ISSN 1881-6053

秋田県健康環境センター年報

第 7 号

平成23年度

ANNUAL REPORT

OF

AKITA RESEARCH CENTER FOR PUBLIC HEALTH AND ENVIRONMENT

No.7 2011

秋田県健康環境センター

は　じ　め　に

秋田県健康環境センターは、平成１８年度に旧衛生科学研究所と旧環境センターが統合して設立され、現在７年目を迎えています。平成２２年度には、保健所でも行われていた試験検査業務が当センターに移管され、本県の保健・環境に関する試験検査体制が一元化されました。

平成２３年３月には、当センターの今後１０年間の方向性を定めた「中長期計画」の改訂を行いました。この中で県民生活の安全・安心の実現に向け、「健康の保持及び増進」、「感染症、食中毒及び化学物質による健康被害の防止」、「環境の保全」の３つを基本方針と定め、職員一同がこれらに関する調査研究と試験検査に取り組んでいます。

そうした中で発生した東日本大震災に起因する東京電力福島第一原子力発電所事故によって、本県における放射性物質の測定・監視を行っている当センターの役割が一層重要となりました。その対応のため、県内のモニタリングポストを１基から６基に増設して空間放射線量の監視を強化したほか、ゲルマニウム半導体検出器も１台から２台に増設し、食品、水道水、降下物、土壌、廃棄物等に含まれる放射性物質濃度の迅速な測定と結果等についての情報発信を行い、県民の皆様の安全・安心の確保に努めています。

この年報は、放射能を含め、主に平成２３年度に当センターが行った、感染症、食中毒、化学物質、大気・水質環境などの分野に関する調査研究や業務実績の概要についてとりまとめたものです。本書を通じて多くの県民の皆様に当センターの活動への御理解と関心を高めていただくとともに、率直な御意見を頂戴することにより、今後の業務に生かしていきたいと考えております。

県民の皆様の温かい御支援、御協力をお願いいたします。

平成２４年１２月

秋田県健康環境センター所長

高　橋　　浩

目　　次

Ⅰ　健康環境センターの概要

1. 沿　革 …… 1
2. 庁舎の概要 …… 1
3. 組　織 …… 1
4. 職員名簿 …… 2
5. 業務内容 …… 3
6. 主要機器 …… 4

Ⅱ　業務実績

1. 試験検査実績 …… 5
2. 研修・学会等 …… 9
3. 研究業務実績 …… 15

Ⅲ　調査研究報告

・ 母子健康手帳改正にともなう胆道閉鎖症早期発見に向けた便色カラーカードの導入… 25
・ 新型インフルエンザウイルスのタミフル耐性鑑別法の開発とその応用 …… 29
・ 食品検体の病原ウイルス検出を可能にした汎用型パンソルビン・トラップ法の開発… 43
・ 結核菌の DNA シークエンスに基づいた分子疫学解析法と薬剤耐性の迅速診断法に関する調査研究－某施設で発生した結核集団事例における JATA12 の応用実例等について－ …… 54
・ 秋田県における鶏肉等のカンピロバクター汚染状況及び家畜の保菌状況について … 58
・ 食中毒疑い事例検査における新規病原菌 *Escherichia albertii* の検出 …… 63
・ 血液から分離されたインフルエンザ菌の解析 …… 67
・ LC-MS/MS を用いた畜水産物中の動物用医薬品一斉分析における固相抽出及びリン脂質クリーンアップ法の検討 …… 70
・ LC-MS/MS を用いたハチミツ中の動物用医薬品一斉分析法の検討 …… 83
・ 福島第一原子力発電所事故に伴う秋田県における放射能調査 …… 91
・ もみ殻を原料とした選択的リン回収材の開発と利用・応用への展開 …… 96

Ⅳ　発表業績

1. 学会発表 …… 103
2. 他誌掲載論文 …… 117

Ⅰ　健康環境センターの概要

1. 沿　革

年 月	事　　項
明治35. 7	衛生試験所を秋田市牛島町に設立。
明治末期	庁舎を秋田市土手長町に移転。
昭和28. 1	衛生研究所に改称。
39. 4	衛生科学研究所に改称。
39. 6	庁舎を秋田市古川堀反町（現千秋明徳町）に新築移転。
45. 7	公害技術センターを秋田市茨島の工業試験場内に設立。
48. 7	庁舎を秋田市八橋に新築移転。
56. 4	環境技術センターに改称。
61. 8	庁舎を秋田市千秋久保田町に新築移
平成12. 4	環境センターに改称。 秋田市山王の県庁第二庁舎に総務班及び監視・情報班を置く。
14. 3	八橋分室敷地内にダイオキシン類分析棟を新築。
18. 4	衛生科学研究所と環境センターを組織統合し，健康環境センターとして発足。 千秋庁舎に企画管理室及び保健衛生部を，八橋庁舎に環境部を設置。
21. 4	八橋庁舎の環境部を千秋庁舎に移転し，庁舎を統合。保健衛生部の理化学部門と環境部の化学物質部門を統合した理化学班を環境・理化学部内に設置。組織を企画管理室，保健衛生部及び環境・理化学部とする。
22. 4	保健所の試験検査課を統合。保健衛生部の微生物班を細菌班とウイルス班に再編し，健康科学班を健康科学・管理班に名称変更。環境・理化学部を理化学部と環境保全部に再編。理化学部には，理化学班を再編した食品理化学班と環境理化学班を設置。環境保全部には環境調査班を名称変更した環境保全班を設置。
24. 4	企画管理室の総務・企画班を再編し、総務管理班と企画情報班を設置。保健衛生部の健康科学・管理班を廃止。理化学部の食品理化学班と環境理化学班を統合し、理化学班を設置。

2. 庁舎の概要

1) 所在地　　秋田市千秋久保田町 6 番 6 号
2) 敷　地　　867.75 ㎡（建物建床面積）
3) 建　物　　鉄筋コンクリート造 5 階建　　延床面積 4,553.52 ㎡

3. 組織

（平成 24 年 4 月 1 日現在）

総職員数 51 名（正職員 42 名，専門員 4 名，非常勤職員 2 名，臨時職員 3 名）

4. 職員名簿

（平成24年4月1日現在）

		職名	氏名
		所長	高橋　浩
企画管理室		室長	瀬尾和雄
	総務管理班	主幹（兼）班長	近江　進
		副主幹	佐藤則子
		主査	黒政　太
		主査	髙橋育子
		技能主任	佐藤博之
	企画情報班	上席研究員（兼）班長	岩谷金仁
		上席研究員	佐藤晴美
		上席研究員	栗盛寿美子
		主任研究員	田村高志
保健衛生部		部長	齊藤志保子
	細菌班	上席研究員（兼）班長	千葉真知子
		上席研究員	和田恵理子
		主任研究員	八柳　潤
		主任研究員	熊谷優子
		研究員	髙橋志保
		研究員	今野貴之
	ウイルス班	上席研究員（兼）班長	安部真理子
		主任研究員	田中貴子
		主任研究員	斎藤博之
		主任研究員	秋野和華子
		主任研究員	佐藤寛子
		研究員	藤谷陽子
		研究員	柴田ちひろ
		研究員	村山力則
理化学部		部長	松田恵理子
	理化学班	主任研究員（兼）班長	小林貴司
		専門員	鈴木雄二
		専門員	大友久利
		研究員	松渕亜希子
		研究員	中村淳子
		研究員	菅原　剛
		研究員	小川千春
		研究員	天明さおり
環境保全部		部長	柴田義明
	環境保全班	主任研究員（兼）班長	鈴木忠之
		主任研究員	石垣　修
		主任研究員	清水　匠
		主任研究員	成田修司
		専門員	大畑博正
		専門員	高嶋　司
		研究員	玉田将文
		研究員	高橋英之
		研究員	佐々木純恵
		技師	生魚利治

5. 業務内容

（平成 24 年 4 月 1 日現在）

企画管理室	総務管理班	・人事，服務 ・予算，決算 ・庁舎管理，庶務一般
	企画情報班	・研究の企画・評価・進行管理 ・センター中長期計画の進行管理 ・広報，研修 ・生活習慣病予防対策業務 ・花粉症予防対策業務 ・精度管理
保健衛生部	細菌班	・感染症発生動向調査にともなう病原体検査業務 ・細菌感染症と食中毒の試験検査及び調査研究 ・薬剤耐性菌に関する調査研究 ・医薬品等に関する検査 ・収去食品及び環境検体等に関する細菌検査
	ウイルス班	・感染症発生動向調査にともなう病原体検査業務 ・ウイルス感染症と食中毒の試験検査及び調査研究 ・エイズ・性感染症・B 型肝炎・C 型肝炎の抗体検査 ・つつが虫病の抗体検査及び調査研究 ・新生児マス・スクリーニング検査及び調査研究 ・感染症情報センター業務 ・結核登録者情報調査 ・健康づくりに関する調査研究
理化学部	理化学班	・食品の安全性に係る試験検査及び調査研究 ・食品放射能の測定 ・有害家庭用品試買検査 ・収去食品の理化学的検査 ・工場・事業場排水中の化学物質の検査 ・廃棄物関係検査 ・環境中の化学物質に関する調査研究
環境保全部	環境保全班	・公共用水域水質調査 ・工場・事業場排水基準検査 ・工場・事業場ばい煙排出基準検査 ・廃棄物関係検査 ・生活衛生関係検査 ・環境放射能の測定 ・大気汚染常時監視 ・航空機騒音調査 ・酸性雨調査 ・アスベスト環境調査 ・環境保全に関する調査研究

6. 主要機器

（平成24年4月1日現在）

機　器　名	規　格
電子顕微鏡	日本電子　JEM-1010
偏光ゼーマン原子吸光光度計	日立製作所　Z-5000
原子吸光分光光度計	バリアン・テクトロン　AA-220FS
原子吸光分光光度計	バリアン・テクノロジーズ　AA-280FS
ＩＣＰ発光分光分析装置	サーモフィシャー　iCAP6300Duo
分離用超遠心機	日立工機　CP70MX
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津　QP5000
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津　QP5050A
ガスクロマトグラフ質量分析計システム	日本電子社　JMS-700Dほか
ガスクロマトグラフ質量分析計	アジレント・テクノロジー　6890N/5973N
超臨界流体抽出装置	ISCO　SFX220
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津　GCMS-QP2010 Plus
ガスクロマトグラフタンデム型質量分析計	サーモフィシャー　TSQ QuantumGC
キャピラリーガスクロマトグラフ	ヒューレットパッカード　HP6890
ガスクロマトグラフ	アジレント・テクノロジー　6890N
ＦＩＤ付ガスクロマトグラフ	アジレント・テクノロジー　7890A
FPD・ECD付ガスクロマトグラフ	アジレント・テクノロジー　7890A
高速液体クロマトグラフ	日立製作所　D-7000
高速液体クロマトグラフ	日立製作所　L-7000
高速液体クロマトグラフ	日立製作所　L-7000
高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ　2695
高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ　996アライアンスシステム
高速液体クロマトグラフ	アジレント・テクノロジー　DAD・FLD検出器付 1200シリーズ
液体クロマトグラフタンデム質量分析計	ABサイエックス　API4000
ノルマルヘキサン自動抽出装置	ラボテック　HX-1000-8
イオンクロマトグラフ	日本ダイオネクス　DX-120
イオンクロマトグラフ	日本ダイオネクス　DX-320
高速溶媒抽出装置	DIONEX社　ASE-200
高速溶媒抽出装置	DIONEX社　ASE-300
大量注入溶媒除去システム	SGE社　SCLV
オートアナライザー	日立メディコ　7020
オートアナライザー	ビーエルテック　QuAAtro 2-HR
Ge半導体検出器付波高分析装置	セイコー EG&G　GEM20P，MCA7700
Ge半導体検出器付波高分析装置	セイコー EG&G　GEM25-70，MCA7600
PCRプロダクト検出定量システム	アプライドバイオシステムズ　ABI PRISM 7000
遺伝子増幅装置	日本ロシュ　ライトサイクラーシステム3
自動核酸精製装置	日本ロシュ MagNA Pure LC2.0
先天性甲状腺機能低下症等スクリーニングシステム	BSD600
低バックグランド放射能自動測定装置	アロカ　LBC-4201B
モニタリングポスト	アロカ　MAR-22
空間放射線量モニタリングシステム	東芝　SD22-T
大型高圧蒸気滅菌装置	平山製作所　HK-530E
大気汚染常時監視テレメータシステム	NEC他
マイクロウェーブ分解装置	マイルストーンゼネラル　ETHOS900
航空機騒音自動測定装置	リオン　NA-37

Ⅱ　業務実績

1.　試験検査実績

1.1 保健衛生部行政依頼検査

（件数）

項目		年度	平成21	平成22	平成23
細菌・ウイルス等の試験検査	感染症発生動向調査病原体別検査数	ウイルス分離検査	459	638	737
		細菌検査	719	854	739
	感染症流行予測調査	インフルエンザ感染源調査	100	100	100
		日本脳炎感染源調査	70	70	70
	食中毒等検査	ノロウイルス検査	357	240	286
		細菌検査	810	1,065	2,969
	HIV抗体検査		7	6	7
	HIV抗体確認検査		4	6	4
	性器クラミジア抗体検査		199	192	156
	梅毒抗体検査		202	190	154
	B型肝炎抗原検査		334	155	159
	C型肝炎抗体検査		338	154	159
	麻疹抗体価検査		0	47	2
	麻疹PCR		4	17	28
	新型インフルエンザ		372	56	10
	新型インフルエンザタミフル耐性検査*		—	16	43
	3類感染症に係わる病原微生物検査		714	1,108	589
	地研レファレンスセンター業務	カンピロ血清型別	6	0	0
		カンピロ感受性試験	31	32	66
		ジフテリア・百日咳・ボツリヌス	55	45	83
	結核菌RFLP検査，VNTR検査		7	5	11
	つつが虫病血清検査		67	110	108
	その他微生物学的検査		93	15	330
食品衛生に係る検査	食品収去検査*		—	1,089	1,021
	食中毒菌汚染実態調査		325	325	275
	精度管理		1	1	3
生活衛生に係る検査	公衆浴場水，遊泳プール水の大腸菌検査*		—	32	34
	貸しおしぼり検査*		—	32	32
	公衆浴場等レジオネラ属菌検査		61	59	67
水質汚濁対策	公共用水域水質環境調査*		—	222	215
	八郎湖水質保全調査*		—	79	79
	工場・事業場排水基準検査*		—	281	266
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査*		—	21	20
マス・スクリーニング	先天性代謝異常，内分泌疾患		7,999	7,741	7,777
医薬品等監視指導業務に係る検査	医薬品，医薬部外品，医療機器（細菌）		9	8	5
県民健康・栄養調査（5年毎に実施）	栄養調査・解析		—	—	871
	食生活状況調査・解析		—	—	823
	塩分濃度測定		—	—	281
合　　計			13,343	15,011	18,579

* 新型インフルエンザタミフル耐性検査，食品収去検査，公衆浴場水・遊泳プール水の大腸菌検査，貸しおしぼり検査，公共用水域水質環境調査，八郎湖水質保全調査，工場・事業場排水基準検査，産業廃棄物等基準検査については，平成22年度から新たに項目を起こした。

1.2 保健衛生部一般依頼検査

（件数）

項目	年度		平成21	平成22	平成23
感染症発生動向調査に関わる検査	秋田市保健所依頼分（再掲）		83	215	340
細菌・ウイルス等の試験検査	ウイルス分離検査		35	0	9
	食中毒関係等ノロウイルス検査		139	4	0
	新型インフルエンザ[*1]		257	13	0
	新型インフルエンザタミフル耐性検査[*2]		—	1	0
	細菌培養同定検査		3	1	0
	細菌遺伝子解析検査		0	3	0
	血液製剤無菌試験	真菌否定検査	34	18	0
		細菌否定検査	34	18	0
	HIV抗体確認検査[*1]		1	0	0
合　計			585	273	349

*1 新型インフルエンザ，HIV抗体確認検査については，平成21年度から新たに項目を起こした。
*2 新型インフルエンザタミフル耐性検査については，平成22年度から新たに項目を起こした。

1.3 情報提供業務

（件数）

項目	年度			平成21	平成22	平成23
基幹・地方感染症情報センター（感染症発生動向調査依頼業務）	患者情報	週報	収集	477	468	468
			報告	53	52	52
			還元	53	52	52
			解析	53	52	52
			提供	477	468	468
		月報	収集	108	108	108
			報告	12	12	12
			還元	12	12	12
			解析	12	12	12
			提供	108	108	108
	病原体情報		収集	697	350	350
			報告	697	350	350
			還元	697	350	350
			解析	697	350	350
	解析評価委員会資料提供			6	6	6
結核登録者情報調査依頼業務	患者情報	月報	収集	108	108	108
			報告	12	12	12
			還元	12	12	12
		年報	収集	9	9	9
			報告	1	1	1
			還元（前年分）	1	1	1
花粉症予防対策依頼業務	スギ花粉予報作成提供			73	53	53
	スギ花粉測定数			73	206	202
	スギ雄花芽調査数			15	15	15
	花粉症患者調査票数			72	85	85
合　計				4,535	3,252	3,248

1.4 理化学部行政依頼検査

（件数）

項目 ＼ 年度			平成21	平成22	平成23
食品監視業務に係る検査	残留抗生物質・残留合成抗菌剤検査		150	540	926
	残留農薬実態検査		8,381	7,379	7,985
	食品収去検査（食品添加物等）		—	808	720
	精度管理		15	16	21
医薬品等監視指導業務に係る検査	医薬品，医薬部外品，医療機器（理化学）		2	2	0
家庭用品試買検査	有害物質		86	61	53
地熱開発地域環境調査	温泉分析		300	252	0
環境放射能水準調査	空間線量		365	365	366
	全ベータ線		150	156	52
	核種分析		79	84	82
	分析確認		55	55	55
福島原子力発電所事故に伴う緊急環境放射能調査	空間線量		—	460	9,328
	核種分析	降下物	—	14	813
		蛇口水	—	17	831
		環境試料*2	—	—	638
		食品試料*2	—	—	324
		畜産試料*2	—	—	573
水質汚濁対策	環境調査	公共用水域水質調査	0	62	48
		地下水調査	14	121	0
		緊急調査	0	179	59
	工場排水基準検査		90	111	98
土壌汚染対策	汚染土壌処理事業所検査*1		—	32	32
化学物質対策	化学物質環境調査		136	140	132
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査		360	364	262
	能代産業廃棄物処理センター環境保全対策	能代地区周辺環境調査	436	489	599
		能代産業廃棄物処理センター関連調査	1,710	3,456	3,194
合　　計			12,329	15,131	27,191

*1 汚染土壌処理事業所検査については，平成22年度から新たに項目を起こした。
*2 福島原子力発電所事故に伴う緊急環境放射能調査については，平成23年度から新たに環境試料・食品試料・畜産試料の項目を起こした。

1.5 環境保全部行政依頼検査

（件数）

項目		年度	平成21	平成22	平成23
大気汚染対策	大気汚染常時監視[*1]	一般環境大気測定局	55 (382,634)	55 (463,449)	56 (462,149)
		自動車排出ガス測定局	15 (103,977)	15 (118,250)	15 (129,504)
		工場局	74 (219,850)	74 (462,620)	74 (540,341)
	ばい煙排出基準検査		29	29	25
	酸性雨調査	酸性雨実態調査	1,450	1,420	1,380
	アスベスト対策	石綿飛散調査	61	59	43
水質汚濁対策	環境調査	公共用水域水質調査	3,975	4,016	4,171
		地下水調査	7	137	47
		緊急調査	0	24	91
	工場・事業場排水基準検査	工場排水	0	2,514	2,383
		水浴場水[*2]	—	475	288
	八郎湖水質保全対策調査	底質調査	36	36	36
		緊急調査	166	0	80
	玉川酸性水影響調査		533	216	304
	十和田湖水質保全対策調査	十和田湖水質生態系調査	360	240	240
		十和田湖流入河川調査	45	0	0
土壌汚染対策	汚染土壌処理事業所検査[*2]		—	36	36
生活衛生に係る検査	遊泳用プール水質検査[*2]		—	40	18
	公衆浴場水質検査[*2]		—	64	16
	食肉衛生検査所自主検査[*2]		—	20	20
騒音対策	航空機騒音調査		735	735	758
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査		0	508	731
	能代産業廃棄物処理センター関連調査		0	1,179	1351
	緊急調査[*2]		—	387	0
合計（大気汚染常時監視を除く）			7,397	12,135	12,018

*1 大気汚染常時監視は，測定対象項目数（実測データ数）を表す。

*2 水浴場水，汚染土壌処理事業所検査，遊泳用プール水質検査，公衆浴場水質検査，食肉衛生検査所自主検査，廃棄物対策緊急調査については，平成22年度から新たに項目を起こした。

2. 研修・学会等

2.1 研修等参加

年　月　日	研　修　名	参　加　者	開催地
23.04.15	水産生物放射能分析技術研修会	菅原　剛	神奈川県
23.05.16～27	平成23年度特定機器分析研修Ⅱ	松渕亜希子	埼玉県
23.07.07～08	平成23年度先天性代謝異常症等検査技術者研修会	秋野和華子	東京都
23.08.25～28	公衆衛生活動・研究論文の書き方研修会	栗盛寿美子	東京都
23.10.17～28	廃棄物分析研修	高橋英之	埼玉県
23.10.18	オキシダント計校正研修	清水　匠	山形県
23.10.28～29	環境保全・公害防止研究発表会	藤島直司	青森県
23.11.01～02	平成23年度地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部微生物研究部会総会・研修会	熊谷優子 秋野和華子	青森県
23.11.10～11	平成23年度地域保健総合推進事業「感染症情報センター担当者向けブロック疫学研修会・連絡会議」	齊藤志保子 村山力則	山形県
23.11.18	平成23年度食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者等研修会	菅原　剛	東京都
23.11.21	「結核菌分子疫学情報データベースの構築」講習会	八柳　潤	宮城県
23.11.24～12.09	平成23年度水質分析研修（Bコース）	玉田将文	埼玉県
23.11.24～12.09	水質分析研修	佐々木純恵	埼玉県
23.11.30	感染症の病原体等の運搬に関する講習会	千葉真知子	東京都
23.12.05～08	平成23年度環境放射能分析研修	菅原　剛	千葉県
23.12.14	3社共催農薬分析技術セミナー2011	天明さおり	東京都
24.01.16～20	アスベスト分析研修	佐々木純恵	埼玉県
24.01.19～20	平成23年度公衆衛生情報研究協議会総会および研究会	村山力則	東京都
24.01.26	第57回水環境セミナー	小林貴司	東京都
24.01.26～27	平成23年度化学物質環境実態調査　環境科学セミナー	山田雅春 玉田将文	埼玉県
24.01.27	平成23年度指定薬物分析研修会議	天明さおり	東京都
24.02.06	低周波騒音測定講習会	高橋英之	東京都
24.02.22～23	平成23年度希少感染症診断技術研修会	今野貴之 秋野和華子	東京都
24.02.27～28	平成23年度地方衛生研究所全国協議会衛生理化学分野研修会	菅原　剛	東京都他
24.02.28	平成23年度日本食品分析センター講習会	松渕亜希子	宮城県
24.03.02～03	日本マス・スクリーニング学会技術部会第３０回研修会	秋野和華子	東京都
24.03.12	結核登録者情報システム研修	田中貴子	東京都
24.03.13	次期感染症サーベイランスシステム研修会	村山力則	東京都
24.03.16	平成23年度放射線監視結果収集調査検討会	松田恵理子 菅原　剛	東京都

2.2 学会等出席

年　月　日	学　会　名	出　席　者 (○は演題発表者)	開催地
23.05.16～17	第101回日本食品衛生学会学術講演会	松田恵理子	東京都
23.06.11～12	第52回日本臨床ウイルス学会	秋野和華子	三重県
23.06.29～30	衛生微生物技術協議会第32回研究会	○八柳　潤 今野貴之 ○斎藤博之 佐藤寛子	東京都
23.07.15～16	第15回腸管出血性大腸菌感染症研究会	八柳　潤	大阪府
23.07.22	第60回東北公衆衛生学会	岩谷金仁	福島県
23.08.05	第4回農薬残留研究会談話会	松田恵理子	神奈川県
23.08.17～18	東北食中毒研究会第24回全体会議・研修会	齋藤志保子 ○八柳　潤	山形県
23.08.18	第65回日本細菌学会東北支部総会	○今野貴之	山形県
23.09.06～10	IUMS(国際微生物学会)2011 Sapporo	○八柳　潤	北海道
23.09.08～10	第58回日本栄養改善学会	栗盛寿美子	広島県
23.09.10～11	ウイルス性下痢症研究会第23回学術集会	斎藤博之 佐藤寛子	北海道
23.09.12～14	国際微生物学連合2011会議	○斎藤博之	北海道
23.09.29～30	第102回日本食品衛生学会学術講演会	○斎藤博之 ○小林貴司 ○松渕亜希子	秋田市
23.10.01	第56回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会	○佐藤寛子	山形県
23.10.06～07	第32回日本食品微生物学会学術総会	髙橋志保 ○斎藤博之	東京都
23.10.18	平成23年度全国保健統計協議会総会	○田中貴子	秋田市
23.10.19～21	第70回日本公衆衛生学会総会	髙山憲男 岩谷金仁 栗盛寿美子 ○田中貴子 村山力則	秋田市
23.10.20～21	腸炎ビブリオシンポジウム	八柳　潤	東京都
23.10.22	第35回秋田県医学検査学会	○柴田ちひろ	横手市
23.10.28～29	第38回日本マス・スクリーニング学会学術集会	秋野和華子	福井県
23.11.03～05	第19回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー	○佐藤寛子	広島県

23.11.03～05	第 22 回廃棄物資源循環学会研究発表会	小川千春	東京都
23.11.04	平成 23 年度全国環境研協議会廃棄物資源循環学会併設研究発表会	○成田修司	東京都
23.11.10～11	全国衛生化学技術協議会年会	天明さおり	長野県
23.11.17～18	第 34 回農薬残留分析研究会	松田恵理子 松渕亜希子	高知県
23.11.25	第 19 回秋田応用生命科学研究会	○斎藤博之	秋田市
23.11.29	地方衛生研究所全国協議会　関東甲信静支部公衆衛生情報研究部会	○田中貴子	東京都
23.12.01	第 53 回環境放射能調査研究成果発表会	菅原　剛	東京都
23.12.03	第 4 回日本カンピロバクター研究会総会	齊藤志保子 ○髙橋志保	神奈川県
23.12.03～04	第 24 回日本性感染症学会	村山力則 佐藤寛子	東京都
24.01.19～20	第 25 回公衆衛生情報研究協議会総会・研究会	和田恵理子 村山力則	埼玉県
24.03.14～16	第 46 回日本水環境学会	小林貴司 ○成田修司 ○佐々木純恵	東京都

2.3 健康環境センター主催研究発表会

開 催 日 ：平成 23 年 6 月 14 日（火）

開催場所：秋田県総合保健センター

	演　題　名	発 表 者
1	結核サーベイランス情報を用いた秋田県の結核登録の現状	田中貴子
2	平成 23 年 2 月に発生した Shigella boydii 4 感染事例について	八柳　潤
3	秋田県における食品の食中毒菌汚染実態調査結果について	高橋志保
4	秋田県における非定型的下痢原性大腸菌の分離状況と *ast*A 保有大腸菌（EAST1EC）の病原因子プロファイル	今野貴之
5	食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発	斎藤博之
6	雄物川流域におけるツツガムシ生息調査と地元自治体との協力による感染予防対策について	佐藤寛子
7	GC/MS/MS を用いた残留農薬一斉分析について	天明さおり
8	八郎湖の残留性有機汚染物質について	玉田将文
9	玉川源泉下流域及び田沢湖における ｐＨ 低下要因の解明	成田修司
10	玉川酸性水中和処理による副次的水質改善効果	佐々木純恵

2.4 その他の口頭発表

年月日	発表会名・演題名	発表者	開催地
23.11.17	あきた産学官連携フォーラム 2011 ・秋田県内のスギ花粉飛散状況について ・玉川源泉の酸度上昇に対応した中和処理技術の開発と中和処理がもたらす副次的効果	髙山憲男 成田修司	秋田市
24.02.24	平成 22 年度保健環境業務研究発表会 ・秋田県における鶏肉等のカンピロバクター汚染状況について ・福島第一原発事故に伴う秋田県における放射能調査 ・貝殻等を利用した新規中和材による玉川酸性水中和試験について	髙橋志保 菅原　剛 髙橋英之	潟上市

2.5 講師派遣等

2.5.1 技術支援

実施日	主な内容	講師氏名	対象	参加者数
23.07.26	牛肉の放射性物質濃度測定について	松田恵理子	（株）秋田県分析化学センター	4 名
23.10.25	パンソルビン・トラップ法について	斎藤博之	東京都中央区保健所	ﾒｰﾙ対応
23.11.01	パンソルビン・トラップ法について	斎藤博之	広島大学	ﾒｰﾙ対応
23.11.07	タイの洪水に伴う水からのウイルス検出について	斎藤博之	大阪大学微生物研究所ＭＯＣＩＤ岡林環樹	ﾒｰﾙ対応
23.12.12	もみ殻リン回収材の製造工程について	成田修司	東北ビル管財（株）	1 名
23.12.15	ボツリヌス菌の毒素試験について	千葉真知子	（財）秋田県総合保健事業団	5 名
24.1.31 ～ 3.31	食品の放射性物質濃度測定について	松田恵理子 菅原　剛	秋田県生活センター	1 名
			合　　計	11 名

2.5.2 出前講座

講座名	講師氏名	実施回数	延べ参加者数
(No. 64) 油断できない結核	田中貴子	5 回	260 名
(No. 65) 細菌性食中毒・感染症について	千葉真知子	1 回	30 名
	今野貴之	6 回	200 名
(No. 66) ウイルス性食中毒について	斎藤博之	2 回	60 名
(No. 67) ウイルス性感染症について	斎藤博之	4 回	137 名
(No. 68) 環境放射能について	高嶋　司	12 回	532 名
	松田恵理子	6 回	316 名
(No. 69) 環境中の化学物質について	小林貴司	2 回	225 名
	合　　計	38 回	1,760 名

2.5.3 その他講師派遣

主な内容	実施日	講師氏名	依頼元	参加数
私の仕事	23.05.21	高山憲男	秋田県臨床検査技師会	35 名
平成２２年結核登録者情報について	23.05.23	田中貴子	健康推進課	17 名
廃棄物および地下水中の揮発性有機化合物等のモニタリングと実際	23.05.31	小林貴司	秋田県立大学生物資源科学部	3 名
食品および農産物中の残留農薬のモニタリングと生物影響	23.06.07	松田恵理子	秋田県立大学生物資源科学部	3 名
食品および環境中の医薬品のモニタリングと生物影響	23.06.21	松田恵理子	秋田県立大学生物資源科学部	3 名
シンポジウム「薬剤耐性菌」KPC-産生肺炎桿菌	23.06.30	八柳　潤	衛生微生物技術協議会第32回事務局	70 名
シンポジウム「腸管系ウイルス」 ノロウイルス：食品からのウイルス検出法	23.06.30	斎藤博之	衛生微生物技術協議会第32回事務局	200 名
秋田県の結核の現状について	23.07.27	田中貴子	結核予防婦人会秋田県連合会	300 名
特殊災害の基礎知識－放射性物質災害－	23.08.08	斎藤博之	秋田県消防学校	108 名
秋田県における減塩と野菜摂取の取り組みについて	23.08.23	栗盛寿美子	健康推進課	340 名
個体の反応【生体と微生物】	23.09.26	八柳　潤	秋田大学	130 名
危険性物質等に係わる基礎知識及び関係法令 細菌・ウイルス	23.10.03	斎藤博之	消防学校	19 名
食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発	23.10.06	斎藤博之	第32回日本食品微生物学会学術総会事務局	750 名
秋田県における減塩と野菜摂取の取り組みについて	23.10.11	栗盛寿美子	大館保健所	30 名
疾病対策に活かすための保健統計－死亡統計に基づいた秋田県の疾病傾向の検討－	23.10.18	田中貴子	平成23年度全国保健統計協議会事務局	50 名
秋田県における減塩と野菜摂取の取り組みについて	23.10.18	栗盛寿美子	大館保健所	35 名
食肉などの食中毒菌汚染実態と汚染食品による健康被害について	23.10.25	齊藤志保子	能代保健所	110 名
微生物制御のための基礎知識	23.11.09	齊藤志保子	生活衛生課	20 名
ウイルス性食中毒について	23.11.11	斎藤博之	生活衛生課	20 名
秋田県における再生可能なエネルギーの利用状況と課題	23.11.18	田村高志	秋田県立大学生物資源科学部	17 名
秋田県における百日咳LAMP検査の概要	23.11.19	八柳　潤	秋田県医師会	40 名
高齢者が気をつけたい感染症	23.11.22	斎藤博之	由利本荘保健所	61 名
最近の感染症発生動向とその対策について	23.11.25	村山力則	由利本荘保健所	45 名
我が国におけるこれからの結核対策～結核対策における地方感染症情報センターの役割	23.11.29	田中貴子	関東甲信静支部公衆衛生情報研究部会事務局	50 名
保健情報学１（保健衛生ニーズ、死亡統計）	24.01.12	田中貴子	秋田大学医学部保健学科	80 名
保健情報学２（生活習慣病対策の保健情報）	24.01.19	田中貴子	秋田大学医学部保健学科	80 名

保健情報学３（結核の情報管理・統計）	24.01.26	田中貴子	秋田大学医学部保健学科	80 名
秋田県の結核患者の状況	24.02.01	田中貴子	健康推進課	260 名
秋田県における放射能調査について	24.02.16	高嶋　司	秋田県人畜共通感染症懇話会	37 名
八郎湖の水質改善と地域資源の循環利用をめざした新たな取り組み	24.03.03	成田修司	秋田県立大学生物資源科学部	30 名
			合　計　30回	3,023 名

2.6 視察・見学等受入

参加者区分	平成21年度	平成22年度	平成23年度	
小・中学生	0	0	2 (1)	秋田大学附属中学校
インターンシップ	7 (2)	10 (2)	13 (3)	秋田大学 ・ 秋田県立大学 秋田工業高等専門学校
その他の学生	31 (3)	14 (1)	13 (2)	秋田大学 ・ 実践女子大学
一般県民	15 (1)	0	0	
業務関係者（医師臨床研修含む）	25 (5)	1 (1)	20 (1)	秋田県食品衛生推進委員会
県外	0	3 (1)	4 (1)	福岡市南区衛生連合会
国外	7 (1)	9 (2)	3 (2)	鼎三国際企業有限公司 環日本海交流推進協議会
合　計	85 (12)	37 (7)	55 (10)	

注）括弧内の数字は団体数

2.7 受賞・表彰等

受賞日	受賞名	受賞者	対象研究	授与学会
23.10.22	学会特別賞	柴田ちひろ	秋田県の男性泌尿器科受診者における尿中 HPV 検出状況	秋田県医学検査学会
23.12.03	2011 年度学術奨励賞	佐藤 寛子	地方都市におけるオーラルセックス経験者の *N.gonorrhoeae* および *C.trachomatis* の検出状況	日本性感染症学会

受賞日	表彰名	受賞者	授与機関
23.08.01	平成 23 年度全国環境研協議会北海道東北支部長表彰	高嶋　司	全国環境研協議会北海道東北支部
23.10.25	平成 23 年度全国環境衛生職員団体協議会長表彰	佐藤信也	全国環境衛生職員団体協議会
23.10.25	平成 23 年度生活環境改善功労者表彰	高嶋　司	生活と環境全国大会

3.　研究業務実績

健康科学・管理班

がん対策における子宮頸がん早期発見とワクチン接種に向けての調査研究－HPV 感染状況とアンケート意識調査から－

（大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」事業）

（平成 22 年 11 月より 1 年間）

研究概要

秋田県において HPV 感染調査や子宮頸がんに対する県民の意識調査は行われておらず，子宮頸がん対策へのアプローチはまだ充分とは言えない。そこで本研究では県民へ子宮頸がんについてのアンケート調査を実施し，その解析結果を子宮頸がんの検診率の向上に資することを目的とするとともに，検診結果の精度向上につなげるため子宮頸がん検診の検査検体についてPCR による HPV-DNA 法の条件検討を行った。

結果

1) アンケート調査

アンケートを集計した結果，県内約 2,500 人の調査モニターのうち，1,030 人から回答があり，回収率は約 41.2%であった。

一度も検診を受けたことのない女性は 268 人(26.4%)であり，年代別内訳は 20 代の 50.8%，30 代の 25.9%，40 代の 16.7%，50 代の 16.3%，60 代以上の 18.2%となっていた。また子宮頸がんに関する知識については全体で「予防にはワクチンが有効である」が 67.0%，「20～30 歳に急増している」が 54.4%と 50%を超えていたが，その他の回答は 50%を下回っており，「禁煙が有効である」という回答は最も低かった。また子宮頸がん検診受診者は未受診者よりも全ての設問で回答率が高く，このことから子宮頸がん検診を受診しない女性ほど，受診したことのある女性より知識または関心が低いことが判明した。また，子宮頸がんに対する知識，関心の低さが，子宮頸がん検診の未受診に繋がっていることが示唆された。

2) HPV 遺伝子増幅条件の検討

No.1 から No.8 の検体より抽出された DNA について，MY プライマー，PGMY プライマー，GP5+/GP6+プライマーを用い PCR を行った。3 組のプライマーセットではいずれも No.4 と No.7 から HPV が検出され，プライマーセットによる差は見られなかった。そこで PCR 反応のサイクル条件を検討した結果，GP5+/GP6+プライマーによる Touch-down PCR において No.5 を除く，すべての検体で HPV 陽性となった。しかしながら Touch-down PCR 法は PCR 反応の時間の長さ，PCR 装置の制限，および再現性などで効率が悪かったため，PGMY プライマーセットおよび GP5+/GP6+プライマーセットによる Semi-nest PCR 法を検討した。その結果，No.5 を除くすべての検体で目的となる DNA 断片が検出され，Touch-down PCR 法よりも増幅効率が上昇し，迅速性および汎用性の点で有効性が得られた。また PCR に用いる Taq polymerase の種類によって増幅効率が大幅に改善されることが判明した。

子宮頸がん検診における受診率および検査精度の向上に関する研究

（平成 23 年度～平成 24 年度）

研究概要

20 数年連続で秋田県における死因 1 位は悪性新生物（がん）であり，検診受診率が低いことも一因となっている。そこで本研究は子宮頸がん検診を対象とし，検診受診率向上のためにフォーカスグループインタビュー（FGI）法による意識調査を行い，検診対象者の受診を妨げている理由や問題点を明らかにする。また検診における検査精度向上のために，現在行われている細胞診検査に HPV-DNA 法を導入検討し，検診結果の精度向上を試みる。本研究は県民への啓発・普及と検診の質の向上により子宮頸がんの早期発見に貢献し，役立てることを目的とする。

結果

子宮頸がん検診受診率向上を目指して「住民の生の声」を把握する調査手法フォーカスグループインタビューを実施した。対象は 20 歳～30 歳代の若い世代の女性で，平成 24 年 2 月 9 日子育てママさんグループ 7 名，2 月 14 日会社員グループ 7 名，2 月 16 日学生グループ 14 名に行った。子育てママさんグループからは，子ども

をみてくれる社会環境面の整備が充実すれば検診を受けやすい。会社員グループからは，会社の方で日時を設定し，上司が声かけしてくれるなど会社全体の理解と協力が得られると受けやすい。学生グループからは，検診云々よりも，前段の「子宮頸がんそのものを知らない」という実態が分かり，しかしこれからは人ごとではいられないという関心の高さが把握できた。

また検査精度向上については，県内の婦人科より提供してもらった子宮頸部の細胞よりDNAを抽出し，PCRにてHPV感染の有無，子宮頸がんへ移行するリスクの高い16種類のHPV遺伝子型の検出を行った。

当初，100種類あるほとんどのHPVの型を増幅可能であるコンセンサスプライマーを用いてPCRによりHPVゲノムのL1遺伝子を増幅し，シークエンス解析，BLASTマッチングでHPV遺伝子型を決定していた。しかしこの方法では，異なるウイルス遺伝子型が重複感染していた場合，コピー数の多いHPV型のみがPCRで増幅されるため，シークエンスによってハイリスク型の重複感染が検出できない場合や，ハイリスク型が存在している場合でもコピー数の多いローリスク型のみが検出されることが判明した。そこで今回の検査方法はL1遺伝子の検出はHPVの感染の有無に限定し，ハイリスクについては全て型特異的なプライマーにより増幅検出することとした。

平成23年度の結果では，細胞診検査においてNILM（陰性）と分類された検体や，ASC-US（定義不明な異形扁平上皮細胞）のように細胞診検査では判定できない検体からもハイリスク型のHPVが検出された。このことから子宮頸がん検診におけるHPV-DNA法は検査精度を向上させるとともに，ハイリスク型感染者に対して検診機会を増加させ，子宮頸がんの早期発見に寄与するものと思われる。

細菌班

カンピロバクターレファレンスセンター業務

（平成元年度～）

研究概要

地方衛生研究所技術協議会のカンピロバクターレファレンスセンター支部として北海道・東北・新潟ブロックからのカンピロバクター分離株の血清型別依頼に対応している。また，県内の散発患者由来株を含み，分離株については，Penner法とLior法による血清型別法の比較検討を行っている。さらに，薬剤耐性化の傾向を把握するため，分離株については，テトラサイクリン，エリスロマイシン，ナリジクス酸，ノルフロキサシン，オフロキサキン，シプロフロキサシンの6剤について，感受性試験を実施している。

平成23年は，埼玉県船橋市の食中毒疑い事例に関連して，患者2名中1名から*C. jejuni*を検出し，血清型別を実施した。また，県内の散発下痢症患者由来の53株（*C. jejuni* 52株，*C. coli* 1株）についてPenner法とLior法の比較を行った。さらに，そのうちの47株（*C. jejuni* 46株，*C. coli* 1株）について感受性試験を実施した。また，同様にして収去食品の検査及び厚生労働省からの依頼で行っている食品の汚染実態調査において分離された16株についても検査を実施した。

結果

散発下痢症患者由来の*C. jejuni* 52株のうち，Penner法で単一の血清型に型別可能であったものは35株（67.3%），Lior法では30株（57.7%）であった。*C. coli*1株はLior法で28型，Penner法では型別不能であった。

また，キノロン系薬剤に散発下痢症患者由来の*C. jejuni* 46株中25株（54.3%），*C. coli* 1株が耐性を示し，キノロン系薬剤への耐性化が進行していることが危惧された。また，*C. jejuni*では3株がエリスロマイシンに耐性を示した。一方，食品由来株（鶏肉）にも同様の耐性を示す株がみられたことから，鶏はカンピロバクターの汚染源としてだけではなく，耐性菌制御の観点からも重要であることが示唆された。

LAMP法による百日咳迅速診断の実施状況と検査結果の概要－地方衛生研究所技術協議会百日咳，ジフテリア，ボツリヌスレファレンスセンター業務－

（平成15年度～）

研究概要

百日咳は，特有のけいれん性の咳発作を特徴とする急性気道感染症である。我々は，県内の百日咳対策に資するために，地方衛生研究所技術協議会百日咳，ジフテリア，ボツリヌスレファレンスセンター業務の一環としてLAMP法による百日咳検査法を導入し，健康推進課と連携して県内の医療機関からの検査依頼に対応する体制を確立した。一方，2010年5月以降，全国的に百日咳様臨床症状を呈する疾患が流行した。全国のレファレンスセンターにおける検査結果では，これらの患者は百日咳，マイコプラズマ共に陰性であった。このため，国立感染症研究所と連携して，これらの患者にどのような呼吸器系病原微生物が関与しているか，各種呼吸器系病原微生物検出用のリアルタイム PCR法を導入して検討した。

結果

2011年4月1日から2012年3月31日までに送付された34検体中，2検体がLAMP法で百日咳菌陽性であった。また，マイコプラズマ（*M. pneumoniae*）は3検体がLAMP法で陽性となり，そのうち大館市内の中学生2名から検出されたマイコプラズマについて，23SrDNAのシークエンスを解析した結果，いずれもマクロライド耐性を惹起する変異を保有していることが確認されたことから，その結果を健康推進課と連携して感染症情報週報に掲載して周知を図った。マイコプラズマLAMP法は検体受領の2時間以内に結果を医療機関に報告可能である。また，マクロライド耐性変異のシークエンス解析も早い場合は検体受領の翌日，遅くても翌々日には医療機関に結果を報告することが可能であることから，本レファレンスセンター業務は百日咳だけではなく，県内におけるマイコプラズマ感染症の迅速診断にも寄与することが可能と考えられる。

一方，国立感染症研究所が開発した *Bordetella holmesii* 検出用 LAMP 法キットを使用して 194 検体の百日咳疑い患者から調製して凍結保存しておいた DNA 溶液を検討したところ，5 検体が *B. holmesii* 陽性であることが確認され，秋田県内で百日咳様呼吸器疾患患者が *B. holmesii* に感染している事実が初めて確認された。今後もLAMP法を使用して秋田県における百日咳，マイコプラズマ，*B. holmesii* の感染疫学について検討すると共に，医療機関からのマクロライド耐性マイコプラズマを含む検査依頼に迅速に対応する必要がある。

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的，疫学的調査研究解析機能の強化に関する研究

（平成18年度～平成24年度）

研究概要

食中毒原因菌や感染症原因菌とは異なり，地方衛生研究所においては薬剤耐性菌の検査や研究を実施する機会がこれまでは少なく，検査・解析技術の機能強化が課題となっている。本研究は厚生労働科学研究として国立感染症研究所と連携して実施した事業であり，地方衛生研究所細菌検査担当者を対象として薬剤耐性菌の検査・解析技術研修を実施すると共に，薬剤耐性菌の耐性機構等に関する調査研究を実施した。

結果

研究班に参加している9地方衛生研究所を対象として，メタロβラクタマーゼ遺伝子検出用PCRのコラボレーティブスタディーを実施し，病原体検出マニュアルに掲載予定のプライマーによりIMP-1，IMP-2，VIM-2遺伝子が正常に検出可能であることを確認した。一方，2003年7月から2006年9月に秋田市内の1医療機関から送付された14株のIMP-1遺伝子を保有する多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* の分子疫学的性状と耐性遺伝子の性状について基礎的な検討を実施した。XbaI PFGEパターンから分離株は同一起源と判断し得た。分離株が保有するClass 1 Integronのサイズは，株により約2.5 Kb単独，約3 Kb単独，約2.5 Kbダブレット，約1.3 Kbと2.5 Kbであった。4株のClass 1 Integronのシ

ークエンスを決定した結果，IMP-1，aacA4，aadA5を含むGene Casetteが同一Class 1 Integron中や，異なるIntegron間で組換え・転移した可能性が示唆された。今回供試した多剤耐性*A.xylosoxidans*の多くが尿由来株であり，一医療機関において継続的に分離されたことは，*A.xylosoxidans*が院内感染起因菌として重要である可能性を示唆している。今後も秋田県内における多剤耐性*A.xylosoxidans*の動向に注視する必要があると共に，分離株の多剤耐性機構についてさらなる検討が必要である。

結核菌のDNAシークエンスに基づいた分子疫学解析法と薬剤耐性の迅速検査法に関する調査研究

（平成22年度～平成23年度）

研究概要

秋田県の新登録結核患者のうち他者に感染させる危険性が高い喀痰塗抹陽性者は約60名で横ばい状態にあり，継続した対策が必要である。結核菌の分子疫学解析は，感染拡大防止の取り組みを支援するものであり，その解析手法としてはRFLP分析法が普及しているが，データの比較とデータベース化が困難であるという問題がある。一方，国内には結核治療の障害となる薬剤耐性結核菌が一定数存在している。本研究は，結核分子疫学解析技術であるJATA12-VNTR法を導入し，データベースを構築すること及び耐性遺伝子のDNAシークエンス変異を指標にした，薬剤耐性結核菌の迅速診断法を導入することを目的として実施した。

結果

結核菌の分子疫学的解析法としてJATA12-VNTR法を試行した。検体にはRFLP分析用に調製・保存しておいたDNA溶液121検体を供試した。

リファンピシンに対する耐性の有無を迅速確実に判定するための遺伝子診断法について検討した。リファンピシン耐性に関与するrpoB遺伝子内部の81 bp hot spotのDNAシークエンスを決定するために，365 bpを増幅するrpo105とrpoBPR7プライマーを使用し，シークエンスプライマーにPR17を使用した。検体には，保存DNA溶液121検体を供試した。

121検体のDNA溶液全てからJATA12-VNTR法によりプロファイルを算定可能であった。しかし，locusの繰り返しナンバーを電気泳動のみにより決定することには困難な場合もあった。

一方，121株についてリファンピシン耐性遺伝子のシークエンスを決定したところ，既知の耐性変異を示す株1株が確認された。リファンピシン耐性の有無を迅速に判定することは，治療と薬剤耐性結核菌の拡散防止上非常に重要である。本事業により導入した方法によると，リファンピシン耐性変異の有無を早い場合は翌日，遅くても数日以内に決定することが可能であり，従来の培養法では2週間程度の期間を要することと比較すると，著しい迅速化が可能となった。

今後も県内分離株を供してJATA12-VNTRのデータと耐性遺伝子のシークエンスデータを継続して蓄積する必要がある。

インフルエンザ菌の遺伝子型別法の検討と分離実態の解明

（平成23年度～平成24年度）

研究概要

インフルエンザ菌は，莢膜の違いにより7つの菌型に分けられる。菌型によっては重症化の危険があるため，分離株の菌型を調査することは極めて重要である。しかしながら，従来の血清型別法では型別が難しい場合が多い。そこで血清型別法に代わる方法として，PCR法による莢膜遺伝子の型別法を検討し，本菌による感染症の発生動向の的確な把握を可能にすること，さらに，県内の分離株を用いて，莢膜遺伝子の型別法を試行し，秋田県内における本菌の菌型ごとの分離実態を明らかにすることを目的に本調査研究を実施した。

平成23年度は，莢膜の遺伝子型別法を検討し，平成20年に県内で分離された菌株135株について血清型別法との比較を行った。また，平成24年1月に肺炎患者の血液から分離された株（HI-2544）についても莢膜の型別を実施すると共に，薬剤耐性に関わる遺伝子を調査した。

結果

血清型別によりa型に分類されたのは135株中2株，b型が3株，c型が1株，e型が1株であった。一方，莢膜産生に関与する遺伝子である*bexA*陽性となったのは135株中4株のみであり，残りの131株（97%）は無莢膜型と考えられた。莢膜株の内訳はb型が3株，e型が1株であった。b型及びe型については血清型別と遺伝子型別の結果が一致したが，血清型別によりa型に分類された2株とc型に分類された1株は一致しなかった。

HI-2544はe型の抗血清に特異的に凝集を示すとともに，PCRにおいてもe型に特異的なバンドが検出され，莢膜e型と判定された。薬剤耐性に関与する遺伝子としてペニシリナーゼ（bla_{TEM}，bla_{ROB}）及びPBPのアミノ酸変異の検出をPCRにて行ったところ，HI-2544はbla_{TEM}，bla_{ROB}に関しては両者とも（－）であったが，BLNAR group IIIに該当するPBPの変異が検出され，薬剤耐性菌と考えられた。

患者由来腸炎ビブリオ分離株のPFGEパターンの比較（厚生労働科学研究費補助金，食品の安全確保推進研究事業「食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築」）

（平成23年度～平成24年度）

研究概要

腸炎ビブリオ分離株のストレス耐性等について，食品を含めた環境由来株と患者由来株の比較試験に供する株を選定するため，秋田県及び青森県において平成16年から平成23年に患者から分離された腸炎ビブリオ分離株，O3:K6 80株，O3:K6以外33株，計113株についてPFGEを実施した。

結果

制限酵素*Sfi* Iを用いたPFGEのパターン解析によりPandemic Cloneに該当するO3:K6，O4:K68，O1:K25は同一のlineageに由来することが確認された。また，在来型の血清型の腸炎ビブリオにおいてはlineageが血清型と密接に関連する傾向があることが示された。一方，血清型が異なる株同士が同一クラスターを形成する場合があることも観察された。

この結果からPandemic Cloneのクラスターから O3:K6を8株，O1:k25，O1:Kut及びO4:K68については1株ずつ計11株，Pandemic Clone以外の株は24株，合計35株を選定した。当センターで選定した菌株を含む腸炎ビブリオ分離株のストレス抵抗性の解析等の研究結果は，「厚生労働科学研究費補助金，食品の安全確保推進研究事業：食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築　平成23年度　総括・分担研究報告書（研究代表者　小西良子）」を参照していただきたい。

ウイルス班

リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に関係するダニ類の実態調査（厚生労働科学研究費補助金，新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究」）

（平成21年度～平成23年度）

研究概要

アカツツガムシのみが保有するKato型*Orientia tsutsugamushi*は，病原性が強く，適切な治療が遅れた場合は重症化や死に至る危険性がある。そのため，媒介種であるアカツツガムシの生息状況，特にその地理的分布の確認とリケッチア保有などの情報が，公衆衛生上重要である。このことから，2011年度は，1964年の秋田県衛生科学研究所の患者発生地域記録と，その後1991年までの患者調査票を参考に，山形県境に近い湯沢市横堀地区の上流部から大仙市刈和野地区の中流部にいたる約70 kmの雄物川の河川敷を対象とし，アカツツガムシ生息実態調査を実施した。

また，昨年度までの調査で，アカツツガムシ生息密度は大仙市の花火大会会場内でも高いことが判明していたが，この情報提供を受け，大仙市役所からつつが虫病患者発生を防ぐための事前対応策として，会場内における殺虫剤散布の効果と薬剤試験についての検討が要望された。このことから，殺ダニ効果の高い薬剤の検

討についても実施した。

結果

1) アカツツガムシ生息域調査

調査範囲である雄物川上流部の湯沢市郊外ではアカツツガムシは確認されなかったが，三関地区より下流では確認されるようになり，横手市を流れる支流との合流点に近づくにつれ，多数確認されるようになった。一方で調査範囲の最下流部に位置する大仙市郊外北部では，アカツツガムシの生息が確認されなかったが，大仙市刈和野地区より上流では確認されるようになり，雄物川流域における最も高密度な生息域は花火大会会場とその周辺にあるキャンプ場や駐車スペースであった。この他，アカツツガムシは，河川沿いの公園や釣り場，船着き場などの水際でも確認されたが，どの調査地においてもアカツツガムシの生息環境は，水際の砂地あるいは中州など，降雨などにより浸水する箇所であり，河川敷内であっても，滅多に浸水しない箇所では確認されなかった。

2) 殺ダニ剤試験

共同研究者である愛知医科大学感染・免疫学講座の角坂照貴講師の元で，殺ダニ効果が期待される7種の農薬および1種の天然物由来薬剤を使用し，アカツツガムシ（花火大会会場付近で採集）とパブロフスキーツツガムシに対する殺ダニ効力が検討された。検討した農薬のうち，殺ダニ効力が高かったのは，フェニトロチオン（スミチオン乳剤），ビフェントリン（テルスタースプレー）とイベルメクチン（アイボメックトロピカル）で，試験に提供したツツガムシ幼虫全数が死亡した。しかし，ビフェントリン（テルスタースプレー）とイベルメクチン（アイボメックトロピカル）は，散布適応植物の制限等から，雑草地での使用には不適当と判断された。天然物由来のカラギーナン*においては，殺ダニ効力が認められたが，ダニ全体が薬剤で覆われることがその効果を発揮するにおいて必須条件であるため，野外の雑草地での使用は効力が限定されると思われた。スミチオン乳剤は，今回の検討で殺ダニ効果が確認された他，残効性が高く，ダニ以外にも広い殺虫スペクトラムを持ち，かつ使用可能植物も広域であるため，優れた効果が期待される。しかし，その反面，水産動植物系への影響が高いため，河川敷での散布は，注意が必要である。また，散布時期やタイミングは薬剤の残効性を高めるためにも，天候を十分に勘案し，実施することが望ましいと考えられる。

