

Annual Report
of
Kobe Institute of Health
XLIX (2021)

神戸市健康科学研究所報

第 49 卷

2021

神戸市健康科学研究所

神戸市中央区港島中町4丁目6番5号

4-6-5 Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan

はじめに

令和3年(2021年)4月より、名称が神戸市環境保健研究所から神戸市健康科学研究所に変更になりました。神戸市健康科学研究所報ができあがりしましたので、お届けいたします。発刊番号はそのまま引き継ぎ、第49巻とさせていただきます。

令和元年(2019年)12月に中国武漢市で発生した新型コロナウイルスは、全世界に広まり、既に477万人以上の人を死に至らせました。神戸市では、国内同様、これまでに5回の波があり、波を繰り返すたびに、感染者数が増加してきました。神戸市内の累積感染者は26,845人、死亡者は609人になりました(以上、2021年10月1日現在)。

令和2年(2020年)3月に、国立感染症研究所から全国の地方衛生研究所に新型コロナウイルスのゲノム解析をやらうと提案があり、神戸市健康科学研究所はいち早く協力することにしました。神戸市内の医療機関に働きかけ、検体を神戸市健康科学研究所に送ってもらうようにしました。当初は検体を国立感染症研究所に送って、ゲノム解析をやらしてもらっていましたが、同年11月からは独自にゲノム解析ができる体制を組みました。

ゲノム解析を続けていると、令和3年(2021年)2月上旬にスパイクタンパクにN501Yという変異を持つ、英国で最初に見つかったアルファ株が検出されました。従来株より感染力が強いと言われており、感染拡大が懸念されました。久元市長が、神戸市民にこのことを伝える必要があると判断され、記者会見で発表されると、大変な注目を浴びました。地道な研究活動が日の目を見た形で、大変誇らしい気持ちになりました。現在の第5波は、さらに感染力が強いとされる、インドで最初に見つかったデルタ株がほとんどを占めています。それもようやく治まろうとしています。先が見えない新型コロナウイルス感染症ですが、感染対策に寄与すべく所員一丸となって頑張っております。

新型コロナウイルス以外の、感染症・食中毒対応、危機管理対応、収去検査など、神戸市健康科学研究所が取り組んできた昨年度一年間の活動も、この所報に記しています。関係部局の方々のご意見やご助言をいただけますと幸いです。

令和3年(2021年)10月
神戸市健康科学研究所
所長 飯島 義雄

目 次

はじめに

神戸市健康科学研究所長 飯島 義雄

研究所概要(令和3年度)

I 組織・職員及び予算

1 組織	1
2 職員配置表	2
3 人事異動	2
4 令和2年度歳出入(決算額)	3

業務報告(令和2年度)

I 各部業務の概要

1 事務系の概要	5
2 感染症部の概要	8
3 生活科学部の概要	15

II 業務実績

1 講演会・研修	
1) 環保研セミナー	23
2) 研修会・講習会	23
3) 市民向けセミナー等	23
4) 著書及び発表論文	23
5) 学会等発表	25
2 検査件数	26

調査研究テーマ(令和3年度)	33
----------------	----

研究報告

I 原著

1 神戸市で発生したサポウイルス食中毒(疑い)事例の詳細な遺伝子解析	花房 剛志 他	35
2 市内温泉施設における緊急事態宣言後のレジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移	小松 頌子 他	39
3 ジルコニアコート化シリカゲル/C18混合ミニカラムを用いたスパイス中の残留農薬分析法の検討	中川 光 他	43
4 通気蒸留装置-アルカリ滴定法を用いた食品中の二氧化硫黄分析精度管理について	上田 泰人 他	50
5 LC-MS/MSを用いた牛筋肉及び牛腎臓中残留動物用医薬品スクリーニング分析法の検討	吉野 共弘 他	54

II 著書及び発表論文記録(令和2年度)	61
----------------------	----

III 学会発表記録(令和2年度)	67
-------------------	----

参考

沿革	69
----	----

所報編集委員会

研 究 所 概 要 (令 和 3 年 度)

I 組織・職員及び予算

1 組織(令和3年5月1日現在)

健康局保健所健康科学研究所 所 長(再・技) 飯 島 義 雄	
事 務 部 門 担当係長(再・事) 荒 川 宏 史	<ol style="list-style-type: none">1. 所の庶務及び所内事務の連絡調整2. 手数料等の徴収3. 施設の管理4. 動物飼育等の検査及び研究に付随する業務5. 感染症の発生動向の調査(病原体の情報に関するものに限る。)6. 感染症及び食品衛生の信頼性確保業務
感 染 症 部 部 長(技) 岩 本 朋 忠 副部長(技) 濱 夏 樹 副部長(技) 森 愛 副部長(技) 野 本 竜 平	<ol style="list-style-type: none">1. 感染症、食中毒等の微生物学的試験検査及び調査研究2. 感染症の血清学的試験検査
生 活 科 学 部 部 長(技) 向 井 健 悟 副部長(技) 山 路 章 副部長(再・技) 上 田 泰 人 副部長(再・技) 八 木 正 博	<ol style="list-style-type: none">1. 食品衛生の試験検査及び調査研究2. 家庭用品等の試験検査及び調査研究3. 大気汚染、水質汚濁等の試験検査及び調査研究4. 一般環境衛生の試験検査及び調査研究

2 職員配置表(令和3年5月1日)

	事務職員	健康科学 研究職	臨床 検査技師	獣医師	総合 科学職	病院 業務員	会計年度 任用職員	計
事務部門	3[1]	1[1]				4[2]	3	11[4]
感染症部		6	1[1]	1	7			15[1]
生活科学部		2[1]			9[1]		*1	11[2]
計	3[1]	9 [2]	1[1]	1	16[1]	4[2]	3	37[7]

[]は、職員数のうち再任用職員数を示す。

病院業務員は事務部門の所属であるが、感染症部に2[1]名、生活科学部に1名を配置している。

*は、産前産後休暇職員の代替職員(集計に含めず)

3 人事異動

【昇任】

R.3.4.1 感染症部副部長(技術職員) 野本 竜平 (環境保健研究所 感染症部)

【転入】

R.3.4.20 事務部門(事務職員) 池上 敬三 (建設局 中部建設事務所)
生活科学部(技術職員) 藤永 千波 (健康局 食品衛生課)
生活科学部(技術職員) 平良 由貴 (健康局 保健所 保健課)

【新規】

R.2.9.1 感染症部(技術職員) 谷本 佳彦 (新規採用)
R.2.12.1 感染症部(技術職員) 伊藤 絵里香 (新規採用)

【退職】

R.3.3.31 事務係(再・技術職員) 貝塚 賢二 (期間満了退職)

【転出】

R.3.4.1 副所長(技術職員) 谷畑 健生 (健康局 保健所担当課長)
R.3.4.20 生活科学部(技術職員) 田中 秀俊 (健康局 地域医療課)
生活科学部(技術職員) 中川 光 (健康局 環境衛生課)
事務部門(事務職員) 土居 真紀 (文化スポーツ局 中央図書館)

4 令和2年度歳出入(決算額)

(単位:千円)

歳 出		金 額	歳 入		金 額
環境保健研究所費等		296,546	環境保健研究所費等		325,317
	報酬	0	衛生手数料		263,385
	賃金	0	雑入※		26,528
	報償費	0	国庫補助金等		35,404
	旅費	0			
	需用費	132,244			
	役務費	45,838			
	委託費	1,828			
	使用料及賃借料	34,851			
	工事請負費	10,955			
	公有財産購入費	28,940			
	備品購入費	41,780			
	負担金補助及び交付金	110			

※雑入の内、分析調査受託分

(単位:千円)

件 名	金 額	依 頼 者	備 考
有害大気汚染物質分析調査	14,659	神戸市環境局	H9年度開始
化学物質環境実態調査	2,082	神戸市環境局	H21年度開始
地下水質調査	1,861	神戸市環境局	H20年度開始
精度管理調査	2,838	神戸市環境局	H21年度開始
ゴルフ場農薬調査	4,909	神戸市環境局	H21年度開始

業 務 報 告

I 各 部 業 務 の 概 要 (令 和 2 年 度)

I 各部業務の概要

1 事務係の概要

事務係長 荒川 宏史

事務係は、所長 1 名、副所長 1 名、事務担当者 6 名(再任用・会計年度任用職員含む)、業務員 5 名(再任用含む。うち 4 名は他部に配置)の 13 名で構成され、業務は次のとおりである。

1 所の庶務及び所内事務の連絡調整

環境保健研究所内の人事・給与関係事務、予算・決算業務、物品調達ほか各種契約に伴う経理事務など、研究所全体の庶務事務及び所内事務の連絡調整を行っている。

環境保健研究所における調査研究においては、「市民に求められる研究所づくり」を目標に、感染症、食品衛生、環境衛生等それぞれの分野で調査研究テーマを決めて取り組んでいる。令和 2 年 8 月に「令和 2 年度調査研究テーマ集(第 30 集)」を発刊し、調査研究を実施した。

研究所職員並びに保健所等の保健衛生に従事する職員等の資質向上に資するため「環保研セミナー」を毎年定期的実施していたが、令和 2 年度は、新型コロナウイルスの流行のため実施できなかった。

2 手数料等の徴収

関係機関や市民等から依頼のある各種検査の受付業務を行い、神戸市環境保健研究所手数料条例及び同施行規則に基づき、検査手数料の請求及び徴収を行っている。

3 施設の管理

研究所の施設・設備の管理を担当しているが、現施設が築後 40 年を経過し老朽化が見られるため、保全改修計画に基づき、計画的に施設・設備の整備・改修・更新等を図っている。なお、耐震補強も平成 28 年 8 月に完了した。

また、病院業務員を配置し、所内各部の実験器具の滅菌・消毒・洗浄・整理、培地作製など試験検査の支援体制を整えている。

4 動物飼育等の検査及び研究に付随する業務

研究所 1 階に動物飼育室を設置しており、動物飼育等の検査及び研究に付随する事務も担当している。

5 感染症の発生動向の調査(病原体の情報に関するものに限る。)

1) 感染症の発生動向に関する情報提供

事務係では、感染症部において実施されている病原体検査(定点届出対象の五類感染症のうち 15 疾病の病原体検査および全数把握対象の可能な限り実施した病原体検査)および市内の 13 病院、1 検査機関から送られてくる病原体検出情報を取りまとめ解析し、神戸市感染症情報センターが発行する週報、月報で情報の発信を行っている。また、病原体情報は国立感染症研究所感染症情報センターにも報告している。

(注)神戸市における感染症情報は、神戸市保健所内に設置されている「神戸市感染症情報センター」が取りまとめを行っている。医師が届出対象の感染症患者を診断した場合、保健所に届けが行われる。届出を行わなければならない疾患は、一類から四類感染症の全てと五類感染症の一部であり、残りの五類感染症は定点(病院)だけが届出を行う。これらのデータを、市内の各区、年齢別に整理し、「神戸市感染症発生動向調査週報」および「月報神戸市感染症情報」として、神戸市ホームページに公開している。また、保健所内の感染症情報センターから医師会を通して医療機関に提供するとともに厚生労働省に報告している。

2) 市内医療機関等への感染症情報のフィードバック

例年、市内の感染症発生動向調査結果をまとめ、感染症患者発生状況および病原体検出状況について、定点として協力いただいている医療機関並びに神戸市新型インフルエンザ等対策病院連絡協議会医療機関等を対象に研修会(神戸市感染症発生動向調査定点研修会)を開催していたが、新型コロナウイルス感染症発生のため令和元年度、令和 2 年度と 2 年続けて中止になった。

3) 「神戸市感染症の話題」

保健所予防衛生課が発行する「神戸市感染症の話題」に疾病および病原体に関する話題を提供している。

令和 2 年

7 月 2019 年病原体検出状況(神戸市実施分)

6 情報発信

1) 所報

「神戸市環境保健研究所報第 48 巻(2020)」を令和 2 年 11 月に発刊し、本市の関係機関(保健所、神戸市関係病院、環境局等)、地方衛生研究所、地方環境研究所、大学や国の関係機関(感染症研究所、国会図書館、環境省等)に配付し、情報を発信した。

2) ホームページの作成、更新

神戸市のホームページ上で、環境保健研究所の業務を、広く市民に理解されるよう、わかりやすい情報の発信に努めている。適宜、内容を更新し、新しい情報を提供している。特に研究所で実施している新型コロナウイルスの検査情報をタイムリーに掲載するよう努めた。

また、平成 29 年度から開催されている倫理審査委員会専門部会の開催内容と承認された研究計画内容および問い合わせ先等を市民の方々に提示している。

7 食品衛生検査の信頼性確保業務

食品衛生法では、食品収去検査の信頼性を確保するために、業務管理(GLP)という制度の導入を義務付けている。環境保健研究所では、検査部門である感染症部が実施する微生物学的検査および生活科学部が実施する理化学的検査が適切に行われていることを確認するため、事務係が信頼性確保部門の業務を担当している。

LA(Laboratory Accident)が発生した際には、LA の事実関係を共有し是正改善を行うために、検査施設管理者(所長)、両部の検査部門責任者(部長)・両部の全検査区分責任者(副部長)、および信頼性確保部門の指定された職員(事務係長)・担当者(事務係)で、環境保健研究所 GLP 協議会を開催している。

1) 内部精度管理

微生物学的検査および理化学的検査について、信頼性確保部門責任者(保健所長)と協議の上、検査部門に対し年度計画を作成させ、その計画に基づき実施するよう指示し、内部点検時に検査部門の内部精度管理が適正に実施されているかについて確認した。

2) 外部精度管理

(一財)食品薬品安全センター(秦野研究所)が実施する「食品衛生外部精度管理調査」に参加した。感染症部は一般細菌数測定検査と細菌同定検査(大腸菌群、E. coli、腸内細菌科菌群、黄色ブドウ球菌、サルモネラ属菌)に参加し、良好な結果であった。さらに、生活科学部が参加実施した、食品添加物検査(着色料の定性、ソルビン酸の定量)、残留農薬検査(残留農薬の定性、クロロピリホス・アトラジン・フルトラニルの定量)、残留動物用医薬品検査(スルファジミジンの定量)については、良好な結果であった。しかしながら特定原材料検査(2 種類の検査キット使用)において、1 キットの z-スコアが限界外となり、不満足となった。値が全参加機関の傾向から明らかに外れているため、測定法の再点検と対策をとることが必要となった。検査手順等の総点検の結果、参加機関 47 機関中 38 機関が「抽出後保存なく測定」、9 機関が「1 日の保存」を行っており、抽出後の冷蔵保存が 1 日であったのが、外れの要因として考えられた。追試した結果、保存日数が 1 日 2 日と延びると、抽出当日よりも試料中濃度が上昇する傾向が確認された。是正対策として該当メーカーのプロトコルでは抽出後の保存の日数等に関して、特に記載が無いが、今後即日測定することにした。

3) 内部点検

感染症部および生活科学部に対して、内部点検実施計画に基づき、信頼性確保の基本的事項が適切に実施されているかを確認した。

実施日:令和 3 年 2 月 26 日(金)

内部点検の種類

- ・検査項目ごとに行う点検
- ・精度管理に関する点検
- ・外部精度管理調査の受け入れに関する点検
- ・その他の点検

8 病原体等の検査の信頼性確保業務

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」および「検査施設における病原体等検査の業務管理要領の策定について」に基づいて、感染症部が実施している病原体等の検査が、適切に行われていることを確認するため、事務係が信頼性確保部門の業務を担当している。

1) 内部精度管理

感染症部が実施した信頼性確保試験の結果の確認を行った。

2) 外部精度管理

厚生労働省が実施する外部精度管理事業「課題 2 インフルエンザウイルスの核酸検出検査」および「課題 3 チフス菌・パラチフス A 菌の同定検査」の両課題に参加した。両課題ともすべて判定は正解であった。

厚生労働事業「新型コロナウイルス感染症の PCR 検査等にかかる精度管理調査業務」(協力依頼)にも参加した。

3) 内部監査

内部監査実施年度計画に基づき、信頼性確保の基本的事項が適切に実施されているか確認をした。

実施日:令和 2 年 12 月 8 日(火)、9 日(水)

内部監査の種類

- ・検査項目ごとに行う点検
- ・精度管理に関する点検
- ・外部精度管理調査の受け入れに関する点検
- ・その他の点検

9 倫理審査委員会専門部会

神戸市環境保健研究所は、市民生活にとって大切な健康・安全・安心に関する試験検査や調査研究を行っている。この中には人体より採取した試料(咽頭拭い液、尿、血液等)を用いる研究も含まれており、これらの研究を進める際には、科学のおよび倫理的妥当性が求められ、かつ個人情報の保護をすることが必要となる。そのため専門性の見地から、神戸市保健事業に係る研究倫理審査委員会専門部会で倫理審査を実施している。

専門部会は神戸市保健事業に係る研究倫理審査委員会の委員長が指名する委員及び臨時委員で組織する。(神戸市保健事業に係る研究倫理審査委員会規則第 5 条第 3 項)

1) 委員数 5 名以上 20 名以内

2) 構成

- ・医学又は医療の分野において専門的知識又は経験を有する者
- ・倫理学又は法律学の分野において専門的知識又は学識経験を有する者
- ・一般の立場から意見を述べることのできる者
- ・男女両性で構成されていること
- ・委員会の設置者の所属機関に所属しない者が複数含まれていること

3) 任期 2 年

令和 2 年度は、専門部会の委員 8 名(臨時委員 1 名を含む)で実施された。迅速審査を 3 回行い、すべての研究課題が承認された。

①第 1 回迅速審査(令和 2 年 8 月 27 日)

- ・ COVID-19 抗原検出試薬の研究開発

②第 2 回迅速審査(令和 2 年 10 月 12 日)

- ・ COVID-19 抗原検出試薬の研究開発

③第 3 回迅速審査(令和 3 年 2 月 8 日)

- ・ 肺非結核性抗酸菌症の臨床診断法の開発:肺 *Mycobacterium avium complex* 症の予後を予測出来る菌側因子の探索
- ・ 行政検査で検出されたウイルスの詳細な性状解析
- ・ COVID-19 抗原検出試薬の研究開発
- ・ 神戸市内の侵襲性肺炎球菌感染症における血清型遷移と疫学的・細菌学的解析
- ・ 薬剤耐性菌のモニタリングと耐性機序の解析
- ・ 行政検査の対象となった 5 類感染症原因細菌の分子疫学解析
- ・ 急性脳炎・脳症患者検体からの次世代シーケンサーを用いた病原体探索

10 その他—健康危機管理業務

健康危機事象が発生すれば、健康危機に迅速かつ的確に対応するため、所長が必要と認めたときは、健康危機管理委員会が設置され、事務係はその庶務を行う。

1) 健康危機管理委員会の運営

令和 2 年度、研究所として「健康危機管理委員会」を設置する大規模健康危機事象は起こらなかった。

2) 健康危機管理情報の収集および模擬訓練の実施

近畿地区の 2 府 7 県 8 市の地方衛生研究所が共同主催し、合同で一斉に実施される「健康危機事象模擬訓練」に毎回参加しているが、令和 2 年度は新型コロナウイルス感染症発生のため中止となった。

また、毎週定期および臨時に「研究所健康危機管理会議」(参加メンバーは所長、各部長、副部長、事務係長を固定し、必要に応じて担当職員)を開催し、健康危機情報の収集と共有を図った。

2 感染症部の概要

部長 岩本 朋忠

I 感染症部の構成と業務

感染症部は、検査・研究業務従事者 14 名、検査補助に従事する業務員 2 名と部長の合計 17 名で、食中毒や感染症等が発生した場合の健康危機管理対応、食品・環境衛生に係る行政検査、感染症法に基づく病原体サーベイランス、神戸空港の衛生対策等の業務、及びそれらに関連する調査・研究を実施している。

1 健康危機対応

神戸市内で発生する食中毒・身体異常や感染症の原因となった細菌やウイルスの検査を実施している。さらには、検出された微生物の遺伝子解析等を実施し、因果関係の究明、科学的根拠に基づく予防対策の構築に取り組んでいる。昨年度から引き続き、令和 2 年度も新型コロナウイルスの PCR 検査を感染症部全員と生活科学部からの応援人員で実施した。新型コロナウイルスの全ゲノム解析に基づくゲノムサーベイランスにも積極的に取り組んでおり、感染対策活動につなげている。さらに、懸念される変異株や注目すべき変異株が持つスパイク部分の変異の有無を検出する PCR 検査とゲノムサーベイランスを組み合わせた変異株監視体制を構築して、変異株の予兆の把握と感染拡大対策に努めている。

2 行政検査

神戸市内で製造若しくは流通する食品の衛生状態、食品衛生法に基づく細菌に関する成分規格等の検査を実施している。また、神戸市内のプール、公衆浴場、コインランドリー等が衛生的に保たれているかを確認するため、細菌の検査を実施している。これらの検査で問題が見つかれば、食品の回収や行政指導が行われる。

3 病原体サーベイランス

感染症の蔓延防止と予防のために、厚生労働省は感染症の発生状況を調査・集計する「感染症発生動向調査事業」を実施している。その一環として、感染症法で定める「病原体サーベイランス」を実施し、その発生状況や株の特色の把握に寄与している。病原体サーベイランスの対象となる主な感染症として、麻疹、風疹、インフルエンザ、手足口病、ヘルパンギーナ、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、無菌性髄膜炎、感染性胃腸炎、結核、百日咳等がある。

4 神戸空港衛生対策

神戸空港に、国際チャーター便が就航できるようになったことに伴い、空港の衛生対策として、蚊の同定および蚊が媒介するフラビウイルス 4 種(デング、西ナイル、日本脳炎、黄熱)の検出、ネズミ族の同定および内・外部寄生虫、ペスト菌の検出を行っている。

II 令和 2 年度の検査実績

1 健康危機管理に伴う検査

1) 食中毒・身体異常等

食中毒・身体異常・感染性胃腸炎等の発生時には、患者検便・従業員検便や食材・ふきとりの検査を実施している。集団食中毒発生時には、分離したサルモネラや腸管出血性大腸菌 O157 の菌株のパルスフィールド電気泳動(PFGE)による疫学解析を実施し、さらに O157 については、集団発生時のみならず散发例についても IS-Printing や MLVA といった分子疫学的解析を行い予防対策に貢献している。

令和 2 年度は、微生物に起因する食中毒として、行政処分された事例は 3 件であった(表 1)。新型コロナウイルスの影響で社会全体が自粛傾向であったこともあり、事例数は昨年の 8 件から半減した。原因微生物は、アニサキスが 2 件、カンピロバクター・ジェジュニが 1 件であった。

これらの結果の科学的根拠となる検査として、食中毒・身体異常の患者および該当施設の従業員の検便検査を実施した。合計 33 検体の細菌検査を実施し、11 株の下痢原因菌を分離した(表 2)。カンピロバクター・ジェジュニおよび黄色ブドウ球菌が 5 件、ウェルシュ菌が 1 件検出された。

食中毒・身体異常に伴う食品および施設ふきとり検査は 60 検体実施し、セレウス菌が 4 件検出された。

同様に、4 食中毒疑い事例から、29 患者便、24 従業員便、計 53 検体の下痢症ウイルス検査を実施し(表 3)、患者便 21 検体(72%)から、ノロウイルスを検出した一方で、従業員便からは検出されなかった。また、患者便、従業員便、計 29 検体についてアデノウイルスおよびロタウイルス検査を、患者便 4 検体からサポウイルス検査を行ったが、これらのウイルスは検出されなかった。

感染症サーベイランスにおいては、腸管出血性大腸菌

感染者の接触者ならびに経過観察者の検査を実施し、2 において腸管出血性大腸菌 O157 の集団事例が発生し、
 件の陽性検体が確認された。また 10 月に児童保育施設 それに伴い 6 件の MLVA 行政検査を実施した。

表 1 令和 2 年度 神戸市食中毒発生状況(微生物に起因するもの)

事例	発生日	摂食者数	患者数	原因食品	病原因物質	原因飲食店営業形態 または原因施設
1	7 月 3 日	1	1	刺身盛り合わせ(炙りしめサバ、アジ等)	アニサキス	飲食店
2	3 月 7 日	5	5	3 月 6 日に提供された鶏刺身を含む食事	カンピロバクター・ジェジュニ	飲食店
3	3 月 19 日	1	1	サバきずし	アニサキス	飲食店

表 2 令和 2 年度 下痢症原因菌分離状況

菌種名	食中毒 身体異常	経過者*	接触者*	定点**	計
<i>Escherichia coli</i> O128	0	1	0	0	1
<i>Escherichia coli</i> O 型不明	0	1	0	0	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	5	0	0	0	5
<i>Clostridium perfringens</i>	1	0	0	0	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	0	0	5
検出菌総数	11	2	0	0	13
検査検体数	33	10	13	0	56

* 病原体サーベイランスで検出された患者の経過便、あるいは接触者便からの検出状況

**小児科定点の感染性胃腸炎検体からの検出状況

表3 令和2年度 下痢症ウイルス検査

検査項目 検体の種類			令和2年度(月)											陽性率 (%)	
			4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2		3
ノロウイルス	患者便	検体数	20		2							3	4	29	72
		陽性数	17		0							0	4	21	
	従業員・関係者便	検体数	11										13	24	0
		陽性数	0										0	0	
ロタウイルス	患者便	検体数	7		2							3	4	16	0
		陽性数	0		0								0	0	
	従業員・関係者便	検体数											13	13	0
		陽性数											0	0	
アデノウイルス	患者便	検体数	7		2							3	4	16	0
		陽性数	0		0								0	0	
	従業員・関係者便	検体数											13	13	0
		陽性数											0	0	
サポウイルス	患者便	検体数											4	4	0
		陽性数											0	0	
	従業員・関係者便	検体数													
		陽性数													
検体総数			31		2							3	17	53	
事例数			1		1							1	1		

2) 抗酸菌、QFT 検査

結核菌について、神戸市在住の新規結核患者より分離された結核菌の全てを保存する菌バンク機能を担っている。また、それらの菌株を用いて、縦列反復配列数多型解析(VNTR)という遺伝子型別解析法による分子疫学的調査を実施しており、結核菌の感染連鎖をモニタリングできる結核菌危機管理体制を整えている。さらに、クオンティフェロン(QFT)検査を実施し、結核患者の接触者検診での感染者特定に貢献している。抗酸菌の薬剤感性試験や菌種同定など通常の検査室で実施ならびに精度管理が難しい検査を実施している。

令和2年度は、遺伝子型別解析 173 検体、QFT 検査 196 検体を実施し、QFT 検査では 23 検体が陽性であった(表 4)。神戸市における両検査の検査数は年々減少傾向にある(表 5)。薬剤感受性検査は 1 検体実施した。菌種同定検査の依頼件数は 0 であった。

表4 令和2年度 抗酸菌症検査件数

	QFT 検査	遺伝子型別解析	同定	感受性検査
件数	196	173	0	1
陽性	23			

表5 平成27年度以降の結核菌検査数

	H27	H28	H29	H30	H31	R2
VNTR 検査数	269	215	220	170	189	173
QFT 検査数	381	379	333	275	256	196
QFT 検査陽性者数	65	43	36	33	25	23

2 行政検査

1) 食品収去検査

食品検査は、収去品の成分規格検査および指導検査を精度管理された標準作業書に基づき実施しており、精度管理は、内部および外部精度管理により厳しくチェックしている。

食品収去検査において、成分規格違反はアイスクリームで2検体あり、違反項目は細菌数2件、大腸菌群2件

であった。不良検体と判断された指導基準不適の食品はなかった(表6)。

生食用カキの検査においては4件を検査し、そのうち1件からノロウイルスが検出され、シーケンスタイプはGII.4であった。

小規模受水槽、特設水道等水道飲用水および飲用温泉水53件を検査した結果、すべて飲用に適していた。

表6 令和2年度 食品等の収去成績

食品分類	収去数	不良検体数	成分規格違反		規範・指導基準など違反						
			件数	項目	腸管出血性大腸菌	細菌数	大腸菌群	E.coli	黄色ブドウ球菌	カンピロバクター	サルモネラ
魚介類	7	1*									
冷凍食品	無加熱摂取冷凍食品	0									
	凍結直前に加熱された加熱後摂取冷凍食品	0									
	凍結直前未加熱の加熱後摂取冷凍食品	0									
	生食用冷凍鮮魚介類	0									
魚介類加工品	4										
肉卵類及びその加工品	7										
乳製品	5										
乳類加工品(アイスクリーム類を除き、マーガリンを含む)	0										
アイスクリーム類・氷菓	13	2	4	大腸菌群(2) 細菌数(2)							
穀類及びその加工品	0										
野菜類・果物及びその加工品	0										
菓子類	0										
清涼飲料水	0										
酒精飲料	0										
氷雪	0										
水	0										
牛乳	2										
その他の食品	0										
計	38	3	4								

缶詰、ビン詰め類を含めない ※魚介類の不良検体1件は生食用カキからノロウイルスGIIを検出した。

2) 環境検査

環境検査は、コインランドリーのふきとりの一般細菌数・大腸菌群・黄色ブドウ球菌、浴場水の大腸菌・大腸菌群の検査を実施した。令和2年度は、新型コロナウイルス感染症の流行により、プール水、消毒を要する洗濯物、理美容のふきとりの検査は実施しなかった。全体で 274 検体の検査を実施し、基準値を超える大腸菌が検出された

検体が1件、大腸菌群が検出された検体が1件であった(表7)。他に一般依頼検査として、1件の浴場水の大腸菌群検査を実施した。

また、浴槽水、冷却塔冷却水、プール水採暖槽、給湯水のレジオネラ属菌検査を実施した。139 検体中 36 検体からレジオネラ属菌を検出した(表8)。他に一般依頼検査として、40 検体のレジオネラ属菌検査を実施した。

