

(2) 調査・事例

1) 加工食品における残留農薬等一斉試験法の検討 - (I)	29
2) フグ食中毒事例におけるTTX分析について	39
3) 低特異性PCR法による高感度ウイルス検出法の確立	43
4) <i>Salmonella</i> Braenderupによる小児重症感染事例と大分県感染症発生動向調査における サルモネラ検出状況 (2004~2008年)	48
5) 大分県内の硝酸性窒素高濃度地域における地下水汚染の実態把握調査	51

加工食品における残留農薬等一斉試験法の検討 — (I)

安井玉樹, 武田亮, 曾根聡子, 森崎澄江, 山下秀門

Investigation of Simultaneous Determination Method of Pesticide Residues to Processed Foods

Tamaki Yasui, Ryo Takeda, Satoko Sone, Sumie Morisaki, Hideto Yamashita

Key words : 残留農薬 pesticide residue, 加工食品 processed foods,
一斉分析 simultaneous determination

要 旨

2008年度に加工食品48検体について、残留農薬の一斉分析を行った。分析法は厚生労働省通知の一斉分析法（以下通知法）¹⁾に準じて行い、多くの加工食品について適用できたが、みそ等の一部の加工食品について、回収率の低下や妨害ピークの出現が確認された。これらの加工食品については、前処理方法を検討した結果、改善され、回収率50%~200%を満たす農薬成分は、GC/MSで176~215成分、LC/MS/MSで67~78成分となった。

また、すべての加工食品について残留農薬は検出されなかった。

は じ め に

2008年に輸入冷凍ぎょうざによる中毒事件や、食品への事故米の流用事件等が発生し、食の安全・安心への関心はこれまで以上に高まっており、加工食品について農薬の検査体制の整備や実態把握が求められている。しかし、加工食品は複数の素材から製造されている場合が多く、素材としての濃度把握が困難であることや加熱、乾燥、加糖、加塩、レトルトなどの影響を受けていること等問題点がある。加工食品の分析法については岡本ら²⁾、北川ら³⁾、松本ら⁴⁾等の報告があるが、本調査では、種々の加工食品について通知法の穀類・豆類および種実の場合を準用し検討したので報告する。

方 法

1 試料

2008年度に当センターに持ち込まれた48検体（表1）を用いた。GC/MSで218成分、LC/MS/MSで88成分の測定を行った（GC/MS、LC/MS/MSで重複成分13成分）。なお、上記48検体から、10検体を選択し添加回収試験用サンプルとして用いた。

表1 検査検体一覧表

検体名	検査検体数	添加回収試験 実施検体数
みそ	5件	1件
きのこ水煮	5件	1件
揚げ物	5件	
豆加工品	4件	
栗加工品	3件	
ピーナッツクリーム	3件	1件
みつ豆類	3件	
緑豆春雨	3件	
さつまいも加工品	2件	1件
さばみそ煮	2件	1件
卵加工品	2件	
お好み焼き	1件	
がんもどき	1件	1件
ぎょうざ	1件	1件
くるみ	1件	
鮭フレーク	1件	1件
赤飯	1件	
中華れんこん	1件	1件
鶏ガラスープ	1件	
はりはり漬	1件	1件
冷凍アスパラガス	1件	
乾わかめ	1件	
計	48件	10件

2 標準物質

農薬標準品は林純薬工業（株）製，関東化学（株）製，和光純薬工業（株）製，Dr. Ehrenstorfer社製（残留農薬試験用）を用いた。

3 試薬

ヘキサン，アセトニトリル，アセトン，メタノールおよびトルエンは残留農薬分析用を，酢酸ナトリウム，無水硫酸ナトリウムは特級品を使用した。

0.5mol/Lリン酸緩衝溶液（pH 7.0）はリン酸一水素二カリウムおよびリン酸二水素一カリウムの特級品を用いて調製した。

4 前処理方法

通知法に準ずる方法（図1）で行った。

なお，動物性食品の加工品や豆類加工品等，脂質を多く含むと思われる食品については，C18カラムの処理を加えた。

また，みそについては抽出時に水を添加する方法で行った。

5 分析装置および測定条件

5.1 分析装置

液体クロマトグラフ/質量分析計：HPLC部 Agilent 1100series (Agilent社製)，MS部API 2000 (Applied Biosystems社製)