以上の調査から，今後も，地元自治体との相互協力の元，つつが虫病対策のための情報発信が必要と考えられた。とりわけ，観光地等の人の出入りが多い地点においては，重点的な調査継続と監視が肝要であると思われた。

＊村上英樹先生（秋田大学）開発試薬：カラギーナンとリンゴ酸水溶液，今回はこれに展開液を添加。

新型インフルエンザウイルスのタミフル耐性鑑別法の開発とその応用

（平成22年度～平成23年度）

研究概要

インフルエンザの治療薬であるタミフル（リン酸オセルタミビル）は，世界の在庫の7割を我が国が保有している。そのため，耐性ウイルスの出現状況のモニタリングが国からの依頼で各都道府県において行われている。具体的には新型インフルエンザウイルス（H1N1pdm09型）のノイラミニダーゼ遺伝子上の H275Y 変異（C→T への一塩基置換）を耐性マーカーとして検出することが求められており，この一塩基置換を簡便に調べる方法を開発することが本研究の目的である。また，他の型のインフルエンザへの適用（A 香港型の E119V 変異と R292K 変異，及び B 型の R150K 変異と D197N 変異）も目指している。具体的な方法として，上記の変異部位を境界とした，オリゴヌクレオチドを合成し，それらを DNA Ligase で結合させる LCR（Ligase Chain Reaction）を基本原理とした反応系を開発した。結合反応が成立するためには，合成オリゴヌクレオチドの末端が抽出したインフルエンザウイルスの塩基配列とペアになることが必要である。従って，一塩基置換によって末端がミスマッチになると結合が起こらないため，反応生成物を電気泳動で分析することで変異の有無を判定できる。また，この手法は反応系の設計が容易であるため，将来的に一塩基置換鑑別を必要とする事態が発生した場合に即応

可能というメリットがある。例えば，インフルエンザウイルスのPB2遺伝子の627番目のアミノ酸がグルタミン酸（トリ型）からリジン（ヒト型）に置換すると，人体内での増殖能が高くなる（毒性が増す）といわれている。本研究の応用例としてその変異箇所（G→A への一塩基置換）に着目したLCR反応系も構築した。

結果

平成23年度は，A香港型について33検体，B型について 10 検体を調べたが上記の耐性マーカーに相当する変異を有するウイルスは検出されず，全てタミフル感受性のウイルスであった。 応用例として構築した E627K 変異を検出する反応系を用いたところ，H1N1pdm09型では該当箇所の塩基が “G” と判定され，トリ由来インフルエンザウイルスの性状を引き継いでいることがわかった。一方，これまでに何度もヒトの間で流行が続いてきたA香港型とB型の該当箇所の塩基は “A” と判定され，正しく識別できていることが確認された。

食品中のウイルス検査実施に向けてのパンソルビン・トラップ法の汎用化（厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」）

（平成 22 年度～平成 24 年度）

研究概要

前年度まで実施された厚生労働科学研究事業において，医薬品として入手できるガンマグロブリン製剤を用い，ノロウイルス，サポウイルス，A 型肝炎ウイルス，アデノウイルス 41 型について幅広く適用可能な食品検査汎用プロトコルを開発することに成功した。その一方で，検査の根幹となる試薬であるパンソルビン（ホルマリン固定された黄色ブドウ球菌）の製造メーカーが1社しかなく，在庫切れや製造中止のリスクをはらんでいることが挙げられた。この問題に対処するため本研究では，黄色ブドウ球菌を培養することで相当品の自家調製を試み，市販品との比較検討を行った。

結果

2 L の培養スケールで得られた相当品は約 20 mL（食品 20 検体分）であった。NoV-GII/4 特異的ウサギ抗血清を用いた場合の回収率は，市販のパンソルビンで56%であったのに対し，自家調製した相当品で94%と 1.7 倍であった。また，各種ガンマグロブリン製剤を用いた汎用化プロトコルにおいても，相当品は市販品に対して 2.2～3.1 倍の回収率を示した。この内，米Baxter 社製「Gammagard」を用いた場合が最も好成績であり，市販品による回収率19%に対し，相当品は 57%（3.1 倍）であった。以上のことから，パンソルビンの相当品は有用であり，費用（市販品は食品 1 検体当たり約 1,000 円）の面でもメリットがあるものと考えられた。

食品理化学班

健康危機管理に対応した食品中の化学物質検査体制の基盤強化に関する研究

（平成 21 年度～平成 23 年度）

研究概要

中国製冷凍餃子による中毒事件をはじめとする食の安全を脅かす事件が相次ぎ，県民の食への不安が増大している。健康危機管理上，食中毒の原因である未知の化学物質を迅速かつ的確に特定できる体制を整備することが急務である。加えて，ポジティブリスト制の施行に伴い，基準が設定された農薬項目数が大幅に増大したことから，残留農薬分析の検査体制の強化が課題となった。食品中の残留農薬等を効率的かつ，迅速に分析するためには，一斉分析法の検討が不可欠であり，さらに，食の安全を脅かす事態に対応するためには精度を確保した分析体制の整備を図っていかなければならない。そのうえで分析可能項目数と分析可能な作物数の増加を目指す。一方で，広域的な食品への毒物混入事件などでは，正確な情報の入手と共有化が鍵を握ることになるため，北東北3県で残留農薬等について，情報交換してリストを作成し，緊急時の協力体制を構築する。

結果

新規に導入した GC-MS/MS の基礎的事項を検討し，稼働可能とした。約 300 農薬について，GC-MS/MS の測定条件（分離カラム，定量イオンの選定，低沸点農薬の分離温度等）を精査した結果，GC-MS に比べて分析時間を大幅に短縮する

を行ったところ，標準液を試料マトリックスで調製したものに PEG を添加する方法が最も精度が良好であった。

LC-MS/MS による有機リン系 50 農薬の一斉分析法として，試料を 90%アセトニトリル溶液で抽出後，25 倍希釈する方法を検討した。添加回収試験を実施したところ，真度，精度ともに良好で，一律基準に耐えうる十分な感度と精度を有していた。

畜水産物を対象とした LC-MS/MS による動物用医薬品の分析法として通知法Ⅲの改良を検討した。改良法により，98 医薬品について添加回収試験を行ったところ，概ね良好な結果が得られ，スクリーニング法として有効であることが確認できた。

環境理化学班

特用林産物の秋田ブランド化並びに機能性と安全性に関する研究（森林技術センターとの共同研究）

（平成 21 年度～平成 25 年度）

研究概要

松くい虫による松枯れ病を防止するために，秋田県内の松林ではネオニコチノイド系農薬のアセタミプリド，チアクロプリドが散布されている。これらの農薬は，自然に分解されるように設計されているが，環境中での挙動に関する調査は少ない。特に，松林に生育するキノコや山菜など特用林産物への影響に関しての調査は皆無である。そこで，松林中の土壌やキノコについて農薬残留量の変動を調査し，環境や特用林産物について安全性の確認を行う。

結果

平成 21，22 年の 6～11 月の期間，ネオニコチノイド系農薬が散布された日本海沿岸松林 5 地点で採取したキノコについて，残留農薬濃度の調査を行った。分析対象のキノコは，アセタミプリド散布地点で 26 検体，チアクロプリド散布地点で 34 検体を採取した。

抽出操作は，高速溶媒抽出装置 ASE-200（DIONEX 社）で行った。均一化した試料 5 g とハイドロマトリクス（Varian 社）を混合し，ASE セルに充填，40 ℃，2000 psi，5%含水アセトンの条件下で，2 回抽出操作を行ない，2 回の抽出液をあわせ，減圧濃縮によりアセトンを留去，メタノールで希釈し，測定溶液の調製を行った。測定は，LC-MS/MS API-4000（AB Sciex 社）で行った。

収穫最盛期の秋に採取したキノコを測定した結果，アセタミプリドが散布された地点のキノコは，すべて一律基準（0.01 μg/g）以下の濃度であった。一方，チアクロプリドが散布された地点では，分解物であるアミド体においては 1 検体だけ，わずかに基準を超える検体（0.02 μg/g）が確認されたが，散布されたチアクロプリド自体はすべて一律基準以下であった

排水処理施設における 1, 4-ジオキサン最適処理条件の検討

（平成 23 年度～平成 24 年度）

研究概要

1,4-ジオキサンは，水溶性が高く難分解性であることから，廃水からの除去が難しい物質である。排水処理施設の処理工程において，有機物の除去効果が期待できるのは生物処理工程であり，この工程で 1,4-ジオキサンを処理する実用的な運転条件を検討する。検討では，実験室レベルでの基礎実験により，処理に最適な温度，滞留時間などの条件を導きだし，実際の排水処理施設への適用を模索する。また，1,4-ジオキサンの公定分析法は煩雑であるため，迅速性が求められる緊急時等への対応が難しい。このため，操作が容易であり，多検体分析が可能なヘッドスペース GC/MS 法を迅速分析法として評価する。

結果

処理条件の検討では，多検体の分析が必要になるため，迅速分析法としてヘッドスペース GC/MS 法の評価を行った。従来の VOC 57 成分と同時の一斉分析メソッドでは，1,4-ジオキサンのピークカウントは，その他の VOC と比べて 1/100～1/1000 程度であり，当センターで定めた RRF 法での定量下限の定義（変動係数および適合率が 10%以内）に当てはめると 1,4-ジオキサンの定量下限は 0.05 mg/L であった。環境

基準（0.05 mg/L）を評価するには，定量下限を低くする必要があるため，ヘッドスペース条件についての検討を行った。試料量を増やし，気相容量を減らしたところ，VOC 成分の面積値は増えたが，1,4-ジオキサンの面積値は増えなかった。濃度によっては，VOC 成分と 1,4-ジオキサンが全く逆の挙動を示すため，試料量は 10 ml が適当と考えられた。また，塩析に用いる塩化ナトリウム量を過飽和加えても，大きな効果はなかった。次に加熱温度を 40，60，80℃に設定し比較したところ，1,4-ジオキサンは 80℃で最大となったが，塩化ビニル等の成分の面積値は減少した。このため，VOC 成分との一斉分析条件としては 60℃が適当と考えられた。GC/MS の条件では，1,4-ジオキサンの感度を上げるために，通常時よりも検出器電圧を高めに設定した。これらの条件により 1,4-ジオキサンの定量下限値は 0.01 mg/L まで改善することができた。環境基準（0.05 mg/L）をスクリーニングするには，十分な感度の一斉分析メソッドと考えられる。

実試料での妥当性を評価するために，公定法である固相抽出法とヘッドスペースーGC/MS 法での定量値の比較を 48 検体行った。その結果，両法の定量値は非常に良く一致していた。

環境保全班

玉川源泉の酸度上昇にも対応した実証的中和処理技術の開発とその対策がもたらす水質改善効果

（平成 22 年度～平成 24 年度）

研究概要

近年，玉川源泉の酸度上昇に伴い，玉川上流部の中和処理施設周辺における渋黒川で観測されている pH 低下の原因は，潜在的酸性成分を含む源泉の混入した強酸性水が湯川を流下し，渋黒川に流入することで生じていることを当センターが行った平成 20 年度～21 年度の研究で明らかにしてきた。そこで本研究では，中和処理施設周辺の酸性水に対して，酸度上昇時においても，効率的に酸性を弱め，田沢湖の水質管理目標である pH6 を達成するための中和技術の開発を目指す。具体的な内容の一つ目は廃棄物であるホタテ貝の貝殻等を原料とし，中和効率の高い中和材の開発とそれらをフィールドへ適用する技術開発，もう一つは，pH 改善を目的とした中和・酸性水対策に伴う，玉川上流部における ヒ素等の重金属の動態調査を実施し，副次的な水質改善効果について検証を行うことを目的としている。これと関連して，秋田県立大学の宮田准教授のグループと研究課題名「玉川温泉下流域の金属元素動態に係わる微生物群衆の機能解析」について，共同研究を行った。

平成 23 年度は，9 月，10 月の 2 回，玉川上流部における中和実証試験を行った。

使用した中和材は，同試験に必要な中和材の量を確保可能であるという理由から，平成 22 年度に開発した貝殻等を原料とする中和効率の高い中和材と同等の中和能力を有する工業用の酸化カルシウム（CaO）を用いた。

また，源泉及び中和処理放流水等の調査を実施し，中和処理による水質改善効果の検討を平成 22 年度に引き続き行った。

結果

上記の実証試験では，平成 22 年度に開発した貝殻を原料する中和効率の高い中和材を用いて試験を行う予定であったが，同中和材はラボスケールでの試験製造であったため，実証試験に必要と考えられる量の確保が難しかった。そのため，同等の中和能力を有する工業用の CaO を用いた試験結果（9 月実施）を以下に記述する。試験は中和処理施設周辺脇を流れる渋黒川で行い，CaO 粉末を水に溶かした濃度 10%の懸濁液を毎分 10 L ずつ，同河川に流し入れた。同河川の観測地点では，試験前の pH は 2.6 であったが，20 分後には 3.1 に改善，さらに 3 時間後には 7.4 まで pH が改善され中和が進んだ。

また，現行の中和処理施設による中和処理によって，中和処理放流水の水質やそれらの渋黒川合流後の水質を調査した結果，中和処理過程において源泉中の鉄から生成するシュベルトマナイト様の化合物によって，源泉中のヒ素またはクロムからなるオキソ酸が同化合物に取り込まれ，除去された後に放流されていることを明らかにした。この結果は，現行の中和処理における副次的効果といえる。これらの現象については，現在も引き続き調査を継続し，詳細を明らかにしたいと考えている。

湖沼生態系の持続的管理手法の開発に関する研究

（平成 22 年度～平成 24 年度）

研究概要

（独）国立環境研究所の地方公共団体環境研究機関等との共同研究課題募集に応募したもので，同研究所，岡山県環境保健センター，名古屋市環境科学調査センターの共同研究であり，神戸大学の研究者をアドバイザーとしている。生態系操作は，1980 年代に欧米を中心に応用されるようになり，我が国でも 2000～2003 年に長野県の白樺湖で行われた試験における透明度の改善が花里孝幸により報告され，近年では諏訪湖においてもアオコ対策の一つとして検討されるなど，新たな技術として注目されるようになってきた。しかし，これを実際に応用しようとするとき，生態系への慎重な配慮とともに，湖の利水などの利害関係者との合意形成が必要と予測され，そのためには，十分な根拠に基づく予測により見通しを示すことのできる技術確立が望まれる。本研究では，この技術確立を目的として，次のような目標を設定して研究している。

1.内部生産の把握手法の確立
2.生態系内の種の競争関係の定量化手法確立
3.生態系と水質の関係の定量化手法の確立

結果

平成 23 年度は，タンクモデルを用いモデル構築に必要な流入負荷量を推計した。また，魚類の現存量を推計しそれらの情報を共有した。さらに，解析ツールとして Excel などの数理演算アプリケーションソフトを利用し 7 種生物系のシミュレーションを行った。

Ⅲ　調査研究報告

母子健康手帳改正にともなう胆道閉鎖症早期発見に向けた便色カラーカードの導入

安部真理子　　秋野和華子　　柴田ちひろ　　野口篤子[*1]

2012年4月1日から母子健康手帳が10年ぶりの改正となり，生後1ヶ月の記録欄ページに赤ちゃんの便色カラーカードが綴られることになった。これは小児の肝胆道疾患の中で死亡率が最も高い胆道閉鎖症を早期に発見するための便色見本のカラーカードであり，筑波大学小児科の松井陽教授（現国立成育医療研究センター病院長）が考案したものである。当センターでは2006年度からこのカラーカードをもとに秋田県版カラーカードを作成し保護者に配布してきた。この便色カラーカード導入後から2011年度までに秋田大学医学部附属病院において胆道閉鎖症と診断された患児は8名であり，胆道閉鎖症関連疾患として，サイトメガロウイルス肝炎，白血病，アラジール症候群，一過性骨髄増殖症，胆汁うっ滞症などの疾患が確認された。また，便色カラーカードを導入することにより保護者における赤ちゃんの便色への関心度が高くなるなどその有用性が確認された。

1. はじめに

母子健康手帳の歴史は1942年にさかのぼる。最初は妊娠及び分娩時の母体死亡を軽減する目的から妊産婦手帳として開始された。その後，1948年には終戦後の生活物資不足による配給欄の有効性を保ち，母子双方の健康管理を行うため母子手帳という名称に改正された。さらに，1965年には名称が母子手帳から母子健康手帳と変更になり10年ごとに様式の一部が改正されてきた。今回は2002年から10年経過しての改正に至る[1]。新しくなった母子健康手帳の主な改正内容は

1. 妊娠期の記載欄の充実
2. 乳幼児の記載欄の充実
3. 乳幼児身体発育曲線の改定
4. 便色の確認の記録
5. 予防接種記録欄の充実

である[2]。本報では4.の「便色の確認の記録」に関して新しく母子健康手帳に綴られた便色カラーカードの紹介をする。また，2006年度から実施している秋田県の便色カラーカード使用の実績等について報告する。

2. 便色カラーカード

2.1 作成の背景

胆道閉鎖症は妊娠末期，出生直後，あるいは生後に肝外胆管の一部もしくは全部が閉塞し胆汁が腸管に排出できない病気であり黄疸を主徴とする。このまま放置すれば胆汁性肝硬変から肝不全となり死亡する不治の病とされてきた[3]。現在は葛西手術（肝門部と腸管を縫い合わせる手術）等の治療法があり，早期に発見し手術をすることにより予後の生存率が高くなるとの報告がある。これを受けて，胆道閉鎖症早期発見の手法として筑波大学小児科の松井陽教授が便色カラーカードを考案した。

2.2 松井方式便色カラーカードについて

松井教授が考案した便色カラーカードは便中に胆汁が分泌されていない白い便色から健康な便色までの7種類の便色の見本である。往復はがき片面に便色見本のカラーカードが印刷され保護者がその便色見本と赤ちゃんの便を比較して何番の色に近いかを記入して返信用はがきを送付もしくは提出するはがき式回収方法である。参考1に札幌市衛生研究所で使用している様式を掲載した。なお，便色カラーカード（往復はがき）

[*1] 秋田大学医学部付属病院小児科

は母子健康手帳とともに保護者に配布された。

2.3　秋田県版便色カラーカード

当センターでは，松井方式（はがき式回収方法）とは異なる啓発方式の秋田県版カラーカードを作成した。（参考2）。カラーカードの便色見本は，考案者（松井陽教授）の厳正なる印刷指示にもとづいて印刷した。

県内の産科医療機関に退院時の保護者へ便色カラーカーの配布を依頼した。便色カラーカードは母子健康手帳に挟めておき，赤ちゃんの便色の確認に使用してもらうこととした。はがき式のように回収は実施していない。配布は県内の産科医療機関で出生したすべての赤ちゃんを対象とした。

3.便色カラーカードの利用実績と有用性

3.1　利用実績

考案者の松井教授の関係自治体である栃木県や茨城県では1994年から便色カラーカードを導入している。秋田県においては松井式（はがき式回収方法）カラーカードの様式を啓発方式に変更し，2006年6月から使用してきた[4,5]。2011年度までに便色カラーカードを導入した自治体は栃木県，茨城県，秋田県を含め，札幌市，岩手県，岐阜県，石川県，北海道，新潟県，富山県，神奈川県，宮城県の12の自治体であった。しかし，自治体ごとにさまざまな形式のカラーカードが配布されており，配布方法や回収の有無を含めて，統一がされていなかった[6,7]。また，カラーカードの導入を希望しているにもかかわらず予算の捻出が困難な自治体があるなど課題があった[8]。

3.2　便色カラーカードの有用性

栃木県の報告では1994年の便色カラーカード導入開始から2004年までの受検者（はがき返送）総数は115,226名であり，出生数からみた受検率は86.9%であった。また，発見率は約9,600人に1人となっている。早期発見された14名の患児のうち9名が生後60日以内に葛西手術を受け，10名が黄疸及び肝移植なしに生存している[11]。2006年からこのカラーカードを全土で導入している台湾ではCheng-Hui Hsiaoらの報告によると，便色カラーカード普及後に生後60日以内の胆道閉鎖症発見率が72.5%から97.1%に上昇したとされている。また，生後60日以内の葛西手術施行率は60%から74.3%に増加し，葛西手術後3ヶ月の減黄率も37%から59.5%に飛躍したとされており[12]，外国においても有用性が確認されている。

3.3 秋田県における実績

秋田県においては，2006年度のカラーカード導入後から2011年度までの6年間に秋田大学医学部附属病院において胆道閉鎖症と診断された患児は8名だった。当該期間の新生児マス・スクリーニング検査受付数は46,779人であったことから5,847人に一人の発見率となり，松井教授の報告（9,600人に一人）と比較してやや高い発見率（発症率）となっていた。また，胆道閉鎖症以外に胆道閉鎖症関連疾患として，サイトメガロウイルス肝炎，シトリン欠損症，白血病，アラジール症候群，一過性骨髄増殖症，胆汁うっ滞症等と診断された患児もいた。

しかし当センターの啓発方式は保護者からのはがき回収を行っていないため，胆道閉鎖症や胆道閉鎖症関連疾患の患児診断においてカラーカードと便色の比較が早期発見につながったかどうか把握できなかった。カラーカードの有用性について検討するため，当センターでは毎年関係医療機関に対してアンケートを行っている。その結果，保護者において，胆道閉鎖症や便の色に対する関心度が高くなっていることが確認され，カラーカードは上記胆道閉鎖症および関連疾患の早期発見に繋がっているものと推察される。

4．新しい母子健康手帳の便色確認の記録

今回の母子健康手帳の改訂で全国的に統一された便色カラーカードが1ヶ月頃の記録欄ページに綴じられ，すべての赤ちゃんに使用が可能になった。従来の母子健康手帳には便の色見本はなく，胆道閉鎖症について注意喚起する文章が欄外に記載されていただけであった。新しい便色カラーカード（参考3）は1番から7番までの便色見本が2枚印刷されている。1枚はおむつの便と比較しやすいように切り取りができるようになっており，残りの1枚はそのまま保管できるようになっている。さらに，生後2週，生後1ヶ月，生後1〜4ヶ月ごとに記録欄が設けられた。

母子健康手帳の作成や印刷は全国の各市町村

に委ねられているため，便色カラーカードの印刷に対しては，生命線である色に対して厳密な印刷規定が設けられた[9]。そして，はがきを利用する回収方式から，当センターと同様の啓発方式となった。また，このカラーカードの使用方法については，産科・小児科の医師や市町村の保健医療関係者に向けたマニュアルが配布された[10]。

このカラーカードの使用方法を参考 4 に示した。その概略は，保護者の比色で便の色が 1 番から 3 番に近い場合は実際におむつを小児科医等に持参して確認する。その上で便色が 1 番から 3 番で且つ黄疸等の症状がある場合は胆道閉鎖症が強く疑われるので小児科もしくは小児外科等の精密医療機関の受診を勧めるとされている。

今回の母子健康手帳に便色カラーカードの綴じ込みが可能になった背景には松井教授の尽力が大きい。今後，秋田県版のカラーカードは新しくなった母子健康手帳のカラーカードに引き継がれるが，当センターでは，母子健康手帳に新しいカラーカードが綴られたことに関する説明や新 Q&A パンフレットをホームページ上に掲載している。今後も保健所や医療機関と連携を図りながらさらなる啓発に努めていきたいと考えている。

５．まとめ

1)便色カラーカードの有用性は認識されていたが，これまで秋田県を含めた一部の自治体しか使用されていなかった。

2)母子健康手帳に活用しやすい便色カラーカードが綴じられた。

3)すべての自治体が同じ形式のカラーカードが使用可能になった。

参考文献

1) 馬場征一: 母子健康手帳の改正について，公衆衛生, **76**, 4, 2012, 333-335.

2) 厚生労働省: 母子保健法施行規則の一部を改正する省令の公布について，保健衛生ニュース, **1642**, 2012, 52-54.

3) 水田祥子代: 胆道閉鎖症，日本小児科学会雑誌, **108**, 1, 2004, 12-19.

4) 安部真理子他: 胆道閉鎖症啓発カラーカードの試みについて，秋田県健康環境センター年報, **2**, 2006, 33-40.

5) 安部真理子他: 胆道閉鎖症及び関連疾患の早期発見の一手法－松井式カラーカードの応用－，秋田県公衆衛生学雑誌, 5, 1, 2007, 24-27.

6) 松井陽他: 胆道閉鎖症，小児内科，**26**, 12, 1994, 121-126.

7) 水嶋好清他: 札幌市における胆道閉鎖症マススクリーニング，日本マス・スクリーニング学会誌, 12, 1, 2002, 23-28.

8) 守島亜季他: 胆道閉鎖症に対する便色カラースクリーニングのその後小児内科, **43**, 6, 2011, 1082-1084.

9) 厚生労働省: 胆道閉鎖症等の早期発見へ体制整備を，保健衛生ニュース, **1641**, 2012, 2-3.

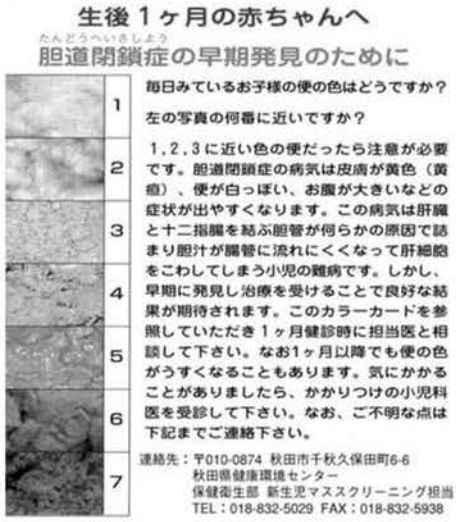
10) 厚生労働省: 母子健康手帳の便色カード活用でマニュアル，保健衛生ニュース，1654, 2012, 8-11.

11) 松井陽他: 便色調カラーカード法による胆道閉鎖症のマス・スクリーニング，小児内科, **36**, 12, 2004, 1948-1949.

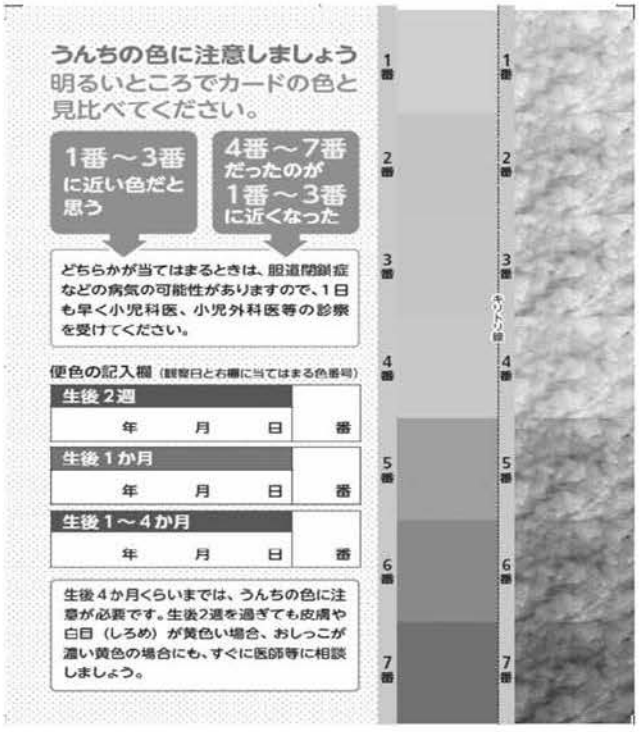
12) Cheng-Hui Hsiao 他: Universal Screening For biliary Atresia Using an Infant Stool Color Card in Taiwan, Hepatology, **47**, 2008, 1233-1240.

参考 1
はがき式便色カラーカード（札幌市衛生研究所）

参考 2
秋田県版啓発便色カラーカード

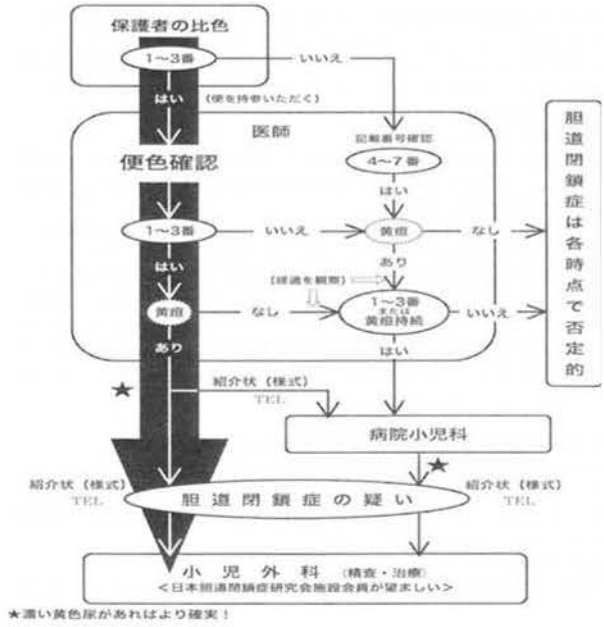


参考 3
新便色カラーカード



参考 4
胆道閉鎖症早期発見フローチャート

図　胆道閉鎖症早期発見のためのフローチャート



新型インフルエンザウイルスのタミフル耐性鑑別法の開発とその応用

斎藤博之　佐藤寛子　藤谷陽子　秋野和華子　千葉真知子　安部真理子

当センターでは，新型インフルエンザ（A/H1N1pdm09 型インフルエンザ）対応の一環として行われているタミフル耐性サーベイランスにおいて，ノイラミニダーゼ（NA）遺伝子の耐性マーカー部位を簡便な手順で鑑別できる方法を開発した。本法はリガーゼ連鎖反応（LCR）を基本原理とし，A ソ連型と A/H1N1pdm09 型のタミフル感受性ウイルスと耐性ウイルス，合計 4 種類の NA 遺伝子を鑑別できるようにデザインした。また，本法の応用例として，A 香港型と B 型のタミフル耐性マーカー部位の鑑別，及びウイルスの増殖能に関わる PB2 遺伝子の変異箇所の鑑別が行える反応系を構築した。A ソ連型 50 検体，A/H1N1pdm09 型 71 検体，A 香港型 85 検体，B 型 10 検体において LCR によるタミフル耐性マーカー部位鑑別結果はシークエンス解析結果と完全に一致し，簡便法として有用であることが示された。また，PB2 遺伝子の変異箇所の識別も正しく行えることが確認された。LCR の反応系はどのような一塩基置換に対しても焦点を当ててデザインできるため，インフルエンザのタミフル耐性問題以外にも幅広く応用が可能であると考えられた。

1. はじめに

2009 年 4 月のメキシコに端を発した新型インフルエンザ[1]（以降 A/H1N1pdm09 型と表記）の流行は，5 月の国内初発例を経て全国に拡大した。この間に様々な感染症対策が講じられたものの，医療分野における混乱に加えて社会的なパニックによる損失は非常に大きいものとなった。ワクチンの生産には時間を要するため，治療薬であるタミフル（オセルタミビル）が対策の柱の一つとして位置付けられ，接触者等への予防投与も行われた。一方で，2007/2008 シーズンからタミフルに耐性を持つインフルエンザウイルス A ソ連型の割合が世界的に増加し，翌 2008/2009 年シーズンではほとんど全ての A ソ連型が耐性を獲得したことから，A/H1N1pdm09 型インフルエンザにおいても同様の問題が危惧された。A/H1N1pdm09 型インフルエンザ対策の一環としてウイルス学的サーベイランスが実施され，その項目の中にタミフル耐性の調査が含まれていたが，その調査を実施するためにはノイラミニダーゼ（NA）遺伝子のシークエンスを決定し，マーカー部位（H275Y）[2] の塩基置換（C→T）を確認する必要があった。しかしながら，前述のパニックにより，検査業務を直接担当する地方衛生研究所（地衛研）のマンパワーを遥かに凌駕する検体が連日頻回にわたって搬入されるに至り，シークエンスを確認する余裕が全く無いのが実状であった[3]。また，インフルエンザのタミフル耐性問題以外でも，病原体遺伝子の一塩基置換を鑑別しなければならないケースは多数存在し，将来的に同様の局面が繰り返し訪れるものと予想された。本研究では，こうした困難な状況を打開するために，任意の一塩基に焦点を当ててその置換を簡便に判定できる LCR （Ligase Chain Reaction ：リガーゼ連鎖反応）[4-6]に着目し，焦眉の急であったタミフル耐性鑑別用の反応系を開発した[7]。開発に当たっては，既にほぼ全てが耐性となっている A ソ連型と A/H1N1pdm09 型の交雑体が生じた場合も視野に入れ，4 種鑑別（A ソ連型・A/H1N1pdm09 型，それぞれの感受性ウイルス・耐性ウイルス）が行えることを目的とした。さらに，他の型への応用例として A 香港型におけるタミフル耐性マーカー部位（E119V 変異と R292K 変異の 2 か所）[8]，同じく B 型におけるマーカー部位（R150K 変異と D197N 変異の 2 か所）[9]についても鑑別用の反応系を構築した。また，タミフル耐性以外の応用例として，インフルエンザウイルスのヒト体内における増殖能に関与するといわれている PB2 遺伝子の E627K 変異[10]を検出する反応系も設計した。

2. 方法

2.1 研究材料

インフルエンザウイルス A ソ連型については MDCK 分離株として 50 株（感受性 10 株，耐性

40株）を用いた。A/H1N1pdm09型インフルエンザウイルスについては，MDCK分離株として10株，鼻咽頭拭い液からのPCR増幅産物として61検体を用いた。A香港型インフルエンザウイルスについては，MDCK分離株として38株，鼻咽頭拭い液からのPCR増幅産物として47検体を用いた。B型インフルエンザウイルスについては，MDCK分離株として10株を用いた。また，A/H1N1pdm09型，A香港型，B型の耐性ウイルス対照として，GenBankに登録されている塩基配列を基に該当部分を機械的に合成したDNA断片を用いた。

2.2 試薬類

2.2.1 耐熱性リガーゼ

「9°N DNA Ligase」（NEB，コード#M0238S）

2.2.2 高感度ゲル染色剤

「GelRed」（ニッポンジーン，コード518-24031）

2.2.3 アガロースゲル

「Agarose 36GU」（フナコシ，コードGA-001）

2.2.4 寒天末

和光純薬，コード016-11875

2.2.5 合成オリゴDNA

表1, 6, 9, 12に示す塩基配列のとおり（5’末端リン酸化DNAはHPLC精製グレード，他は簡易カートリッジ精製グレード）

2.2.6 RNA抽出

「QIAamp Viral RNA Mini Kit」（QIAGEN，コード52906）

2.2.7 逆転写酵素

「ReverTra Ace」（東洋紡，コードTRT-101）

2.2.8 ランダムプライマー（タカラバイオ，コード3802）

2.2.9 Taq DNA Polymerase（グライナー，コードTAQ-1）

2.3 LCRの操作手順

2.3.1 インフルエンザウイルスAソ連型，及びA/H1N1pdm09型の場合

全体のフローチャートを図1に示した。定法に従い，分離株または鼻咽頭拭い液からのRNA抽出とランダムプライマーを用いた逆転写反応を行った。得られたcDNAに対して，3種のプライマー「USSR-N1-FS」，「SW-N1-FS」，「H1N1-NA-R」を用いたPCRによる予備増幅（94℃ 30秒－59℃ 30秒－72℃ 30秒，35サイクル）を行い，エチジウムブロマイドを含む2.5%アガロースゲル電気泳動で増幅バンドを確認した。増幅産物は一部についてシークエンスを解析するのと同時に，増幅サイズに応じてAソ連型，またはA/H1N1pdm09型のLCRによるタミフル耐性鑑別反応を行った（図1）。

予備増幅において275 bpのバンドが認められた場合は，表2及び3に示す反応系を調製し，217 bpのバンドが認められた場合は表4及び5に示す反応系を調製した。LCRによる鑑別反応は，「94℃ 3分－70℃ 3分」を1サイクル行った後，「94℃ 30秒－70℃ 30秒」を20サイクル行った。その後，GelRedを含む5%アガロースゲル（アガロース2.5%，寒天末2.5%の混合）で電気泳動を行い，50 bpのプローブが結合して99 bp（1 bpのオーバーラップ有り）になるかどうかを観察した。また，こうして得られた判定結果とシークエンスによって得られた塩基情報と比較して，正しく鑑別されているかどうかを確認した。

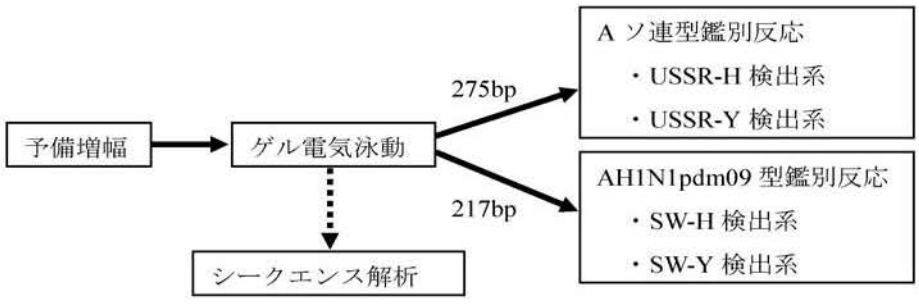


図1　LCRによるタミフル耐性鑑別のためのフローチャート

2.3.2 インフルエンザウイルスA香港型の場合

検体から抽出したRNAをもとに，ランダムプライマーを用いた逆転写反応によってcDNAを合成した（2.3.1と同一の反応）。得られたcDNAに対して，プライマー「N2-F」と「N2-R」による予備増幅（温度条件は2.3.1と同一）を行い，2.5%アガロースゲル電気泳動にて698 bpのバンドを確認した。LCRによるタミフル耐性鑑別反応は表7及び8に示す反応系により行った。反応は「94℃ 3分－65℃ 3分」を1サイクル行った後，「94℃ 30秒－65℃ 30秒」を20サイクル行った。その後，GelRedを含む5%アガロースゲルにて電気泳動を行い，結合プローブバンドの有無（E119V変異では119 bp，R292K変異では99 bp）を観察した。また，この判定結果と，シークエンスによって得られた塩基情報を比較して正しく鑑別されているかを確認した。

2.3.3 インフルエンザウイルスB型の場合

検体から抽出したRNAをもとに，ランダムプライマーを用いた逆転写反応によってcDNAを合成した（2.3.1と同一の反応）。得られたcDNAに対して，プライマー「BN-F」と「BN-R」による予備増幅（温度条件は2.3.1と同一）を行い，2.5%アガロースゲル電気泳動にて318 bpのバンドを確認した。LCRによるタミフル耐性鑑別反応は表10及び11に示す反応系により行った（温度条件は2.3.2と同一）。その後，GelRedを含む5%アガロースゲルにて電気泳動を行い，結合プローブバンドの有無（R150K変異では119 bp，D197N変異では99 bp）を観察した。また，この判定結果と，シークエンスによって得られた塩基情報を比較して正しく鑑別されているかを確認した。

2.3.4 インフルエンザウイルスPB2遺伝子変異の場合

検体から抽出したRNAをもとに，ランダムプライマーを用いた逆転写反応によってcDNAを合成した（2.3.1と同一の反応）。得られたcDNAに対して，プライマー「PB2-F」と「PB2-R」による予備増幅（温度条件は2.3.1と同一）を行い，2.5%アガロースゲル電気泳動にて318 bpのバンドを確認した。LCRによるトリ型かヒト型かの鑑別反応は表13及び14に示す反応系により行った。反応の温度条件 94℃ 3分－70℃ 3分を1サイクルに続き，94℃ 30秒－65℃ 2分を20サイクル行った。その後，GelRedを含む5%アガロースゲルにて電気泳動を行い，99 bpの結合プローブバンドの有無（トリ型ではE627検出系，ヒト型ではK627検出系に出現）を観察した。また，この判定結果と，シークエンスによって得られた塩基情報を比較して正しく鑑別されているかを確認した。

3. 結果

3.1 インフルエンザウイルスA ソ連型，及びA/H1N1pdm09型における耐性鑑別

予備増幅のPCRにおいて3種類のプライマーを使用することにより，A ソ連型では275 bp，新型で217 bpの増幅産物が得られるように反応系をデザインした。図2に示すようにA ソ連型とA/H1N1pdm09型は増幅サイズによって明瞭に区別できた。A/H1N1pdm09型の検体であるにもかかわらず，A ソ連型の増幅サイズを示した場合（またはその逆）は，交雑体の可能性があるが現時点では観察されていない。

予備増幅産物に対してLCRの鑑別反応を行った。ここでは，H 反応系（タミフル感受性株に反応）とY反応系（タミフル耐性株に反応）の両方を行い，プローブの結合の有無によりH275Yに関する塩基置換を鑑別した。図3にはシークエンス解析でタミフル感受性と判定されたA ソ連型2株と，耐性と判定された10株についてLCRの結果を示したが，前者はH反応系でのみ，後者はY反応系でのみ結合プローブのバンドが観察された。同様に図4ではシークエンス解析でタミフル感受性と判定されたA/H1N1pdm09型12株と，対照として化学合成した耐性株の塩基配列をLCRで鑑別したが，前者はH反応系でのみ，後者はY反応系でのみ結合プローブのバンドが認められた。図5にはA/H1N1pdm09型，及びのA ソ連型のH反応系とY反応系の交叉試験結果を示したが，4種類の反応系はそれぞれ特異的で交叉しないことがわかった。

A ソ連型のタミフル感受性株10株と，耐性株40株について本法による鑑別を試みたところ，シークエンス解析によって得られた結果と一致した。A/H1N1pdm09型の71検体（分離株10，

PCR 増幅産物 61）については，本法を用いることで 2 検体（図 6,7）から耐性ウイルスを検出し，他は感受性のウイルスであった。シークエンス解析で確認した結果とも一致していた。

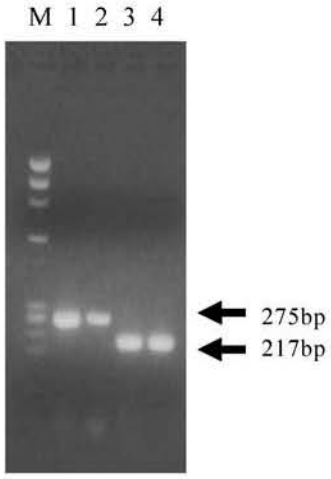


図 2　予備増幅産物のアガロースゲル電気泳動

M: φX174/HaeⅢ, 1: A ソ連型感受性株, 2: A ソ連型耐性株,
3: A/H1N1pdm09 型感受性株,　4: A/H1N1pdm09 型耐性株配列（化学合成 DNA）

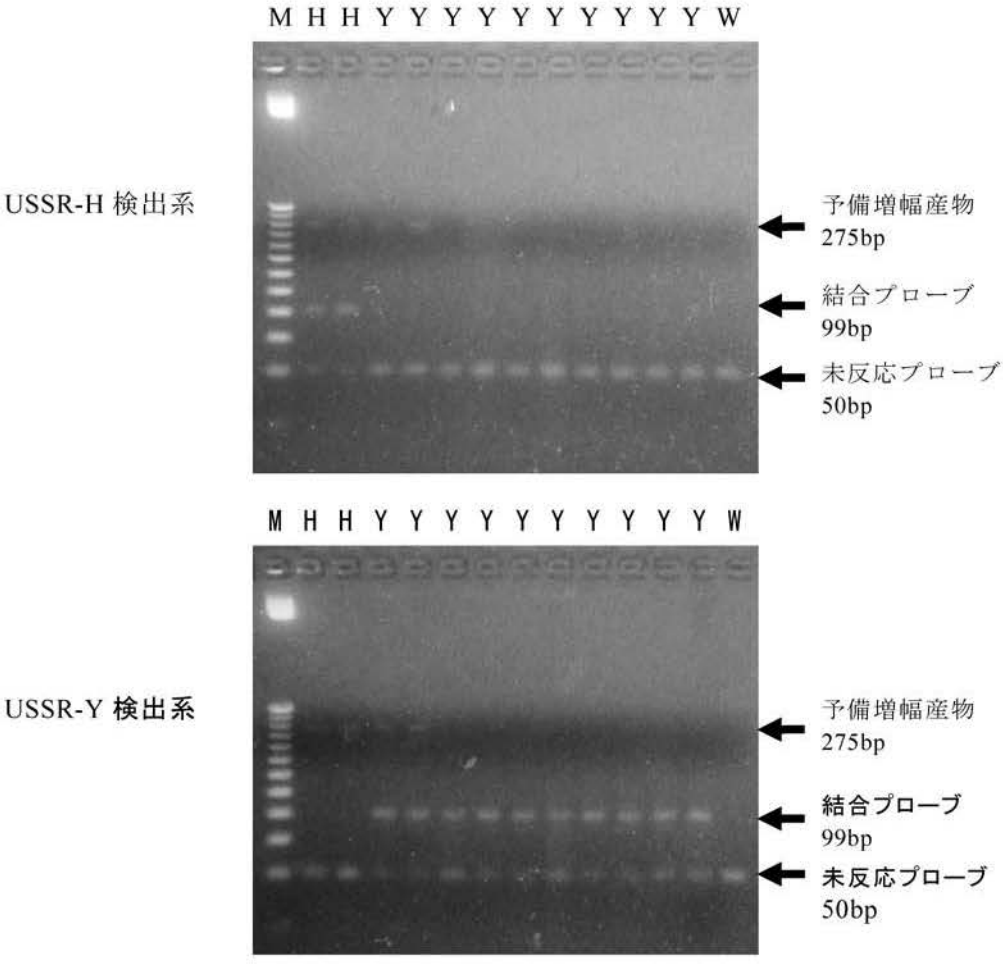


図 3　A ソ連型タミフル耐性鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動

M: 25bp marker、H: A ソ連型感受性株、Y: A ソ連型耐性株、W: 蒸留水

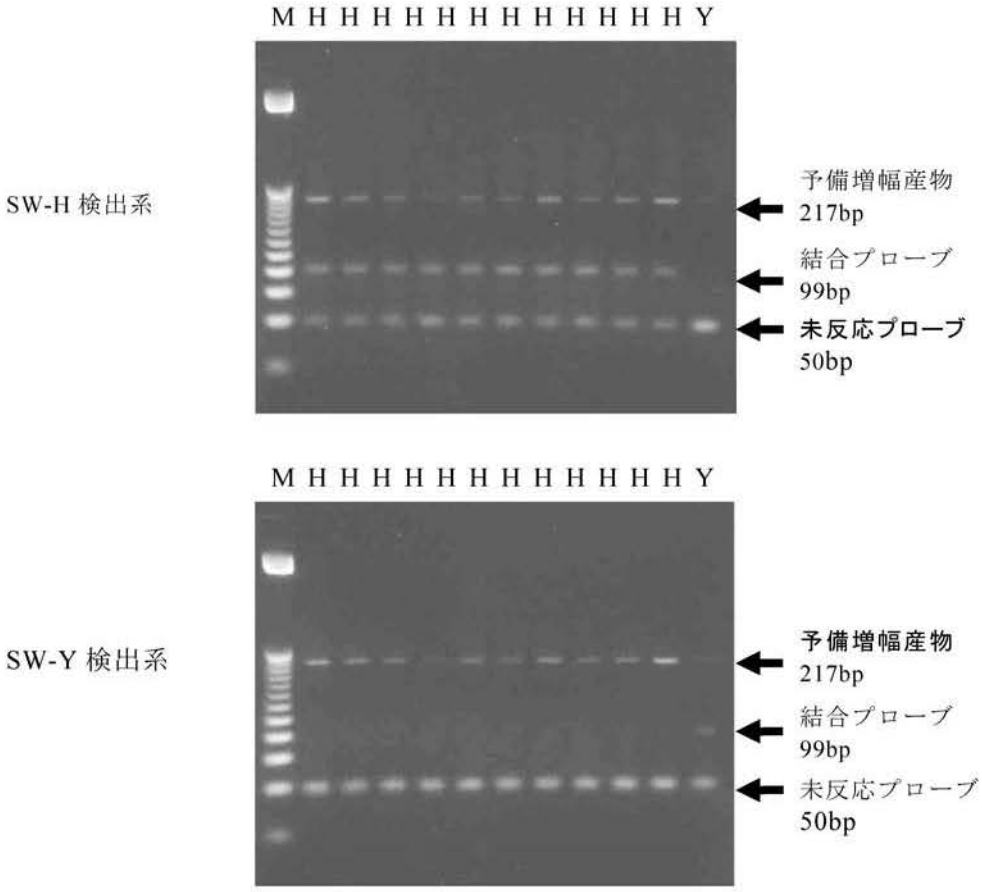


図４　A/H1N1pdm09 型タミフル耐性鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動

M: 25bp marker、H:A/H1N1pdm09 型感受性株、Y: A/H1N1pdm09 型耐性株配列（化学合成 DNA）

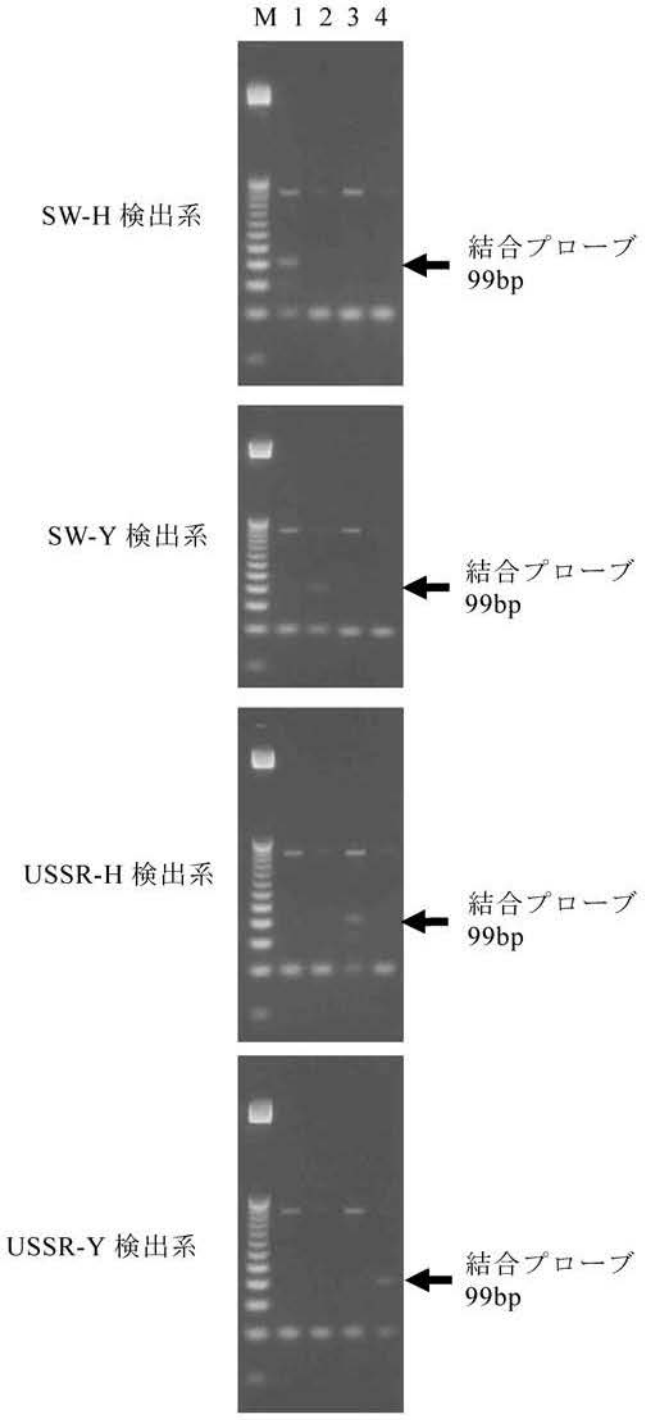


図 5　A/H1N1pdm09 型と A ソ連型との交叉反応

M: 25bp marker,　1: A/H1N1pdm09 型感受性株,
2: A/H1N1pdm09 型耐性株配列（化学合成 DNA）,
3: A ソ連型感受性株, 4: A ソ連型耐性株

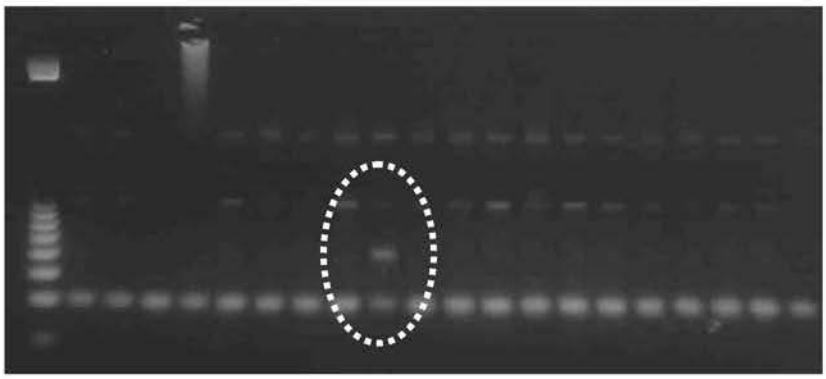


図６　秋田県で検出されたタミフル耐性ウイルス（実例 1）
平成 22 年 1 月 25 日採取：横手保健所からの行政依頼（福祉施設）

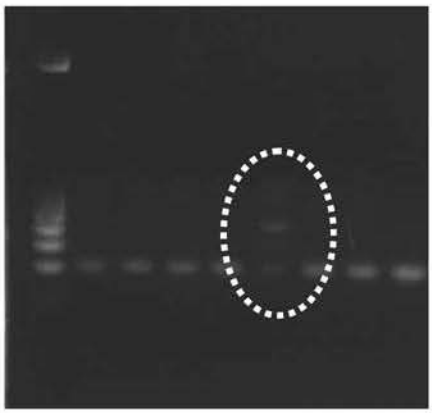


図７　秋田県で検出されたタミフル耐性ウイルス（実例 2）
平成 22 年 2 月 3 日採取：感染症発生動向調査対象医療機関

3.2 インフルエンザウイルス A 香港型における耐性鑑別

インフルエンザウイルス A 香港型については，タミフル耐性鑑別においてよく用いられる 2 か所のマーカー部位（E119V 変異，R292K 変異）を同時に検出できる反応系を構築した。どちらのマーカー部位も感受性であった場合には E119-R292 検出系のアガロースゲルに 2 本の結合プローブのバンドが出現する（図 8 レーン A）。これらの内，一方が耐性であった場合には，該当するバンドが E119-R292 検出系から消えて，V119-K292 検出系の方に出現する（図 8 レーン B，C）。両方が耐性であった場合には V119-K292 検出系に 2 本のバンドが出現する（図 8 レーン D）。図 8 に示した検体（レーン 1～8）はいずれも E119-R292 検出系の方に 2 本のバンドが認められたため，感受性であると判定された。全部で 85 検体（分離株 38，PCR 増幅産物 47）について本法を試みたところ，全て感受性であり，シークエンス解析の結果とも一致した。

3.3 インフルエンザウイルス B 型における耐性鑑別

インフルエンザウイルス B 型については，タミフル耐性鑑別においてよく用いられる 2 か所のマーカー部位（R150K 変異，D197N 変異）を同時に検出できる反応系を構築した。どちらのマーカー部位も感受性であった場合には R150-D197 検出系のアガロースゲルに 2 本の結合プローブのバンドが出現する（図 9 レーン A）。これらの内，一方が耐性であった場合には，該当するバンドが R150-D197 検出系から消えて，K150-N197 検出系の方に出現する（図 9 レーン B，C）。両方が耐性であった場合には K150-N197 検出系に 2 本のバンドが出現する（図 9 レーン D）。図 9 に示した検体（レーン 1～4）はいずれも R150-D197 検出系の方に 2 本のバン