表7 令和2年度 環境検査

分類	検体数	衛生基準または指導基準等の不適検査数				
		一般細菌数	大腸菌	大腸菌群	黄色ブドウ球菌	その他のブドウ球菌
コインランドリーのふきとり	70	0		0	0	
浴場水	204		1	1		
計	274	0	1	1	0	0

表8 令和2年度 レジオネラ属菌検査

分類	浴槽水	冷却塔冷却水	プール水採暖槽	給湯水	合計
検体数	106	10	16	7	139
レジオネラ属菌検出検体数	26	4	5	1	36
検出率(%)	24.5	40	31.3	14.3	25.9

3) HIV 確認検査

神戸市保健所が実施するHIV検査のスクリーニング検査で陽性疑いの出た検体について、感染症部が確認検査を行っている。令和2年度は5検体の確認検査を実施し、そのうち3検体がHIV-1型陽性で、1検体で判定保留があった(表9)。

表9 令和2年度 HIV 確認検査

	検査数	陰性	判定保留	陽性	陽性率(%)
確認検査	5	1	1	3	60

4) 異物・衛生害虫検査

行政から依頼される食品等に混入している異物の検査を行っているが、令和2年度においては健康局からの依頼検査はなかった。

3 病原体サーベイランス

感染症法で定めるサーベイランス対象の疾患を、細菌性のものとウイルス性のものに分けて実施している。

1) 細菌性病原体サーベイランス

1. 定点医療機関

例年、小児科定点からのA群溶血性レンサ球菌および性感染症定点からの生殖器材料の検査を実施しているが、令和2年度は新型コロナウイルス感染症の流行もあったことから検体の搬入はなかった。

2. その他の細菌感染症

侵襲性肺炎球菌感染症13例の分離菌株について、血清型を同定した。PCR法とボウカ法により、15C(2株)、24F(2株)、7C(1株)、15A(1株)、15B(1株)、21(1株)、22F(1株)、38(1株)、PCR法により、10A(1株)、15A/15F(1株)、20(1株)と同定した。

喀痰から検出された *Corynebacterium diphtheriae* 1株の毒素遺伝子検査を行った結果、毒素遺伝子は陰性であった。

細菌性髄膜炎疑いの検体が搬入され、脳脊髄液から *Streptococcus intermedius* を分離した。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症として届出された腸内細菌科細菌および関連調査検体を合わせて22株の検査を実施した。腸内細菌科細菌として、*Serratia marcescens*(9株)、*Klebsiella pneumoniae*(4株)、*Escherichia coli*(3株)、*Enterobacter cloacae*(3株)、

Klebsiella aerogenes(1株)、*Klebsiella oxytoca*(1株)、血液から分離された *Achromobacter* sp.(1株)を検査した。ディスク法によるβ-ラクタマーゼ産生のスクリーニングおよび薬剤耐性遺伝子の保有状況を調べた。その結果、クラスCβ-ラクタマーゼ産生が示唆された菌種は、*Enterobacter cloacae*(3株)、*Klebsiella aerogenes*(1株)であり、1株の *Enterobacter cloacae* から EBC 型β-ラクタマーゼが検出された。

クラス A β-ラクタマーゼのみ検出された菌種は *Escherichia coli*(2株)、*Klebsiella pneumoniae*(1株)であった。2株の *Escherichia coli* から CTX-M-1 型β-ラクタマーゼを検出し、そのうち1株からは TEM 型β-ラクタマーゼも検出した。*Klebsiella pneumoniae* からは SHV 型、CTX-M-2 型β-ラクタマーゼを検出した。

クラス B β-ラクタマーゼ産生が示唆された菌種は、*Klebsiella pneumoniae*(3株)、*Escherichia coli*(1株)、*Klebsiella oxytoca*(1株)であった。2株の *Klebsiella pneumoniae* からは IMP-1 β-ラクタマーゼと SHV 型β-ラクタマーゼを検出した。1株の *Klebsiella pneumoniae* からは IMP-6 β-ラクタマーゼと SHV 型、CTX-M-2 型β-ラクタマーゼを検出した。*Escherichia coli* からは、IMP-6 β-ラクタマーゼと TEM 型、CTX-M-2 型β-ラクタマーゼを検出した。*Klebsiella oxytoca* からは IMP-6 β-ラクタマーゼと CTX-M-2 型β-ラクタマーゼを検出した。

また、同一医療機関の入院患者3名から分離された *Serratia marcescens* 6株から GES-5 β-ラクタマーゼが検出された。環境より分離された *Serratia marcescens* 1株の検査も実施したが、GES-5 は検出されなかった。また、入院患者の1名の血液から *Achromobacter* sp.が分離され、IMP-34 β-ラクタマーゼを検出した。

レジオネラ症患者由来菌株 *Legionella pneumophila* 血清群 1 の 2 株の検査を実施した。SBT(Sequence-based typing)による遺伝子型は、ST2935(新規遺伝子型)、ST353(国内固有遺伝子型)と同定した。これらの遺伝子型は、土壌・水たまり分離株が主に属するグループに存在した。

劇症型溶血性レンサ球菌 10 株を収集した。内訳は A 群溶血性レンサ球菌 5 株、G 群溶血性レンサ球菌 5 株であった。A 群溶血性レンサ球菌の T 型別については、型別不能(4株)、T11 型(1株)であった。G 群溶血性レンサ球菌の *emm* 遺伝子型については、*stG245.0* 型(3株)、*stG6792.3* 型(1株)、*stG485.0* 型(1株)であった。*stG245.0* 型 3 株はエリスロマイシンとクリンダマイシンに耐性を示し、

薬剤耐性遺伝子として *ermB* 遺伝子を保有していた。

ダニ媒介性感染症の行政検査として 8 症例、計 15 検体の搬入があり、日本紅斑熱 8 件、ツツガムシ病 5 件、ライム病 2 件、および SFTS 1 件について検査を実施した。そのうち 5 件が日本紅斑熱陽性であった

2) ウイルスサーベイランス

ウイルスサーベイランスとして、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、風しんウイルス、麻疹ウイルスなど多種類のウイルスの検査を行っている。今年度は、23,820 検体から 3,532 件を検出した(表 10)。

1. 新型コロナウイルスサーベイランス

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)に関しては、23,760 検体から 3,530 件の SARS-CoV-2 を検出した。そのうち新規の陽性検体が 2,841 検体、陰性確認での陽性検体が 689 検体であった。COVID-19 の市内での流行動態の把握やクラスター対策の一環として、研究所に搬入された行政検査検体に加え、市内の医療機関や民間検査センターで陽性となった検体を収集し、新型コロナウイルスのゲノムサーベイランスを実施した。令和 2 年度に採取された計 2,619 検体のゲノムを解読し、市内感染拡大期の分子系統の把握や院内感染事例での感染伝播様式の検証、変異株への対応など得られた情報を適宜保健所へ還元し、公衆衛生対策として活用した。

2. 新型コロナウイルス以外のウイルスサーベイランス

新型コロナウイルス以外のウイルス感染症に関しては、検体数は 60 件と少なく、検出ウイルスはライノウイルス及びアデノウイルス 2 型の各 1 件のみであった。

エンテロウイルスは 37 検体中、無菌性髄膜炎検体(咽頭ぬぐい液)からライノウイルス 1 件を検出した。手足口病、ヘルパンギーナなどエンテロウイルスを主因とする感染症について、令和 2 年は全国的に流行が見られず、無菌性髄膜炎由来ウイルスについても令和 2 年の全国検出数は前年から約 95%減であった。

アデノウイルスについては、咽頭結膜熱検体(咽頭ぬぐい液)からアデノウイルス 2 型 1 件を検出した。全国の咽頭結膜熱検体からの検出数も前年の約 2 割に減少した。

インフルエンザウイルスは、2019/20 シーズンの 3 月に最後に分離・検出されていない。マスクや手洗い、密の回避等の新型コロナウイルス感染症対策により、インフルエンザ報告数も減少して 2020/21 シーズンは国内流行がなかったことに加え、サーベイランス検体である鼻腔拭い液の採取・回収が困難となったことが原因と考えられる。

感染性胃腸炎の検体の搬入はなかった。

新型コロナウイルス感染症の流行により、海外との往来が激減したため、輸入感染症であるデング熱、チクングニア熱、ジカ熱の検査依頼はなかった。急性脳炎症例について日本脳炎の検査依頼があったが、陰性であった。

性感染症定点からのクラミジア抗原検出の検体数は 2 件で、すべて陰性であった(表 11)。

4 神戸空港衛生対策検査

蚊の調査を 14 回(6~12 月)、ネズミ調査を 8 回(7 月および 11 月に各 4 回)行った。CDCトラップにより、アカイエカ 17 匹、コガタイエカ 6 匹、ヒトスジシマカ 4 匹の成虫が捕獲された。また、オビトラップにより、アカイエカの幼虫 2 匹が捕獲された。これら捕獲された成虫および幼虫から羽化させた成虫についてフラビウイルス 4 種(西ナイル、日本脳炎、デング、黄熱)の遺伝子検出を実施したがすべて陰性であった。

ネズミの捕獲数は 0 匹であった。

5 依頼検査

一般からの検査も受け付けており、水の検査 20 件、食品検査 48 件の検査を実施した。

III 調査・研究

地方衛生研究所には、1)公衆衛生・地域保健に関する調査および研究、2)健康危機管理対応能力の向上、3)感染症予防対策の推進等の活動や貢献が求められている。

一方、食中毒・感染症を引き起こす病原体の種類は毎年のように拡大し、それを検出・診断する方法もより高度になってきている。

このように多様化するニーズを踏まえて、令和 3 年度は、「調査研究テーマ」に記載する調査・研究に取り組む。

それぞれの研究者が切磋琢磨し、令和 2 年度分に国際的な学術雑誌などに掲載されたものは「II 著書及び発表論文記録」に、学会発表等を行ったものについては、「III 学会発表記録」に記載した。

表 10 令和 2 年度 ウイルスサーベイランス

ウイルス名	令和 2 年度(月)												合計
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
ライノ			1										1
アデノ 2 型						1							1
SARS-CoV-2 * (新型コロナウイルス)	415 (250)	154 (135)	3 (2)	94	208	67	133	305	518	812	208 (37)	613 (265)	3,530 (689)
陽性検体数	415	154	4	94	208	68	133	305	518	812	208	613	3,532
総検体数	1,525	1,220	400	1,857	2,526	1,041	1,236	1,728	3,279	4,695	1,495	2,818	23,820

*()内は陰性確認検体での陽性検体数

表 11 令和 2 年度 クラミジア抗原検出状況

クラミジア・トラコマティス	令和 2 年度(月)												合計	
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
検体数												1	1	2
陽性数														0

3 生活科学部の概要

部長 向井 健悟

生活科学部は、検査・研究業務従事者 11 名と検査補助に従事する業務員 2 名の 13 名で構成され、業務内容は食品関連検査業務と環境関連検査業務に大別される。

1 食品関連検査業務

食品関連検査業務は令和 2 年度神戸市食品衛生監視指導計画に基づく食品中の添加物、残留農薬、動物用医薬品、放射性物質、自然毒の検査、器具・容器包装の規格検査、特定原材料(アレルギー物質)を含む食品、遺伝子組換え食品等に係る検査、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づく乳幼児衣料等家庭用品の規格検査及びこれらの業務に関する調査・研究等を中心として、身体異常の原因追求や苦情等による緊急検査・調査が加わっている。

1 行政検査等

令和 2 年度の食品等の検査実施状況を表 1 に示す。収去検査及び苦情検査の実績は、検体数 177、検査項目数は延べ 6,031 であった。

1) 収去検査

(1) 添加物

添加物検査において検査を行った検体数は 26、検査項目数は延べ 166 であった。

なお、いずれも使用基準違反等はなかった。

(2) 食品の成分規格等(セシウムを除く)

「食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年 12 月 28 日厚生省告示第 370 号)」に基づき、食肉製品 7 検体、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令(昭和 26 年 12 月 27 日厚生省令第 52 号)」に基づき、乳 2 検体、乳製品 5 検体、「菓子指導要領(昭和 52 年 11 月 16 日環食第 248 号)」に基づき、油菓子 7 検体について検査を実施した。

延べ 39 の検査項目について、いずれも規格基準違反等はなかった。

(3) 残留農薬

残留農薬検査においては GC-MS/MS、LC-MS/MS による多成分一斉試験法を実施しており、平成 18 年度に施行された残留農薬等に関するポジティブリスト制度に対応

すべく、検査体制の強化を図ってきた。実施する検査項目は対象食品毎に定めており、衛生監視事務所より依頼された青果物では GC-MS/MS 及び LC-MS/MS による 251 項目の検査を実施した。また、食品衛生検査所より依頼された青果物の検査では、LC-MS/MS による 70 項目の検査を実施した。

検体数は 67、検査項目数は延べ 5,404 であった。衛生監視事務所が収去した青果物については、3 検体から 4 項目の農薬が延べ 5 項目検出され、食品衛生検査所が収去した農産物については、20 検体から 14 項目の農薬が延べ 26 項目検出された。これらのうち残留基準値を超過したものはなかった。

(4) 動物用医薬品

厚生労働省通知「畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について」により、畜水産物 3 検体について、合成抗菌剤等 45 項目の検査を実施し、いずれも検出されなかった。検査項目数は延べ 135 であった。

(5) 特定原材料(アレルギー物質)

アレルギー物質を含む食品については、健康危害の発生を防止する観点から、その表示について法的に義務化されており、検査方法が通知されている。検査を行った検体数は 21(乳 4、小麦 12、えびかに 5)、検査項目数は延べ 42 であった。ELISA 法によるスクリーニング検査の結果、いずれも陰性となり、表示違反はなかった。

(6) 遺伝子組換え食品

遺伝子組換え食品については、トウモロコシ半製品及び加工品 5 検体について検査を実施した。いずれの検体においても安全性未審査遺伝子組換え体 CBH351 及び Bt10 の混入は認められなかった。

(7) 器具・容器包装

器具・容器包装については、原材料及び材質別、さらには用途別に規格が定められている。検査を行った検体数は 34、検査項目別には材質試験が延べ 49 項目、溶出試験が延べ 163 項目、その他が延べ 10 項目で合わせて 222 項目であり、違反等はなかった。

(8) 放射性物質

平成 23 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災に伴う福島県原子力発電所の事故により、周辺地域の農畜水産物に対する放射性物質汚染が懸念され、厚生労働省は食品に対するセシウムの成分規格を制定し、各自治体で検査を実施することになった。

本市においてもガンマ線測定機器であるゲルマニウム半導体検出器を整備し、平成 24 年 1 月より検査を開始している。検査対象食品は上記周辺地域で生産・漁獲された農畜水産物等および加工品で、検査項目はセシウム(Cs-134、Cs-137)である。

令和 2 年度に検査した検体数は 1 件で内訳は表 1 のとおりセシウムは検出されなかった。

(9) 自然毒

平成 27 年 3 月 6 日食安発 0306 第 1 号により下痢性貝毒の機器分析法が導入され、オカダ酸群の規制値が定められたことから、平成 27 年度より下痢性貝毒の検査を開始した。5 検体の検査を実施し、いずれの検体からも検出されなかった。

また、平成 27 年 7 月 23 日食安発 0723 第 1 号により乳に含まれるアフラトキシン M1 の取り扱いについて通知されたことを受け、検査を実施した。牛乳 2 検体について検査を実施し、いずれからも検出されなかった。

2) 苦情食品等の検査

食の安全性に対する関心が高まるなか、市民から衛生監視事務所等に寄せられる食品に関する問い合わせ・苦情は、身体異常、食品の腐敗・変敗、異物、異味、異臭、カビの発生等多岐にわたる。当部では、衛生監視事務所等に寄せられた苦情食品に関して、必要に応じて理化学的検査を実施し、原因の究明や問題解決に有効な情報を提供している。

令和 2 年度の苦情事例数は 4、検体数は 6、検査項目数は延べ 7 であった。

表 2 に、苦情事例として検査結果を含めその概要をまとめた。

3) 一般依頼検査

令和 2 年度、神戸市の行政機関等からの一般依頼検査は、検体数で 14、検査項目数で延べ 32 であった。そのうち 6 検体はゲルマニウム半導体検出器による学校給食及び保育所等の給食の食材の検査であった。

4) 家庭用品の検査

令和 2 年度の家庭用品品目別検体数は表 3 に示すとおり、乳幼児用繊維製品 10、家庭用エアゾール 1、家庭用洗剤 2、その他(木材防腐剤)1 など計 14 であった。また、検査項目別検体数は表 4 に示すとおり、ホルムアルデヒド 10、テトラクロロエチレン 2、トリクロロエチレン 2 など計 27 であり、いずれも基準に適合していた。

2 精度管理

食品衛生に関する検査データの信頼性確保を目的として、平成 9 年 4 月、国及び地方自治体の食品衛生検査施設に導入された GLP について、各標準作業書に基づく分析機器の日常及び定期の保守点検並びに外部精度管理調査の受け入れ及び内部精度管理などを実施した。また令和 3 年 2 月、検査等の業務の管理状況について、信頼性確保部門による内部点検が行われるなど、検査の信頼性確保体制の整備を図った。実施した精度管理の内容は、以下のとおりである。

1) 外部精度管理

(一財)食品薬品安全センターが実施する外部精度管理調査のうち、食品添加物 I (着色料の定性)、食品添加物 II (ソルビン酸)、特定原材料(卵)、残留農薬 II (アトラジン、クロルピリホス、フルトラニル)、残留動物用医薬品(スルファジミジン)に参加し、実施した。結果は、食品添加物、残留農薬、残留動物用医薬品については良好であった。しかしながら、特定原材料については一部の検査結果の z-スコアが限界外となり、不満足と判定された。これは調査に参加した検査機関全体の分布の傾向と比較してずれが生じていることを意味するため、検査方法の見直し、検証を行い、改善策を講じた。原因を究明し、信頼性確保部門責任者に報告した。

2) 内部精度管理

食品添加物、農薬、動物用医薬品等 202 項目において実施した。添加量が明らかな試験品による、繰り返し回数 5 回の検査並びに 1 回の検査、及び陰性対照の試験品の検査を実施し、結果はいずれも良好であった。

3 調査・研究

地域保健対策を効果的に推進し、公衆衛生の向上・増進に寄与すべく、検査体制の整備、分析技術の向上により、健康危機管理の科学的かつ技術的中核としての機能強化を図り、健康危機管理対応能力の向上に取り組んでいる。食品等に起因する身体異常、苦情事例に迅速に

対応するため、これまでに、GC-MS による有害化学物質等の迅速分析システムの充実、LC-MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の整備等を進めてきた。更に精密質量測定による定性能力の優れた高速液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計(LC-QTOF/MS)を導入し、未知混入物質による健康被害対策にも着手している。本機により、測定対象物質を特定することが困難な場合や、標準品が入手できない場合において、混入物質の網羅的な解析が期待でき、さらに、これまでは困難であった代謝物や反応副生物の測定も可能であることから、化学物質による健康被害発生時における、原因物質の究明への活用、危機管理・対応能力向上に取り組んでいる。

これらの成果も含め、学会発表等は別項のとおりである。

II 環境関連検査業務

環境関連検査業務は、飲料水・プール水・浴場水に関する一般環境衛生検査、ゴルフ場農薬・地下水などの水質汚濁に係る検査、有害大気汚染物質や空気中アスベストなどの大気汚染に係る検査、これらの業務に関する調査研究等である。表5に水質関係業務別検査件数を、表6に大気関係業務別検査件数を示す。

1 行政検査等

1) 飲料水、浴場水等

飲用温泉水は、TOCについて3検体を分析した。簡易専用水道及び小規模受水槽については、pH、色度、濁度、Cl、TOC、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の6項目(以下「飲料水簡易セット項目」という)及び鉄、鉛、亜鉛、銅、蒸発残留物、亜硝酸性窒素の項目を50検体分析した。公衆浴場水は、201検体について一般項目の分析を実施した。結果としては、公衆浴場水の12検体でpH、色度、濁度、TOCの基準値超過があった。

2) ゴルフ場使用農薬

公共用水域(河川・湖沼)の5地点で公共用水域等における農薬の水質評価指針に定められているものも含め69項目を、また、ゴルフ場排水(排水口または調整池)23地点で46項目を、それぞれ採水して水質調査を行った。結果としては、神戸市ゴルフ場農薬指導指針の指針値を超過した検体はなかった。

3) 地下水

概況調査として、3年連続調査予定の2年目の定点9

地点で環境基準項目30項目を調査した。そのうち3地点については、要監視項目24項目も調査した。また、過去に基準値を超過したことがあるモニタリング地点(継続監視調査地点)4地点(うち1地点は概況調査地点を兼ねる)については、砒素などの基準超過項目の調査を行った。結果としては、概況調査地点では、1地点で環境基準項目(ふっ素)の基準値超過があった他、継続監視調査地点を兼ねる1地点でも環境基準項目(テトラクロロエチレン)の基準値超過があった。継続監視地点では、前年度に引き続き鉛、砒素、トリクロロエチレン、ふっ素、ほう素が基準値を超過していた。

4) 有害大気汚染物質

大気汚染防止法施行令に基づき令和2年度は市内6地点で毎月1回(24時間)の調査を行った。調査項目としては、平成23年10月15日付中央環境審議会答申において優先取組物質とされた塩化メチルとトルエン、さらには健康被害を誘発する可能性を指摘された1,2-ジクロロプロパンと大気中への排出量の比較的多いエチルベンゼン、キシレン及びトリメチルベンゼンを加えた揮発性有機化合物類(15項目)、及びアルデヒド類(2項目)、重金属類(6項目)、多環芳香族・その他(2項目)、計25項目を対象として実施した。結果としては、環境基準値及び指針値を超過した地点はなかった。

5) 空気中アスベスト

民間事業者のアスベスト除去工事に対する環境局実施の監視調査及び神戸市発注事業に対する関係部局の監視調査に対する空気中アスベスト検査を実施している。令和2年度の検体数は合計で6件であった。

6) 健康危機(環境汚染を含む)に係る検査

健康危機・環境汚染事象発生時には、迅速な対応による原因究明および専門機関としての助言的業務が求められる。これらの期待に応えるためには、平常時における準備・体制整備・情報収集・健康危機管理に対する高い意識などが不可欠である。

令和2年度は特に健康危機に係る検査依頼はなかったが、環境省通知「環水大発第2005281号、環水大土発第2005282号、令和2年5月28日」により、河川水等中の「ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)及びペルフルオロオクタン酸(PFOA)」が新たに要監視項目に追加され、「PFOS及びPFOA」の指針値(暫定)として「0.00005 mg/l以下」が提示された。そ

れを受け、環境局から共同研究の申し出があり、四半期ごとに市内河川7地点を測定した。さらに研究所では独自に12地点を追加すると共に、測定項目についてもPOPs条約で追加される見込みのPFHxSなど類縁物質を含め計17項目について測定し、神戸市での全体像を明らかにした。

7) 一般依頼検査

行政検査のほか、一般市民等からの依頼による簡易専用水道や井戸水の飲用適否検査を受け入れている。令和2年度の検体数は合計で20件であった。

2 精度管理

外部機関の実施する精度管理調査に参加し、検査データの信頼性確保に努めた。また、環境省から「環境測定を外部に委託する場合における精度管理に関するマニュアル H22年7月」が示されており、これに基づき環境測定委託先機関の信頼性確保業務を環境局と共同実施した。

令和2年度の外部精度管理への参加状況は以下のとおりである。

1) 兵庫県水道水質検査外部精度管理(兵庫県水道水質管理連絡協議会)

参加項目 鉛(試料形態:模擬水質)

2) 厚生労働省・水道水質検査の精度管理調査

参加項目 六価クロム、フェノール類(試料形態:模擬水質)

3) 環境省・環境測定分析統一精度管理

参加項目 COD(試料形態:模擬水質)

3 調査・研究

1) 化学物質エコ調査(環境省からの依頼)

この調査は、平成5年度より環境局と共同で実施している。令和2年度は初期環境調査、分析法開発について実施した。

(1) 初期環境調査

海水中のアンピシリンについて分析し、その結果をまとめ、環境省へ報告した。

(2) 分析法開発

LC-MSを用いて、水質試料中の2-ベンジリデンオクタールの分析法を開発し環境省へ報告した。

2) II型共同研究(国と複数の自治体との共同研究)

(1) 「災害時等の緊急調査を想定したGC/MSによる化学物質の網羅的簡易迅速測定法の開発」への参加

事故・災害時において初動時スクリーニングに有効なGC/MSによる全自動同定定量システム(AIQS)の構築を目的として国立環境研究所及び他の地方環境研究所等と共同研究を実施している。AIQSは分析装置の状態を一定に揃えることにより、登録された対象物質であれば、標準品を用いることなく、物質の同定と相対定量が可能なシステムであり、災害時等における網羅分析において非常に有用である。これまでに新たに147物質が登録され、令和2年度は当所における健康危機管理体制の構築を目指し、環境試料を用いてAIQSによる定性・定量分析を検討した。

(2) 「LC-MS/MSによる分析を通じた生活由来物質のリスク解明に関する研究」への参加

化学物質による環境汚染実態解明の研究において、LC-MS/MSやLC-QTOF/MSを用いた網羅分析の技術を駆使して環境中に存在する汚染物質を同定する報告事例が増えてきている。同定された化学物質の多くは、医薬品を始めとする生活由来物質が占めており、そのうち、医薬品は微量でも生態に影響を及ぼす可能性を否定できない。本研究では、これらの生活由来物質を対象に汚染実態とそのリスク評価を進め、LC-QTOF/MSを使用した化学物質漏洩事故等の非常時における対応力強化を図る。令和2年度は、選定した化学物質群17項目について、共有した分析法で夏期における河川等公共用水域での実態調査を実施した。

表1 令和2年度 食品等検査件数

項目 食品群	検 体 数	食 品 添 加 物											残 留 農 薬			動 物 用 医 薬 品	放 射 性 物 質	自 然 毒 素	食 品 成 分						組 換 え 遺 伝 子	特 定 食 品 了 レ ル ギ 関 係 材 料	器 具 ・ 容 器 包 装			合 計																					
		食 品			添 加 物				小 計				G C / M S 測 定 農 薬	L C / M S 測 定 農 薬	加 工 食 品 等 の 有 機 リ ン 系 農 薬				小 計	食 品 成 分	酸 価 ・ 過 酸 化 物 価	重 金 属	毒 性 試 験	シ ン 了 シ ン			規 格 試 験	そ の 他	小 計		そ の 他																				
		保 存 料	着 色 料	甘 味 料	質 保 持 剤	漂 白 剤	発 色 剤	酸 化 防 止 剤	防 か び 剤	そ の 他	指 定 外 添 加 物	再 掲																				小 計	pH	重 金 属	毒 性 試 験	シ ン 了 シ ン	規 格 試 験	そ の 他	小 計	材 質 試 験	溶 質 試 験	そ の 他									
魚 介 類	13		12	2															14				135			5								8									162								
魚 介 類 加 工 品																																																			
魚 肉 練 り 製 品	3	4	2			2													8																											10					
肉 卵 類 及 び そ の 加 工 品	7	5	3			5													13																											17					
乳 類	2																																														10				
乳 製 品 等	10	15																	15																											25					
穀 類 及 び そ の 加 工 品	4	4	1	1															6																											81					
麺 類																																																			
野 菜 果 実 類 及 び そ の 加 工 品	72																		8																													5,356			
漬 物 類	4	11	24	9	3	4					1								52																											52					
弁 当 ・ 惣 菜	4																																															8			
冷 凍 食 品	2	1					1																																								4				
菓 子 類	9																																																18		
清 涼 飲 料																																																			
酒 精 飲 料																																																			
そ の 他 食 品	9	15	24	3	1	2	1				2								48																															59	
食 品 添 加 物 及 び そ の 製 剤																																																			
器 具 ・ 容 器 包 装	34																																																		222
そ の 他	4																																																		5
合 計	177	55	60	20	5	6	7	5	8				166	716	4,688		5,404	135	1	9																											6,031				

(取去検査及び苦情食品等の検査の合計)

表2 令和2年度 苦情品等検査結果

No.	受付日	事件名	発症内容 (時間)	苦情品等	理化学検査 検査項目	理化学検査 結果	感染症部検査結果	備考
1	R2.4.21	餃子の木片様異物	-	異物	赤外線吸収スペクトル	セルロースと類似したスペクトルを確認 異物と類似したスペクトルを確認	-	「量販店で購入したチルド餃子を喫食したところ、口の中から1cmほどの木片様異物が出てきたため、原因を調査して欲しい。」との依頼が寄せられた。製造所を管轄する保健所による調査の結果、当該異物は木片であると推察されたが、製造所内にも木製のものは見当たらず、同僚苦情も無かったことから、混入した原因の特定には至らなかった。
				対照品：竹製の割箸				
2	R2.9.15	ドリアの黒色異物	-	異物	赤外線吸収スペクトル	サラダ油と類似したスペクトルを確認	-	「飲食店のテイクアウトで購入したドリアを喫食していたところ、口中に違和感があり確認すると5～6mmのプラスチック様黒色異物が見つかり、残品にも同様異物が2片混入していた。」との届出があった。当該施設本社検査室では過去の事例から、外観等により「ジェットオープン」の上部に形成される油分が氷柱状に固まったもの」との調査結果であった。IR・蛍光X線の分析結果とも矛盾しないことから、ジェットオープンから当該異物が落下し混入したものと推察された。
					元素含有率(蛍光X線分析)	K:0.047%、P:0.011%、S:0.010%、Cu:0.001%、測定対象外元素:99.931%		
3	R2.11.24	フグ食中毒の疑い	口唇、手足のしびれ(喫食後5時間程度)	糞尿	テトロドトキシン	検出せず	-	「飲食店で提供されたフグを喫食後、口唇及び手足のしびれを呈した患者を診察した。」との届出があった。患者が利用した飲食店を調査した結果、有毒部位の提供は確認できず、また、同僚苦情もなく、原因の特定には至らなかった。
				血清		検出せず		
4	R3.2.2	巻寿司の石様異物	-	異物	元素含有率(蛍光X線分析)	(薄茶色の部分) K:51.937%、Ca:27.702%、S:8.527%、P:8.126% (円錐の底面が最も濃い茶色の部分) K:43.242%、Ca:31.004%、P:10.645%、S:10.363%	-	「量販店で購入した巻寿司(アボカドを含む)を喫食していたところ、口腔内に違和感を感じ、出したところ、石様異物が出てきた。」との届出があった。業者の自主検査結果では、赤外線吸収スペクトルでセルロース成分を検出し、外観や硬さから植物片と推察、アボカドのヘタの乾燥した一部の可能性があるが特定できないとの結果であった。