ガスクロマトグラフ/質量分析計：GC部6890N，MS部5975MSD (Agilent社製)

5.2 LC/MS/MS測定条件

5.2.1 HPLC

カラム：L-column ODS (2.1 mm i.d.×150mm, 5 μm, 財団法人 化学物質評価研究機構)

カラム温度：40℃

移動相：A液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液

B液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム-アセトニトリル溶液

グラジエント条件：A75%B25% (0分) →12分,A 5%B95% (13分保持) →25分 直線グラジエント

注入量：4.0 μL

流量：0.2mL/min

5.2.2 MS/MS

イオン化法：Electrospray Ionization (ESI)

測定法：Multiple Reaction Monitoring (MRM)

イオンスプレー電圧：5,000V (positive)

イオン源温度：500℃

各農薬成分の分析条件は表2に示した。

5.3 GC/MS 測定条件

カラム：HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 μm)

カラム温度：250℃ (1min) →25℃/min→125℃ →10℃/min→300℃ (10min)

注入口温度：250℃

注入量：2 μL (パルスドスプリットレス)

キャリアーガス：He, コンスタントフローモード

MSイオン源温度：230℃

イオン化法：Electron Ionization (EI)

イオン化電圧：70eV

分析モード：Selective Ion Monitoring (SIM) 及びScanモード

各農薬成分の分析条件は表3に示した。

6 添加回収試験評価方法

添加回収試験は10種類の加工食品に対して，各農薬成分1.0 μg添加し，回収率50%~200%を満たす成分を検査可能と判断した。なお，回収率の算出はGC/MS測定成分については絶対検量線から，LC/MS/MS測定成分についてはマトリックス検量線から行った。