ドが認められたため，感受性であると判定された。MDCK 分離株 10 株について本法を試みたところ，全て感受性であり，シークエンス解析の結果とも一致した。

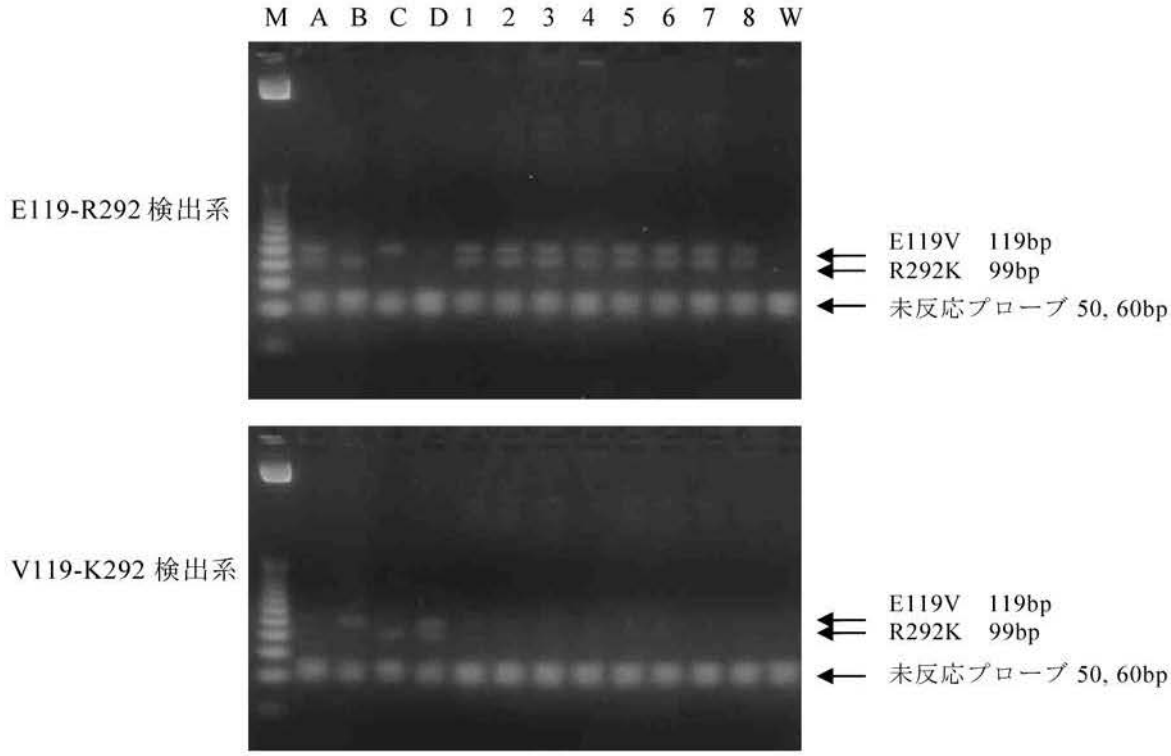


図 8　A 香港型タミフル耐性鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動

M：25bp Ladder，A：両方感受性，B：E119V 耐性，C：R292K 耐性，D：両方耐性，
1～8：T 病院患者由来ウイルス，W：蒸留水

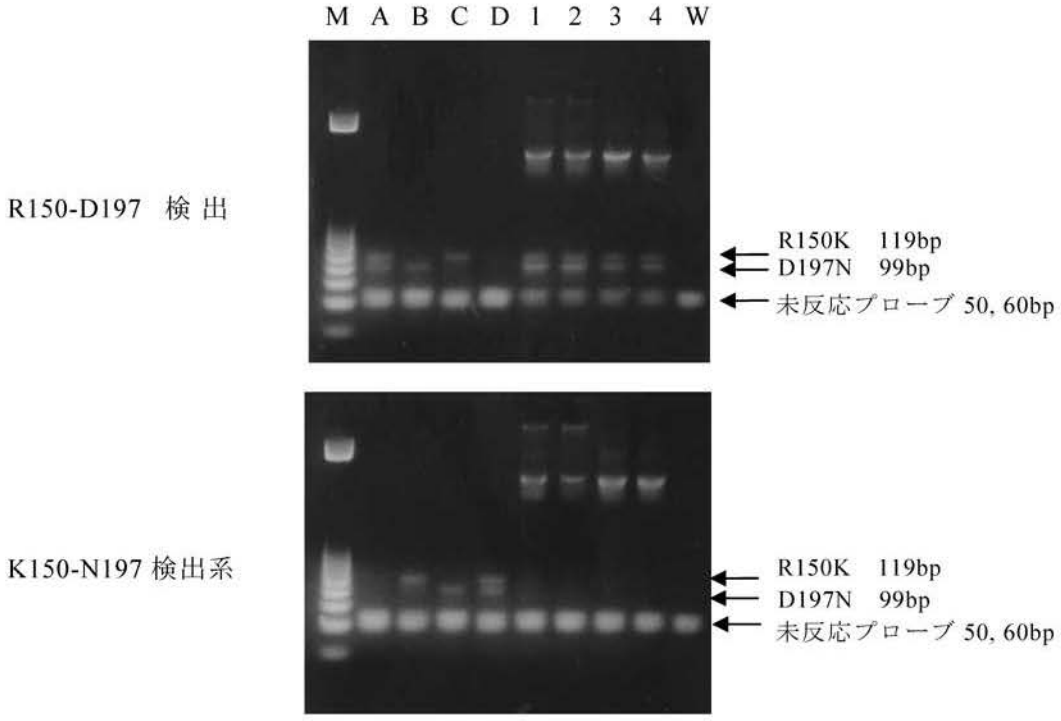


図 9　B 型タミフル耐性鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動

M：25bp Ladder，A：両方感受性，B：R150K 耐性，C：D197N 耐性，D：両方耐性，
1～4：感染症発生動向調査対象医療機関由来ウイルス，W：蒸留水

3.4 インフルエンザウイルス PB2 遺伝子変異の検出

A/H1N1pdm09 型インフルエンザウイルスの増殖能に関わる PB2 遺伝子はトリ由来であることから，増殖のための至適温度が，トリの体温（42℃）に近いことが知られている。従って，PB2 遺伝子の変異によってヒト型の塩基配列に変わった場合には，増殖至適温度が低下して，ヒトの体内で増えやすいウイルスが出現することが危惧されている。LCR による一塩基鑑別の応用例として，PB2 遺伝子の該当部分を識別する反応系を構築した。図 10 に示したとおり，トリ型の PB2 遺伝子を有する A/H1N1pdm09 型では，E627 検出系の方に結合プローブのバンドが現れた（図 10 レーン 1）。一方，すでにヒトの間で流行が繰り返されている A ソ連型と A 香港型は，K627 検出系の方にバンドが認められた（図 10 レーン 2, 3）。シークエンス解析の結果とも一致した。

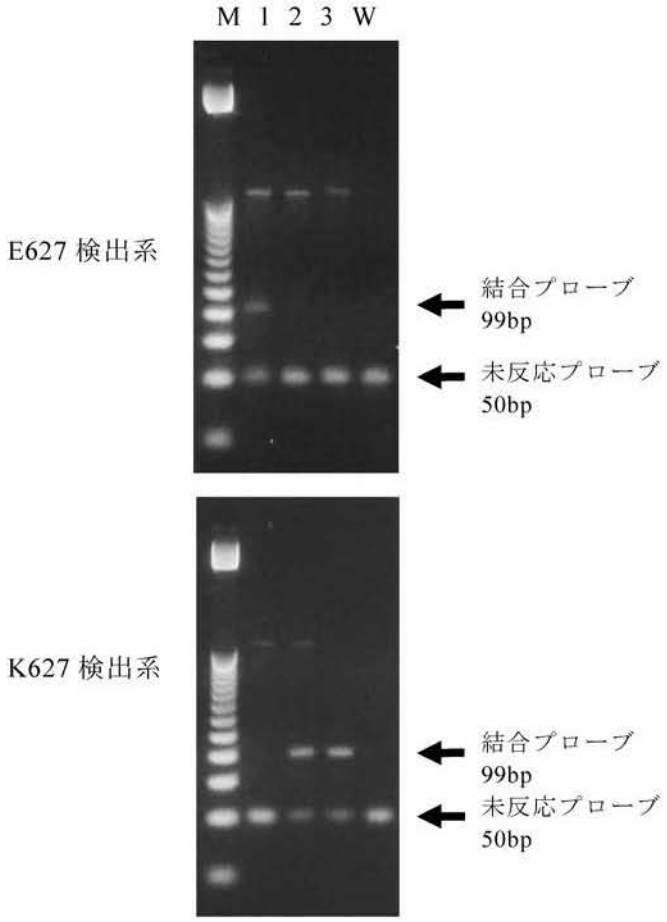


図 10　PB2 遺伝子 E627K 変異鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動

M: 25bp marker、1: A/H1N1pdm09 型、2: A ソ連型、3: A 香港型、W: 蒸留水

4. 考察

4.1 インフルエンザウイルス A ソ連型，及び A/H1N1pdm09 型における LCR 反応系の開発

タミフルの世界在庫の 7 割が我が国において用いられている現状から，感染症発生動向調査には耐性のサーベイランスが含まれている。タミフルの標的となるノイラミニダーゼの遺伝子には耐性に関与するマーカー部位が知られており，その部分のシークエンスを解析することによって市中に流行しているタミフル耐性ウイルスの判定が可能である。一方，シークエンス解析のためには，遺伝子の該当部分の増幅→電気泳動による確認→増幅断片の精製→電気泳動による再確認→定量→ジデオキシ反応→ローディングサンプル調製といった手作業のプロセスが必要で，その後も生データ（塩基配列）のトリミングや比較は手作業である（当然，検体数の分だけ必要）。さらに，こうした煩雑な作業と

検査業務を同時に行うと，コンタミネーションによる検査ミスを起こすリスクも増大する。本研究では，任意の一塩基置換に焦点を当てられるLCRを用いて,簡便な検査法をデザインした。図1に示すとおり，予備増幅の段階でA ソ連型とA/H1N1pdm09型を区別し,続く鑑別反応でタミフル耐性マーカーを判定できるようにした。この手法により,A ソ連型とA/H1N1pdm09型の交雑体も含めて4種鑑別が可能となった。本研究ではA ソ連型50検体，A/H1N1pdm09型71検体についてLCRとシークエンス解析の結果を照合し,両者が一致していることが確認できた。その過程で2検体からA/H1N1pdm09型の耐性ウイルスを検出することができ，実践的な使用に耐えるものと考えられた。

4.2 LCRによる一塩基鑑別の応用

インフルエンザウイルスA香港型とB型についてもタミフル耐性ウイルスは存在し，そのマーカー部位も知られている。A ソ連型やA/H1N1pdm09 型は一か所の塩基を鑑別すればよいのに対し，A香港型とB型の場合は，よく用いられるマーカー部位は2か所である。本研究では，長さの異なる2種類の結合プローブを検出することで，いずれか一方，あるいは両方のマーカー部位が耐性となっているかどうかを区別できる反応系を開発することができた（図8, 9）。平成22～23年にはA香港型とB型の耐性ウイルスは検出されなかったが，平成22年11月に発生した，死者8名を含む院内感染事例（図8 レーン1～8）では住民不安の解消に役立った。

タミフル耐性鑑別以外への応用例として，インフルエンザウイルスの増殖能に関わるPB2遺伝子の一塩基置換を識別する反応系を開発した（図10）。A/H1N1pdm09型はトリ由来のPB2遺伝子を保有しており，ヒトの間で流行が繰り返されているA ソ連型やA香港型とは異なることがわかる。

4.3 LCRによる一塩基鑑別の特長

本法以外にタミフル耐性鑑別に用いられている方法としては,TaqManプローブ法[11-13]とサイクリングプローブ法[14]がある。いずれもReal-time PCR 装置を用いるが，A ソ連型とA/H1N1pdm09型の反応系しかなく，新規の反応系をデザインするのに時間を要する。また，前者は専用の試薬を国立感染研から供給してもらう必要があるため，地方衛生研究所以外の試験研究機関では制約が伴う。本研究で検討したLCRは任意の一塩基に対してデザインすることが容易なため，A/H1N1pdm09型以外のタミフル耐性鑑別，あるいは他の病原体での一塩基鑑別など応用範囲が広いという特長がある。また，一つの検体にタミフル感受性ウイルスと耐性ウイルスが混在している場合には，シークエンス解析，TaqManプローブ法，サイクリングプローブ法のいずれもが判定不能になることが多いが，LCRならば問題なく判定できる（図3, 4の場合はH検出系とY検出系の両方に結合プローブバンドが出現する）。さらに，高価な大型機器を用いずとも実施できるため，国内の小規模な試験検査機関のみならず，途上国おいても導入が容易である。本法は反応系デザインが容易であることや，試薬の入手に特段の制限がないことから，何らかの鑑別を必要とする局面の初期段階（マニュアルが整っていない段階）における柔軟な対応に役立つものと考えられた。

参考文献

1) Center for Disease Control and Prevention: Update: novel influenza A (H1N1) virus infections – worldwide, May 6, 2009. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep **58**, 2009, 453-458.

2) Gubareva L, et. al.: Selectionof influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. J. Infect. Dis. **183**, 2001, 523-531.

3) 斎藤博之,他：秋田県における新型インフルエンザ(A/H1N1)発生への検査，調査についての準備及び初期対応状況について，厚生労働科学研究費補助金　厚生労働科学特別研究事業「新型インフルエンザ（インフルエンザA/H1N1sw1）発生への検査，調査についての準備及び初期対応の総括と，病原体検査や感染者調査に関する今後の国と地方との連携強化及び対応能力強化に関する緊急研究　平成21年度総括・分担研究報告書, 2010

4) Barany, F, et. al.: Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Prot. Natl. Acad. Sci. **88**, 1991, 189-193.
5) Barany, F, et. al.: The ligase chain reaction in a PCR world. PCR Methods Appl. **1**, 1991, 5-16.
6) Tooley, PW, et. al.: Use of ligase chain reaction for enhanced detection of Phytophthora infestans. Can. J. Pathol. **24**, 2002, 294-301.
7) 斎藤博之,他：LCR を用いた簡便なタミフル耐性鑑別法の開発, 厚生労働科学研究費補助金厚生労働科学特別研究事業「新型インフルエンザ（インフルエンザ A/H1N1sw1）発生への検査，調査についての準備及び初期対応の総括と，病原体検査や感染者調査に関する今後の国と地方との連携強化及び対応能力強化に関する緊急研究　平成 21 年度総括・分担研究報告書, 2010
8) Zuercher T, et. al.,: Mutations conferring zanamivir resistance in human influenza virus N2 neuraminidases compromise virus fitness and are not stably maintained in vitro. J. Antimicrobiol. Chem. **58**, 2006, 723-732.
9) Oakley AJ, et. al.: Structural and functional basis of resistance to neuraminidase inhibitors of influenza B viruses. J. Med. Chem. **53**, 2010, 6421-6431.
10) Aggarwal S, et. al.: Biochemical Impact of the Host Adaptation-associated PB2 E627K Mutation on the Temperature-dependent RNA Synthesis Kinetics of Influenza A Virus Polymerase Complex. J. Biol. Chem. **286**, 2011, 34504-34513.
11) Hindiyeh M, et. al.: Rapid detection of influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus neuraminidase resistance mutation H275Y by real-time reverse transcriptase PCR. J. Clin. Microbiol. **48**, 2010, 1884-1887.
12) Ujike M, et.al.: Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) during2007-2009 influenza seasons, Japan. Emerg. Infect. Dis. **16**, 2010, 926-935.
13) van der Vries E, et. al.: Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase. J. Clin. Virol. **47**, 2010, 34-37.
14) Suzuki Y, et. al.: Identification of oseltamivir resistance among pandemic and seasonal influenza A (H1N1) viruses by an His275Tyr genotyping assay using the cycling probe method. J. Clin. Microbiol. **49**, 2011, 125-130.

表 1　インフルエンザウイルス A ソ連型、及び A/H1N1pdm09 型の NA 遺伝子に用いる合成 DNA

名前	修飾	配列　(5'→3')	ポジション
USSR-N1-FS	なし	GAACCATAAAAAGTTGGAAAAAGC	641 → 664
SW-N1-FS	なし	TGTAAATGGTTCTTGCTTTACTG	699 → 721
H1H1-NA-R	なし	AGACACCCAMGGTCGATTYGA	894 ← 915
USSR-N1-C1	5'末端リン酸化	ATTATGAGGAATGYTCCTGTTACCCAGACACTGGCATAGTGATGTGTGT	824 → 872
USSR-N1-C2	5'末端リン酸化	AAAAKTGGGTGCATTCAACTCTATTGATTTAGTAACCTTCCCCTTTTCG	774 ← 822
USSR-N1-HD1	なし	TTAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCCAMTTTTC	774 → 823
USSR-N1-HD2	なし	TTACACATCACTATGCCAGTGTCTGGGTAACAGGARCATTCCTCATAATG	823 ← 872
USSR-N1-YD1	なし	TTAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCCAMTTTTT	774 → 823
USSR-N1-YD2	なし	TTACACATCACTATGCCAGTGTCTGGGTAACAGGARCATTCCTCATAATA	823 ← 872
SW-N1-C1	5'末端リン酸化	ACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGT	824 → 872
SW-N1-C2	5'末端リン酸化	ATAATTAGGGGCATTCATTTCGACTGATTTGACTATCTTTCCCTTTTCT	774 ← 822
SW-N1-HD1	なし	TTAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATC	774 → 823
SW-N1-HD2	なし	TTACATGTGATTTCACTAGAATCAGGATAACAGGAGCATTCCTCATAGTG	823 ← 872
SW-N1-YD1	なし	TTAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATT	774 → 823
SW-N1-YD2	なし	TTACATGTGATTTCACTAGAATCAGGATAACAGGAGCATTCCTCATAGTA	823 ← 872

・ポジションは GenBank Accession No.: FJ966973 に記載のある遺伝情報の塩基番号と合成の方向（矢印）を示す。

表 2　USSR-H 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	12.9
10× Buffer　（添付）	2
USSR-N1-C1 (1μM)	1
USSR -N1-C2 (1μM)	1
USSR -N1-HD1 (1μM)	1
USSR -N1-HD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・A ソ連型タミフル感受性型に反応する

表 3　USSR-Y 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	12.9
10× Buffer　（添付）	2
USSR -N1-C1 (1μM)	1
USSR -N1-C2 (1μM)	1
USSR -N1-YD1 (1μM)	1
USSR -N1-YD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・A ソ連型タミフル耐性型に反応する

表 4　SW-H 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	12.9
10× Buffer　（添付）	2
SW-N1-C1 (1μM)	1
SW-N1-C2 (1μM)	1
SW-N1-HD1 (1μM)	1
SW-N1-HD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・A/H1N1pdm09 型タミフル感受性型に反応する

表 5　SW-Y 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	12.9
10× Buffer　（添付）	2
SW-N1-C1 (1μM)	1
SW-N1-C2 (1μM)	1
SW-N1-YD1 (1μM)	1
SW-N1-YD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・A/H1N1pdm09 型タミフル耐性型に反応する

表 6　インフルエンザウイルス A 香港型の NA 遺伝子に用いる合成 DNA

名前	修飾	配列　(5'→3')	ポジション
N2-F	なし	TACAGGATTTGCACCTTTTTCTAA	282 → 305
N2-R	なし	TGGGTGTGTCTCCRACAAGTC	959 ← 979
E119V-N2-C1	5'末端リン酸化	ACCTTATGTGTCATGCGATCCTGACAAGTGTTATCAATTTGCCCTTGGRCAGGGAACAA	357 → 415
E119V-N2-C2	5'末端リン酸化	CTCTTGTCACCCAGATGTCCCCACCAGCGGAAAGCCKAATCGAATTGTCCTTAGAAAAA	297 ← 355
E119V-N2-ED1	なし	TTTTTCTAAGGACAATTCGATTMGGCTTTCCGCTGGTGGGGACATCTGGGTGACAAGAGA	297 → 356
E119V-N2-ED2	なし	TTGTTCCCTGYCCAAGGGCAAATTGATAACACTTGTCAGGATCGCATGACACATAAGGTT	356 ← 415
E119V-N2-VD1	なし	TTTTTCTAAGGACAATTCGATTAGGCTTTCCGCTGGTGGGGACATCTGGGTGACAAGAGT	297 → 356
E119V-N2-VD2	なし	TTGTTCCCTGYCCAAGGGCAAATTGATAACACTTGTCAGGATCGCATGACACATAAGGTA	356 ← 415
R292K-N2-C1	5'末端リン酸化	AGACAACTGGAAAGGCTCCAATAGGCCCATHGTAGATATAAACATAAAG	876 → 924
R292K-N2-C2	5'末端リン酸化	TGCAGACACATCTGACACCAGGATATCGAGGATARCAGGAGCACTCCTC	826 ← 874
R292K-N2-RD1	なし	GAGGAGTGCTCCTGYTATCCTCGATATCCTGGTGTCAGATGTGTCTGCAG	826 → 875
R292K-N2-RD2	なし	CTTTATGTTTATATCTACDATGGGCCTATTGGAGCCTTTCCAGTTGTCTC	875 ← 924
R292K-N2-KD1	なし	GAGGAGTGCTCCTGYTATCCTCGATATCCTGGTGTCAGATGTGTCTGCAA	826 → 875
R292K-N2-KD2	なし	CTTTATGTTTATATCTACDATGGGCCTATTGGAGCCTTTCCAGTTGTCTT	875 ← 924

・ポジションは GenBank Accession No.: CY035024 に記載のある遺伝情報の塩基番号と合成の方向（矢印）を示す。

表 7　E119-R292 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	8.9
10× Buffer　（添付）	2
E119V-N2-C1 (1μM)	1
E119V-N2-C2 (1μM)	1
R292K-N2-C1 (1μM)	1
R292K-N2-C2 (1μM)	1
E119V-N2-ED1 (1μM)	1
E119V-N2-ED2 (1μM)	1
R292K-N2-RD1 (1μM)	1
R292K-N2-RD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・A 香港型タミフル感受性型に反応する

表 8　V119-K292 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	8.9
10× Buffer　（添付）	2
E119V-N2-C1 (1μM)	1
E119V-N2-C2 (1μM)	1
R292K-N2-C1 (1μM)	1
R292K-N2-C2 (1μM)	1
E119V-N2-VD1 (1μM)	1
E119V-N2-VD2 (1μM)	1
R292K-N2-KD1 (1μM)	1
R292K-N2-KD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・A 香港型タミフル耐性型に反応する

表 9　インフルエンザウイルス B 型の NA 遺伝子に用いる合成 DNA

名前	修飾	配列　(5'→3')	ポジション
BN-F	なし	GATAATAAGGGAACCTTTTATTGC	346 → 369
BN-R	なし	TTTGCATAGGAATGGTATGTGTCA	639 ← 663
R150K-BN-C1	5'末端リン酸化	AAACAAGCTGAGGCATCTRATTTCAGTCAAMTTRGGCAAAATCCCAACWGTAGAAAACT	457 → 515
R150K-BN-C2	5'末端リン酸化	TGTCYYCTCTTKTTCCATTGTAGTATCCCCCTGGTTGRGCTGCATARTGGGTTAGAGCA	397 ← 455
R150K-BN-RD1	なし	TGCTCTAACCCAYTATGCAGCYCAACCAGGGGGATACTACAATGGAAMAAGAGRRGACAG	397 → 456
R150K-BN-RD2	なし	AGTTTTCTACWGTTGGGATTTTGCCYAAKTTGACTGAAATYAGATGCCTCAGCTTGTTTC	456 ← 515
R150K-BN-KD1	なし	TGCTCTAACCCAYTATGCAGCYCAACCAGGGGGATACTACAATGGAAMAAGAGRRGACAA	397 → 456
R150K-BN-KD2	なし	AGTTTTCTACWGTTGGGATTTTGCCYAAKTTGACTGAAATYAGATGCCTCAGCTTGTTTT	456 ← 515
D197N-BN-C1	5'末端リン酸化	ACARTAATGCAYTRMTCAAAATAAAATATGGAGAAGCATAYACTGACAC	597 → 645
D197N-BN-C2	5'末端リン酸化	RGGGCCATCAACTCCGATATAWGTCCATTCYYTACCATCATGGCATGCG	547 ← 595
D197N-BN-DD1	なし	CGCATGCCATGATGGTARRGAATGGACWTATATCGGAGTTGATGGCCCYG	547 → 596
D197N-BN-DD2	なし	GTGTCAGTRTATGCTTCTCCATATTTTATTTTGAKYARTGCATTAYTGTC	596 ← 645
D197N-BN-ND1	なし	CGCATGCCATGATGGTARRGAATGGACWTATATCGGAGTTGATGGCCCYA	547 → 596
D197N-BN-ND2	なし	GTGTCAGTRTATGCTTCTCCATATTTTATTTTGAKYARTGCATTAYTGTT	596 ← 645

・ポジションは GenBank Accession No.: AB036870 に記載のある遺伝情報の塩基番号と合成の方向（矢印）を示す。

表 10　R150-D197 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	8.9
10× Buffer　（添付）	2
R150K-BN-C1 (1μM)	1
R150K-BN-C2 (1μM)	1
D197N-BN-C1 (1μM)	1
D197N-BN-C2 (1μM)	1
R150K-BN-RD1 (1μM)	1
R150K-BN-RD2 (1μM)	1
D197N-BN-DD1 (1μM)	1
D197N-BN-DD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・B 型タミフル感受性型に反応する

表 11　K150-N197 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	8.9
10× Buffer　（添付）	2
R150K-BN-C1 (1μM)	1
R150K-BN-C2 (1μM)	1
D197N-BN-C1 (1μM)	1
D197N-BN-C2 (1μM)	1
R150K-BN-KD1 (1μM)	1
R150K-BN-KD2 (1μM)	1
D197N-BN-ND1 (1μM)	1
D197N-BN-ND2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・B 型タミフル耐性型に反応する

表 12　インフルエンザウイルス PB2 遺伝子に用いる合成 DNA

名前	修飾	配列　(5'→3')	ポジション
PB2-F	なし	TTTCARTCTYTWGTCCCYAAGG	1738→1759
PB2-R	なし	YCCRGMTGTGCYTTCATCTG	2036←2055
E627-PB2-C1	5'末端リン酸化	ARCARAGYAGRATGCARTTYTCBTCAYTRACTGTGAATGTGAGRGGATC	1880→1928
E627-PB2-C2	5'末端リン酸化	TGGWGGRGCRGCWGCAAARGGRAGAAGYTTTATTATYTGRRYDGTRTCA	1830←1878
E627-PB2-ED1	なし	TGAYACHRYYCARATAATAAARCTTCTYCCYTTTGCWGCYGCYCCWCCAG	1830→1879
E627-PB2-ED2	なし	GATCCYCTCACATTCACAGTYAMTGAVGARAAYTGCATYCTRCTYTGYTC	1879←1928
E627-PB2-KD1	なし	TGAYACHRYYCARATAATAAARCTTCTYCCYTTTGCWGCYGCYCCWCCAA	1830→1879
E627-PB2-KD2	なし	GATCCYCTCACATTCACAGTYAMTGAVGARAAYTGCATYCTRCTYTGYTT	1879←1928

・ポジションは GenBank Accession No.: FJ966976 に記載のある遺伝情報の塩基番号と合成の方向（矢印）を示す。

表 13　E627 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	12.9
10× Buffer　（添付）	2
E627K-PB2-C1 (1μM)	1
E627K –PB2-C2 (1μM)	1
E627K –PB2-ED1 (1μM)	1
E627K –PB2-ED2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・トリ型の PB2 遺伝子に反応する

表 14　K627 検出系

試薬類	使用量（μl）
DW	12.9
10× Buffer　（添付）	2
E627K –PB2-C1 (1μM)	1
E627K –PB2-C2 (1μM)	1
E627K –PB2-KD1 (1μM)	1
E627K –PB2-KD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・ヒト型の PB2 遺伝子に反応する

食品検体の病原ウイルス検出を可能にした汎用型パンソルビン・トラップ法の開発

斎藤博之　東方美保*1　岡智一郎*2　片山和彦*2　田中智之*3　野田　衛*4

これまでの研究において，ノロウイルス GII/4 型とそれに対するウサギ抗血清を用いた汚染回収モデルにより，固形・液状・練り物・油物など，どのような食品でもウイルス検査ができる，パンソルビン・トラップ法を開発することができた。次の段階として，本法を下痢症ウイルス全般に対応させるため，添加する抗体について検討を加えた。その結果，外国製ガンマグロブリン製剤である「Gammagard」を用いることで，ノロウイルスでは 13 遺伝子型（GII/2，GII/3，GII/4，GII/5，GII/6，GII/12，GII/13，GII/18，GI/3，GI/4，GI/8，GI/9，GI/14），サポウイルスでは 4 種類全ての型，他に A 型肝炎とアデノウイルス 41 型において有効であることを確認した。これにより，ガンマグロブリン製剤を常用試薬として準備しておけば，一通りの下痢症ウイルス検査が可能となることがわかった。一方で，患者の回復期血清を利用することで限定的な局面における流行事例に対応できることが示唆された。このことは，流通食品が汚染された場合などに原因を突き止めて，必要に応じて回収命令を出すなどの対応を可能にするものと考えられた。

1. はじめに

ウイルス性食中毒の対策として二枚貝の汚染実態調査や，調理従事者への衛生教育等が進められてきている[1,2]。しかしながら，原因として疑われる食品からのウイルス検出は，その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため，具体的な汚染ルートの解明に決め手を欠いているのが実状である。原因物質としてはノロウイルス（NoV）が大部分を占めているが，他にもサポウイルス（SaV）やアデノウイルス 41 型（Ad41）に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに，2010 年 3 月に我が国における A 型肝炎（HAV）感染者の報告が急増するなど，食品中のウイルスを検出する方法の確立は急務となっている[3]。平成 19～21 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」において，固形，液状，練り物，油物などの一般的な食品から NoV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法（パントラ法）を開発し，この問題を解決するための糸口を見出すことができた[4-13]。これまでにパントラ法の基本プロトコルはほぼ完成したが，食品検体の処理方法を優先的に検討したため，ウイルスの種類としては流行の主流である NoV-G Ⅱ /4 型にターゲットを絞って開発を進めてきた。しかしながら，現実問題として NoV にも多くの型が存在し，さらに NoV 以外の下痢症ウイルスへの対応が課題として残っている。また，これまでの開発に用いてきたウイルス様中空粒子（VLP）で作製したウサギ抗血清は，量的な問題があるため，全国的な食中毒事例対応のためには，より汎用的な抗体供給源を確保する必要があった[14-16]。本研究では，こうした問題を解決するために次の検討を行った。

①感染者（ヒト）の血清の利用。
②試薬として市販されているヒトプール血清の利用。
③医薬品として市販されているガンマグロブリン製剤の利用。
④上記の抗体供給源を利用した広範な下痢症ウイルス検査への対応。

*1 福井県衛生環境研究センター　*2 国立感染症研究所　*3 堺市衛生研究所
*4 国立医薬品食品衛生研究所

2. 方法

2.1 研究材料

汚染実験に用いる食品として，市販されているポテトサラダと焼きソバを用いた。また，検出対象となるウイルスとして，NoV-GII/2, GII/3, GII/4，GII/5，GII/6，GII/12，GII/13，GII/18，GI/3，GI/4，GI/8，GI/9，GI/14，SaV-GI，GII，GIV，GV，及び Ad41 については秋田県内の集団感染事例とサーベイランス定点から得られた糞便を用いた。NoV は Kojima らのプライマー[17]G2-SKF/G2-SKR, 及び G1-SKF/G1-SKR で増幅した PCR 産物を系統樹解析[18]することにより血清型を確認した。同様に SaV の血清型は，Okada らのプライマー[19]SV-F2/SV-R2，Ad41 については Saitoh-Inagawa らのプライマー[20]AdU-S/AdU-A を用いて得られた PCR 産物の系統樹解析により確認した。HAV については，市販の不活化ワクチン「エイムゲン」（化血研）を用いた。

2.2 試薬類

2.2.1 抗 NoV 血清

国立感染症研究所で VLP から作製したウサギ免疫血清[21]（抗 GI/3, 4, 8　GII/2, 3, 4, 5, 6）を単味で用いた。

2.2.2 ヒトプール血清

Kojin Bio 社よりロットが異なるもの 10 種類を購入した。

2.2.3 ガンマグロブリン（化血研）

15%筋注用医薬品を Alfresa Pharma 社より購入した。

2.2.4 ガンマグロブリン（日本製薬）

15%筋注用医薬品を Alfresa Pharma 社より購入した。

2.2.5 Bharglob

インド Bharat Serum and Vaccine Limited 社の 10%筋注用ガンマグロブリン製剤（血液ソースは米国）。Advy Chemical 社より購入した。

2.2.6 Gammagard

米国 Baxter 社の 5%静注用ガンマグロブリン製剤。Alfresa Pharma 社より購入した。

2.2.7 HAV 感染者血清

1957 年に秋田県尾去沢で発生した HAV 集団感染事例[22]で採取・保管されていた血清。須藤恒久・秋田大学名誉教授より分与いただいた。

2.2.8 小児プール血清

感染症流行予測調査で採取した，10 歳以下の小児の血清 20 人分を無作為にプールしたものを用いた。

2.2.9 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) – 0.5M NaCl - 0.1% Tween20

2.2.10 パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で，メルク社から購入した。

2.2.11 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

2.2.12 カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を使用した。

2.2.13 再懸濁液

2.2.12 の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

2.2.14 逆転写反応エンハンサー

RTmate（ニッポンジーン）を使用した。

2.2.15 DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

2.2.16 アミラーゼ

前処理用：　枯草菌由来α-Amylase 粉末（和光純薬）を使用した。

後処理用：α-Amylase Ultrapure（ニッポンジーン）を使用した。

2.2.17 食品処理袋

サニスペックテストバッグ（アズワン）を使用した。

2.3 パンソルビン・トラップ法の全体の手順

基本的な操作の流れを図 1 に示した。なお，ウイルスと抗体の反応性を確認するための試験（図 2A, 表 1～5）では，超音波処理とα-Amyrase 前処理は省略した。

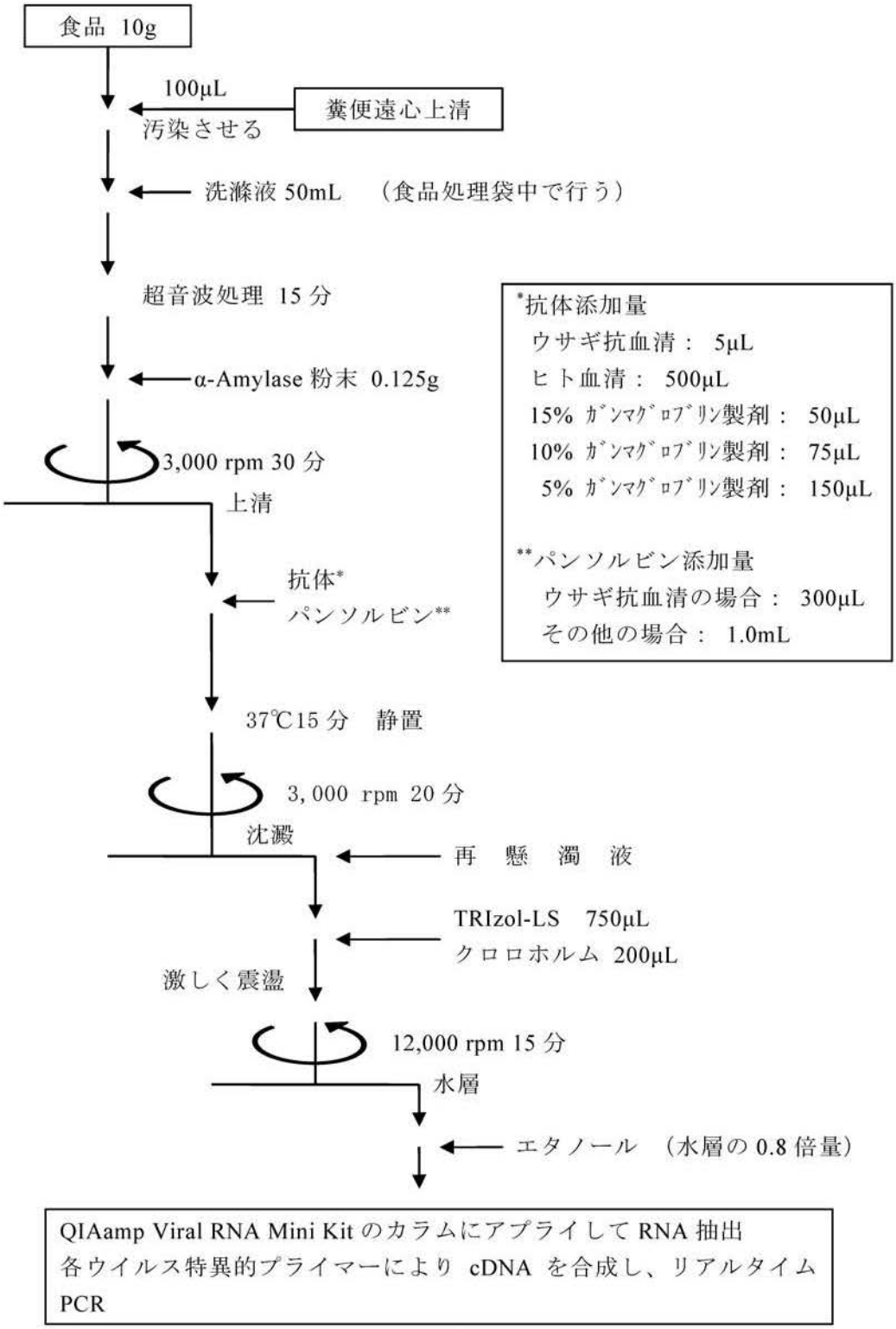


図１　パンソルビン・トラップ法の操作手順（Ver. 4）

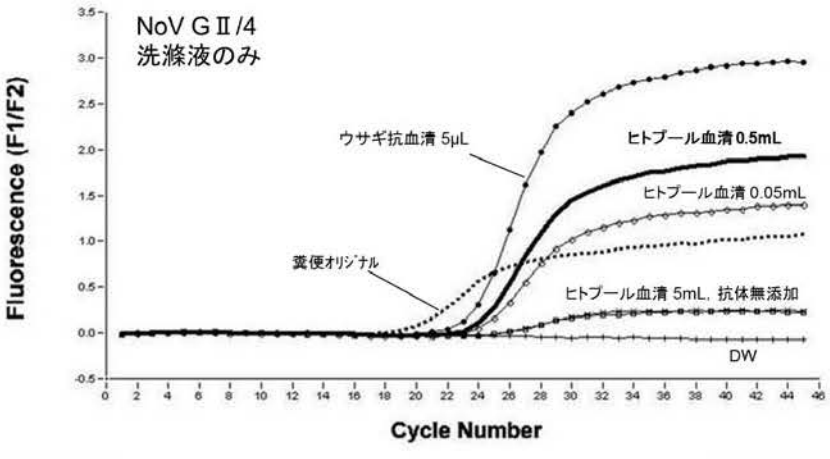


図 2A　ヒトプール血清の添加量の検討

2.4 ウイルスの検出

Ad41 については図 1 の抽出液をそのまま用い，Real-time PCR 検出系[23]でコピー数を測定した。NoV，SaV，及び HAV については，図 1 で得られた抽出液（60 μL）から 8.5 μL を取り，DNase I 及び α-Amylase Ultrapure を各 1 μL，RNase inhibitor を 0.25 μL，5×逆転写 buffer（添付）を 4 μL 加えた後，蒸留水で反応量を 15.5 μL とし，37℃ 10 分，65℃ 5 分のインキュベーションを行った。その後，各ウイルス特異的プライマー（Real-time PCR と同一のもの），dNTP，RTmate，及び逆転写酵素を追加して cDNA を合成した（反応容量 20 μL）。合成した cDNA 溶液を 5 μL 取り，NoV については Kageyama ら[24]，SaV については Oka ら[25]，HAV については，古田ら[26]の Real-time PCR によりウイルスを検出した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」，及び「LightCycler 480」で反応容量は 20 μL である。

3. 結果

3.1 ヒトプール血清を用いた NoV の検出

ヒトプール血清は，10～20 人程度の成人血清を混合して研究用試薬として販売されている。血液の由来は米国である。成人血清は，幼少期からの感染経験を経てさまざまなウイルスに対する抗体を含んでいるものと考えられるため，パントラ法の抗体供給源として最初に検討した。図 2A にはヒトプール血清の添加量によるウイルス回収効率の変化を示した。50 mL の反応系に対して，ヒトプール血清を 5 mL 添加した場合は，無添加の場合と同じになり全く効果が認められなかった。最適添加量は 0.5 mL で，VLP で作製したウサギ抗血清に準ずる回収効率が得られた。以後，ヒト血清（プール血清，または感染者血清）を用いる場合には 0.5 mL を添加することとした。

図 2B と図 2C には，焼きソバとポテトサラダの汚染検体から，NoV-GII/4 型の回収を試みた結果を示した。ヒトプール血清 0.5 mL を添加することでウサギ抗血清に匹敵する増幅曲線が得られた。

一方で，ヒトプール血清のロット間の差を検証するために，10 種類の別ロットによる回収率を比較したものが表 1 である。表中で HS と表記された検体は NoV-GII/4 の感染歴がある個人の糞便と血清を採取したもので，参考として加えた。回収率の便宜上の評価基準として 10%以上（白：積極的に使用する価値あり），1～9%（灰色：使用できるが他の方法も考慮に入れる），0.9%以下（黒：50 mL の食品乳剤から，0.5 mL をサンプリングしたのと同じため使用する意味が無い）の三段階に分けて表記した。NoV の流行の主流を占めている NoV-GII/4 型の場合にはロット間の差はあまり認められないが，それ以外の型，特に GI 型になるとバラつきが大きくなり，回収率の数値も低くなった。

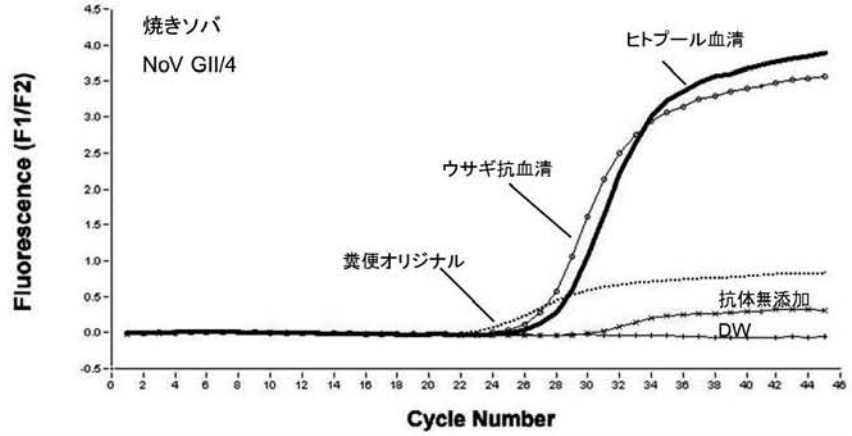


図 2B　ヒトプール血清を用いた NoV 回収試験（焼きソバ）

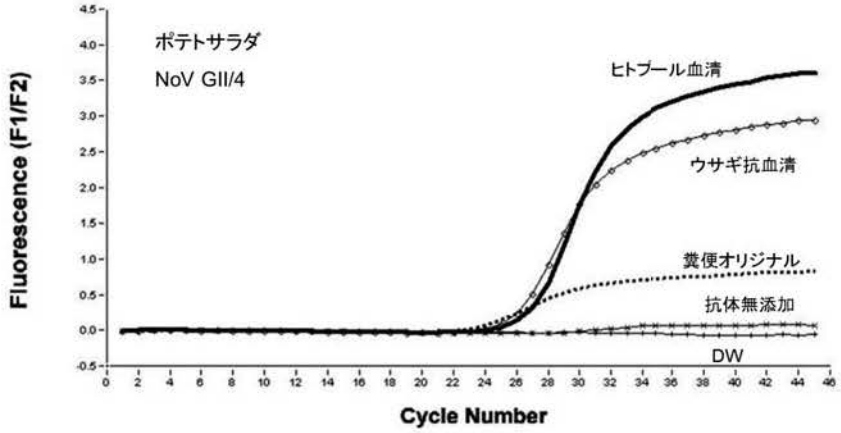


図 2C　ヒトプール血清を用いた NoV 回収試験（ポテトサラダ）

3.2 食品中の HAV の検出

2010 年 3 月に HAV 感染者の報告数が急増したことを受けて，パントラ法によって食品からの HAV 検出が可能かどうかを検討した。汚染モデル食品として焼きソバ（図 3A）とポテトサラダ（図 3C）を HAV 不活化ワクチンで汚染させたものを用いた。添加抗体は前述のヒトプール血清（ロット番号：H15L03Z）に加えて，HAV の予防に使われているガンマグロブリン製剤（図 3B），及び HAV 感染者血清を用いた。ガンマグロブリン製剤はヒトプール血清（図 2A）と同様に事前に添加量の最適化を行った。焼きソバとポテトサラダのいずれでも HAV 感染者血清と HAV 非感染者血清（前述の HS 血清）の増幅曲線の差異は明らかであり，HAV に対してもパントラ法の理論が適用できることがわかった。ヒトプール血清も有効であったが，ガンマグロブリン製剤でも同様の回収効率が得られた。

3.3 食品中の SaV の検出

NoV 以外の食中毒原因物質として報告例がある SaV について焼きソバとポテトサラダを用いた汚染回収試験を行ったものが図 4A と図 4B である。ここでは SaV-GV 型を用いたが，ヒトプール血清，小児プール血清，ガンマグロブリン製剤のいずれを用いても良好な増幅曲線が得られた。

3.4 各ウイルスに対するガンマグロブリン製剤の反応性

前項までの回収試験でガンマグロブリン製剤

の有効性が期待できる結果が得られたため，国内製品（化血研と日本製薬）に加えて外国製品（Bharglob と Gammagard）の反応性をさまざまな下痢症ウイルスについて検証した。表 2 には NoV，表 3 には SaV，表 4 には HAV，表 5 には Ad41 の回収率をそれぞれ示した。全体を俯瞰すると Gammagard を用いた場合の成績が全てのウイルスに対してバランスが取れているのがわかる。

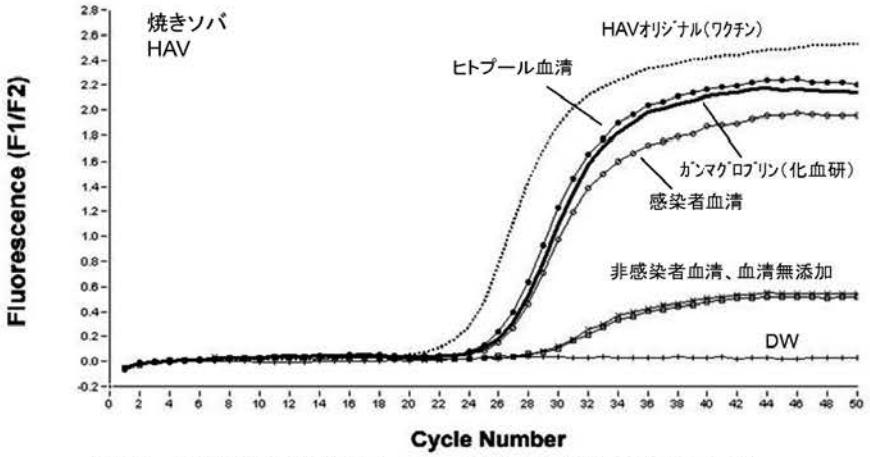


図 3A 各種抗体を用いた HAV の回収試験（焼きソバ）

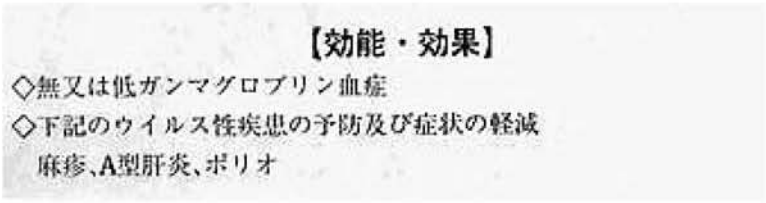

【効能・効果】
◇無又は低ガンマグロブリン血症
◇下記のウイルス性疾患の予防及び症状の軽減
麻疹、A型肝炎、ポリオ

図 3B ガンマグロブリン製剤（化血研）の効能書き

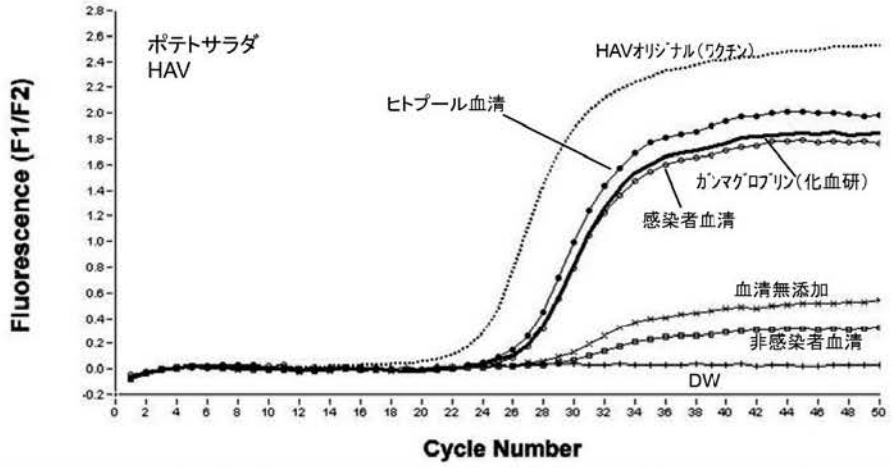


図 3C 各種抗体を用いた HAV の回収試験（ポテトサラダ）

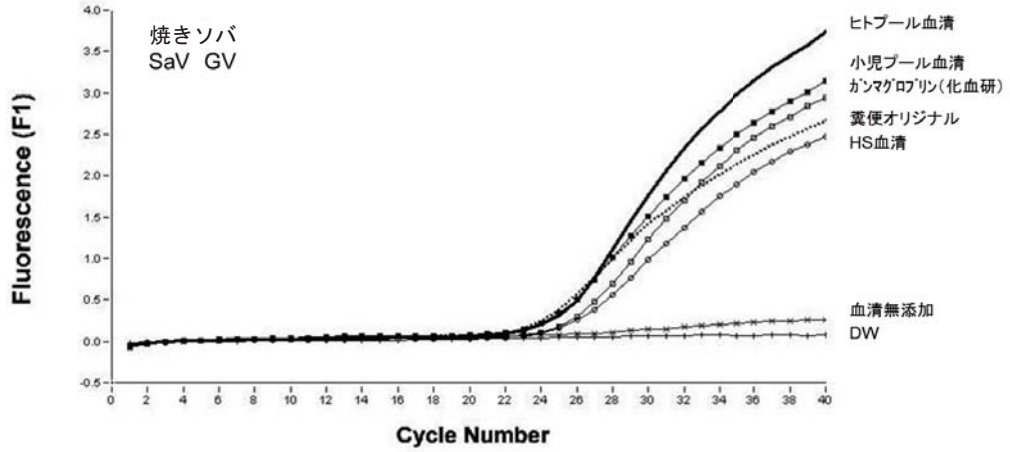


図 4A 各種抗体を用いた SaV の回収試験（焼きソバ）

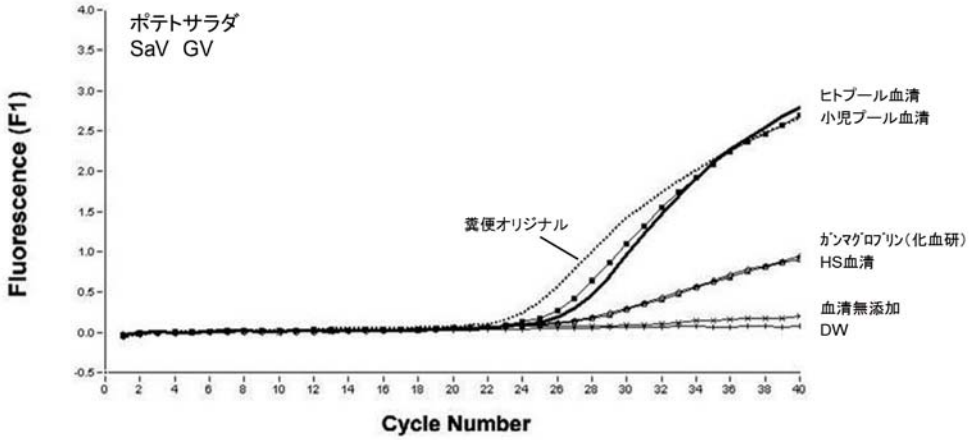


図 4B 各種抗体を用いた SaV の回収試験（ポテトサラダ）

4. 考察

4.1 抗体供給源としてのヒト血清

多くのヒトは幼少期にさまざまなウイルス感染を経験しているため，血清中にすでにある程度の抗体を持っているものと考えられる。従って，パントラ法の抗体供給源としてヒト血清を用いることの有用性について最初に検討がなされた。試薬として 10～20 人程度の血清を混合したものが市販されているため，それを利用したところ NoV-GII/4 型の回収については VLP で作製したウサギ抗血清に準ずる効果が得られた（図 2B，図 2C）。この場合，血清の添加量が多すぎると効果が無くなるため，あらかじめ最適量を決定しておく必要がある（図 2A）。これは，ウサギ抗血清と違って，ターゲットとなるウイルスとは無関係の IgG が大量に含まれているため，パンソルビン表面の Protein A と結合する際に競合阻害を起こすことが原因である。ヒト血清を用いる場合には 50 mL の反応系に対して 0.5 mL の添加により最も良い成績が得られている。一方で，ヒト血清中の抗体含有量には当然のごとく個人差があるため，プール血清といえどもロット間の差が予想された。そこで，10 種類のロットを比較したところ表 1 のように NoV-GII/4 型ではあまり差は見られないが，それ以外の型では使用において問題が発生する製品もあった。抗体含有量は疫学状況を反映しているものと考えられるため，流行の主流である

NoV-GII/4 型ではどのロットでも十分な抗体が含まれているものの，GI 型のような大規模な流行が起きていないものについてはロット差が大きくなってしまうという実状がある。購入時にロットごとに事前評価をした上で用いるならば，こうした問題を回避できるかもしれないが，有効性の低い製品を入手してしまうリスクは存在する。また，別の運用方法として，何かの事例の際に患者の回復期血清が得られたならば，その中には原因ウイルスに対する抗体が含まれていることが期待できるため，限定的な局面での使用という点では考慮に値するものと考えられる。

4.2 抗体供給源としてのガンマグロブリン製剤

2010 年 3 月に HAV 感染者の報告数が急増したことから，パントラ法による HAV 回収について検討したものが図 3A と図 3C である。現時点で HAV 特異的なウサギ抗血清は利用できないため，HAV 感染歴のあるヒトの血清と無いヒトの血清を比較することでパントラ法の有効性を確認した。ここで，添加抗体の候補の一つとしてガンマグロブリン製剤を加えた理由は，図 3B に示したとおり，HAV の予防目的の医薬品として使用されており，抗体の供給源となりうる可能性があったからである。結果として，感染者血清やヒトプール血清と同程度の回収効率が得られ，有効性が裏付けられた。特筆すべきは，ヒトプール血清が 10～20 人の血清を混合したものであるのに対し，ガンマグロブリン製剤は 1 万人単位の血漿をプールした上で製造されているということである。従って，ロット間のバラつきはほとんど無くなることが期待できる。

ガンマグロブリン製剤は，ヒト血清中の IgG を抽出したものであるため，HAV 以外の下痢症ウイルスにも幅広く用いることができる可能性があった。そこで，SaV の汚染回収試験（図 4A，図 4B）を行ったところ，良好な増幅曲線が得られ抗体供給源として有用であることがわかった。

4.3 外国製ガンマグロブリン製剤の利用

国内製のガンマグロブリン製剤は，文字どおり全て国内の献血によって得られた血液から製造されている。従って，流行レベルが抑制され，衛生状態が向上するほど抗体含有量が少なくなるという矛盾点を内包している。そこで，外国製のガンマグロブリン製剤を利用することで，こうした問題を回避できる可能性が考えられた。その理由として，諸外国では原料となる血漿が有償で採取されているという事実がある。このような有償採取の制度のもとで製造されたガンマグロブリン製剤には，多くのウイルスに対する抗体が含まれていることがすでに明らかとなっており [27]，表 2～5 に示した回収試験の成績にもその傾向が現れている。これらの成績を俯瞰すると Baxter 社の Gammagard がどのウイルスに対しても効果が認められ，パントラ法のための常用試薬として有用であることがわかる。

4.4 パントラ法の運用と今後の展開

図 5 に示すとおり，Gammagard を常備しておくことで，どのような下痢症ウイルスによる事例であっても一通りの対応ができるものと考えられる。VLP で作製したウサギ抗血清は理論上の裏付けがあるため，精度管理などの特定の目的に絞って用いるようにすれば，量的な問題も回避できる。また，表 2 によると NoV の GI 型に対する回収率は相対的に弱い部分があるため，ブロードバンドモノクローナル抗体により補完してゆく方法が考えられる。一方で，患者の回復期血清を用いるという方法も限定的な局面でならば効果を発揮する可能性がある。特に流通食品が汚染されて複数の都道府県にまたがって患者が発生しているような大規模事例では，最初に感染して回復した人から血液提供の協力を得て原因食品を突き止めるという戦略をとることも可能である。現行の制度下では流通食品の回収命令を出すには，疫学調査に加えて，食品からウイルスを検出することが求められるためこうした方法が有効であるものと考えられる。

今回の研究で新たに浮上してきた問題としては，パンソルビンが品薄になって入手困難な時期があったということである。現在ではメルク社の本国在庫（ドイツ）は回復しているが，今後も在庫切れや製造中止などのリスクが残るため，黄色ブドウ球菌を各試験研究機関で培養してパンソルビンの相当品を自家調製できるようにすることを計画している。また，ガンマグロブリン製剤の有効性は証明されたものの，パンソルビンの添加量が多いためコスト増となる問

題もあり，相当品の自家調製プロトコルを早急に検討する必要がある。また，実際の事例に適用する場合に備えて食品衛生検査指針等の公式のマニュアルへの収載が計画されている。

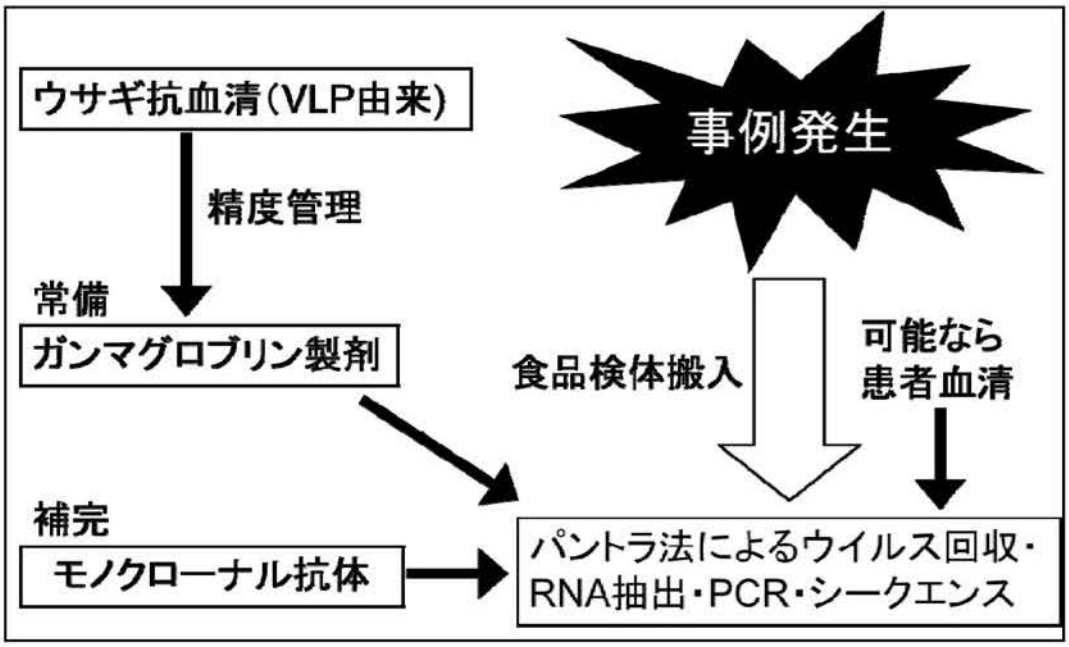


図 5 パンソルビン・トラップ法の運用モデル

参考文献

1) 国立感染症研究所感染症情報センター，国立感染症研究所ウイルス第二部: ノロウイルス集団発生事例に対して感染症および食品部局が共同で実施する初期実地疫学調査および微生物学的検査のポイント（第 1 版：平成 19 年 11 月 18 日付け）, 2007, 16-17.