表3 令和2年度 家庭用品品目別検体数

	検査品目	検体数
乳 幼 児 用 織 維 製 品	おしめ	0
	おしめカバー	1
	よだれ掛け	1
	下着	1
	寝衣	1
	くつ下	1
	中衣	0
	外衣	4
	帽子	0
	手袋	1
	乳幼児用以外の寝衣	0
	家庭用エアゾール	1
	家庭用洗剤	2
	その他	1
	合計	14

表4 令和2年度 家庭用品検査項目別検体数

検査項目	検体数
ホルムアルデヒド	10
メタノール	1
塩化ビニルモノマー	1
テトラクロロエチレン	2
トリクロロエチレン	2
漏水試験	2
落下試験	2
圧縮変形試験	1
耐酸性試験	1
酸の量	1
耐アルカリ性試験	1
アルカリの量	0
その他	3
合計	27

表5 令和2年度 水質関係業務別検査件数

業務名	主な検査項目	検査件数
専用・特設水道給水栓水、 飲用温泉水など	水道法に基づく化学試験全項目 49 項目	3
井戸水、簡易専用水道、小規模受水 槽など	飲料水簡易セット項目(pH、色度、濁度、Cl、TOC、 NO ₂ +NO ₃ の6項目)、Fe、Pb、Zn、Cu、蒸発残留物など	350
プール水	pH、濁度、過マンガン酸カリウム消費量、トリハロメタン	0
浴場水 浴槽水	濁度、過マンガン酸カリウム消費量、TOC	136
上がり用水、上がり用湯	pH、色度、濁度、TOC	528
ゴルフ場使用農薬調査	イマダクロプロリド、アゾキシストロンビン、アシユラムなど 69 種 類の農薬	1,472
地下水調査	環境基準項目(30)、要監視項目(24)など	378
緊急性を要する検査、追跡調査、排水 基準を超える工場排水など	COD、T-N、導電率、水道法に基づく化学試験全項目 49 項 目、砒素など	0
一般依頼検査(井戸水、簡易水道、河 川水、池水、海水など)	飲料水簡易セット項目、水道法に基づく全項目、環境基準 項目など	20
環境測定を外部機関に委託する場合 の信頼性確保事業	COD、T-N、TOC、砒素、フッ素、ホウ素など	426
合 計		3,313

表6 令和2年度 大気関係業務別検査件数

業務名	検査件数
有害大気汚染物質測定	
揮発性有機化合物類	1,440
アルデヒド類	148
重金属	360
水銀	71
酸化エチレン	74
ベンゾ[a]ピレン	72
アスベスト検査	6
合 計	2,171

Ⅱ 業務実績（令和2年度）

II 業務実績

1 講演会・研修

1) 環境研セミナー

新型コロナウイルス感染症発生のため実施せず

2) 研修会・講習会

研修・講習名	実施日	場所	内容	担当
令和2年度 第1回 臨時 神戸市新型インフルエンザ 等対策病院連絡会	R2.6.25	神戸	SARS-CoV-2 ウイルスのゲノム解析か らみる感染状況および対策について	岩本 朋忠
SARS-CoV-2 ゲノム解析に 関する技術研修	R2.12.8	加古川	兵庫県立健康科学研究所へ SARS-CoV-2 のゲノム解析技術について 講習会を実施した	野本 竜平
第19回 OPEN INNOVATION cafe	R2.12.10	神戸	COVID-19 検査における役割と病原体サ ーベイランス活動について	岩本 朋忠
II型共同研究「LC-MS/MS による分析を通じた生活由 来物質のリスク解明に関す る研究」令和2年度推進會 議	R3.2.5	Web	LC-QTOF/MS を用いた神戸市の取り組 み	吉野 共広
令和2年度 第2回 臨時 神戸市新型インフルエンザ 等対策病院連絡会	R3.3.18	神戸	神戸市内の SARS-CoV-2 ゲノムサーベイ ランスと変異株への対応について	野本 竜平

3) 市民向けセミナー等

新型コロナウイルス感染症発生のため実施せず

4) 著書及び発表論文

表題	著者名 (当所職員はアンダーライン)	誌名
Two new cases of pulmonary infec- tion by <i>Mycobacterium shigaense</i> , Japan	Shiomi Yoshida, <u>Tomotada Iwamoto</u> , Takehiko Kobayashi, <u>Ryohei Nom- oto</u> , Yoshikazu Inoue, Kazunari Tsu- yuguchi, and Katsuhiko Suzuki	Emerg Infect Dis 26:2728-2732, 2020

Bacterial population kinetics in heteroresistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> harbouring rare resistance-conferring mutations in <i>gyrA</i> and <i>rpoB</i> imply an epistatic interaction of mutations in a pre-XDR-TB patient	Shiomi Yoshida, <u>Tomotada Iwamoto</u> , <u>Kentaro Arikawa</u> , Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Yoshikazu Inoue, Satoshi Mitarai, Taisuke Tsuji, Kazunari Tsuyuguchi, and Katsuhiko Suzuki	J Antimicrob Chemother 75:1722-1725, 2020
Higher genome mutation rates of Beijing lineage of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> during human infection	Mariko Hakamata, Hatayo Takihata, <u>Tomotada Iwamoto</u> , Aki Tamaru, Atsushi Hashimoto, Takahiro Tanaka, Shaban A Kaboso, Gebremichal Gebretsadik, Aleksandr Ilinov, Akira Yokoyama, Yuriko Ozaki, Akihito Nishiyama, Yoshitaka Tateishi, Hiroshi Moro, Toshiaki Kikuchi, Shujiro Okuda, and Sohkichi Matsumoto	Sci Rep 10:17997, 2020
The Novel Coronavirus Pandemic and the State of the Epidemic in Kobe, Japan	<u>Noriko Nakanishi</u> , <u>Yoshio Iijima</u>	J Disaster Res 16:84-87. 2021
A Genome Epidemiological Study of SARS-CoV-2 Introduction into Japan	Tsuyoshi Sekizuka, (略:12名), <u>Ryohi Nomoto</u> , (略:11名)	<i>mSphere</i> . 2020 Nov;5(6) . doi:10.1128/msphere.00786-20.
Agglutination of Human Polyomaviruses by Using a Tetravalent Glycocluster as a Cross-Linker	Makoto Ogata, Takashi Onoda, Ami Koizumi, Yuhei Tokunaga, Isao Ohta, <u>Souichi Nukuzuma</u> , Enoch Y. Park, Taichi Usui, and Tetsuro Suzuki	ACS Omega 5:21940-21947, 2020
Characterization of JC polyomavirus derived from COS-IMRbcells	<u>Souichi Nukuzuma</u> , Chiyoko Nukuzuma, Masanori Kameoka, Shigeki Sugiura, Kazuo Nakamichi, Takafumi Tasaki, Koushi Hidaka and Tsutomu Takegami	Jpn J Infect Dis 74:48-53, 2021
Human iPS cell-derived astrocytes support efficient replication of progressive multifocal leukoencephalopathy-type JC polyomavirus	Emiko Shinbo, <u>Souichi Nukuzuma</u> , Yoh-ichi Tagawa	Biochem Biophys Res Comm 533:983-987, 2020
3層固相ミニカラムを用いた GC-MS/MS による農産物中残留農薬分析法の検討	<u>大久保祥嗣</u> 、 <u>向井健悟</u>	食品衛生学雑誌 61: 239-246、2020
セルフクリーニングイオン源搭載 GC-MS/MS による農産物中残留農薬分析の検証	<u>大久保祥嗣</u> 、 <u>八木正博</u>	食品衛生学雑誌 62: 14-19、2021

5) 学会等発表

(下線は当所職員)

演題名	発表者名	学会名	開催時期場所
Pre-XDR および XDR 結核菌で出現頻度が高まる <i>gyrA</i> 変異と <i>rpoB</i> 変異についての考察	岩本朋忠、吉田志緒美、村瀬良朗、 <u>有川健太郎</u> 、御手洗聡	第 95 回日本結核・非結核性抗酸菌症学総会・学術集会	2020 年 10 月 11-12 日、web・誌上開催
アジスロマイシン耐性淋菌の薬剤耐性機序の解析	三浦真希子、大澤佳代、 <u>中西典子</u> 、吉田弘之、澤村暢、重村克巳、宮良高維、荒川創一、藤澤正人	日本性感染症学会 第 33 回学術大会	2020 年 12 月 5-6 日、web 開催 (東京)
全ゲノム解析を活用した神戸市内分子疫学調査	<u>有川健太郎</u> 、藤山理世、村瀬良朗、御手洗聡、 <u>岩本朋忠</u>	第 95 回日本結核・非結核性抗酸菌症学総会・学術集会	2020 年 10 月 11-12 日、web・誌上開催
有馬温泉施設における緊急事態宣言後のレジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移	<u>小松頌子</u> 、 <u>中西典子</u> 、 <u>岩本朋忠</u>	第 18 回神戸市生活衛生研究発表会	誌面発表
神戸市で発生したサポウイルス食中毒(疑い)事例の詳細な遺伝子解析	<u>花房剛志</u> 、 <u>有川健太郎</u> 、 <u>森愛</u> 、 <u>岩本朋忠</u>	第 18 回神戸市生活衛生研究発表会	誌面発表
LC-MS/MS による畜産物中の抗生物質一斉分析法の検討	<u>吉野共広</u> 、 <u>山路章</u> 、 <u>八木正博</u> 、 <u>向井健悟</u>	第 57 回全国衛生化学技術協議会年会	2020 年 11 月 9-10 日、紙上・web 開催 (宮崎)
LC-QTOF/MS を用いた河川水中の化学物質のスクリーニング法	<u>吉野共広</u> 、 <u>八木正博</u> 、 <u>向井健悟</u>	第 47 回環境保全・公害防止研究発表会	2020 年 11 月 19 日、書面開催 (川崎)
安全性未審査の遺伝子組換えサケにおける検査法について	<u>日置優伽</u> 、 <u>岸本由里子</u> 、 <u>佐藤徳子</u> 、 <u>山路章</u> 、 <u>向井健悟</u>	第 57 回全国衛生化学技術協議会年会	2020 年 11 月 9-10 日、紙上・web 開催 (宮崎)
安全性未審査の遺伝子組換えコマにおける検査法について	<u>岸本由里子</u> 、 <u>日置優伽</u> 、 <u>上田泰人</u> 、 <u>向井健悟</u>	第 18 回神戸市生活衛生研究発表会	誌面発表
ジルコニアコート化シルカゲル/C18 混合ミニカラムを用いたスパイス中の残留農薬分析法の検討	<u>中川光</u> 、 <u>山路章</u> 、 <u>向井健悟</u>	第 18 回神戸市生活衛生研究発表会	誌面発表

2 検査件数

令和2年度

部別依頼者別検査年報

感染症部

(4月から3月までの集計)

部別	検査項目	健康局		環境局		その他の市関係		市立病院		その他		合計	
		件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
感 染 症 部	細菌鏡検	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	細菌培養同定(咽)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	細菌サーベイランス	55	550,000	0	0	0	0	0	0	0	0	55	550,000
	遺伝子解析(PFGE法)	19	380,000	0	0	0	0	0	0	0	0	19	380,000
	レジオネラ	134	509,200	0	0	0	0	0	0	40	152,000	174	661,200
	結核菌群抗原精密測定	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	細菌培養同定(便)	24	89,760	0	0	0	0	0	0	0	0	24	89,760
	細菌培養同定(血)	1	2,150	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,150
	細菌培養同定(膿)	1	1,600	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,600
	細菌培養同定(生)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	嫌気性培養	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	簡易培養	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	薬剤感受性1	26	44,200	0	0	0	0	0	0	0	0	26	44,200
	薬剤感受性2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	薬剤感受性3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QFT検査	208	1,272,960	0	0	0	0	0	0	0	0	208	1,272,960	
髄液抗原検出	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
STD細菌	1	4,300	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4,300	
下痢症検便	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
抗酸菌顕微鏡検査	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
抗酸菌分離培養検査1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
抗酸菌同定ナイアシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
抗酸菌同定(生化学)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
結核菌同定(AccuMTB)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MAC同定(AccuMAC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
抗酸菌核酸同定(DDH)	194	795,400	0	0	0	0	0	0	0	0	194	795,400	
結核菌直接PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MAC直接PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
結核菌RNA増幅(MTD)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
食品腸管出血性大腸菌o157・o26・o111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
抗酸菌薬剤感受性4剤	1	3,800	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3,800	
サルモネラ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ペロ毒素	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
赤痢等培養	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
細菌同定	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
水質細菌	15	48,000	0	0	0	0	0	0	0	64,000	35	112,000	

部別	検査項目	健康局		環境局		その他の市関係		市立病院		その他		合計	
		件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
生 活 科 学 部 (食 品 化 学)	食品簡易	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品比較的複雑	339	2,034,000	0	0	0	0	0	0	0	0	339	2,034,000
	食品複雑	29	290,000	0	0	0	0	0	0	0	0	29	290,000
	食品特殊	34	680,000	0	0	6	120,000	0	0	0	0	40	800,000
	牛乳規格	2	12,000	0	0	6	36,000	0	0	0	0	8	48,000
	質量分析等	0	0	0	0	2	40,000	0	0	0	0	2	40,000
	アレルギ- (定性試験)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	アレルギ- (各定量試験)	42	840,000	0	0	0	0	0	0	0	0	42	840,000
	アレルギ- (各確認試験)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	遺伝子組換え (DNA抽出)	5	75,000	0	0	0	0	0	0	0	0	5	75,000
	遺伝子組換え (定性試験)	10	100,000	0	0	0	0	0	0	0	0	10	100,000
	遺伝子組換え (各定量試験)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品化学成績書	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品化学成績書特殊	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品化学写真カラー	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品化学写真カラー追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品化学写真モノクロ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品化学写真モノクロ追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	食品化学写真モノクロ追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	農薬等一斉分析1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
農薬等一斉分析2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
農薬等一斉分析3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
真菌鏡検	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
真菌培養同定(咽)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
真菌培養同定(便)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
真菌培養同定(血)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
真菌培養同定(膿)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
真菌培養同定(生)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
食品真菌鏡検	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
食品真菌数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
食品真菌培養	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
食品真菌同定	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
食品真菌同定	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
食品化学合計		461	4,031,000	0	0	14	196,000	0	0	0	0	475	4,227,000
前年度合計		1,115	9,616,000	0	0	15	216,000	0	0	0	0	1,130	9,832,000
前年度比(%)		41.3	41.9	-	-	93.3	90.7	-	-	-	-	42.0	43.0

部別	検査項目	健康局		環境局		その他の市関係		市立病院		その他		合計	
		件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
生 活 科 学 部 (環 境 化 学)	簡易水質(飲適)	50	200,000	0	0	0	0	0	0	20	80,000	70	280,000
	水質簡易	450	675,000	0	0	0	0	0	0	0	0	450	675,000
	水質複雑	486	1,117,800	0	0	0	0	0	0	7	16,100	493	1,133,900
	水質有機物(PCB等)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	トリハロメタン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	水質特殊	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	水質特殊追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	排水簡易	0	0	5	7,500	0	0	0	0	0	0	5	7,500
	排水複雑	0	0	9	40,500	0	0	0	0	0	0	9	40,500
	排水特殊	0	0	1	20,000	0	0	0	0	0	0	1	20,000
	排水特殊追加	0	0	1	3,000	0	0	0	0	0	0	1	3,000
	ガス検知管	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ガス簡易	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ガス比較的複雑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ガス複雑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ガス複雑追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ガス特殊	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ガス特殊追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	粒子状降下煤塵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	粒子状浮遊粉塵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
粒子状粒度分布	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
粒子状粉塵水溶性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
粒子状粉塵金属	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
粒子状粉塵特殊(アスベスト)	0	0	8	160,000	0	0	0	0	0	0	8	160,000	
粒子状粉塵特殊追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
燃料硫黄分	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
燃料灰分	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
水質底質簡易	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
水質底質複雑	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
水質底質農薬	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
水質底質農薬追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ガス揮発性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ガス揮発性追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
環境化学成績書	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
環境化学写真カラー	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
環境化学写真カラー追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
環境化学写真モノクロ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

環境化学写真モノクロ追加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
環境化学写真ボラロ不	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
酸性雨水溶性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
排水特殊PCB等	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
酸性雨簡易	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
環境化学合計	986	1,992,800	24	231,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	96,100	1,037	2,319,900	
前年度合計	2,578	8,885,200	69	1,085,500	13	62,000	0	0	0	0	0	0	0	0	39	139,000	2,699	10,171,700	
前年度比 (%)	38.2	22.4	34.8	21.3	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	69.2	69.1	38.4	22.8	

総括

令和2年度

	部	健康局		環境局		その他の市関係		市立病院		その他		合計	
		件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
令和2年度合計	感染症部	26,457	256,080,970	0	0	44	55,000	0	0	204	702,500	26,705	256,838,470
	生活科学部(食品化学)	461	4,031,000	0	0	14	196,000	0	0	0	0	475	4,227,000
	生活科学部(環境化学)	986	1,992,800	24	231,000	0	0	0	0	27	96,100	1,037	2,319,900
	総合計	27,904	262,104,770	24	231,000	58	251,000	0	0	231	798,600	28,217	263,385,370
前年度合計	感染症部	6,093	39,045,250	0	0	62	115,400	0	0	316	799,900	6,471	39,960,550
	生活科学部(食品化学)	1,004	8,764,000	0	0	12	156,000	0	0	0	0	1,016	8,920,000
	生活科学部(環境化学)	2,600	8,808,700	85	1,168,500	0	0	0	0	20	76,600	2,705	10,053,800
	総合計	9,697	56,617,950	85	1,168,500	74	271,400	0	0	336	876,500	10,192	58,934,350
前年度比 (%)	感染症部	434.2	655.9	-	-	71.0	47.7	-	-	64.6	87.8	412.7	642.7
	生活科学部(食品化学)	45.9	46.0	-	-	116.7	125.6	-	-	-	-	46.8	47.4
	生活科学部(環境化学)	37.9	22.6	28.2	19.8	-	-	-	-	135.0	125.5	38.3	23.1
	総合計	287.8	462.9	28.2	19.8	78.4	92.5	-	-	68.8	91.1	276.9	446.9

【 参 考 】

手数料条例によらない(事業に伴う)検査件数

感染症部

年 度	H27	H28	H29	H30	H31	R2
結核菌QFT検査	381	379	333	275	256	196
結核菌遺伝子型別解析	269	215	220	170	189	173
HIV確認検査	13	20	14	7	10	5
感染症部合計	663	614	567	452	455	374

生活科学部

(環境関連)

年 度	H27	H28	H29	H30	H31	R2
ゴルフ場使用農薬	1,772	1,804	1,842	1,886	1,840	1,472 ※1
地下水調査	314	402	388	376	378	378
環境測定を外部機関に委託する場合の信頼性確保事業	364	437	439	435	403	426 ※2
有害大気汚染物質	2,160	2,213	2,340	2,160	2,160	2,171 ※3
小 計	4,610	4,856	5,009	4,857	4,781	4,447

(食品関連)

年 度	H27	H28	H29	H30	H31	R2
残留農薬	25,565	27,263	22,105	22,360	19,482	5,404 ※4
動物用医薬品	1,440	1,665	1,215	1,260	855	135 ※5
小 計	27,005	28,928	23,320	23,620	20,337	5,539

生活科学部合計	31,615	33,784	28,329	28,477	25,118	9,986
---------	--------	--------	--------	--------	--------	-------

総 合 計	32,278	34,398	28,896	28,929	25,573	10,360
-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

※1 1検体当たり、45～60項目を検査

※2 1検体当たり、1～54項目を検査

※3 1検体当たり、9～25項目を検査

※4 1検体当たり、30～255項目を検査

※5 1検体当たり、3～35項目を検査

調査研究テーマ（令和3年度）

令和3年度 調査研究テーマ集

(感染症対策分野)

(代表研究者)

- ・神戸市内の流入下水における新型コロナウイルス等の検出による流行検知 谷本 佳彦 他
- ・非病原性を疑う大腸菌における病原因子遺伝子保有状況調査 濱 夏樹 他
- ・原因不明の感染性胃腸炎疑い検体における起因ウイルスの探索 花房 剛志 他
- ・次世代シーケンサーを活用した結核ゲノム疫学への展開に向けた研究 岩本 朋忠 他
- ・鳥型結核菌 (*Mycobacterium avium*) のゲノム多様性に関する研究 岩本 朋忠 他
- ・肺炎球菌の分子疫学解析と薬剤耐性機序に関する研究 小松 頌子 他
- ・薬剤耐性菌のモニタリングと耐性機序の解析 中西 典子 他
- ・急性脳炎・脳症患者検体からの次世代シーケンサーを用いた病原体探索 宮本 園子 他
- ・神戸市で流行するSARS-CoV-2のゲノム解析 野本 竜平 他
- ・環境及びヒト由来*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* の詳細な遺伝子解析 有川 健太郎 他
- ・同一遺伝系統結核菌株の全ゲノム解析によるクラスター形成 有川 健太郎 他
- ・病原体サーベイランスで検出されるウイルスの詳細な遺伝子解析 森 愛 他
- ・新型コロナウイルスのワクチン接種によって獲得された抗体の継時的変化・ウイルス中和効果に関する研究 谷本 佳彦 他

(食品衛生分野)

- ・神戸市に流通する鶏肉から得られた食中毒菌の薬剤耐性状況調査 岡本 桂子 他
- ・神戸市に流通する鶏肉から得られた食中毒菌の薬剤耐性状況調査2 濱 夏樹
- ・特定原材料検査の検討 大西 優伽 他
- ・安全性未審査及び審査済み遺伝子組換え食品の検査法の検討 岸本 由里子 他
- ・Multiplex PCR法による病原大腸菌の検討 米澤 武志 他

・カンピロバクター属細菌の定量試験法の検討	野本 竜平	他
・農作物の残留農薬多成分一斉分析法の検討	平良 由貴	他
・GC/MS用AIQS-DB及びLC-QTOF/MSを用いた健康危機管理体制の構築	山路 章	他
・LC-MS分析の前処理法としての分子鋳型ポリマー固相カートリッジ精製の基礎的検討	山路 章	他
・食品添加物の妥当性評価試験について	上田 泰人	他
・健康危機管理(異物)の試験について	上田 泰人	他

(環境衛生分野)

・人工環境水中のレジオネラ属菌の遺伝子型別解析とモノクロラミン等の消毒効果の検証	小松 頌子	他
・レジオネラ属菌における菌株間の相互作用と定着性、病原性についての解析	中西 典子	他

(環境保全分野)

・地下水調査及びこれに関連する物質動態解析	藤永 千波	他
・神戸の水環境をさらに改善するために	向井 健悟	他
・化学物質環境実態調査及び下水中の化学物質実態把握	吉野 共広	他
・神戸市域内の有害大気汚染物質の実態調査及び動態解析	福田 彩香	他
・神戸市の環境水中に残留が懸念される化学物質の実態解明及び超極性物質の網羅分析法の開発	八木 正博	他

研究報告

I 原著

神戸市で発生したサポウイルス食中毒(疑い)事例の詳細な遺伝子解析

花房剛志、有川健太郎、谷本佳彦、森愛、岩本朋忠

神戸市健康科学研究所 感染症部

1 はじめに

サポウイルスはノロウイルスと同様にカリシウイルス科に属し、全長約 7,500 塩基からなる RNA ウイルスである。そのカプシドの構造タンパク質である VP1 領域の塩基配列から Genogroup I (GI)~Genogroup V (GV) の 5 つの主要な遺伝子群に分類され、このうち GI、GII、GIV および GV はヒトに感染することが知られている。さらに、GI は 7 種類 (GI.1-7)、GII は 8 種類 (GII.1-8)、GV は 2 種類 (GV.1-2) の遺伝子型に分類される¹⁾。また、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼをコードする RdRp 領域が、サポウイルスの遺伝的多様性の評価に用いられている²⁾。

サポウイルスは、ヒトでは小腸粘膜で増殖し、嘔吐、下痢、発熱といった症状を呈する³⁾。従来は乳幼児の感染症と考えられていたが、近年は成人における大規模な食中毒事例も報告されている。2013 年度以降、神戸市ではサポウイルス食中毒(疑い)事例が 3 件発生し、うち 2 件は 2019 年度に同一施設から発生している(表 1)。

当所では、サポウイルス検査にリアルタイム PCR 法を用いている。この方法では、陽性または陰性を迅速に判定できるが、遺伝子型別判定やウイルスの相同性を解析することができない。遺伝子型別判定や相同性を解析することで、サポウイルス食中毒(疑い)事例について、より詳細な原因の解明や今後の再発防止につながる可能性がある。本研究では、サポウイルスの遺伝子型別判定法の導入を試み、公衆衛生の向上に寄与する知見が得られたので報告する。

2 方法

2.1 対象検体

表 1 に示した食中毒(疑い) 3 事例と他都市依頼 2 検体を含む 66 検体のうち、リアルタイム PCR で陽性であった 34 検体を対象とした。

表 1. 対象検体の内訳

検体内訳	発生年月	陽性検体数	利用者	従業員	備考
事例A	2014.2	19 (24)	14 (15)	5 (9)	飲食店での宴会
他都市依頼	2014.3	1 (2)	1 (2)	0 (0)	不明
事例B	2019.11	11 (25)	8 (11)	3 (14)	ホテルでの宴会
事例C	2020.2	3 (15)	3 (3)	0 (12)	事例Bと同一施設

()は陰性も含めた検体数

2.2 ウイルス RNA 抽出と cDNA 作製

便試料を PBS に懸濁させて 10% 乳剤を作製し、遠心後の上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit(キアゲン)を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa)を用いて逆転写し、cDNA を作製した。

2.3 VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR

作製した cDNA について、VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR を行った。プライマーには SV-F11 および SV-R1⁴⁾を用いた(表 2)。酵素は KOD FX(東洋紡)を用いた。反応条件は、94°C/2 分、(98°C/45 秒・58°C/45 秒・68°C/45 秒)×28 ~ 40 サイクル、68°C/2 分で行った。目的の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認した。また、得られた PCR 産物について、VP1 領域のダイレクトシーケンスを行った。

2.4 RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR

作製した cDNA について、RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR を行った。1st PCR プライマーには Sapp36 および SaV1245R²⁾を用いた。また、2nd PCR プライマーには GV-GLPSGM および SaV1245R を用いた(表 2)。酵素は Ex Taq (TaKaRa)を用いた。反応条件は、94°C/3 分、(94°C/30 秒・55°C/30 秒・72°C/45 秒~1 分)×40 サイクル、72°C/7 分で行った。目的の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認した。また、得られた PCR 産物について、RdRp 領域のダイレクトシーケンスを行った。

表 2. 使用したプライマー

Primer	Sequence (5' to 3')	Function	Location
SV-F11	GCT TGG TTY ATA GGT GGT AC	Forward	5098-5117
SV-R1	CWG GTG AMA CMC CAT TKT CCA T	Reverse	5857-5878
Sapp36	GTT GCT GTT GGC ATT AAC A	forward	4273-4291
SaV-1245R	CCC TCC ATY TCA AAC ACT A	Reverse	5159-5177
GV-GLPSGM	GGT CTC CCC TCG GGC ATG	forward	4560-4577
SaV-1245R	CCC TCC ATY TCA AAC ACT A	Reverse	5159-5177

2.5 遺伝子解析

ダイレクトシーケンスで得られたサポウイルスの塩基配列について、既知のウイルスの塩基配列と比較できる BLAST 検索を行い、遺伝子型を決定した。また、得られた

塩基配列情報をもとに、Molecular Evolutionary Genetics Analysis ver. 6.06 プログラムを用いて、近隣結合法による系統樹解析を行った⁵⁾。

3 結果

3.1 VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR

リアルタイム PCR で陽性となった 34 検体の cDNA について、VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR を行った。目的の PCR 産物(780 bp)の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した。サンプル①(Ct 値:20.1)、サンプル②(Ct 値:25.2)、サンプル③(Ct 値:30.4)および Negative Control (N.C.)の結果を図 1 に示す。

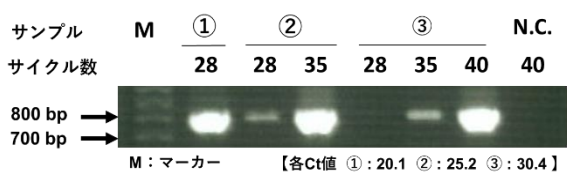


図 1. アガロースゲル電気泳動の結果

サンプル①は 28 サイクルの PCR で遺伝子解析を行うために十分な遺伝子増幅が確認された。一方で、サンプル②およびサンプル③では遺伝子解析を行うには不十分であったため、35 サイクルの PCR を行ったところ、サンプル②では十分な増幅が確認された。サンプル③では 40 サイクルの PCR を行ったところ、十分な増幅が確認された。N.C. では 40 サイクルの PCR を行っても増幅が確認されなかった。その他のサンプルについても検討したところ、リアルタイム PCR の Ct 値が 22 未満であれば 28 サイクルで、Ct 値が 22~29 未満であれば 35 サイクルで、Ct 値が 29~31.5 未満であれば 40 サイクルで目的遺伝子の十分な増幅が確認された。一方、Ct 値が 33 を超えた検体では十分な遺伝子増幅が確認されなかった(図 2)。

