁾。このため、これら無承認無許可医薬品による健康被害を未然に防ぐため、2003年度より県内で販売されている「いわゆる健康食品」(以下、健康食品)の医薬品成分検査を実施している。2021年度の健康食品の強壯系成分の検査結果について報告する。

調査方法

1 検体

2021年度は、県内雑貨量販店で販売されている無承認無許可医薬品にあたる強壯系成分の混入の可能性がある物品5製品6検体(液剤 5、錠剤 1)を購入し検体とした。1製品は液剤および錠剤が同梱されており、これらは別検体とした。

2 検査対象物質

強壯用医薬品であるシルденаフィル、ホンデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ヨヒンビン、リドカインの6種類をターゲット検査対象物質とした。

また、既知情報から整理した強壯系成分 58 成分をスクリーニング検査の対象物質とした。

3 試薬

シルденаフィル、ホンデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ヨヒンビン、リドカイン標準品は 10 mg をメタノールに溶解して 10 mL とし、標準原液(1000 ppm)とした。さらに各標準原液をアセトニトリル-メタノール(1:1)で希釈して、混合標準溶液を調製した。

前処理及び標準溶液調製及び移動相に用いたア

セトニトリルは LC/MS 用を用いた。その他のメタノールは関東化学株式会社製の LC/MS 用、超純水及びギ酸は富士フィルム和光純薬株式会社製の LC/MS 用を用いた。

4 分析装置及び条件

高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS-DAD)として、ウォータース株式会社製 Waters ACQUITY UPLC I-CLASS / Xevo G2-XS QTOF を使用した。分析カラムはウォータース株式会社製 Waters UPLC HSS C₁₈(2.1 mm i.d. × 100 mm、粒子径 1.8 μm)を用いた。カラム温度は 45°C とし、移動相には 3 mM ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.9)(A 液)及び 0.1% ギ酸-アセトニトリル(B 液)を表 1 に示すグラジエント溶離条件で用いた。また、流速は 0.3 mL/min とし、試料の注入量は 1 μL とした²⁾。

表 1 グラジエント溶離条件

Time, min	A 液, %	B 液, %
0 - 2.1	80	20
6.5	60	40
9.5 - 11.0	40	60
11.3 - 12.8	5	95
13.0	80	20
15.0	80	20

また、QTOF/MS 分析は、Scan 範囲: m/z: 50-1000、測定モードは、MS^E(Resolution)、Cone Energy を 40 V とした。また、Collision Energy は、Low (0 V)、High (Ramp: 15-40 V)とした。

ターゲット検査対象物質の名称、組成式及び精密

質量数を表 2 に示す。

表 2 ターゲット検査対象物質

物質名	組成式	精密質量数
シルデナフィル	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	474.2049
ホンデナフィル	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	466.2692
タダラフィル	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	389.1376
バルデナフィル	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	488.2206
ヨヒンビン	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.1943
リドカイン	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	234.1732

5 分析検体の前処理

錠剤は乳鉢で粉末にした。液剤及び錠剤検体は、約 0.2 g を採取し、アセトニトリル-メタノール(1:1) 10 mL を加えて 1 分間攪拌した後、10 分間超音波抽出した。これらを 3000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清 2 mL を分取し、アセトニトリル - メタノール(1:1) で 10 mL に定容した。その溶液を 0.2 μm 遠心式フィルターユニットでろ過し、試験溶液とした。

検査結果

今回調査した健康食品からは全ての検体においてターゲット検査対象物質は未検出だった(表 3)。また、ターゲット検査対象物質以外の強壮系成分(58 成分)についても精密質量数によるターゲットスクリーニング検査で含有が疑われる検体は無かった。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局監視指導課・麻薬対策課 報道発表資料:平成 23 年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について。(2012 年 6 月 22 日).
- 2) Waters Application Note:「UPLC/MS/MS for the Screening, Confirmation, and Quantification of Drugs Illegally Added to Herbal/Dietary Supplements for the Enhancement of Male Sexual Performance」, (2012).

表 3 健康食品中強壮用無承認無許可医薬品検査結果(2020)

検査項目		強壮成分検出数/検体数	備考	
ターゲット検査対象物質	シルデナフィル	0/6	液剤	5 検体(5 製品)
	ホンデナフィル	0/6		
	タダラフィル	0/6		
	バルデナフィル	0/6		
	ヨヒンビン	0/6		
	リドカイン	0/6		
スクリーニング対象物質	以外の既報強壮系成分	0/6	錠剤	1 検体(1 製品)

指定薬物の検査結果(2021 年度)

吉村 裕紀, 辻村 和也

Survey Report of Designated Substances Controlled by the Pharmaceuticals and Medical Devices Act, for Luxury Goods (2021)

Hiroki YOSHIMURA and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: 指定薬物, 医薬品医療機器等法, LC-QTOF/MS, GC-MS

Key words: Designated Substances, PMD Act, LC-QTOF/MS, GC-MS

はじめに

近年、危険ドラッグの乱用による事件事故が大きな社会問題となっている。危険ドラッグ中の成分は主に「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律(医薬品医療機器等法)」で指定薬物として規制される成分であり、その危険性は麻薬や覚醒剤をしのぐものもある。現在 2,300 成分を超える化学物質が指定薬物とされている。国は、包括指定制度導入、認定手続きの簡素化、単純所持禁止等の対応を行い、規制の強化及び迅速化に取り組んでいる。

長崎県でも 2014 年度より危険ドラッグ及びその含有が疑われる嗜好品等を買上し、指定薬物の混入検査を開始した。本年度は、指定薬物成分の混入の可能性があるリキッド、固形剤、クリームおよびジェルについて検査を実施した。その結果について報告する。