2) 丸山務（監修）：改訂　ノロウイルス現場対策, 2007, 35-36.

3) 薬事・食品衛生審議会　食品衛生分科会食中毒部会: ノロウイルス食中毒対策について（提言），2007, 1-2.

4) 斎藤博之，他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収，厚生労働科学研究費補助金　食品の安心・安全確保推進研究事業　食品中のウイルスの制御に関する研究　平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008, 103-111.

5) 東方美保，他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収（検討 2），厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008, 125-133.

6) 斎藤博之，他：食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発，秋田県健康環境センター年報，4，2008，75-81.

7) 東方美保，他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収検討（第 1 報），福井県衛生環境研究センター年報, **7**, 2008, 69-72.

8) 斎藤博之，他：パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良（検討 1），厚生労働科学研究費補助金　食品の安心・安全確保推進研究事業　食品中のウイルスの制御に関する研究　平成 20 年度 総括・分担研究報告書, 2009, 27-38.

9) 東方美保，他：パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良（検討 2），厚生労働科学研究費補助金　食品の安心・安全確保推進研究事業　食品中のウイルスの制御に関する研究　平成 20 年度 総括・分担研究報告書, 2009, 181-190.

10) 斎藤博之，他：食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用性向上に関する研究，秋田県健康環境センター年報，**5**，2009，54-62.

11) 斎藤博之，他：パンソルビン・トラップ法に

よる食品検査法の構築（検討 1），厚生労働科学研究費補助金　食品の安心・安全確保推進研究事業　食品中のウイルスの制御に関する研究　平成 21 年度 総括・分担研究報告書, 2010, 45-60.

12) 東方美保, 他：パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築（検討 2），厚生労働科学研究費補助金　食品の安心・安全確保推進研究事業　食品中のウイルスの制御に関する研究　平成 21 年度 総括・分担研究報告書,2010, 187-197.

13) 斎藤博之，他：パンソルビン・トラップ法による食品中のノロウイルス検査法の構築，秋田県健康環境センター年報, 6, 2010, 59-69.

14) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出法, 病原微生物検出情報, **32**, No.12, 2011, 4-5.

15) 斎藤博之, 他：食品中のウイルス検査に向けてのパンソルビントラップ法の汎用化，厚生労働科学研究費補助金　食品の安心・安全確保推進研究事業　食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究　平成 22 年度 総括・分担研究報告書, 2011, 45-57.

16) 斎藤博之: 食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発，日本食品微生物学会雑誌, **29**, No.1, 2012, 32-37.

17) Kojima S, et al.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J. Virol. Methods, 100, 2002, 107-114.

18) Kageyama T, et al.: Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. J. Clin. Microbiol., 42, 2004, 2988-2995.

19) Okada M, et al.: Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. Arch. Virol.,**147**,2002,1445-1451.

20) Inagawa WS, et al.: Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol.,**34**,1996,2113-2116.

21) Hansman GS et al. : Genetic and antigenic diversity among noroviruses. J. Gen. Virol.,**87**, 2006, 909-919

22) 須藤恒久: 小児伝染性肝炎の一流行に就いて第一報　疫学的観察，日本小児科学雑誌, **63**,1959,37-42.

23) Logan C, et al.: Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. J. Clin. Microbiol., **44**, 2006,3189-3195.

24) Kageyama T, et. al. : Broady reactive and highly sensitive assay for Norwalk-lile viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol., **41**, 2003, 1548-1577.

25) Oka T,: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. J. Med. Virol.,**78**, 2006, 1347-1353.

26) 古田敏彦, 他: ノロウイルス（ノーウォーク様ウイルス）とA型肝炎ウイルスによって汚染されたウチムラサキ貝による食中毒事例. 感染症学雑誌,77, 2003, 89-94.

27)Eastland T,: Monetary blood donation incentives and the risk of transfusion-transmitted infection. Transfusion,38,1998, 874-882.

表１　NoV 回収試験におけるヒトプール血清の製造ロットの比較（回収率・%）

添加抗体（ロット番号）	NoV						
	GII/4	GII/5	GII/6	GII/18	GI/4	GI/8	HS
ウサギ抗血清	46.29	30.31	8.57	NT	2.65	NT	NT
H15L03Z	44.66	24.67	13.38	10.03	2.52	1.43	10.64
1690-S10	16.33	30.66	9.08	7.12	1.97	1.20	6.29
1701-S10	47.40	3.34	8.65	1.64	0.63	0.69	4.67
1723-S10	38.94	24.48	14.63	9.47	3.16	1.16	16.30
1746-S10	27.54	7.60	15.79	4.94	2.37	1.07	12.90
1784-S19	27.18	5.69	10.45	3.32	2.05	0.59	19.39
1788B-S20	29.29	11.07	9.38	9.10	2.92	1.15	19.85
1788-S21	39.36	16.37	4.65	8.82	2.49	0.24	23.23
1791A-S20	62.43	14.35	8.74	9.48	3.08	0.73	3.28
1791B-S10	31.94	19.94	4.53	5.60	1.91	0.27	13.83
HS	53.08	1.64	6.82	2.54	1.64	0.30	12.25
無添加	3.57	ND	3.94	ND	0.37	ND	2.93

ウサギ抗体血清は各遺伝子型の単味血清を使用。ヒトプール血清は製造ロット 10 種類を使用。HS は NoV-GII/4 の感染歴がある個人の糞便検体と血清。

表２　ガンマグロブリン製剤を用いた NoV 回収試験（回収率・%）

添加抗体	GII/2	GII/3	GII/4	GII/5	GII/6	GII/12	GII/13	GII/18	GI/3	GI/4	GI/8	GI/9	GI/14
ウサギ抗血清	93.4	14.8	77.3	36.4	18.4	65.8	NT	NT	50.4	14.3	13.0	NT	NT
ﾋﾄﾌﾟｰﾙ血清	27.2	11.8	45.2	13.9	13.4	32.9	37.9	11.6	6.9	8.9	1.4	1.3	21.0
Gｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ(化血研)	29.4	11.3	56.4	17.1	7.5	32.3	33.6	10.0	3.9	8.1	2.0	1.5	13.0
Gｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ(日本製薬)	26.1	15.6	32.5	16.0	10.6	32.7	46.4	11.2	8.9	6.7	1.1	6.2	17.2
Bharglob	33.6	12.4	32.9	17.5	19.7	30.1	48.8	11.7	7.7	8.8	0.9	14.7	29.2
Gammagard	45.1	12.4	45.7	22.4	11.9	43.0	55.5	9.4	12.6	12.6	2.7	7.0	27.8

ウサギ抗体血清は各遺伝子型の単味血清を使用。

表３　ガンマグロブリン製剤を用いた SaV 回収試験（回収率・%）

	SaV			
添加抗体	GI	GII	GIV	GV
小児ﾌﾟｰﾙ血清	10.4	28.0	10.5	17.8
ﾋﾄﾌﾟｰﾙ血清	14.0	26.3	14.1	27.1
Gｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ(化血研)	8.8	25.0	8.0	20.3
Gｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ(日本製薬)	7.7	24.9	20.2	23.7
Bharglob	4.9	27.9	9.6	27.1
Gammagard	8.0	30.3	16.9	35.3

表４　ガンマグロブリン製剤を用いた HAV 回収試験（回収率・%）

添加抗体	HAV
感染者血清	7.6
ﾋﾄﾌﾟｰﾙ血清	15.2
Gｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ(化血研)	8.4
Gｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ(日本製薬)	8.0
Bharglob	13.5
Gammagard	13.7

表５　ガンマグロブリン製剤を用いた Ad41 回収試験（回収率・%）

添加抗体	Ad41
小児ﾌﾟｰﾙ血清	63.6
ﾋﾄﾌﾟｰﾙ血清	17.1
Gｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ(化血研)	6.0
Gｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ(日本製薬)	8.9
Bharglob	5.6
Gammagard	38.4

結核菌のDNAシークエンスに基づいた分子疫学解析法と薬剤耐性の迅速診断法に関する調査研究－某施設で発生した結核集団事例におけるJATA12法の応用実例等について－

八柳　潤　　田中貴子　　千葉真知子　　齊藤志保子

結核菌の分子疫学解析法であるJapan Anti-Tuberculosis Association（JATA）12法と，リファンピシン耐性の迅速遺伝子診断方法を導入した。電気泳動条件を最適化することにより，JATA 12プロファイルの算定が容易且つ確実となった。一方，供試した121検体のうち1検体がリファンピシン耐性変異を有することが確認された。DNAシークエンス解析により，早い場合は検体受領の翌日，遅くても数日以内にリファンピシン耐性変異の有無を決定することが可能となり，従来の培養法と比較して著しく迅速化した。秋田市内で発生した結核集団事例において分離株をJATA12法により解析した結果，感染者集団の中で特定の菌株に感染しているグループを識別することが可能であることが示され，JATA12法が集団感染事例の感染疫学を詳細に知る上で極めて有効であることが実証された。

1．はじめに

秋田県の年間の結核新登録患者数は平成10年の311名から平成23年の127名まで漸減傾向にあるものの，他者に結核菌を感染させる危険性が大きい喀痰塗沫陽性肺結核患者数は年間約60名で横ばい状態にあり，継続した対策が必要である。結核集団感染事例は，食中毒のように同時多発しない限り，散発例として見逃されてしまう可能性があり，感染が拡大する危険性が高い。結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）の分子疫学的性状解析は，集団感染事例における特定菌株の拡散規模を把握するうえで特に有用な方法である。また，菌株同士の性状を比較することにより，見逃されやすいdiffuse outbreak，いわゆる「隠れた集団感染事例」の探知も可能となることから，感染拡大防止上有用である。結核菌の分子疫学的性状の解析手法としてはRFLP分析が国際標準法として確立しており，当センターにおいても平成12年から13年に分析技術を導入した。しかし，RFLP分析により得られるデータはアナログ的な画像（バーコード様）であることから多数のデータを比較すること，あるいは異なる機関で得たデータを比較することは困難である。これらの難点を解決する方法として，近年，国内で分離される結核菌の80%を占める「北京型株」の解析に最適化されたJapan Anti-Tuberculosis Association（JATA）12法が国内標準法として普及しつつある。JATA12法で得られる結果はデジタル的な数値であることから，データベース化に適し，且つ，異なる機関で得られたデータとの比較が容易である。しかしながら，分子疫学解析は微生物学的な専門技術に立脚しているために，結核対策を直接担う行政担当者や医療機関の結核担当者には，これまで，その内容と有用性が十分に認識されているとは言い難い状況にあった。

一方，国内には結核治療の障害となる薬剤耐性結核菌が一定数存在している。薬剤耐性結核菌に感染した際には，適切な薬剤を使用した治療を行わないと治療不可能となるばかりではなく，患者が感染源となり耐性結核菌の感染が拡大する可能性がある。従って，結核菌の薬剤耐性を確認することは重要であるが，培養法に基づいた従来法では結果が得られるまでに長い時間を要することが問題である。

本研究は，結核分子疫学解析技術であるJATA12法を導入すること及び耐性遺伝子のDNAシークエンス変異を指標にした，薬剤耐性結核菌の迅速診断法を導入することを目的として実施した。また，先般，秋田市内の某施設で結核の集団感染事例が発生し，患者から分離された結核菌についてJATA12法により分子疫学

性状を解析する機会を得たことから，当該事例の解析結果を結核菌分子疫学解析の実例として報告する。

2. 方法

2.1 供試DNA溶液と結核菌

JATA12 法とリファンピシン耐性の遺伝子診断法の検討には，当センターに保存しておいた結核菌 DNA 抽出溶液 121 検体を供試した。

集団感染事例の解析には，平成 23 年 4 月 15 日に報告された初発患者から平成 24 年 2 月 20 日までに報告された患者 14 名のうち，12 名から分離された結核菌を供試した。

2.2 実験方法

2.2.1 JATA12 法

前田ら [1]が報告したプロトコールに従い実施した。泳動ゲルには 1.2%アガロースゲルと 2.0%アガロースゲル（いずれも Nusieve 1:3：TakaraLO3=1：2）を使用し，泳動バッファーには×0.5 TBE を使用した。1.2%ゲルでは JATA1, 2, 7, 9, 11, 12 を，2.0%ゲルでは JATA3, 4, 5, 6, 8, 10 を泳動した。PCR 産物のサイズ (bp) からコピーナンバーを算出した。

2.2.2 リファンピシン耐性遺伝子診断法の検討

リファンピシン耐性に関与する rpoB 遺伝子内部の 81 bp hot spot の DNA シークエンスを決定するために，365 bp 断片を増幅する rpo105[2]と rpoBPR2[3]プライマーを使用し PCR を行い，得られた 365 bp 増幅断片の DNA シークエンスをダイレクトシークエンスにより決定した。シークエンスプライマーには PR17[3]を使用した。

2.2.3 北京型株の鑑別

当該集団事例で分離された，JATA12 パターンが異なる 3 株（表：分類 A，B，C）について，北京型株に該当するかどうかを Warren らの方法 [4]により検討した。

3. 結果と考察

3.1 JATA12 法とリファンピシン耐性の遺伝子診断方法の検討

供試した 121 検体の DNA 溶液全てから JATA12 法により PCR 増幅断片が得られ，繰り返しナンバーを算定することにより JATA12 プロファイルを得ることが可能であった。しかし，泳動後のアガロースゲル上での増幅断片の形態，とりわけそのバンドの太さが locus により大きく異なる傾向が認められたことから，正確な断片サイズの決定が困難な例がみられた。そのため，JATA locus 毎に使用アガロースゲル濃度とゲルにアプライする増幅液の量を最適化した結果，各 JATA locus についてシャープな泳動像が得られるようになり，繰り返しナンバーの算定が容易且つ確実となった。

一方，121 株についてリファンピシン耐性に関与する rpoB 遺伝子のシークエンスを決定したところ，耐性変異を有する株 1 株が確認された。耐性結核菌のうち，最も問題視される多剤耐性結核菌はリファンピシン耐性を示すことから，リファンピシン耐性の有無を迅速に判定することは，治療と薬剤耐性結核菌の拡散防止上，非常に重要である。今回導入した方法によると，リファンピシン耐性変異の有無を，早い場合は検体受領の翌日，遅くても数日以内に決定することが可能であり，従来の培養法では 2 週間程度の長期間を要することと比較して，著しい迅速化が可能となった。

3.2 JATA12 法による結核集団感染事例解析の実例

3.2.1 事例の概要

平成 23 年，秋田市保健所管内の某施設で咳，痰，発熱，呼吸困難の症状を呈した患者が市内の医療機関において塗沫検査，PCR，画像診断の結果から肺結核（ガフキー9 号）と診断されたことにより事例が探知された。調査の結果，初発患者を含み患者が 14 名，感染者（QFT 陽性）が 35 名の大規模な施設内結核集団感染事例であることが明らかとなった。

患者 14 名中 12 名から結核菌が分離された。

3.2.2 結核菌分離株の JATA12 法による解析結果

表に供試した結核菌 12 株の菌株番号，報告月日，JATA12 プロファイルと分類を示す。JATA12 プロファイルは，12 桁の数値で表現される。初発患者（TB204：インデックスケース）と同じプロファイルを分類 A とし，その他のプロファイルを分類 B，C とした。なお，これらの 3 種

類の株は全て北京型であり，リファンピシン耐性変異を保有しない，リファンピシン感受性株であることが確認された。

本事例ではインデックスケースがガフキー9号と多量の結核菌を排菌している状況であったこと，そして原因施設が特殊な閉鎖環境であったことから，他の11名の患者は全てインデックスケースから結核菌に感染したと推定され，結核菌分離株のJATA12プロファイルはインデックスケースと同一であろうと予想された。しかしながら，予想に反してTB205とTB206のJATA12プロファイルはインデックスケースのプロファイルと異なっていた(分類B, 分類C)。RFLP分析によっても全く同じ分類結果が得られたことから，TB205とTB206が分離された患者は，当該施設内でインデックスケースから感染を受けたのではなく，施設外で感染して入所後に発病したものと考えられた。一方，TB215は施設内でインデックスケースと全く接触が無かったことから，当初はこの集団事例とは無関係と考えられていた。しかしながら，TB215のJATA12プロファイルがインデックスケースと同じであったことから，この患者も集団感染の一部であることが判明した。これらの結果は，この患者がインデックスケースからの直接感染ではなく，インデックスケースから感染した他の患者を介して2次感染を受けた可能性を示すものと考えられた。

今回の集団感染事例において分離株をJATA12法により解析した結果，集団内における特定菌株（インデックスケースが感染した株）の拡散規模を明確に把握することが可能であることが実証された。このように，JATA12法により結核菌分離株を解析することにより，多数の感染者の中で特定の菌株に感染しているグループを識別することが可能となり，このことは結核集団感染事例の感染疫学を詳細に知る上で極めて有効であることが確かめられた。

今後も県内で結核の集団事例が発生した場合，分離株についてJATA12法を実施することにより，特定菌株に罹患している患者が集団発生しているのか，疫学的関連の無い患者が偶然多発しているのかを明確に判別することが可能となり，このことは，感染拡大防止策を決定する上で有用な情報となるものと考えられる。さらに，JATA12プロファイルをデータベース化することにより，散発事例と判断された事例同士の関連を確認することも可能となり，隠れたDiffuse Outbreakの探知が容易になると考えられる。なお，本研究終了後に秋田市内の結核病棟保有医療機関において保存されている結核菌全て，約100株についてJATA12法を行う機会を得た。また，得られたJATA12プロファイルについては，宮城県保健環境センターが開発したデータベース（エクセルマクロ）に登録し，今後の解析に備える予定である。

表　集団事例由来結核菌12株の菌株番号，報告月日，JATA12プロファイルと分類

菌株番号	患者	報告	JATA12プロファイル	分類
TB204	HK	4/15	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A
TB205	YY	5/9	5－3－4－3－5－3－9－4－5－7－6－4	B
TB206	MK	6/22	6－3－3－3－6－3－7－4－5－6－7－6	C
TB207	SY	7/4	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A
TB208	HY	6/1	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A
TB209	HT	6/10	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A
TB210	AM	7/20	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A
TB211	MT	7/8	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A
TB212	OA	8/11	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A
TB213	SK	8/11	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A
TB214	SM	2/7*	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A
TB215	GT	2/20*	4－3－3－4－7－3－7－5－5－7－2－6	A

＊平成24年

TB204:インデックスケース

参考文献

1) 前田伸司，村瀬良朗，御手洗聡，他: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型（VNTR）分析システム，Kekkaku，**83**, 2008, 673-678.

2) Wiliams D.L. et. Al.: PCR-Heterodulex Detection of Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis. CR Protocols for Emerging Infectious Diseases. D.H. Persing ed., ASM Press. 1996.

3) Sekiguchi J. et. Al.: Detection of Multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. **45**, 2007, 179-192.

4) Warren R.M. et. al. :Patient with Active Tuberculosis Often Have Different Strains in the Same Sputum Specimen, Amer. J. Respir. Critical Care Med., **169**, 2004, 610-614.

秋田県における鶏肉等のカンピロバクター汚染状況及び家畜の保菌状況について

髙橋志保　熊谷優子　和田恵理子　今野貴之　八柳　潤　千葉真知子　齊藤志保子

国内における細菌性食中毒事例数は減少してきているにも関わらず，カンピロバクター・ジェジュニ／コリ（*Campylobacter jejuni / coli*）による食中毒事例は依然として多発している。食中毒事例で判明した原因食品として鶏肉類が最も多いことから，鶏肉類を中心として県内におけるカンピロバクターの汚染状況を調査した。その結果，県内に流通している鶏肉類は，カンピロバクターに高度に汚染されている実態が明らかとなった。また，鶏肉以外では牛レバーで汚染が確認された。さらに，県内の家畜の保菌率を調査したところ，牛で約20%，豚および鶏では90%を超える高い保菌が確認された。特に鶏については食鳥処理場における解体処理段階での糞便汚染による食肉の汚染拡大が窺えることから，汚染低減のための対策と併せ，消費者に対して食肉の病原体汚染状況や，生食することの危険性等についての啓発活動を行っていく必要がある。

1. はじめに

カンピロバクター（*Campylobacter*）は家禽や家畜，野生動物の腸管内に広く常在し，ヒトの細菌性下痢症の重要な原因菌である。ヒトの下痢症の原因菌として分離される主な菌種はカンピロバクター・ジェジュニ（*C.jejuni*）およびカンピロバクター・コリ（*C.coli*）であり，1982年にはこの2菌種が食中毒の病因物質として指定された[1)]。

厚生労働省の食中毒統計によると，国内における細菌性食中毒事例数は平成10年をピークに年々減少傾向にあるものの，カンピロバクターによる食中毒事例数は横ばい状態が続いている。カンピロバクターによる食中毒事例数は平成15年以降第1位となっており，近年では発生件数全体の6割を占めるまでになっている。

また，県内の医療機関から提供される散発下痢症患者由来の分離株からは，年間を通してカンピロバクターが確認されており，食中毒だけでなく，散発下痢症としても多くの健康被害をもたらしていると考えられる。その背景には家庭や飲食店等において日常的にカンピロバクターに感染する機会があると推察される。

カンピロバクターによる食中毒の原因としては，家禽や家畜，野生動物の糞便による湧き水や井戸水，簡易水道などの汚染も，ヒトの下痢症の発生要因としてあげられているが[1)]，原因食品としては鶏肉等の食肉が最も多い。そこで，これまで秋田県で行った各調査や収去食品検査の結果から，秋田県における鶏肉等のカンピロバクター汚染状況および家畜の保菌状況をまとめたので報告する。

2. 方法

2.1 対象

2.1.1 市販食肉等の汚染実態調査

平成12～14年度は，厚生労働科学研究「鶏肉に起因するカンピロバクター食中毒の予防対策に関する調査研究」，「食品製造の高度衛生管理に関する研究」（主任研究者　岩手大学　品川邦汎先生）において，県内のスーパーや小売店等で購入した市販鶏肉73検体の調査を実施した。

当センターの独自調査[2,3)]として，平成17～18年度は市販の鶏肉，鶏レバー，豚肉，豚レバー，牛肉，牛レバー合わせて99検体，平成19年度は，食鳥処理場における製品加工工程で解体された県産のカット鶏肉75検体の調査を実施した。

また，厚生労働省による食中毒菌汚染実態調査として，平成20～23年度に秋田県が実施し，購入した鶏ミンチ肉および牛レバーの計97検体の調査を実施した。

2.1.2 収去食品検査

食品衛生監視指導計画に基づき，平成 17～23 年度に県内のスーパーや小売店等で収去された鶏肉検体計 115 検体の調査を実施した。

2.1.3 家畜の保菌状況調査

平成 15 年度に当センターで調査[4]した，牛の直腸便 87 検体および胆汁 78 検体，同様に平成 17～18 年度に調査[2]した，と畜場に搬入された牛および豚から採取した直腸便と胆汁をそれぞれ 100 検体ずつ，平成 19 年度は県内の 22 養鶏場から食鳥処理場に搬入された県産地鶏の盲腸便 66 検体の調査を実施した。

2.2 調査方法

平成 12～19 年度に実施した市販食肉等の汚染実態調査および家畜の保菌状況調査については，それぞれの調査結果報告書等[2~7]からカンピロバクター陽性検体数および検出率をまとめた。

平成 20～23 年度に実施した調査については，食中毒菌汚染実態調査実施要領に定められた方法で検査を実施した。検査方法は，検体 25 g をストマックバックに採取し，100 ml の Preston 培地を加え 30 秒間ストマッカー処理したものを試料原液とし，その全量を増菌培養した。その検査結果から陽性検体数および検出率を求めた。

収去食品検査については，秋田県検査実施標準作業書（Standard Operating Procedures：SOP）に示された検査方法に基づいて検査を実施した。検査方法は，検体 25 g を採取し，滅菌生理食塩水 225　ml を加え，ストマッカー処理したものを試料原液とし，その 1 ml を 10 ml の Preston 培地が入った中試験管に入れ，増菌培養した。その検査結果から陽性検体数および検出率を算出した。また，収去食品に関する検査は，他の検査と検査法が異なることから，平成 23 年度の 5 検体については，秋田県の SOP による検査と同時に，食中毒菌汚染実態調査実施要領の手法も用いて検査を実施した。

3. 結果

3.1 市販食肉等の汚染実態調査

平成 12～19 年度に実施した調査研究による市販食肉等のカンピロバクター汚染実態調査結果を表 1 にまとめた。鶏肉からは 60.9%～74.0%，鶏レバーからは 44.4%と，高率にカンピロバクターが検出されている。一方，豚肉や豚レバー，牛肉，牛レバーからは検出されなかった。

また，厚生労働省による食中毒菌汚染実態調査の秋田県におけるカンピロバクター検査結果を表 2 に示した。鶏ミンチ肉からのカンピロバクター検出率は，28.6%～50.0%と高率であった。加熱調理用牛レバーからの検出率は 0～20.0%であった。

表 3 に平成 20～22 年に実施した全国における同調査結果[8]を示した。秋田県以外の調査では鶏ミンチ肉や加熱調理用牛レバーのほか，生食用の牛レバーや鶏たたきからもカンピロバクターが検出されていた。

3.2 収去食品検査

平成 17～23 年度に検査を実施した鶏肉 115 検体中，カンピロバクターが検出されたのは，平成 17 年度に 1 検体，平成 20 年度に 2 検体，平成 21 年度に 1 検体であり，検出率は 3.5%であった。

食中毒菌汚染実態調査実施要領の手法を用いた検査結果は，5 検体中 3 検体からカンピロバクターが検出された。さらに，今回，陽性となった 3 検体のうち 2 検体からは *C.jejuni* と *C.coli* の両菌種が検出された。また，分離されたコロニーの複数個を血清型別したところ，同一検体に複数の血清型が存在していたことから，鶏が保菌しているカンピロバクターの多様性が明らかとなった。

表 1　調査研究による汚染実態調査

検査年	検体種	陽性数/検体数	検出率（%）
H12~14	鶏肉	54 / 73	74.0
H17~18	鶏肉	14 /23	60.9
	鶏レバー	4 / 9	44.4
	豚肉	0 / 25	0
	豚レバー	0 / 14	0
	牛肉	0 / 25	0
	牛レバー	0 / 3	0
H19	県産鶏肉	52 /75	69.3

表 2　厚労省による食中毒菌汚染実態調査（秋田県）

検体種類	陽性数／検体数（検出率%）			
	H20	H21	H22	H23
鶏ミンチ肉	7 / 19 (36.8%)	4 / 14 (28.6%)	12 / 24 (50.0%)	5 / 10 (50.0%)
牛レバー（加熱調理用）	1 / 7 (14.3%)	0 / 12 (0%)	0 / 1 (0%)	2 / 10 (20.0%)

表 3　厚労省による食中毒菌汚染実態調査（全国）

検体種類	陽性数／検体数（検出率%）		
	H20	H21	H22
鶏ミンチ肉	46 / 196 (23.5%)	65 / 216 (30.1%)	71 / 198 (35.9%)
牛レバー（加熱調理用）	18 /212 (8.5%)	22 / 207 (10.6%)	22 / 209 (10.5%)
牛レバー (生食用)	2 / 11 (18.2%)	3 / 17 (17.6%)	2 / 21 (9.5%)
鶏たたき	9 / 45 (20.0%)	5 / 45 (11.1%)	8 / 48 (16.7%)

3.3 家畜の保菌状況

家畜の保菌率を表 4 に示す。牛の直腸便および胆汁からの検出率は 29.2%および 21.4%で，分離されたカンピロバクターの大部分が *C.jejuni* であった。

豚の直腸便からの検出率は 92.0%で，その陽性検体のすべてから *C.coli* が検出されており，うち 1 検体は同時に *C.jejuni* も保菌していた。胆汁からはカンピロバクターは検出されなかった。

鶏の盲腸便からの検出率は 90.9%であった。分離された菌種は *C.jejuni* が 66.7%，*C.coli* が 47.0%で，陽性検体のうち 15 検体から *C.jejuni* と *C.coli* の両方が分離された。

表 4　家畜の保菌率

検体種類	検体数	陽性数（検出率）	菌名	
			C.jejuni	*C.coli*
牛直腸便	178	52 (29.2%)	47 (26.4%)	8 (4.5%)
牛胆汁	187	40 (21.4%)	39 (20.9%)	1 (0.5%)
豚直腸便	100	92 (92.0%)	1 (1.0%)	92 (92.0%)
豚胆汁	100	0		
鶏盲腸便	66	60 (90.9%)	44 (66.7%)	31 (47.0%)

4. 考察

食中毒の原因となるカンピロバクターは，通常家禽や家畜の腸管内に保菌され，と畜場等での解体の過程で食肉を汚染すると考えられる[9]。

豚のカンピロバクター保菌率は 92.0%で，極めて高かった。しかしながら，そのほとんどは *C.coli* であった。*C.coli* は *C.jejuni* に比べても環境での抵抗力が弱く，肉表面の菌は早期に死滅すると考えられている[9]。実際，豚肉からカンピロバクターは検出されなかった。また，*C.coli* による食中毒や散発下痢症は *C.jejuni* に比べて極端に少ないことから，豚肉を介する感染はまれと思われる。

鶏は盲腸便からの検出率，食鳥処理場における製品加工工程で解体されたカット鶏肉からの検出率が高いことから，市販鶏肉の高確率な汚染が発生する原因として，解体処理段階で糞便の漏出による「と体」の汚染が生じ，その後の加工処理，流通過程において食肉の汚染が拡大していることが考えられる。

カンピロバクターに汚染されている鶏肉が流通し，さらに生食用としての基準がないにもかかわらず刺身やたたきとして販売・提供され，喫食されていることや，高度汚染鶏肉による二次汚染などが，カンピロバクターを原因とする食中毒の主な原因食品が鶏肉である理由として挙げられる。

一方，牛は直腸便からの検出率は豚や鶏に比べると低率であるものの，胆汁からもカンピロバクターが検出された。このことは，牛レバーは表面だけではなく，肝臓実質そのものが汚染されていることを示唆している。汚染実態調査の全国のデータをみると生食用の牛レバーからもカンピロバクターが検出されており，カンピロバクターによる食中毒事例や散発下痢症の重要な原因食品になっていると考えられる。

今回，様々な調査，研究事業に関連して行ったカンピロバクターに関する検査結果をまとめたところ，収去食品検査におけるカンピロバクターの検出率が他の調査結果に比較して低いことが明らかとなった。この要因の一つとして，秋田県の SOP による検査法は培養に用いる検体量が少ないことがあげられる。実際，平成 23 年度の 5 検体について食中毒菌汚染実態調査実施要領の手法を用いて検査を実施したところ，前法ではカンピロバクターが検出されなかった 3 検体からカンピロバクターが検出された。食品からのカンピロバクター検出法については，これまで公定法に相当する試験法が示されていなかったが，平成 23 年度には秋田県も参画して食品からのカンピロバクター検出法についてのコラボレイティブスタディが実施された。今後，コラボレイティブスタディで用いられた方法が国内標準試験法として示される可能性が高いこ

とから，それに併せて秋田県でも今後 SOP の検討等が必要と思われる。

また，市販食肉等の汚染実態調査から，特に県内に流通している鶏肉類はカンピロバクターに高度に汚染されている実態が浮き彫りとなった。伊藤ら（1985）の調査[10]では鶏から検出された *C.jejuni* 菌株の約 80%はヒト由来株の血清型と同一であることが示されており，鶏肉はヒトの下痢症の感染源として最も重要と考えられる。

カンピロバクターはおそらく食品中ではほとんど増殖できないが，少量の菌で感染が成立すると考えられている[9]。また，カンピロバクター食中毒において複数の血清型が検出されることはめずらしくないが，実際に，食中毒の原因食品として最も多い鶏肉検体が複数の血清型のカンピロバクターに汚染されていることは，我々の調査でも確認されている。これらのことから，カンピロバクターによる健康被害防止のためには，農場などの生産現場，食鳥・食肉処理場，流通過程にある食品関連事業者等が，それぞれの立場で汚染要因を把握し，対策を講じていくことで，カンピロバクター汚染を低減させていくことが重要であると考えられる。同時に，食中毒予防のためには汚染実態を踏まえ，一般消費者に対し，取り扱いや調理における衛生管理の必要性，生食することの危険性等について，より一層の啓発活動を行っていくことが必要である。

参考文献

1) 仲西寿男，丸山務，他: 食品由来感染症と食品微生物，中央法規出版，2009, 347-364.
2) 齊藤志保子，八柳潤，今野貴之: 秋田県における食中毒起因菌の侵淫実態と分離株の性状に関する調査研究，秋田県健康環境センター年報，**2**，2006，49-56.
3) 齊藤志保子，八柳潤，今野貴之: 市販鶏肉の腸管系感染症の感染源としてのリスク解明について，秋田県健康環境センター年報，**4**，2008，56-64.
4) Shioko S, Jun Y, Seizaburo H, Yuko I, Kunihiro S, Noriyuki S, Ken-ichi A, Katsuhiko E : Campylobacter jejuni isolated from retail poultry meat,bovine feces and bile,and human diarrheal samples in Japan:Comparison of serotypes and genotypes , FEMS Immunology and Medical Microbiology, **45**, 2005, 311-319.
5) 品川邦汎, 他:市販鶏肉のカンピロバクターの汚染実態に関する研究，厚生科学研究費補助金　特別研究事業　鶏肉に起因するカンピロバクター食中毒の予防対策に関する調査研究平成 12 年度分担研究報告書，2001.
6) 品川邦汎, 他:食鳥肉のカンピロバクターコントロールに関する研究，厚生科学研究費補助金　生活安全総合研究事業　食品製造の高度衛生管理に関する研究　平成 13 年度総括研究報告書，2002.
7) 品川邦汎, 他:食品製造の高度衛生管理に関する研究，厚生科学研究費補助金　食品・科学物質安全総合研究事業　食品製造の高度衛生管理に関する研究　平成 14 年度総括研究報告書，2003.
8) 厚生労働省:食安監発 0330 第 1 号　平成 22 年度食品の食中毒菌汚染実態調査の結果について，平成 23 年 3 月 30 日
9) 坂崎利一，他:食水系感染症と細菌性食中毒，2000，336-362.
10) 伊藤武，他:ニワトリにおけるカンピロバクターの保菌状況ならびに排菌推移および養鶏場における本菌汚染状況について，感染症学雑誌，**59**，1985，86.

食中毒疑い事例検査における新規病原菌 *Escherichia albertii* の検出

今野貴之　八柳　潤　髙橋志保　熊谷優子　和田恵理子　千葉真知子　齊藤志保子

2011 年 11 月に秋田県内の一保健所管内における食中毒疑い事例において，腸管病原性大腸菌（EPEC）や多くの腸管出血性大腸菌の病原因子として知られるインチミンの遺伝子（*eae*）を持った菌が患者から分離された。今回，我々は菌の生化学的な性状やリボソームの小サブユニットを構成する 16S rRNA 遺伝子の解析に加え，*stx*，*eae*，*uidA*，*lysP*，*mdh*，*cdtB* の有無を EPEC と比較した PCR 法により本菌を新規の下痢原性病原菌とされる *Escherichia albertii* と同定した。

1. はじめに

Escherichia albertii は，ヒトに下痢原性を示す可能性のある新規のエシェリキア属菌として 2003 年に報告された[1,2]。*E. albertii* は，当初，腸管病原性大腸菌（EPEC）や多くの腸管出血性大腸菌の病原因子として知られるインチミンの遺伝子である *eae* を持った非典型的な *Hafnia alvei* とされていたが，その後の研究でハフニア属ではないことが示された[1,3-5]。これらの *H. alvei* 様の菌は，Huys ら[2]による遺伝学的な系統解析により新規のエシェリキア属菌 *E. albertii* とされた。

Sharma らは，*E. albertii* がアメリカ合衆国における約 62,000,000 事例の原因不明の食中毒及び 3,200 の死亡例の要因のうちの 1 つかもしれないことを指摘している[6,7]。しかしながら，日本における *E. albertii* の分離報告はほとんどなく，その疫学や病原菌としての重要性についてはこれまでのところ分かっていない。

2011 年 11 月，秋田県において患者 22 人の食中毒疑い事例が発生した。我々はこの事例において *eae* を保有する EPEC 様の菌を分離し，菌の生化学的な性状試験，細菌の系統解析に広く用いられる 16S rRNA 遺伝子の解析や *stx*，*eae*，*uidA*，*lysP*，*mdh*，*cdtB* に対する PCR 法等の遺伝学的な手法により本菌の同定を試みた。

2. 方法

2.1 菌分離

施設従業員便 16 検体，患者便 19 検体，施設内拭き取り 10 検体に関して食中毒原因菌及びノロウイルスを調査した。食中毒原因菌としては，病原大腸菌（腸管出血性大腸菌含む），赤痢菌，サルモネラ属菌，ビブリオ属菌，エルシニア，カンピロバクター，黄色ブドウ球菌，セレウス菌，ウェルシュ菌を調査した。

病原大腸菌の検出は，PCR 法により各病原大腸菌の主要な病原因子，すなわち腸管出血性大腸菌の *stx*，EPEC の *eae*，腸管侵入性大腸菌の *invE*，毒素原性大腸菌の *est* 及び *elt*，腸管集合性大腸菌 *aggR* 及び *astA* の有無を確認することで行った[8-11]。

生化学的性状は，indole 及び lysine decarboxylase の産生性，lactose 及び xylose の発酵性，motility（運動性）について調査した。

2.2 16S rRNA の相同性解析

16S rRNA の遺伝子解析は Falske[12] ら及び Lane[13] らの方法を基に行った。

遺伝子の相同性解析は，BLASTN.2.2.24 によるオンラインの解析システムにより行った（http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html）。

2.3 *E. albertii* と EPEC の保有因子の比較

stx 及び *eae* に加えて，EPEC の確認のため，大腸菌に特異的な *uidA* の検出を行った。一方，*E. albertii* の確認は，Hyma ら[14] が報告した *lysP* と *mdh* を標的にした *E. albertii* 検出用の PCR 法により行った。また，*E. albertii* の病原因子の一つとして報告されている *cdtB* についても，Tóth ら[15] の報告を基に検出を行った。また，*cdtB* の型別を Kim ら[16] の報告を基に行った。

表１　*E. albertii* 同定 PCR に使用したプライマー

Target	Property	Sequence (5'–3')
stx	Shiga toxin	GAGCGAAATAATTTATATGTG
		TGATGATGGCAATTCAGTAT
eae	intimine	CAGGATCGCCTTTTTTATACG
		CTCTGCAGATTAACCTCTGC
uidA	beta-D-	TCAGCGCGAAGTCTTTATACC
	glucuronidase	CGTCGGTAATCACCATTCCC
lysP	lysine-specific	GGGCGCTGCTTTCATATATTCTT
	permease	TCCAGATCCAACCGGGAGTATCAGGA
mdh	malate	CTGGAAGGCGCAGATGTGGTACTGATT
	dehydrogenase	CTTGCTGAACCAGATTCTTCACAATACCG
cdtB	cytolethal	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG
	distending toxin	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA

3. 結果と考察

2011 年 11 月に秋田県内で発生した食中毒疑い事例の検査では，患者便より EPEC O 抗原型別不能が 1 名から，ノロウイルスが 2 名から検出された。また，ノロウイルスが検出されたうちの 1 名から，病原大腸菌の検査に関連して EPEC 様の菌株（EC15062）が検出された。

EC15062 は病原大腸菌の検査で *eae* のみ（＋）で *stx* を含むその他の病原大腸菌の主要な病原因子は（－）であった（図 1）。そのため，当初，EC15062 は EPEC であると予想された。しかしながら，生化学的な性状試験の結果，indole（＋），lysine（＋）であるが，motility（－），lactose（－），xylose（－）であり，大腸菌としては極めて非定型的性状であることが確認された（表 2）。

次に，EC15062 の 16S rRNA 遺伝子の一部 823 nt に関して，相同性解析を実施したところ，EC15062 の配列は *E. albertii* strain KWB09-600（accession no. HM194877）の配列と 100%一致したものの，多くの大腸菌の配列とも高い相同性を示した。一般に，非定型的な性状を示す菌の同定には，16S rRNA 遺伝子の相同性解析が有用であることが知られているが，*E. albertii* と大腸菌は非常に近縁であり，EC15062 の同定においては 16S rRNA 遺伝子の相同性解析では不十分と思われた。

そこで，EC15062 が EPEC か *E. albertii* かを鑑別するため，EPEC E2348/69 株を対照にして，PCR 法により *stx*, *eae*, *uidA*, *lysP*, *mdh* 及び *cdtB* の検出を行った（図 2）。その結果，EC15062 は，EPEC E2348/69 株と同じく *stx*（－），*eae*（＋）である一方，EPEC E2348/69 株とは対照的に，大腸菌に特徴的な *uidA* が（－），*E. albertii* 特異的に設計された *lysP* 及び *mdh* が（＋）であった。これらの結果から，EC15062 は *E. albertii* と同定された。

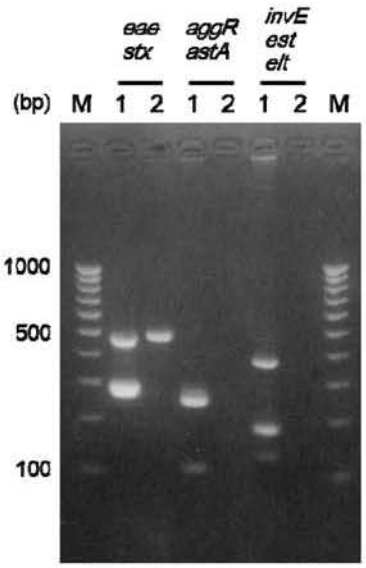


図１　病原大腸菌の主要病原因子の検出

stx (289 bp), *eae* (479 bp), *aggR* (254 bp), *astA* (106 bp), *elt* (186 bp), *est* (130 bp), *invE* (382 bp). Lanes: M, 100 bp size ladder (Bio-Rad); 1, **陽性コントロール**; 2, EC15062.

また，EC15062 は *E. albertii* の病原因子の一つとして報告されている *cdtB* に関しても（＋）であった。大腸菌では，CDT はその遺伝子配列から 5 つの型に分けられる。図 3 に示したように，EC15062 の *cdt* は typeIII と typeV に陽性を示した。これらの結果は，Hyma ら [14] の *E. albertii* の *cdt* の DNA 配列の解析結果と一致した。

E. albertii は，大腸菌の典型的な性状と異なるため，通常の病原大腸菌の検査では見過ごされたり，誤同定を招きかねない。今回，病原大腸

菌の病原因子の探索に加えて，*uidA* や *lysP* 及び *mdh* といった菌種特異的もしくは菌種により多型性を持つ遺伝子の PCR を併用することで *E. albertii* の同定が可能であった。ただし，本事例において *E. albertii* が検出された患者からはノロウイルスも検出されており，病原性や臨床症状に対する本菌の関与は不明であった。

E. albertii の病原性や疫学，臨床症状との関連については知見が不足しており，その解明のためには今後もさらなる事例の集積が必要と考えられる。

表２　*E. coli*, *E. albertii*, EC15062 の性状比較

	E. coli[17]	*E. coli* inactive[17]	*E. albertii*[18]	EC15062
Motility	+	−	−	−
Indole production	98%	80%	−	+
Lysin decarboxylase	90%	40%	+	+
Lactose fermentation	95%	25%	−	−
Xylose fermentation	95%	70%	−	−

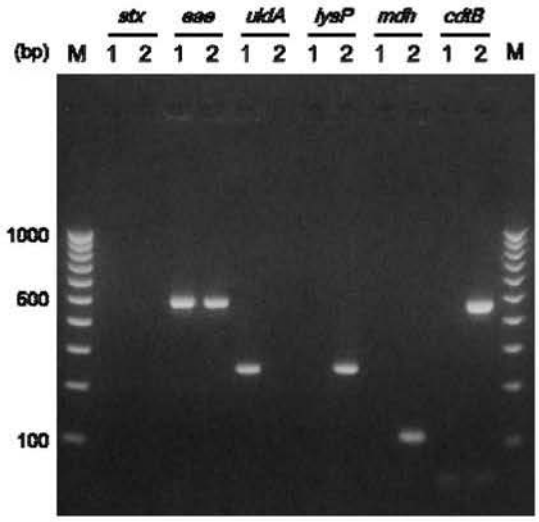


図２　分離株と EPEC における各遺伝子検出比較

Lanes: M, 100 bp size ladder (Bio-Rad); 1,EPEC E2348/69 株; 2, EC15062.

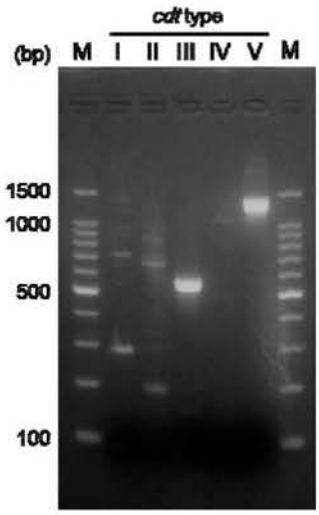


図３　分離株の CDT 型別

Lanes: M.

参考文献

1) Albert MJ, Alam K, Islam M, Montanaro J, Rahaman AS, Haider K, Hossain MA, Kibriya AK, Tzipori S: *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans, Infect. Immun., **59**, 4, 1991, 1507–1513.

2) Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J: *Escherichia albertii* sp. nov, a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **53**, 3, 2003, 807–810.

3) Janda JM, Abbott SL, Albert MJ: Prototypal diarrheagenic strains of *Hafnia alvei* are actually members of the genus *Escherichia*, J. Clin. Microbiol., **37**, 8, 1999, 2399–2401.

4) Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Probert W: Phenotypic and genotypic properties of the genus *Hafnia*, J. Med. Microbiol., **51**, 7, 2002, 575–580.

5) Ridell J, Siitonen A, Paulin L, Lindroos O, Korkeala H, Albert MJ: Characterization of *Hafnia alvei* by biochemical tests, random amplified polymorphic DNA PCR, and partial sequencing of the 16S rRNA gene, J. Clin. Microbiol., **33**, 9, 1995, 2372–2376.

6) Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV: Food-related illness and death in the United States, Emerg. Infect. Dis., **5**, 5, 1999, 607–625.

7) Sharma M, Kniel KE, Derevianko A, Ling J, Bhagwat AA: Sensitivity of *Escherichia albertii*, a potential food-borne pathogen, to food preservation treatments, Appl. Environ. Microbiol., **73**, 13, 2007, 4351–4353.

8) Ito K, Watanabe H, Toyosato M, Kosaka T, Mizuno K: Genetic analysis of *Shigella* pathogenesis and rapid detection method of *Shigella* virulence gene by the polymerase chain reaction, Jpn. J. Clin. Med., **50**, July, 1992, 368–372 (in Japanese).

9) Itoh F, Ogino T, Itoh K, Watanabe H: Differentiation and detection of pathogenic determinants among diarrheogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction using mixed primers, Jpn. J. Clin. Med., **50**, July, 1992, 343–347 (in Japanese).

10) Yatsuyanagi J, Saito S, Ito I: A case of hemolytic-uremic syndrome associated with shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces, Jpn. J. Infect. Dis., **55,** 5, 2002, 174–176.

11) Konno T, Yatsuyanagi J, Saito S: Virulence Gene Profiling of Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-stable Enterotoxin 1-harboring *E. coli* (EAST1EC) Derived from Sporadic Diarrheal Patients, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 64, 3, 2012, 314-320.

12) Felske A, Rheims H, Wolterink A, Stackebrandt E, Akkermans AD: Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class *Actinobacteria* in grassland soil, Microbiology, **143**, 9, 1997, 2983–2989.

13) Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR: Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, P. Natl. Acad. Sci. USA., **82**, 20, 1985, 6955–6959.

14) Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, Bumbaugh AC, Janda JM, Strockbine NA, Young VB, Whittam TS: Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains, J. Bacteriol., **187**, 2, 2005, 619–628.

15) Tóth I, Hérault F, Beutin L, Oswald E: Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV), J. Clin. Microbiol., **41**, 9, 2003, 4285–4291.

16) Kim JH, Kim JC, Choo YA, Jang HC, Choi YH, Chung JK, Cho SH, Park MS, Lee BK: Detection of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients in Republic of Korea, J. Microbiol. Biotechnol., **19**, 5, 2009, 525–529.

17) Farmer JJ 3rd, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR, Steigerwalt AG, O'hara CM, Morris GK, Smith PB, Brenner DJ: Biochemical identification of new species and biogroups of enterobacteriaceae isolated from clinical specimens, J. Clin. Microbiol., **21**, 1, 1985, 46–76.

18) Abbott SL, O'Connor J, Robin T, Zimmer BL, Janda JM: Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*, J. Clin. Microbiol., **41**, 10, 2003, 4852–4854.

血液から分離されたインフルエンザ菌の解析

今野貴之　八柳　潤　髙橋志保　熊谷優子　和田恵理子　千葉真知子　齊藤志保子

インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）の一部は，小児の細菌性髄膜炎等の侵襲性感染症の起因菌として知られており，感染症の動向を把握する上で莢膜の血清型を明らかにすることは極めて重要である。平成24年1月に県内医療機関において，肺炎患者の血液からインフルエンザ菌が分離された。分離株の莢膜の血清型を検査したところ，莢膜の型の中でも比較的まれなe型であることを確認した。また，薬剤耐性に関与する遺伝子としてペニシリナーゼ（bla_{TEM}，bla_{ROB}）及びペニシリン結合タンパク質（PBP）のアミノ酸変異の検出をPCRにて行った。分離株はbla_{TEM}, bla_{ROB}に関しては陰性であったが，β-lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenza* (BLNAR) group IIIに該当するPBPの変異が検出され，薬剤耐性菌と考えられた。

1. はじめに

インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）は，1×0.3 μmほどの多形性のグラム陰性桿菌で，菌体の表面に莢膜と呼ばれる構造を持つ菌と持たない菌が存在し，莢膜は血清学的にa～fの6型に分けられる。インフルエンザ菌は気管支炎，肺炎，中耳炎，副鼻腔炎といった市中感染症の起因菌となるが，特にb型（Hib）は小児の細菌性髄膜炎等の侵襲性感染症の起因菌として知られている。菌型によって重症化する場合があるため，本菌による感染症の動向を把握する上で莢膜の血清型を明らかにすることは極めて重要である。

当センターでは，平成23年度からインフルエンザ菌の薬剤耐性遺伝子の検出に加え，莢膜の遺伝子型別法を検討している。本報では，平成24年1月に県内医療機関から検査依頼のあった血液から分離されたインフルエンザ菌について行った莢膜型別と薬剤耐性遺伝子の解析結果について報告する。

2. 症例

患者：76歳男性。

既往歴：平成7年から狭心症として内服治療を受け，平成18年7月には，症状増悪にて右冠動脈病変に対してCypher stentが留置されていた。

平成23年1月に胃角部の胃癌のため腹腔鏡下幽門側胃切除術を受ける。手術自体の合併症はなかったが，術後から経口摂取不良による栄養障害が著明となり，体重が48 kgから38 kgまで減少し，一般状態が低下，全身の衰弱も顕著となっていた。

現病歴：平成23年11月22日，咳嗽が強くなり酸素飽和度が低下，誤嚥性肺炎の診断にて入院となった。入院後ピペラシリン／タゾバクタム（PIPC/TAZ）2.25 g，1日2回の点滴などで治療が行われ，肺炎はいったん改善した。入院中に誤嚥性肺炎を再発し，12月7日からセフェピム（CFPM）1 g，1日2回で治療が行われた。以後は中心静脈栄養で管理が行われたが，肺炎を反復し，12月26日からはセフメタゾール（CMZ）1 g，1日2回で加療されたが高熱が続いた。平成24年1月6日からはセフォペラゾン／スルバクタム（CPZ/SBT）1 g，1日2回で加療されたが，臨床的な改善はなく，1月18日にはCO_2ナルコーシスとなり昏睡状態に至り，平成24年1月31日に死亡した。

3. 方法

3.1 莢膜型別

平成24年1月5日の患者の静脈血培養から分離されたインフルエンザ菌（HI-2544）について，莢膜の型別を市販の抗血清（デンカ生研）を用いた免疫学的手法とPCR法[1)]により行った。

3.2 薬剤感受性試験及び薬剤耐性遺伝子の検出

ピペラシリン（PIPC），セフォペラゾン／スルバクタム（CPZ/SBT），セファクロル（CCL），セフタジジム（CAZ），セフジニル（CFDN），イミペネム（IPM），レボフロキサシン（LVFX）についてディスク法により阻止円を計測した。また，アンピシリン（ABPC），セフォタキシム（CTX），メロペネム（MEPM）についてはE-testを用いて最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。

薬剤耐性遺伝子について，PCR 法により bla_{TEM}[2] 及び bla_{ROB}[3] の検出を試みた。また，penicillin binding protein（PBP）の変異を検出するため，Ubukata ら[4]の報告を基にβ-lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae*（BLNAR）の group I，II 及び III に特徴的なアミノ酸変異部分にプライマーを設計し，PCR を行った。

4. 結果

4.1 莢膜型別

市販抗血清を用いた血清型別において，HI-2544 は e 型の抗血清に特異的に凝集を示した。また，PCR 法を用いた遺伝子型別においても e 型に特異的なバンドが検出された（図 1）。これらの結果から，HI-2544 は *H.influenzae* e 型と判定された。

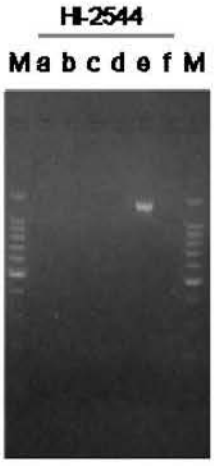


図 1　莢膜型特異的 PCR
M:100 bp ladder, a 型:250 bp, b 型:480 bp, c 型:250 bp, d 型:150 bp, e 型:1350 bp, f:450 bp.