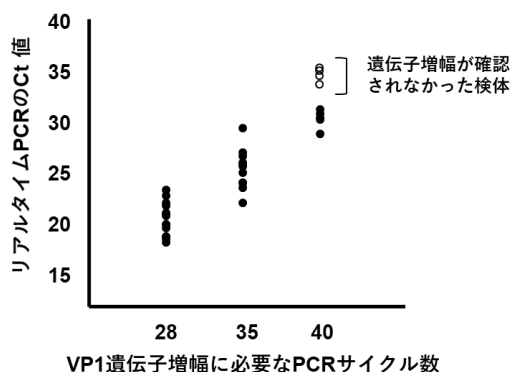


図 2. Ct 値と VP1 遺伝子増幅に必要な PCR サイクル数の関係

3.2 RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR

リアルタイム PCR で陽性となった 34 検体の cDNA について、RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR を行った。目的の 1st PCR 産物(904 bp)または 2nd PCR 産物(617 bp)の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した。

RdRp 領域を標的とした PCR は、VP1 領域を標的とした PCR と比較して検出感度が低く、リアルタイム PCR の Ct 値が 20 前後であれば、遺伝子解析を行うために十分な遺伝子増幅が確認された検体もあったが、Ct 値が 23.7 を超えた検体では遺伝子増幅が確認できなかった(図 3)。

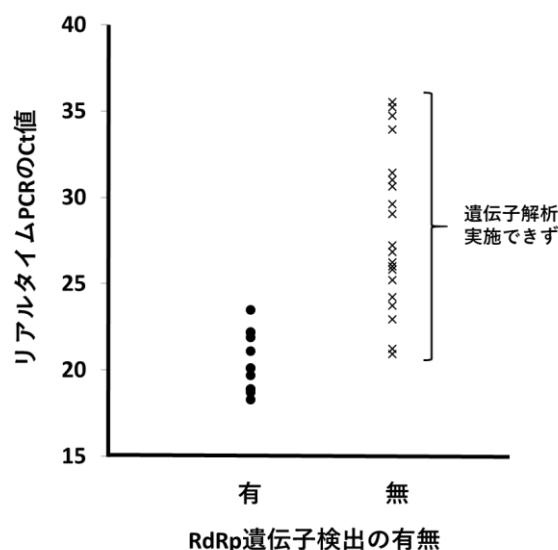


図 3. Ct 値と RdRp 遺伝子検出の関係

3.3 VP1 領域における遺伝子解析

VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR で十分な遺伝子増幅が確認された 30 検体について、ダイレクトシーケンスを行い、得られた塩基配列を解析した。

事例 A、事例 B、事例 C および他都市依頼検体から得られた塩基配列について、BLAST 検索を行ったところ、すべてサポウイルス GL2 と高い相同性が認められた。

また、事例 A では利用者 13 名と従業員 2 名について、共通して得られた 723 塩基の配列が一致した。事例 B では利用者 8 名と従業員 3 名について、共通して得られた 655 塩基の配列が一致した。事例 C では利用者 3 名について、共通して得られた 714 塩基の配列が一致した。

続いて、サポウイルス VP1 領域の部分配列(636 nt)に基づく系統樹解析を行った(図 4)。

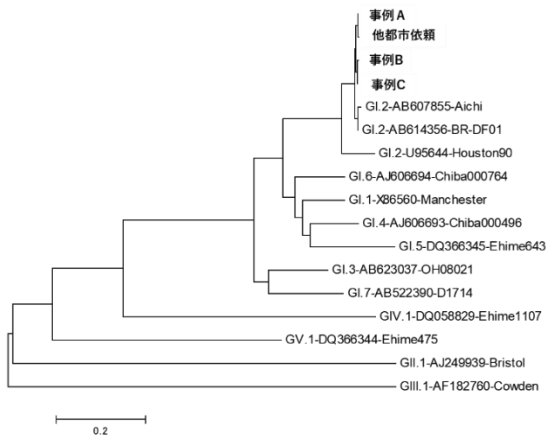


図 4. VP1 領域の部分配列(636 nt)に基づく系統樹解析

事例 A と他都市依頼検体を比較すると、VP1 領域の部分配列(636 nt)に 1 塩基の違いがみられた。同様に、事例 B と事例 C を比較すると、1 塩基の違いがみられた。また、最も古い事例 A と最も新しい事例 C を比較すると、4 塩基の違いがみられた。

3.4 RdRp 領域における遺伝子解析

RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR で十分な遺伝子増幅が確認された 12 検体について、ダイレクトシーケンスを行い、得られた塩基配列を解析した。

事例 A、事例 B、事例 C から得られた塩基配列について、BLAST 検索を行ったところ、すべてサポウイルス GI.2 と高い相同性が認められた。

また、事例 A では利用者 4 名と従業員 1 名について、共通して得られた 544 塩基の配列が一致した。事例 B では利用者 4 名と従業員 2 名から 731 塩基の配列が得られ、そのうち利用者 2 名と従業員 2 名については配列が一致した。事例 C では利用者 1 名から 540 塩基の配列が得られた。

続いて、サポウイルス RdRp 領域の部分配列(494 nt)に基づく系統樹解析を行った(図 5)。

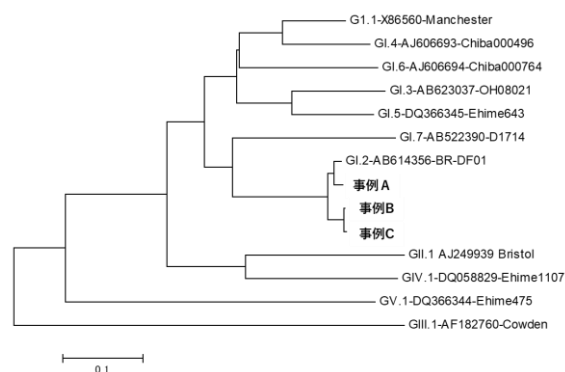


図 5. RdRp 領域の部分配列(494 nt)に基づく系統樹解析

事例 A と事例 B を比較すると、RdRp 領域の部分配列(494 nt)に 19 塩基の違いがみられた。同様に、事例 B と事例 C を比較すると、2 塩基の違いがみられた。

4 考察

過去に神戸市で発生したサポウイルス食中毒(疑い)事例について、コンベンショナル PCR 法により、遺伝子型別判定や相同性を解析することができた。また、リアルタイム PCR で得た Ct 値から VP1 領域における遺伝子解析に必要な PCR サイクル数を予測することで、迅速な遺伝子型別検査を行うことが可能となった。RdRp 領域を標的とした PCR では、VP1 領域を標的とした PCR と比較して検出感度が低く、リアルタイム PCR の Ct 値が 23.5 を超える検体からは遺伝子解析を行うために十分な増幅が確認されなかったため、今後は PCR 条件の見直しや使用するプライマーの改良を行う必要があると思われる。

各事例の検体から得られた VP1 領域および RdRp 領域の部分配列はすべて、サポウイルス GI.2 と高い相同性が認められた。サポウイルスについての全国的な疫学データは少ないが、サポウイルス GI.2 による食中毒事例は複数報告されている。

各事例について、保健所が行った聞き取り調査情報と本結果を併せて考察する。

事例 A では 17 名が宴会に参加し、連絡の取れた 15 名のうち 12 名が翌日以降に嘔吐や下痢を呈した。VP1 領域における遺伝子解析の結果、利用者 13 名と従業員 2 名から検出された塩基配列が一致した。また、RdRp 領域における遺伝子解析の結果、利用者 4 名と従業員 1 名から検出された塩基配列が一致した。よって、施設内で集団感染が発生した可能性が高い。聞き取り調査情報では、利用者 と従業員の接触やトイレ等共有場所の有無といった詳細な情報はなかったが、食中毒事件もしくは両者の接触時やトイレ等共有場所で感染した可能性が示唆された。

事例 B では 45 名が宴会に参加し、2 日後以降に 40 名が下痢等の身体異常を呈した。VP1 領域における遺伝子解析の結果、利用者 8 名と従業員 3 名から検出された塩基配列が一致した。また、RdRp 領域における遺伝子解析の結果、利用者 4 名と従業員 2 名から検出された塩基配列が一致した。よって、施設内で集団感染が発生した可能性が高い。聞き取り調査情報では、会場内でのオムツ交換や嘔吐等はないとあったが、両者の接触やトイレ等共有場所に関する記載はなかった。したがって、食中毒事件もし

くは両者の接触時やトイレ等共有場所で感染した可能性が示唆された。

事例 C は、事例 B の 3 か月後に発生した。宴会後、36 名のうち 18 名が翌日以降に嘔吐や下痢を呈した。リアルタイム PCR の結果、利用者 3 名からサポウイルスが検出されたが、従業員からは検出されなかった。よって、食中毒事件とは断定できない。また、VP1 領域における遺伝子解析の結果、利用者 3 名から検出された塩基配列が一致した。聞き取り調査によって、会場出入口周辺でオムツ交換が行われたことが分かっており、それが感染源となった可能性がある。

事例 B と事例 C について、同一施設で 3 カ月後に発生したため、事例 C は事例 B で検出されたサポウイルスが残存して発生した可能性が考えられた。今回の研究で、両者のサポウイルスの VP1 領域の部分配列に 1 塩基の違いが認められ、RdRp 領域の部分配列に 2 塩基の違いが認められた。両者を比較するためにはより詳細な遺伝子解析が必要である。そこで、今後は次世代シーケンサーを活用したサポウイルスゲノムの全長解析を検討し、複数の領域で遺伝子型別判定や相同性を解析することで、検査結果の信頼性を高めていきたい。

5 まとめ

本研究では、サポウイルスの VP1 領域および RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR 法を検討し、過去に神戸市で発生したサポウイルス食中毒(疑い)事例について遺伝子解析を行った。リアルタイム PCR で Ct 値が 31.5 未満の検体から、VP1 領域の部分配列が得られた。また、Ct 値が 20 前後の検体では RdRp 領域の部分配列も得られた。遺伝子解析の結果、すべての事例で遺伝子型は GI.2 であったが、塩基配列には各事例でそれぞれ違いがみられた。

食中毒(疑い)事例について、遺伝子型の判別や相同性を解析することで、聞き取り調査情報と併せて様々な考察を行うことができ、より詳細な原因の解明や今後の再発防止につながる可能性が示唆された。

6 参考文献

- 1) Oka T, et al. 2020. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses. *Archives of Virology* 165:2335-2340.
- 2) Harada S, et al. 2013. Phylogenetic Analysis of the Nonstructural and Structural Protein Encoding Region Sequences, Indicating Successive Appearance of Genomically Diverse Sapovirus Strains from Gastroenteritis Patients. *Jpn. J. Infect. Dis* 66, 454-457, 2013.
- 3) サポウイルス「食品衛生の窓」東京都福祉保健局 <https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/micro/sapo.html>.
- 4) Okada M, et al. 2002. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Archives of Virology* 147:1445-1451.
- 5) Oka T, et al. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. *Clin Microbiol Rev* 28:32-53, 2015.

市内温泉施設における緊急事態宣言後の レジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移

小松頌子、中西典子、岩本朋忠
神戸市健康科学研究所 感染症部

1 はじめに

土壌や淡水に生息するレジオネラ属菌は、土埃などに運ばれて人工環境水中で増殖する。増殖したレジオネラ属菌はエアロゾルとともに飛散することで人に感染し、レジオネラ症を引き起こす¹⁾。これまでに、温泉入浴施設を感染源としたレジオネラ症は多数報告されており、特に新規営業開始時や休止後の再開時は、レジオネラ属菌が増殖している危険性が高いため²⁾、レジオネラ症の感染リスクが高まる可能性がある。

R2年度は、新型コロナウイルス感染症の流行により、4月に初めての緊急事態宣言が発出され、温泉入浴施設に対して使用の制限等の要請がなされた。これを受けて厚生労働省からは、十分に消毒した後に営業を再開するよう注意喚起がなされており³⁾、レジオネラ症への感染防止対策がより一層求められることとなった。

そこで、緊急事態宣言後の影響を調べるために、宣言解除後に実施したR2年度の市内温泉施設におけるレジオネラ属菌の検出状況を精査し、検出菌数の多かった5施設に着目して、直近9年間に分離されたレジオネラ属菌の遺伝子型の推移を調査した。

2 材料および方法

1) 調査対象

市内温泉地区の施設全体のレジオネラ属菌検出状況については、H28年度からR1年度を緊急事態宣言前の期間とし、緊急事態宣言解除後のR2年度の行政検査結果を比較対象とした。

さらに、5施設(A~E)において、H24年度からR2年度に分離されたレジオネラ属菌を解析対象とした。

2) レジオネラ属菌の分離および同定

検水 500 mL を直径 47 mm、孔径 0.2 μ m のポリカーボネート製メンブレンフィルター(ミリポア、GTTTP04700)で吸引ろ過後、フィルターを滅菌ミリQ水 5 mL に浸し、5分間のボルテックスで再浮遊した。濃縮検水を 50°C20 分間の

熱処理後、100 μ L を GVPC 寒天培地(関東化学)に塗布した。36°Cで 7 日間培養し、システイン要求性かつ斜光法におけるモザイク・カットグラス様コロニーをレジオネラ属菌と推定した。

Legionella pneumophila の同定は、LEG(genus *Legionella* 16S rRNA gene)と Lmip(*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene)の両プライマーを用いた PCR 法により行った⁴⁾。両遺伝子が増幅したものを *L. pneumophila*、LEG のみが増幅したものを *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌と同定した。*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定して BLAST 検索を行うことにより、菌種同定した。

3) 血清型別

L. pneumophila の血清群(serogroup, 以下、SG)は、レジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いて型別した。

4) 遺伝子型別解析

L. pneumophila の遺伝子型別解析は、Sequence Based Typing (SBT) 法と Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) 法を用いた⁴⁾。SBT 法では、7つの遺伝子をシーケンスし、データベースで照合することで遺伝子型(sequence type, 以下、ST)を決定した。MLVA 法では、12領域のリピート数を解析した。

また、SG1 の 9 株については、病原性との関連が明らかになっている *lag-1* 遺伝子を標的とした PCR 法を実施した⁴⁾。

3 結果

(1) レジオネラ属菌検出状況

市内温泉地区における、直近5年間のレジオネラ属菌検出率を表1に示す。R2年度の行政検査では、R1年度と比較して検出率は低下した。一方、レジオネラ属菌が検出された施設について、検出菌数(10~100 CFU/100 mL 未満、100~1,000 CFU/100 mL 未満、1,000~10,000 CFU/

100 mL 未満、10,000 CFU/100 mL 以上)に対する検出施設数やその割合を精査したところ、R2 年度に 10,000 CFU/100 mL 以上の菌数が検出された施設が 5 施設あり、検出施設のうち 29.4%を占めた。H30年度の 0 施設(0%)、R1 年度の 3 施設(15.8%)と比較して、R2 年度は検出菌数の多い施設の割合が高かった。なお、5 施設はいずれも採水時に遊離残留塩素濃度(0.4 mg/L 程度²⁾)またはモノクロアミン濃度(3 mg/L 程度²⁾)を維持できていなかった。

次に、R2 年度の検出菌数が 10,000 CFU/100 mL 以上であった 5 施設において、H24 年度以降に分離されたレジオネラ属菌を表 2 に示す。A 施設では、*L. londiniensis*、*L. israelensis* が継続的に分離された。また R2 年度は検出されなかったものの、*L. pneumophila* SG UT(untypable) が約 8 年にわたって分離された。B 施設では、約 7 年にわたって *L. pneumophila* SG1 が分離された。C 施設では、H26 年度と R2 年度に *L. pneumophila* SG1 が分離された。D 施設では H24 年度以降、様々な血清型の *L. pneumophila* が分離された。E 施設では、*L. pneumophila* は検出されず、*L. israelensis* が約 9 年にわたって分離された。

(2) 各施設で分離されたレジオネラ属菌の遺伝子型の解析

A, B, C, D 施設より分離された *L. pneumophila* の遺伝子型別解析の結果を表 3 に示す。A 施設において、H24 年度より分離された SG UT(4 株)は同一の ST であり、SBT 法未実施の菌株を含めた 5 株の MLVA 型は一致した。B 施設において、H26 年度より分離された SG1(4 株)は同一の ST であり、SBT 法未実施の菌株を含めた 6 株の MLVA 型は、H26 年度分離株での 1 領域を除いて一致した。また、6 株は全て *lag-1* 遺伝子を有していた。C 施設において、R2 年度と H26 年度に分離された SG1 は ST、MLVA 型ともに一致した。D 施設において、R2 年度に分離された SG UT と R1、H30 年度に分離された SG6 は、SBT 法は未実施であるが、MLVA 型は一致した。

4 考察

R2 年度は新型コロナウイルス感染症の流行のため、4 月に初めて発出された緊急事態宣言により、市内の温泉地区においても多くの施設で、休業や施設の使用制限があったと思われる。その影響を受けて、宣言解除後に実

施した R2 年度の行政検査では、レジオネラ属菌検出率が高まることが危惧されたが、実際には検出率は上昇していなかった。これは営業再開に際し、各施設が感染防止対策を実施したことが一因と考えられた。

しかしながら、R2 年度は検出菌数の多い施設の割合が高いことが明らかとなった。また、着目した 5 施設の R2 年度の菌数は直近 5 年間で最も多かった(データ不掲載)。この要因としては、緊急事態宣言下の休業期間中の衛生管理が不十分であったことが考えられた。

着目した 5 施設において、R2 年度に分離された菌株のほぼ全てが、過去に分離されたものと同一の遺伝子型もしくは菌種であったことから、休業の影響を受け、施設内に定着していた菌株が増殖したことが、検出菌数増加の要因の一つと考えられた。また、D 施設においては他施設とは異なり、R2 年度に新たな遺伝子型の *L. pneumophila* が分離されていることから、外部からの菌株が混入したことも検出菌数増加の一因と考えられた。本施設は、2 泉源の混合泉を利用しており、露天風呂も設置されている。H24 年度以降、様々な遺伝子型の *L. pneumophila* が分離されていることから、露天風呂周りの環境や泉源、泉源を混合する貯湯槽など、外部から様々な遺伝子型の *L. pneumophila* が持ち込まれ、それらが増殖している可能性が示唆された。

さらに、A, B 施設のように長期間にわたって同一遺伝子型の菌株が施設内に定着することも明らかとなった。レジオネラ属菌はバイオフィームによって、外界の不利な条件(消毒剤など)から保護され、増殖の場となることから¹⁾、バイオフィーム対策の重要性が確かめられた。特に B 施設は、病原性関連遺伝子 *lag-1* を保有する *L. pneumophila* が定着していることから、レジオネラ症への感染リスクの高い環境であると考えられるため、より一層の衛生管理が求められる。

以上の結果より、レジオネラ属菌を施設内に定着させないよう、常時からの衛生管理が重要であることに加え、施設休業後の再開時にはさらなる衛生管理が必要であることが示された。

5 参考文献

- 1) 中原俊隆: 第 4 版 レジオネラ症防止指針、公益財団法人日本建築衛生管理教育センター、2017

- 2) 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知 生食発 0919 第 8 号 “公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について” 令和元年 9 月 19 日
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課 事務連絡

- “施設の使用再開に伴うレジオネラ症への感染防止対策について” 令和 2 年 5 月 13 日
- 4) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル レジオネラ症、令和 2 年 9 月 1 日改訂

表 1 レジオネラ属菌検出率

	R2 年度	R1 年度	H30 年度	H29 年度	H28 年度
検査検体数 / 施設数	40 / 39	42 / 37	38 / 34	40 / 37	52 / 38
検出検体数 / 施設数 (菌数 10,000 CFU/100 mL 以上)	17 / 17 (5 / 5)	21 / 19 (3 / 3)	11 / 11 (0 / 0)	21 / 20 (4 / 4)	29 / 24 (5 / 3)
検出率 [%] (菌数 10,000 CFU/100 mL 以上)	42.5 / 43.6 (29.4 / 29.4)	50.0 / 51.4 (14.3 / 15.8)	28.9 / 32.4 (0 / 0)	52.5 / 54.1 (19.0 / 20.0)	57.7 / 63.2 (17.2 / 12.5)

表 2 5 施設において分離されたレジオネラ属菌種

施設	年度#1	菌種#2
A	R2	<i>L. londiniensis</i> , <i>L. israelensis</i>
	R1	<i>L. pneumophila</i> SG1/UT
	H30	<i>L. pneumophila</i> SG UT, <i>L. spp</i>
	H29	<i>L. pneumophila</i> SG UT, <i>L. londiniensis</i>
	H28	<i>L. londiniensis</i>
	H27	<i>L. pneumophila</i> SG6/UT, <i>L. israelensis</i> , <i>L. nagasakiensis</i>
	H26	<i>L. israelensis</i>
	H25	<i>L. israelensis</i>
	H24	<i>L. pneumophila</i> SG UT, <i>L. londiniensis</i> , <i>L. israelensis</i>
B	R2	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. londiniensis</i>
	H30	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. spp</i>
	H29	<i>L. pneumophila</i> SG1
	H28	<i>L. pneumophila</i> SG1
	H27	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. quinlivanii</i>
	H26	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. londiniensis</i>
	H25	<i>L. pneumophila</i> SG UT, <i>L. israelensis</i>
C	R2	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. londiniensis</i>
	H30	<i>L. spp</i>
	H29	<i>L. israelensis</i>
	H26	<i>L. pneumophila</i> SG1/UT
D	R2	<i>L. pneumophila</i> SG5/UT
	R1	<i>L. pneumophila</i> SG6
	H30	<i>L. pneumophila</i> SG6
	H29	<i>L. pneumophila</i> SG8
	H26	<i>L. pneumophila</i> SG8, <i>L. londiniensis</i> , <i>L. israelensis</i>
	H24	<i>L. pneumophila</i> SG3/8, <i>L. israelensis</i>
E	R2	<i>L. londiniensis</i> , <i>L. israelensis</i>
	H28	<i>L. israelensis</i>

H26	<i>L. londiniensis, L. israelensis</i>
H25	<i>L. israelensis</i>
H24	<i>L. israelensis</i>

#1: 不記載年度は不検出(10 CFU/100 mL 未満)。ただし、D 施設の H28 年度の検査は実施しなかった。

#2: *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌で、菌種同定未実施の菌株は *L. spp* と表記した。

表 3 分離された *L. pneumophila* の遺伝子型別解析結果

施設	年度	SG	ST ^{#1}	MLVA profile												lag-1 ^{#2}
				Lpms01	Lpms03	Lpms13	Lpms19	Lpms31	Lpms33	Lpms34	Lpms35	Lpms38	Lpms39	Lpms40	Lpms44	
A	R1	1	new1	8	8	0	4	17	4	2	19	0	10	4	9	-
	R1		1439													
	H30	UT	NT	6	8	9	0	12	2	2	19	0	10	4	9	NT
	H29		1439													
	H27															
	H27	6	new2	8	8	11	4	17	1	1	3	3	13	4	9	NT
H24	UT	1439	6	8	9	0	12	2	2	19	0	10	4	9	NT	
B	R2		new3													
	H30		NT													
	H29	1	new3	9	8	8	4	14	2	3	11	8	0	4	9	+
	H28		NT													
	H27															
	H26		new3									10				
H25	UT	2668	8	8	8	5	10	4	3	11	0	0	4	9	NT	
C	R2	1	2744	6	8	9	4	12	2	2	19	3	10	4	9	-
	H26															
	H26	UT	1117	9	8	9	4	12.5	4	2	24	3	11	5	0	NT
D	R2	5	NT	8	8	11	4	17	1	1	3	3	6	4	9	NT
	R2	UT														
	R1	6	NT	9	8	8	0	14	2	2	18	3	11	4	9	NT
	H30															
	H29	8	NT	7.5	7	11	4	4	4	1	16	0	12	5	9	NT
	H26	8	1547	9	8	11	0	14	5	4	27	0	11	4	9	NT
	H24		5													
	H24	3	1005	8	7	8	5	12	2.5	3	22	0	8	4	9	NT
H24	3	1996	0	7	8	5	12	2.5	3	22	0	8	4	0	NT	

#1: データベースに未登録の新規 ST を ST new1, 2, 3 とした。NT: not tested

#2: NT: not tested

ジルコニアコート化シリカゲル/C18 混合ミニカラムを用いた スパイス中の残留農薬分析法の検討

中川光^{1,2}、山路章¹、向井健悟¹

¹神戸市健康科学研究所 生活科学部、²現所属 神戸市健康局環境衛生課

1 はじめに

スパイスとは、食品に風味付けの目的で比較的少量使用される種々の植物由来の芳香性樹皮、根、根茎、蕾、種子、果実または果皮をいい、近年食の多様化に伴って日本においても多種多様なスパイスが使用されている。また、スパイスなどの輸入食品では、農薬の基準超過等の違反事例が散見されており、これらの安全性に対する消費者の不安と関心は高まっている。

スパイスの分析法としては、農薬等の一斉試験法(以下「通知法」という。)が厚生労働省から通知されているが、通知法に従い前処理を実施しても、スパイスに由来する夾雑成分が非常に多く、精製工程での除去が不十分なため、夾雑成分に妨害されて対象の農薬が測定できない、測定機器が汚染されるなど、分析には大きな課題があった。

そこで、本検討では既報^{2,3)}を参考に脂質除去に有用な、シリカゲルにジルコニアとC18を化学結合させた固相ミニカラム(Z-Sep/C18)を用いて精製方法を検討したので、夾雑成分の除去効果及び添加回収試験の結果について報告する。

2 実験方法

2.1 試料

市販のコリアンダー、クミン、カルダモンを用いた。いずれも今回対象とする農薬が含まれていないことを確認した後、実験に供した。

2.2 試薬及び標準品等

農薬標準品には林純薬工業(株)製の PL2005 農薬 GC/MS Mix1~7、PL2005 農薬 LC/MS Mix4~7、PL 農薬混合標準溶液(第一種特定化学物質)II及び PL 農薬混合標準溶液(第一種特定化学物質関連)IIを用いた。アセトニトリル、アセトン、トルエン、メタノール、n-ヘキサン、塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬工業(株)製、0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH7.0)は林純薬工業(株)製を用いた。精製用固相ミニカラムには、

Supelclean Z-Sep/C18 混床 SPE チューブ(シグマアルドリッチ社製)及び InertSep GC/NH₂(ジエールサイエンス(株)製)を用いた。

標準原液は、GC-MS/MS 測定対象農薬はアセトンで、LC-MS/MS 測定対象農薬はアセトニトリルで溶解し、それぞれ 1 µg/mL 混合標準原液とした。検量線は混合標準原液を GC-MS/MS 測定対象農薬はアセトン/n-ヘキサン(1:1)で、LC-MS/MS 測定対象農薬はメタノールで適宜希釈して、マトリックス検量線として 5~15 ng/mL の範囲で作製した。

2.3 装置及び測定条件

装置及び測定条件については、表 1 に示した。なお、定量下限値は 0.01 mg/kg とした。

表 1 GC-MS/MS 及び LC-MS/MS 測定条件

<GC-MS/MS>	
装置	GC:7890B, MS:7000C Triple Quad (Agilent Technologies)
カラム	VF-5MS (0.25 mm×30 m, 膜厚 0.25 µm) (Agilent Technologies)
昇温条件	70°C (2) - 25°C/min - 150°C (0) - 3°C/min - 200°C (0) - 25°C/min - 310°C (0) - 315°C (5)
注入口温度	250°C
キャリアガス	ヘリウム
流量	定流量 1.0 mL/min
注入量	2 µL
<LC-MS/MS>	
装置	HPLC:LC20A (shimadzu), MS:Qtrap 4500 (AB SCIEX)
カラム	InertSustain C18 (2.1×150 mm, 粒径 3 µm) (GL Sciences)
カラム温度	40°C
移動相	A液:5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B液:5 mM 酢酸アンモニウム・メタノール溶液
グラジエント条件	A:B (min)=85:15 (0)→60:40 (1-3.5)→50:50 (6)→45:55 (8)→5:95 (17.5-35)→85:15 (35.1-50)
流速	0.2 mL/min
注入量	5 µL

2.4 分析対象物質

GC-MS/MS 測定対象農薬 179 項目及び、LC-MS/MS 測定対象農薬 72 項目の合計 251 項目を対象とした。それぞれ表 2 及び表 3 に示した。