調査方法

1 検体

指定薬物成分の混入の可能性のある物品としてリキッド 6 製品、固形剤 2 製品、クリーム 1 製品およびジェル 1 製品をインターネット通販で購入し、計 10 製品を検体とした。

2 前処理

検体 25 mg(クリーム製品にあつては 50 mg)をマイクロチューブに量り取り、メタノール 1 mL を加え、ボルテックス攪拌 30 秒及び 5 分間超音波照射(クリーム製品にあつては 60 °C で 5 分間加温後、50 °C で 10 分間超音波照射)による抽出後、0.2 μm 遠心式フィルターユニット(メルクミリポア)でろ過し、試験溶液とした。試験溶液は、必要に応じ適宜メタノールで希釈した。

3 分析装置

(1) ガスクロマトグラフ - 質量分析装置 (GC-MS)
アジレントテクノロジー株式会社製 7890A/5975C GC/MSD を使用した。

(2) 高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS-DAD)
ウォータース株式会社製 Waters ACQUITY UPLC I-CLASS / Xevo G2-XS QTOF を使用した。

4 分析条件

指定薬物の GC-MS 分析条件は、「指定薬物の分析法について」(2007 年 5 月 21 日付け薬食監麻発第 0521002 号監視指導・麻薬対策課通知)に準じて行った。また、LC-MS 分析条件は、平成 27 年度指定薬物分析研究会議の資料を参考にした。GC-MS 条件(表 1)及び LC-QTOF/MS-DAD 条件(表 2)に示す。

5 スクリーニング検査

GC-MS スキャン分析で取得したデータを対象に、AMDIS プログラム(NIST)を用い、Deconvolution 処理を行った。処理されたピークについて、当センターで作成した「指定薬物 GC-MS ライブラリー」、国衛研「違法ドラッグ閲覧データシステム」、「SWGDRUG Mass Spectral Library」及び「Cayman Spectral Library」を用い、各検体に含まれる指定薬物及び類似体のスクリーニングを行った。

LC-QTOF/MS スキャン分析(MS^E モード)では、取得したデータを対象に当センターで作成した「指定薬物精密質量数データベース」を用いた検索を行った。

表 1 GC-MS 分析条件

【条件 1】	【条件 2】(合成大麻ノイド用)
カラム: HP-1MS (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 製)	カラム: HP-1MS (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 製)
キャリアーガス: He, 0.7 mL/min	キャリアーガス: He, 1.1 mL/min
(リテンションタイムロッキング): MDPPP: 27.8 min)	(リテンションタイムロッキング): MDPPP: 4.96 min)
注入口温度: 200°C、スプリットス	注入口温度: 250°C、スプリットス
検出器温度: 280°C	検出器温度: 280°C
イオン化法: EI	イオン化法: EI
カラム温度: 80°C (1 min) -5°C/min-190°C (15 min) -10°C/min -310°C (10 min)	カラム温度: 200°C (1 min) -5°C/min-310°C (7 min)
スキャン: m/z: 40-550	スキャン: m/z: 40-550

表 2 LC-QTOF/MS-DAD 分析条件

【条件 1】	【条件 2】(合成大麻ノイド用)
カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm, Waters 製)	カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm, Waters 製)
ガードカラム: Van Guard column (2.1 mm×5 mm, 1.8 μm, Waters 製)	ガードカラム: Van Guard column (2.1 mm×5 mm, 1.8 μm, Waters 製)
移動相 A: 0.1% ギ酸	移動相 A: 0.1% ギ酸
移動相 B: 0.1% ギ酸アセトリル	移動相 B: 0.1% ギ酸アセトリル
グラジエント条件: A(%)/B(%) = 95/5(0 min) -80/20(20 min) -20/80(30 min, 10 min hold)	グラジエント条件: A(%)/B(%) = 65/35(4 min fold) -35/65 to 25/75 (4-16 min)-10/90(16-17 min, 6 min hold)
流速: 0.3 mL/min	流速: 0.3 mL/min
カラム温度: 約 40°C	カラム温度: 約 40°C
イオン化法: ESI	イオン化法: ESI
DAD スキャン範囲: 210-450 nm	DAD スキャン範囲: 210-450 nm
MS スキャン: m/z 100-800	MS スキャン: m/z 100-1000

検査結果

2021 年度指定薬物の検査において、医薬品医療機器等法第 2 条第 15 項に規定する指定薬物を含有する製品は確認されなかった。

参考文献

- 1) 薬食監麻発 0521002 号 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知:「指定薬物の分析法について」(2007 年 5 月 21 日)。

- 2) 野澤真里奈他; 違法ドラッグ試買検査の実施について (2011), 京都府保環研年報 57, 56 ~ 63 (2012)
- 3) 高橋市長, 他; 千葉県における違法ドラッグ試験検査について(平成 21 年度), 千葉県衛生研究所年報 58, 51 ~ 54 (2009).
- 4) 武田章弘, 他; 平成 23・24 年度の違法ドラッグ買上調査について. 大阪府立公衛研所報 51, 23 ~ 27 (2013)
- 5) 内山菜穂子; 平成 27 年度指定薬物分析研究会議資料「危険ドラッグ製品の分析及び成分の同定について」(2015).