4.2 薬剤感受性試験及び薬剤耐性遺伝子の検出

HI-2544 の薬剤感受性試験の結果を表 1 に示す。HI-2544 は CCL, CFDN に耐性を示し，ABPC に対する MIC が 2 μg/ml で低感受性であった。

PCR 法により薬剤耐性遺伝子を検索したところ，HI-2544 は bla_{TEM}，bla_{ROB} に関しては両者とも陰性であったが，BLNAR group III に該当する PBP の変異が検出された（図 2b）。

表 1　薬剤感受性試験成績.

薬剤	阻止円 (mm)	判定
PIPC	27	S
CPZ/SBT	23	S
CCL	7	R
CAZ	22	S
CFDN	7	R
IPM	19	S
LVFX	27	S

薬剤	MIC (μg/ml)	判定
ABPC	2	I
CTX	2	S
MEPM	0.25	S

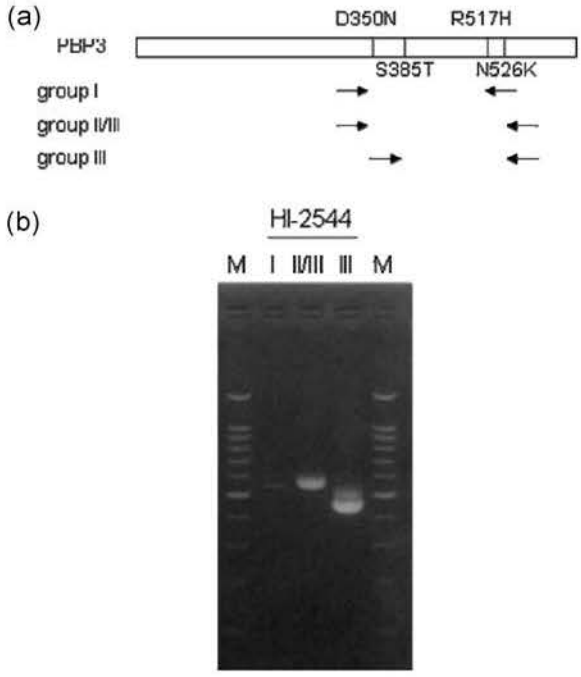


図 2　PCR for BLNAR
(a)primer 設計位置. (b) HI-2544 の BLNAR 型別. M: 100 bp ladder, I: 536 bp, II/III: 569 bp, III: 459 bp

5. 考察

日本では，平成20年に小児向けHibワクチンの販売が開始された。それに伴い，小児の細菌性髄膜炎等の侵襲性感染症を引き起こす菌型が変化する可能性が指摘されている。今回，誤嚥性肺炎から菌血症に至る中で血液培養より *H. influenzae* e型を確認した。e型は従来から寝たきり状態の患者における髄膜炎等で分離されることが多かった[5]。今回の患者も比較的高齢で，一般状態の低化した状態にあった。しかしながら，e型もその臨床的な特徴はHibと同様と考えられており[6]，それによる侵襲性感染症には注意が必要である。今回の事例は，現在注目されているようなワクチン導入によるHib以外の菌型の増加を示すものではないが，Hibと同様に小児の髄膜炎等の起因菌として知られる肺炎球菌ワクチンでは，導入後に接種対象年齢以外の年代にも集団免疫効果が確認されている[7]。そのため，Hibワクチン導入後の秋田県内のインフルエンザ菌感染症の発生動向を把握するためには，小児に限らずその発生を確認していくことが重要である。

また，本事例で分離された菌株は，薬剤感受性試験においてABPCに低感受性を示し，遺伝子検査においてもBLNAR group IIIに該当する変異が検出されたことから，薬剤耐性菌と考えられた。BLNARの場合，治療に難渋することが多いため，本菌による感染症の動向については莢膜の血清型に併せて，薬剤耐性の状況も注視していくことが必要と思われる。

謝辞

本報の内容の一部は，大館市立扇田病院の大本直樹先生，大館市立総合病院の高橋義博先生，太田和子技師長，三浦浩子技師，奈良昇悦技師，佐藤謙太郎技師から提供していただいた情報を基に作成致しました。深謝致します。

参考文献

1) Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER: PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*, J Clin Microbiol., **32**, 10, 1994, 2382–2386.

2) 今野貴之，八柳潤，齊藤志保子，小沼譲，太田和子，高橋義博：秋田県において初めて確認されたSHV-12型ESBL産生大腸菌について，病原微生物検出情報，31, 7, 2010, 209–210.

3) Tenover FC, Huang MB, Rasheed JK, Persing DH: Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenza*e, J Clin Microbiol., **32**, 11, 1994, 2729-2737.

4) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inoue M, Konno M: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenza*, Antimicrob Agents Chemother., **45**, 6, 2001, 1693–1699.

5) Campos J, Román F, Pérez-Vázquez M, Oteo J, Aracil B, Cercenado E; Spanish Study Group for *Haemophilus influenzae* Type E: Infection due to *Haemophilus influenzae* serotype e: microbiological, clinical, and epidemiological features, Clin Infect Dis., **37**, 6, 2003, 841–5.

6) Cerquetti M, Ciofi degli Atti ML, Cardines R, Giufre M, Romano A, Mastrantonio P: *Haemophilus influenzae* serotype e meningitis in an infant, Clin Infect Dis., **38**, 7, 2004, 1041.

7) Poehling KA, Talbot TR, Griffin MR, Craig AS, Whitney CG, Zell E, Lexau CA, Thomas AR, Harrison LH, Reingold AL, Hadler JL, Farley MM, Anderson BJ, Schaffner W: Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine, JAMA, **295**, 14, 1668–74.

LC-MS/MS を用いた畜水産物中の動物用医薬品一斉分析における固相抽出及びリン脂質クリーンアップ法の検討

松渕亜希子　　松田恵理子

LC-MS/MS による，畜水産物中の動物用医薬品 98 成分の一斉分析法を検討した。分析法には通知法（HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲ）[1]を改良した方法を用い，動物用医薬品の固相抽出や LC-MS/MS の測定妨害成分であるリン脂質のクリーンアップについて検討し，より迅速で実用的な一斉分析法を構築した。

鶏肉，豚肉，牛肉，エビ，サケ，牛乳，鶏卵，鶏レバー，ウナギ蒲焼きの 9 種類の食品について，添加回収試験（添加濃度：0.01 μg/g，n=3）を実施したところ，サケ，鶏レバー，ウナギ蒲焼きを除いて，概ね良好な結果が得られた。添加回収試験結果に問題があったこれらの 3 食品については，マトリックス添加検量線を用いることで結果が改善された。固相抽出カラムの選択に加えて，リン脂質をクリーンアップすることは，多様な食品についての一律基準レベルの分析に対して効果的であり，本法は精度の高いスクリーニング法として有用と考えられる。

1.　はじめに

動物用医薬品は畜水産物の安定供給，人獣共通感染症の防止等に貢献している一方，食品への残留による健康被害が懸念されている。

残留規制については，2006 年よりポジティブリスト制が施行し，規制対象品目が大幅に増加した（従来の 33 から約 250 品目）。動物用医薬品の残留基準は，一律基準よりも低い基準や不検出，不含有のものが比較的多い。このため，高精度で，低濃度レベルまで検出可能な一斉分析法が求められている。

近年，動物用医薬品の分析には，高感度・高選択性の特性を持つ LC-MS/MS を用いる方法が主流となっている。同機器による一斉分析法が多数報告[2-6]され，煩雑な操作，夾雑物の影響による再現性の低下や低回収率等，様々な問題が指摘されている。

そこで問題解決の一環として，動物用医薬品の固相抽出や測定妨害成分であるリン脂質のクリーンアップについて，数種の固相カラムを比較し，効率的かつ精度の高い一斉分析法を検討したところ，良好な結果が得られたので報告する。

2.　実験方法

2.1　試料

秋田県内で販売されている鶏肉，豚肉，牛肉，サケ，エビ，鶏卵，牛乳，鶏レバー（以下，レバー），ウナギ蒲焼きを用いた。

2.2　対象動物用医薬品

表 1 に示した，動物用医薬品 98 成分（抗生物質 23，合成抗菌剤 33，寄生虫駆除剤 14，抗炎症薬 10，ホルモン剤 6，その他医薬品等 12）を対象とした。

2.3　試薬等

標準品は以下のメーカーの製品を用いた。

関東化学，林純薬工業，和光純薬工業，Dr.Ehrenstorfer，LKT Laboratories，MP Biomedicals，Riedel-de Haen，Sigma Aidrich，AcuuStandard，ALEXIS，川崎三鷹製薬，テバ製薬，武田シェリング・プラウ・アニマルヘルス，インターベット，コーキン化学。

溶媒は関東化学製のアセトニトリル，メタノール，水（いずれも LC-MS 用），和光純薬工業製のジメチルホルムアミド(特級)，ギ酸(LC-MS 用）を用いた。

試薬は和光純薬工業製のメタリン酸，ギ酸アンモニウム，酢酸アンモニウム（いずれも特級）を用いた。

標準原液及び混合標準溶液は次の方法で調製した。各標準品の溶解性に応じ，メタノール，アセトニトリル，水，ジメチルホルムアミドを

表1　対象動物用医薬品およびイオン化最適条件

成　分	RT[*1](min)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	DP[*2](V)	CE[*3](V)	CXP[*4](V)
Benzylpenicillin	22.5	335.2	217.0	111	21	14
Oxacillin	23.7	402.2	160.1	61	19	10
Nafcillin	24.4	415.3	199.2	81	19	12
Mecillinam	18.0	326.2	167.2	81	33	10
Cloxacillin	23.7	435.9	178.0	126	35	12
Dicloxacillin	24.1	470.2	212.1	61	45	14
Cephalexin	17.1	348.1	158.1	61	15	10
Cephapirin	15.1	424.2	292.2	76	21	8
Ceftiofur	21.0	524.2	241.1	76	25	16
Nalidixic acid	22.4	233.2	215.2	46	23	14
Piromidic acid	23.9	289.2	243.2	61	43	16
Oxolinic acid	20.9	262.2	216.1	61	41	14
Flumequine	22.7	262.2	202.2	61	45	12
Sarafloxacin	17.7	386.1	342.2	86	27	10
Orbifloxacin	17.4	396.1	352.2	91	27	10
Trimethoprim	16.0	291.1	230.1	86	33	16
Ormetoprim	16.8	275.1	259.1	86	37	18
Pyrimethamine	19.1	249.1	233.0	111	39	16
Kitasamycin	21.3	772.4	109.3	111	61	6
Tylosin	21.2	916.6	174.1	116	53	12
Oleandomycin	20.4	688.4	544.4	76	23	18
Mirosamicin	19.9	728.4	116.1	101	67	10
Josamycin	22.1	828.6	174.0	131	47	12
Erythromycin	21.3	734.5	158.2	96	43	10
Sulfadoxine	18.9	311.2	155.9	71	27	10
Sulfadimethoxine	20.3	311.2	156.1	76	31	10
Sulfabenzamide	19.4	277.1	156.0	71	19	10
Sulfadiazine	14.6	251.1	155.9	66	23	10
Sulfamonomethoxine	18.7	281.2	156.0	66	25	10
Sulfamethoxypyridazine	17.8	281.2	155.9	61	25	10
Sulfacetamide	12.3	215.0	156.0	61	15	10
Sulfisozole	16.6	240.0	156.0	66	21	10
Sulfathiazole	15.3	256.1	155.9	56	23	10
Sulfisoxazole	18.8	268.1	113.1	61	23	8
Suifatroxazole	18.5	268.1	108.2	76	37	6
Sulfaquinoxaline	20.6	301.2	156.0	71	25	10
Suifamerazine	16.4	265.1	155.9	66	25	10
Sulfadimidine	17.6	279.1	186.0	71	25	14
Sulfisomidine	14.6	279.1	124.0	56	31	8
Sulfapyridine	15.8	250.1	156.1	56	23	10
Suifamethoxazole	18.4	254.1	156.0	61	23	10
Sulfamethizole	17.4	271.1	156.0	51	21	10
Sulfanitran	22.3	336.2	156.1	76	19	10
Sulfachloropyridazine	18.3	285.1	155.9	61	23	10
Suifabromomethazine	22.4	359.0	92.1	76	49	6
Fenbendazole	24.8	300.1	268.1	81	31	18
Oxfendazole	21.5	316.1	159.0	86	47	10
Oxfendazole sulfone	21.8	332.1	300.1	91	31	20
Praziquantel	24.5	313.2	203.1	91	25	14
Morantel	17.5	221.1	123.0	66	47	8

*1　RT : Retevtion time　*2　Declustering potential　*3　Collision Energy　*4　Collision cell exit potential

表1　対象動物用医薬品およびイオン化最適条件，続き

成　分	RT*1(min)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	DP*2(V)	CE*3(V)	CXP*4(V)
Flubendazole	23.5	314.1	282.1	86	31	20
Oxibendazole	20.8	250.1	218.1	86	27	16
Triclabendazole	26.7	358.9	344.0	101	37	10
Triclabendazole Oxon	25.7	329.0	167.9	101	43	12
Thiabendazole	17.4	202.1	175.1	91	37	12
5-Hydroxythiabendazole	15.9	218.0	191.0	46	37	12
Mebendazole	23.2	296.1	264.1	81	31	18
Lebamisole	14.4	205.1	178.0	91	31	12
Metronidazole	13.7	172.1	128.0	61	21	10
Dimetridazole	15.1	142.0	96.1	61	23	6
Ronidazole	14.1	201.1	140.0	51	17	10
Diaveridine	15.6	261.1	123.1	86	33	8
Clopidol	16.8	192.0	101.0	86	39	6
Benzocaine	21.4	166.0	138.0	61	21	10
Azaperone	17.7	328.1	165.0	81	31	10
Brotizolam	23.7	392.9	314.0	101	33	8
Mafoprazine	18.8	402.2	193.1	86	41	14
Xylazine	17.5	221.1	90.1	66	33	6
Tolfenamic Acid	27.4	262.1	209.1	46	39	14
Meloxicam	24.3	352.0	115.0	71	27	8
Ketoprofen	24.0	255.2	209.1	76	19	14
Carprofen	25.5	274.1	228.0	61	21	16
Flunixin	25.9	297.1	264.0	86	47	18
Hydrocortisone	23.0	363.4	121.2	81	35	8
Methylprednisolone	23.8	375.3	253.2	56	27	18
Prednisolone	22.9	361.3	147.1	66	31	10
Betamethasone	23.5	393.2	373.1	71	13	10
Dexamethasone	23.6	393.2	373.2	71	13	10
Altrenogest	25.5	311.2	227.2	96	35	16
Norgestomet	25.2	373.2	313.2	86	19	8
Chlormadinone	25.7	405.2	345.1	81	19	10
α-Trenbolone	24.2	271.2	253.2	101	29	18
β-Trenbolone	24.1	271.2	115.0	91	93	8
Clostebol	25.5	323.2	143.0	81	35	10
Melengestrol acetate	25.9	397.2	337.3	76	21	10
Virginiamycin	23.5	526.3	337.1	101	31	10
Novobiocin	26.6	613.3	189.0	76	39	12
Tiamulin Fumarate	20.9	494.4	192.1	81	29	14
Lincomycin	15.8	407.2	126.0	81	37	8
Clenbuterol	17.6	277.1	203.0	61	25	14
Menbutone	23.9	259.1	159.0	51	15	10
Tripelennamine	18.6	256.2	211.2	46	21	14
Famphur	23.3	326.0	93.0	76	43	6
Prifinium	20.4	306.2	86.1	56	37	4
Ethopabate	21.8	238.1	206.0	46	17	14
Tetracycline	17.2	445.3	410.2	76	27	12
Doxycycline	20.2	445.3	428.2	71	25	14
Oxytetracycline	17.5	461.2	426.2	71	29	14
Chlortetracycline	19.0	479.2	444.1	71	31	14

*1 RT : Retevtion time　*2 Declustering potential　*3 Collision Energy　*4 Collision cell exit potential

用いて溶解し 500 μg/mL の標準原液を調製した。これらの各標準原液を混合し 1 μg/mL となるようにアセトニトリルで調製し，混合標準液とした。

検討で用いた固相抽出カラムとリン脂質のクリーンアップカラム，各溶出条件を表 2，3 に示す。以下 EVOLUTE ABN＋を EVOLUTE, InertSep RP-1 を RP-1，ISOLUTE SLE+ を ISOLUTE ，Captiva ND Lipids を Captiva，Hybrid SPE Phospholipid を Hybrid SPE，InertSep RP-C18 を RP-C18，InertSep PSA を PSA と略称で示す。また，Hybrid SPE，MonoSpin TiO，PSA は 2 種類の溶出用溶媒を用いて検討した。各溶媒を番号で示す。

表2　固相抽出カラムと溶出条件

品名（メーカー）	溶出条件
Oasis HLB : 60 mg/3 cc（Waters）	メタノール 5 mL
EVOLUTE ABN＋ : 50 μm, 100 mg（Biotage）	
InertSep RP-1 : 60 mg/3 mL（GL Sciences）	
ISOLUTE SLE＋ : 10 mL（Biotage）	酢酸ｴﾁﾙ 20 mL×3回

表3　リン脂質のクリーンアップカラムと溶出条件

品名 （メーカー）	溶出条件
Captiva ND Lipids（Agilent Technologies）	70%メタノール
Hybrid SPE-Phospholipid: 30 mg/1 mL (Sigma-Aldrich)	① 1%ｷﾞ酸/ﾒﾀﾉｰﾙ ② 1%ｷﾞ酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ/ﾒﾀﾉｰﾙ
MonoSpin TiO（GL Sciences）	
C18*1 : 30 mg（AISTI SCIENCE）	アセトニトリル 1 mL
InertSep RP-C18*2 : 30 mg/1 mL（GL Science）	
InertSep PSA : 50 mg/1 mL (GL Sciences)	③ 1%ｷﾞ酸溶液 : ﾒﾀﾉｰﾙ (4:1, v/v) ④ 0.05 Mｷﾞ酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ溶液 : ﾒﾀﾉｰﾙ (4:1, v/v)

*1 シリカゲルベース　*2 ポリマーベース

2.4　装置

高速液体クロマトグラフは Agilent Technologies 社製 Agilent1100，質量分析装置は AB Sciex 社製 API4000，ハンドホモジナイザーは DREMEL 社製 MH-1000，遠心分離機は Sigma 社製 Sigma 1-15K，久保田製作所製 KUBOTA8850，日立工機製 himacCR20GⅢを用いた。

2.5　LC 及び MS 条件

分析カラムは，L-column (2.1 mm i.d × 150 mm, 粒子径 3 μm，化学物質評価研究機構製）を使用した。

移動相は A 液 0.05％ギ酸水溶液，B 液 0.05％ギ酸/メタノールを用い，グラジエント条件を 0 min（B：5％）→2 min（B：20％）→6 min（B：20％）→22 min（B：95％）→30 min（B：95％）→30.1 min（B：5％）→40 min（B：5％）とした。カラム温度は 40 ℃，流速は 0.2 mL/min，注入量は 10 μL とした。

イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード（ESI Positive），分析モードは Scheduled Multiple Reaction Monitoring（Scheduled MRM）とした。イオンスプレー電圧は 5.5 kV，イオン源温度は 500℃とした。

MRM 条件は，50～100 ng/mL の範囲で調製した各動物用医薬品の標準溶液をシリンジポンプを用いて直接 MS/MS に注入し，自動最適化より決定した。自動最適化の結果，感度が最も良好であったイオンを選択し，定量用イオンに用いた（表 1）。

α-トレンボロンと β-トレンボロンは配座異性体であり，今回のグラジエント条件では，ピークが近接しているため，まとめて定量した。

2.6　検量線の作成

検量線は，固相抽出カラム及びリン脂質のクリーンアップカラムの検討の際は絶対検量線を用い，添加回収試験の際は絶対検量線に加えてマトリックス添加検量線も用いた。

絶対検量線は，0，0.05，0.1，1，10，20 ng/mL の濃度で作成し，全ての成分について 0.05 または 0.1～20 ng/mL の範囲で良好な直線性（r = 0.999 以上）が得られた。

マトリックス添加検量線は，各試料 9 食品のブランク試験液を用いて，0，0.05，0.1，1，10，

20 ng/mL の濃度で調製した。全ての成分について 0.05 または 0.1～20 ng/mL の範囲で良好な直線性（r = 0.999 以上）が得られた。

2.7　検出限界

検出限界は，標準液（0.01, 0.05, 0.1, 1 ng/mL）を測定し，ピークの S/N 比が 3 以上の濃度を採用した。全成分において，0.01, 0.05, 0.1 ng/mL のいずれかであり，基準値レベルの分析に対して十分な検出感度を有していた。また，各試料 9 食品のブランク試験溶液で標準液（0.01, 0.05, 0.1, 1 ng/mL）を調製し測定したところ，全成分で 0.05, 0.1, 1 ng/mL のいずれかであった。

2.8　試験液の調製

2.8.1　検討用の試料抽出液の調製

検討用の試料には鶏肉を用い，また通知法 [1] を改良した方法で試料からの抽出を行った。図 1 に概略を示す。

試料 5.0 g にアセトニトリル，メタノールおよび 0.2%メタリン酸溶液（1 : 1 : 3）混液 75 mL を加えてホモジナイズし，遠心分離（3000 rpm, 10 min, 0℃）を行い，上清を 100 mL メスフラスコに移した。残留物に先の混液 15 mL を加えてかき混ぜた後，上記と同様に操作して，ろ液を合わせ，100 mL に定容した。これを，高速遠心分離し（12000 rpm, 30 min, 0℃），上清を 40℃で約 20 mL 以下に濃縮した。

この濃縮液に試料あたり 0.01 μg/g となるように混合標準液を添加して正確に 20 mL としたものを，固相抽出カラム検討用試験液（以下，A 液）とし，動物用医薬品の抽出効果の検討に使用した。

2.8.2　固相抽出カラムの検討

4 種類の固相カラム，Oasis HLB，EVOLUTE，RP-1，ISOLUTE を選び，試料抽出液からの動物用医薬品の抽出効果を比較した。

(1) OasisHLB，EVOLUTE，RP-1 による抽出

各カラムに，メタノール 5mL，水 5 mL を順次注入し，コンディショニングを行った後，A 液 8 mL（試料 2.0 g 相当）を負荷し，流出液を捨てた。次に水 10 mL を注入してカラムを洗浄後，メタノール 5 mL を注入し，ろ液を採取した。次にメタノールを濃縮乾固し，20%メタノール溶液 2 mL を正確に加えて溶解し，これを試験液とした。

(2) ISOLUTE による抽出

カラムに A 液 8 mL（試料 2.0 g 相当）を負荷し，10 分間静置した。次に酢酸エチル 20 mL による溶出を 3 回繰り返し，ろ液を合わせた。ろ液を濃縮乾固後，20%メタノール溶液 2 mL を正確に加えて溶かし，これを試験液とした。

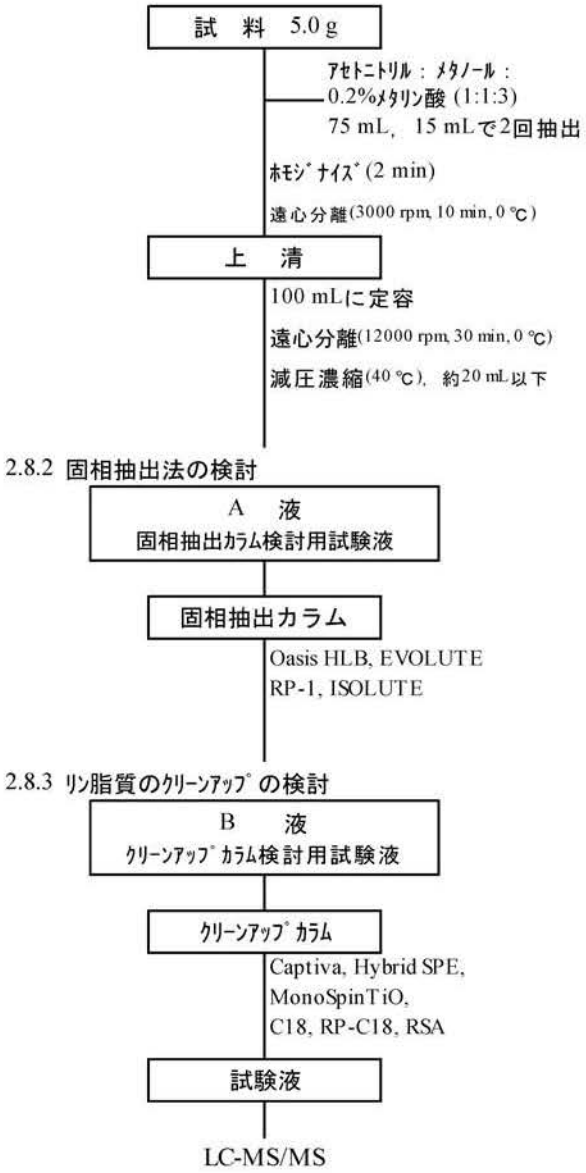


図1　検討用試験液の調製フロー

2.8.3　リン脂質のクリーンアップの検討

固相抽出で得られた試験液をさらにクリーンアップすることにした。対象はリン脂質とし，

6種類のカラム（Captiva, Hybrid SPE, MonoSpin-TiO, C18, RP-C18, PSA）について検討した。

図1に示したフローに従い，固相抽出（Oasis-HLB）後の溶出液をメタノールで5 mLに定容し，これに試料あたり0.01 μg/gとなるように混合標準液を添加し，クリーンアップカラム検討用試験液（以下，B液）とした。次に各カラムによる調製法を示す。

(1) Captivaによる調製

B液2 mL（試料2.0 g相当量）を分取し，濃縮乾固後，70%メタノール溶液1 mLに溶かした。この200 μL（試料0.40 g相当）をCaptivaに注入した。得られた溶出液を水で2倍に希釈したものを試験液とした。

(2) Hybrid SPEによる調製

溶出には，表3に示した2種類の溶媒を検討した。B液2 mL（試料2.0 g相当量）を分取し，濃縮乾固後，各溶媒1 mLに溶解した。各溶媒でコンディショニングしたカラムに，各液250 μL（試料0.50 g相当）を負荷し，さらに各溶媒1 mLで溶出し，ろ液を合わせた。これを濃縮乾固し，20%メタノール溶液500 μLを正確に加えて溶解したものを試験液とした。

(3) MonoSpin TiOによる調製

溶出には，表3に示した2種類の溶媒を検討した。B液2 mL（試料2.0 g相当量）を分取し，濃縮乾固後，各溶媒500 μLに溶解した。各溶媒でコンデショニングしたカラムに，各液50 μL（試料0.20 g相当）を負荷し，遠心分離（5000 rpm, 2 min）を行った。得られた溶出液に水150 μLを加え，これを試験液とした。

(4) C18, RP-C18による調製

B液2 mL（試料2.0 g相当量）を分取し，濃縮乾固後，アセトニトリル1 mLに溶かした。アセトニトリルでコンデショニングしたカラムに，250 μL（試料0.50 g相当）を負荷し，さらにアセトニトリル1 mLで溶出した。これを濃縮乾固し20%メタノール液500 μL正確に加えて溶解したものを試験液とした。

(5) PSAによる調製

溶出には，表3に示した2種類の溶媒を検討した。B液2 mL（試料2.0 g相当量）を分取し，濃縮乾固後，各溶媒1 mLに溶解した。各溶媒でコンデショニングしたカラムに，各液250 μL（試料0.50 g相当）を負荷し，得られた溶出液を水で2倍に希釈し，試験液とした。

2.8.4　9食品の添加回収試験

選択した固相抽出カラムとリン脂質クリーンアップカラムを用いて，2.1で示した9食品について添加回収試験（添加濃度：試料あたり0.01 μg/g, n=3）を実施した。概略を図2に示す。

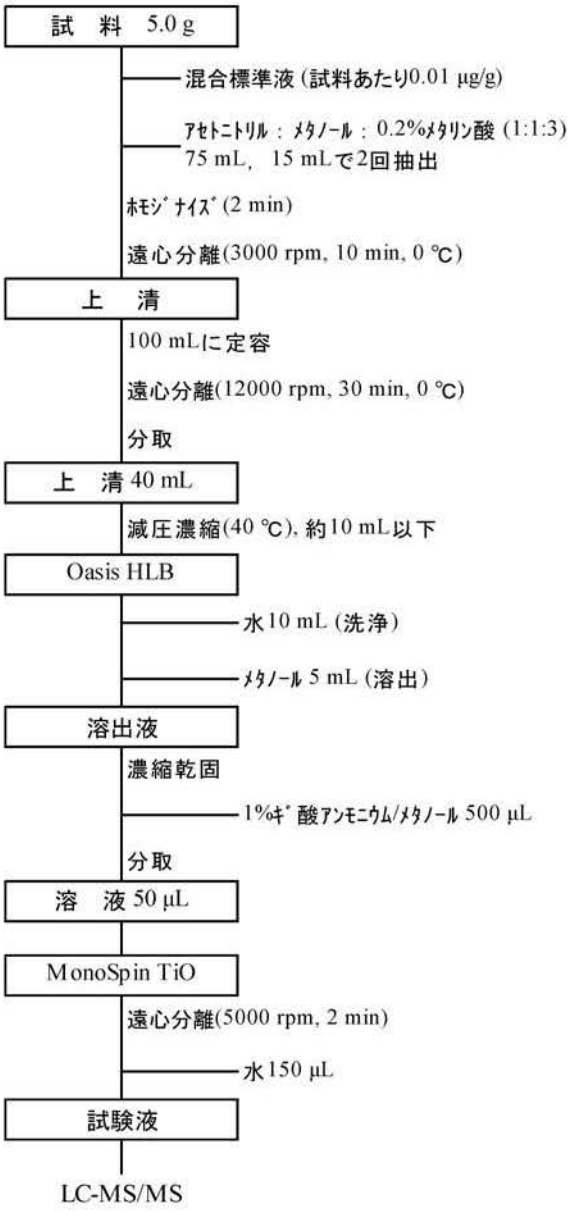


図2　添加回収試験のフロー

3　結果および考察

3.1　固相抽出カラムの検討

試料抽出液からの動物用医薬品の抽出効果を，固相カラム（Oasis HLB，EVOLUTE，RP-1，ISOLUTE）を用いて比較した。実験方法 2.8.1，2.8.2 に従って試験液を調製し，添加回収試験（添加濃度：0.01 μg/g，n=1）を行った。その結果を図 3 に示す。Oasis HLB で約 8 割が，その他についても，約 6～7 割の成分が回収率 50～120%の範囲内にあった。特に回収率 70～120%内の成分については， Oasis HLB で 98 成分中 62 成分と最も多く，次いで ISOLUTE であった。ISOLUTE では，吸着により回収できない成分が 9 成分みられた。これらの結果から，Oasis HLB を選択することにした。

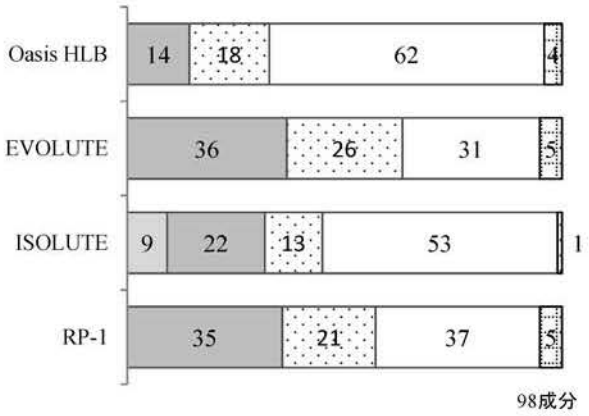


図3　固相抽出カラムの回収率(%)分布

□No data　■< 50%　▨50%≦-<70%
□70%≦-≦120%　▩ >120%

3.2　リン脂質のクリーンアップの検討

回収率の一層の改善や夾雑物の影響を減らして，より確かな分析法とするために，固相抽出後の試験液に，さらにクリーンアップを施すことにした。クリーンアップは，より高い効果と省力化を考慮して Oasis HLB 後に追加して行い，対象は畜水産物に比較的多量に含有し，イオンサプレッション等の原因となるリン脂質に絞った。

クリーンアップカラムは，リン脂質のリン酸基に特異的な親和性を持つもの 3 種（Captiva，Hybrid SPE，Mono SpinTiO），リン脂質の疎水性部分やリン酸基のアニオン部分と親和性があり，他の脂質類の除去も期待できるもの 3 種（C18，RP-C18，PSA）の計 6 種を検討することにした。

実験方法 2.8.3 に従って，各試験液を調製し，添加回収試験（添加濃度：0.01 μg/g，n=1）により，クリーンアップ効果を比較した。その結果を図 4 に示す。

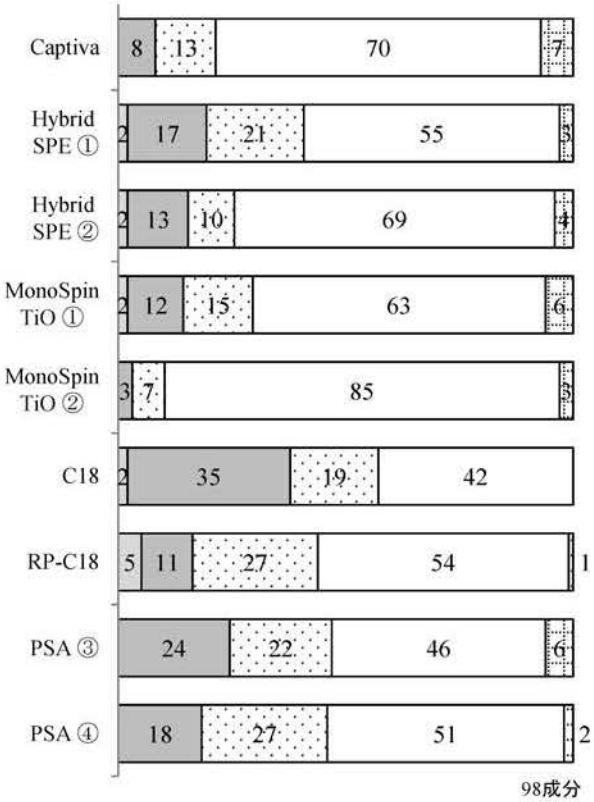


図4　クリーンアップカラムの回収率(%)分布

□No data　■< 50%　▨50%≦-<70%
□70%≦-≦120%　▩ >120%

最も良好な結果が得られたのは，MonoSpin TiO を用い，1%ギ酸アンモニウム/メタノールで溶出した場合であり，92 成分が回収率 50～120%を満たした。全体的にみると，リン脂質以外の脂質に対しても効果を期待した C18，RP-C18，PSA に比べ，Captiva，Hybrid SPE，MonoSpin TiO の効果が高かった。Hybrid SPE と MonoSpin TiO については，2 種類の溶媒で溶出を行ったが，いずれも塩を加えた 1%ギ酸アンモニウム/メタノールで溶出した方が良好な結果であった。

MonoSpin TiO は，モノリス型シリカゲルにコーティングされた二酸化チタンがリン酸基を選択的に捕捉するため，構造中にリン酸基を含む除草剤の抽出等に用いられている [7-8]。また形状がスピンカラムであり，従来のカートリッジタイプの固相カラムと比較して操作が簡単で，必要な試料量も極少量で済み，迅速な多検体の処理が可能である等の利点がある。Hybrid SPE も，

MonoSpin TiO と同様に，シリカゲルにコーティングされたジルコニアがリン酸基を捕捉するため，リン酸化ペプチドの精製や血中のリン脂質の除去等に用いられている [9-10]。本研究では，これらのカラムを畜水産物中のリン脂質の除去に応用したが，結果は概ね良好であり，効果的なクリーンアップ法であると考えられた。

図 5 に Oasis HLB 単独と MonoSpin TiO を併用した時の回収率の分布を示す。MonoSpin TiO を用いることによって，回収率の分布が 70～120 %に収束した。また，試験液の Q3 スキャンのクロマトグラムを図 6 に示す。クリーンアップを追加することにより，15～24 分に溶出するリン脂質等の妨害ピークの低減が確認できた。

以上の結果から，Oasis HLB の後に MonoSpin-TiO（溶出液：1%ギ酸アンモニウム/メタノール）を用いることにし，他の食品についても検討した。

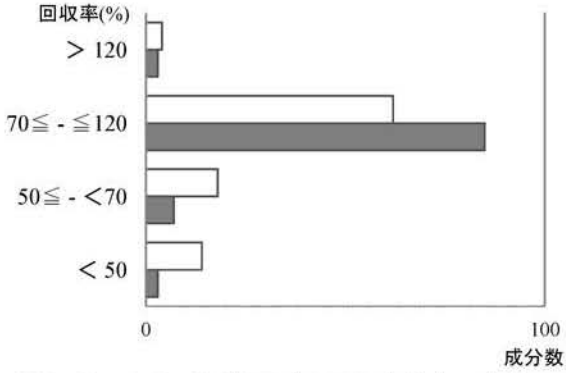


図5　MonoSpin TiO併用時の回収率分布の変化
□ Oasis HLB単独
■ MonoSpin TiO併用（1%ｷﾞ酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ/ﾒﾀﾉｰﾙ）

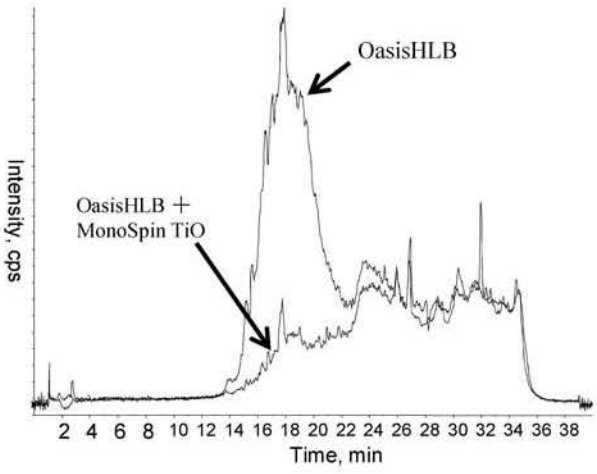


図6　Q3スキャンクロマトグラフ
（ポジティブモード，*m/z*：100-1000）

3.3　添加回収試験

2.1 に示した 9 食品について，実験方法 2.8.4 に従って，添加回収試験（添加濃度：0.01μg/g，n=3）を行った。回収率は絶対検量線とマトリックス添加検量線を用いて求めた。各食品の回収率の分布を図 7 に，添加回収試験結果を表 4 に示す。絶対検量線で定量した場合，鶏肉，豚肉，牛肉，エビ，牛乳，鶏卵において，回収率 50～120%内の成分が約 8 割を超え，良好な結果であった。サケ，レバー，ウナギ蒲焼きについては，マトリックス添加検量線を用いることで回収率を改善することができた。

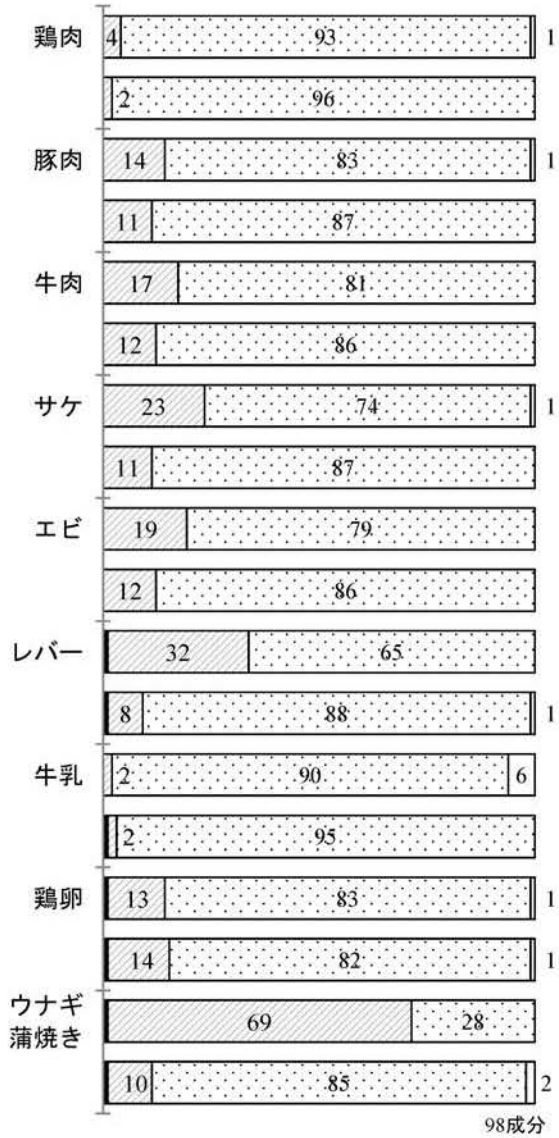


図7　添加回収率試験の回収率(%)分布
■ No data　□＜50%
□50%≦-≦120%　□＞120%

表4　9食品の添加回収試験結果（鶏肉，牛乳，エビ，サケ，豚肉）

成　分	鶏肉		牛乳		エビ		サケ		豚肉	
	平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)	
	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス
Benzylpenicillin	88.9 / 2.2	60.4 / 2.1	78.4 / 12.1	56.3 / 11.1	79.6 / 2.3	81.3 / 3.4	73.3 / 3.9	59.0 / 3.5	68.4 / 2.6	67.7 / 4.8
Oxacillin	93.7 / 7.8	89.7 / 7.1	85.6 / 11.9	76.5 / 11.3	104.0 / 2.4	100.9 / 0.9	78.5 / 1.9	94.4 / 2.0	103.5 / 4.1	93.6 / 6.4
Nafcillin	97.4 / 2.9	74.5 / 2.2	56.6 / 19.7	40.7 / 18.5	113.0 / 1.4	99.0 / 2.5	74.1 / 3.2	86.6 / 1.1	101.8 / 2.3	92.0 / 2.3
Mecillinam	80.3 / 7.3	89.8 / 7.0	90.2 / 4.3	85.9 / 3.9	66.8 / 6.2	71.3 / 5.4	77.0 / 1.9	85.9 / 1.9	72.4 / 6.0	69.9 / 5.7
Cloxacillin	90.3 / 7.0	74.8 / 6.9	76.0 / 9.3	68.4 / 7.8	92.6 / 1.1	87.6 / 1.2	79.2 / 3.6	79.6 / 0.9	96.3 / 3.5	77.7 / 2.8
Dicloxacillin	85.1 / 5.8	80.2 / 5.5	71.2 / 10.7	64.1 / 5.6	83.9 / 5.5	104.1 / 5.4	62.0 / 0.7	80.0 / 1.2	77.7 / 4.8	80.9 / 3.2
Cephalexin	74.0 / 10.6	82.5 / 8.4	88.8 / 7.3	110.2 / 7.3	73.4 / 8.9	71.8 / 14.1	58.6 / 2.3	59.8 / 2.1	64.7 / 7.5	61.1 / 7.4
Cephapirin	66.2 / 14.8	73.1 / 12.4	84.3 / 4.9	92.0 / 4.3	84.0 / 4.3	96.8 / 4.6	86.8 / 4.2	95.9 / 3.9	78.3 / 6.6	91.4 / 6.2
Ceftiofur	82.8 / 10.1	88.2 / 9.9	91.7 / 4.0	88.4 / 2.8	94.3 / 2.6	90.3 / 2.5	83.2 / 2.2	83.6 / 4.5	84.2 / 4.2	85.6 / 4.0
Nalidixic acid	63.4 / 6.7	56.8 / 9.6	64.6 / 9.3	54.8 / 9.6	44.1 / 10.2	49.5 / 11.4	41.5 / 4.6	42.4 / 4.5	21.6 / 31.5	24.3 / 34.8
Piromidic acid	61.2 / 11.3	51.6 / 11.4	57.6 / 10.9	49.7 / 9.4	39.8 / 12.6	42.7 / 12.0	35.7 / 7.1	40.1 / 7.1	19.2 / 26.9	20.6 / 35.0
Oxolinic acid	69.9 / 6.9	57.8 / 8.5	76.6 / 6.9	63.8 / 3.8	37.6 / 11.6	51.8 / 8.3	36.1 / 3.1	55.5 / 2.8	27.5 / 27.6	37.6 / 33.0
Flumequine	77.2 / 2.3	64.0 / 7.9	76.3 / 13.3	63.3 / 6.4	44.6 / 11.2	53.2 / 11.4	36.7 / 3.3	50.6 / 2.0	26.1 / 26.2	30.8 / 31.6
Sarafloxacin	93.7 / 6.8	53.9 / 10.3	142.7 / 4.9	56.9 / 3.6	62.1 / 13.5	40.5 / 17.7	84.7 / 4.8	35.7 / 6.0	50.5 / 30.1	16.2 / 40.8
Orbifloxacin	62.3 / 6.9	66.9 / 7.9	77.2 / 16.0	63.8 / 16.8	44.0 / 11.1	65.3 / 10.8	53.1 / 3.9	64.3 / 4.4	40.7 / 20.1	44.3 / 24.0
Trimethoprim	85.7 / 5.1	87.8 / 5.3	100.5 / 5.3	84.8 / 5.7	69.3 / 5.1	86.8 / 4.6	82.2 / 4.2	88.6 / 4.2	86.4 / 4.9	93.3 / 4.8
Ormetoprim	75.0 / 4.9	83.2 / 5.2	92.4 / 7.6	84.9 / 7.8	58.9 / 5.7	83.5 / 5.7	75.6 / 2.4	86.3 / 2.4	81.9 / 5.1	90.1 / 5.1
Pyrimethamine	70.1 / 4.9	83.3 / 6.1	97.9 / 0.9	84.9 / 1.0	38.7 / 2.9	60.0 / 2.7	55.6 / 5.4	68.3 / 5.2	76.8 / 2.9	81.4 / 2.9
Kitasamycin	70.0 / 4.3	75.4 / 6.3	69.5 / 10.4	80.4 / 4.9	47.9 / 5.3	47.8 / 6.4	56.9 / 4.6	72.5 / 3.2	63.3 / 2.9	69.8 / 2.2
Tylosin	72.6 / 4.1	63.4 / 4.9	68.7 / 14.8	66.5 / 13.6	46.5 / 5.3	45.1 / 4.2	46.8 / 3.8	49.3 / 3.8	51.5 / 3.8	51.2 / 3.9
Oleandomycin	83.6 / 5.2	87.1 / 5.1	97.3 / 4.5	91.5 / 4.1	87.9 / 2.5	113.7 / 2.3	84.1 / 4.5	89.4 / 6.0	83.1 / 4.6	102.7 / 4.6
Mirosamicin	63.9 / 9.3	81.2 / 9.8	94.7 / 4.4	89.3 / 4.4	64.5 / 2.7	85.9 / 2.7	69.8 / 0.9	88.2 / 0.9	81.5 / 5.8	83.4 / 5.7
Josamycin	77.4 / 3.0	85.8 / 3.0	81.9 / 6.0	75.7 / 6.0	54.2 / 6.5	58.4 / 6.1	57.4 / 2.0	80.7 / 1.9	55.3 / 2.0	72.6 / 1.9
Erythromycin	25.2 / 21.4	27.4 / 24.6	5.0 / 2.1	- / -	66.8 / 6.7	79.6 / 6.5	45.9 / 9.9	94.5 / 5.3	22.7 / 22.1	46.6 / 21.9
Sulfadoxine	99.3 / 3.0	81.5 / 3.3	94.8 / 3.6	71.0 / 4.0	83.2 / 5.4	96.1 / 5.9	70.3 / 2.6	77.1 / 2.6	85.1 / 5.0	86.6 / 4.5
Sulfadimethoxine	86.2 / 4.7	78.7 / 5.3	95.8 / 4.1	80.9 / 3.3	75.5 / 5.9	81.0 / 5.7	70.5 / 9.1	78.4 / 9.0	98.8 / 4.0	92.1 / 3.9
Sulfabenzamide	71.8 / 3.3	89.5 / 3.7	87.5 / 3.6	79.1 / 3.8	47.8 / 7.5	94.2 / 4.6	43.2 / 0.4	61.1 / 0.4	73.0 / 2.7	82.4 / 2.7
Sulfadiazine	88.1 / 6.7	85.7 / 8.1	85.0 / 2.4	75.9 / 1.9	80.9 / 11.9	98.0 / 11.7	72.6 / 6.2	87.9 / 6.1	76.4 / 4.3	88.2 / 4.3
Sulfamonomethoxine	104.1 / 6.6	80.5 / 6.6	106.3 / 1.8	69.4 / 1.6	74.8 / 5.3	94.2 / 4.5	63.3 / 3.7	72.6 / 3.6	83.3 / 5.3	85.0 / 5.3
Sulfamethoxypyridazine	92.6 / 4.5	78.0 / 5.2	81.7 / 3.4	72.3 / 3.4	65.9 / 6.0	87.1 / 5.8	57.6 / 4.2	70.3 / 4.2	73.4 / 5.9	80.0 / 5.8
Sulfacetamide	52.0 / 1.9	88.2 / 5.6	86.7 / 4.2	79.1 / 5.9	70.9 / 5.4	86.8 / 5.3	68.5 / 2.4	79.9 / 2.2	85.3 / 3.3	94.5 / 3.2
Sulfisozole	80.5 / 2.5	84.4 / 2.9	83.8 / 1.6	76.9 / 3.2	52.7 / 10.1	94.3 / 6.5	58.2 / 2.5	77.9 / 2.5	74.5 / 4.8	89.0 / 4.8
Sulfathiazole	84.0 / 5.5	84.6 / 5.1	75.8 / 2.2	72.0 / 2.3	74.1 / 7.1	97.3 / 6.9	66.8 / 6.0	72.9 / 5.2	82.4 / 4.5	88.9 / 4.3
Sulfisoxazole	83.4 / 3.1	103.3 / 3.2	88.1 / 3.8	75.0 / 3.8	68.6 / 7.5	100.0 / 7.3	61.8 / 1.0	76.6 / 1.0	85.3 / 3.7	89.9 / 1.6
Suifatroxazole	78.1 / 3.7	90.7 / 3.2	88.0 / 7.2	79.6 / 7.2	56.7 / 10.4	90.2 / 8.0	59.7 / 2.5	78.3 / 2.5	81.9 / 5.7	91.6 / 1.8
Sulfaquinoxaline	93.1 / 4.3	74.6 / 4.6	87.8 / 4.2	71.6 / 4.2	73.4 / 6.0	86.3 / 5.9	55.3 / 2.0	63.4 / 2.1	83.0 / 4.7	82.0 / 4.7
Suifamerazine	100.8 / 6.6	78.8 / 6.7	75.5 / 7.8	79.6 / 7.9	71.9 / 5.7	92.8 / 5.0	66.4 / 3.4	78.3 / 3.4	75.9 / 5.0	88.3 / 5.0
Sulfadimidine	92.1 / 6.5	73.7 / 7.1	90.0 / 4.6	73.0 / 4.6	77.9 / 5.7	90.6 / 5.6	66.2 / 3.6	74.7 / 3.7	79.0 / 4.2	80.4 / 4.3
Sulfisomidine	77.9 / 6.3	82.9 / 6.8	82.8 / 2.6	80.6 / 2.7	66.0 / 7.6	92.9 / 7.3	61.8 / 4.5	81.5 / 4.5	73.8 / 5.4	90.8 / 5.4
Sulfapyridine	85.2 / 5.9	75.0 / 7.8	76.2 / 6.7	76.1 / 6.7	78.6 / 4.3	99.8 / 4.3	66.1 / 3.0	78.8 / 3.4	78.5 / 2.0	94.1 / 2.0
Suifamethoxazole	82.5 / 4.5	88.9 / 4.6	91.5 / 3.7	79.0 / 3.7	59.8 / 11.5	87.7 / 11.0	63.2 / 2.1	75.2 / 2.1	84.2 / 6.1	90.5 / 6.0
Sulfamethizole	71.7 / 5.4	74.1 / 5.9	79.7 / 5.2	70.6 / 5.2	63.5 / 4.9	90.4 / 4.7	48.6 / 4.5	56.4 / 4.5	74.8 / 3.7	79.4 / 3.7
Sulfanitran	75.4 / 4.4	92.7 / 4.8	89.2 / 2.4	83.4 / 2.6	42.5 / 17.0	82.9 / 15.6	47.1 / 1.5	57.9 / 0.9	76.4 / 1.9	88.2 / 1.9
Sulfachloropyridazine	87.4 / 3.5	77.2 / 3.8	91.0 / 6.4	67.9 / 6.4	55.0 / 6.4	85.4 / 6.4	57.6 / 2.2	67.4 / 2.1	74.6 / 5.3	79.1 / 5.2
Suifabromomethazine	90.5 / 4.7	77.8 / 5.1	90.2 / 5.2	75.0 / 5.2	68.3 / 4.9	80.3 / 5.5	51.6 / 7.1	60.7 / 4.4	78.9 / 3.1	87.0 / 3.1
Fenbendazole	60.6 / 5.0	62.5 / 5.0	93.1 / 4.2	88.5 / 4.2	13.3 / 9.4	17.5 / 8.5	36.5 / 20.5	44.6 / 16.1	70.8 / 3.3	81.3 / 2.6
Oxfendazole	95.7 / 4.9	82.3 / 6.7	86.7 / 10.7	94.1 / 11.1	82.3 / 4.5	86.4 / 4.2	82.6 / 3.2	91.9 / 3.2	88.5 / 4.8	91.8 / 4.2
Oxfendazole sulfone	96.0 / 5.3	93.6 / 6.4	99.3 / 4.2	85.1 / 4.1	63.0 / 12.3	73.0 / 9.0	71.1 / 3.5	80.8 / 3.5	82.7 / 5.1	86.1 / 5.1
Praziquantel	99.0 / 1.5	86.1 / 1.8	102.5 / 5.4	87.6 / 5.3	77.5 / 3.0	86.7 / 3.1	61.0 / 1.5	72.7 / 1.1	85.7 / 4.5	94.4 / 4.3