表2 GC-MS/MS 測定対象農薬 179 項目

1	BHC	46	クロルベンシド	91	2-(1-ナフチル)アセタミド	136	フルミオキサジン
2	DDT	47	クロロベンジレート	92	ナプロバミド	137	プレチラクロール
3	EPN	48	シアナジン	93	ニトータルインプロピル	138	プロシモン
4	XMC	49	シアノホス	94	ノルフルラゾン	139	プロチオホス
5	アザコナゾール	50	ジエトフェンカルブ	95	バクロブトラゾール	140	プロバクロール
6	アセトクロール	51	ジクロトホス	96	パラチオン	141	プロバジン
7	アトラジン	52	ジクロフェンチオン	97	パラチオンメチル	142	プロパニル
8	アメトリン	53	ジクロホップメチル	98	ハルフェンブロックス	143	プロパホス
9	アラクロール	54	ジクロラン	99	ピコリナフェン	144	プロパルギット
10	アルドリン及びディルドリン	55	ジスルホトン	100	ピテルタノール	145	プロピコナゾール
11	イサゾホス	56	シハロトリン	101	ピフェノックス	146	プロピザミド
12	インフェンホス	57	シハロホップブチル	102	ピフェントリン	147	プロヒドロジヤモン
13	イソプロカルブ	58	ジフェナミド	103	ピペロニルブトキシド	148	プロフェノホス
14	イソプロチオラン	59	シプロコナゾール	104	ピペロホス	149	プロボキスル
15	イプロベンホス	60	シペルメトリン	105	ピラゾホス	150	プロマシル
16	ウニコナゾールP	61	シマジン	106	ピリダフェンチオン	151	プロメトリン
17	エスプロカルブ	62	ジメタメトリン	107	ピリダベン	152	プロモブチド
18	エチオン	63	ジメチルビンホス	108	ピリフェノックス	153	プロモプロピレート
19	エディフェンホス	64	ジメテナミド	109	ピリブチカルブ	154	プロモホス
20	エトキサゾール	65	ジメエート	110	ピリプロキシフェン	155	ヘキサコナゾール
21	エトフェンブロックス	66	シメトリン	111	ピリミノバックメチル	156	ベナラキシル
22	エトフメセート	67	ジメピペレート	112	ピリミホスメチル	157	ベノキサコール
23	エトプロホス	68	スピロキサミン	113	ピリメタニル	158	ヘプタクロル
24	エトリムホス	69	ターバシル	114	ピンクロゾリン	159	ベルメトリン
25	エポキシコナゾール	70	ダイアジノン	115	フェナミホス	160	ペンコナゾール
26	エンドスルファン	71	チオベンカルブ	116	フェナリモル	161	ペンディメタリン
27	エンドリン	72	チオメト	117	フェントロチオン	162	ペンフレセート
28	オキサジアゾン	73	チフルザミド	118	フェノキサニル	163	ホサロン
29	オキサジキシル	74	テクナゼン	119	フェノチオカルブ	164	ホスファミドン
30	オキシフルオルフェン	75	テトラコナゾール	120	フェンクロルホス	165	ホスメット
31	カズサホス	76	テトラジホ	121	フェンチオン	166	ホレート
32	カフェンストロール	77	テニルクロール	122	フェントエート	167	マラチオン
33	カルフェントラゾールエチル	78	テブコナゾール	123	フェンバレレート	168	マイクロブタニル
34	カルボキシ	79	テブフェンピラド	124	フェンプロバトリン	169	メチダチオン
35	キナルホス	80	テフルトリン	125	フサライド	170	メキシクロール
36	キノキシフェン	81	テルブトリン	126	ブタクロール	171	メミノストロピン
37	クレソキシムメチル	82	テルブホス	127	ブタミホス	172	メラクロール
38	クロマゾン	83	トリアジメノール	128	ブピリメート	173	メビンホス
39	クロルタルジメチル	84	トリアジメホ	129	ブプロフェジン	174	メフェナセト
40	クロルピリホス	85	トリアゾホス	130	フルキンコナゾール	175	メフェンビルジエチル
41	クロルピリホスメチル	86	トリアレート	131	フルジオキシニル	176	メブロニル
42	クロルフェナビル	87	トリブホス	132	フルシトリネート	177	モノクロトホス
43	クロルフェンソ	88	トリフルラリン	133	フルトラニル	178	レスメトリン
44	クロルフェンビンホス	89	トリフロキシストロピン	134	フルトリアホール	179	レナシル
45	クロルプロファム	90	トルクロホスメチル	135	フルバリネート		

表3 LC-MS/MS 測定対象農薬 72 項目

1	アジンホスメチル	21	クロマフェノジド	41	テブチウロン	61	ヘキサフルムロン
2	アゾキシストロピン	22	クロメブロッブ	42	テブフェノジド	62	ヘキシチアゾクス
3	アニロホス	23	クロリダゾン	43	テフルベンズロン	63	ベンシクロ
4	アラマイト	24	クロロクスロン	44	トリデモルフ	64	ペンダイオカルブ
5	アルジカルブ	25	シアゾファミド	45	トリフルムロン	65	ペントキサゾン
6	アルドキシカルブ	26	ジウロン	46	ナプロアニリド	66	ボスカリド
7	イソキサフルトール	27	シフルフェナミド	47	ノバルロン	67	メタベンズチアズロン
8	イプロバリカルブ	28	ジフルベンズロン	48	ピラクロストロピン	68	メキシフェノジド
9	イマザリル	29	シプロジニル	49	ピリミカーブ	69	モノリニウロン
10	イミダクロプリド	30	シメコナゾール	50	フェノキシカルブ	70	ラクトフェン
11	インダノファン	31	ジメチリモール	51	フェノブカルブ	71	リニウロン
12	インドキサカルブ	32	ジメモルフ	52	フェリムゾ	72	ルフエヌロン
13	オキサジクロメホ	33	シラフルオフェン	53	フェンアミドン		
14	オキサミル	34	スピノサド	54	フェンピロキシメート		
15	オリザリン	35	ダイアレート	55	フェンメディファム		
16	カルバリル	36	ダイムロン	56	ブタフェナシル		
17	カルプロバミド	37	チアクロプリド	57	フルフェナセト		
18	クミルロン	38	チアベンダゾール	58	フルフェノクスロン		
19	クロキントセツトメキシル	39	チアメキサム	59	フルリドン		
20	クロチアニジン	40	テトラクロルビンホス	60	プロバキザホップ		

2.5 試験溶液の調製

本検討では通知法の「穀類、豆類及び種実類の場合」に準じ、図1のとおり実施した。

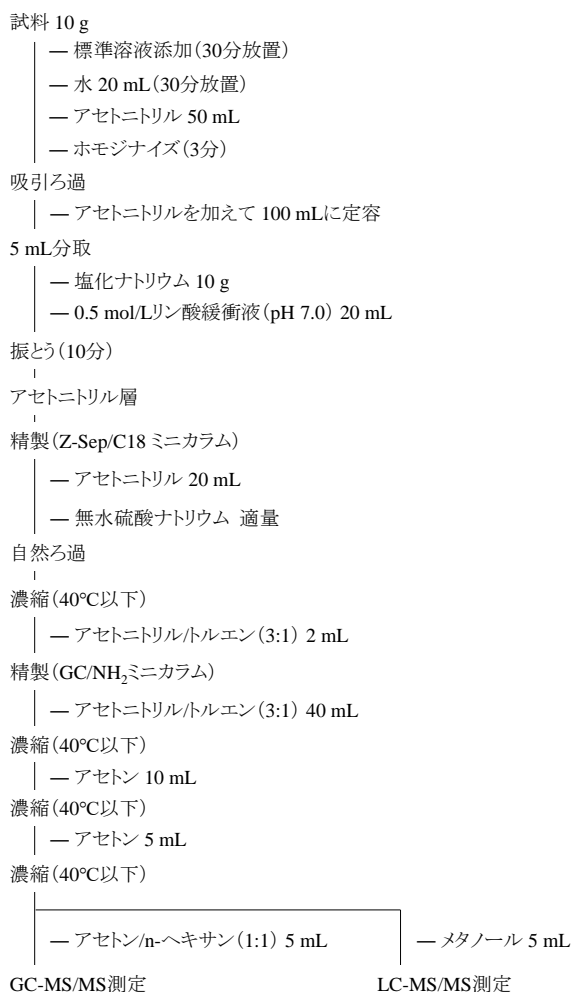


図1 試験法のフローチャート

3 結果及び考察

3.1 Z-Sep/C18 による夾雑成分の除去について

各スパイスにおける TIC クロマトグラムを図2-1～図2-3に示した。従来の通知法どおり精製した試験溶液の TIC クロマトグラムでは、いくつかの夾雑成分による大きなピークが全てのスパイスにおいて確認できた。一方で、Z-Sep/C18 固相ミニカラムを用いた本試験法ではこれらのピークが消失あるいは大幅に減少し、多くの対象農薬において問題となっていた夾雑成分による妨害が大幅に改善された。通知法においては、C18 固相ミニカラムで脂質等の疎水性物質、GC/NH₂ 固相ミニカラムで色素や脂肪酸を除去する精製工程があるが、本試験法において Z-Sep/C18 固相ミニカラムによりアシルグリセロールやリン脂質等を除去する工程を加えたことが、各スパイスの夾雑成分の除去に大きく寄与していると考えられた。

3.2 添加回収試験の結果について

本検討で用いた試験法の正確度(対象物質の真の濃度に対する測定値の偏りの度合い)を確認するため、添加回収試験(添加濃度 0.1 µg/g, n=6)による評価をおこなった。評価の基準は、分析結果の信頼性を確保するために国が定めた「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁴⁾(以下「ガイドライン」という。)に基づき、選択性があり(妨害ピークがなく)、平均回収率が70%～120%を満たした項目を良好とした。

妨害ピークを認める場合は、ガイドラインには表4のとおり妨害ピークの許容範囲が定められているが、本検討では全ての項目で定量限界濃度に相当するピークの面積の1/3未満であるかを基準に評価した。

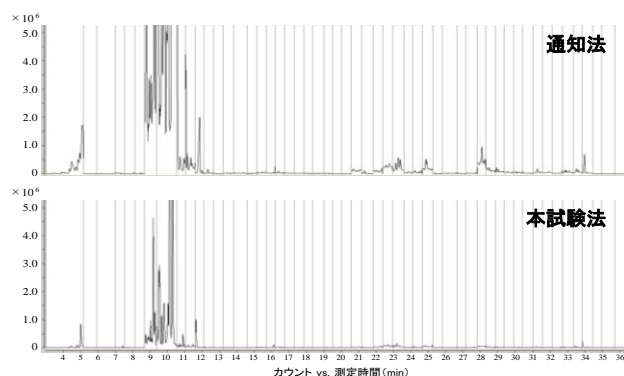


図2-1 カルダモンにおける TIC クロマトグラム

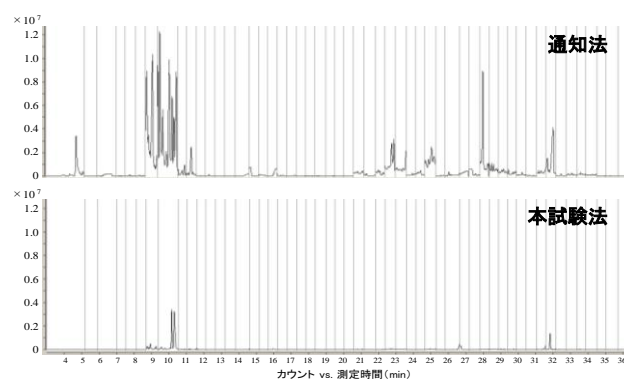


図2-2 クミンにおける TIC クロマトグラム

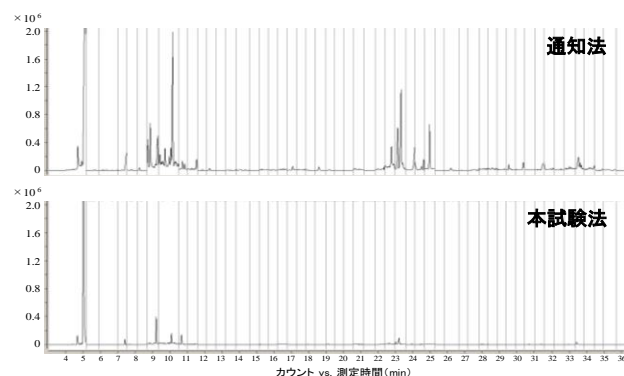


図2-3 コリアンダーにおける TIC クロマトグラム

表 4 妨害ピークの許容範囲

定量限界と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲
定量限界 ≤ 基準値1/3	< 基準値濃度に相当するピークの1/10
定量限界 > 基準値1/3	< 定量限界濃度に相当するピークの1/3
不検出	< 定量限界濃度に相当するピークの1/3

添加回収試験の結果、表 5～表 7 のとおり 251 項目中カルダモンで 235 項目、クミンで 238 項目、コリアンダーで 241 項目が良好であった。いずれかのスパイスで良好な回収率を満たさなかった項目は GC-MS/MS 測定対象農薬では XMC、イソプロカルブ、カルボキシシ、ジクロトホス、チオメトン、メビンホス、モノクロトホス、レスメトリンの 179 項目中 8 項目、LC-MS/MS 測定対象農薬ではアルドキシカルブ、イマザリル、イミダクロプリド、オキサミル、クロチアニジン、ジメチリモール、スピノサド、チアベンダゾール、チアメキサム、フェリムゾン、フェンアミドンの 72 項目中 11 項目であった。また、選択性が良好でなかった項目は、カルダモンにおいては XMC、イソプロカルブ、シペルメトリンの 3 項目、クミンにおいては XMC、イミダクロプリドの 2 項目、コリアンダーでは 0 項目であった。これらのピーク近傍にはスパイス中に含まれる夾雑成分による妨害ピークが確認された。しかしながら、シペルメトリン及びイミダクロプリドはいずれも「食品分類名:その他のスパイス」において残留基準値が 5 ppm に設定されているため、表 4 に示すガイドラインの妨害ピークの許容範囲では許容されるピーク面積である可能性は十分に考えられる。

また、本試験法によって回収率が低下した項目もいくつか見られ、特に LC-MS/MS 測定対象農薬については良好な回収率を満たさなくなる項目が増加した。これは、Z-Sep/C18 固相ミニカラムによって農薬が保持されている影響が考えられるが、Z-Sep/C18 を使用しなかった場合、試料に含まれる夾雑成分によって測定機器やカラム等が汚染され、場合によってはメンテナンスを必要とすることから、Z-Sep/C18 固相ミニカラムによる精製をおこない、測定することが望ましいと考える。回収率が良好でなかった項目、本試験法でも夾雑成分による妨害が見られる項目については、今後検討の余地があると思われる。

以上のことから、カルダモン、クミン、コリアンダーにおいて 251 項目中 235～241 項目について分析法を確立することができた。これらスパイスの分析法を確立したことで脂質等の夾雑成分を含むその他の試料についても同様の方法で分析が可能であると考えられ、当所における健康危機管理体制の強化につながることを期待できる。

4 まとめ

本検討では、スパイス中の残留農薬の分析法について検討をおこなった。通知法によりスパイス中の農薬を分析すると、スパイス由来の夾雑成分に妨害されて多くの農薬が分析できなかった。そのため、本検討では Z-Sep/C18 固相ミニカラムを用いた精製方法を検討し、添加回収試験を実施した結果、以下のような知見が得られた。

- 1) Z-Sep/C18 固相ミニカラムを用いてアシルグリセロールやリン脂質等を除去したことで、スパイス由来の夾雑成分による大きなピークが消失あるいは大幅に減少し、夾雑成分による妨害ピークが大幅に改善された。
- 2) 本試験法を用いて添加回収試験を実施した結果、カルダモン、クミン、コリアンダーにおいて 251 項目中 235～241 項目について、選択性の基準及び平均回収率 70%～120%を満たし、定量分析法を確立することができた。
- 3) 一部の農薬については、Z-Sep/C18 固相ミニカラムによる保持の影響で回収率が低下したと考えられた。しかしながら、スパイス試料に含まれる夾雑成分による測定機器やカラム等の汚染などの影響を考慮すると、Z-Sep/C18 固相ミニカラムによる精製は必要な操作であるため、本試験法で良好な結果が得られなかった項目についてはさらなる検討の余地があると思われる。

5 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 日付け食安発第 0124001 号)
- 2) Kuniyo Sugitate and Machiko Saka. Decrease in the matrix enhancement effect on pesticides analysis with GC-MS using new types of solid-phase extraction column. J. Pestic. Sci. 2015. 40(3):87-91.
- 3) 岩越景子ら:LC-MS/MS を用いた豆類中残留農薬の迅速分析法に関する研究. 食衛誌. 2016. 57:5.
- 4) 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等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について(平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号)

表 5 カルダモンにおける添加回収試験の結果 (n=6)

カルダモン				カルダモン				カルダモン				カルダモン			
No.	農薬名	選択性	回収率(%)	No.	農薬名	選択性	回収率(%)	No.	農薬名	選択性	回収率(%)	No.	農薬名	選択性	回収率(%)
GC1	BHC	○	93	GC64	ジメテナミド	○	91	GC127	ブタミホス	○	84	LC11	インダノファン	○	97
GC2	DDT	○	93	GC65	ジメエート	○	104	GC128	ブピリメート	○	89	LC12	インドキサカルブ	○	90
GC3	EPN	○	85	GC66	シメトリン	○	89	GC129	ブプロフェジン	○	89	LC13	オキサジクロメホン	○	93
GC4	XMC	×	267	GC67	ジメビレレート	○	94	GC130	フルキンコナゾール	○	86	LC14	オキサミル	○	47
GC5	アザコナゾール	○	85	GC68	スピロキサミン	○	82	GC131	フルジオクソニル	○	77	LC15	オリザリン	○	97
GC6	アセトクロール	○	94	GC69	ターバシル	○	88	GC132	フルシトリネート	○	93	LC16	カルバリル	○	88
GC7	アトラジン	○	94	GC70	ダイアジノン	○	91	GC133	フルトラニル	○	91	LC17	カルプロバミド	○	88
GC8	アトリン	○	91	GC71	チオベンカルブ	○	94	GC134	フルトリアホール	○	83	LC18	クミルロン	○	94
GC9	アラクロール	○	93	GC72	チオメトン	○	65	GC135	フルバリネート	○	89	LC19	クロキントセットメキシル	○	89
GC10	アルドリノ及びディルドリン	○	92	GC73	チフルザミド	○	89	GC136	フルミオキサジン	○	74	LC20	クロチアニジン	○	68
GC11	イサゾホス	○	94	GC74	テクナゼン	○	91	GC137	プレチラクロール	○	88	LC21	クロマフェノジド	○	92
GC12	イソフエホス	○	88	GC75	テトラコナゾール	○	88	GC138	プロシミン	○	92	LC22	クロメプロップ	○	90
GC13	イソプロカルブ	×	215	GC76	テトラジホン	○	92	GC139	プロチオホス	○	90	LC23	クロリダゾン	○	74
GC14	イソプロチオラン	○	89	GC77	テニルクロール	○	87	GC140	プロバクロー	○	92	LC24	クロロクソン	○	87
GC15	イプロベンホス	○	93	GC78	テブコナゾール	○	82	GC141	プロバジン	○	95	LC25	シアゾファミド	○	88
GC16	ウニコナゾールP	○	86	GC79	テブフェンピラド	○	89	GC142	プロバニル	○	95	LC26	ジウロン	○	72
GC17	エスプロカルブ	○	94	GC80	テフルトリン	○	97	GC143	プロバホス	○	78	LC27	シフルフェナミド	○	95
GC18	エチオン	○	91	GC81	テルフトリン	○	92	GC144	プロバルギット	○	95	LC28	ジフルベンズロン	○	90
GC19	エチフェンホス	○	86	GC82	テルブホス	○	91	GC145	プロビコナゾール	○	86	LC29	シプロジニル	○	86
GC20	エトキサゾール	○	87	GC83	トリアジメノール	○	89	GC146	プロビザミド	○	93	LC30	シメコナゾール	○	89
GC21	エトフェンブロックス	○	94	GC84	トリアジメホン	○	91	GC147	プロビドロジャスモン	○	98	LC31	ジメチリモール	○	0
GC22	エトフメセート	○	96	GC85	トリアゾホス	○	86	GC148	プロフェノホス	○	85	LC32	ジメトモルフ	○	88
GC23	エトプロホス	○	97	GC86	トリアレート	○	93	GC149	プロボクスル	○	97	LC33	シラフルオフェン	○	91
GC24	エトリムホス	○	92	GC87	トリブホス	○	93	GC150	プロマシル	○	85	LC34	スピノサド	○	55
GC25	エボキシコナゾール	○	91	GC88	トリフルラリン	○	87	GC151	プロメトリン	○	90	LC35	ダイアラート	○	93
GC26	エンドスルファン	○	92	GC89	トリフロキシストロビン	○	91	GC152	プロモブチド	○	91	LC36	ダイムロン	○	98
GC27	エンドリン	○	94	GC90	トルクロホスメチル	○	93	GC153	プロモプロビレート	○	87	LC37	チアクロプリド	○	80
GC28	オキサジアゾン	○	90	GC91	2-(1-ナフチル)アセタミド	○	80	GC154	プロモホス	○	90	LC38	チアベンダゾール	○	30
GC29	オキサジキシル	○	83	GC92	ナプロバミド	○	87	GC155	ヘキサコナゾール	○	93	LC39	チアトキサム	○	52
GC30	オキシフルオルフェン	○	90	GC93	ニトータルイソプロピル	○	77	GC156	ベナラキシル	○	89	LC40	テトラクロロピビンホス	○	90
GC31	カズサホス	○	96	GC94	ノルフルラゾン	○	86	GC157	ベノキヤコル	○	93	LC41	テブチアロン	○	77
GC32	カフエンストロール	○	84	GC95	バクロフトラゾール	○	86	GC158	ヘプタクロール	○	93	LC42	テブフェノジド	○	95
GC33	カルフェントラゾンエチル	○	90	GC96	バラチオン	○	88	GC159	ベルメトリン	○	91	LC43	テフルベンズロン	○	90
GC34	カルボキシン	○	9	GC97	バラチオンメチル	○	85	GC160	ベンコナゾール	○	92	LC44	トリデモルフ	○	87
GC35	キナルホス	○	93	GC98	ハルフェンブロックス	○	85	GC161	ベンディメタリン	○	81	LC45	トリフルムロン	○	88
GC36	キノキシフェン	○	89	GC99	ピコリナフェン	○	90	GC162	ベンフレセート	○	94	LC46	ナプロアニリド	○	90
GC37	クレソキシムメチル	○	92	GC100	ピテルタノール	○	89	GC163	ホサロン	○	92	LC47	ノバルロン	○	93
GC38	クロマゾン	○	97	GC101	ピフェノックス	○	70	GC164	ホスファミド	○	83	LC48	ビラクロストロビン	○	88
GC39	クロルタルジメチル	○	91	GC102	ピフェントリン	○	95	GC165	ホスメット	○	85	LC49	ピリミカブ	○	74
GC40	クロルピリホス	○	92	GC103	ピペロニルブトキシド	○	89	GC166	ホレート	○	87	LC50	フェノキシカルブ	○	91
GC41	クロルピリホスメチル	○	93	GC104	ピペロホス	○	86	GC167	マラチオン	○	90	LC51	フェンブカルブ	○	88
GC42	クロルフェナビル	○	82	GC105	ピラゾホス	○	87	GC168	ミクロフタニル	○	88	LC52	フェリムゾン	○	72
GC43	クロルフェンソン	○	89	GC106	ピリダフェンチオン	○	74	GC169	メチダチオン	○	91	LC53	フェンアミド	○	70
GC44	クロルフェンビホス	○	87	GC107	ピリダベン	○	93	GC170	メトキシロー	○	97	LC54	フェンピロキシメート	○	91
GC45	クロルプロファミン	○	97	GC108	ピリフェノックス	○	80	GC171	メトキシストロビン	○	87	LC55	フェンメチファミン	○	83
GC46	クロルベンシド	○	91	GC109	ピリプチカルブ	○	91	GC172	メラクロー	○	91	LC56	ブタフェナシル	○	93
GC47	クロロベンジレート	○	90	GC110	ピリプロキシフェン	○	95	GC173	メビンホス	○	84	LC57	フルフェナセット	○	90
GC48	シアナジン	○	94	GC111	ピリミノバックメチル	○	87	GC174	メフェナセット	○	90	LC58	フルフェノクスロン	○	95
GC49	シアノホス	○	92	GC112	ピリミホスメチル	○	91	GC175	メフェンビルジエチル	○	89	LC59	フルリドン	○	90
GC50	ジエトフェンカルブ	○	87	GC113	ピリメタニル	○	92	GC176	メプロニル	○	90	LC60	プロバキサホップ	○	88
GC51	ジクロトホス	○	52	GC114	ピンクロソリン	○	94	GC177	モノクロトホス	○	44	LC61	ヘキサフルムロン	○	93
GC52	ジクロフェンチオン	○	95	GC115	フェナミホス	○	76	GC178	レスメトリン	○	0	LC62	ヘキシチアゾクス	○	92
GC53	ジクロホップメチル	○	91	GC116	フェナリモール	○	90	GC179	レナシル	○	81	LC63	ベンシクロン	○	92
GC54	ジクロラン	○	91	GC117	フェントロチオン	○	86	LC1	アジンホスメチル	○	83	LC64	ベンダイオカルブ	○	88
GC55	ジスルホトン	○	73	GC118	フェノキサニル	○	87	LC2	アゾキシストロビン	○	88	LC65	ペントキサゾン	○	86
GC56	シハロトリン	○	94	GC119	フェノチオカルブ	○	93	LC3	アニロホス	○	90	LC66	ボスカリド	○	83
GC57	シハロホップメチル	○	93	GC120	フェンクローホス	○	91	LC4	アラマイト	○	95	LC67	メタベンズチアズロン	○	70
GC58	ジフェナミド	○	92	GC121	フェンチオン	○	87	LC5	アルジカルブ	○	78	LC68	メキシフェノジド	○	89
GC59	シプロコナゾール	○	81	GC122	フェントエート	○	90	LC6	アルドキシカルブ	○	49	LC69	モノリニユロン	○	87
GC60	シベルメトリン	×	103	GC123	フェンバレレート	○	91	LC7	イソキサフルトール	○	80	LC70	ラクトフェン	○	96
GC61	シマジン	○	95	GC124	フェンプロバトリン	○	94	LC8	イプロバリカルブ	○	88	LC71	リニユロン	○	87
GC62	ジメタメトリン	○	88	GC125	フザライド	○	87	LC9	イマザリル	○	23	LC72	ルフェスロン	○	90
GC63	ジメチルピビンホス	○	88	GC126	ブタクロール	○	90	LC10	イミダクロプリド	○	72				

表6 クミンにおける添加回収試験の結果(n=6)