食品中のアレルゲン検査結果(2021年度)

松尾 広伸, 松永 尚子, 辻村 和也

Survey Report of Allergen in Food (2021)

Hironobu MATSUO, Naoko MATSUNAGA and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: アレルゲン(特定原材料)、そば、酵素免疫測定法

Key words: allergen, buckwheat, ELISA method

はじめに

アレルゲン(特定原材料)を含有する食品は、食物アレルギーによる健康被害を防止する目的で、2001年4月に特定原材料の表示が義務づけられ、2002年4月から本格的に施行された。特定原材料の検査法については、2002年11月の厚生労働省通知により、定量検査法(ELISA法)および確認検査法(PCR法・ウエスタンブロット法)が定められた¹⁾。

当センターでは、2007年度から本格的にアレルゲンの検査を開始している。2021年度は、「小麦」の検査を行ったので報告する。

調査方法

1 試料

県内に流通する加工食品のうち、「小麦」の使用、または混入が疑われるもので、使用原材料表示に「小麦」が記載されていないもの7製品12検体とした(検体内訳: 県南保健所(3)・県北保健所(5)・対馬保健所(3))。1製品中に複数種類の食品が同梱されている場合は、別検体として整理した。

2 試薬

1) 定量検査法(ELISA法)

株式会社森永生化学研究所製モリナガ FASPEK エライザ 小麦および日本ハム株式会社中央研究所製 FASTKIT エライザ Ver. 小麦を使用した。

2) 確認検査法(PCR法)

DNA抽出には、QIAGEN社製 DNeasy Plant mini kit および QIAGEN社製 Genomic Tip 20/Gを使用した。植物DNA検出用プライマー対および小麦DNA検出用プライマー対はサーモフィッシャーサイエンティフィック社で合成したものを使用し、PCR緩衝液、dNTP、MgCl₂、Taqポリメラーゼは Applied

Biosystems社製を使用した。電気泳動用時に用いる100 bp DNA Ladder、Loading buffer はタカラバイオ社製、エチジウムブロマイドは Invitrogen 社製、アガロース、TE緩衝液、TAE緩衝液は(株)日本ジーン製を使用した。

3 機器

フードカッター: レッチェ社製 GM200, 恒温振とう機: 東京理科器機株式会社製 MMS-3011, 冷却遠心機: クボタ商事株式会社製 3740, マイクロプレートリーダー: バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社製 iMark, プレートウォッシャー: バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社製 ImunoWash 1575 を用いた。

4 検査方法

2014年3月26日消食表第36号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査法について」の一部改正について²⁾に準じて検査を行った。

規格基準

特定原材料等由来のタンパク質含量が、10 μg/g未滿でなければならない。

検査結果

2種類のELISA法による定量検査の結果、5検体から10 μg/gを超える小麦由来のタンパク質を検出した(表1)。そこでPCR法による確認検査を行ったところ、4検体から小麦に特異的な増幅遺伝子バンドを検出した(表1)。

今回の検査において、4検体の表示違反(疑)製品の市場への流通が確認された。今後も表示違反食品の排除および表示適正化を行う目的で、県内に流通する食品中のアレルゲンの検査が必要と考え

られる。

(2002年11月6日).

参 考 文 献

1) 第 0513003 号 厚生労働省通知食案基発:「アレルギー物質を含む食品の検査法について」,

2) 消食表第 36 号 消費者庁次長通知:「アレルギー物質を含む食品の検査法について」の一部改正について, (2014年3月26日)

表 1. 小麦由来タンパク質が検出された検体の検査結果

検体	小麦表示	定量検査 (ELISA法)		確認検査 (PCR法)
		FASPEK	FASTKIT	
果皮加工製品	なし	陰性	19 $\mu\text{g/g}$	陰性
生菓子①	なし	13 $\mu\text{g/g}$	>20 $\mu\text{g/g}$	陽性
生菓子②	なし	13 $\mu\text{g/g}$	>20 $\mu\text{g/g}$	陽性
生菓子③	なし	>20 $\mu\text{g/g}$	>20 $\mu\text{g/g}$	陽性
生菓子④	なし	18 $\mu\text{g/g}$	>20 $\mu\text{g/g}$	陽性

長崎県における医薬品等公的試験検査体制について

松永 尚子, 吉村 裕紀, 松尾 広伸, 山口 恵里果, 谷口 香織, 辻村 和也

System of Analytical Testing of Pharmaceutical Products in Nagasaki

Naoko MATSUNAGA, Hiroki YOSHIMURA, Hironobu MATSUO, Erika YAMAGUCHI,
Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: 医薬品、公的認定試験検査機関、PIC/S

Key words: pharmaceutical products, Official Medicines Control Laboratories, PIC/S (Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme)

はじめに

当センターでは、県内で製造・流通する医薬品等の品質を確保するため、長崎県薬務行政室が収去した医薬品等について製造販売承認書等（以下、承認書等）の規格及び試験方法により、医薬品医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保に関する法律（医薬品医療機器法）に基づく試験検査を実施している。医薬品流通の国際的な広がりに伴い国際調和された品質基準や品質システムが必須となり、2012年、日本はGMP査察の国際協調組織であるPIC/S（医薬品査察協定及び医薬品査察協同スキーム）の加盟申請を行った。厚生労働省は、PIC/S加盟申請にあたり、GMP調査体制の整備、国際基準を満たした公的認定試験検査機関の品質システム等の構築のため、「GMP調査要領の制定について」（2012年2月16日付薬食監麻発第0216第7号）¹⁾を発出した。当センターは、当該通知の別添2の公的試験検査機関としての要件である「品質管理監督システム」を整備・構築した上で、2013年8月に委託者である長崎県薬務行政室（調査当局）の確認を受け、医薬品等の試験検査を実施する公的認定試験検査機関として認定された。