添加濃度：0.01μg/g, n=3　　-：不検出

表4　9食品の添加回収試験結果（鶏肉，牛乳，エビ，サケ，豚肉），続き

成　分	鶏肉		牛乳		エビ		サケ		豚肉	
	平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)	
	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス
Morantel	91.8 / 4.7	82.1 / 7.0	95.3 / 3.1	82.1 / 2.0	78.4 / 2.4	87.2 / 2.8	86.6 / 1.9	92.0 / 1.2	83.8 / 4.9	87.0 / 5.6
Flubendazole	86.7 / 4.1	73.6 / 4.6	98.6 / 6.6	81.7 / 6.2	61.9 / 3.3	62.4 / 3.1	64.6 / 8.0	69.6 / 7.9	86.7 / 3.9	89.3 / 3.3
Oxibendazole	79.5 / 5.6	87.2 / 5.5	92.3 / 5.7	88.4 / 5.7	55.2 / 6.6	67.8 / 6.4	61.4 / 5.8	82.0 / 5.6	78.6 / 4.3	88.3 / 4.2
Triclabendazole	40.3 / 5.3	32.8 / 15.3	64.4 / 7.9	54.4 / 7.9	5.3 / 14.1	9.4 / 10.3	24.9 / 24.7	42.8 / 25.1	39.7 / 2.6	67.6 / 2.7
Triclabendazole Oxon	47.5 / 7.9	65.1 / 7.9	74.4 / 6.7	75.7 / 6.7	5.8 / 7.4	9.3 / 13.5	18.1 / 18.9	26.4 / 21.2	37.9 / 8.4	68.1 / 7.2
Thiabendazole	80.6 / 2.6	86.9 / 2.8	89.1 / 10.4	83.4 / 10.5	97.0 / 6.8	51.7 / 6.8	101.7 / 1.2	99.7 / 1.1	115.0 / 3.8	102.7 / 3.9
5-Hydroxythiabendazole	69.8 / 4.1	85.6 / 4.4	79.0 / 6.9	74.1 / 6.9	80.7 / 6.7	92.5 / 4.0	82.2 / 3.6	82.9 / 3.5	106.3 / 4.5	97.0 / 4.5
Mebendazole	93.4 / 3.4	80.0 / 4.0	99.9 / 5.2	85.4 / 5.1	65.9 / 3.9	71.7 / 3.9	66.7 / 8.0	78.8 / 7.8	85.3 / 5.1	90.4 / 5.4
Lebamisole	92.2 / 4.6	84.4 / 6.5	104.6 / 3.9	88.8 / 3.7	81.2 / 4.3	85.5 / 4.2	82.8 / 3.9	91.5 / 3.8	84.4 / 4.7	90.2 / 4.7
Metronidazole	89.0 / 4.7	80.3 / 5.4	94.9 / 4.9	85.5 / 5.3	69.0 / 3.8	86.4 / 3.7	75.9 / 4.0	91.4 / 4.0	75.2 / 2.3	88.6 / 2.3
Dimetridazole	53.7 / 3.4	77.0 / 3.8	55.0 / 13.3	57.4 / 13.3	51.3 / 5.1	101.0 / 5.3	43.9 / 1.4	77.0 / 2.1	41.9 / 10.0	63.7 / 9.1
Ronidazole	98.2 / 6.2	79.8 / 6.8	102.1 / 3.0	86.3 / 2.9	79.0 / 7.5	101.7 / 7.3	80.5 / 3.6	89.5 / 3.5	83.1 / 3.6	111.3 / 3.3
Diaveridine	72.6 / 4.0	77.6 / 4.4	90.7 / 7.5	94.8 / 7.6	64.1 / 5.3	84.5 / 5.2	78.4 / 4.6	89.7 / 4.6	82.2 / 4.6	92.6 / 4.5
Clopidol	81.7 / 1.3	92.3 / 1.5	97.6 / 4.6	95.3 / 4.3	62.6 / 3.0	99.6 / 2.7	69.7 / 5.2	92.9 / 5.1	73.9 / 1.7	92.0 / 1.6
Benzocaine	69.0 / 6.3	71.8 / 6.5	54.2 / 2.4	70.3 / 1.7	72.6 / 2.5	114.3 / 1.8	54.9 / 4.3	80.8 / 4.6	72.6 / 3.3	86.1 / 0.6
Azaperone	113.3 / 3.4	79.4 / 3.0	122.0 / 7.4	74.5 / 4.4	79.8 / 2.1	73.7 / 2.4	101.0 / 5.3	79.7 / 6.3	119.3 / 4.2	84.3 / 4.0
Brotizolam	94.7 / 1.0	79.2 / 1.2	91.4 / 7.6	74.4 / 9.2	75.8 / 4.5	83.0 / 4.3	67.7 / 3.8	77.6 / 3.2	83.7 / 3.7	88.6 / 3.7
Mafoprazine	79.1 / 2.0	88.2 / 2.1	95.0 / 3.0	86.9 / 3.1	65.0 / 3.7	85.0 / 3.7	77.3 / 2.8	85.9 / 2.7	87.6 / 4.1	87.2 / 2.5
Xylazine	84.3 / 6.3	81.6 / 6.3	93.1 / 5.3	88.1 / 5.2	81.3 / 2.8	87.3 / 2.7	83.2 / 4.9	86.1 / 4.6	89.8 / 3.8	91.5 / 3.7
Tolfenamic Acid	20.7 / 31.9	54.4 / 30.3	33.5 / 17.3	58.0 / 11.7	12.6 / 39.2	52.1 / 33.1	3.17 / 8.9	33.9 / 9.4	14.0 / 17.7	51.9 / 16.9
Meloxicam	85.1 / 3.0	83.5 / 6.5	90.5 / 3.5	80.8 / 4.1	85.1 / 3.7	86.6 / 5.9	70.1 / 1.0	88.5 / 0.3	84.3 / 1.2	89.3 / 0.5
Ketoprofen	90.9 / 3.2	87.7 / 0.5	101.8 / 4.3	85.9 / 4.2	71.3 / 0.5	93.9 / 2.2	46.0 / 5.8	66.5 / 4.5	77.2 / 6.5	90.7 / 1.3
Carprofen	51.2 / 7.8	100.6 / 5.1	67.3 / 1.6	80.7 / 1.6	18.7 / 10.7	68.7 / 8.6	16.2 / 8.0	29.1 / 10.3	22.2 / 8.7	85.0 / 5.8
Flunixin	75.3 / 3.1	89.9 / 3.1	89.0 / 5.0	83.4 / 5.0	72.0 / 3.7	92.0 / 3.5	57.2 / 8.5	74.4 / 6.7	69.2 / 3.3	81.9 / 3.2
Hydrocortisone	92.5 / 3.2	92.9 / 3.7	107.3 / 5.2	88.7 / 5.4	64.6 / 7.1	85.0 / 5.9	132.3 / 5.7	55.2 / 4.1	162.0 / 5.1	91.8 / 4.4
Methylprednisolone	98.1 / 1.8	98.0 / 2.7	105.0 / 4.0	85.5 / 3.1	75.7 / 5.8	90.1 / 5.7	63.7 / 4.3	82.0 / 4.3	84.0 / 4.0	86.1 / 2.5
Prednisolone	98.8 / 4.6	89.3 / 4.7	108.0 / 3.3	87.9 / 3.2	67.9 / 7.0	89.7 / 4.3	55.9 / 1.1	72.6 / 1.7	80.7 / 2.2	90.5 / 2.1
Betamethasone	94.9 / 2.9	93.0 / 3.0	104.0 / 3.4	89.9 / 3.4	75.9 / 3.1	93.9 / 3.0	56.5 / 0.5	74.1 / 0.3	82.4 / 3.0	93.3 / 2.9
Dexamethasone	96.8 / 3.4	96.3 / 4.2	104.3 / 4.6	89.2 / 4.5	76.5 / 3.4	96.3 / 3.6	57.6 / 1.1	70.8 / 1.0	83.8 / 4.7	92.5 / 2.5
Altrenogest	61.7 / 2.4	88.3 / 3.0	71.5 / 1.8	66.8 / 3.2	49.1 / 2.4	65.2 / 2.2	39.2 / 5.2	58.8 / 3.3	54.5 / 1.8	74.6 / 1.4
Norgestomet	74.5 / 1.7	99.3 / 1.6	87.8 / 3.5	88.6 / 3.6	57.1 / 5.4	76.5 / 5.2	46.7 / 1.8	70.5 / 1.7	70.1 / 3.8	95.4 / 3.3
Chlormadinone	67.8 / 3.2	83.8 / 3.7	86.2 / 2.3	83.3 / 3.3	38.4 / 10.3	56.4 / 10.1	33.9 / 12.2	56.5 / 8.4	61.0 / 4.9	82.5 / 4.9
α, β-Trenbolone	76.1 / 1.9	83.2 / 1.8	83.1 / 3.7	82.3 / 3.7	62.8 / 4.8	89.6 / 4.7	45.5 / 4.0	73.9 / 4.0	64.4 / 2.5	89.1 / 2.4
Clostebol	74.3 / 4.2	96.7 / 4.6	91.6 / 0.4	89.7 / 0.7	48.6 / 1.6	68.8 / 0.9	46.8 / 4.0	67.5 / 2.6	67.0 / 2.5	93.8 / 2.5
Melengestrol acetate	73.9 / 2.2	79.8 / 2.2	90.2 / 4.2	87.5 / 3.8	43.9 / 9.5	52.3 / 7.6	38.5 / 6.4	57.6 / 5.7	70.1 / 2.3	91.6 / 4.0
Virginiamycin	94.6 / 6.6	73.5 / 6.6	122.0 / 11.4	93.9 / 8.1	101.0 / 1.6	91.3 / 1.6	57.3 / 4.1	69.7 / 3.5	84.6 / 1.1	77.3 / 1.7
Novobiocin	82.9 / 4.5	89.1 / 6.0	70.1 / 5.3	61.8 / 5.0	62.5 / 3.9	82.4 / 3.6	52.8 / 7.6	75.7 / 5.0	73.3 / 7.3	95.9 / 6.7
Tiamulin Fumarate	88.1 / 4.2	98.2 / 4.9	100.0 / 5.3	86.0 / 5.3	74.2 / 2.5	78.0 / 2.4	83.0 / 4.1	98.6 / 4.3	90.6 / 5.6	95.7 / 5.7
Lincomycin	77.4 / 5.3	83.6 / 3.4	84.5 / 7.6	78.0 / 8.3	68.3 / 3.4	86.6 / 3.3	72.0 / 3.8	96.5 / 3.9	71.8 / 2.8	86.7 / 2.8
Clenbuterol	81.8 / 2.6	80.8 / 2.5	98.2 / 4.9	86.9 / 4.9	67.6 / 4.6	91.6 / 4.5	74.4 / 4.9	95.4 / 5.0	82.5 / 9.4	97.8 / 9.5
Menbutone	88.0 / 3.5	91.8 / 5.4	97.1 / 4.2	87.3 / 4.1	71.5 / 3.1	85.8 / 1.2	45.8 / 1.9	68.1 / 0.4	77.1 / 1.7	88.5 / 1.9
Tripelennamine	98.3 / 1.6	81.5 / 2.1	105.3 / 2.7	74.0 / 2.8	74.0 / 5.1	81.3 / 5.1	93.0 / 3.2	84.4 / 3.2	96.6 / 4.9	78.9 / 3.8
Famphur	92.7 / 1.6	90.6 / 1.4	94.7 / 5.4	88.6 / 5.7	72.0 / 4.2	99.0 / 3.7	53.7 / 4.2	79.0 / 4.0	81.0 / 3.2	91.5 / 4.6
Prifinium	94.4 / 5.3	85.0 / 5.8	102.6 / 4.8	85.5 / 4.9	70.9 / 2.8	82.8 / 2.6	80.5 / 5.3	87.4 / 5.3	87.2 / 1.9	95.4 / 2.0
Ethopabate	90.6 / 2.4	103.6 / 3.3	94.0 / 4.4	97.1 / 4.4	61.9 / 9.4	95.1 / 5.5	63.3 / 1.1	87.1 / 1.0	82.1 / 3.8	96.5 / 3.6
Tetracycline	84.5 / 12.9	70.6 / 12.6	106.2 / 8.4	84.4 / 7.6	60.3 / 6.3	30.7 / 13.1	73.4 / 1.9	37.7 / 1.5	45.8 / 11.9	21.3 / 36.3
Doxycycline	134.3 / 11.6	80.9 / 4.1	137.0 / 9.2	86.1 / 9.9	77.2 / 2.7	46.6 / 9.8	82.0 / 4.7	55.7 / 5.0	58.9 / 3.7	35.9 / 28.5
Oxytetracycline	103.7 / 8.7	83.8 / 9.8	125.7 / 9.4	81.3 / 10.8	71.5 / 5.1	41.3 / 15.2	71.8 / 1.5	60.4 / 2.1	43.4 / 5.6	26.6 / 33.5
Chlortetracycline	104.0 / 13.0	65.8 / 5.3	126.0 / 7.6	70.2 / 9.4	51.4 / 6.2	25.2 / 8.4	50.8 / 1.3	39.2 / 6.4	36.2 / 5.0	18.2 / 37.8

添加濃度：0.01μg/g, n=3　　-：不検出

表4　9食品の添加回収試験結果（牛肉，鶏卵，レバー，ウナギ蒲焼き）

成　分	牛肉		鶏卵		レバー		ウナギ蒲焼き	
	平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)	
	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス
Benzylpenicillin	76.1 / 2.9	73.5 / 4.5	73.0 / 7.1	41.9 / 6.1	81.1 / 7.1	77.5 / 7.2	53.5 / 6.5	46.9 / 6.6
Oxacillin	95.4 / 2.0	87.7 / 2.4	85.8 / 1.6	135.0 / 1.4	66.8 / 2.3	99.5 / 2.2	50.7 / 4.0	75.5 / 4.0
Nafcillin	86.3 / 2.7	80.2 / 4.3	70.4 / 8.2	113.0 / 5.4	39.0 / 7.1	66.3 / 3.2	62.2 / 3.2	85.7 / 3.2
Mecillinam	69.0 / 4.9	76.9 / 3.0	68.9 / 1.2	90.1 / 1.0	65.3 / 5.0	77.7 / 4.5	13.3 / 9.0	20.2 / 7.2
Cloxacillin	84.4 / 3.1	75.9 / 4.2	81.7 / 12.3	89.2 / 10.3	81.0 / 4.0	89.6 / 3.8	63.4 / 2.4	77.6 / 2.4
Dicloxacillin	65.5 / 0.9	74.3 / 3.7	69.2 / 0.9	96.3 / 6.3	54.9 / 3.1	82.2 / 1.7	38.3 / 7.4	75.7 / 7.4
Cephalexin	58.4 / 5.7	55.3 / 5.5	65.6 / 8.8	67.4 / 6.9	63.8 / 15.5	64.5 / 14.3	10.1 / 1.2	14.1 / 1.5
Cephapirin	87.1 / 3.0	98.5 / 2.5	84.4 / 2.4	92.8 / 2.0	64.0 / 1.6	77.6 / 1.5	62.4 / 5.5	88.1 / 5.2
Ceftiofur	84.4 / 5.9	87.6 / 5.8	79.8 / 3.0	77.3 / 2.5	88.6 / 2.2	91.7 / 2.3	60.1 / 1.8	79.3 / 1.7
Nalidixic acid	33.7 / 6.7	33.2 / 7.3	27.3 / 2.7	32.6 / 3.1	61.9 / 8.0	68.8 / 7.6	44.9 / 6.3	61.8 / 6.5
Piromidic acid	27.6 / 7.2	27.7 / 8.2	32.2 / 10.5	33.0 / 9.5	75.2 / 4.6	61.9 / 1.6	63.7 / 6.3	64.4 / 11.9
Oxolinic acid	28.9 / 2.7	39.3 / 10.1	43.6 / 4.3	46.8 / 6.7	60.7 / 5.1	84.9 / 5.8	38.8 / 10.9	68.9 / 7.2
Flumequine	30.3 / 1.6	40.2 / 5.7	37.8 / 2.7	40.0 / 9.9	59.5 / 12.7	66.4 / 12.7	83.9 / 5.9	95.7 / 2.8
Sarafloxacin	58.9 / 4.8	32.1 / 13.6	38.0 / 15.9	25.2 / 6.9	55.0 / 10.2	45.1 / 9.7	45.9 / 9.5	40.8 / 9.9
Orbifloxacin	42.2 / 4.3	54.1 / 4.0	61.3 / 5.7	53.7 / 4.9	49.5 / 3.3	72.5 / 3.2	40.0 / 3.1	73.8 / 3.1
Trimethoprim	79.6 / 3.2	97.0 / 2.7	78.3 / 4.3	82.2 / 3.8	59.4 / 1.2	80.4 / 1.1	42.0 / 2.7	74.2 / 2.6
Ormetoprim	71.7 / 1.4	89.5 / 1.4	77.7 / 1.0	85.5 / 0.8	50.0 / 2.6	79.9 / 2.5	38.9 / 4.1	75.6 / 3.9
Pyrimethamine	65.9 / 5.7	82.6 / 5.2	73.6 / 2.6	81.6 / 2.2	34.8 / 1.5	64.4 / 1.5	35.6 / 4.5	72.9 / 4.2
Kitasamycin	57.8 / 1.8	57.5 / 4.2	69.3 / 4.2	67.1 / 3.7	45.0 / 7.3	51.3 / 6.6	46.7 / 8.1	61.7 / 7.2
Tylosin	46.6 / 3.5	40.7 / 5.1	62.4 / 1.9	49.4 / 1.7	43.0 / 5.6	44.0 / 5.1	46.5 / 9.0	50.7 / 8.2
Oleandomycin	77.5 / 9.0	100.8 / 8.0	86.4 / 2.2	80.7 / 1.9	72.9 / 3.7	87.3 / 3.6	63.3 / 4.0	81.2 / 3.8
Mirosamicin	73.9 / 2.2	87.0 / 2.1	85.2 / 1.6	80.9 / 1.4	55.6 / 2.9	84.6 / 2.8	50.0 / 5.1	81.7 / 4.7
Josamycin	61.8 / 4.7	65.2 / 3.8	81.1 / 3.0	86.4 / 2.6	58.1 / 2.1	67.3 / 1.9	58.2 / 4.8	75.0 / 4.5
Erythromycin	28.9 / 48.3	47.2 / 46.9	15.1 / 8.7	34.6 / 7.1	1.3 / 8.1	63.0 / 9.4	37.9 / 13.1	55.2 / 12.3
Sulfadoxine	73.6 / 1.1	78.5 / 1.3	89.2 / 1.6	87.4 / 1.4	72.2 / 3.9	91.7 / 3.7	45.2 / 2.5	80.1 / 2.4
Sulfadimethoxine	82.1 / 9.7	85.1 / 9.0	70.8 / 1.9	86.4 / 1.6	54.4 / 3.0	85.3 / 2.8	40.1 / 4.2	78.8 / 3.9
Sulfabenzamide	52.8 / 2.9	75.4 / 7.5	75.4 / 2.2	90.7 / 1.9	29.6 / 9.1	886 / 8.7	15.7 / 4.3	69.2 / 4.0
Sulfadiazine	76.3 / 4.4	83.8 / 5.4	72.9 / 2.9	76.4 / 2.5	62.4 / 2.4	82.9 / 2.4	37.4 / 4.7	81.6 / 4.6
Sulfamonomethoxine	76.0 / 3.6	82.8 / 3.3	76.7 / 3.5	80.8 / 3.1	53.1 / 8.9	89.1 / 8.6	35.8 / 4.7	76.7 / 4.6
Sulfamethoxypyridazine	55.5 / 2.8	72.9 / 2.9	64.0 / 4.0	72.2 / 3.5	48.7 / 5.3	88.1 / 5.1	32.9 / 2.2	78.4 / 2.0
Sulfacetamide	78.8 / 6.7	97.4 / 6.7	87.2 / 1.9	96.0 / 1.6	49.8 / 17.0	110.2 / 10.4	23.4 / 3.0	91.4 / 2.8
Sulfisozole	57.8 / 4.4	94.7 / 3.6	75.4 / 2.2	88.1 / 1.9	38.6 / 3.7	80.9 / 3.5	19.6 / 12.3	78.3 / 11.6
Sulfathiazole	69.1 / 6.1	81.5 / 5.6	74.6 / 4.7	79.3 / 4.2	48.1 / 2.3	78.2 / 2.3	34.5 / 6.8	77.0 / 6.5
Sulfisoxazole	69.0 / 3.5	90.6 / 3.0	87.2 / 2.8	87.8 / 2.3	48.1 / 8.6	89.6 / 7.8	28.9 / 4.0	79.1 / 3.6
Suifatroxazole	60.5 / 4.3	87.7 / 3.7	78.5 / 1.6	89.0 / 1.4	35.9 / 9.5	79.1 / 9.1	27.4 / 2.1	78.5 / 2.0
Sulfaquinoxaline	66.9 / 3.2	67.1 / 4.1	72.0 / 10.2	76.1 / 8.7	53.8 / 1.4	77.6 / 1.4	38.0 / 1.2	64.3 / 4.9
Suifamerazine	74.4 / 4.2	86.2 / 1.2	72.7 / 2.3	86.5 / 2.0	57.0 / 2.4	85.7 / 2.3	34.0 / 3.6	78.2 / 3.4
Sulfadimidine	70.3 / 2.2	83.6 / 2.4	73.3 / 1.8	77.6 / 1.5	54.9 / 2.1	86.1 / 2.0	33.2 / 7.2	82.8 / 7.0
Sulfisomidine	66.0 / 4.7	85.0 / 5.2	74.1 / 1.4	88.2 / 1.2	52.3 / 3.0	77.1 / 3.1	36.7 / 4.4	83.1 / 4.3
Sulfapyridine	65.5 / 4.1	82.6 / 4.8	72.6 / 2.6	76.1 / 2.2	63.0 / 3.3	85.0 / 3.2	37.5 / 6.5	79.3 / 6.1
Suifamethoxazole	66.6 / 3.7	88.6 / 3.6	73.4 / 1.1	82.1 / 0.9	38.2 / 5.9	73.8 / 5.6	29.1 / 3.7	77.9 / 3.5
Sulfamethizole	56.9 / 3.7	70.8 / 4.6	69.5 / 1.8	78.1 / 1.5	41.6 / 3.7	79.3 / 3.6	27.7 / 9.9	82.0 / 9.5
Sulfanitran	55.6 / 2.1	77.7 / 3.8	76.1 / 4.1	85.3 / 3.6	47.5 / 8.5	103.8 / 8.5	20.3 / 7.4	66.8 / 7.5
Sulfachloropyridazine	60.2 / 4.4	81.7 / 4.3	59.5 / 3.7	69.6 / 3.1	37.4 / 6.0	78.6 / 5.8	27.5 / 2.1	76.3 / 1.9
Suifabromomethazine	66.2 / 3.6	73.4 / 3.6	74.4 / 2.5	75.4 / 2.1	63.6 / 5.2	83.2 / 5.0	37.4 / 4.4	80.0 / 4.2
Fenbendazole	49.9 / 6.2	84.0 / 4.1	55.1 / 7.0	87.6 / 6.1	20.9 / 11.0	37.2 / 10.0	26.7 / 5.4	37.6 / 5.5
Oxfendazole	89.9 / 1.6	91.5 / 2.4	83.8 / 1.2	87.5 / 1.0	70.2 / 0.5	93.5 / 0.5	52.4 / 3.4	82.6 / 3.2
Oxfendazole sulfone	80.7 / 2.6	86.3 / 3.4	80.8 / 1.3	84.5 / 1.1	68.5 / 2.1	89.1 / 2.0	50.8 / 3.1	82.1 / 3.0
Praziquantel	71.2 / 3.4	82.6 / 3.4	84.8 / 1.2	92.2 / 1.0	66.9 / 3.6	81.9 / 3.4	50.4 / 3.2	83.3 / 3.1

添加濃度：0.01μg/g, n=3　　-：不検出

表4　9食品の添加回収試験結果（牛肉，鶏卵，レバー，ウナギ蒲焼き），続き

成　分	牛肉		鶏卵		レバー		ウナギ蒲焼き	
	平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)		平均(%) / RSD(%)	
	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス	絶対	マトリックス
Morantel	82.5 / 1.5	90.5 / 1.7	94.1 / 1.1	79.5 / 1.6	80.9 / 2.0	81.7 / 1.9	65.9 / 5.9	77.4 / 4.7
Flubendazole	79.3 / 2.0	86.9 / 3.4	76.5 / 6.0	79.0 / 5.2	61.5 / 1.7	90.9 / 1.7	57.6 / 3.6	77.8 / 3.4
Oxibendazole	73.4 / 1.6	86.4 / 1.4	68.5 / 7.4	73.1 / 6.3	52.8 / 3.9	82.2 / 3.7	45.6 / 1.6	85.2 / 1.5
Triclabendazole	20.6 / 19.5	56.2 / 18.4	19.4 / 5.7	23.7 / 4.9	8.1 / 35.0	14.0 / 28.6	14.4 / 5.7	27.4 / 4.9
Triclabendazole Oxon	27.4 / 17.0	69.5 / 14.7	28.1 / 8.2	46.83 / 7.3	6.7 / 26.4	17.5 / 21.8	23.8 / 21.8	51.4 / 19.6
Thiabendazole	108.0 / 2.3	106.3 / 2.3	89.5 / 1.0	95.0 / 0.9	50.7 / 2.9	76.2 / 2.7	41.0 / 4.6	81.0 / 4.4
5-Hydroxythiabendazole	73.2 / 2.8	78.7 / 2.8	87.9 / 2.5	93.1 / 2.2	57.9 / 0.9	86.3 / 0.8	38.5 / 2.5	77.9 / 2.3
Mebendazole	77.3 / 3.8	89.8 / 4.1	76.6 / 3.2	79.4 / 2.8	60.9 / 4.0	89.6 / 3.9	45.9 / 2.4	73.3 / 2.3
Lebamisole	83.2 / 2.1	93.1 / 4.3	86.8 / 0.5	80.8 / 0.4	80.7 / 1.6	87.5 / 1.5	50.0 / 10.5	62.6 / 9.9
Metronidazole	75.5 / 5.1	92.3 / 5.5	74.1 / 3.8	87.1 / 3.3	53.9 / 2.2	86.1 / 2.2	30.1 / 1.3	55.4 / 1.2
Dimetridazole	47.9 / 4.3	83.0 / 4.3	54.8 / 3.5	90.8 / 3.2	51.8 / 1.7	115.3 / 0.8	41.4 / 7.0	148.0 / 7.0
Ronidazole	81.7 / 3.4	98.3 / 3.4	79.8 / 5.3	85.8 / 4.6	61.5 / 4.0	80.5 / 4.0	46.0 / 5.3	85.0 / 5.1
Diaveridine	73.5 / 4.8	92.4 / 4.3	80.9 / 3.7	83.3 / 3.2	49.7 / 6.1	86.8 / 5.9	39.4 / 4.5	73.6 / 4.2
Clopidol	61.5 / 1.6	102.0 / 1.6	82.7 / 0.3	94.9 / 0.3	42.8 / 5.4	82.3 / 5.1	25.6 / 7.7	73.5 / 7.2
Benzocaine	62.6 / 6.1	75.1 / 3.9	70.0 / 2.6	106.7 / 2.1	56.3 / 1.1	117.0 / 1.8	33.6 / 2.0	136.7 / 1.9
Azaperone	112.7 / 2.9	102.0 / 2.1	112.3 / 3.3	75.1 / 2.8	25.2 / 26.0	22.1 / 11.0	65.2 / 3.9	82.9 / 3.8
Brotizolam	75.3 / 4.0	82.2 / 7.0	85.1 / 6.1	87.0 / 5.3	70.5 / 4.1	85.8 / 3.9	60.6 / 6.5	82.0 / 6.4
Mafoprazine	78.9 / 4.0	90.7 / 4.0	84.0 / 1.1	83.7 / 0.9	57.1 / 3.7	86.6 / 3.5	47.4 / 3.6	79.7 / 3.4
Xylazine	89.4 / 1.9	94.9 / 2.0	88.3 / 1.1	86.3 / 0.9	76.7 / 4.7	80.8 / 4.5	67.2 / 4.4	81.2 / 4.1
Tolfenamic Acid	8.8 / 31.5	33.9 / 32.1	16.8 / 32.8	34.9 / 27.8	11.2 / 16.1	33.0 / 16.3	5.9 / 22.0	33.2 / 20.0
Meloxicam	72.8 / 5.1	84.1 / 3.9	75.1 / 0.7	82.9 / 0.67	77.3 / 3.3	96.4 / 3.5	56.5 / 3.8	82.8 / 3.6
Ketoprofen	56.9 / 0.8	75.9 / 1.3	74.5 / 8.7	78.6 / 5.6	42.2 / 29	77.1 / 4.7	32.8 / 9.8	69.7 / 9.7
Carprofen	18.0 / 11.2	53.9 / 12.1	30.7 / 13.1	60.0 / 11.3	14.6 / 6.0	47.0 / 5.4	15.5 / 23.5	42.7 / 23.2
Flunixin	57.0 / 7.4	77.3 / 8.5	62.1 / 1.6	68.3 / 1.3	61.6 / 3.5	84.2 / 3.3	49.1 / 4.9	79.7 / 4.7
Hydrocortisone	111.0 / 3.2	97.8 / 3.9	78.5 / 2.8	85.2 / 2.4	53.3 / 9.3	99.9 / 8.0	35.7 / 6.0	82.0 / 6.0
Methylprednisolone	68.3 / 1.1	85.2 / 2.9	77.2 / 4.3	81.2 / 3.7	55.9 / 4.0	86.0 / 4.0	41.7 / 7.0	66.1 / 7.0
Prednisolone	66.8 / 1.5	83.7 / 1.5	79.8 / 1.4	85.2 / 1.2	55.2 / 5.3	96.9 / 5.2	34.7 / 3.0	72.4 / 3.0
Betamethasone	66.6 / 0.4	82.5 / 0.5	79.2 / 8.1	87.7 / 6.9	50.4 / 1.1	92.2 / 1.1	44.1 / 4.4	70.6 / 4.3
Dexamethasone	67.8 / 0.2	83.5 / 1.0	79.7 / 7.5	87.5 / 6.4	50.9 / 3.4	92.5 / 3.3	45.0 / 5.0	71.7 / 4.8
Altrenogest	43.4 / 2.9	65.1 / 3.2	51.8 / 10.5	63.9 / 8.4	46.5 / 4.3	64.9 / 5.8	44.8 / 10.4	73.5 / 7.8
Norgestomet	59.1 / 4.0	81.3 / 4.0	65.0 / 8.7	99.6 / 7.5	46.6 / 3.8	86.8 / 3.8	38.0 / 2.3	65.5 / 2.3
Chlormadinone	47.6 / 3.2	73.1 / 3.2	56.6 / 8.1	80.6 / 7.2	39.3 / 5.3	74.2 / 5.2	26.1 / 6.5	46.3 / 6.6
α, β-Trenbolone	49.0 / 2.5	73.5 / 3.2	68.2 / 8.0	82.7 / 7.0	60.2 / 7.4	74.4 / 7.3	48.4 / 7.4	89.7 / 8.3
Clostebol	51.9 / 3.1	74.2 / 5.1	66.8 / 4.8	96.2 / 4.5	42.1 / 2.0	78.9 / 2.0	35.5 / 8.2	70.9 / 7.6
Melengestrol acetate	51.3 / 4.2	72.1 / 4.4	64.9 / 1.9	81.5 / 1.6	44.2 / 3.3	80.4 / 3.2	31.1 / 10.9	55.4 / 10.3
Virginiamycin	75.3 / 3.6	75.2 / 3.0	98.1 / 8.7	88.3 / 7.1	103.1 / 11.1	76.7 / 11.1	82.6 / 9.3	94.4 / 9.2
Novobiocin	57.2 / 9.7	78.0 / 9.0	62.8 / 4.9	75.1 / 3.9	52.7 / 5.8	74.8 / 5.1	53.9 / 3.8	76.2 / 3.8
Tiamulin Fumarate	87.2 / 2.2	92.8 / 3.6	99.4 / 5.2	65.2 / 4.4	98.3 / 1.9	86.4 / 1.7	78.4 / 4.9	89.5 / 4.7
Lincomycin	64.1 / 4.4	88.8 / 2.6	74.5 / 2.7	81.7 / 2.3	61.2 / 0.8	82.6 / 0.7	15.1 / 21.5	28.3 / 18.4
Clenbuterol	74.5 / 1.8	98.3 / 3.4	74.0 / 5.6	77.2 / 4.9	53.3 / 3.5	83.3 / 3.4	40.3 / 3.2	85.3 / 3.2
Menbutone	61.3 / 0.8	78.8 / 1.4	72.8 / 2.8	76.8 / 2.4	41.9 / 4.1	67.4 / 4.1	36.0 / 3.2	66.9 / 3.1
Tripelennamine	93.1 / 4.0	92.2 / 4.3	103.4 / 6.3	66.0 / 5.4	83.2 / 5.6	76.7 / 5.3	72.5 / 4.9	75.1 / 4.6
Famphur	61.9 / 1.2	82.5 / 1.1	77.9 / 3.1	83.2 / 2.7	57.3 / 6.0	102.4 / 5.9	29.7 / 1.5	79.2 / 1.5
Prifinium	84.1 / 5.5	100.2 / 6.4	122.3 / 1.7	77.4 / 1.5	102.4 / 4.8	83.9 / 4.7	88.9 / 3.6	78.0 / 3.5
Ethopabate	70.4 / 0.4	88.3 / 0.6	85.4 / 1.1	96.2 / 1.0	56.4 / 2.3	101.4 / 2.3	30.9 / 3.2	85.4 / 3.1
Tetracycline	59.0 / 3.5	32.6 / 4.9	33.4 / 6.2	28.3 / 8.2	80.3 / 3.0	92.4 / 74.0	76.9 / 2.2	55.7 / 3.6
Doxycycline	59.6 / 2.7	45.4 / 4.7	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
Oxytetracycline	60.0 / 2.0	34.1 / 8.3	47.5 / 2.7	29.8 / 3.8	83.0 / 6.8	60.6 / 1.4	114.0 / 7.4	91.0 / 0.2
Chlortetracycline	42.2 / 3.2	28.5 / 12.8	35.5 / 5.4	28.0 / 6.5	81.5 / 2.7	186.2 / 96.8	70.1 / 10.7	50.2 / 2.9

添加濃度：0.01μg/g, n=3　　-：不検出

まとめ

動物用医薬品の固相抽出やリン脂質のクリーンアップについて，数種の固相カラムを用いて比較検討を行ったところ，Oasis HLB と MonoSpinTiO を併用した場合に最も良好な結果が得られた。

9 食品の添加回収試験（添加濃度：0.01 μg/g）では，鶏肉，豚肉，牛肉，エビ，鶏卵，牛乳で良好な結果が得られた。サケ，レバー，ウナギ蒲焼きは，マトリックス添加検量線を用いることで回収率を改善することができた。

リン脂質の除去は，畜水産物中の多様な動物用医薬品の一斉分析において効果的であり，一律基準レベルの分析を可能とした。本法は簡便で十分な感度と精度が得られることからスクリーニング法として実用性が高いと考えられる。

参考文献

1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について（平成 17 年 1 月 24 日食安発第 0124001 号），「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 Ⅲ（畜水産物）」.

2) 甲斐茂美他：高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による畜水産物中動物用医薬品スクリーニング分析法，分析化学，**56**，12，2007，1105-1113.

3) 野口昭一郎他：LC-MS/MS を用いた畜水産物中の残留動物用医薬品の一斉分析法，食品衛生学雑誌，**49**，3，2008，177-188.

4) 梶田弘子他：LC-MS/MS による畜水産食品中の動物用医薬品一斉分析，食品衛生学雑誌，**49**，6，2008，381-389.

5) 吉田絵美子他：乳および乳製品中のテトラサイクリン系抗生物質を含めた動物用医薬品一斉分析の検討，食品衛生学雑誌，**50**，5，2009，216-222.

6) 吉田絵美子他：加工食品中の動物用医薬品迅速一斉試験法の検討，食品衛生学雑誌，**52**，1，2011，59-65.

7) 太田彦人他：含リンアミノ酸系除草剤の分析前処理用 TiO_2 コーティングモノリススピンカラムの開発，日本法科学技術学会，第 14 回学術集会講演要旨集，2008.

8) Takeshi Saito, et al.：Mix-mode TiO-C18 Monolith Spin Column Extraction and GC-MS for the Simultaneous Assay of Organophosphorus Compounds and Glufosinate, and Glyphosate in Human Serum and Urine，ALYTICAL SCIENCES，**27**，10，2011，999-1005.

9) 渡辺大助他：ジルコニアカートリッジを用いた生体試料中含リンアミノ酸類の濃縮固相抽出法の開発，日本法科学技術学会，第 15 回学術集会講演要旨集，2009.

10) 前田尚之他：LC-MS/MS を用いたラット臓器中ステロイドホルモンおよびそのグルクロン酸抱合体の同時分析，日本質量分析学会，第 58 回質量分析総合討論会要旨集，2010.

LC-MS/MS を用いたハチミツ中の動物用医薬品一斉分析法の検討

松渕亜希子　　松田恵理子

ハチミツ中の動物用医薬品 80 成分について，LC-MS/MS による一斉分析法を検討した。ハチミツを 100 倍に希釈し，精密ろ過膜を用いてろ過する方法（以下，希釈法）と，ポリマー系カラム（Oasis HLB）を用いて固相抽出する方法（以下，固相抽出法）の 2 法について比較検討した。

希釈法により添加回収試験（添加濃度：0.02 及び 0.1 μg/g，各 n=3）を実施したところ，低濃度では 53 成分，高濃度では 66 成分で良好な結果（回収率 50～120%，相対標準偏差（以下，RSD）15%以下）が得られた。低濃度では，夾雑物の影響を受けやすく，成分によっては良好な結果が得られないものもあった。

固相抽出法により，添加回収試験（添加濃度：0.001 μg/g，n=3）を行ったところ，73 成分で良好な結果であった。固相抽出法を用いることで，一律基準及び不検出レベルに耐えうる十分な感度と精度を満たすことができ，スクリーニング法としての有用性が得られた。

1. はじめに

ハチミツは，ミツバチが植物の花蜜等からつくりだす天然の甘味物質であり，腐そ病やバロア病等のミツバチの疾病に使われる動物用医薬品の残留が懸念されている。ハチミツの国内自給率は 10%未満であり，流通品の大部分は中国，カナダ，アルゼンチン等からの輸入品である。検疫所のモニタリング検査では，ハチミツやその加工品から，動物用医薬品の検出事例が報告されている [1)]。

ハチミツの場合，基準値が設定されている動物用医薬品の数が少なく，それらの基準値が極めて低い。また，これまで検出事例のあったものが数種であることから，ハチミツの分析法は測定対象物質を限定的に絞り込んだものが多く [2-4)]，多種類を対象とした低濃度レベルにおける一斉分析法の検討は非常に少ない。そこで今回，LC-MS/MS を用い，簡便かつ迅速で低濃度レベルに対応できる動物用医薬品一斉分析法を検討した。

2. 実験方法

2.1　試料

秋田県内で販売されているハチミツを用いた。

2.2　対象動物用医薬品

表 1 に示した，動物用医薬品 80 成分（抗生物質 14，合成抗菌剤 32，寄生虫駆除剤 13，抗炎症薬 6，ホルモン剤 5，その他医薬品等 10）を対象とした。

2.3　試薬等

標準品は以下のメーカーの製品を用いた。

関東化学，林純薬工業，和光純薬工業，Dr.Ehrenstorfer，LKT Laboratories，MP Biomedicals，Riedel-de Haen，Sigma Aidrich，AcuuStandard，ALEXIS，川崎三鷹製薬，テバ製薬，武田シェリング・プラウ・アニマルヘルス，インターベット，コーキン化学。

溶媒は，関東化学製のアセトニトリル，メタノール，水（いずれも LC-MS 用），和光純薬工業製のジメチルホルムアミド（特級），ギ酸（LC-MS 用）を用いた。

標準原液及び混合標準溶液は次の方法で調製した。各標準品の溶解性に応じ，メタノール，アセトニトリル，水，ジメチルホルムアミドを用いて溶解し 500 μg/mL の標準原液を調製した。これらの各標準原液を混合し 1 μg/mL となるようにアセトニトリルで調製し，混合標準液とした。

精製カラムは，精密ろ過膜は Whatman 社製 Anotop10（孔径 0.02 μm），ポリマー系（ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体）カラムは Waters 社製の Oasis HLB （60 mg/ 3cc）を用いた。

表1　対象動物用医薬品およびイオン化最適条件

成　分	RT[*1] (min)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	DP[*2] (V)	CE[*3] (V)	CXP[*4] (V)
Benzylpenicillin	21.6	335.2	217.0	111	21	14
Oxacillin	23.1	402.2	160.1	61	19	10
Nafcillin	24.0	415.3	199.2	81	19	12
Cloxacillin	23.0	435.9	178.0	126	35	12
Dicloxacillin	23.5	470.2	212.1	61	45	14
Cephalexin	15.3	348.1	158.1	61	15	10
Ceftiofur	20.4	524.2	241.1	76	25	16
Nalidixic acid	21.6	233.2	215.2	46	23	14
Piromidic acid	23.2	289.2	243.2	61	43	16
Oxolinic acid	20.0	262.2	216.1	61	41	14
Flumequine	21.8	262.2	202.2	61	45	12
Sarafloxacin	16.3	386.1	342.2	86	27	10
Orbifloxacin	15.9	396.1	352.2	91	27	10
Trimethoprim	14.0	291.1	230.1	86	33	16
Ormetoprim	15.0	275.1	259.1	86	37	18
Pyrimethamine	17.8	249.1	233.0	111	39	16
Kitasamycin	20.2	772.4	109.3	111	61	6
Oleandomycin	19.3	688.4	544.4	76	23	18
Mirosamicin	19.0	728.4	116.1	101	67	10
Josamycin	21.0	828.6	174.0	131	47	12
Erythromycin	20.2	734.5	158.2	96	43	10
Sulfadoxine	17.6	311.2	155.9	71	27	10
Sulfadimethoxine	19.3	311.2	156.1	76	31	10
Sulfabenzamide	18.2	277.1	156.0	71	19	10
Sulfadiazine	12.4	251.1	155.9	66	23	10
Sulfamonomethoxine	17.4	281.2	156.0	66	25	10
Sulfamethoxypyridazine	16.3	281.2	155.9	61	25	10
Sulfacetamide	9.7	215.0	156.0	61	15	10
Sulfisozole	14.8	240.0	156.0	66	21	10
Sulfathiazole	13.4	256.1	155.9	56	23	10
Sulfisoxazole	17.5	268.1	113.1	61	23	8
Suifatroxazole	17.1	268.1	108.2	76	37	6
Sulfaquinoxaline	19.7	301.2	156.0	71	25	10
Suifamerazine	14.6	265.1	155.9	66	25	10
Sulfadimidine	16.1	279.1	186.0	71	25	14
Sulfisomidine	12.2	279.1	124.0	56	31	8
Sulfapyridine	13.8	250.1	156.1	56	23	10
Suifamethoxazole	17.0	254.1	156.0	61	23	10
Sulfamethizole	15.8	271.1	156.0	51	21	10
Sulfanitran	21.3	336.2	156.1	76	19	10

*1 Retention time　*2 Declustering potential　*3 Collision Energy　*4 Collision cell exit potential

表1　対象動物用医薬品およびイオン化最適条件，続き

成　分	RT[*1] (min)	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	DP[*2] (V)	CE[*3] (V)	CXP[*4] (V)
Sulfachloropyridazine	16.9	285.1	155.9	61	23	10
Suifabromomethazine	21.4	359.0	92.1	76	49	6
Fenbendazole	24.0	300.1	268.1	81	31	18
Oxfendazole	20.6	316.1	159.0	86	47	10
Oxfendazole sulfone	20.9	332.1	300.1	91	31	20
Praziquantel	23.7	313.2	203.1	91	25	14
Morantel	15.8	221.1	123.0	66	47	8
Flubendazole	22.7	314.1	282.1	86	31	20
Oxibendazole	19.7	250.1	218.1	86	27	16
Triclabendazole	26.1	358.9	344.0	101	37	10
Triclabendazole Oxon	25.0	329.0	167.9	101	43	12
Mebendazole	22.3	296.1	264.1	81	31	18
Metronidazole	11.2	172.1	128.0	61	21	10
Dimetridazole	12.8	142.0	96.1	61	23	6
Ronidazole	11.7	201.1	140.0	51	17	10
Clopidol	14.9	192.0	101.0	86	39	6
Benzocaine	20.3	166.0	138.0	61	21	10
Azaperone	16.0	328.1	165.0	81	31	10
Brotizolam	22.9	392.9	314.0	101	33	8
Mafoprazine	17.6	402.2	193.1	86	41	14
Xylazine	15.7	221.1	90.1	66	33	6
Tolfenamic Acid	26.7	262.1	209.1	46	39	14
Meloxicam	23.7	352.0	115.0	71	27	8
Ketoprofen	23.3	255.2	209.1	76	19	14
Carprofen	24.9	274.1	228.0	61	21	16
Flunixin	25.3	297.1	264.0	86	47	18
Dexamethasone	22.7	393.2	373.2	71	13	10
Altrenogest	24.9	311.2	227.2	96	35	16
Norgestomet	24.5	373.2	313.2	86	19	8
Chlormadinone	25.1	405.2	345.1	81	19	10
Clostebol	24.8	323.2	143.0	81	35	10
Melengestrol acetate	25.3	397.2	337.3	76	21	10
Virginiamycin	22.8	526.3	337.1	101	31	10
Tiamulin Fumarate	19.8	494.4	192.1	81	29	14
Clenbuterol	15.9	277.1	203.0	61	25	14
Menbutone	23.1	259.1	159.0	51	15	10
Tripelennamine	17.1	256.2	211.2	46	21	14
Famphur	22.4	326.0	93.0	76	43	6
Prifinium	19.3	306.2	86.1	56	37	4
Ethopabate	20.8	238.1	206.0	46	17	14

*1 Retention time　*2 Declustering potential　*3 Collision Energy　*4 Collision cell exit potential

2.4　装置

高速液体クロマトグラフは Agilent Technologies 社製 Agilent1100，質量分析装置は AB Sciex 社製 API4000，遠心分離機は久保田製作所製 KUBOTA 8850 を用いた。

2.5　LC および MS 条件

分析カラムは，Atlantis T3（2.1 mm i.d × 150 mm, 粒子径 3 μm，Waters 社製）を使用した。移動相は A 液 0.05%ギ酸水溶液，B 液 0.05%ギ酸/アセトニトリルを用い，グラジエント条件を 0 min（B：5%）→2 min（B：20%）→6 min（B：20%）→22 min（B：95%）→30 min（B：95%）→30.1 min（B：5%）→40 min（B：5%）とした。カラム温度は 40℃，流速は 0.2 mL/min，注入量は 10 μL とした。

イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード（ESI Positive），分析モードは Multiple Reaction Monitoring（MRM）とした。イオンスプレー電圧は 5.5 kV，イオン源温度は 500℃とした。

MRM 条件は，50～100 ng/mL の範囲で調製した各動物用医薬品の標準溶液をシリンジポンプを用いて直接 MS/MS に注入し，自動最適化より決定した。自動最適化の結果，感度が最も良好であったイオンを選択し，定量用イオンに用いた（表 1）。

2.6　検量線の作成

検量線は，絶対検量線とし，0，0.01，0.05，0.1，1，10，20 ng/mL の濃度で作成し，全ての成分について 0.01，0.05，0.1～20 ng/mL の範囲で良好な直線性（r = 0.999 以上）が得られた。

2.7　検出限界および定量限界

検出限界及び定量限界は，標準液（0.01，0.05，0.1，0.5，1 ng/mL）を測定し，ピークの S/N 比 3 以上の濃度を検出限界，10 以上の濃度を定量限界とした。表 2 に各試験法の希釈倍率に換算した試料あたりの検出限界（ng/g），定量限界（ng/g）を示す。

2.8　試料液の調製

2.8.1 希釈法

試料2.0 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に量り採り，メタノール 18 mL を加え，30 分間振とうした。振とう後，遠心分離（3000 rpm，5min）を行い，上清を 20 mL メスフラスコに移し，水で定容した。定容した液 1.0 mL を 10 mL メスフラスコに分取し，50%メタノール溶液で定容した。これを Anotop 10 でろ過し，試験液とした。

2.8.2　固相抽出法

試料2.0 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に量り採り，水 20 mL を加えて，超音波抽出を 10 分間行った。

Oasis HLB にメタノール 5 mL，水 5 mL を順次注入しコンディショニングを行った後，先の抽出液を全量負荷し，流出液を捨てた。次に水 20 mL を注入してカラムを洗浄後，カラムを遠心分離（3000 rpm，10 min）し，水を完全に除去した。このカラムにメタノール 5 mL を注入し，溶出液をガラス試験管に採取した。次に窒素気流下でメタノールを除去し，20%メタノール溶液 2 mL を正確に加えて溶解し，これを試験液とした。

3　結果および考察

3.1　希釈法

ハチミツが LC-MS/MS 測定の妨害となる脂肪を含まず [5]，またタンパク質の含有量も少ないこと，さらに操作の簡便・迅速性を考慮し，試料をメタノールで抽出後，50%メタノール溶液で希釈した液を精密ろ過膜でろ過する方法 [6]を検討することにした。ろ過膜の目詰まりや夾雑物の影響を防ぐため，希釈倍率を 100 倍とした。

ハチミツに，試料あたり 0.02（低濃度）および 0.1（高濃度）μg/g となるように混合標準液を添加し，2.8.1 により試験液を調製し，添加回収試験を実施した。結果を表 2，3 に示す。回収率 50～120%，RSD15%以下を満たした成分が，低濃度で 53 成分，高濃度で 66 成分であり，高濃度では概ね良好な結果が得られた。低濃度では，高濃度に比べ RSD15%を超えてバラツキが大きい成分が多く，またキタサマイシン，ジョサマイシン等の検出できない成分もあった。

3.2　固相抽出法

先の精密ろ過膜を使用した方法では概ね良好な結果が得られたが，希釈倍率が高く，試料量

表2　希釈法および固相抽出法の添加回収試験結果

成　分	希釈法						固相抽出法			
	添加濃度 (μg/g) 0.02		0.1		LOD*3 (μg/g)	LOQ*4 (μg/g)	添加濃度 (μg/g) 0.001		LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)
	平均*1	RSD*2	平均	RSD			平均	RSD		
Benzylpenicillin	57.6	13.5	86.6	27.6	0.01	0.1	75.8	5.4	0.0001	0.001
Oxacillin	98.5	13.0	93.3	9.2	0.001	0.005	100.8	3.9	0.00001	0.00005
Nafcillin	95.2	5.3	96.0	4.5	0.001	0.005	99.5	2.5	0.00001	0.00005
Cloxacillin	74.2	36.9	107.2	25.2	0.001	0.005	99.1	7.7	0.00001	0.00005
Dicloxacillin	99.7	8.5	88.8	6.5	0.01	0.1	90.7	7.5	0.0001	0.001
Cephalexin	120.3	29.6	120.7	3.7	0.001	0.005	57.9	7.2	0.00001	0.00005
Ceftiofur	110.3	37.8	122.4	44.2	0.001	0.005	101.6	6.5	0.00001	0.00005
Nalidixic acid	94.5	8.3	95.5	1.8	0.01	0.1	92.8	8.3	0.0001	0.001
Piromidic acid	94.0	3.3	84.9	4.0	0.001	0.005	95.9	4.0	0.00001	0.00005
Oxolinic acid	89.0	4.5	78.7	5.0	0.01	0.1	64.6	5.9	0.0001	0.001
Flumequine	66.2	11.7	76.4	0.3	0.001	0.001	71.0	6.2	0.00001	0.00001
Sarafloxacin	119.7	6.0	91.0	16.6	0.01	0.1	99.4	11.9	0.0001	0.001
Orbifloxacin	78.2	22.3	106.0	7.5	0.005	0.01	80.4	4.6	0.00005	0.0001
Trimethoprim	140.5	9.6	136.3	6.3	0.001	0.005	101.3	2.1	0.00001	0.00005
Ormetoprim	118.7	8.2	127.7	0.9	0.001	0.001	88.2	3.9	0.00001	0.00001
Pyrimethamine	119.2	7.1	105.5	10.7	0.001	0.005	89.7	0.9	0.00001	0.00005
Kitasamycin	-*5	-	72.4	12.5	0.001	0.001	110.3	2.3	0.00001	0.00001
Oleandomycin	104.0	22.5	110.4	8.8	0.001	0.001	119.0	2.2	0.00001	0.00001
Mirosamicin	115.8	5.0	99.8	4.5	0.001	0.005	118.7	3.4	0.00001	0.00005
Josamycin	-	-	130.5	35.2	0.001	0.001	100.2	7.0	0.00001	0.00001
Erythromycin	90.8	16.3	94.4	4.5	0.001	0.001	57.4	3.7	0.00001	0.00001
Sulfadoxine	94.7	3.1	97.5	3.3	0.001	0.001	86.2	3.5	0.00001	0.00001
Sulfadimethoxine	97.7	10.9	100.4	3.7	0.001	0.001	94.6	4.0	0.00001	0.00001
Sulfabenzamide	107.3	6.9	105.6	5.9	0.001	0.001	74.4	5.4	0.00001	0.00001
Sulfadiazine	109.2	4.4	98.4	1.9	0.001	0.005	83.4	2.7	0.00001	0.00005
Sulfamonomethoxine	95.2	6.8	92.9	5.0	0.001	0.001	88.1	4.3	0.00001	0.00001
Sulfamethoxypyridazi	114.8	8.2	98.0	3.3	0.001	0.001	87.9	4.0	0.00001	0.00001
Sulfacetamide	103.0	15.3	102.4	15.6	0.001	0.005	68.1	2.2	0.00001	0.00005
Sulfisozole	81.8	34.6	96.1	5.5	0.005	0.01	67.4	5.4	0.00005	0.0001
Sulfathiazole	88.8	20.4	104.4	7.7	0.005	0.01	76.8	1.5	0.00005	0.0001
Sulfisoxazole	111.0	21.7	100.2	3.5	0.001	0.005	87.0	5.9	0.00001	0.00005
Suifatroxazole	102.0	2.1	100.4	2.3	0.001	0.005	88.7	1.8	0.00001	0.00005
Sulfaquinoxaline	127.3	8.7	100.2	15.3	0.001	0.001	87.0	3.3	0.00001	0.00001
Suifamerazine	97.7	9.8	91.5	4.2	0.001	0.001	86.6	3.2	0.00001	0.00001
Sulfadimidine	105.7	7.2	81.0	3.1	0.001	0.005	94.6	4.3	0.00001	0.00005
Sulfisomidine	108.0	11.6	104.1	7.2	0.001	0.001	80.9	3.4	0.00001	0.00001
Sulfapyridine	76.3	26.2	101.1	13.8	0.001	0.001	80.4	0.3	0.00001	0.00001
Suifamethoxazole	100.2	4.2	104.2	5.6	0.001	0.005	91.3	3.8	0.00001	0.00005
Sulfamethizole	84.0	14.3	82.1	4.5	0.001	0.001	87.9	0.4	0.00001	0.00001
Sulfanitran	145.0	8.8	109.7	14.5	0.001	0.005	35.6	7.5	0.00001	0.00005

*1 n=3の平均値 (%) *2 Relative standard deviation (%) ：相対標準偏差 (%) *3 Limit ofDetection (S/N≧3)：検出限界（各法の希釈倍率に換算した値を掲載） *4 Limit ofquantification (S/N≧10) ：定量限界（各法の希釈倍率に換算した値を掲載） *5 －：不検出