No.	農薬名	クミン		No.	農薬名	クミン		No.	農薬名	クミン		No.	農薬名	クミン	
		選択性	回収率(%)			選択性	回収率(%)			選択性	回収率(%)			選択性	回収率(%)
GC1	BHC	○	99	GC64	ジメテナミド	○	96	GC127	ブタミホス	○	91	LC11	インダノファン	○	95
GC2	DDT	○	99	GC65	ジメエート	○	110	GC128	ブピリメート	○	96	LC12	インドキサカルブ	○	93
GC3	EPN	○	99	GC66	シメトリン	○	95	GC129	ブプロフェジン	○	101	LC13	オキサジクロメホン	○	92
GC4	XMC	×	334	GC67	ジメピレレート	○	107	GC130	フルキンコナゾール	○	92	LC14	オキサミル	○	46
GC5	アザコナゾール	○	95	GC68	スピロキサミン	○	109	GC131	フルジオキシニル	○	94	LC15	オリザリン	○	87
GC6	アセトクロール	○	97	GC69	ターバシル	○	96	GC132	フルシトリネート	○	98	LC16	カルバリル	○	87
GC7	アトラジン	○	100	GC70	ダイアジノン	○	99	GC133	フルトラニル	○	98	LC17	カルプロバミド	○	91
GC8	アトリン	○	97	GC71	チオベンカルブ	○	101	GC134	フルトリアホル	○	95	LC18	クミロン	○	88
GC9	アラクロール	○	99	GC72	チオモン	○	96	GC135	フルバリネート	○	97	LC19	クロキントセットメキシル	○	94
GC10	アルドリン及びデルドリン	○	97	GC73	チフルザミド	○	98	GC136	フルミオキサジン	○	89	LC20	クロチアニジン	○	65
GC11	イサゾホス	○	96	GC74	テクナゼン	○	91	GC137	プレチラクロー	○	94	LC21	クロマフェンジド	○	93
GC12	イソフェンホス	○	96	GC75	テトラコナゾール	○	95	GC138	プロシミン	○	99	LC22	クロメブロッブ	○	94
GC13	イソプロカルブ	○	101	GC76	テトラジホン	○	95	GC139	プロチオホス	○	99	LC23	クロリダゾン	○	73
GC14	イソプロチオラン	○	95	GC77	テニルクロール	○	93	GC140	プロバクロー	○	95	LC24	クロロクスロン	○	93
GC15	イソプロベンホス	○	96	GC78	テブコナゾール	○	91	GC141	プロバジン	○	96	LC25	シアソファמיד	○	89
GC16	ウニコナゾールP	○	94	GC79	テブフェンピラド	○	95	GC142	プロバニル	○	96	LC26	ジウロン	○	85
GC17	エスプロカルブ	○	100	GC80	テフルトリン	○	103	GC143	プロバホス	○	90	LC27	シフルフェナミド	○	94
GC18	エチオン	○	99	GC81	テルプトリン	○	100	GC144	プロバルギット	○	101	LC28	ジフルベンズロン	○	91
GC19	エチフェンホス	○	97	GC82	テルブホス	○	96	GC145	プロビコナゾール	○	93	LC29	シプロジニル	○	90
GC20	エトキサゾール	○	93	GC83	トリアジメノール	○	97	GC146	プロビザミド	○	98	LC30	シメコナゾール	○	86
GC21	エトフェンブロックス	○	99	GC84	トリアジメホス	○	97	GC147	プロビドロジャスモン	○	101	LC31	ジメチリモール	○	0
GC22	エトフメセート	○	99	GC85	トリアゾホス	○	98	GC148	プロフェノホス	○	92	LC32	ジメモルフ	○	92
GC23	エトプロホス	○	99	GC86	トリアレート	○	99	GC149	プロボクスル	○	102	LC33	シラフルオフェン	○	91
GC24	エトリムホス	○	96	GC87	トリブホス	○	99	GC150	プロマシル	○	91	LC34	スピノサド	○	85
GC25	エボキシコナゾール	○	98	GC88	トリフルラリン	○	94	GC151	プロメトリン	○	98	LC35	ダイアレート	○	91
GC26	エンドスルファン	○	98	GC89	トリフロキシストロピン	○	96	GC152	プロモブチド	○	95	LC36	ダイムロン	○	95
GC27	エンドリン	○	102	GC90	トルクロホスメチル	○	98	GC153	プロモプロビレート	○	97	LC37	チアクロブリド	○	86
GC28	オキサジアゾン	○	99	GC91	2-(1-ナフチル)アセタミド	○	86	GC154	プロモホス	○	98	LC38	チアベンダゾール	○	52
GC29	オキサジキシル	○	92	GC92	ナプロバミド	○	98	GC155	ヘキサコナゾール	○	102	LC39	チアメキサム	○	43
GC30	オキシフルオルフェン	○	94	GC93	ニトロタルイソプロピル	○	93	GC156	ベナラキシル	○	98	LC40	テトラクロロピルビンホス	○	88
GC31	カズサホス	○	100	GC94	ノルフルラン	○	92	GC157	ベノキヤコール	○	96	LC41	テブチウロン	○	83
GC32	カフエンストロール	○	93	GC95	バクプロトラゾール	○	92	GC158	ヘプタクロール	○	97	LC42	テブフェンジド	○	93
GC33	カルフェントラゾンエチル	○	91	GC96	バラチオン	○	93	GC159	ベルメトリン	○	98	LC43	テフルベンズロン	○	94
GC34	カルボキシシ	○	55	GC97	バラチオンメチル	○	93	GC160	ベンコナゾール	○	96	LC44	トリデモルフ	○	90
GC35	キナルホス	○	101	GC98	ハルフェンブロックス	○	94	GC161	ベンデメタリン	○	94	LC45	トリフルムロン	○	93
GC36	キノキシフェン	○	95	GC99	ピコリナフェン	○	95	GC162	ベンフレセート	○	97	LC46	ナプロアネリド	○	96
GC37	クレノキシムメチル	○	98	GC100	ピテルタノール	○	100	GC163	ホサロン	○	95	LC47	ノバルロン	○	95
GC38	クロマゾン	○	101	GC101	ピフェノックス	○	97	GC164	ホスファミド	○	91	LC48	ピラクロストロピン	○	92
GC39	クロルタルジメチル	○	100	GC102	ピフェントリン	○	100	GC165	ホスメット	○	92	LC49	ピリミホーフ	○	87
GC40	クロルピリホス	○	98	GC103	ピペロニルプロキシド	○	100	GC166	ホレート	○	93	LC50	フェノキシカルブ	○	93
GC41	クロルピリホスメチル	○	95	GC104	ピペロホス	○	93	GC167	マラチオン	○	95	LC51	フェンブカルブ	○	87
GC42	クロルフェナビル	○	98	GC105	ピラゾホス	○	95	GC168	マイクロタニル	○	98	LC52	フェリムゾン	○	98
GC43	クロルフェンソ	○	98	GC106	ピリダフェンチオン	○	90	GC169	メチダチオン	○	97	LC53	フェンアミン	○	91
GC44	クロルフェンピホス	○	95	GC107	ピリダベン	○	97	GC170	メトキシクロール	○	104	LC54	フェンピロキシメート	○	93
GC45	クロルプロファム	○	101	GC108	ピリフェノックス	○	92	GC171	メトミノストロピン	○	96	LC55	フェンメチファム	○	82
GC46	クロルベンシド	○	96	GC109	ピリプチカルブ	○	100	GC172	メトラクロール	○	97	LC56	メタフェナシル	○	96
GC47	クロロベンジレート	○	98	GC110	ピリプロキシフェン	○	99	GC173	メベンホス	○	86	LC57	フルフェナセット	○	93
GC48	シアナジン	○	95	GC111	ピリミノバックメチル	○	92	GC174	メフェナセット	○	96	LC58	フルフェノクスロン	○	89
GC49	シアノホス	○	93	GC112	ピリミホスメチル	○	98	GC175	メフェンビルジエチル	○	96	LC59	フルリドン	○	93
GC50	ジエトフェンカルブ	○	94	GC113	ピリメタニル	○	96	GC176	メプロニル	○	94	LC60	プロバキザホップ	○	92
GC51	ジクロトホス	○	59	GC114	ピンクロソリン	○	96	GC177	モノクロトホス	○	53	LC61	ヘキサフルムロン	○	96
GC52	ジクロフェンチオン	○	99	GC115	フェナミホス	○	89	GC178	レスメトリン	○	25	LC62	ヘキシチアゾクス	○	97
GC53	ジクロホップメチル	○	98	GC116	フェナリモル	○	96	GC179	レナシル	○	92	LC63	ベンシクロン	○	95
GC54	ジクロラン	○	91	GC117	フェントロチオン	○	94	LC1	アジンホスメチル	○	87	LC64	ベンダイオカルブ	○	88
GC55	ジスルホトン	○	93	GC118	フェノキサニル	○	92	LC2	アゾキシストロピン	○	90	LC65	ベントキサゾン	○	96
GC56	シハロトリン	○	99	GC119	フェノチオカルブ	○	101	LC3	アニロホス	○	93	LC66	ボスカリド	○	89
GC57	シハロホップブチル	○	97	GC120	フェンクロルホス	○	99	LC4	アラマイト	○	96	LC67	メタベンズチアズロン	○	87
GC58	ジフェナミド	○	101	GC121	フェンチオン	○	97	LC5	アルジカルブ	○	84	LC68	メトキシフェンジド	○	92
GC59	シプロコナゾール	○	93	GC122	フェントエート	○	97	LC6	アルドキシカルブ	○	45	LC69	モノリニユロン	○	84
GC60	シベルメトリン	○	99	GC123	フェンバレレート	○	98	LC7	イソキサフルトール	○	74	LC70	ラクトフェン	○	96
GC61	シマジ	○	94	GC124	フェンプロバトリン	○	98	LC8	イソバカリカルブ	○	89	LC71	リニユロン	○	87
GC62	ジメタメトリン	○	97	GC125	フサライド	○	94	LC9	イマザリル	○	61	LC72	ルフェスロン	○	93
GC63	ジメチルピルビンホス	○	94	GC126	ブタクロー	○	97	LC10	イミダクロブリド	×	60				

表7 コリアンダーにおける添加回収試験の結果(n=6)

No.	農薬名	コリアンダー		No.	農薬名	コリアンダー		No.	農薬名	コリアンダー		No.	農薬名	コリアンダー	
		選択性	回収率(%)			選択性	回収率(%)			選択性	回収率(%)			選択性	回収率(%)
GC1	BHC	○	94	GC64	ジメテナミド	○	91	GC127	ブタミホス	○	102	LC11	インダノファン	○	85
GC2	DDT	○	98	GC65	ジメエート	○	109	GC128	ブピリメート	○	99	LC12	インドキサカルブ	○	97
GC3	EPN	○	100	GC66	シメトリン	○	92	GC129	ブプロフェジン	○	99	LC13	オキサジクロメホン	○	96
GC4	XMC	○	103	GC67	ジメビレレート	○	94	GC130	フルキンコナゾール	○	96	LC14	オキサミル	○	50
GC5	アザコナゾール	○	93	GC68	スピロキサミン	○	88	GC131	フルジオキシニル	○	96	LC15	オリザリン	○	85
GC6	アセトクロール	○	91	GC69	ターバシル	○	91	GC132	フルシトリネート	○	102	LC16	カルバリル	○	85
GC7	アトラジン	○	96	GC70	ダイアジノン	○	97	GC133	フルトラニル	○	94	LC17	カルプロバミド	○	89
GC8	アメリリン	○	96	GC71	チオベンカルブ	○	98	GC134	フルトリアホール	○	88	LC18	クミルロン	○	88
GC9	アラクロール	○	93	GC72	チオメトン	○	86	GC135	フルバリネート	○	99	LC19	クロキントセツトメキシル	○	95
GC10	アルドリン及びディルドリン	○	97	GC73	チフルザミド	○	97	GC136	フルミオキサジン	○	93	LC20	クロチアニジン	○	66
GC11	イサノホス	○	93	GC74	テクナゼン	○	86	GC137	プレチラクロール	○	99	LC21	クロマフェンジド	○	88
GC12	イソフェンホス	○	99	GC75	テトラコナゾール	○	100	GC138	プロシミジン	○	91	LC22	クロメブロップ	○	95
GC13	イソプロカルブ	○	90	GC76	テトラジホホ	○	100	GC139	プロチオホス	○	100	LC23	クロリダゾン	○	76
GC14	イソプロチオラン	○	93	GC77	テニルクロール	○	94	GC140	プロバクロー	○	89	LC24	クロクロスロン	○	84
GC15	イプロベンホス	○	97	GC78	テブコナゾール	○	94	GC141	プロバジン	○	95	LC25	シアゾファミド	○	84
GC16	ウニコナゾールP	○	91	GC79	テブフェンピラド	○	102	GC142	プロバニル	○	94	LC26	ジウロン	○	85
GC17	エスプロカルブ	○	99	GC80	テフルトリン	○	101	GC143	プロバホス	○	96	LC27	シフルフェナミド	○	95
GC18	エチオン	○	103	GC81	テルプトリン	○	97	GC144	プロバルギット	○	99	LC28	ジフルベンズロン	○	84
GC19	エディフェンホス	○	87	GC82	テルブホス	○	98	GC145	プロビコナゾール	○	94	LC29	シプロジニル	○	94
GC20	エトキサゾール	○	101	GC83	トリアジメノール	○	93	GC146	プロビザミド	○	91	LC30	シメコナゾール	○	84
GC21	エトフェンブロックス	○	102	GC84	トリアジメホホ	○	96	GC147	プロビロジヤモン	○	98	LC31	ジメチリモール	○	0
GC22	エトフェメセート	○	92	GC85	トリアゾホス	○	93	GC148	プロフェノホス	○	95	LC32	ジメモルフ	○	88
GC23	エトプロホス	○	92	GC86	トリアレート	○	98	GC149	プロボクスル	○	92	LC33	シラフルオフェン	○	96
GC24	エトリムホス	○	97	GC87	トリブホス	○	108	GC150	プロマシル	○	93	LC34	スピノサド	○	91
GC25	エポキシコナゾール	○	94	GC88	トリフルラリン	○	101	GC151	プロメトリン	○	95	LC35	ダイアレート	○	87
GC26	エンドスルファン	○	98	GC89	トリフロキシストロピン	○	97	GC152	プロモブチド	○	93	LC36	ダイムロン	○	86
GC27	エンドリン	○	99	GC90	トルクロホスメチル	○	98	GC153	プロモプロビレート	○	102	LC37	チアクロブリド	○	84
GC28	オキサジアゾン	○	104	GC91	2-(1-ナフチル)アセタミド	○	89	GC154	プロモホス	○	101	LC38	チアベンダゾール	○	52
GC29	オキサジキシル	○	91	GC92	ナプロバミド	○	97	GC155	ヘキサコナゾール	○	97	LC39	チアメキサム	○	53
GC30	オキシフルオールフェン	○	101	GC93	ニトータルイソプロピル	○	100	GC156	ベナラキシル	○	97	LC40	テトラクロロピビンホス	○	85
GC31	カズサホス	○	96	GC94	ノルフルラン	○	93	GC157	ベノキサコール	○	90	LC41	テブチウロン	○	82
GC32	カフエントラゾール	○	89	GC95	バクトロフトラゾール	○	93	GC158	ヘフタクロル	○	95	LC42	テブフェンジド	○	89
GC33	カルフェントラゾンエチル	○	98	GC96	バラチオン	○	100	GC159	ベルメトリン	○	99	LC43	テフルベンズロン	○	90
GC34	カルボキシリン	○	76	GC97	バラチオンメチル	○	93	GC160	ベンコナゾール	○	98	LC44	トリデモルフ	○	94
GC35	キナルホス	○	94	GC98	ハルフェンブロックス	○	99	GC161	ベンディメタリン	○	101	LC45	トリフルムロン	○	89
GC36	キノキシフェン	○	96	GC99	ピコリナフェン	○	101	GC162	ベンフルセート	○	91	LC46	ナプロアニリド	○	91
GC37	クレソキシメチル	○	98	GC100	ビテルタノール	○	93	GC163	ホサロン	○	100	LC47	ノバルロン	○	88
GC38	クロマゾン	○	89	GC101	ピフェノックス	○	103	GC164	ホスファミド	○	94	LC48	ビラクロストロピン	○	91
GC39	クロルタルジメチル	○	98	GC102	ピフェントリン	○	103	GC165	ホスメット	○	86	LC49	ビリメカブ	○	88
GC40	クロルピリホス	○	101	GC103	ピベロニルブトキシド	○	104	GC166	ホレート	○	97	LC50	フェノキシカルブ	○	90
GC41	クロルピリホスメチル	○	98	GC104	ピベロホス	○	101	GC167	マラチオン	○	93	LC51	フェンブカルブ	○	84
GC42	クロルフェナビル	○	95	GC105	ピラゾホス	○	100	GC168	マイクロブタニル	○	94	LC52	フェリムゾン	○	67
GC43	クロルフェンソ	○	98	GC106	ピリダフェンチオン	○	95	GC169	メチダチオン	○	87	LC53	フェンアミジン	○	83
GC44	クロルフェンピビンホス	○	97	GC107	ピリダベン	○	99	GC170	メトキシクロール	○	97	LC54	フェンピロキシメート	○	97
GC45	クロルプロファミ	○	96	GC108	ピリフェノックス	○	90	GC171	メトミストロピン	○	95	LC55	フェンメチファム	○	78
GC46	クロルベンシド	○	96	GC109	ピリブチカルブ	○	103	GC172	メトラクロール	○	93	LC56	ブタフェナシル	○	89
GC47	クロロベンジレート	○	101	GC110	ピリプロキシフェン	○	101	GC173	メビホス	○	64	LC57	フルフェナセツト	○	87
GC48	シアナジン	○	100	GC111	ピリミノバクメチル	○	93	GC174	メフェナセツト	○	95	LC58	フルフェノクスロン	○	100
GC49	シアノホス	○	88	GC112	ピリホスメチル	○	100	GC175	メフェンビルジエチル	○	99	LC59	フルリドン	○	85
GC50	ジエトフェンカルブ	○	97	GC113	ピリメタニル	○	92	GC176	メプロニル	○	97	LC60	プロバキサホップ	○	96
GC51	ジクロトホス	○	53	GC114	ピンクロゾリン	○	93	GC177	モノクロトホス	○	46	LC61	ヘキサフルムロン	○	95
GC52	ジクロフェンチオン	○	101	GC115	フェナミホス	○	100	GC178	レスメトリン	○	80	LC62	ヘキシチアゾクス	○	94
GC53	ジクロホップメチル	○	102	GC116	フェナリモル	○	96	GC179	レナシル	○	87	LC63	ベンシクロ	○	92
GC54	ジクロラン	○	89	GC117	フェントロチオン	○	95	LC1	アジンホスメチル	○	85	LC64	ベンダイオカルブ	○	86
GC55	ジスルホトン	○	91	GC118	フェノキシニル	○	96	LC2	アゾキシストロピン	○	86	LC65	ベントキサゾン	○	86
GC56	シハロトリン	○	101	GC119	フェノチオカルブ	○	92	LC3	アニロホス	○	88	LC66	ボスカリド	○	88
GC57	シハロホップブチル	○	102	GC120	フェンクロルホス	○	99	LC4	アラマイト	○	91	LC67	メタベンズチアズロン	○	83
GC58	ジフェナミド	○	93	GC121	フェンチオン	○	99	LC5	アルジカルブ	○	86	LC68	メトキシフェンジド	○	84
GC59	シプロコナゾール	○	90	GC122	フェントエート	○	97	LC6	アルドキシカルブ	○	53	LC69	モリニューロン	○	85
GC60	シベルメトリン	○	101	GC123	フェンパレレート	○	100	LC7	イソキサフルトール	○	74	LC70	ラクトフェン	○	96
GC61	シマジン	○	90	GC124	フェンプロバトリン	○	105	LC8	イプロバリカルブ	○	88	LC71	リニューロン	○	83
GC62	ジメタメトリン	○	97	GC125	フサライド	○	89	LC9	イマザリル	○	73	LC72	ルフェスロン	○	96
GC63	ジメチルピビンホス	○	93	GC126	ブタクロー	○	100	LC10	イミダクロブリド	○	75				

通気蒸留装置-アルカリ滴定法を用いた食品中の二酸化硫黄分析精度管理について

上田泰人、大西優伽、岸本由里子、佐藤徳子、向井健悟

神戸市健康科学研究所 生活科学部

1 はじめに

亜硫酸およびその塩類は食品の漂白、酸化防止、保存などの目的で広く使用されており、我が国への輸入食品の違反事例でも頻出している食品添加物である。食品中の亜硫酸の分析は測定対象として二酸化硫黄としており、厚生労働省通知法¹⁾では抽出は通気蒸留装置を用い、定量は高濃度ではアルカリ滴定法、低濃度では比色法を用いることとされている。食品の二酸化硫黄分析法としては、通気蒸留後に比色法²⁾、イオンクロマトグラフィー法^{3)~6)}、アルカリ滴定法⁷⁾を用いる報告がある。比色法に比べて操作が簡易であるアルカリ滴定法は微量分注器を用いると低濃度側でも適応可能なことから、精度管理を実施する上での分析操作における留意点について検討したので報告する。

2 方法

2.1 試料

たくあん、煮豆、蜂蜜、水飴、ワイン、乾燥マンゴーの6食品。6食品のうちワイン、乾燥マンゴーを除く4食品には二酸化硫黄が含まれていないことを事前に確認済みである。

2.2 試薬等及び試液

試薬等及び試液：厚生労働省通知法¹⁾に従った。亜硫酸水素ナトリウム(特級)、エタノール(高速液体クロマトグラフ用)、過酸化水素(特級)、0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液(容量分析用)、リン酸(一級)、メチルレッド(特級)及びメチレンブルー(特級)は富士フィルム和光純薬製、シリコーン樹脂(食品添加物)は信越化学工業製を用いた。

標準亜硫酸溶液：亜硫酸水素ナトリウム 200mg をミリQ水 100mL に溶かした。

2.3 装置

宮本理研工業製亜硫酸定量装置 AR-20 を用いた。ただし、丸底フラスコは三商 100mL 丸底フラスコ、ナンシ型フラスコはファルコン製 50mL 用ポリプロピレンコニカルチューブを用い、定量はニチヨー製可変式連続分注器 8100(シリンジ 0.6mL、1 滴=0.01mL)を用いた。

2.4 分析法

厚生労働省通知法¹⁾に準じ、50mL コニカルチューブに 0.3%過酸化水素溶液 10mL を入れ、メチルレッド・メチレンブルー試液 1 滴を加え、0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液 0.01mL を加え緑色とし装置捕集側に取り付けた。100mL 丸底フラスコに試料 2.0g、ミリQ水 20mL、エタノール 2mL、シリコーン樹脂 2 滴、25%リン酸 10mL を加え装置に取り付けた。窒素ガスを 0.55L/分で通気し、マイクロガスバーナーの炎の高さは 5cm とし 10 分間加熱後に、可変式連続分注器 8100 を用いて 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液で液が緑色になるのを終点とし定量した。

3 結果および考察

3.1 標準溶液

標準品はミリQ水に溶解し、ヨウ素液で標定し用いた。冷蔵保存後に濃度の低下が確認されたので、用時調製とした。なお、亜硫酸水素ナトリウムは 1%トリエタノールアミン溶液中では 12 か月間経時的に標定したところ安定であるとの報告がある³⁾。

3.2 可変式連続分注器 8100 の精度

ミリQ水で 30 回繰返し 0.01mL 採取し、重量を測定したところ、平均で 0.00990mg、標準偏差 0.00025mg であり、精度は高かった。

3.3 試料添加後の経過時間

たくあん 2.0g(n=2)に二酸化硫黄を 0.10g/kg になるように添加し、静置なしで 10 分加熱したものと、静置 30 分後に加熱 10 分または 20 分に延長したものを実施した(表 1)。静置なしでは回収率は 97.9%及び 99.4%であったが、静置 30 分後では 10 分加熱で 91.7%及び 93.2%、加熱時間を 20 分に延長すると 96.3%及び 97.9%であった。30 分静置の間に亜硫酸水素ナトリウムが食品内部に浸透し、回収率を低下させ、加熱時間の 20 分延長で増加する現象が他の食品でも想定される。今回は使用状態に近づけるため、添加回収試験は試料添加後 30 分静置し、加熱時間は 10 分で実施した。

表 1. たくあんの添加後の静置時間および加熱時間と回収率の関係(n=2)

添加後の静置時間(分)	加熱時間(分)	回収率(%)		
		①	②	平均
0	10	97.9	99.4	98.7
30	10	91.7	93.2	92.5
	20	96.3	97.9	97.1

3.4 器具反復使用のための洗浄へのエタノール使用

通気蒸留装置は使用后、二酸化硫黄を含め食品中の揮発性成分が付着し、次の分析を妨害すると考えられるので、洗浄が必要である。使用した通気蒸留装置を図 1 に示す。

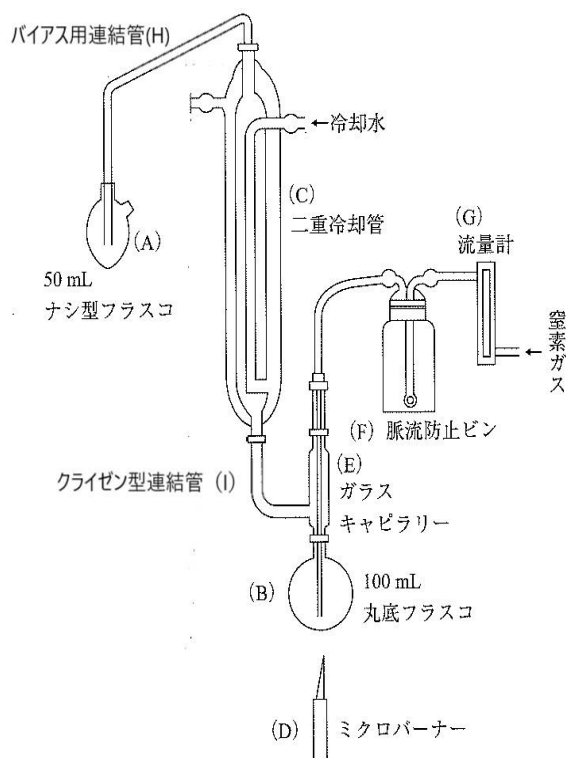


図 1. 通気蒸留装置

器具で洗浄が必要と考えられるのは丸底フラスコ(B)からコンカルチューブ(A)までの 6 点あり、そのうち丸底フラスコ(B)は通常の洗浄、コンカルチューブ(A)は交換した。装置から取り外しが困難なクライゼン型連結管(I)及び二重冷却管(C)は上からミ Q 水及びエタノールで洗浄した。装置からの取り外しは容易であるが連続分析する上で必要な本数が確保できていなかったガラスキャ

ピラリー(E)及びバイアス用連結管(H)は取り外し給湯の湯及びエタノールで洗浄した。

エタノール洗浄を行った経緯は次の通りである。過去に高濃度のピロ亜硫酸ナトリウムを含む食品の分析し、器具洗浄後も二酸化硫黄が検出され続けた経験があった。有機物を水より溶解し易いと考えられるエタノールで、二重冷却管を洗浄したところ有効であったことから、今回も二重冷却管及びクライゼン型連結管に当該洗浄を実施した。今回、煮豆などの添加回収試験で同一日に連続して実施したとき、一回目に比べ二回目では数値が低くなる傾向が認められた。その原因としてガラス器具に付着した洗浄水の残渣への亜硫酸の付着が考えられたため、他の器具にも当該洗浄を追加した。煮豆又は水 2.0g に二酸化硫黄として 0.1g/kg 添加して連続分析した際に、次の分析との間に洗浄時にエタノール洗浄を付け加えた場合と無い場合の結果を表 2 に示す。

表 2. 添加回収率と洗浄時のエタノール使用有無の関係

試料	回収率(%)	
	エタノール洗浄有	エタノール洗浄無
1 煮豆	83.1	83.1
2 煮豆	84.6	78.6
3 煮豆	86.0	86.0
4 煮豆	89.0	86.0
5 水	96.4	90.4
6 水	96.4	90.4

3.5 乾燥マンゴーにおける加熱時間

乾燥果実は加熱時間 10 分後も検出されるとの報告がある⁷⁾。ピロ亜硫酸ナトリウム使用の表示がある乾燥マンゴー片 17g をビーカー内でハサミで均一化し、パラツキを考慮し 2.0g(n=4)を 50 分間加熱し、10 分以後は 5 分間隔で 50 分まで分析した(表 3、図 2)。4 検体とも加熱時間 10 分以後も増加し、50 分加熱を基準として 10 分では 63.9~74.1%、20 分では 87.9~93.1%、30 分では 94.4~97.2%、40 分では 98.4~99.0%であった。今回の実験した区分の最後の部分に該当する 45 分間から 50 分間の 5 分間でも 4 検体とも 0.001mg/kg ~0.002mg/kg の間で増加していた。

表 3. 乾燥マンゴーの加熱時間および濃度の関係
(n=4)

加熱時間(分)	濃度(g/kg)				平均
	①	②	③	④	
10	0.204	0.193	0.161	0.170	0.182
15	0.250	0.228	0.206	0.204	0.222
20	0.267	0.241	0.223	0.218	0.237
25	0.277	0.248	0.236	0.229	0.248
30	0.280	0.251	0.239	0.234	0.251
35	0.283	0.254	0.245	0.239	0.255
40	0.285	0.256	0.249	0.244	0.259
45	0.287	0.257	0.250	0.247	0.260
50	0.288	0.259	0.252	0.248	0.262

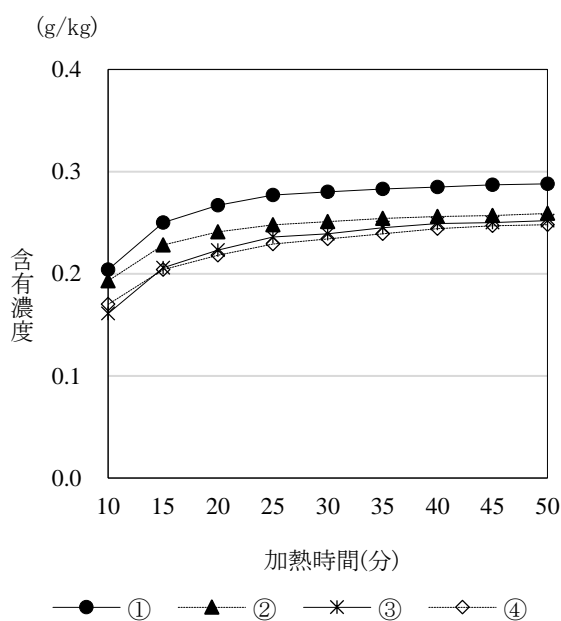


図 2. 乾燥マンゴー中の含量と加熱時間の関係(n=4)

3.6 乾燥マンゴーにおける添加回収試験

上記の乾燥マンゴー2.0gに二酸化硫黄として1.0g/kg添加し、30分間加熱の間に10分間隔で定量した結果(n=3)を表4に示す。回収率は同一加熱時間で得られた乾燥マンゴーの平均値を差し引いて算出した。回収率の各時間の平均は10分では95.4%、20分では95.8%、30分では96.0%とほぼ同一であり、加熱時間が10分あれば良好な結果が得られることが示唆された。

表 4. 乾燥マンゴーの添加回収率と加熱時間の関係
(n=3)

加熱時間(分)	回収率(%)			平均
	①	②	③	
10	94.5	96.0	95.6	95.4
20	95.4	96.9	95.0	95.8
30	95.7	97.1	95.2	96.0

3.7 添加回収試験

水、たくあん、煮豆、蜂蜜、水飴、ワイン、乾燥マンゴーにおける添加回収試験結果を示す(表5)。いずれも試料量2.0g、加熱時間10分でn=2で実施した。添加濃度は水、たくあん、蜂蜜、水飴及び煮豆は0.10g/kg、ワインは0.30g/kg、乾燥マンゴーは1.0g/kgとした。平均回収率(n=2)は水94.0%、たくあん85.3%、煮豆86.5%、蜂蜜88.8%、水飴92.5%、ワイン92.5%、乾燥マンゴーは95.3%であった。

表 5. 食品等の添加回収試験結果(n=2)

たくあん及び乾燥マンゴーは再掲

試料	添加前の試料中の濃度(g/kg)	添加濃度(g/kg)	回収率(%)		
			①	②	平均
			水	nd	0.10
たくあん	nd	0.10	84.6	86.0	85.3
煮豆	nd	0.10	89.5	83.5	86.5
蜂蜜	nd	0.10	91.0	86.5	88.8
水飴	nd	0.10	92.5	92.5	92.5
ワイン	0.12	0.30	92.0	93.0	92.5
乾燥マンゴー	0.182	1.00	94.5	96.0	95.3

4 まとめ

アルカリ滴定法で十分低濃度まで分析できた。標準の添加後30分静置は、静置しないものに比べて回収率の低下が認められたが、使用状態に近づけるため添加後30分静置して試験した。加熱時間も通知のとおり10分とした。通気蒸留装置の洗浄にエタノールを用いると、添加回収率の同一日の1回目と2回目の差が減少し、回収率増加と再現性の向上が示唆された。乾燥

マンゴーは加熱時間 10 分以後も徐々に増加し 50 分まで濃度の上昇が確認された。バックグラウンドより高濃度添加し、バックグラウンドを差し引くと加熱時間 10 分、20 分、30 分とほとんど差が認められなかった。6 食品での回収率は 85.3%～95.3%と良好であった。

参考文献

- 1) 「食品中の食品添加物分析法」の改正について(令和元年 6 月 28 日付、厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長通知、薬生食基発 0628 第 1 号)
- 2) 柴田正ら:食衛誌、31、57～66(1990)
- 3) 松本ひろ子ら:食衛誌、42、329-334(2001)
- 4) 下井俊子ら:食衛誌、45、332～338(2004)
- 5) 関戸晴子ら:神奈川県衛生研究所報告、41、24～27(2011)
- 6) 酒井康宏ら:神奈川県衛生研究所報告、50、28～30(2020)
- 7) 鈴木裕司ら:福島県衛生研究所年報、33、46-49(2015)