本報告では、当センターにおける医薬品検査等の試験検査体制とその信頼性保証業務について報告する。

組織・体制

1 公的認定試験検査機関としての組織体制

当センターの公的認定試験検査機関の品質方針として、「公的試験検査機関として、確かな技術力の維持と時流に即応した試験検査体制の整備に努め、危機管理を伴う緊急時においても、関係機関と連携して試験検査業務を効率的、効果的に実施する。試験検査の結果並びに情報を迅速かつ的確に業務所管課に提供し、行政施策を科学的・技術的側面より支援する。」とし、継続して適切であるよう定期的にレビューしている。組織体制は、センター所長を公的試験検査機関の長とし、試験検査部門及び信頼性保証部門の他、必要な組織体制を図1のとおり定めている。試験検査部門は、試験検査業務全般を担当し、信頼性保証部門は、試験検査データの信頼性を確保するため試験検査部門とは独立し、品質管理監督システムの遵守・維持に対する責任を負う。

2 文書規定の整備

当センターの医薬品等の試験検査業務について、薬生監麻発0728第5号²⁾で示された品質管理監督システムに基づき図2の文書体系で定めている。「品質マニュアル」を最上位の文書とし、その下位に一連の試験検査業務にかかわる手順書等を位置づけし、さらにその下位に検体毎の手順書とその記録としている。手順書等として、「試験検査の委受託に関する取り決め事項」、「検体の受け入れに関する手順」等13項目の文書を整備している。

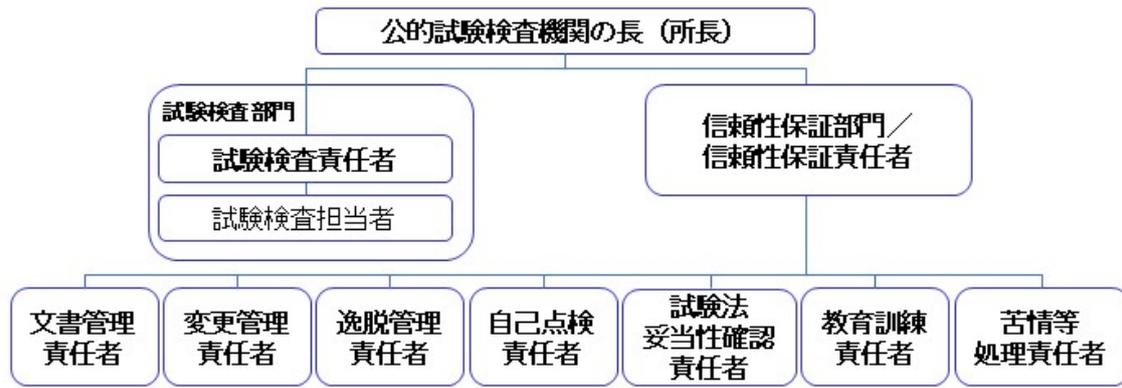


図1 当センターの公的認定試験検査機関の組織体制図

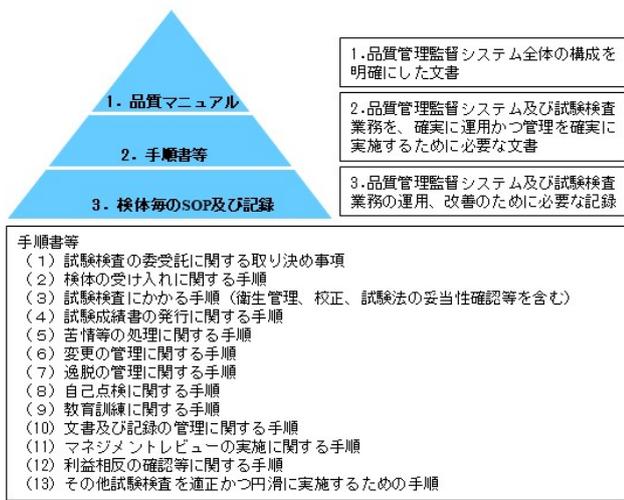


図2 当センターの品質管理監督システムの文書体系

3 取り決め

2013年8月に委託者と検体等の試験検査の受託に関し、検体の採取、搬送・受渡方法、認定要件の充足、調査当局による認定要件の確認、公的認定試験検査機関に対する改善指示、公的認定試験検査機関における文書の保存等について取り決め書を交わした。毎年、この取り決め書に基づき認定要件を満たしているかの確認調査を受けている。調査の結果、是正措置が必要な場合は、改善指示書を受領し、改善した上で改善報告書を調査当局に提出する必要がある。

試験検査業務

1 検体の受け入れ・管理

当センターの試験検査の検体は、委託者から依頼による医薬品と外部精度管理試験等によるものがある。検体を受け入れた際は、依頼書に記載された検体の名称及び検体番号、送付年月日及び依頼書番号、製造番号及び製造販売者氏名、数量、試験検査項目、試験検査委託者名を確認する。委託

者からの依頼書の写しに確認事項を記載し検体等管理簿を作成し、検体は温湿度管理された試験室内に保管する。

2 試験検査

試験検査責任者は、試験検査の実施にあたり委託者との事前協議により検体の搬入時期等について年間計画等を策定し、計画的かつ適切に実施する。

1) 試験検査方法

全ての試験検査において、検体毎あるいは試験検査項目毎に試験検査手順書(以下、手順書)を定める。その際の試験検査方法として、日本薬局方等の各条の試験方法、当該品目の承認書等の規格及び試験方法に基づく方法を、妥当性を確認した上で適用する。試験の実施においては、日本薬局方の通則、一般試験法等を必要に応じて参照し、試験検査を実施する。