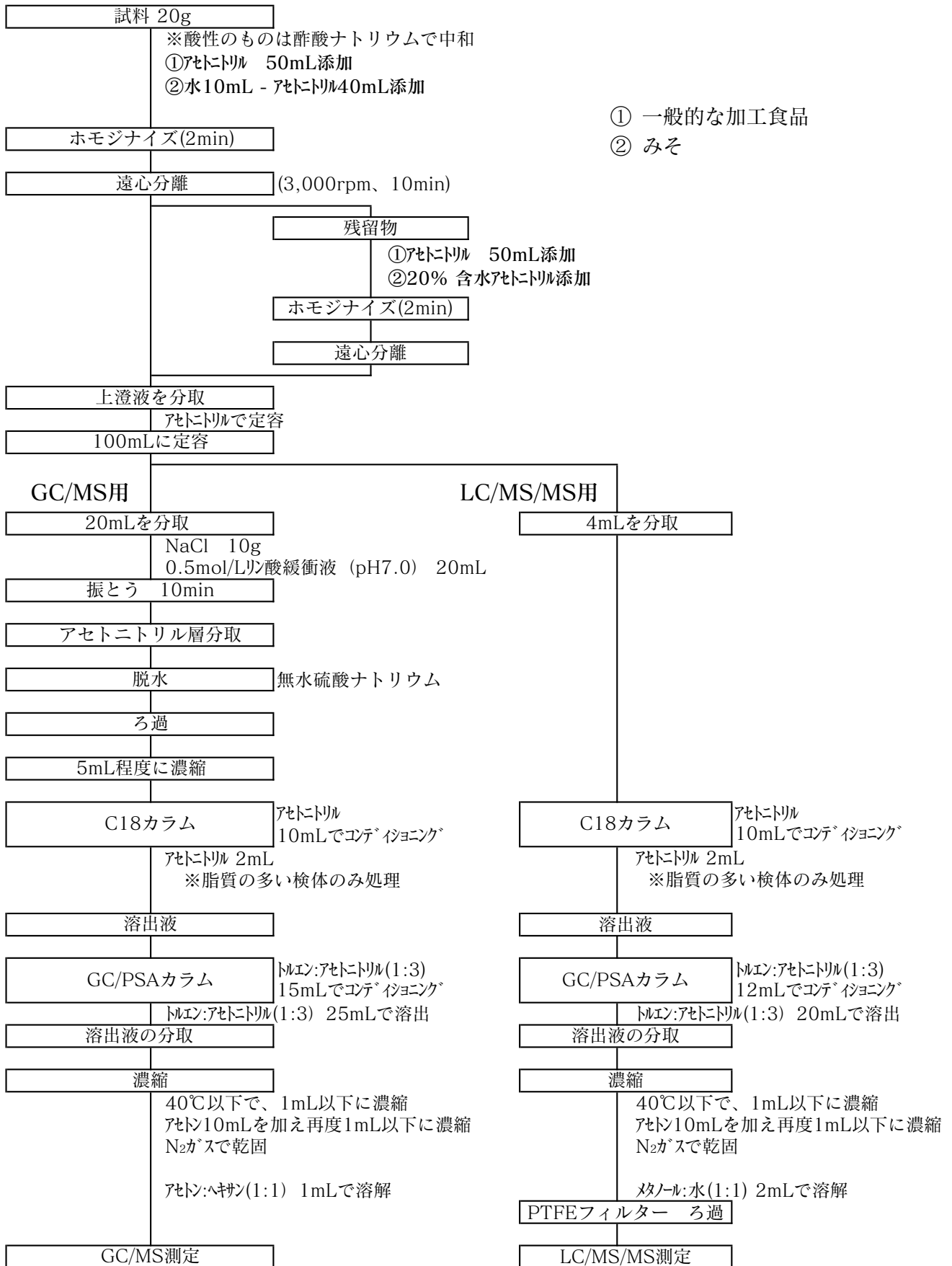


図 1 分析法フロー

表 2 Compound-specific LC/MS/MS parameters

(ESI Positive) Pesticide	RT (min)	MRM trace (m/z)	DP*1 (V)	CE*2 (V)	(ESI Positive) Pesticide	RT (min)	MRM trace (m/z)	DP*1 (V)	CE*2 (V)
Acephate	2.3	184 → 143	6	15	Spinosyn-D	10.4	746 → 142	40	40
Aldicarb-sulfoxide	2.4	207 → 132	11	13	Dimethomorph-Z	10.5	388 → 301	40	30
Aminocarb	2.4	209 → 152	30	15	Dimethomorph-E	10.8	388 → 301	40	30
Butocarboxim-sulfoxide	2.4	207 → 75	30	20	Fluridon	10.9	330 → 310	40	40
Methamidophos	2.4	142 → 94	16	19	Triticonazole	11.0	318 → 70	16	33
Aldicarb-sulfone	3.0	240 → 223	1	13	Methiocarb	11.1	226 → 121	16	25
Dimethirimol	3.3	210 → 71	36	45	Fenobucarb	11.2	208 → 95	11	16
Methomyl	3.4	163 → 88	6	15	Chloroxuron	11.3	291 → 72	20	50
ethiofencarb-sulfoxide	3.5	242 → 107	16	23	Iprovalicarb	11.4	321 → 119	10	30
Methiocarb-sulfoxide	3.5	242 → 185	16	19	Linuron	11.4	249 → 160	16	30
Thiofanox-sulfoxide	3.6	235 → 104	30	20	Simeconazole	11.4	294 → 70	20	40
Thiamethoxam	3.7	292 → 211	20	20	Azoxystrobin	11.5	404 → 372	33	21
Pirimicarb	4.7	239 → 72	20	30	Cumyruon	11.5	303 → 185	20	20
3OH-Carbofuran	4.9	238 → 163	30	20	Promecarb	11.5	208 → 109	30	20
Thiofanox	4.9	220 → 163	26	17	Cyprodinil	11.6	226 → 93	40	50
Chloridazon	5.0	222 → 92	20	40	Epoxiconazole	11.6	330 → 121	20	30
Imidacloprid	5.3	256 → 209	51	21	Dymuron	11.7	269 → 151	16	19
Thiofanox-sulfone	5.8	268 → 57	30	20	Fenamidone	11.7	312 → 92	20	40
Acetamiprid	5.9	223 → 126	21	27	Pyrifthalid	11.7	319 → 139	20	40
Dioxacarb	5.9	224 → 123	30	20	Methoxyfenozide	12.1	369 → 149	10	20
Ferimzone-Z	6.7	255 → 91	31	45	Mepanipyrim	12.3	224 → 77	20	50
Butocarboxim	7.0	191 → 75	20	20	Chromafenozide	12.4	395 → 175	6	23
Ferimzone-E	7.0	255 → 91	31	45	Tetrachlorvinphos-Z	12.5	367 → 127	21	21
Thiacloprid	7.0	253 → 126	40	30	Flufenacet	12.6	364 → 152	20	30
Tebuthiuron	7.1	229 → 172	20	30	Butafenacil	12.7	492 → 180	11	57
Oxycarboxine	7.2	268 → 175	20	20	Tebufenozide	12.8	353 → 133	20	20
Aldicarb	7.5	208 → 89	1	21	Cyazofamid	13.0	325 → 108	20	20
Imazalil	7.5	297 → 159	26	31	Anilofos	13.5	368 → 199	20	20
Metolcarb	8.2	166 → 109	30	20	Pyraclostrobin	13.7	388 → 163	10	30
Thiodicarb	8.5	355 → 88	26	33	Pencycuron	13.9	329 → 125	26	31
Bendiocarb	8.9	224 → 109	11	25	Indoxacarb	14.0	528 → 203	21	53
Propoxsul	8.9	210 → 111	30	20	Cyflufenamid	14.2	413 → 91	21	59
Carbofuran	9.0	222 → 165	16	17	Terbucarb	14.2	278 → 166	20	20
Methabenzthiazuron	9.1	222 → 165	10	20	Benzofenap	14.3	431 → 105	40	50
XMC	9.3	180 → 123	6	20	Fenoxaprop-ethyl	14.4	362 → 288	40	30
Carbaryl	9.4	202 → 145	11	15	Quizalofop-ethyl	14.6	373 → 299	31	27
Xylylcarb	9.5	180 → 123	6	20	Cloquintocet-mexyl	14.7	336 → 238	20	20
Furametpyr	9.6	334 → 157	26	41	Propaquizafop	14.7	444 → 100	21	29
Ethiofencarb	9.7	226 → 107	6	21	Benfuracarb	14.9	411 → 252	20	20
Monolinuron	9.8	215 → 126	20	20	Fenpyroximate-Z	15.0	422 → 366	10	20
Spinosyn-A	9.9	732 → 142	40	40	Furathiocarb	15.0	383 → 195	16	25
Isoprocarb	10.1	194 → 95	11	25	Hexythiazox	15.6	353 → 228	20	20
2,3,5-Trimethacarb	10.2	194 → 137	20	20	Fenpyroximate-E	15.8	422 → 366	10	20
3,4,5-Trimethacarb	10.2	194 → 137	20	20	Carbosulfan	17.7	381 → 118	40	30