LC-MS/MSを用いた牛筋肉及び牛腎臓中 残留動物用医薬品スクリーニング分析法の検討

吉野共広、山路章、八木正博、向井健悟
神戸市健康科学研究所 生活科学部

1 はじめに

当研究所の畜水産物の収去検査において、残留合成抗菌剤45項目の検査は、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験I(畜水産物)」¹⁾に則り、LC-MS/MSを用いた一斉分析法を、残留抗生物質の検査は「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改定)」及び「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(改定)」²⁾に則り、簡易検査法(ペーパーディスク法)を、ペーパーディスク法が陽性であった場合は分別推定法を実施している。分別推定法が陽性となった場合、違反に該当するかの判断をするには、該当抗生物質が基準値を超える残留値かどうかを定量する必要があるが、当所においては未だ定量まで至った事例はない。分別推定法が陽性になった場合に備え、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性確認ガイドラインについて」³⁾(以下、ガイドラインという。)に基づき分析法の妥当性評価を実施し、LC-MS/MSを用いた抗生物質を含む動物用医薬品等の検査体制を構築する必要がある。

畜水産物中に残留する抗生物質のLC-MS/MSによる分析法については、ペニシリン系やテトラサイクリン系といった系統別の試験法⁴⁻⁸⁾や、複数系統の抗生物質を同時に分析する方法⁹⁻¹⁸⁾も開発されている。

本研究では、非常に高い極性を有するアミノグリコシド系を除く抗生物質を網羅的に分析することを目的とし、動物用医薬品スクリーニング分析法の検討を行った。それらの結果について報告する。

2 実験方法

2.1 試料

試料は、分析対象の抗生物質等が残留していないことを確認した牛筋肉及び牛腎臓を用いた。

2.2 試薬等

対象とした38種の動物用医薬品を表1に示す。38種の内訳は、テトラサイクリン系抗生物質4種、ペニシリン系抗生物質9種、セファロsporin系抗生物質6種、マクロ

ライド系抗生物質9種、合成抗菌剤6種、その他4種である。これらの動物用医薬品の標準品は、富士フィルム和光純薬工業製、Merck(Sigma-Aldrich)製、Merck(Supelco)製を用いた。

アセトニトリル(残留農薬・PCB試験用又はLC/MS用)、ギ酸(LC/MS用)、りん酸水素二ナトリウム(無水)(特級)、クエン酸(無水)(特級)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(試薬研究用、以下「EDTA・2Na」という。)を用いた。水はMerck(Millipore)製の超純水製造装置Milli-Q IQ7000で精製したMilli-Q水を使用した。

EDTA含有クエン酸緩衝液(pH 4.0)は、クエン酸21.0gを水に溶かして1,000 mLとし(第1液)、りん酸水素二ナトリウム(無水)28.4gを水に溶かし1,000 mLとした(第2液)後、第1液307 mLと第2液193 mLを混和し、EDTA・2Na 1.86gを溶解し、調製した。

2.3 器具及び機器

50 mL ポリプロピレン(PP)製遠心管: CORNING 社製 FALCON 遠心分離用コニカルチューブ

1.5 mL PP製バイアル: GL Sciences 製スクリューバイアル PP透明

フードプロセッサー: CONAIR 社製 Cuisinart DLC-10PRO

ホモジナイザー: IKA 社製 ULTRA-TURRAX T25-Basic
冷却遠心分離機: 久保田商事製 ユニバーサル冷却遠心機 5911

振とう器: 東京理化機器製 分液ロート振とう機 MMV-1000W

高速遠心分離機: トミー工業製 微量高速遠心機 MX-300

シリンジフィルター: Merck(Millipore)製 Millex-LG 孔径 0.20 µm、直径 4 mm、親水性 PTFE

LC: 島津製作所製 SHIMADZU LC-20A Series

MS: AB Sciex 製 QTRAP4500

2.4 分析条件

カラム: GL Sciences 製 InertSustain AQ-C18 PEEK
 (2.1×150 mm, 3 μm)
 移動相: A 液 0.1%ギ酸水溶液、B 液アセトニトリル
 グラジエント(B 液): 5%(0→2 分)→95%(10→15 分)
 →5%(15→25 分)
 流速: 0.2 mL/min
 カラム温度: 40°C
 注入量: 5 μL
 イオンソース温度: 500°C
 イオン化法: ESI(+), ESI(-)
 イオンスプレー電圧: 5500 V(+), -4500 V(-)
 測定モード: SRM(表 1)

2.5 試験溶液の調製

松本らの希釈法¹⁴⁾を参考にした分析フローを図 1 に示す。器具については、ガラス製器具への吸着を防ぐために PP 製器具を使用し^{12,14)}、ペニシリン系抗生物質はメタノール付加体を形成し定量値の低下やばらつきのがあったため^{19,20)}メタノールは使用しないこととした。

均一化した試料 5.0 g を 50 mL 容の PP 製遠心管(A) に量り採り、0.2%ギ酸含有アセトニトリル 15 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みを PP 製遠心管(B)に分取する。残渣に 0.2%ギ酸含有アセトニトリル 15 mL を加えて、5 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた上澄みを先の PP 製遠心管(B)に合わせる。さらに残渣に EDTA 含有クエン酸緩衝液 15 mL を加えて、5 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みを先の PP 製遠心管(B)に合わせ、水で 50 mL に定容する。その溶液を混和後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離する。得られた上澄みを 1.5 mL 容の PP 製チューブに分取したものを 12,000 rpm で 3 分間遠心分離後、0.2 μm フィルターでろ過し、PP 製バイアルに分取したものを試験溶液とする。

2.6 標準原液・混合標準溶液

各標準品を秤量し、物質の溶解性に応じてアセトニトリル、アセトニトリル/水(2:3)に溶解し、各標準原液 1000 μg/mL を調製した。標準溶液の調製についても、ペニシリン系抗生物質がメタノール付加体を形成しないようにメタノールは使用しないこととした^{19,20)}。

アセトニトリル溶液に溶解した標準はジョサマイシン、ミロサマイシン、スルファモノトキシム、エンロフロキサシン、オルメトプリム、メクロプラミド、デキサメタゾンの 7 種であ

った。ただし、オルメトプリムを除く 6 種はアセトニトリルで 1,000 μg/mL に、アセトニトリルにやや溶けにくいオルメトプリムは 200 μg/mL に調製した。アセトニトリルで調製した 7 種及び富士フィルム和光純薬製の動物用医薬品混合標準液(マクロライド系抗生物質 7 種、各 20 μg/mL アセトニトリル溶液)を除いた 24 種については、アセトニトリル/水(2:3)に溶解して 1,000 μg/mL に調製した。

各標準原液及び富士フィルム和光純薬製の動物用医薬品混合標準液(マクロライド系抗生物質 7 種)を混合し、10 μg/mL の混合標準溶液を調製した。

2.7 マトリックス検量線

検量線作成用の標準液は、10 μg/mL 混合標準溶液をアセトニトリル/水(3:2)で希釈した 1 μg/mL 100 μL に、フィルターろ過したマトリックス試料粗抽出液 900 μL を加え、マトリックス添加標準溶液 100 ng/mL を調製した。このマトリックス添加標準液をマトリックス試料粗抽出液で段階希釈した 0.2、0.5、1、2、5、10 ng/mL の 6 点のうち、物質の感度に合わせて 0.2~5 若しくは 0.5~10 ng/mL のマトリックス検量線を用いて定量値を算出した。

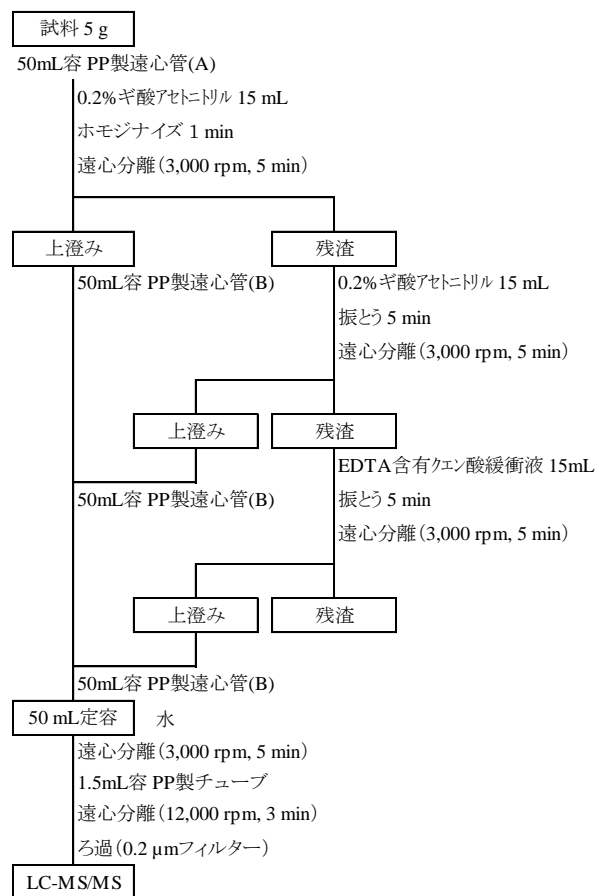


図 1 分析フロー

表 1 検討した化合物およびイオン化最適条件

No.	動物用医薬品名	保持時間 (分)	分子量	イオン化 モード	プレカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision cell exit potential (V)	
1	テトラサイクリン系 抗生物質	Oxytetracycline	7.9	460.4	posi	461.1	426.0	81	27	14
							443.1	81	17	14
						478.9	444.0	96	29	18
							462.1	96	23	16
3	Doxycycline	8.8	444.4	posi	445.0	428.0	55	25	12	
						154.2	55	40	12	
4	Tetracyclin	8.1	444.4	posi	445.1	410.0	81	27	16	
						427.2	81	17	14	
5	Ampicillin	7.6	349.4	posi	350.1	105.9	61	21	8	
						160.0	61	17	14	
6	Amoxicillin	6.7	365.4	posi	365.9	349.0	51	11	14	
						113.8	51	25	8	
7	Cloxacillin	10.7	435.9	nega	434.1	292.7	-60	-16	-19	
						389.9	-60	-10	-11	
8	Dicloxacillin	11.1	470.3	nega	468.0	326.7	-65	-14	-21	
						423.8	-65	-10	-25	
9	ペニシリン系 抗生物質	Nafcillin	10.8	414.5	posi	415.0	199.0	76	17	8
							171.1	76	21	12
10	Oxacillin	10.4	401.4	posi	401.9	243.0	61	17	10	
						160.0	61	17	8	
11	Mecillinam	8.1	325.1	posi	326.0	167.1	111	29	10	
						139.0	111	37	10	
12	Penicillin G	9.8	334.4	posi	335.0	160.0	61	13	8	
						176.0	61	15	8	
13	Penicillin V	10.1	350.4	posi	350.9	160.0	56	17	10	
						114.0	56	43	6	
14	Cefazolin	8.2	454.5	posi	455.0	323.0	50	15	12	
						156.0	50	23	12	
15	Cefoperazone	8.6	645.7	posi	646.0	530.1	51	15	22	
						143.1	51	33	10	
16	セファロスポリン系 抗生物質	Cefalonium	7.7	458.5	posi	458.8	337.0	31	13	12
							158.0	31	25	20
17	Cefapirin	7.2	423.5	posi	423.8	292.0	61	19	12	
						152.0	61	29	10	
18	Ceftiofur	9.2	523.6	posi	523.8	241.0	81	23	10	
						124.9	81	81	8	
19	Cefalexin	7.6	347.4	posi	348.0	157.9	61	11	8	
							174.1	61	19	8
20	Josamycin	10.3	828.0	posi	828.5	109.3	71	45	10	
						174.3	71	45	10	
21	Mirosamicin	9.1	727.9	posi	728.5	158.3	101	37	14	
						116.1	101	29	16	
22	Neospiramycin I	8.0	698.9	posi	350.3	160.0	71	17	12	
						174.1	71	21	10	
23	Spiramycin I	8.2	843.1	posi	422.3	174.2	51	27	6	
						101.0	51	19	10	
24	マクロライド系 抗生物質	Tilmicosin	8.7	869.1	posi	870.7	88.2	60	111	13
							174.0	60	61	13
25	Erythromycin A	9.3	733.9	posi	734.1	158.0	26	33	8	
						576.0	26	27	22	
26	Tylosin	9.5	916.1	posi	916.5	772.3	11	41	28	
						83.1	11	127	12	
27	Tiamulin	9.9	493.7	posi	494.3	192.0	51	27	14	
						118.9	51	59	10	
28	Leucomycin A5	9.9	771.9	posi	772.4	174.0	16	37	6	
						109.1	16	87	10	
29	サルファ剤	Sulfamonomethoxine	8.9	280.1	posi	281.0	155.9	60	24	13
								92.0	60	41
30	フェニコール系	Florfenicol	9.2	358.2	nega	355.9	184.8	-75	-24	-7
						118.8	-75	-42	-9	
31	フルオロキノロン系	Marbofloxacin	7.8	362.4	posi	363.1	72.1	60	53	13
								320.0	60	22
32	Enrofloxacin	8.1	359.4	posi	360.1	316.2	60	25	13	
						245.0	60	37	13	
33	Orbifloxacin	8.2	395.4	posi	396.0	352.0	60	25	13	
							295.0	60	34	13
34	薬酸拮抗剤	Ormetoprim	8.0	274.3	posi	275.1	123.0	60	32	13
								231.0	60	36
35	Metoclopramide	8.2	299.8	posi	300.0	227.1	86	25	10	
						184.0	86	11	10	
36	Chlorpheniramine	8.8	274.8	posi	275.0	230.1	51	21	10	
						167.0	51	49	12	
37	Diphenhydramine	9.4	255.4	posi	256.5	167.0	41	15	12	
						151.9	45	5	12	
38	Dexamethasone	10.1	392.5	posi	393.0	373.1	71	11	14	
							355.1	71	15	14

2.8 添加回収試験

均一化した牛筋肉及び牛腎臓試料に動物用医薬品の一律基準である 0.01ppm になるように、1 µg/mL 混合標準溶液 50 µL を添加し、30 分間静置したものを添加回収試験用試料とした。牛腎臓試料で回収率が低下する化合物が存在したため、比較のために、標準溶液添加と同時に静置せずに抽出を開始した試料についても併せて試験を実施した。

3 結果及び考察

3.1 LC カラムの検討

GL Sciences 製 InertSustainC18 カラム(2.1×100 mm、3 µm)及び GL Sciences 製 InertSustain AQ-C18 PEEK カラム(2.1×100 mm、3 µm)について、10 ng/mL の混合標準溶液を用いて比較検討した。

結果、C18 カラムを使用した場合と比較して、AQ-C18 PEEK カラムを使用した際の化合物のピーク面積及び高さは、全ての化合物で同等以上(アモキシシリンを除き 1.0 ~ 1.9 倍程度)であった。特に、アモキシシリンの増加率は高く、ピーク面積は 2.4 倍、高さは 4.8 倍であった。AQ-C18 PEEK カラムを使用した際の化合物の保持時間は、C18 カラムと比較して保持が良好であり、アモキシシリン以外の化合物では 0.2~0.6 分、アモキシシリンでは 2.1 分保持時間が長かった。保持時間が後ろへずれ、測定対象物質の溶出時の有機溶媒濃度が高くなることで、イオン化効率が上昇したことが原因と考えられた。

3.2 バイアルの検討

既報¹²⁾において、ガラス製バイアルよりも PP 製バイアルの方が 50 時間後においても安定したピーク面積で測定可能であるが、PP 製バイアルの場合であっても 10%アセトニトリル(アセトニトリル/水(1:9))溶液中のナフシリンのピーク面積が 45%まで減少する結果が確認された。本研究では希釈溶液が異なるため、同様の検証を実施した。

混合標準 10 ng/mL(アセトニトリル/水(3:2)溶液)を、Waters 製不活性処理済み透明ガラスバイアル及び GL Sciences 製 PP 製透明バイアル(各 n=3)に調製し、調製直後、10 及び 50 時間後(4°C冷蔵保存)に測定し、PP 製の調製直後のピーク面積を 100 として、比較した。

結果、ガラス製バイアルでは調製直後でもピーク面積が減少している化合物が 3 項目(ネオスピラマイシン I、スピラマイシン I、チルミコシン)存在した。一方、PP 製バイアルでは調製後 50 時間後でも、ナフシリンを含む全化合

物のピーク面積でほぼ減少はみられなかった(表 2)。よって、バイアルは PP 製を使用することとした。また、試験溶液の調製においても、ガラス器具ではなく PP 製器具を使用することとした。

表 2 化合物のバイアルごとの経時変化(n=3)
(希釈溶液:アセトニトリル/水(3:2)、調製直後(0H)、
10 時間後(10H)、50 時間後(50H)の比較)

No.	動物用医薬品名	調製直後のPP製バイアルの ピーク面積を100とした値				
		PP製 バイアル		不活性処理済み ガラスバイアル		
		10H	50H	0H	10H	50H
1	Oxytetracycline	98	105	102	101	99
2	Chlortetracycline	90	103	101	96	101
3	Doxycycline	102	96	106	96	97
4	Tetracyclin	93	99	100	95	92
5	Ampicillin	99	101	103	102	104
6	Amoxicillin	100	118	104	108	118
7	Cloxacillin	95	117	104	103	129
8	Dicloxacillin	99	107	100	94	86
9	Nafcillin	87	89	102	87	92
10	Oxacillin	94	91	99	97	92
11	Mecillinam	91	98	100	95	100
12	Penicillin G	93	93	101	94	94
13	Penicillin V	96	95	106	95	93
14	Cefazolin	100	100	102	100	97
15	Cefoperazone	95	107	109	102	109
16	Cefalonium	88	99	104	99	97
17	Cefapirin	100	103	103	104	104
18	Ceftiofur	93	96	101	96	97
19	Cefalexin	92	96	98	93	94
20	Josamycin	89	93	97	90	93
21	Mirosamycin	88	97	97	89	98
22	Neospiramycin I	88	101	23	13	19
23	Spiramycin I	90	103	26	13	18
24	Tilmicosin	103	110	0	0	0
25	Erythromycin A	84	101	102	89	100
26	Tylosin	85	89	100	83	91
27	Tiamulin	90	100	99	93	98
28	Leucomycin A5	87	92	96	89	93
29	Sulfamonomethoxine	91	96	102	94	99
30	Florfenicol	93	91	98	102	82
31	Marbofloxacin	96	104	90	81	84
32	Enrofloxacin	95	105	93	86	85
33	Orbifloxacin	91	96	96	91	94
34	Ormetoprim	89	93	100	91	94
35	Metoclopramide	85	92	100	89	93
36	Chlorpheniramine	86	91	95	84	86
37	Diphenhydramine	89	95	98	88	95
38	Dexamethasone	90	88	101	89	105

3.3 標準品の保存性

調製から半年後(褐色ガラス製保存容器、4°C冷蔵保

存)の混合標準溶液(各 10 µg/mL)と単品の標準原液を、それぞれ 10 ng/mL に希釈し、ピーク面積を比較し、保存性を確認した。

混合標準中では、セファロスポリン系抗生物質が劣化する傾向にあった。単品の標準原液については、ペニシリン系抗生物質のナフシリン、ペニシリン G(ベンジルペニシリン)、ペニシリン V(フェノキシメチルペニシリン)、セファロスポリン系抗生物質のセファピリン、セフロキシムの各 1,000 µg/mL アセトニトリル/水(2:3)溶液が大幅な減衰傾向にあった。これら 5 種の標準原液を用時調製し、測定直前に混合標準液を調製することとした。今後、標準原液や混合標準溶液の保存瓶についても、ガラス製と PP 製を比較検討する必要がある。

3.4 添加回収試験

動物用医薬品 38 項目に対して、牛筋肉及び牛腎臓を用いた添加回収試験の結果(n=5)を表 3 に示す。牛腎臓の 2 項目を除き、ガイドラインの示す目標値である真度(回収率)70~120%、併行精度 25%未満の範囲に入り、概ね良好な結果であった。牛筋肉の回収率は70~98%、併行精度は 0.8~9.7%、牛腎臓では回収率が低い 2 項目を除き 72~96%及び 1.4~9.9%であり、本法は、スクリーニング検査として十分使用できる試験法であった。

添加回収率が低い物質は、牛腎臓でのセファピリン、セフチオフルの 2 項目であった。回収率低下の原因を探るため、標準添加と同時に抽出操作を開始する添加回収試験を実施したところ、セファピリンは回収率 97%、併行精度 6.1%、セフチオフルは回収率 97%、併行精度 6.1%と、良好な結果であった。つまり、既報^{10,21-23)}どおり、セファピリンは酵素反応の影響で脱アセチル化セファピリンに、セフチオフルは、デスフロイルセフチオフルに代謝され、回収率が低下したと考えられる。今後、代謝物を含めた定量や、酵素反応が進まない条件(温度・pH)等を検討する必要がある。

4 まとめ

牛筋肉及び牛腎臓中の動物用医薬品 38 項目について、LC-MS/MS によるスクリーニング分析法を検討した。LC カラムに AQ-C18 PEEK カラムを使用することで、特にアモキシシリンについて感度良く測定することができた。また、混合標準溶液をアセトニトリル/水(3:2)で希釈した場合でも PP 製バイアルが有用であり、50 時間後でも安定した測定が可能であった。添加回収試験を行った結果、牛

腎臓の 2 項目(セファピリン、セフチオフル)を除き、ガイドラインの真度及び併行精度の目標値を満たした。

5 今後の展望

今後、標準原液や混合標準溶液の保存瓶の検討、代謝物を含めた定量、酵素反応が進まない条件の探索、今回対象から除いたアミノグリコシド系抗生物質の一斉分析を検討する予定である。

表 3 添加回収試験結果(n=5)

No	動物用医薬品名	牛筋肉	牛腎臓
1	Oxytetracycline	74(7.7)	84(9.7)
2	Chlortetracycline	73(2.9)	77(6.8)
3	Doxycycline	73(4.1)	76(5.0)
4	Tetracyclin	73(8.6)	72(2.6)
5	Ampicillin	73(4.8)	86(4.4)
6	Amoxicillin	82(7.1)	93(5.7)
7	Cloxacillin	78(8.6)	94(7.7)
8	Dicloxacillin	71(5.6)	85(9.9)
9	Nafcillin	81(0.8)	87(1.4)
10	Oxacillin	91(1.9)	89(2.7)
11	Mecillinam	82(6.8)	92(6.4)
12	Penicillin G	87(5.7)	92(2.5)
13	Penicillin V	83(4.8)	85(2.2)
14	Cefazolin	83(9.0)	78(9.8)
15	Cefoperazone	85(9.7)	81(8.4)
16	Cefalonium	82(4.6)	94(8.8)
17	Cefapirin	75(8.4)	55(46)
18	Ceftiofur	70(4.6)	58(27)
19	Cefalexin	74(8.7)	91(6.1)
20	Josamycin	90(6.9)	90(6.4)
21	Mirosamicin	94(5.4)	85(4.7)
22	Neospiramycin I	83(5.3)	80(7.8)
23	Spiramycin I	84(5.1)	81(6.5)
24	Tilmicosin	96(5.5)	94(9.1)
25	Erythromycin A	93(5.5)	81(1.5)
26	Tylosin	87(4.7)	85(3.1)
27	Tiamulin	93(3.0)	94(4.5)
28	Leucomycin A5	92(4.6)	85(4.5)
29	Sulfamonomethoxine	91(8.5)	95(7.3)
30	Florfenicol	88(7.4)	93(6.7)
31	Marbofloxacin	84(6.4)	95(3.0)
32	Enrofloxacin	90(7.5)	89(3.4)
33	Orbifloxacin	85(5.9)	96(8.3)
34	Ormetoprim	90(2.2)	90(4.9)
35	Metoclopramide	94(3.2)	91(3.4)
36	Chlorpheniramine	96(5.0)	81(3.4)
37	Diphenhydramine	98(2.3)	91(4.0)
38	Dexamethasone	93(4.3)	89(8.1)

()内の数字は併行精度(%)

参考文献

- 1) 平成 17 年 1 月 24 日付け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」食安発第 0124001 号(2005).
- 2) 平成 6 年 7 月 1 日付け厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知「平成 6 年度畜水産食品の残留有害物質のモニタリング検査の実施について」衛乳第 107 号(1994).
- 3) 平成 22 年 12 月 24 日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」食安発第 1224 第 1 号(2010).
- 4) 畑野和広:LC/MS/MS による動物組織中のペニシリン系抗生物質の同時定量,食品衛生学雑誌,44,1-6(2003).
- 5) 服部涼子他:鶏肉及び牛肉中のβラクタム系抗生物質の簡便な一斉分析法の検討,兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告,7, 10-16(2016).
- 6) Asakawa D *et al.* Sensitivity enhancement of aminoglycosides in hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry by post-column addition of trace sodium acetate in methanol, Food Additives & Contaminants: Part A, 35, 1116-1126(2018).
- 7) 灘波順子他:LC-MS/MS を用いた牛の筋肉及び腎臓中のアミノグリコシド系抗生物質に関する一斉分析法の検討,岡山県環境保健センター年報,44, 71-77(2020).
- 8) 前原香純他:エピマーを含むテトラサイクリン系抗生物質の分析法の検討,鹿児島県環境保健センター所報,21, 84-89(2020).
- 9) Goto T *et al.* High-throughput analysis of tetracycline and penicillin antibiotics in animal tissues using electrospray tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring transition,Journal of Chromatography A, 1100, 193-199 (2005).
- 10) 河原さおり他:LC/MS/MS を用いた豚のβ-ラクタム及びテトラサイクリン系抗生物質の同時分析,平成 20 年度熊本市環境総合研究所報,16, 43-48(2009).
- 11) 村川弘他:LC/MS/MS を用いた畜水産食品中の動物用医薬品迅速分析法の検討(第 2 報),平成 21 年度熊本県保健環境科学研究所報,39, 21-25 (2009).
- 12) 久保記久子他:LC-MS/MS による畜水産物中の動物用医薬品等の一斉分析(III),平成 21 年度福岡市保健環境研究所報,35, 110-115(2009).
- 13) 上村聖子他:LC/MS/MS による魚介類・食肉・鶏卵中残留動物用医薬品スクリーニング分析法の検討,平成 22 年度 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報,73, 39-44(2011).
- 14) 松本理世他:LC/MS/MS を用いた畜水産物中動物用医薬品等の迅速一斉分析法の検討(第 3 報),熊本県保健環境科学研究所報,44, 28-37(2014).
- 15) Kanda M *et al.* Multi-residue determination of polar veterinary drugs in livestock and fishery products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Journal of AOAC international, 98, 230-247(2015).
- 16) 藤井良昭他:高速液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法による畜肉中のテトラサイクリン系及びβ-ラクタム系抗生物質の一斉分析,分析化学,66, 369-374(2017).
- 17) 関村光太郎他:豚筋肉中残留動物用抗菌剤の微生物学的スクリーニングおよびLC-MS/MS 同時測定法の開発,食品衛生学雑誌,61, 109-118(2020).
- 18) 山本直美他:LC-MS/MS による動物用医薬品等一斉試験法—その 1—精製方法の比較検討について—,令和元年度 堺市衛生研究所年報,37, 67-71(2021).
- 19) Svetlana G *et al.* Study on the formation of an amoxicillin adduct with methanol using electrospray ion trap tandem mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom., 22, 67-74 (2008).
- 20) 西村一彦他:ペニシリン系抗生物質のメタノール付加体形成に関する研究,北海道衛生研究所所報,64, 17-21 (2014).
- 21) Fagerquist K C *et al.* Confirmatory analysis of β-lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom., 17, 660-671(2003).
- 22) Fagerquist K C *et al.* Confirmatory and quantitative analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Anal. Chem., 77, 1473-1482(2005).
- 23) Feng S *et al.* Determination of Ceftriaxone Metabolite Desfuroylceftriaxone Cysteine Disulfide in Bovine Tissues Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry as a Surrogate Marker Residue for Ceftriaxone, J. Agric. Food Chem., 62, 5011-5019 (2014).

II 著書及び発表論文記録
(令和2年度)

< 欧文(論文・総説・著書等) >

Two new cases of pulmonary infection by *Mycobacterium shigaense*, Japan

Shiomi Yoshida¹, Tomotada Iwamoto², Takehiko Kobayashi¹, Ryohei Nomoto², Yoshikazu Inoue¹, Kazunari Tsuyuguchi¹, and Katsuhiko Suzuki¹

¹National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ²Kobe Institute of Health

Emerg Infect Dis. 26:2728-2732, 2020

(SY, TI, TK contributed equally)

要旨: An increase in incidence of pulmonary NTM infections among immunocompetent patients in recent years is an emerging public health concern. We report 2 case-patients in Japan with *Mycobacterium shigaense* pulmonary infections. One patient was given aggressive treatment and the other conservative treatment, according to distinctive radiologic evidence. A close phylogenetic relationship based on whole-genome sequencing was found between strain from the conservatively treated patient and a reference strain of cutaneous origin. In summary, we found that the NB-type *M. shigaense* pulmonary strain was closely related to the cutaneous reference strain, but the more pathogenic FC-type strain differed considerably. Our results for this rare species open possibilities for further investigation into this neglected NTM disease and provide indications for the need for therapy.