妥当性確認試験は、日本薬局方参考情報「分析法バリデーション」³⁾に準じ、検体の種類及びその入手量を勘案して、可能な範囲で実施する。また、妥当性確認試験は 試験検査を新たに開始する場合、承認書の試験方法と異なる場合、試験検査手順が大きな変更があった場合に実施し、定期的に試験方法の妥当性を確認することとしている。

2) 試験検査の実施及び記録

全ての試験検査は、検体毎あるいは試験検査項目毎に定められた手順書に基づいて実施する。

試験検査担当者は、試験検査責任者が発行したワークシートに検体毎あるいは試験検査項目毎に試験結果、検体採取量、使用試薬及び調製試液等、試験操作、試験データ及び計算記録等の必要事項について記録を作成し、試験検査責任者の確認を得る。

規格に適合しない試験検査結果を得た場合に

は、別に定める「規格外試験検査結果(OOS)の処置に関する手順」に基づき、その原因を調査し、記録する。試験手順からの逸脱が発生した場合は、別に定める「逸脱の管理に関する手順」に基づき、必要な措置を行い、記録する。

3) 試薬・試液及び培地、標準品等の管理

試薬・試液管理担当者は、全ての試薬・試液及び培地に、管理番号を付与し、管理台帳に購入・調製日、使用、廃棄の履歴を記録し、管理し、廃棄後は、試験検査責任者の確認を得る。試薬・試液管理担当者は、各試薬・試液及び培地の容器に、名称、管理番号、入手日(製造日)、使用期限及び保管場所等をラベル表示する。開封後の使用期限は、未開封時の使用期限よりも短い期間とし記載する。

4) 試験検査設備(機器)及び器具

当センターの試験検査設備として、高速液体クロマトグラフ、pH計、化学はかり、分銅、遠心分離機、振とう機がある。

試験検査責任者は、試験検査設備及び器具を統括的に管理し、機器管理担当者を指定し、各機器の管理標準作業書に従い担当機器の定期点検(外部委託による点検・校正を含む)、異常時対応等に係る管理業務を担当させる。機器管理担当者は点検の実施結果について、記録を行い試験検査責任者の確認及び信頼性保証責任者の承認を得る。各機器は公的試験検査機器であること、名称、管理番号、点検日、次回点検予定日を明示したラベルを表示する。

3 試験検査の成績書の発行

試験検査担当者は試験実施後、速やかに試験結果表を作成する。試験検査責任者は、生データ、ワークシートと照合し検査結果を評価し、記載内容について確認、記録後、試験検査担当者に試験検査成績書を作成させる。信頼性保証責任者は、検査結果及び試験検査成績書について照査し、試験検査成績書の発行の承認を行う。

試験検査成績書は、公的認定試験検査機関の長(所長)による承認後、委託者に発行する。

信頼性保証業務

1 変更の管理

公的試験検査に係る施設、設備、試験方法、手順書類、記録様式に関して変更する場合は、変更管理責任者は試験検査結果への影響についてランク付け及び妥当性確認の必要性の有無を判断し、

妥当性確認の必要性がある場合は「妥当性確認」の評価を実施した上で変更を行い、信頼性保証責任者の承認を得る。信頼性保証責任者は変更内容について必要に応じて教育訓練を実施させる。変更管理責任者はこれらの「変更管理記録」及び「妥当性確認記録」として、保管・管理する。

2 逸脱の管理

試験手順等や試験検査データの規格からの逸脱が生じた場合においては、逸脱の内容を記録し、重大な逸脱が生じた場合においては、逸脱による試験検査データへの影響を評価し、所要の措置を執る。評価の結果及び措置について記録を作成し、保管するとともに、信頼性保証業務を担当する組織に対して文書により報告を行い、報告後の評価の結果及び措置について、信頼性保証業務を担当する組織の確認を受けることとしている。

3 苦情等の処理に関する手順

公的試験業務及び発行した試験検査成績書に関する委託者からの苦情等の対応に適用し、苦情等にかかる事項の原因を究明し、改善が必要な場合は改善措置を講ずること、苦情等の内容、原因究明の結果及び改善措置を記載した記録を作成し、保管するとともに、信頼性保証業務を担当する組織に対して文書により速やかに報告し、確認を得る。

4 自己点検

公的認定試験検査機関の試験検査業務全般について品質システムの要件及び手順書等を遵守しているか年に1回自己点検を実施し、自己点検の結果の記録を作成し、これを保管する。

5 教育訓練

信頼性保証や試験検査業務に従事する職員に対して、年度当初に必要な教育訓練の計画を立案し、計画に基づき実施する。対象者は研修記録を作成し、これを保管する。

6 文書及び記録の管理

文書を作成、又は改訂する場合においては、手順書等に基づき、承認、配布、保管等を行う。

手順書等を作成、又は改訂するときは、当該手順書等の日付を記載するとともに、それ以前の改訂に係る履歴を保管し、文書及び記録は、取り決めに従い保管する。

7 マネジメントレビュー

公的認定試験検査機関の長(所長)は、手順書等に基づき、原則年1回マネジメントレビューを実施し、品質管理監督システムが維持されていることを確認

し、生じた問題に対して、改善を図らなければならない。信頼性保証責任者は、各責任者に前回のマネジメントレビューでの指示事項の実施状況、品質方針の見直し、公的試験検査における報告書発行期間の遵守状況、自己点検での指摘事項の改善状況、公的試験検査に係る改善提案について検証し、所長及び各部門責任者に報告する。このマネジメントレビューは、センターが発行する組織、業務等の概要を記した年報等と自己点検をもって代替措置とすることができる。

8 利益相反の確認等

試験検査データの信頼性を確保するために、職員等は、公的試験検査機関に規定されている倫理規定等を遵守し、利益相反に該当していないか原則毎年度ごとに利益相反自己申告書により宣誓し所長に提出する必要がある。