表2　希釈法および固相抽出法の添加回収試験結果，続き

成　分	希釈法						固相抽出法			
	添加濃度 (μg/g)				LOD[*3] (μg/g)	LOQ[*4] (μg/g)	添加濃度 (μg/g)		LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)
	0.02		0.1				0.001			
	平均[*1]	RSD[*2]	平均	RSD			平均	RSD		
Sulfachloropyridazine	96.0	9.4	101.6	5.7	0.001	0.005	83.3	2.6	0.00001	0.00005
Suifabromomethazine	93.0	16.0	92.5	10.6	0.001	0.005	97.0	2.3	0.00001	0.00005
Fenbendazole	99.8	8.0	104.7	1.1	0.005	0.01	84.6	2.9	0.00005	0.0001
Oxfendazole	100.5	14.3	89.2	11.7	0.001	0.001	106.0	1.6	0.00001	0.00001
Oxfendazole sulfone	108.5	2.9	96.1	0.5	0.001	0.005	96.6	0.6	0.00001	0.00005
Praziquantel	103.2	7.6	101.8	5.3	0.001	0.005	106.3	1.1	0.00001	0.00005
Morantel	115.7	3.9	130.0	6.0	0.01	0.1	124.3	1.9	0.0001	0.001
Flubendazole	86.5	2.5	92.6	6.8	0.001	0.005	102.0	1.7	0.00001	0.00005
Oxibendazole	98.3	15.0	109.7	3.2	0.005	0.01	91.7	1.9	0.00005	0.0001
Triclabendazole	78.7	16.5	88.5	4.4	0.001	0.005	27.9	8.5	0.00001	0.00005
Triclabendazole Oxon	87.3	8.7	103.3	7.4	0.001	0.005	65.0	5.1	0.00001	0.00005
Mebendazole	102.8	6.6	95.2	5.4	0.005	0.01	101.3	2.3	0.00005	0.0001
Metronidazole	104.3	15.6	116.0	7.4	0.005	0.01	86.6	1.3	0.00005	0.0001
Dimetridazole	98.5	1.8	100.9	11.0	0.01	0.05	79.6	5.1	0.0001	0.0005
Ronidazole	109.0	14.8	103.3	3.0	0.001	0.001	83.2	4.2	0.00001	0.00001
Clopidol	43.3	40.4	95.7	9.5	0.005	0.01	74.1	4.1	0.00005	0.0001
Benzocaine	87.0	1.1	95.4	3.9	0.005	0.01	85.0	3.4	0.00005	0.0001
Azaperone	104.0	8.8	105.5	8.3	0.001	0.005	96.8	8.5	0.00001	0.00005
Brotizolam	96.8	10.1	92.2	2.5	0.001	0.001	111.3	6.4	0.00001	0.00001
Mafoprazine	121.8	6.2	126.7	4.6	0.001	0.001	90.6	2.0	0.00001	0.00001
Xylazine	112.8	10.7	116.0	6.0	0.001	0.005	133.0	3.4	0.00001	0.00005
Tolfenamic Acid	78.3	15.8	106.3	10.6	0.001	0.005	43.9	12.4	0.00001	0.00005
Meloxicam	102.8	3.6	92.9	1.8	0.001	0.001	100.4	3.5	0.00001	0.00001
Ketoprofen	68.2	23.2	96.0	3.6	0.001	0.005	102.3	2.5	0.00001	0.00005
Carprofen	-[*5]	-	64.4	28.4	0.01	0.05	72.2	4.6	0.0001	0.0005
Flunixin	93.7	6.1	92.9	4.6	0.001	0.005	103.4	4.4	0.00001	0.00005
Dexamethasone	93.8	10.8	98.1	6.3	0.001	0.005	102.0	3.6	0.00001	0.00005
Altrenogest	75.8	17.6	59.6	8.8	0.01	0.05	46.8	15.0	0.0001	0.0005
Norgestomet	95.8	9.8	93.5	21.0	0.001	0.005	92.8	1.4	0.00001	0.00005
Chlormadinone	104.3	14.0	105.0	3.8	0.005	0.01	89.6	4.2	0.00005	0.0001
Clostebol	91.8	12.5	89.1	5.5	0.005	0.01	90.8	4.2	0.00005	0.0001
Melengestrol acetate	87.8	17.2	87.6	4.1	0.005	0.01	91.4	6.2	0.00005	0.0001
Virginiamycin	173.8	22.6	105.3	7.2	0.005	0.01	114.0	3.8	0.00005	0.0001
Tiamulin Fumarate	107.5	7.9	117.3	3.2	0.001	0.001	139.7	1.1	0.00001	0.00001
Clenbuterol	101.8	6.3	117.0	7.5	0.001	0.005	109.0	1.8	0.00001	0.00005
Menbutone	90.8	16.1	92.4	8.4	0.001	0.005	91.8	5.1	0.00001	0.00005
Tripelennamine	124.0	7.3	138.3	7.2	0.001	0.005	84.1	7.6	0.00001	0.00005
Famphur	78.0	11.3	97.2	6.2	0.001	0.005	97.3	4.2	0.00001	0.00005
Prifinium	102.8	1.4	112.0	5.4	0.001	0.001	111.3	2.7	0.00001	0.00001
Ethopabate	95.3	7.9	96.4	1.9	0.001	0.005	90.7	0.8	0.00001	0.00005

*1 n=3の平均値 (%) *2 Relative standard deviation (%) ：相対標準偏差 (%) *3 Limit of Detection (S/N≧3) ：検出限界（各法の希釈倍率に換算した値を掲載） *4 Limit of quantification (S/N≧10) ：定量限界（各法の希釈倍率に換算した値を掲載） *5 － ：不検出

表3　希釈法および固相抽出法の回収率評価結果

評価条件 回収率(%)	希釈法		固相抽出法
	添加濃度(μg/g)		
	0.02	0.1	0.001
No data	3	0	0
＜50	1	0	4
50 - 120 (RSD ＜15%)	53	66	73
50 - 120 (RSD ≧15%)	16	6	0
120 ＜	7	8	3

表4　一律基準以下の成分とその基準値

成　分	基準値 (μg/g)	LOQ*1 (μg/g) (固相抽出法)
Benzylpenicillin	0.004	0.001
Nafcillin	0.005	0.00005
Brotizolam	0.001	0.00001
Altrenogest	0.003	0.0005
Norgestomet	0.0001	0.00005
Chlormadinone	0.002	0.0001
Clostebol	0.0005	0.0001

*1 表2の固相抽出法のLOQを再掲

表5　不検出基準の成分と通知法の検出限界(LOD)

成　分	LOD(μg/g)	
	通知法*1	固相抽出法*2
Dimetridazole	0.0002	0.0001
Ronidazole	0.0002	0.00001
Dexamethasone	0.00005	0.00005
Clenbuterol	0.00005	0.00005

*1 厚生労働省通知，食安発第1129001号，別添3より
*2 表2の固相抽出法のLODを再掲

に換算した場合，低濃度レベルのピークの確認が困難な場合があるため，他の方法も検討した。ハチミツを対象とした分析法はこれまでに数多く報告されており[2,3,7-9]，その中からハチミツを水で希釈後，ポリマー系カラムOasis HLBで精製する方法を採用し，一斉分析に適用できるか試みた。

ハチミツに，試料あたり0.001 μg/gとなるように混合標準液を添加し，2.8.2より試験液を調製し，添加回収試験を行った。結果を表2，3に示す。測定成分の9割以上の73成分において回収率50～120%，RSD15%以下を満たした。

測定した80成分のうち，一律基準以下が7成分（表4）あるが，添加回収試験結果や定量限界値を総合すると，本法は十分な定量精度を満たすと考えられる。不検出基準についても4成分（表5）あるが，本法の検出限界は通知法の検出限界[10]を下回り，定性には支障ない感度が得られた。また不含有基準の成分においても，適用可能な感度を有していると考えられる。

まとめ

ハチミツの一斉分析法として，希釈法と固相抽出法の2法について比較検討した。希釈法では高濃度（0.1 μg/g）の添加濃度において，回収率50～120%，RSD15%以下を満たした成分が66成分であり，概ね良好な結果が得られた。

固相抽出法では，添加濃度が0.001 μg/gの低濃度であっても，9割以上の成分において回収率50～120%，RSD15%以下を満たし，一律基準および不検出レベルに耐えうる十分な感度と精度が得られた。

参考文献

1) 厚生労働省ﾎｰﾑﾍﾟｰｼﾞ http://www.mhlw.go.jp, ホーム＞政策について＞分野別の政策一覧＞健康・医療＞食品＞輸入食品監視業務＞違反事例
2) 石井里枝他：LC-MS/MSによるハチミツおよびローヤルゼリー中のクロラムフェニコールの分析，食品衛生学雑誌，**47**，2，2006，58-65.
3) 石井里枝他：LC-MS/MSによるハチミツおよびローヤルゼリー中のテトラサイクリン系抗生物質の分析，食品衛生学雑誌，**47**，6，2006，277-283.
4) 井之上浩一他：LC/ESI-MS/MSによる畜水産物中の大環状ラクトン寄生虫駆除剤の一斉分析法，食品衛生学雑誌，**51**，1，2010，1-9.
5) 五訂増補日本食品標準成分表
6) 梶田弘子他：LC-MS/MSによる畜水産食品中の動物用医薬品一斉分析，食品衛生学雑誌，**49**，6，2008，381-389.
7) 西村修一他：LC-MS/MSによるハチミツ中の残留動物用医薬品等の一斉分析，鹿児島県環境保健センター所報，8，2007，125-130.
8) 野口昭一郎他：LC-MS/MSを用いた畜水産物中の残留動物用医薬品の一斉分析法，食品

衛生学雑誌，**49**，3，2008，177-188.
9)　遠藤美砂子他：畜水産物中の残留動物用医薬品の一斉分析，宮城県保健環境センター年報，**26**，2008.
10)　厚生労働省通知，食安発第1129001号，平成17年11月29日：食品衛生法等の一部を改正する法律による改正後の食品衛生法第11条第3項の施行に伴う関係法令の整備について，別添3，改正後の一般規則5，6及び7に規定する各試験法の検出限界.

福島第一原子力発電所事故に伴う秋田県における放射能調査

菅原　剛　　珍田尚俊*　　高橋知子　　高嶋　司　　松田恵理子

平成23年3月11日に発生した福島第一原子力発電所事故の県内への影響を迅速に把握するため，当センターでは空間放射線量率の監視体制を強化し，雨やちりなどの降下物，水道水，及び県内の食品や環境中などに含まれる放射性物質を測定した。調査の結果，事故前後で空間放射線量率に変化は見られず，センター内で採取した定時降下物及び水道水からは，事故直後に一時的に人工放射性物質が検出されたもののいずれも微量であり，問題の無いレベルであった。県内に流通している食品及び環境試料に含まれる人工放射性物質はほとんど検出されず，検出されても国が定めた基準等と比較して十分小さな値であった。

1. はじめに

平成23年3月11日に発生した東北地方太平洋沖地震とそれに伴う巨大津波により，福島第一原子力発電所で深刻な事故が発生し，大量の人工放射性物質が環境中に放出された。当センターでは昭和30年代から定期的に環境放射能調査を行ってきており，今回の事故による県内への影響を把握するため，放射能に係るモニタリング体制を強化した。空間放射線量率の監視を強化したほか，当センターで採取した定時降下物及び水道水の人工放射性物質を毎日測定するとともに，県民の安全・安心を確保するため，県内産の牛肉や玄米をはじめとした食品試料及び牧草や土壌等の環境試料について調査を実施した。ここでは，平成24年3月までの調査結果について報告する。

2. 方法

2.1 空間放射線量率

当センター屋上（秋田市，地上高23 m）における空間放射線量率を24時間連続測定し，また，平成23年6月からはセンター敷地内における地上高1m，50cm，1cmの空間放射線量率を毎日午前10時に測定した。空間放射線量率の連続測定にはモニタリングポスト（アロカ社製MAR-22）を，地上高1 m，50 cm，1 cmの測定にはNaIシンチレーションサーベイメータ（アロカ社製TCS-171）を使用した。

2.2 放射性物質の測定

センター内で採取した定時降下物及び水道水，県内の食品試料及び環境試料について放射性物質を測定した。表1に事故発生後に測定した試料の種類及びその検体数を示す。

表1　事故発生後に調査を行った試料

（平成23年3月～平成24年3月）

検体名	検体数	検体名	検体数
定時降下物	271	スイカ	1
水道水	271	枝豆	1
食品試料		キュウリ	1
牛肉	146	ほうれん草	1
熊肉	4	アスパラガス	1
淡水魚(アユ)	3	トマト	1
キノコ	10	秋冬ねぎ	1
海水魚	3	キャベツ	1
海藻（ワカメ）	1	**環境試料**	
比内地鶏	1	稲わら	3
玄米	72	牧草	10
米粉用米	1	水浴場水	8
麦	1	プール水	8
大豆	3	土壌（校庭）	8
牛乳	14	落葉	9
リンゴ	1	木質ペレット類	19
モモ	1		

前処理操作は「緊急時におけるガンマ線スペクトロメトリーのための試料前処理法（文部科学省測定シリーズ No.24）」及び「緊急時における食品の放射能測定マニュアル（厚生労働省）」に準じて行った。測定操作は「ゲルマニウム半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリー（文部科学省測定シリーズNo.7）」に基づき行った。測定にはゲルマニウム半導体核種分析装置（セイコーEG&G社製 MCA-7700）を使用した。表2に使用した測定容器及び測定時間を示す。

*仙北地域振興局福祉環境部

表 2　測定容器及び測定時間

	検体名	測定容器	測定時間(秒)
常時監視試料	定時降下物	U-8容器	21600
	水道水	2Lマリネリ容器	21600
食品試料	牛肉	2Lマリネリ容器	2000
	玄米		600
	その他		2000
環境試料	牧草、稲わら 落葉、木質ペレット	2Lマリネリ容器	2000
	水浴場水 プール水		7200
	土壌	U-8容器	3600
	焼却灰		2000

3. 結果

3.1 空間放射線量率

大気中の放射線量の変化を把握するため，当センター屋上に設置しているモニタリングポストにより空間放射線量率を24時間連続で測定した。図1にモニタリングポストによる空間放射線量率の経時変化を示す。事故後の空間放射線量率は事故以前の平常値（0.022～0.086 μSv/h）[1]の範囲内にあり，事故発生の前後で比較しても変化は見られなかった。

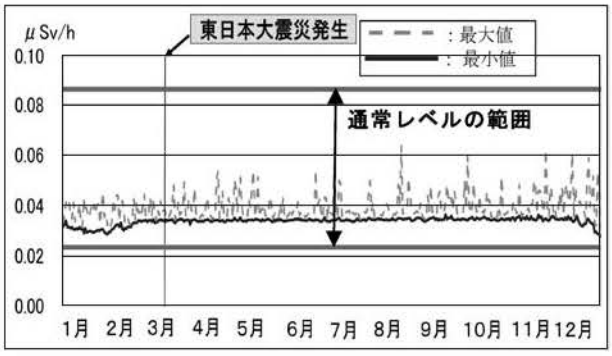


図1 モニタリングポストによる事故前後の空間放射線量率の経時変化

また，地表付近の放射線量を調査するため，平成23年6月から毎日午前10時にNaIシンチレーションサーベイメータを使用して，センター敷地内の地上高1 m，50 cm，1 cmの空間放射線量率を測定した。表3に地表付近の空間放射線量率を示す。事故由来と考えられる異常値は測定されず，モニタリングポストの測定値と地表付近の測定値とを比較しても違いはほとんど見られなかった。

表3 NaIシンチレーションサーベイメータによる地表付近の空間放射線量率

測定場所（センター内）	空間放射線量率
敷地内・地上1m	0.04～0.08 μSv/h
敷地内・地上50cm	0.05～0.09 μSv/h
敷地内・地上1cm	0.05～0.10 μSv/h

3.2 定時降下物

事故の影響により降下した放射性物質の状況を調査するため，降下物採取装置を用いて1日分（前日9時から当日9時まで）の雨やちりを平成23年3月19日から12月28日まで毎日採取し，降下物に含まれる放射性物質を測定した。図2に秋田市における定時降下物の人工放射性物質濃度の推移を示す。3月21日から4月28日までの期間に一時的に事故由来のI-131，放射性セシウム（Cs-134及びCs-137）が検出された。検出された日は雨天時に集中しているため，上空及び大気中に浮遊していた放射性物質が雨と一緒に降下したものと考えられる。最大値はI-131が89 Bq/m^2，放射性セシウムが合計170 Bq/m^{2}であった。この値を空間放射線量（Sv）に換算すると平常時の1/100程度であるため，問題の無いレベルと考えられる。5月以降は，I-131及び放射性セシウムは検出されなかった。

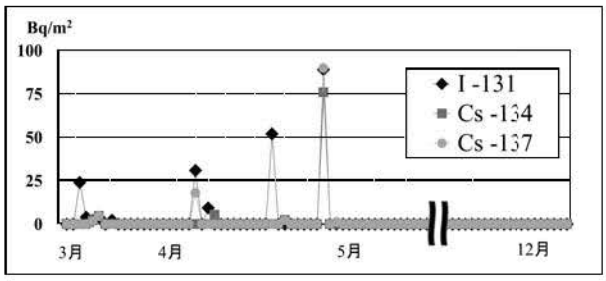


図2 秋田市における定時降下物の人工放射性物質濃度の推移（H23.3.18以降）

3.3 水道水

事故による飲料水への影響の有無を調査するため，当センターの水道水を平成23年3月18日から12月27日まで毎日採取し，放射性物質を測定した。図3に秋田市における水道水中の人工放射性物質濃度の推移を示す。放射性セシウムは調査開始から1度も検出さ

れなかった。一方，I-131 は 3 月 22 日から 4 月 1 日までの間で連続して検出されたが，I-131 の半減期は約 8 日と短いこともあり 3 月 23 日の 2.0 Bq/kg をピークに減少していき，4 月 2 日以降は検出されなかった。この I-131 の最大値 2.0 Bq/kg は，飲料水中の I-131 の暫定規制値であった 300 Bq/kg [2]を大きく下回っている。

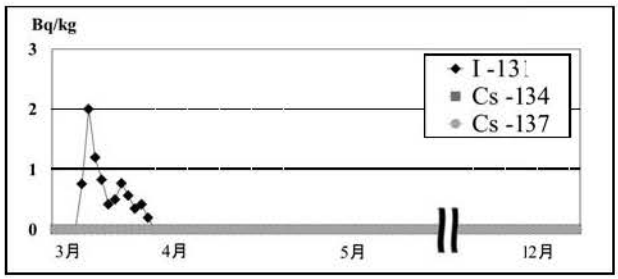


図 3 秋田市における水道水中の人工放射性物質濃度の推移（H23. 3. 18 以降）

3.4 食品試料

3.4.1 牛肉

県産牛肉の安全性を確認するため，当センターでは県外産の放射性物質に汚染された稲わら等を給餌された牛の肉について，平成 23 年 7 月から平成 24 年 3 月までに 146 検体を測定した。調査の結果，I-131 は全ての検体から検出されなかった。一方放射性セシウムは、検査開始当初に食品衛生法上の暫定規制値以上で検出されたものが 1 検体あったが，その後は暫定規制値を超えた検体はなく，その濃度は時間経過と共に低下し，平成 24 年 3 月末には不検出か検出されても 5Bq/kg 以下となった。なお，それ以外の県産牛については、全頭検査として、平成 23 年 8 月から民間委託によるスクリーニング検査を実施しているが，現在まで人工放射性物質は検出されていない。

3.4.2 その他食品試料

平成 23 年 7 月 26 日から県産農産物等を対象とした食品試料の調査を開始した。秋田県産の玄米や果実，野菜，魚介類からは人工放射性物質は検出されなかった。一方，アユ，熊，キノコ等の山間部に生息する動植物の一部からは放射性セシウムがわずかに検出された。図 4 にアユ，熊肉，キノコの測定結果を示す。

アユについては 3 検体を測定した。2 検体から Cs-134 と Cs-137 が約 1:1 の比率で微量に検出された。福島第一原発事故直後における Cs-134 と Cs-137 の検出比率は約 1:1 であると報告されている [3]ため，事故の影響を反映しているものと考えられる。

熊肉については福島第一原発事故後に捕獲された 3 検体及び比較のために事故前の平成 22 年 8 月に捕獲された 1 検体を測定した。事故前の熊肉からは Cs-137 のみが微量に検出されたため，チェルノブイリ原発事故の痕跡と考えられた。これは，事故から 26 年経過した現在，半減期約 30 年の Cs-137 は約 1/2 に，半減期約 2 年の Cs-134 は約 1/8,000 にまで減衰し，比率として Cs-137 の存在割合が非常に大きくなるため [4]である。一方，事故後の熊肉では Cs-137 が検出比率 1:1 よりやや高く検出された。これは，チェルノブイリ原発事故の影響に加えて，福島第一原発事故の影響が反映されたため，比率に違いが生じたものと考えられる。

キノコについては 10 検体を測定した。7 検体から微量の放射性セシウムが検出された。このうち 2 検体からは半減期が短い Cs-134 が検出されたことから，福島第一原発事故の影響を反映していると考えられる。残り 5 検体からは Cs-137 のみが検出されたことから，チェルノブイリ原発事故の痕跡と考えられる。

ただし，これらの放射性セシウムの濃度はいずれも 10 Bq/kg 以下と微量であり，一般食品の基準値である 100 Bq/kg [5]を大きく下回っている。

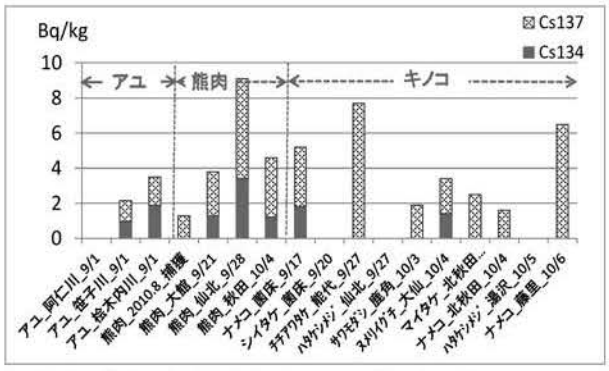


図 4 県内で採取されたアユ，熊肉，キノコの放射性セシウム濃度

3.5 環境試料

3.5.1 牧草

県内産牧草の安全性を確認するため，平成23年5月14日と6月17日に県内5カ所で採取した牧草を測定した。図5に牧草中の人工放射性物質の濃度を示す。5月の調査では，県南部の湯沢市でI-131が4.5 Bq/kg検出された。一方，放射性セシウムは全地点で微量に検出されたが，湯沢市では5月，6月共に他の地点よりもやや高かった。半減期が短いI-131が検出されたこと，及びCs-134とCs-137が約1:1の比率で検出されたことから，福島第一原発事故の影響を反映していると考えられる。ただし，これらの値は牛用飼料として使用した場合の暫定許容値である100 Bq/kg[6)]を下回っている。

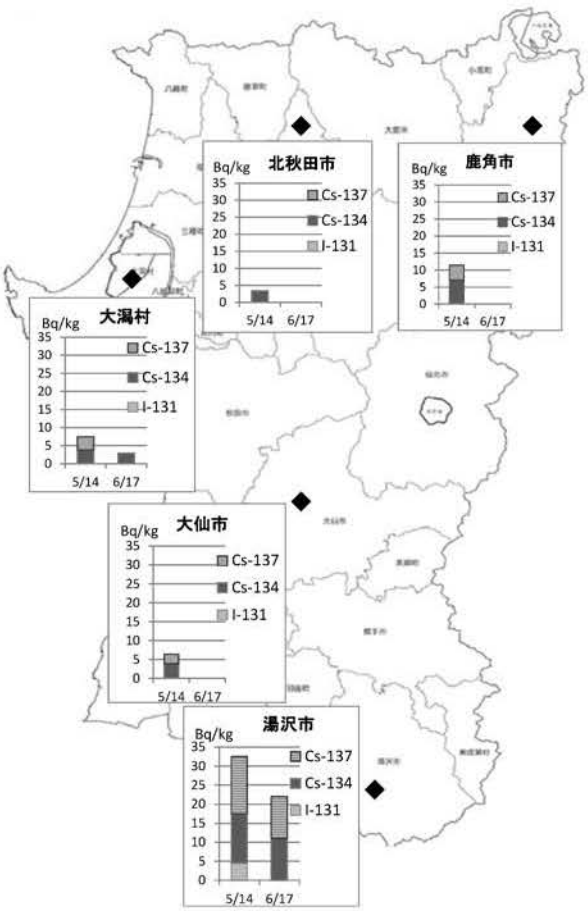


図5 県内5箇所で採取した牧草中の人工放射性物質濃度

3.5.2 落葉

山間部における放射性物質の沈着量を調査するため，平成23年11月に県内の山間部8カ所及び秋田市郊外の秋田県森林技術センターの広葉樹の落葉を採取し，放射性物質を測定した。図6に広葉樹の落葉中の放射性セシウム濃度を示す。5地点で微量の放射性セシウムが検出され，このうち県南部3地点においてやや高い傾向を示した。牧草と同様にCs-134とCs-137が約1:1の比率で検出されたことから，福島第一原発事故の影響を反映していると考えられる。また，落葉採取時にNaIシンチレーションサーベイメータにより山間部における1 m高さの空間放射線量率を測定した。その結果，全地点において測定値は0.03～0.06 μSv/hであり，県内における平常時の範囲内であった。

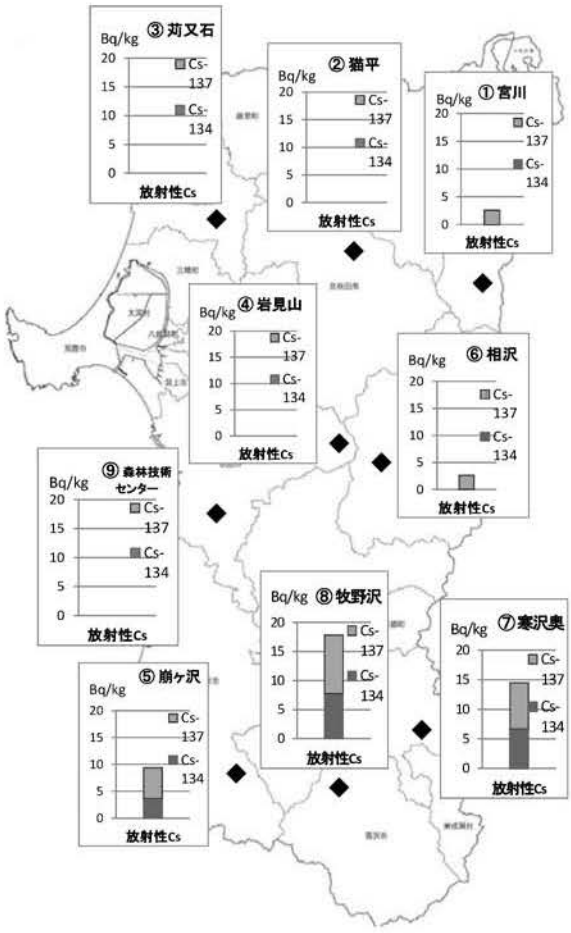


図6 県内で採取した広葉樹の落葉中の放射性セシウム濃度

3.5.3 木質ペレット

欧州産赤松を原料としたペレット製品の焼却灰からCs-137が検出されたという情報提供を受け，県内で製造された木質ペレットとその焼却灰に含まれる放射性物質を測定した。図7に木質ペレット及びその焼却灰に含まれていた放射

性セシウム濃度を示す。欧州産赤松を原料としたペレットからCs-137が10～13 Bq/kg、その焼却灰から1,500～1,600 Bq/kg検出された。これらのペレット及び焼却灰から検出された要因として，原材料の産地が欧州であること，及び半減期が短いCs-134が検出されなかったことから，チェルノブイリ原発事故の影響が大きく反映されたと考えられる。また，同様の影響により，数社の混合焼却灰である⑥において，土壌改良材として使用する場合の国の暫定許容値である400 Bq/kg[6)]をわずかに上回ったと考えられる。

県内産の木材を原料とした間伐材ペレット及び杉ホワイトペレットからは人工放射性物質は検出されなかったが，その焼却灰からは放射性セシウムが24～220 Bq/kg検出された。牧草，落葉と同様にCs-134とCs-137が約1:1の比率で検出されたことから，福島第一原発事故の影響を反映していると考えられる。これらの焼却灰の測定値は暫定許容値である400 Bq/kgを下回っている。

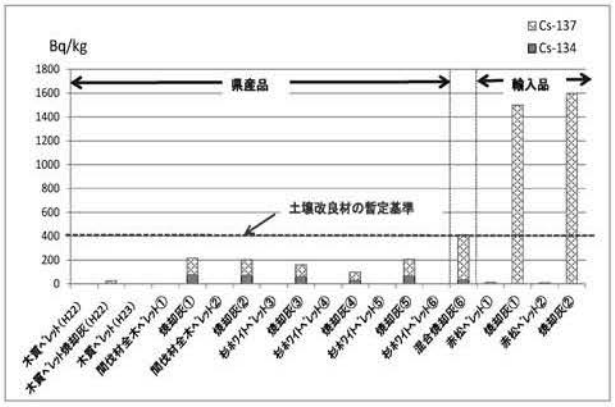


図7 木質ペレット及びその焼却灰に含まれていた放射性セシウム濃度

3.5.4 その他環境試料

県内各地の公共施設における放射性物質の状況を把握するため、県内の水浴場水4カ所，学校のプール水及びグラウンドの土壌8カ所，及び県内産稲わら3カ所について測定を行った。その結果，いずれからも人工放射性物質は検出されなかった。

4. まとめ

県内の空間放射線量率は事故前後で変化は見られなかった。定時降下物，水道水，県内産食品及び環境試料を調査した結果，複数の検体から福島第一原発事故由来と考えられる人工放射性物質が検出された。ただし，いずれもごく微量であり，ほとんどの検体から人工放射性物質は検出されていない。これらの結果から，福島第一原発事故の県内への影響は極めて小さかったものと考えられる。放射性物質の影響は長期に及ぶことから，今後も放射能に関する安全・安心を確保するため、引き続き監視を強化していくとともに，速やかに測定結果等の情報を提供していく。

参考文献

1) 珍田尚俊，柳田知子，松田恵理子: 秋田県における空間放射線量率の連続測定結果，秋田県健康環境センター年報，**5**，2009，88-92
2) 食安発0317第3号: 放射能汚染された食品の取り扱いについて，平成23年3月17日.
3) 河田燕，山田崇裕: 原子力事故により放出された放射性セシウムの $^{134}Cs/^{137}Cs$ の放射能比について，Isotope News，**5**，2012，16-20
4) 珍田尚俊，柳田知子: 秋田県における雨水の全β放射能測定結果とその特徴，秋田県健康環境センター年報，**4**，2008，91-94
5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課: 概要資料「食品中の放射性物質の新たな基準値について」平成24年
6) 農林水産省通知消安発第2444号，生産第3442号，林政産第99号，水推第418号: 放射性セシウムを含む肥料・土壌改良資材・培土及び飼料の暫定許容値の設定について，平成23年8月1日（平成24年2月3日，平成24年3月23日一部改正）.

もみ殻を原料とした選択的リン回収材の開発と利用・応用への展開

成田修司　　鈴木忠之　　石垣　修

本県から大量に排出される「もみ殻」を原料として，当センターでは初の特許となる技術を開発した。同技術は水中のリンを選択的に回収する回収材の製造及びリン回収後に肥料とする素材開発である。この素材の効果的な利活用を目的として，次の2つの取り組みを行った。一つは，湖沼水質保全特別措置法（湖沼法）に基づく指定湖沼の八郎湖において，富栄養化の一因と考えられている高濃度リン湧出水対策，もう一つは，リン吸着後のもみ殻の肥料化を目指した肥効試験である。同湧出水対策では，リン湧出水を約1.8 mg/L（PO4-P mg/L）の通常濃度から，処理後は約0.5 mg/Lへと約1/4に減少させた。また，同対策の副次効果として同湧出水のCOD（化学的酸素要求量）が，約5 mg/Lから4 mg/L程度まで減少し，約20%の削減効果も確認された。一方，ブロッコリー栽培における肥効試験では，リン吸着後のもみ殻を施肥した肥効区が化成肥料（888）の肥効区と比較して，肥料溶脱による葉の紫化が見られず，葉が著しく大きく育つなど，同もみ殻肥効区の良好な生育が認められた。

1. 緒言

本県において富栄養化が問題となっている八郎湖では，2006年度に全国ワースト3の汚れた湖としてランキングされた。2007年12月には，同湖の抱える問題を解決するため，湖沼法に基づく指定湖沼の指定を受けた。富栄養化の原因の一つと考えられているのが，八郎湖の北側に位置する堤防沿いの干拓地（以降，リン湧出地帯:図 1）から湧出しているリンを含む地下水である。その濃度は一般的な環境水より遙かに高くPO4-Pで約2 mg/Lと報告されている[1)]。また，そのリン地下水の同湖への負荷量は約30トン/年とも見積もられており，大きな負荷を与えていることが，片野らによって報告された[1)]。さらに，その地下水の特徴は，大部分が生体の利用しやすい形態であるリン酸イオンであることも報告されている[1)]。つまり，夏場に八郎湖で発生するアオコ等の栄養源の可能性が考えられる。当センターでは，同湖の富栄養化対策として，このリンを除去・回収するための技術開発を行った。そこで着目した素材は，リン地下水が湧出する秋田県大潟村で大量に発生する「もみ殻」である（図2）。使い道に困った「もみ殻」は，「もみ殻焼き」が行われ，大気汚染の原因として，「米どころ」における長年の懸案事項となっている。この「もみ殻」の焼却時に発生する物質の中に，ぜんそく等のアレルギーを引き起こす「ホルムアルデヒドや針状物質」などが含まれていることが，近年の研究で明らかとなった[1-2)]。当センターでは，これらの報告を受け，県民の健康を守ることを目的として，もみ殻を有効利用し，適正処理のための技術開発を目指した。本研究では，「もみ殻」を適正処理する

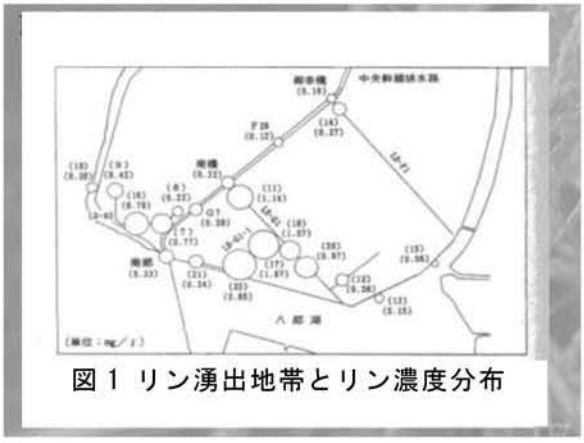


図1 リン湧出地帯とリン濃度分布

図2 未利用資源として選択したもみ殻

過程でリンを除去・回収するという付加価値をつけ，水質浄化という新たな活用法を提案し，上記リン湧出水への応用を見据えた活用について検討する。また，リンを除去・回収した後の「もみ殻」は農業への活用も視野に入れている。

本報では，湧出するリンを除去・回収する水質浄化材（以降：リン回収材）の開発を通して，地域循環型の素材がもたらす富栄養化対策や肥料としての利活用などといった体系的な技術の成果について紹介する（図 3）。また，当センターで開発したリン回収材が他県で利用される状況についても報告する。

2. 方法

2.1 もみ殻とカルシウムの複合化によるリン回収材の合成（図 4）

もみ殻にリン回収能を付与するために，本研究ではリンと親和性が高く環境中に豊富に存在しているカルシウムとの複合化を試みた。もみ殻とカルシウムを複合化させるために，以下の２つの方法を用い,検討を行った。一つめは，所定量の水酸化カルシウムをイオン交換水に分散し，得られた懸濁液にもみ殻を含浸する方法である。もみ殻と水酸化カルシウムを所定の重量比になるように計量した後，イオン交換水が数十 ml 入ったビーカーに，計量済みの水酸化カルシウムを入れ攪拌した。得られた水酸化カルシウムの懸濁液を，乳鉢中でもみ殻に乳棒で圧力をかけながら混合することによって，もみ殻内部に懸濁液を所定時間しみこませた。このとき，もみ殻を粉砕しないように注意し，所定時間含浸した。二つめは，もみ殻と水酸化カルシウムを所定の重量比になるように計量した後，計量済みの水酸化カルシウムをイオン交換水 30 ml の入ったビーカーに入れ攪拌する。この懸濁液に酸を添加し，溶液が透明になるように調整した。この時の pH は 2～4 である。この溶液に水酸化ナトリウムを添加し，pH を 6～7 に調整した。このようにして得られたカルシウム溶液を，乳鉢中でもみ殻に乳棒で圧力をかけながら混合し（もみ殻を粉砕しないように注意する），溶液をもみ殻内部に約 1 ～3 時間含浸させた。上記の 2 つの方法により得られたカルシウム含浸試料をフタ付きのるつぼに入れ，所定の温度で 60 分間加熱した後，室温まで冷却して得られた回収材を前者は，ME $Ca(OH)_2$／もみ殻の重量比［炭化温度］(表記例 ME1/10[650])，後者は MN $Ca(OH)_2$／もみ殻の重量比［炭化温度］と表記する(表記例 MN1/10[650])（図 4）。なお，比較のためにカルシウムを担持していない試料についても検討を行った。

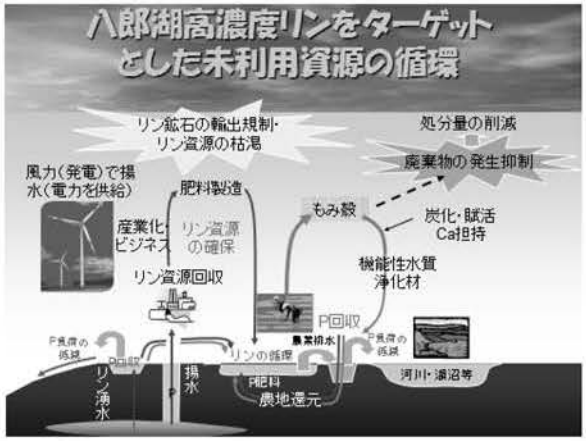


図 3 未利用資源循環モデル

図 4 リン回収材の製造方法

2.2 リン回収実験

リン回収実験は，$[PO_4^{3-}]_0$ = 50 mg/l のリン酸二水素カリウム（関東化学株式会社製，試薬特級）溶液 500 ml に合成した回収材を 0.5 g 投入し，回分式で行った。所定時間後にサンプリングをおこない，得られた試料溶液中のリン酸イオン濃度を，モリブデン青吸光光度法により，分光光度計（HITACHI U-2000）を用いて定量した。

2.3 リン酸イオンの選択的回収

塩化物イオン，硝酸イオン，硫酸イオンが共存している溶液から，合成した回収材を用いてリン酸イオンの選択的回収挙動を調べた。その

方法を以下に示す。

リン酸二水素カリウム（関東化学株式会社製，試薬特級），塩化ナトリウム（ナカライテスク株式会社製，試薬特級），硝酸カリウム（ナカライテスク株式会社製，試薬特級），硫酸ナトリウム（無水）（和光純薬工業株式会社製，試薬特級）を所定量秤量し，ミリQ水に溶解させた後，それぞれのアニオン濃度が 50 mg/l の濃度になるように調整した。この共存アニオン溶液 500 ml に，合成した回収材 0.5 g を投入し，マグネティックスターラーを用いて攪拌した。所定時間ごとに溶液を 1 ml 採取し，ミリQ水で 10 倍希釈することにより，全量を 10 ml とした。得られた分析試料をイオンクロマトグラフィー（日本ダイオネクス株式会社製，イオンクロマトグラフ DX-120）及び分光光度計を用い定量した。

2.4 リン回収後の回収材中のリン溶出実験

本研究で開発したリン回収材のリン回収後の，肥料利用可能性を調べるために，クエン酸可溶性リン酸（ク溶性リン）を定量した。

ク溶性試験を行った回収材は，300 mg/l のリン酸イオン溶液 3 L から，本研究で製造した MN1/10[650]を 3 g を投入し，70 時間リン回収試験を行ったものをろ過，風乾したものを使用した。溶出試験及び溶出したリンの定量は，第二改訂 詳解肥料分析法（越野 正義 編著，株式会社養賢堂）ク溶性リンの溶出方法に従い溶出をおこない，溶出した試料のリン酸イオン濃度を上記 2.2 のリン酸イオンの測定方法に従い，分光光度計を用いて定量した。

2.5 リン湧出水中のリン除去回収フィールド試験

試験は大潟村南部のフィールドにあるリン含有地下水が湧出している水路で実施する予定であったが，秋田県内で絶滅したと考えられていた「イトクズモ」の生息がその水路に確認されたことから，その生息環境を保護するため，図 5 に示したリン除去・回収装置を設置し，同水路の水を引き込むことにより実施した。図 5 の装置に上記のリン回収材 MN1/10[650]を 400 L（約 200 kg）充填し，同水路の水を 1～10 L/min の速度で導入し，試験を行った。

図 5 リン湧出水を導入するリン除去・回収装置

2.6 リン吸着もみ殻の肥効試験

リン吸着後のもみ殻炭を用いた，ブロッコリー栽培の肥効試験は日本植生（株）に委託し，次のように行った。

土壌は花崗岩が風化したマサ土とピートモス，バーキュライトを 8:1:1 の比で混合したものを用いた。比較に用いた化成肥料は，窒素，リン，カリが各 8%含有している 8-8-8 を使用した。栽培はワグネルポット 1/2000 (15 L) を使用し，化成肥料 8-8-8 を 7.5 g / pot 施肥した。リン吸着後のもみ殻を用いた試験条件は，次の通りである。リン吸着後のもみ殻 1 g あたり，リンが 20 mg 含まれるものを 30 g（P 施肥量 0.6 g），硫安 2.1 g（窒素 21%），塩化カリウム 1.0 g（カリウム 60%）を上記土壌に混合し，栽培開始から個々の生育状況の評価を行った。

3. 結果と考察

3.1 合成した回収材のリン回収挙動

未処理のもみ殻及び 650℃で 60 分間炭化処理を行った試料（以降 MC[650]と記載する。）を用い，リン回収試験を行った結果を図 6 に示す。リン酸イオンはどちらの試料を用いても回収することはできなかった。これらの試料の比表面積は，もみ殻では 2.3 m^2/g であったものが，炭化処理した試料 MC[650]では約 100 倍の 211 m^2/g に増加していた。しかしながら，この比表面積の増加がリン回収の能力に直接結び付くものではなかった。

ME1/10[650]と MN1/10[650]を用いた，リン回収試験結果を図 7 に示す。それぞれの回収材が時間経過に伴ってリンを回収し，回収時間 2 時

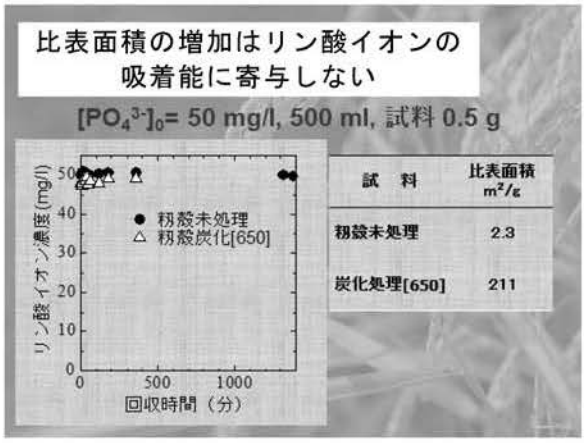


図 6 未処理及び炭化処理を施した
もみ殻のリン回収実験結果

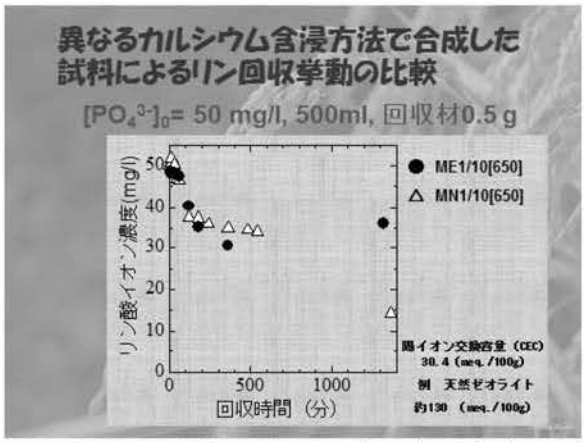


図 7 2 つの異なるカルシウム含浸方法で
合成したリン回収材のリン回収結果

間までは，ほぼ同様の回収挙動を示していた。ME1/10[650]は回収時間 3～6 時間においても，ほぼ直線的にリン酸イオン濃度が減少しているのに対し，MN1/10[650]では緩やかな減少曲線を描いていた。ME1/10[650]は 6 時間で吸着飽和に達したと考えられたが，22 時間後のリン酸イオン濃度は上昇していた。つまり，一度回収されたリンが脱着したと理解できる。一方，MN1/10[650]では，6 時間以降もリンを回収し続け，約 24 時間後には，初濃度の 70～80%回収していた。また，そのときの回収量は，ME1/10[650]と比較して約 2 倍であった。さらに，ME1/10[650]でみられたリンの脱着もMN1/10[650]の場合にはみられず，回収安定性も向上していた。

3.2 リン酸イオンの選択的回収挙動

リン酸イオン及び種々の共存アニオン（濃度: 約 50 mg/l）を含む溶液中の，MN1/10[650]を用いたリン酸イオンの選択的回収試験の結果を図 8 に示す。共存アニオンである Cl^-が約 5 mg/l 増加していたが，NO_3^-，SO_4^{2-}については，回収前後における濃度変化がほとんどなかった。一方，リン酸イオンについては，回収時間 24 時間で，初期濃度の約 85 %を回収していたことから，リン酸イオンのみを選択的に回収可能であることが理解できる。

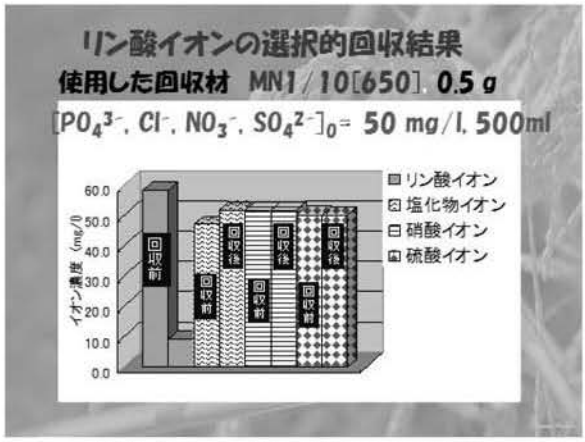


図 8 リン回収材 MN1/10[650]の
リン酸イオンの選択的回収

3.3 リン回収後の回収材中のリン溶出試験結果

MN1/10[650]を用いたリン回収試験及びリン溶出試験の結果を図 9 に示す。MN1/10[650]は回収材投入から 70 時間で，回収材 1g 当たり 75 mg のリン酸イオンを回収していた。この試料 1g をクエン酸溶液 250 ml で溶出したところ，回収したリン酸イオンを全量溶出していたことから，本研究で製造した回収材のリン回収後におけるリン酸肥料としての可能性も確認することができた。

図 9 リン回収後もみ殻炭のク溶性試験結果

3.4 リン湧出水中のリン除去・回収試験

上記リン除去・回収装置による試験結果を図10に示す。リン湧出水のリン濃度はPO4-P mg/Lで約1.8 mg/Lであるが，浄化後の濃度は約0.5 mg/Lと約1/4の濃度に減少した。また，水質汚濁の指標であるCOD（化学的酸素要求量）についても同時に調査したところ，湧出水では約5 mg/Lであったが，4 mg/L程度まで減少していたことから，20%ほどの除去が確認された。つまり，この回収装置はリンの除去・回収のみの削減を狙ったものであったが，副次的な効果としてCODも削減できることが明らかとなった。

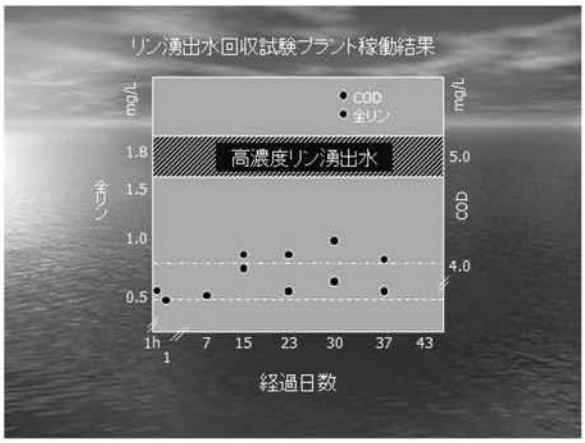


図10 フィールドにおけるリン湧出水のリン回収結果

3.5 リン吸着もみ殻の肥効試験

リン吸着後の「もみ殻炭」を用いた，上記条件での肥効試験結果を図11に示す。

図11 化成肥料とリン回収後のもみ殻炭を施肥したブロッコリーの肥効試験

この結果は栽培開始2週間後の写真である。葉の大きさに著しい違いが見られ，化成肥料と比べ，リン吸着後のもみ殻を施肥したものの生育が良いことがわかった。さらに，化成肥料を用いて栽培したものは，初期に生育した葉が紫色に変化していることが明らかとなった。これは，栄養素が溶脱によって欠乏したことによるものと考えられる。同現象は，もみ殻を用いた場合には見られなかった。

4. 当センターで開発した技術の他県における応用

上記のように，もみ殻を原料とし，リンを除去回収する素材を活用しようという試みが，長崎県で始まっている。長崎県では，2008年に「第2期諫早湾干拓調整池水辺環境の保全と創造のための行動計画」を策定し，現在，その計画に基づいて，各種施策を実施している。しかしながら，同調整池の水質は水質保全目標であるCOD:5 mg/L，T-N:1 mg/L，T-P:0.1 mg/Lを超過し，その水質動向の把握とさらなる水質保全に向けた取り組み，並びに自然干陸地等の利活用の推進が重要な課題となっている。2008年からは諫早湾干拓事業でつくられた干拓地での営農が始まり，中央干拓地（556 ha）の排水が集まる遊水池の排水が調整池へ大きな負担をかけている結果が示されている。現在，遊水池では九州農政局が使用済みの浄水発生土を用いて，リンの吸着試験を実施している。しかしながら，リン吸着後の浄水場発生土は，再利用の方法が確立されなければ，産業廃棄物として処理しなければならない。この課題に対し，当センターで開発した「もみ殻を原料としたリン回収材」に白羽の矢がたった。上述したように，当センターで開発したリン回収材はリンを除去・回収した後に農業への利用が考えられ，循環利用としての可能性を有している。図12は九州農政局及び長崎県の職員が，現在，当センターで実施しているリン除去回収装置を視察した時に秋田魁新報社から取材を受けた記事である。

現在，長崎県では実験室レベルでの試験を重ね，実際の排水に対しても有効である旨の報告を受けている。平成24年3月末には実証試験用の横向流接触及び上向流接触方式の水路2系統（図13下）が完成し，秋田県の業者が製造した「もみ殻を原料としたリン回収材」が同水路に充填され，試験が行われている。

図 12 本県で開発したリン回収技術の他県での活用：九州農政局及び長崎県職員の視察の模様

図 13 諫早湾調整池の水質改善を目的とした実証試験用水路と浄化前処理施設

参考文献

1) 片野ら，秋田県環境技術センター年報，18, 104-109, 1990.

42, 143-150, 2000.

2) Katsumi Torigoe et al. Pediatrics International,

3) Hiroyuki Kayaba et al, Tohoku J. Exp. Med., 204, 27-36, 2004.