和訳: 皮膚疾患を引き起こす非結核性抗酸菌の*M. shigaense*による肺感染症2例を経験した。2例のうち1例は結節性気管支拡張症(NBタイプ)を呈しており、もう1例は繊維空洞型(FCタイプ)を呈した。皮膚疾患の原因菌として知られる*M. shigaense*が*M. avium*によって引き起こされる肺MAC症で典型的に認められる二つの病型、すなわち、NBタイプとFCタイプを引き起こした症例を世界で初めて報告した。さらに我々は今回の症例で分離された菌の全ゲノム解析を行い、過去に皮膚疾患を引き起こした*M. shigaense*のゲノム情報との比較を行った。その結果、NBタイプの患者由来株は皮膚疾患患者由来株と全ゲノム中わずかに19カ所しか塩基変異が認められなかったのに対し、空洞を伴い12か月に及ぶ多剤併用化学療法を要したFCタイプ由来株は約7000カ所の変異が認められ、病原性の上昇が示唆された。

Bacterial population kinetics in heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* harbouring rare resistance-conferring mutations in *gyrA* and *rpoB* imply an epistatic interaction of mutations in a pre-XDR-TB patient

Shiomi Yoshida¹, Tomotada Iwamoto², Kentaro Arikawa², Tsuyoshi Sekizuka³, Makoto Kuroda³, Yoshikazu Inoue¹, Satoshi Mitarai⁴, Taisuke Tsuji⁵, Kazunari Tsuyuguchi¹, and Katsuhiko Suzuki¹

¹National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ²Kobe Institute of Health, ³National Institute of Infectious Diseases, ⁴Research Institute of Tuberculosis, ⁵Red Cross Kyoto Daiichi Hospital

J Antimicrob Chemother 75:1722-1725, 2020

(SY and TI contributed equally. TI, Corresponding author)

要旨: Bacterial population kinetics of strains harbouring drug resistance-conferring mutations within a patient often show cryptic resistance in clinical practice. We report a case that showed emergence and dominance of *Mycobacterium tuberculosis* with uncommon *rpoB* and *gyrA* mutations, followed by an *rpoC* compensatory mutation, during treatment. The subclone in this study possessed rare mutations conferring resistance to rifampicin (*rpoB* V170F) and levofloxacin (*gyrA* S91P) and it rapidly outcompeted other subclones during treatment that included levofloxacin but not rifampicin (<7 days). The high-probability compensatory mutation *rpoC* V483A also emerged and became dominant subsequent to the *rpoB* V170F mutation. To the best of our knowledge, this is the first case showing the emergence of such a rare variant that dominated the population within a patient during treatment of TB.

和訳: 薬剤耐性結核により、結核対策は複雑化している。我々は、結核菌の薬剤耐性化が無作為な遺伝子突然変異の集積によるとする「選択仮説」に対して、特定の変異が次に起る変異の方向性に影響するという「選択的誘導仮説」を唱えている。本論文では、ゲノムディープシーケンスにより1群体のポピュレーション変動解析を行うことで、リファンピシン耐性に関与する*rpoB* V170Fとフルオロキノロン耐性に関与する *gyrA* S91P、さらにcompensatory mutationとして知られる*rpoC*変異の体内動態を詳細に解析した。相乗的エピスタシスを実臨床で示唆する貴重な症例である。

Higher genome mutation rates of Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* during human infection

Mariko Hakamata¹, Hatayo Takihata¹, Tomotada Iwamoto², Aki Tamaru³, Atsushi Hashimoto⁴, Takahiro Tanaka⁴, Shaban A Kaboso¹, Gebremichal Gebretsadik¹, Aleksandr Ilinov¹, Akira Yokoyama¹, Yuriko Ozaki¹, Akihito Nishiyama¹, Yoshitaka Tateishi¹, Hiroshi Moro⁵, Toshiaki Kikuchi⁴, Shujiro Okuda¹, and Sohkiichi Matsumoto¹

¹Niigata School of Medicine, ²Kobe institute of Health, ³Osaka Prefectural Institute of Public Health, ⁴Niigata University Medical and Dental Hospital, ⁵Niigata Graduate School of Medical and Dental Sciences

Sci Rep 10:17997, 2020

要旨 : We tracked and obtained an original *Mtb* isolate of Beijing lineage from the 1999 tuberculosis outbreak in Japan, as well as five other isolates that spread in humans, and two isolates from the patient caused recurrence. Three isolates were from patients who developed TB within one year after infection (rapid-progressor, RP), and the other three isolates were from those who developed TB more than one year after infection (slow-progressor, SP). We sequenced genomes of these isolates and analyzed the propensity and rate of genomic mutations. Generation time versus mutation rate curves were significantly higher for RP. The ratio of oxidative versus nonoxidation damages induced mutations was higher in SP than RP, suggesting that persistent *Mtb* are exposed to oxidative stress in the latent state. Our data thus demonstrates that higher mutation rates of *Mtb* Beijing strains during human infection is likely to account for the higher adaptability and an emergence ratio of drug resistance.

和訳 : 結核菌北京株の突然変異率は、Lineage 4 に属する結核菌よりも高く、結核菌北京株の高い病原性や薬剤耐性の要因である可能性が示唆された。遺伝子多型解析では、酸化的損傷に起因すると推定されている突然変異が長期潜伏後発症群の方に多く、潜伏期間中にも薬剤耐性変異が起こる可能性が示唆された。結核菌北京株の高頻度の薬剤耐性化を防ぐためには、感染した結核菌の系統により治療法を検討する必要性も考えられた。今後、結核菌系統の特性を理解し、治療法を工夫することで結核の薬剤耐性化や重篤化を防ぐ有効な対策の構築につながることを期待される。

The Novel Coronavirus Pandemic and the State of the Epidemic in Kobe, Japan.

Noriko Nakanishi, Yoshio Iijima

Kobe Institute of Health,

J Disaster Res 16:84-87. 2021

要旨 : The outbreak of the novel coronavirus disease (COVID-19), caused by the SARS-CoV-2 virus, occurred in Wuhan, China in December 2019 and quickly spread to both the developed and developing countries. The virus will continue to infect humans and animals symptomatically or asymptotically, and humans will be expected to coexist with SARS-CoV-2 by preventing infections and its spread. In this paper, we report on the occurrence of the COVID-19 epidemic in Japan, including the city of Kobe.

和訳 : 2019年12月で武漢に端を発した新型コロナウイルス(COVID-19)は、過去のどのパンデミックより急速に世界中に広がった。世界中に広がったこのウイルスは、ヒトや動物に感染し続けるので、感染防御対策をとって、このウイルスと共存していくことが求められるであろう。神戸を含む日本での流行状況について概説した。

A Genome Epidemiological Study of SARS-CoV-2 Introduction into Japan

Tsuyoshi Sekizuka¹, (略: 12名), Ryohei Nomoto⁹, (略: 11名)

¹Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan, ⁹Department of Infectious Diseases, Kobe Institute of Health, Kobe, Hyogo, Japan.

mSphere. 2020 Nov;5(6) . doi:10.1128/msphere.00786-20.

要旨: This study aimed to evaluate the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) genome sequences from COVID-19 cases and to characterize their genealogical networks to demonstrate possible routes of spread in Japan. We found that there were at least two distinct SARS-CoV-2 introductions into Japan, initially from China and subsequently from other countries, including Europe. Our findings can help understand how SARS-CoV-2 entered Japan and contribute to increased knowledge of SARS-CoV-2 in Asia and its association with implemented stay-at-home / shelter-in-place / self-restraint / lockdown measures. This study suggested that it is necessary to formulate a more efficient containment strategy using real-time genome surveillance to support epidemiological field investigations in order to highlight potential infection linkages and mitigate the next wave of COVID-19 in Japan.

和訳: 本研究はCOVID-19症例から得られたSARS-CoV-2のゲノムネットワーク解析により、日本での感染伝播様式を明らかにすることを目的とした。その結果、日本へのSARS-CoV-2の侵入は、当初は中国から、その後はヨーロッパを含む他国からと、少なくとも2回に分けて行われたことが判明した。今回の結果は、SARS-CoV-2の日本への侵入経路の解明に役立つとともに、アジアにおけるSARS-CoV-2の流行状況や、自粛要請政策との関連性についての知見の蓄積にも貢献するものである。本研究では、潜在的な感染の関連性を明らかにし、日本におけるCOVID-19の次の波を軽減するためには、疫学的な実地調査を支援するために、リアルタイムのゲノムサーベイランスを用いたより効率的な封じ込め戦略を策定する必要があることが示唆された。

Agglutination of Human Polyomaviruses by Using a Tetravalent Glycocluster as a Cross-Linker

Makoto Ogata¹, Takashi Onoda², Ami Koizumi², Yuhei Tokunaga³, Isao Ohta³, Souichi Nukuzuma⁴, Enoch Y. Park⁵, Taichi Usui⁵, and Tetsuro Suzuki³

¹Fukushima University, ²Fukushima College, ³Hamamatsu University School of Medicine, ⁴Kobe Institute of Health,

⁵Shizuoka University

ACS Omega 5:21940-21947, 2020

要旨: Two kinds of tetravalent double-head sialo-glycosides with short/long spacers between the Neu5Aca2, 6Galβ1, 4GlcNAc units and ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) scaffold were found to be capable of binding to virus-like particles of Merkel cell polyomavirus (MCPyV-LP). The assay also showed the effective capture of particles of pathogenic, infectious human polyomavirus JCPyV when complexed with a ligand, suggesting its possible application as a method for trapping viruses by filtration under conditions of virus aggregation. These results show that the tetravalent glycocluster serves as a ligand not only for agglutinating MCPyV-LP but also for trapping the pathogenic virus.

和訳: ウイルスの糖鎖構造 Neu5Aca2, 6Galβ1, 4GlcNAc とエチレングリコール四酢酸(EGTA)の足場の間に存在する短/長スペーサーを有する 2 種類の四価糖鎖クラスターは、メルケル皮膚癌の原因ウイルスであるメルケル細胞ポリオーマウイルスの中空粒子(MCPyV-LP)のウイルス様粒子に結合できることが判明した。さらに、進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスであるJC ポリオーマウイルスについても、ウイルスとリガンドの結合し凝集する条件下でフィルターろ過によりトラップできることが明らかになった。以上のことから、四価糖鎖クラスターは架橋剤としてMCPyV-LPを凝集できるだけでなく、JC ウイルスなどのポリオーマウイルスをトラップできたことから、生体からのウイルス除去の臨床応用が可能である。

Characterization of JC polyomavirus derived from COS-IMRb cells

Souichi Nukuzuma¹, Chiyoko Nukuzuma², Masanori Kameoka³, Shigeki Sugiura⁴, Kazuo Nakamichi⁵, Takafumi Tasaki⁶, Koushi Hidaka⁷ and Tsutomu Takegami⁶

¹Kobe Institute of Health, ²Thermocell, ³Kobe University, ⁴Nara Medical University, ⁵National Institute of Infectious Disease, ⁶Kanazawa Medical University, ⁷Kobe Gakuin University

Jpn J Infect Dis 74:48-53, 2021

要旨: JCPyV causes PML, a demyelinating disease of the central nervous system affecting immunocompromised patients. The study of PML-type JCPyV *in vitro* has been limited owing to the inefficient propagation of the virus in cultured cells. In this study, we carried out long-term culture of COS-7 (designated as COS-IMRb cells) transfected with PML-type M1-IMRb, an adapted viral DNA with a rearranged non-coding control region (NCCR). COS-IMRb cells produced high amounts of virus in COS-IMRb cells. The JCPyV genomic DNA derived from a clone of COS-IMRb-3 cells was detected using Southern blotting, as a single band of approximately 5.1 kbp without deletion. These findings suggest the potential of using COS-IMRb-3 cells as a useful tool for screening anti-JCPyV drugs.

和訳: 進行性多巣性白質脳症(PML)は JC ポリオーマウイルス(JCPyV)がオリゴデンドロサイトに感染することで脳に脱髄を引き起こす致死的な疾患である。JCPyV を宿主域が狭く、培養細胞で効率的に増殖させるのが困難なため研究が滞っていた。本研究は JCPyV の培養細胞での効率的な増殖系を確立するために、COS-7 細胞に IMR-32 細胞で良好に増殖する PML 型 JCPyV である M1-IMRb 細胞由来の PML 型 JCPyV をトランスフェクトして blind passage したところ、高力価のウイルスを産生していることを確認できた。さらに、サザンプロットでウイルスゲノムの検出では欠失はなかった。COS-IMRb-3 細胞は抗 JCPyV 薬のスクリーニング系として有用である。

Human iPS cell-derived astrocytes support efficient replication of progressive multifocal leukoencephalopathy-type JC polyomavirus

Emiko Shinbo¹, Souichi Nukuzuma², Yoh-ichi Tagawa¹

¹Tokyo Institute of Technology, ²Kobe Institute of Health Biochem Biophys Res Comm 533:983-987, 2020

要旨: JCPyV causes PML, a demyelinating disease of the central nervous system, in immunocompromised patients. The study of JCPyV *in vitro* has been limited due to the difficulty of efficiently propagating the virus in cultured cells. In this study, human iPS cell-derived astrocytes were exposed to PML-type JCPyV. Infection, replication, and VP1 and T antigens of JCPyV were detected and confirmed in this culture. PML-type JCPyV genomic DNA in the infected cells was detected as a single band with no deletions. In addition, the non-coding control region (NCCR) of M1-IMRb was conserved in infected cells without point mutations. These findings indicated that a culture system using human iPS cell-derived astrocytes would be useful for studies of PML, especially for screening anti-JCPyV drugs.

和訳: JC ポリオーマウイルス(JCPyV)は進行性多巣性白質脳症(PML)の原因ウイルスで免疫低下の患者に発生する。JCPyV を培養細胞で効率的に増殖させるのが困難なため研究が制限されていた。本研究はヒト iPS 細胞由来のアストロサイトに持続感染細胞である COS-IMRb 細胞由来の PML 型 JCPyV を感染させたところ、良好なウイルス DNA 複製がみられ、ウイルス抗原である VP1 と T 抗原も感染細胞内で検出された。さらに、ウイルスゲノムの検出では欠失はなく、ウイルスの調節領域の塩基配列は親株である調節領域と完全に保持していた。これらの所見からヒト iPS 細胞由来のアストロサイトは PML の研究、特に抗 JCPyV 薬のスクリーニングで有用である。

〈邦文(論文・総説・著書等)〉

3層固相ミニカラムを用いた GC-MS/MS による農産物中残留農薬分析法の検討

大久保祥嗣^{1,2} 向井健悟¹

¹神戸市環境保健研究所、²現所属 神戸市保健所西部衛生監視事務所

食品衛生学雑誌 61: 239-246、2020

要旨：農作物に含まれる農薬の多成分簡易迅速試験法の検討を行った。本研究では、精製工程の簡素化および使用する溶媒の量と種類を少なくすることを試みた。

試験溶液は農作物の QuEChERS 法による抽出液を、3層(C18、SAX、PSA)の固相を積層したミニカラムにより精製して調製し、この試験溶液を大量注入装置・胃袋型ガラスインサート搭載 GC-MS/MS により分析した。

この試験法により、8 種類の農産物を用いて添加回収試験を実施したところ、241～331 成分が、真度 70%～120%、併行精度 25%未満の目標基準に適合した。

セルフクリーニングイオン源搭載 GC-MS/MS による農産物中残留農薬分析の検証

大久保祥嗣^{1,2} 八木正博¹

¹神戸市環境保健研究所、²現所属 神戸市保健所西部衛生監視事務所

食品衛生学雑誌 62: 14-19、2021

要旨：農産物中に含まれる農薬の分析を、セルフクリーニングイオン源搭載 GC-MS/MS により行うことについて検証を行った。セルフクリーニングイオン源は、測定終了後または測定中常時、イオン源内に水素を一定圧で注入することにより、イオン源の汚染を防ぐ機能を有したイオン源である。セルフクリーニングイオン源搭載 GC-MS/MS により、農産物中の農薬分析を行ったところ、明瞭なイオン源の汚染防止効果がみられた。251 種類の農薬成分において良好なピーク感度が得られ、253 成分について決定係数(R^2)0.990 以上の検量線が得られた。6 作物による添加回収試験では 180～221 成分が、真度 70%～120%、併行精度 25%未満の目標基準に適合した。

III 学 会 発 表 記 録
(令 和 2 年 度)

〈国内学会〉

Pre-XDR および XDR 結核菌で出現頻度が高まる *gyrA* 変異と *rpoB* 変異についての考察

岩本朋忠¹、吉田志緒美²、村瀬良朗³、有川健太郎¹、御手洗聡³

¹神戸市環境保健研究所、²国立病院機構近畿中央呼吸器センター、³結核予防会結核研究所抗酸菌部

第 95 回日本結核・非結核性抗酸菌症学総会・学術集会:2020 年 10 月 11-12 日、web・誌上開催

要旨: LVFX 耐性 MDRTB (FQR-MDRTB) 95 株、LVFX 感受性 MDRTB (FQS-MDRTB) 57 株、LVFX 単独耐性 (Mono-FQR) 22 株、全薬剤感受性 30 株のゲノム情報を Miseq (イルミナ社)を用いて取得し、変異と感受性との関連性を精査した。

【結果と考察】*gyrA* 上の D94A と A90V および *rpoB* D435V 変異の出現頻度が FQR-MDRTB 株で有意に上昇した。*rpoB* D435V を保有する 17 株中 8 株が XDR-TB であり、うち 7 株は *gyrA* D94A であった。*rpoB* と *gyrA* 間の遺伝子相互作用を示唆する。FQR 株 117 株中 *gyrA* または *gyrB* の QRDR 内に変異を有する株は 101 株 (86%)であった。QRDR 外の変異の中には、未報告の耐性関連変異やわが国に土着の遺伝子系統群を支持する変異が見出された。さらに、*gyrA/gyrB* いずれにも変異を持たない FQR 株が 10 株検出された。

全ゲノム解析を活用した神戸市内分子疫学調査

有川健太郎¹、藤山理世²、村瀬良朗³、御手洗聡³、岩本朋忠¹

¹神戸市環境保健研究所、²神戸市保健所予防衛生課、³結核予防会結核研究所抗酸菌部

第 95 回日本結核・非結核性抗酸菌症学総会・学術集会:2020 年 10 月 11-12 日、web・誌上開催

要旨: VNTR を活用した結核菌の地域内分子疫学が全国で実施されている。近年、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析の実用化が進み、より確かな患者クラスターの検出が可能になった。本研究では神戸市内で VNTR 解析により複数年にわたり検出され続け、クラスターサイズが拡大し続ける患者クラスター(時空間的拡大クラスター)に着目し、全ゲノム解析を活用したより確かな患者クラスターの検出を試みた。神戸市で 2016 年に新規登録患者から分離された 200 株、2015、2017 年に分離された 2016 年分離株とクラスターを形成した 78 株、その他 3 株の合計 281 株について全ゲノム解析を行い、VNTR クラスター情報、疫学情報を加味した地域内分子疫学解析を行った。分子疫学解析により見出された時空間的拡大型クラスターは、1)近現在の感染リスクが高い患者群と 2)過去における流行の名残の二種を内包しており、全ゲノム解析により識別可能と考えられる。

アジスロマイシン耐性淋菌の薬剤耐性機序の解析

三浦真希子¹、大澤佳代¹、中西典子²、吉田弘之³、澤村暢¹、重村克巳^{4,5}、宮良高維⁶、荒川創一⁷、藤澤正人⁴

¹神戸常盤大学保健科学部医療検査学科、²神戸市環境保健研究所感染症部、³(株)兵庫県臨床検査研究所検査部、⁴神戸大学医学部附属病院泌尿器科、⁵神戸大学大学院保健学研究科、⁶神戸大学医学部附属病院感染制御部、⁷三田市民病院

日本性感染症学会 第 33 回学術大会:2020 年 12 月 5-6 日、東京、web

要旨: アジスロマイシン (AZM) は、淋菌感染症の治療の際、適応が認められている薬剤の 1 つである。推奨薬に対するアレルギーがある場合や無効の場合に使用を考慮されるが、近年耐性菌が増加している。今回耐性化に関与する遺伝子変異、及び疫学解析を実施した。兵庫県下で 2015 年から 2019 年に分離された淋菌 791 株のうち、E-test を用いた薬剤感受性試験で AZM MIC >0.5 µg/mL を示した耐性株 24 株を対象とした。全ての株で、*mtrR* のプロモーター領域の 1 塩基欠損(67%, 16/24)、もしくは、翻訳領域における A39T、R44H、G45D のアミノ酸変異(33%, 8/24)のいずれかを認めた。また、AZM MIC > 0.5 µg/mL の株のうち、殆どの株において 23S rRNA における C2611T の遺伝子変異が認められた。NG-MAST 解析では、ST1407 及び ST4316 が多く検出された。ST4316 は 2018 年度に新たに検出されたシーケンスタイプであり、NG-MLVA 解析では、これまでとは異なる系統に属していた。

〈第 18 回神戸市生活衛生研究発表会〉

誌面発表

有馬温泉施設における緊急事態宣言後のレジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移

小松頌子、中西典子、岩本朋忠

神戸市で発生したサポウイルス食中毒(疑い)事例の詳細な遺伝子解析

花房剛志、有川健太郎、森愛、岩本朋忠

LC-MS/MSによる畜産物中の抗生物質一斉分析法の検討

吉野共広、山路章、八木正博、向井健悟

第57回全国衛生化学技術協議会年会:2020年11月9-10日、紙上・web開催(宮崎)

要旨: 畜産物中に残留する抗生物質27項目及び動物用医薬品11項目(抗生物質等38項目)の一斉分析法の検討を行った。添加回収試験陽の試料は、分析対象の抗生物質等が残留していないことを確認した牛筋肉及び腎臓を用いた。抽出は、松本等の希釈法(熊本県保健環境科学研究所報、44、28-37(2014))を参考に行い、マトリックス検量線を用いて定量を行った。抗生物質(27項目)については、牛筋肉26項目、牛腎臓19項目、抗生物質以外(11項目)については、牛筋肉・腎臓ともに全11項目が、回収率70~120%の範囲に入り、概ね良好な結果であった。牛筋肉の回収率は63~120%、腎臓では回収率が極端に低い2項目を除き49~135%であり、本希釈法は、スクリーニング検査として十分使用できる試験法であった。牛腎臓での添加回収率が極端に低い物質は、セファピリン、セフチオフルの2項目であった。セファピリンについては、酵素反応の影響で脱アセチル化セファピリンに、セフチオフルについても腎臓で代謝され、デスフロイルセフチオフルに変化している可能性が示唆された。

安全性未審査の遺伝子組換えサケにおける検査法について

日置優伽、岸本由里子、佐藤徳子、山路章、向井健悟

第57回全国衛生化学技術協議会年会:2020年11月9-10日、紙上・Web開催(宮崎)

要旨: 安全性未審査のGM食品検査の検査方法は、厚生労働省より通知されており、平成29年に新たにGMサケ(AquAdvantage)の検査法が追加された。市販の生サケ及びサケ加工食品について、新たに追加された検査法を用いて試験を行い、外部精度管理調査にも参加した。その結果、厚生労働省通知に準じた方法で検査が可能であることが確認された。また、検体数を増やし、加工度が高いと思われるものについても問題なく検査が可能か調査していきたい。当所では現在、安全性未審査のGMトウモロコシのみ検査を行っているが、今後はGMサケについても検査が可能であり、より市民の食の安全安心への貢献が期待できる。

LC-QTOF/MSを用いた河川水中の化学物質のスクリーニング法

吉野共広、八木正博、向井健悟

第47回環境保全・公害防止研究発表会:2020年11月19日、書面開催(川崎)

要旨: 災害などが原因で水質汚染事故が起きた際、環境中に流出した化学物質を迅速に把握するためには、普段から化学物質の網羅分析を実施して平時における環境中の汚染状況を把握しておくことが理想と考えられる。本研究は、環境水中の汚染化学物質の網羅的分析を目的とし、門上らが開発したLC-QTOF/MS用ターゲットスクリーニング法であるAIQS-DBを用い、2019年8月及び2020年2月の神戸市域における河川水5地点の環境汚染物質の同定を行い、調査結果を取りまとめたものである。検出項目の傾向としては、8月は2月と比較して検出される農薬の種類が増える傾向にあり、8月において特に検出率が高い農薬は、Chlorantraniliprole(殺虫剤)やClothianidin(殺虫剤)であった。また、下水処理場の放流水が流入している地点ではPPCPsの検出項目が大半を占める傾向にあった。半定量の結果、検出濃度上位の物質は、Sucralose(人工甘味料)、Dinotefran(殺虫剤)、1H-Benzotriazole(腐食防止剤)などであった。

〈第18回神戸市生活衛生研究発表会〉

誌面発表

安全性未審査の遺伝子組換えコマにおける検査法について

岸本由里子、日置優伽、上田泰人、向井健悟

ジルコニアコート化シルカゲル/C18混合ミニカラムを用いた

スパイス中の残留農薬分析法の検討

中川光、山路章、向井健悟

参 考

沿 革

明治 45 年 5 月 (1912 年)	市立東山病院内に市立衛生試験所設置	昭和 45 年 4 月 (1970 年)	化学部を食品化学部と公害検査部に分離
昭和 10 年 9 月 (1935 年)	葺合区野崎通 8 丁目(万国病院隔離病舎跡)に移転	昭和 47 年 4 月 (1972 年)	病院管理センターから分離し、事務係を設置
昭和 11 年 (1936 年)	増築	昭和 48 年 4 月 (1973 年)	神戸市環境保健研究所に改称
昭和 14 年 4 月 (1939 年)	市立都市生活科学研究所に改称(庶務部、化学部、細菌部、栄養部で 30 名)	昭和 56 年 3 月 (1981 年)	現在地(中央区港島中町 4 丁目)に新築移転(建設費 19 億 7 千万円 地上 7 階 延 5,500 m ²)
昭和 17 年 4 月 (1942 年)	市立衛生試験所は、都市生活科学研究所(葺合区野崎通)と細菌検査室(東山病院内)の 2 箇所に分離	平成 7 年 1 月 (1995 年)	阪神・淡路大震災による被災
昭和 20 年 3 月 (1945 年)	都市生活科学研究所は空襲にて焼失、戦後、市立東山病院内に細菌検査室として業務の一部を復活	平成 7 年 12 月 (1995 年)	阪神・淡路大震災による被害部分の改修
昭和 23 年 9 月 (1948 年)	神戸市衛生局防疫課細菌検査所となる	平成 8 年 4 月 (1996 年)	局統合のため、衛生局環境保健研究所から保健福祉局健康部環境保健研究所となる
昭和 24 年 4 月 (1949 年)	厚生省地方衛生研究所設置要綱に基づき神戸市立衛生研究所に改称し、市防疫課に所属	平成 9 年 2 月 (1997 年)	排水処理施設建替
昭和 28 年 4 月 (1953 年)	機構改革により部制が廃止	平成 9 年 3 月 (1997 年)	地盤杭亀裂による建物傾斜復旧工事開始
昭和 31 年 4 月 (1956 年)	神戸市衛生研究所に改称(1 課 4 部制:庶務課、細菌検査部、疫学部、化学試験部、虫疫部)	平成 10 年 3 月 (1998 年)	復旧工事完了
昭和 33 年 10 月 (1958 年)	市立中央市民病院内(生田区加納町 1 丁目)に新築移転(建設費 3,300 万円地下 1 階地上 4 階 延約 1,500m ²)	平成 10 年 4 月 (1998 年)	病理部を廃止し、企画情報部を設置 疫学部を寄生体部に、公害検査部を環境化学部に名称変更
昭和 36 年 5 月 (1961 年)	神戸市医療センター設置により市立医療センター衛生研究所に改称	平成 15 年 4 月 (2003 年)	細菌部と寄生体部を統合し、微生物部に名称変更 庶務部を事務係に名称変更
昭和 37 年 4 月 (1962 年)	虫疫部を廃止し、病理部を設置	平成 22 年 12 月 (2010 年)	中央市民病院移転に伴う熱源等改修工事開始
昭和 42 年 1 月 (1967 年)	病院管理センター発足により病院管理センター衛生研究所に改称	平成 23 年 6 月 (2011 年)	熱源、電気、ガス、電話等改修工事終了

平成 24 年 5 月 (2012 年)	創立 100 周年
平成 24 年 11 月 (2012 年)	環境保健研究所保全計画を策定
平成 25 年 4 月 (2013 年)	微生物部を感染症部に改称 食品化学部と環境化学部を統合し、 生活科学部とする 企画情報部を廃止し、その業務を事 務係へ移行させる
平成 26 年 2 月 (2014 年)	エレベーター設備の更新完了
平成 26 年 3 月 (2014 年)	受変電設備の更新完了
平成 27 年 3 月 (2015 年)	みなとじま寮売却に伴い、みなとじま 寮敷地内埋設の給排水設備撤去と付 替工事完了
平成 27 年 8 月 (2015 年)	BSL-3 (P3) 室更新等 6 階実験室の改 修完了
平成 27 年 9 月 (2015 年)	看護短大売却に伴い、看護短大敷地 内埋設の雨水管の移設工事完了
平成 28 年 8 月 (2016 年)	耐震補強・外壁改修完了
平成 29 年 3 月 (2017 年)	ドラフト I 期改修、貯湯槽 1 基更新
平成 30 年 3 月 (2018 年)	ドラフト改修完了
平成 31 年 3 月 (2019 年)	中和槽更新、重金属処理装置撤去
令和 2 年 8 月 (2020 年)	機械設備改修工事 (5 階他一部終了)
令和 3 年 2 月 (2021 年)	火災報知設備更新工事完了
令和 3 年 4 月 (2021 年)	神戸市環境保健研究所から神戸市健 康科学研究所に名称変更

所報編集委員会

有川 健太郎・花房 剛志(感染症部)

福田 彩香(生活科学部)

辻 敦子・秋吉 京子(事務)

神戸市健康科学研究所報

第49巻(非売品)

令和3年11月1日発行

編集発行

神戸市健康科学研究所

〒650-0046

神戸市中央区港島中町4丁目6番5号

電話 078-302-6197

FAX 078-302-0894

Email kanpoken-hp@office.city.kobe.lg.jp

HP <http://www.city.kobe.lg.jp/life/health/lab/kih/index.html>

印刷

株式会社ルネック

〒652-0047

神戸市兵庫区下沢通4丁目7-30

電話 078-576-8866

FAX 078-576-3016