9 監督

公的認定試験検査機関である当センターは、委託者(当局)との取り決めで、毎年度、当局により要件に適合していることの確認を受けなければならない。

業務の現状

1 試験検査方法と妥当性確認

当センターでは、当局が収去した県内流通医薬品の試験検査について、GMP調査要領²⁾に示された公的認定試験検査機関の要件の一つとして、医薬品の試験方法の「妥当性確認」について手順書に明記し医薬品検査結果の信頼性を確保することが求められている。「妥当性確認」は、試験方法が確立している「製造業者」とは異なる試験環境である当センターにおいても試験検査を実施し結果が信頼できるものであることを確認するためのものであり、承認書等に規定された試験方法についてもその実施が求められる。2018年度及び2020年度、試験検査のための承認書等及び局方参考情報³⁾収載の「分析法バリデーション」に準じた「規格及び試験方法」について妥当性確認試験を実施した。

今後の課題として、新規医薬品の試験検査を効率的かつ試験の信頼性向上を目的とした「妥当性確認」の手順の明確化を図るため簡略化した最低限のバリデーション試験法について検討を図る必要がある。

2 自己点検

年に1回、内部点検を実施している。これまでの主

な指摘事項として機器の標準作業書や記録の不備、記載もれ等があり、これら指摘事項については手順書改訂等、是正措置を実施し信頼性保証責任者へ報告している。

3 外部監査

年に1回、調査当局より確認調査を受けている。これまで文書による改善措置はないが、標準品の受入時の重量確認、試験検査室の適切な温湿度確認と記録、分析機器における電子記録のセキュリティのための定期的なパスワード更新等の推奨があり、これらの事項については手順書改訂を行う等の改訂措置を行った。

また、2018年度に独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)によるGMP調査体制及び調査方法についての査察があり、試験検査機器の使用記録の不備 重大な変更を行った場合の手順の不備 教育訓練の不備 マネジメントレビューの代替措置の場合の評価内容の乖離について指摘事項があり、手順書改訂を行う等の対応措置を行った。

4 マネジメントレビュー

品質方針等について、自己点検での指摘事項に対する改善実施、センターが発行する組織、業務等の概要を記した年報を実施した。

5 外部精度管理

2021年度、厚生労働省が登録検査機関に対して実施している外部精度管理に参加している。

まとめ

当センターは、2013年8月より医薬品の試験検査は公的認定試験検査機関として品質管理監督システムに基づいて実施している。今後も定期的な組織責任体制の整備、自己点検、所内・所外研修会等の教育訓練、マネジメントレビュー、当局による確認調査を通して定期的に見直しを図り、よりよい品質管理監督システムとなるよう医薬品検査の信頼性確保に努めたい。

参考文献

- 1) 薬食監麻発0216第7号 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知:「GMP調査要領の制定について」(2012年2月16日)。
- 2) 薬生監麻発0728第5号 厚生労働省医薬・生活衛生局監視指導・麻薬対策課長通知:「GMP調査要領の制定について」(2021年7月28日)。

- 3) 厚生労働省告示第220号 第十八改正日本薬局方(2021年6月7日).

健康危機事案を想定した模擬訓練結果(2021年度)

松永 尚子, 吉村 裕紀, 松尾 広伸, 山口 恵里果, 谷口 香織, 辻村 和也

Training Results of Assuming Food Poisoning Outbreak (2021)

Naoko MATSUNAGA, Hiroki YOSHIMURA, Hironobu MATSUO, Erika YAMAGUCHI,
Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード:健康危機管理、食中毒、テトラミン、TLC、LC-MS/MS

Key words: health crisis management, food poisoning, tetramine, TLC, LC-MS/MS

はじめに

近年の健康危機は、健康食品事件や残留農薬の含まれた食品の流通、生物毒など多様で高度な対応を要するものに変容してきている。このような健康危機事案に的確に対応するため、地方衛生研究所の位置づけについては「地域保健対策の推進に関する基本的な指針(1994年12月1日厚生省告示第374号)」の中で、「地方衛生研究所は、地域における健康危機管理の科学的・技術的中核となる機関として機能の充実強化を図ること、他地方衛生研究所等の関係機関と連携体制の構築を図ること」とされている。

こうした状況を踏まえて、地方衛生研究所全国協議会九州支部(以下、九地研と略)では、2006年2月に「九州ブロック地方衛生研究所広域連携マニュアル」を策定し、情報の共有、試験検査・技術研修の相互支援等広域連携を行い、地域保健総合推進事業の一環として九地研会員で毎年原因不明の健康危機事案を想定した毒性物質の定性・定量検査の模擬訓練を実施している。

当センター生活化学科でも本訓練に参加し健康危機管理における理化学検査体制の強化を図っている。本報告では、2021年度の実施内容と当センターの結果について報告する。

実施方法

1 実施期間

2021年11月1日～11月26日

2 検体

事務局より送付された液体約50 g

3 実施体制

模擬訓練の進行調整役として訓練責任者を配置し、実施要領に従い演習を行った。

4 シナリオ概要

家族5人が昼食時に庭先でブイヤベース(地中海風寄せ鍋)とやきそばの調理を行い飲食した。家族のうち大人3人が食後約30分から次々と、気分不良、頭痛、めまい、おう吐、下痢などの症状を呈し、病院を受診した。病院の医師が食中毒と判断し、保健所に通報し、保健所から地衛研に検査依頼がなされたという設定であった。また、原因物質のために必要と思われる情報については適宜質問し追加情報を入手した。