Ⅳ　発表業績

1.　学会発表

秋田県の男性泌尿器科受診者における尿中HPV検出状況

柴田ちひろ，佐藤寛子，斎藤博之
安部真理子，千葉真知子，能登　舞[*1]
能登　彩[*2]　　能登宏光[*3]

第35回秋田県医学検査学会
2011年10月，横手市

ヒトパピローマウイルス（HPV）は子宮頸がんの原因ウイルスとして知られているが，男性の尿路・性器がんへの関与も指摘されている。しかし，男性のHPV感染状況については女性ほど研究が進んでおらず，その実態はほとんど分かっていない。そこで，秋田県内の泌尿器科受診者を対象に男性におけるHPV感染状況について調査した。

平成21年6月～平成22年5月に秋田泌尿器科クリニックを受診した尿路・性器感染症の自覚症状のある患者103名，自覚症状の無い患者13名の計120名を対象に，インフォームドコンセントを得た上で初尿検体を採取した。検査は，検体からDNAを抽出した後，内部標準物質であるβ-globinが検出された場合のみを有効検体としてnested-PCRによるHPVの検出を行った。HPV陽性検体はダイレクトシークエンスによりgenotypeを判定した。

120検体中，β-globinが検出された有効検体は98検体であった。このうちHPVは8検体から検出され（検出率8.2%），いずれも自覚症状のある患者から検出された。Genotypeはハイリスク型が6例（16型2例，18型1例，33型1例，52型1例，58型1例），中間リスク型が1例（66型），ローリスク型が1例（11型）であった。

今回，男性からもHPVが検出されたことで，今後は女性だけではなく男性も対象としたHPV感染予防の啓発が必要であると考えられた。

[*1]：秋田大学医学部付属病院，[*2]：かづの厚生病院，[*3]：秋田泌尿器科クリニック

疾病対策に活かすための保健統計-死亡統計に基づいた秋田県の疾病傾向の検討-

田中貴子

平成23年度全国保健統計協議会総会
2011年10月，秋田市

秋田県健康環境センターでは，地方衛生研究所（以下，地衛研）の機能である公衆衛生情報の収集・解析・提供業務の一環として，疾病対策や行政施策支援の一助を目的とした死亡統計に関する疾病状況を検討し関係機関へ提供してきた。今回はその解析結果の一部と業務について紹介する。1960年～2005年までの都道府県別年齢調整死亡率（人口動態統計特殊報告）を用いて全国比較，順位，年次推移（5年毎）等を把握した。また，2005年の主な死因について県・保健所別に標準化死亡比（以下，SMR）を算出し解析した。基準は全国値100である。

本県の1960年～2005年までの10大死因の年齢調整死亡率の年次推移は，特に男性の全がんは横ばいで推移している。男性の部位別がんでは胃がんは減少しているもののいまだに高く，次に気管・肺がん，大腸がんが増加傾向にある。都道府県別順位（男性）では，胃がん，食道がん，脳梗塞，自殺が1960年～2005年まで5位以内に入り高い死亡率である。次に，2005年SMRからみた県・保健所別疾病状況は，胃がん（男性）は北秋田保健所を除きSMR 114.0～176.3とほとんどの保健所で全国を上回っていた。自殺（男性）は全保健所でSMR 109.1～221.1と大幅に全国を上回っていた。

年齢調整死亡率の年次推移では，長期的にみると各疾病の死亡率は確実に低下してきていることが分かった。しかし，全国に比して高い疾病があること，SMRから各保健所の状況をみると，それぞれで高い死亡率を示す疾病があり，今回の調査でターゲットとすべき疾病や地域を明らかにすることができた。

秋田県健康環境センター（地方衛生研究所）における保健師活動について

田中貴子，栗盛寿美子

第 70 回日本公衆衛生学会総会
2011 年 10 月，秋田市

地方衛生研究所（以下，地衛研）は，保健衛生行政の推進に必要な科学的・技術的中核機関としての業務を行っている。しかし地衛研に所属する保健師は少なくその活動はあまり知られていない。そこで平成 22 年度「地域診断から始まる，見える保健活動検討会」調査を参考に，昭和 39 年～平成 22 年に至る保健師業務を当センターの年報から抽出し検討した。

秋田県の成人病予防に寄与する目的で昭和 39 年に当センター内に成人病科が誕生し，保健師は昭和 50 年以降 1 名配置された。これまでの調査研究では，昭和期には成人病予防や循環器検診，老人保健事業等の研究を行ってきた。平成以降は若い世代の健康調査や個別健康教育手法の検討，近年はがん予防を中心としたテーマに取り組む等，行政ニーズを踏まえ市町村，保健所，課との連携により調査研究を進めている。公衆衛生情報の収集・解析・提供では厚生労働省の結核登録者情報調査等を実施し，結核月報・年報管理を行い，その集計解析結果を担当者会議，研修会，議会資料として提供し，保健所や県担当課と連携し感染拡大防止の監視を行っている。更にホームページへの掲載，出前講座等により一般への普及啓発を図っている。その他公衆衛生情報として，死亡統計を用いた地域診断を行い報告書を作成・配布し，その有用性を評価された。様々な職種で構成されている地衛研にあっても，保健師の課題発掘の視点，企画立案，連携調整，実行力は業務推進の大きな力であり，保健師は主体的にそしてチームの一員としてその力を十分に発揮できる可能性があると思われる。

中学生における食事バランスと肥満状況との関連について

村井幸子*[1]，髙桑克子*[2]，古井美和子*[3]，
田中貴子

第 70 回日本公衆衛生学会総会
2011 年 10 月，秋田市

本研究では中学生の食事バランスと肥満状況との関連，肥満予防の観点から朝食の摂り方及び運動量（部活）との関連について検討した。平成 13～17 年の井川中学生の栄養調査結果を用い、親（主に母親）の食事は献立調査，生徒の栄養調査は朝昼夜別に分析した。また，生徒の食事バランス（食事構成）は三菜(主食，主菜，副菜)が揃っているか否かを調査日毎に判別した。同時に実施した健康調査結果から，肥満度を BMI の推計基準値を用いて算出した。体格状況はやせ，普通，肥満（軽度・中程度・高度肥満）に区分した。

親の食事バランスがとれている生徒（G 群）と，とれていない生徒（N 群）とで体格状況をみるとＮ群でＧ群より，男子でやせが，女子で肥満者の割合が高かった。朝食の食事構成をみると，男女とも三菜が 2 日間とも揃っていない生徒の割合がＮ群でほぼ 80％と高かった。次いで，体格状況をみると，2 日間とも三菜が揃っている生徒でやせが少なく，女子では肥満者も少なくなっていた。しかし男子では肥満者が多かったが，そのうちの 6 割が特定の部活の生徒だった。　次に，親・子ともにバランスの悪い群で，朝食で顕著な野菜不足と過剰な菓子パンの摂取がみられた。今回の結果から，子どもの体格は，子どもの食事と運動量のバランスが関与していること，さらに親の食事が乱れた場合，子どもは特に朝食で手軽な菓子類を食べてカロリーを補っていることがわかった。親が自ら食事バランスを整えていくことが，子どもの正しい食生活につながると考えられた。

[1]：井川町，*[2]：元秋田県衛生科学研究所，
*[3]：山本地域振興局福祉環境部

秋田県における三大生活習慣病の死亡動向に対する年齢・時代・世代要因の影響

三輪のり子*[1]，田中貴子，中村隆*[2]

第 70 回日本公衆衛生学会総会
2011 年 10 月，秋田市

本研究では，経年推移だけではとらえ難い死

亡動向に対する年齢・時代・世代要因の影響を明らかにし，秋田県の三大生活習慣病に対するアプローチの方向性を得ることを目的とする。秋田県の1960～2005年（5年毎）における全がん・心疾患・脳血管疾患の各死亡数と人口（20～95歳）を，中村のベイズ型Age-Period-Cohortモデル（交互作用効果モデルを含む）により分析し，死亡率に対する年齢・時代・世代効果を男女別に算出した。

年齢効果は，三疾病とも加齢と共に上昇しており，その傾向は心疾患で顕著であった。時代効果は，全がん・心疾患（女）では2000年から上昇傾向にあった。脳血管疾患では，1990年代まで下降が続いていたが，近年は上昇傾向に転じていた。世代効果は，全がんでは1890～1920年代生まれ，心疾患･脳血管疾患では1870～1910年代生まれの明治・大正世代で高く，三疾病のいずれもそれ以降の昭和世代は低くなっていた。三疾病の中で心疾患は特に変化幅が大きく生活習慣の積み重ねによる生体の変化が大きいことが示唆された。全がん・心疾患（女）及び脳血管疾患は，時代要因により死亡が増加する方向にあるため，その背景を社会環境から探り，県民全体に向けたアプローチを検討する必要がある。また，全がんと心疾患（女）は，1970年代生まれ世代から改善がみられなくなった背景をリスク因子の保有状況から探り，これら世代が受け入れやすい手段でアプローチすることが望ましいと考えられた。

*1：千里金蘭大学 看護学部，*2：情報・システム研究機構 統計数理研究所

結核対策における地方感染症情報センターの役割－秋田県健康環境センターの実施状況

田中貴子

地方衛生研究所全国協議会
関東甲信静支部公衆衛生情報研究部会

2011年11月，東京都

秋田県健康環境センターでは，昭和56年から結核サーベイランス業務を行っている。厚生労働省の結核登録者情報調査を中心に，具体的には結核月報・年報管理を行い，その集計・解析結果を担当者会議，研修会，議会資料として提供し，さらにホームページへの掲載，出前講座等により一般への普及啓発を図っている。また保健所及び県担当課と連携し，感染拡大防止の監視を行っている。このように現在実施している結核情報業務は，実に多岐に渡っておりその中でも「集計・解析」「情報の還元・公表」「結核対策への反映」が特に重要な業務として考えられる。

結核情報の意義および健康環境センターの役割についてまとめると，1）結核情報は秋田県の結核対策を推進するための根拠となる基礎的，科学的かつ重要な情報である。2）秋田県の結核の低まん延化を目指し，結核対策に反映できるより有益で精度の高い結核情報を提供することが大切である。3）健康環境センターは結核登録者情報調査から得られた情報を的確に集計・解析し，行政機関や一般住民等に目的に応じて迅速かつタイムリーに提供していくことが重要である。4）健康環境センターは引き続き保健所，関係機関等と連携を取りながら，結核情報に係わる業務の中核的役割を担っていくことが必要である。最後に，担当者は情報を的確に解析する能力を高め，結核情報の集約・発信の中心的役割を担うことを認識し今後も業務に取り組むことが必要である。

Characterization of *Kluyvera cryocrescens* strains harboring a novel variant of bla_{CTX-M} gene isolated from retail poultry in AKITA, Japan.

Jun Yatsuyanagi, Sioko Saito, Masanori Watahiki*1, Yutaka Shiraki*2, Masahiro Suzuki*3, Fubito Ishiguro*4, Nami Kanno*5, Katsuhiko Sunaoshi*6, Koichi Murakami*7, Kikuyo Ogata*8, and Yoshichika Arakawa*9

IUMS
October 2011, Sapporo

CTX-M ESBL-producing strains have increasingly been of clinical concern worldwide. Origin of the bla_{CTX-M} genes has been attributed to natural chromosomal CTX-M-like genes of Kluyvera strains. However, little is known about reservoir of *Kluyvera* strains in Japan. The aim of this study was to isolate and characterize *Kluyvera* strains harboring the bla_{CTX-M} gene from retail poultry in AKITA, Japan.

Sixteen retail poultry were employed. Broth cultures of the poultry were inoculated onto MacKonkey plates containing 1% cellobiose and 2 micro g/ml Cephalothin. The bla_{CTX-M} gene-harboring strains were isolated by using PCR. *BamHI* restriction fragment of chromosomal DNA from the Kluyvera isolates were cloned into pBCKS vector, and *E. coli* JM109 trasformants expressing Cephalotin-resistant phenotype were obtained. DNA sequence of the inserts and resistance phonotype of the transformants were determined. Two *Kluyvera cryocrescens* strains, #4-5 and #8-5, were isolated from the poultry, and two JM109 transformants, JM109-4 and JM109-8, containing the bla_{CTX-M} gene from strain #4-5 and #8-5, respectively, were obtained. The *K. cryocrescens* strain #4-5 and #8-5 harbored a novel bla_{CTX-M3} variant and $bla_{CTX-M10}$ variant gene, respectively. Both of the JM109-4 and JM109-8 showed 4 micro g/ml and <1 micro g/ml MIC of CTX and CAZ, respectively. Both of the JM109-4 and the JM109-8 contained a putative asparatate amino transferase gene, the novel bla_{CTX-M} gene, and the orf477-like gene, which is identical configuration to that previously reported about *K. ascorbata* bla_{CTX-M3} gene. Both of the fragments, however, didn't contain ISEcp1 associated with plasmid-mediated bla_{CTX-M} genes. These results support the hypothesis that *Kluyvera* strains serve as a gene pool of the bla_{CTX-M} genes. Our results also suggested a role of poultry as a reservoir of the *Kluyvera* strains in Japan. Further studies should be conducted to characterize bla_{CTX-M} gene possessing strains in poultry produced in Japan.

[*1]:Department of Bacteriology, Toyama Institute of Health
[*2]:GIFU Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences
[*3]:Laboratory of Bacteriology, Aichi Prefectural Institute of Public Health
[*4]:Fukui Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science
[*5]:Bacteriology, FUKUSHIMA Prefectural Institute of Public Health
[*6]:Clinical Microbiology, Saitama Institute of Public Health
[*7]:Department of Health Sciences, Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences
[*8]:Bacteriology, OITA Prefectural Institute of Public Health
[*9]:0Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases

KPC-産生肺炎桿菌

八柳 潤

衛生微生物技術協議会第 32 回研究会
2011 年 6 月，東京都

KPC（*Klebsiella pneumoniae carbapenemases*）を産生する肺炎桿菌が世界中で分離されてきている。カルバペネムは多剤耐性グラム陰性菌感染症に対する「最後の砦」であるため，KPC 産生菌の侵淫は問題視されている。本発表では，「新たな多剤耐性菌」である KPC 産生菌の概要について述べる。

1．KPC の分類と特徴

β-ラクタマーゼは，Ambler の分類によりクラス A から D に分類されている。KPC は活性中心にセリンを持つクラス A に属し，カルバペネマーゼ活性を有する。クラス A に属するカルバペネマーゼとしては，他に Sme, Imi, GES, NMC-A が知られている。KPC には KPC-2 から KPC-11 のバリアントがあり，いずれも伝達性プラスミド（60 Kb，75 Kb など）上にコードされている。KPC 産生菌の殆どは *K. pneumoniae* であるが，*K. oxytoca*，*E. cloacae*，*E. aerogenes*，*E. coli*，*C.*

freundii, *Salmonella*, *P. aeruginosa* にもKPC産生菌が報告されている。カルバペネム系抗生物質は強力で緑膿菌，アシネトバクター属を含む多剤耐性菌に有効であることから，「多剤耐性菌感染症治療の最後の砦」とされている。KPCは，このカルバペネム系抗生物質を加水分解することから問題視されている。

2．KPCの疫学

KPC産生株は1996年にノースカロライナで発見されて以来，2004年には中国，スコットランド，2005年にフランス，コロンビア，イスラエルで検出され，近年ではノルウエー，スエーデンなどの欧州各国でも検出されるなど，世界各地に伝播しつつある。我が国では，2008年4月に米国から帰国した急性骨髄性白血病患者（35YF）からKPC-3産生多剤耐性 *K. pneumoniae* が分離された例が始めてである。2010年9月15日から12月28日に実施した「我が国における新たな多剤耐性菌の実態調査」では2株のKPC産生 *K. pneumoniae* が確認されたが，我が国における本菌の検出は，現時点では稀である。

3．KPCの検査法

医療機関で汎用されている自動同定装置では，KPC産生株を正しく検出できない場合があることが報告されており，問題となっている。PCR法，リアルタイムPCR法が報告されており，地方衛生研究所で実施可能である。

4．まとめ

昨年注目されたNDM-1と同様に，KPCは腸内細菌が産生すること，伝達性プラスミド上にコードされていることから，健康人の腸管定着を介する市中拡散が懸念される。保菌健康人を介した感染拡大は，その探知も防止も困難を極めるので，気付いたときには既に国内に広く侵淫していたという最悪の事態に至りかねない。医療機関における院内感染起因菌としても重要視すべき菌であるため，地方衛生研究所は本菌の分離同定と分子疫学解析技術を習得することに加えて，行政の院内感染対策部門，地域の医療機関との連携体制を構築する必要があると考えられる。

E. coli 0104 特異的 PCR－*E. coli* 0104 O antigen polymerase gene (*wzy*) のクローニングによるPCR陽性対象専用株の作出

八柳 潤

東北食中毒研究会第24回全体会議及び研修会
2011年8月，山形市

腸管出血性大腸菌（EHEC）O104は2011年4月以降，ドイツを中心とした欧州で感染者が多発し，大きな健康被害を惹起した。このEHEC O104は腸管凝集付着性大腸菌（EAggEC）O104にベロ毒素ファージが感染して派生したハイブリッド型のEHECであるとされている。国内でのEHEC O104感染者の発生は未確認であるが，国内への侵入を迅速に探知して適切な対応をすることが健康被害の拡大防止の上で重要である。しかしながら，O104の型別血清は国内市販品が無いことが問題となっている。このため，我々は *E. coli* O104のO-antigen polymerase gene（wzy）（GenBank Accession Number AF361371, 1,113 bp）を標的としたO104特異的PCR法用のプライマーを設計し，また，O104陽性対象用大腸菌株を作出した。国立感染症研究所細菌第1部の伊藤健一郎博士から分与された，中部国際空港検疫所で分離されたEAggEC O104 2342株のDNA溶液から *E. coli* O104のO-antigen polymerase gene (wzy)の全長（1,113 bp）を増幅し，TAクローニングシステム（Amersham），トランスフォーメーションキット（ニッポンジーン）を使用して *E. coli* JM109にクローニングし，O104wzyORF 1,113 bpを保有するJM109/O104-KI/AKITA20110616を作出した。O104特異的PCR用プライマーとして，O104wzyの470 bpを増幅するO104wzy_F:ttt act tca cga ggt gtc aag, O104wzy_R: att aac att aat gca gat aaa tgg を設計し，JM109/O104-KI/AKITA20110616から470 bpの断片が増幅されることを確認した。なお，*E. coli* O104 O antigen gene clusterは *E. coli* K9 gene clusterと同一であることから，O104wzy PCR陽性株についてはK9抗原保有の否定が必要となる。その目的にはO8wbD, O9wbD共通プライマーである #3592：ggc atc ggt cgg tat tcc, #3594 tgc gct aat cgc gtc tac が使用できる。

JM109/O104-KI/AKITA20110616は上記プライマー等関連情報を添付して当センターから分与可能である。

秋田県で分離された *astA* 保有大腸菌の病原因子保有状況

今野貴之，八柳 潤，齊藤志保子

第65回日本細菌学会東北支部総会
2011年8月，山形市

*astA*を保有する大腸菌は，毒素原性大腸菌の耐熱性エンテロトキシンに類似の毒素EAST1を産生し，これまでに数例の集団下痢症事例の報告がある一方，健康者からも多数分離されるためその病原性には賛否両論がある。今回，秋田県における*astA*保有大腸菌による健康被害の実態を把握するため，散発下痢症患者由来の大腸菌を用いて，その侵淫実態を調査した。また，*astA*保有大腸菌の病原性について，*astA*以外の病原因子が関わる可能性を調査するため，これまでに下痢原性大腸菌で報告されている様々な病原因子の保有状況を併せて調査した。

平成19年から平成21年までの下痢原性大腸菌疑い株から，*astA*保有大腸菌は35株検出された。これら35株について*iha*，*lpfA*，*ldaG*，*pilS*，*pic*，*pet*，*irp2*，*daa*，*aah*，*aid*，*cdtB*及び*hlyA* の12種類の病原因子について保有状況を調査したところ，24株で何らかの付着性に関わる病原因子を検出した。また，3株ではα溶血素産生に関わる*hlyA*が検出された。さらに，24株でヒトの体内での増殖に必要な*irp2*が検出され，*iha*，*pilS*，*pic*及び*hlyA*を保有する株は共通してこの因子を持ち合わせていた。特定の病原因子のセットを持つ菌株のみがヒトへの病原性を持つと推定すると，*iha*，*pilS*，*pic*，*hlyA*，*irp2*といった病原因子は*astA*保有大腸菌の病原性に重要な役割を持つことが示唆された。

秋田県における鶏肉等のカンピロバクター汚染状況について

髙橋志保，熊谷優子，和田恵理子
今野貴之，八柳　潤，千葉真知子
齊藤志保子，天野憲一[*1]

第4回日本カンピロバクター研究会総会
2011年12月，相模原市

厚生労働省食中毒統計によると，細菌性食中毒事例は年々減少傾向にあるものの，カンピロバクターによる事例数は横ばい状態で，平成15年以降，第1位となっている。その背景には，家庭や飲食店等における感染があると推察されることから，カンピロバクターによる食中毒事例の原因食品として最も多い鶏肉類を中心に，秋田県における汚染状況をまとめた。

平成12～22年に市販食肉等の汚染実態調査，平成17～22年に収去食品検査，平成15～18年に家畜の保菌状況調査を行った。汚染実態調査では，牛肉や豚肉からはカンピロバクターは検出されなかったが，鶏肉や鶏レバーからは44.4～74.0%，鶏ミンチ肉からは28.6～50.0%，加熱調理用牛レバーからは0～14.3%検出された。収去食品からは4.0%検出された。家畜の保菌状況調査では，牛及び豚の直腸便から29.2%，92.0%，胆汁から21.4%，0%，鶏盲腸便からは90.9%と高率に検出された。

汚染実態調査から，県内に流通している鶏肉類はカンピロバクターに高度に汚染されている実態が浮き彫りとなった。また，牛胆汁からの検出は，牛レバーの汚染は表面だけではなく，実質そのものの汚染を示唆している。このように汚染された鶏肉や牛レバーが，依然としてカンピロバクターによる食中毒事例や散発下痢症を発生させる重要な原因と考えられる。汚染を低減させるためには，農場，処理場，食品関連事業者等がそれぞれの立場に応じた対策を講じていくことが重要であり，同時に消費者に対して，生食することの危険性等について一層の啓発活動を行っていくことが必要である。

[*1]：秋田大学バイオサイエンス教育研究センター

ノロウイルス：食品からのウイルス検出法

斎藤博之

衛生微生物技術協議会第32回研究会
2011年6月　東京都

パンソルビン・トラップ法（パントラ法）は，食品検体からノロウイルス（NoV）を検出するための実践的な手法である。全国的に食中毒対応で用いるには次のような課題があった。プロトコルに必須の抗NoV血清の絶対量は少なく，全国の食中毒事例に対応するには全く足りていない。また，現在のところNoV-GII/4を含めて19遺伝子型に対する特異的抗血清が利用可能であるが，その他の遺伝子型には対応できない。一方，実際に食品検体が搬入される時点では遺伝子型は不明なため選択が困難であるという実践的な問題もある。さらに，サポウイルスなどNoV以外の食中毒起因ウイルスへの対応も必要である。

対応策を検討したところ，1万人単位でプールされた血漿から製造・販売されているガンマグロブリン製剤を利用することでこの問題を解決することができた。例としてNoV-GII/4型の回収率（3回の平均）を示すと，ポテトサラダでは24.4±3.6%，焼きソバでは25.6±2.3%であった。汚染レベルの異なるモデル食品からnested PCRによる検出を試みたところ，これらの2食品ではいずれも食品1g当り35コピーまで検出できた。これまでのところ，ガンマグロブリン製剤は，NoVでは11遺伝子型（GI/3，GI/4，GI/8，GI/9，GII/2，GII/3，GII/4，GII/5，GII/6，GII/13，GII/18），サポウイルスでは4種類全ての型，他にA型肝炎ウイルスとアデノウイルス41型において有効であることを確認している。このように上記の課題をクリアーできたため，本法を実事例で試すことが可能となり，実用化に向けて大きく前進したものと考えられる。

Development of a PANtrap method to detect norovirus from contaminated food

斎藤博之，東方美保[*1]，岡　智一郎[*2]
片山和彦[*2]，田中智之[*3]，野田　衛[*4]

国際微生物学連合2011会議
2011年9月　札幌市

Noroviruses (NoVs) are a major cause of food poisoning and a dominant cause of food-related outbreaks of gastroenteritis. Foodborne gastroenteritis is being increasingly recognized as a public health problem, but identification of the etiological agents responsible has been restricted due to the difficulty to detect the agents from food samples. We developed a PANtrap method for the detection and quantification of NoVs from different food samples, that included solid, liquid, paste and oily states. We spiked NoV GII/4 stool suspension that includes 10^5 copies of NoV RNA into 10 grams of potato salad and stir fried noodle. Food samples were rinsed by a homogenizing buffer and centrifuged to obtain food emersion. Anti NoV GII/4 serum was added into the food emersion to make NoV-IgG complexes. PANSORBIN was added and the samples re-centrifuged to collect NoV-IgG complexes adsorbed by PANSORBIN. NoV RNA was extracted from this PANSORBIN pellet using a commercial extraction kit, and then analyzed using RT real-time PCR. The recovery rate from potato salad was 78.3±10.8%, in contrast to 0.33±0.08% when no anti NoV GII/4 serum was added. Similar results were obtained from the stir fried noodle, 81.5±10.2% (anti NoV serum mix added) and 1.15±0.25% (no anti NoV serum). We also applied a commercially available human gamma globulin agent to the PANtrap method to detect other viruses. We succeeded to recover other NoV genotypes as well as sapoviruses, adenovirus type 41, and hepatitis A virus. These results show the potential of the PANtrap method for the detection of food bone viruses from contaminated food.

[*1]：福井県衛生環境研究センター，[*2]：国立感染症研究所，[*3]：堺市衛生研究所，[*4]：国立医薬品食品衛生研究所

食品中のノロウイルス検出のためのパンソルビン・トラップ法の開発

斎藤博之，東方美保[*1]，岡　智一郎[*2]
片山和彦[*2]，田中智之[*3]，野田　衛[*4]

第102回日本食品衛生学会学術講演会
2011年9月　秋田市

ウイルス性食中毒の大部分を占めるのがノロウイルス（NoV）であることがわかっているにもかかわらず，原因として疑われる食品からウイルスを検出できた例はカキを除けば極めて稀少である。その理由として，ウイルスを含む食品乳剤をPCRで用いる量まで減量濃縮するには多大な労力と時間とコストを要し，多検体を取り扱うのは事実上不可能であるという実状がある。こうした困難な状況を打開するために，固形，液状，練り物，油物等の一般的な食品からNoVを検出する手法の開発を行った。

蒸留水で希釈した糞便で各種食品を汚染させて食中毒モデル食品とした。モデル食品を洗滌液に懸濁させた後，3,000 rpm 30分遠心することで固形物を除去した。食品の遠心上清（濁質を含む）に抗体（抗NoVウサギ単味血清または市販ガンマグロブリン製剤）及びパンソルビン（IgG結合性プロテインAを持つ黄色ブドウ球菌の菌体）を加えてNoV-IgG-菌体の複合体を形成させた後，遠心分離によりNoVを回収した。NoVが吸着した菌体を少量の緩衝液で再懸濁したものをTRIzol-LS（invitrogen）でフェノール抽出し，水層からQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いてRNAを抽出した。以上の基本プロトコールにおいて，洗滌液の組成，食品乳剤作成方法，抗体の種類と添加量，抗原抗体反応とパンソルビン吸着反応の時間，及び抽出したRNAに対する逆転写反応の条件等について，Real-time PCRの数値を基に最適化を図った。また，本法の有用性を検証するために，現在多用されているポリエチレングリコール沈澱法（PEG沈澱法）による回収結果と比較した。

食品洗滌液の組成を検討したところ，0.1 M Tris・HCl-0.5M NaCl-0.1% Tween20 (pH8.4) が最適であり，さらにα-アミラーゼ粉末を2.5 mg/mLになるように添加することで，反応妨害物質である炭水化物を分解除去できた。抗体とパンソルビンは別々に反応させる必要はなく，同時添加15分の処理で十分な回収結果が得られた。逆転写反応の際にランダムプライマーよりも，NoV特異的プライマーを用いた方が，特に低濃度汚染検体において効果的であった。回収率はNoVの血清型や食品種別によって異なるが，焼きソバにウサギ単味抗血清を用いた例で81.5±10.2%であった。PEG沈澱法を用いた場合の回収率と比べると2～1,000倍の数値であり，マカロニサラダ等の練り物において特に有効であった。実事例における汎用化のために，市販ガンマグロブリン製剤を用いたところNoVでは12遺伝子型，サポウイルスでは4種類全ての型，他にA型肝炎ウイルスとアデノウイルス41型において10～50%の回収率であった。本法はどのような食品であっても共通の工程で検査が行えるため，今後は実際の運用面における利便性を追究していく予定である。

[*1]：福井県衛生環境研究センター，[*2]：国立感染症研究所，[*3]：堺市衛生研究所，[*4]：国立医薬品食品衛生研究所

食品中のノロウイルス検出の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発

斎藤博之

第32回日本食品微生物学会学術総会
2011年10月　東京都

平成9年に食品衛生法の中に初めてウイルスが登場し，ウイルス性食中毒という概念が確立したのは，歴史の一つの節目と言える。その後，糞便検体に対する検査技術は長足の進歩を遂げたものの，食品検体からのウイルス検出は困難を極め，「糞便は検査できるが，食品の検査は難しい」といった状態のまま10年が経過した。ウイルスが食品衛生法上の食中毒原因物質として規定されている以上，このような片肺飛行を続けることは社会的に大きなトラブルを招来する結果に繋がるため，食品からのウイルス検出技術の開発は焦眉の急とされていた。そこで平成19年から厚生労働科学研究費補助金（食品の

安心・安全確保推進研究事業）による研究の一環として，食品中のNoVを検出するための実践的手法の開発に関する研究がスタートした。その結果，パンソルビン・トラップ法（パントラ法）を開発し，固形，液状，練り物，油物などの多種・多様な食品からNoVを検出することが可能となった。

開発した実験室内プロトコルは，これまで無かったものを作り出す“プロダクト・イノベーション”に相当したが，それを実用に供するためには，もう一段の“プロセス・イノベーション”を必要とした。最大の問題は，プロトコルに必須である抗NoV血清の安定供給であった。多くの検討を重ねた末に，1万人単位でプールされた血漿から製造・販売されているガンマグロブリン製剤を利用することでこの問題を解決することができた。例としてNoV-GII/4型の回収率（3回の平均）を示すと，ポテトサラダでは24.4±3.6%，焼きソバでは25.6±2.3%であった。汚染レベルの異なるモデル食品からnested PCRによる検出を試みたところ，これらの2食品ではいずれも食品1g当り35コピーまで検出できた。これまでのところ，ガンマグロブリン製剤は，NoVでは12遺伝子型（GI/3, GI/4, GI/8, GI/9, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/12, GII/13, GII/18），サポウイルスではヒトに感染する4種類全ての型，他にA型肝炎ウイルスとアデノウイルス41型において有効であることを確認している。このように上記の課題をクリアーできたため，本法を実事例で試すことが可能となり，実用化に向けて大きく前進したものと考えられる。

病原ウイルスによる食品汚染を検出するパンソルビン・トラップ法の開発

斎藤博之，東方美保[*1]，岡　智一郎[*2]
片山和彦[*2]，田中智之[*3]，野田　衛[*4]

第19回秋田応用生命科学研究会
2011年11月　秋田市

黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）は，化膿性疾患などの原因となることから有害微生物として認識されている。一方で細胞壁中に含まれるProtein AはIgGと強固に結合する性質を持つため，ホルマリン固定された菌体はパンソルビンという試薬として市販されている。平成9年に食品衛生法が改正され，史上初めて「ウイルス性食中毒」という概念が確立したが，食品中のウイルスを検出する方法については手探り状態のまま現在に至っている。我々は，上記のパンソルビンを利用することで，固形・液状・練り物・油物など多種・多様な食品からノロウイルス（NoV）に代表される食中毒起因ウイルスを検出する技術（パンソルビン・トラップ法：以下パントラ法と略）を開発したので紹介する。

パントラ法の基本原理は，食品乳剤中にウイルスに対する抗体を添加することにより，抗原抗体複合体を形成させ，それを黄色ブドウ球菌表面のプロテインAに吸着させることで，菌体とともにウイルス粒子を沈殿・回収することである。回収した菌体を少量の緩衝液で再懸濁してから市販のキットを用いてRNA抽出を行えば，50 mLの食品乳剤から50 μLのPCRスケールのRNA溶液まで，効率良く減量濃縮できることになる。添加する抗体として，開発時にはGII/4型のNoVウイルス様粒子（VLPs）を免疫して作製した特異的ウサギ抗血清が用いられた。その後，実践使用のための安定的な抗体供給源として，市販ガンマグロブリン製剤を用いる汎用プロトコルが考案された。

ポテトサラダと焼きそばを，NoV-GII/4型で汚染させたモデル食品に作製し，投入したウイルス量と回収できたウイルス量をReal-time PCRで比較したところ，特異的ウサギ抗血清を用いた場合は約80%，ガンマグロブリン製剤を用いた場合は約25%の回収率であった。また，nested PCR（二重PCR）による検出限界を検討したところ，特異的ウサギ抗血清を使用した場合は，食品1 g当たり10コピー，ガンマグロブリン製剤を使用した場合は35コピーの汚染レベルまで検出できた。ガンマグロブリン製剤は特異的ウサギ抗血清と比べると1/3程度の数字（PCRでは2サイクル以内の差）であるが，NoVの他の型やサポウイルス，A型肝炎ウイルスなどにも幅広く対応できる対応できる利点があり，汎用プロトコルとして実事例へ用いることが可能となった。

*1：福井県衛生環境研究センター，*2：国立感染症研究所，*3：堺市衛生研究所，*4：国立医薬品食品衛生研究所

秋田県の雄物川流域におけるアカツツガムシ生息状況について－2011年の調査から－

佐藤寛子，柴田ちひろ，佐藤了悦
秋野和華子，斎藤博之，安部真理子
斎藤志保子，門馬直太*1，高橋 守*2
藤田博己*3，角坂照貴*4，高田伸弘*5
川端寛樹*6

第56回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会
2011年10月，山形市

近年，アカツツガムシは絶滅したかのように思われていたが，2008年と2010年，秋田県においてアカツツガムシ媒介性のつつが虫病患者が再び発生した。2009年以降の調査において，アカツツガムシの生息が感染推定地を含む同県大仙市の観光スポットでも確認されたため，我々は調査域を雄物川上流～支流まで広げ，アカツツガムシ・ハザードマップ作成を試みているので，その経過等について報告する。

調査は1964年の患者発生記録を参考に，雄物川上流部の湯沢市から中流部の大仙市にいたる約70 kmの河川敷を対象地域に，黒布見取り法によって行った。調査地域の最上流部にあたる湯沢市郊外では，記録上は患者発生地とされていたが，アカツツガムシの生息は確認されなかった。しかし，隣市を流れる支流との合流点に近づくにつれ，アカツツガムシが確認されるようになり，観光スポット周辺にいたっては高密度に生息していることが推定された。ちなみに，アカツツガムシは水際の砂地に，特に中州での生息数が多い傾向にあったが，河川沿いの公園や釣り場等でも確認された。今後は，これらツツガムシの病原体保有状況の検査も含めた調査継続の必要性が示唆された。

*1：福島県衛生研究所，*2：埼玉医科大学，*3：大原総合病院附属大原研究所（現:馬原アカリ医学研究所），*4：愛知医科大学，*5：福井医科大学，*6：国立感染症研究所

秋田県におけるShimokoshi型つつが虫病の5症例

佐藤寛子，柴田ちひろ，佐藤了悦
秋野和華子，斎藤博之，安部真理子
斎藤志保子，高橋守*1，藤田博己*2
角坂照貴*3，高田伸弘*4，川端寛樹*5
須藤恒久*6

第56回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会
2011年10月，山形市

国内における*Orientia tsutsugamushi*（Ot）の代表的な血清型のうち，Shimokoshi型はベクターが未だ不明である上，感染症例の報告も少ない。今回，秋田県において抗体検査により確認し得た5つの症例について報告する。

症例1：59才男性，発病年月日1995/10/12，発熱（38.0℃）と発疹，肛門部に刺し口，感染要因 森林作業。

症例2：51才男性，発病年月日1997/10/18，発熱（38.0℃）と発疹，上腕に刺し口，感染要因 水田作業。

症例3：92才女性，発病年月日2009/5/8，発熱（38.0℃）と発疹，上腕に刺し口，感染要因 畑作業。

症例4:75才女性，発病年月日2009/5/17，発熱（38.3℃）と発疹，上腕に刺し口，感染要因 山菜採り。

症例5:57才男性，発病年月日2011/5/17，発熱（37.5℃）と発疹，背部に刺し口，感染要因 畑作業。

以上の症例の発生地点は県北部が1例と県南部が4例で，発生時期は春季3例と秋季2例であった。Shimokoshi型Otは概して人に対する病原性が弱いとされてきたが，これら5症例は全てつつが虫病の3徴候を認め，典型的な症状を呈していた。今後，人に対する病原性の再評価とともに，ベクター解明に向けた調査の進展が望まれる。

[*1]：埼玉医科大学，[*2]：大原総合病院附属大原研究所（現:馬原アカリ医学研究所），[*3]：愛知医科大学，[*4]：福井大学，[*5]：国立感染症研究所，[*6]：秋田大学

秋田県におけるアカツツガムシ生息域（2011年）

佐藤寛子　柴田ちひろ　佐藤了悦
秋野和華子　斎藤博之　安部真理子
斎藤志保子　門馬直太[*1]　高橋守[*2]
藤田博己[*3]　角坂照貴[*4]　高田伸弘[*5]
川端寛樹[*6]

第19回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー
2011年11月，広島県

秋田県の雄物川流域は古くからアカツツガムシの生息地として知られ，アカツツガムシ媒介性つつが虫病患者の多発地でもあった。近年になって，秋田県を含むこれまでの生息地におけるアカツツガムシは絶滅したかのように思われていたが，2008年，秋田県において15年ぶりにアカツツガムシ媒介性のつつが虫病患者が発生し，大仙市角間川地区の雄物川河川敷が感染推定地とされた。2009年の調査でアカツツガムシの生息が感染推定地の他，角間川より7 km下流の全国花火大会会場でも確認されたが，翌2010年，角間川から20 km上流でも患者が発生した。このことを受け，我々は調査域を雄物川支流を含む上流域の約70 kmにまで広げ，アカツツガムシ・ハザードマップ作成を試みたので，その経過等について報告する。

調査地域の最上流部にあたる湯沢市郊外では，記録上は患者発生地とされていたが，アカツツガムシの生息は確認されず，そこから約3 km下流に至ってから確認された。さらに下流の横手市を流れる支流との合流点に近づくにつれ，多くのアカツツガムシが確認されるようになった。一方で調査範囲の最下流部に位置する大仙市郊外北部の記録上の患者発生地でもアカツツガムシの生息確認が出来なかったが，そこから18 kmの上流地点以南では確認されるようになり，雄物川流域における最も高密度な生息域は花火大会会場周辺にあることが推察された。また，アカツツガムシの生息環境は広い河川敷の中でも水際の砂地に，特に中州での生息数が多い傾向にあったが，河川沿いの公園や釣り場といった増水時に水没する箇所にも確認された。今後は，未調査の支流での調査に加え，ツツガムシの病原体保有状況の検査も実施し，得られた情報の地元自治体や保健所への提供などを通して，つつが虫病対策に活用することが必要と考えられた。

[*1]：福島県衛生研究所，[*2]：埼玉医科大学，[*3]：大原総合病院附属大原研究所（現：馬原アカリ医学研究所），[*4]：愛知医科大学，[*5]：福井医科大学，[*6]：国立感染症研究所

もみ殻を原料としたリン回収材の開発とそれを活用した八郎湖高濃度リン対策への展開

成田修司，鈴木忠之，石垣　修

平成23年度廃棄物資源循環学会年会
併設研究発表会
2012年11月　東京都

米どころ秋田では，大量発生するもみ殻の焼却が長年の懸案となっている。近年，焼却に伴う健康被害の報告もあることから，もみ殻の適正処理が求められている。当センターでは，このニーズに対応するため，適正処理の過程において，リンを吸着する水質浄化材へ転換する技術開発に取り組んだ。著者らは，その浄化材を本県において富栄養化が問題となっている八郎湖対策への適用を目指し研究を進めた。

上記リン回収材の開発では，リンと親和性が高く環境中に豊富に存在するカルシウム（Ca）との複合化を試みた。合成したリン回収材を用いて，リン酸イオンの吸着試験（初濃度[PO_4^{3-}=50 mg/L]）を行った結果，24時間後のリン酸イオン回収量は，35 mg/g-sampleとなった。同様に合成したリン回収材を用いて，種々の共存アニオン（PO_4^{3-}，NO_3^-，SO_4^{2-}，Cl^-，濃度:50 mg/l)を含む

溶液から，PO_4^{3-}の選択的回収試験を行った結果を以下に記述する。Cl^-が約 5 mg/l 増加していたが，NO_3^-，SO_4^{2-}については回収前後の濃度変化がほとんど見られなかった。一方，PO_4^{3-}については，回収時間 24 時間で，初期濃度の約 85 %を回収していたことから，PO_4^{3-}のみを選択的に回収可能であることが明らかとなった。

上記回収材を用いて，フィールドにおける小規模の実証試験を行った結果，湧出水中の 3/4 程度のリン負荷低減を確認した。また，この技術が長崎県の諫早湾対策で活用されることについても報告した。

玉川源泉から湧出する鉄及びアルミニウムのイオン成分が関与する源泉下流域及び田沢湖のpH低下機構

成田修司，高橋英之，佐々木純恵
布田　潔[*1]，宮田直幸[*2]

第 46 回　日本水環境学会
2012 年 3 月　東京都

秋田県仙北市にある玉川源泉の大噴は，pH約1.2の強酸性水を湧出している。その強酸性水は，長い間下流域の土壌や河川に多大な影響を与え，その酸性水が導入された田沢湖ではpHが4台にまで低下した。この酸性水対策として，平成元年には石灰中和処理施設が運転を開始し，源泉の大部分をpH約3.5まで処理した後，河川に放流することにより田沢湖のpH改善が進んできた。しかし，平成14年ごろから同源泉の総酸度（PP酸度）が急激に上昇し，下流の田沢湖においてpH低下が観測されるようになった。本研究では，同源泉の総酸度を構成している強酸成分と鉄の2価（Fe^{2+}）及びアルミニウムイオン（Al^{3+}）等の弱酸成分（以降，潜在的酸性成分と記述）が関与するpH低下の反応機構とその反応が生じていると考えられる流域を明らかにすることを目的に調査を行った。

調査地点は，平成20年から継続的に調査を実施している源泉（大噴），玉川温泉の排水が混入する中和処理施設周辺の湯川末端部及び同施設放流口である。各地点で試料水を採取し，pH及びFe^{2+}，鉄の3価（Fe^{3+}），Al^{3+}の金属イオン濃度について分析を行った。

上記の調査地点で観測されたpH及びFe^{2+}，Al^{3+}濃度より，湯川及び同施設から流出する酸性成分の割合を算出した（表1）。全体の約4割は同施設を経由しない湯川の強酸成分が占め，同施設周辺の河川pH約4をpH2台にまで低下させた。また約5割が湯川及び中和放流水中のAl^{3+}とFe^{2+}からなる潜在的酸性成分であった。Fe^{2+}は流下に伴い鉄酸化細菌の存在下でFe^{2+}がFe^{3+}に酸化され，式1が進行する。その結果，源泉の下流5 km付近には河床に$Fe(OH)_3$の赤褐色沈殿がみられるようになった。

$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$, $Fe^{3+}+3H_2O \rightarrow Fe(OH)_3\downarrow+3H^+$（式1）

また，一部の Al^{3+}はpH約4.8の玉川ダムでは沈殿せずに流下し，田沢湖（pH約5.2）付近で加水分解（式2）が進行すると考えられ，理論的に田沢湖のpHを低下もしくは上昇させない方向に反応が進む可能性が高いことが明らかとなった。

$Al_{3+}+3H_2O \rightarrow Al(OH)_3\downarrow+3H^+$（式2）

表 1　湯川及び中和処理施設から流出する酸性成分の割合

	強酸成分(%)	Al^{3+}(%)	Fe^{2+}(%)
中和放流水	15	30	7
湯　川	39	8	1

[*1]：秋田大学大学院工学資源学研究科，[*2]：秋田県立大生物資源学部

玉川酸性水中和対策がもたらす副次効果

佐々木純恵，成田修司，高橋英之
布田　潔[*1]，宮田直幸[*2]

第 46 回　日本水環境学会
2012 年 3 月，東京都

秋田県仙北市にある玉川源泉から湧出する強酸性水（pH 約 1.2）は，大部分が玉川中和処理施設で pH 約 3.5 まで石灰中和された後，玉川支流の渋黒川に放流されている。当センターでは，

この中和処理過程において，シュベルトマナイト（Sch）様化合物が形成され，同処理施設放流口に堆積していることを明らかにした。この Sch は，一般的に，ヒ素（As）等の重金属を取り込む性質をもつことが知られている。そこで，本研究では Sch 様化合物中が，源泉中の重金属を取り込む挙動を明らかにし，水質への副次効果について検討を行った。

本調査では，大噴の源泉，中和処理施設の中和処理水と同処理施設放流口の堆積物である Sch 様化合物を採取し，As，鉛（Pb），クロム（Cr）について定量分析を行った。

源泉，中和処理水，Sch 様化合物の重金属濃度を表 1 に示す。これらの結果から，pH 約 1.2 の源泉が中和処理により，pH 約 3.5 まで酸性を弱められる過程において，上記重金属を取り込みながら，Sch 様化合物が形成されたと考えられる。その一部が同処理施設放流口に堆積したことにより，さらに Sch 様化合物に重金属が高濃度に蓄積されたと推察される。このような重金属の挙動は同処理施設において酸性を弱めるために行っている処理の副次的な効果であり，下流域の重金属の濃度低下に大きく貢献していると考えられる。

表 1　源泉，中和処理水，Sch 様化合物中の As, Pb, Cr 濃度

	源泉 ($mg \cdot L^{-1}$)	中和処理水 ($mg \cdot L^{-1}$)	Sch様化合物 ($mg \cdot kg^{-1}$)
As	4.2	<0.001	14.0×10^3
Pb	1.2	0.49	0.61×10^3
Cr	0.10	0.014	0.19×10^3

[*1]：秋田大学大学院工学資源学研究科，[*2]：秋田県立大生物資源学部

マツ林に生育するキノコへの農薬の影響

小林貴司，松渕亜希子，松田恵理子
菅原冬樹[*1]，阿部　実[*1]

第 102 回日本食品衛生学会学術講演会
2011 年 9 月，秋田市

松くい虫による松枯れ病を防止するために，日本海沿岸の松林ではネオニコチノイド系農薬のアセタミプリド，チアクロプリドが散布されている。これらの農薬は，自然環境中で徐々に減少するが，松林に発生するキノコに及ぼす影響に関しての知見は少ない。そこで，松林で採取したキノコについて農薬含有量を調査し，安全性についての評価を行った。また，より直接的にキノコへの農薬影響を評価するために，高濃度農薬含有培地でキノコを生育し，吸収試験を行った。

収穫最盛期の秋に採取したキノコを測定した結果，アセタミプリドが散布された地点のキノコは，すべて一律基準（0.01 μg/g）以下の濃度であった。一方，チアクロプリドが散布された地点では，分解物であるアミド体においてわずかに基準を超える 1 検体（0.02 μg/g）があったが，チアクロプリド自体はすべて一律基準以下であった。

農薬吸収試験の結果，採取したすべてのキノコから農薬は検出されなかった。生育の過程でキノコが農薬を吸収しないことから，マツ林のキノコに農薬が検出される要因は，散布時に直接付着したときや，マツ葉などの農薬含有堆積物にキノコが接触したときなど，直接または間接的な接触によるものと考えられた。

[*1]：秋田県農林水産技術センター森林技術センター

LC-MS/MS を用いた畜水産物中の動物用医薬品の一斉分析法における精製法の検討

松渕亜希子，松田恵理子

第102回日本食品衛生学会学術講演会
2011年9月，秋田市

畜水産物中の動物用医薬品の分析を精度よく行うためには，試料中の脂質の除去が重要である。今回，脂質の中からリン脂質に焦点をあて，その精製法の検討を行った。リン脂質は両親媒性で目的物質との分離が困難であり，LC-MS/MS 分析の際，イオン化抑制等の原因となる。そこで，一律基準レベルに対応した分析をするために，数種のタイプの異なる固相カラム（脂質等

の高分子夾雑物除去のための4種，リン脂質除去のため6種の計10種）を選択し，精製効果等について比較した。

測定対象成分は，抗生物質，ホルモン剤，駆虫薬等の計98成分とし，対象食品は，鶏肉，豚肉，牛肉，サケ，エビ，鶏レバー，牛乳，鶏卵，ウナギ蒲焼きとした。

厚生労働省通知，HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲを改良した方法により試験溶液を調製し，LC-MS/MSを用いて測定した。カラムの精製効果の評価は，添加回収試験で行い，試料あたり10 ppbとなるように添加した。

脂質等の高分子夾雑物除去のためのカラムについては，Oasis HLBで最も多くの成分を回収できた。さらにリン脂質を除去するために，Oasis HLBの追加精製として，リン脂質に選択性が高いカラムについて検討した。その結果，MonoSpin TiOを用い，1%ギ酸アンモニウム/メタノールで溶出する条件で，最も多くの成分の回収が可能であった。

Oasis HLBおよびMonoSpin TiOの2つのカラムを併用し，9種類の食品について，添加回収試験を実施した。鶏レバー，ウナギ蒲焼きを除いて，約8割の成分で回収率50～120%，併行精度（RSD%）20%以下と概ね良好な結果が得られた。レバー，ウナギ蒲焼きでは，マトリックス添加検量線を用いることで，結果が改善された。

2.　他紙掲載論文

Virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1-harboring *E. coli* (EAST1EC) derived from sporadic diarrheal patients

Takayuki Konno, Jun Yatsuyanagi, Shioko Saito

FEMS Immunology and Medical Microbiology,
64, 3, 2012, 314-320.

Between 2007 and 2009, a total of 2168 *Escherichia coli* strains derived from diarrheal patients, defined as putative diarrheagenic *E. coli* (DEC) , were collected from medical institutions in Akita prefecture, Japan. Thirty five of the strains lacked typical pathogenic determinants of DEC other than *astA*, which encodes enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) . These *E. coli* strains are referred to as EAST1EC. Several studies have suggested a role of EAST1 in diarrhea; however, the correlation between diarrhea and the presence of *astA* remains inconclusive. To investigate whether EAST1EC strains derived from diarrheal patients shared pathogenic factors other than EAST1, virulence gene profiling of 12 virulence genes - *iha*, *lpfA*, *ldaG*, *pilS*, *pic*, *pet*, *irp2*, *daa*, *aah*, *aid*, *cdtB* and *hlyA* - was carried out. PCR analysis revealed that four of the 35 EAST1EC strains harbored only *astA*, 24 harbored genes associated with adhesins and intestinal colonization, three strains harbored the gene for α-hemolysin, and 24 strains harbored the gene for a siderophore. These results indicated that some EAST1EC strains harbor various virulence genes associated with distinct *E. coli* pathotypes, primarily enterohemorrhagic *E. coli* and EAggEC, which may represent additional pathogenic determinants of EAST1EC.

1年にわたる気管支炎・肺炎の流行と検出ウイルスの推移

斎藤博之，佐藤寛子，秋野和華子，藤谷陽子
安部真理子

病原微生物検出情報
32, 8, 2011,18-19

ヘルパンギーナやインフルエンザといった特定の疾患に含まれない，いわゆる“かぜ症候群”の検体として，これまでは咽頭炎や上気道炎などの診断名のものが多数を占めていた。しかし，最近1年間（2010年5月～2011年6月）の病原体サーベイランス定点の小児科から持ち込まれた検体を俯瞰すると，咽頭炎・上気道炎由来のものが54検体であったのに対し，気管支炎，または肺炎と診断されたものが224検体と4倍以上にのぼり呼吸器感染症の様相が変化しつつあるように思われる。また，これらの下気道疾患の中で喘息の併記があるものが68検体と3割近くに及び，咳が遷延する傾向が推察される。本稿では，上記の気管支炎・肺炎由来の検体から検出されたウイルスの推移について報告する。

検体からは，ヒトメタニューモウイルス，パラインフルエンザウイルス，RSウイルスなどが検出されたが，2010年10月をピークとしたライノウイルスの流行が目立っている。この時期には診断名に喘息が併記された検体が多く，2010年9月（6検体），10月（20検体），11月（7検体）であった。ライノウイルスは基礎疾患を持たない子供に感染しても軽症で経過するのに対し，アレルギー等の喘息体質を持つ子供が感染すると気道狭窄を引き起こして重症化するなど，異なった病態を示すことが知られている。図2は検体添付の調査票に喘息の記載があったものと無かったもので検出ウイルスの差異を比較したものであり，ライノウイルスが喘息発症の重要な因子であることが見て取れる。今回の調査で”不検出”となった検体については，エンテロウイルス，アデノウイルス，インフルエンザウイルス（A型，B型），及びマイコプラズマ・ニューモニェの検出も試みたが陰性であった。他の病原体の可能性も当然残るが，春から初夏にかけての検体で不検出のものが多いこと

から，花粉アレルギーで受診した患者のものが含まれていることも考慮すべきである。気管支炎・肺炎の多発傾向が一過性のもので終わるか，今後も定着するかについては継続的な調査で明らかになっていくものと思われる。

パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出法

斎藤博之，東方美保[*1]，岡　智一郎[*2]，
片山和彦[*2]，田中智之[*3]，野田　衛[*4]

病原微生物検出情報
32, 12, 2011,4-6

平成9年に食品衛生法の中に初めてウイルスが登場し，ウイルス性食中毒という概念が確立したのは，歴史の一つの節目と言える。しかし一方で，カキ以外の一般的な食品からウイルスを検出する方法として，一応の標準としてポリエチレングリコール（PEG）沈澱法が存在していたものの手探りの状態が続いてきた。そこで平成19年から厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）による研究の一環として，食品中のウイルスを検出するための実践的手法の開発に関する研究がスタートした。その結果，固形，液状，練り物，油物などの多種・多様な食品からノロウイルス（NoV）に代表される食中毒起因ウイルスを検出することができるパンソルビン・トラップ法（パントラ法）を開発し，ルーチンの食品検査として実施可能な段階に達してきたため，本稿にてその概要を紹介する。

パントラ法の基本原理は，食品乳剤中にウイルスに対する抗体を添加することにより，抗原抗体複合体を形成させ，それを黄色ブドウ球菌表面のプロテインAに吸着させることで，菌体とともにウイルス粒子を沈殿・回収することである。添加する抗体として，開発時にはGII/4型のNoVウイルス様粒子（VLPs）を免疫して作製したウサギ抗血清が用いられた。その後，実践使用のための安定的な抗体供給源として，市販ガンマグロブリン製剤を用いる汎用プロトコールが考案された。回収率はウサギで作製した特異的抗血清の1/3程度となるが（PCRでは2サイクル以内の差），NoVの他の型や，サポウイルス（SaV），A型肝炎ウイルス(HAV)などへも幅広く対応できるという利点がある。これまでのところ，ガンマグロブリン製剤は，NoVでは12遺伝子型（GI/3, GI/4, GI/8, GI/9, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/12, GII/13, GII/18），サポウイルスではヒトに感染する4種類全ての型，他にA型肝炎ウイルスとアデノウイルス41型において有効であることを確認している。また，流通食品が疑われる大規模・広域事例では，最初に感染して回復した人の血清を用いることも可能である。当事者の協力が得られることが大前提となるが，不幸にして社会問題に発展した場合には原因究明のための選択肢の一つとなるであろう。

以上のとおり，パントラ法は食品検体から調製された乳剤を濃縮・精製してRNA抽出液を得る段階までを担保するものであり，それ以降の逆転写反応やPCRについては既報に従うことになる。多くのケースでは逆転写反応前にDNase I処理を行っているが，α-Amylaseも同時に添加することで検出効率が向上する。また，ランダムプライマーよりも，特異的プライマーを用いて逆転写反応を行った方が，検出効率は高い。ポテトサラダと焼きそばを，NoV-GII/4で汚染したモデル食品に作製（様々な汚染レベルのもの）し，ガンマグロブリン製剤を用いたパントラ法で抽出したRNAからnested PCR（1st.PCR: COG2F/G2-SKR, 2nd.PCR: COG2F/COG2R によるReal-time PCR）による検出を試みたところ，いずれも食品1g当り35コピーの汚染レベルのものまで検出できた。2nd.PCRの段階でReal-time PCRを用いると結果は定性扱いとなるが，ゲル電気泳動をハイブリダイゼーションで確認したのと同義であることから，タイムプレッシャーの中で高感度を求められる局面においては効果的と考えられる。

[*1]：福井県衛生環境研究センター，[*2]：国立感染症研究所，[*3]：堺市衛生研究所，[*4]：国立医薬品食品衛生研究所

食品中のノロウイルス検出の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発

斎藤博之

日本食品微生物学会雑誌
29, 1, 2012, 32-37

平成 9 年に食品衛生法の中に初めてウイルスが登場して以来，糞便検体に対する検査技術は長足の進歩を遂げ，簡易検査キットによるベッドサイド診断も可能となっている。一方，食品検体からのウイルス検出は困難を極め，「糞便は検査できるが，食品の検査は難しい」といった状態のまま10年が経過した。そこで平成19年から厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）による研究の一環として，食品中のNoVを検出するための実践的手法の開発に関する研究がスタートした。その結果，パンソルビン・トラップ法（パントラ法）を開発し，固形，液状，練り物，油物などの多種・多様な食品からNoVを検出することが可能となった。

開発段階では様々な反応条件を最適化するために系を単純化する必要があり，NoV-GII/4型で汚染させた市販食品をモデル食品とした。添加する抗体としてGII/4型のNoVウイルス様粒子（VLPs）を免疫して作製したウサギ抗血清（国立感染研ウイルス第2部第1室において作製）を用いて検討した。しかし，このようにして作製された抗血清は理論上の裏付けはあるものの絶対量が少なく，全国の食中毒事例に対応するには全く足りないという問題に直面した。多くの検討を重ねた末に，1万人単位でプールされた血漿から製造・販売されているガンマグロブリン製剤を利用することでこの問題を解決することができた。これまでのところ，ガンマグロブリン製剤は，NoVでは13遺伝子型（GI/3，GI/4，GI/8，GI/9，GI/14，GII/2，GII/3，GII/4，GII/5，GII/6，GII/12，GII/13，GII/18），サポウイルスではヒトに感染する4種類全ての型，他にA型肝炎ウイルスとアデノウイルス41型において有効であることを確認している。

食品からのウイルス検出法は，10年以上にわたって世界中で検討が重ねられてきているテーマであり，原理の異なる様々な手法が考案されている。本稿で紹介したパントラ法は，最初から日常業務に取り入れることを前提として設計されたものであり，ある意味一つの完成形と言える。高速冷却遠心機等の大型機器を使わないことや，必要な全ての試薬を市販品として入手できることは導入が容易であることを意味している。運用面においては，パントラ法は言わば“骨格プロトコール”であって，抗体等の添加試薬はそれぞれの事情に応じて入れ替えられるように柔軟性を持たせてある。今後は実事例を積み重ねながら，随時改良を加えていくことになるが，そのためにもできるだけ多くの機関で使われることを期待している。

地方都市における Oral sex 経験者の N. gonorrhoeae および C. trachomatis の検出状況

佐藤寛子，柴田ちひろ，
能登 彩[*1]，能登 舞[*2]，能登宏光[*3]

日本性感染症学会誌, **12**, 1, 2011, 99-107

Oral sex 経験者 125 例を対象に初尿と咽頭スワブ及びうがい液を検体として，淋菌とクラミジアの検出状況を検討した。併せて，病原体をreal-time PCR法で定量解析し，スワブとうがい液の有用性を比較検討した。尿検体の淋菌あるいはクラミジア陽性率は，Oral sexを患者とパートナー両者が行ったA群が49.5%，パートナーだけのB群が50.0%であった。また，咽頭検体陽性率は，A群が15.9%，B群が16.7%であった。尿，咽頭検体の両方が陽性であったのは，A群が12.1%，B群が16.7%であり，両群間に有意差はなく，Oral sexはどちらの行為でも感染リスクがあることが示唆された。また，うがい液の検出率は95.0%，スワブは50.0%であり，双方の病原体コピー数には顕著な差がなかったことから，患者の負担軽減の面からもうがい液が有用と考えられた。

[*1]：秋田大学医学部付属病院，[*2]：かづの厚生病院，[*3]：秋田泌尿器科クリニック

秋田県健康環境センター年報
第7号 2011

発行日　平成24年12月
発行所　秋田県健康環境センター
〒010-0874 秋田市千秋久保田町6番6号
TEL: 018-832-5005
FAX: 018-832-5938