5 原因物質の探索および特定

(1) 候補物質の選定

喫食状況、患者症状、発症時間などの健康被害の特徴と除草剤散布の状況から、原因物質候補を選定し、その試験法等について情報収集を行った。

(2) 定性分析

(1)で選定した物質の含有を確認するために、薄層クロマトグラフィー(TLC)、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)を用いた定性分析を実施した。また、選定された候補物質以外の物質についても、LC-MS/MSを用いて探索し

た。LC-MS/MSとして、アジレントテクノロジー株式会社製1290 Infinity LC/6460を使用した。

(3) 定量分析

(2)の定性分析で確認された物質について、LC-MS/MSを用いた定量分析を実施した。

(4) 毒性量の推定、検証

候補物質の毒性量について、定量分析の結果から算出した含有量と毒性に関する文献等の情報と比較検討した。

6 模擬訓練事業結果検討会

模擬訓練後に結果検討会がWEB開催され、他機関との結果比較や演習時の課題等情報の共有を行った。

結果と考察

1 原因物質の探索および特定

(1) 候補物質の選定

原因物質候補として、巻貝の有毒成分であるテトラミン、ジャガイモの有毒成分であるソラニン、ツキヨタケの有毒成分であるイルジンS、および庭先で調理していることから農薬を選定した。

(2) 定性分析

検体2 gを採取しメタノール20 mLを加えて振とう(300回/分、15分間)し、遠心分離(2500 rpm、15分間)後、ろ過した。上清を分取し必要に応じ窒素パーズで濃縮し試料溶液とした。

テトラミンのTLCによる分析は食品衛生検査指針等^{1,2,3)}を参考に表1の条件で行った。その結果、テトラミン標準液(テトラメチルアンモニウムクロリド(テトラミン))(和光純薬工業(株),特級)をメタノールで適宜希釈して調製)と同一の位置に検出した(図1)。また、LC-MS/MSのm/z 50~1000のMS2スキャン分析の結果、検体抽出液からテトラミン標準液と同じm/z74のピークを確認し(図2)、MRM分析(定量イオン74.1 > 59.1)において、保持時間:約3.1分もテトラミン標準液と一致していることを確認した(図3)。

一方、その他の候補物質であるソラニン、イルジンSおよびその他「農薬」等原因物質になりうる物質はいずれの分析でも含有が確認できなかった。

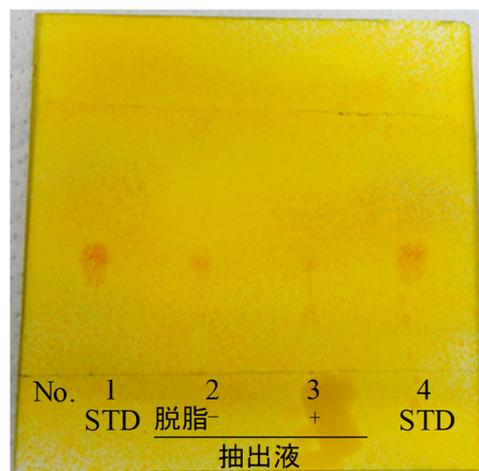
以上のことから、原因物質をテトラミンと断定した。

(3) テトラミンの定量分析

食品衛生検査指針¹⁾の「テトラミン」の試験法を参考に、定量用試料(n=3)、テトラミン標準液添加試料(n=2、試料中濃度5 ng/g)、ブラ

表1 TLC測定条件

薄層板	セルロースプレート 10×10 アビセルSF(フナコシ薬品(株)製)
展開溶媒	1-ブタノール/酢酸/水(4/1/5、v/v/v)
滴下量	各10 μL
呈色	ドラージェンドルフ試薬



No.1,4: テトラミン標準溶液(500 ppm)(NO.1: $R_f=0.41$ 、No.4: $R_f=0.42$)、No.2: メタノール抽出液、 $R_f=0.40$ 、3: メタノール抽出液(ヘキサン抽出による脱脂あり)、 $R_f=0.41$ 、各スポット量:10 μL

図1 テトラミンのTLC結果

表2 LC-MS/MS分析条件

機器	アジレント・テクノロジー株式会社製 Agilent 1290 Infinity LC + 6460
LC条件	
分析カラム	Allure PFP Propyl, 5 μm, 2.1×150 mm (RESTEK製)
移動相	A液:0.1%ギ酸 B液:ギ酸/ 1Mギ酸アンモニウム/MeOH(0.1/2/100) B10%(0-5 min) →B90%(5-10 min) →B90%(10-15 min) →B10%(15-20 min)
カラム温度	40
流速	0.2 mL/min
注入量	1 μL
MS/MS条件	
イオン化法	Agilent Jet Stream-ESI (+)
測定モード	MRM
キャピラリー電圧	4000 V
イオン源温度	350
測定イオン	74.1>59.1(定量イオン) 74.1>58.2(定性イオン)

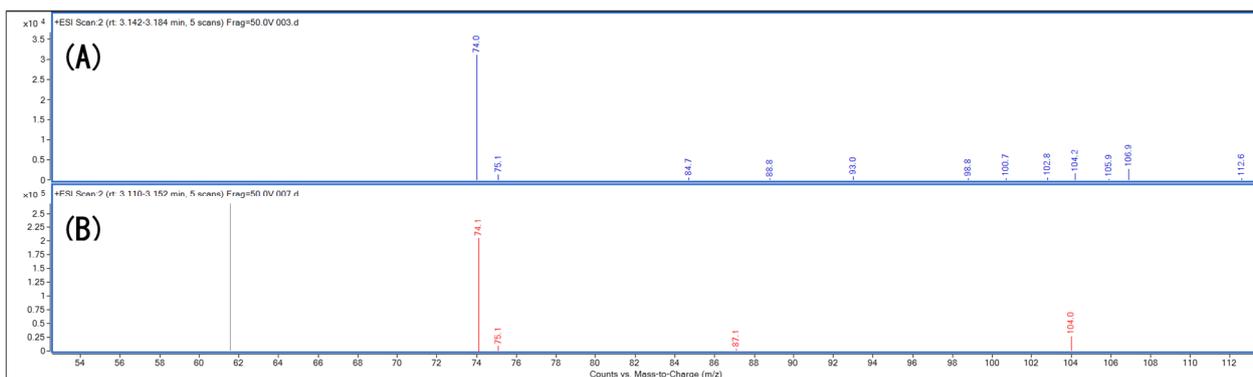


図2 (A)テトラミン標準液(500 ng/mL)および(B)検体抽出液のマススペクトル

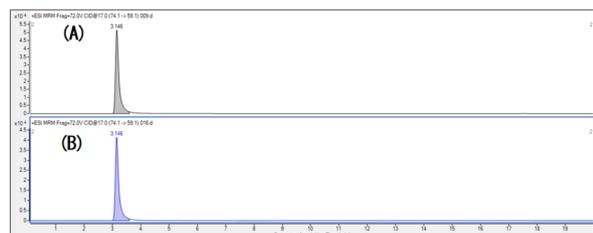


図3 (A)テトラミン標準液(50 ng/mL)および(B)検体抽出液のMRMクロマトグラム

シナリオ試料として市販のピヤベース類似品を用いて図4のとおり各試料溶液を調製した。定量に用いたLC/MS/MS条件は表2に示す。MRM条件は、74.1 59.1を定量イオンとし、74.1 58.2のトランジションを確認イオンとした。検量線を図5に示す。1-50 ng/mLの範囲で決定係数0.9990の良好な直線が得られた。定量の結果、検体抽出液中のテトラミン濃度は502-508 $\mu\text{g/g}$ (平均504 $\mu\text{g/g}$ (n=3)、添加回収率は51.4-90.8% (n=2)であった。シナリオの喫食量、文献^{4),5)}より試料中濃度は妥当であると判断した。

(4) 模擬訓練事業結果検討会

結果検討会は、2022年2月25日にWEB開催された。模擬訓練事務局の結果報告書によると、食中毒の原因はピヤベースで使用した「チョウセンボラ」が有毒部位の唾液腺を除去されずに調理されたことによるものであり、原因物質は有毒成分であるテトラミン、検体中のテトラミン添加量は500 $\mu\text{g/g}$ であった。当センターの結果が原因物質としてテトラミンと断定し、定量結果の真度が100.8%であることから、定性、定量いずれにおいても当センターの試験法が妥当であることが確認できた。

まとめ

本訓練では、シナリオから原因物質を推定し情報

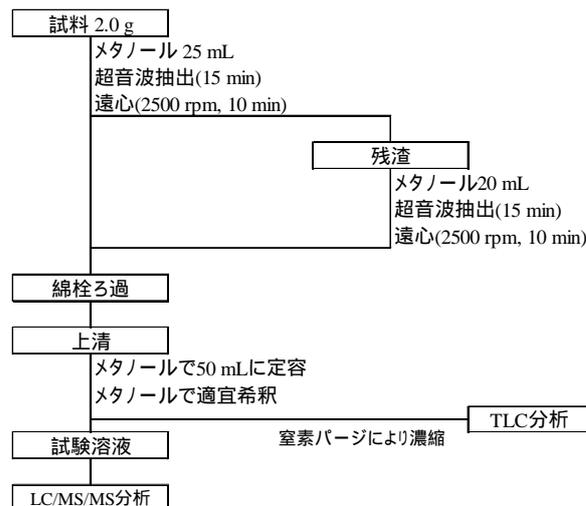


図4 試験溶液の調製法(定量分析およびTLC分析)

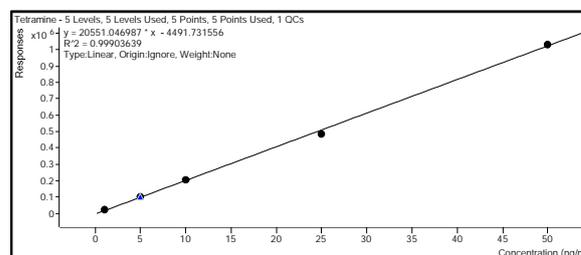


図5 テトラミンの検量線(1-50 ng/mL)

収集、協議を繰り返しながら、複数の分析方法による定性、定量分析するという健康危機管理における検査体制を確認することができた。今後も幅広い視野を持って情報収集力と分析技術の向上に努め検査体制強化を図るとともに、九州ブロックの関係機関と連携・協力体制を維持していきたい。

参考文献

- 1) 食品衛生検査指針(理化学編) 2015, 848-852, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京(2015).
- 2) 数田行雄, 他: 巻貝唾液腺の毒成分について, 山口衛公研業報, 10, 30-31(1989).

- 3) 下井俊子, 他:化学物質及び自然毒による食中毒等事件例(平成21年), 東京健安研セ年報, **61**, 267-271 (2010).
- 4) 新藤哲也, 他:イオンクロマトグラフィーによる巻貝(軟体動物)中テトラミンの分析及び調理による消長, 食品衛生学雑誌, **41**, 11-16 (2000).
- 5) 西川徹, 他: チョウセンボラの喫食によるテトラミン食中毒事例, 長崎県環境保健研究センター所報, **55**, 118-120 (2009).