*1 Declustering potential *2 Collision energy

表3 Compound-specific GC/MS parameters

Pesticide	Analyte mode SIM or Scan	RT (min)	Target ion (m/z)	Qualitative ion (m/z)	Pesticide	Analyte mode SIM or Scan	RT (min)	Target ion (m/z)	Qualitative ion (m/z)
Methamidophos	SIM	6.3	94	141	Metalaxyl	Scan	13.6	206	249
2,4-Dichloroaniline	Scan	7.4	161	163	Bromacil	SIM	13.8	231	205
Mevinphos	SIM	8.3	192	164	Terbutryn	Scan	13.8	226	241
Acephate	SIM	8.4	136	94	Fenitrothion	SIM	13.8	260	277
XMC	Scan	9.8	122	107	Spiroxamine-2	Scan	13.8	100	
Tecnazene	Scan	10.3	261	203	Pirimiphos-methyl	Scan	13.9	290	305
Propoxur	Scan	10.4	110	152	Ethofumesate	Scan	13.9	161	207
Demeton-s-methyl	SIM	10.4	142	109	Quinoclamine	SIM,Scan	14.1	172	207
Propachlor	Scan	10.4	120	176	Malathion	Scan	14.1	173	158
Ethalfuralin	Scan	10.8	276	316	Thiobencarb	Scan	14.1	100	257
Trifluralin	SIM,Scan	11.0	306	264	Metolachlor	Scan	14.2	162	238
Benflurarin	Scan	11.1	292	264	Fenthion	SIM,Scan	14.2	278	169
Phorate	Scan	11.4	260	231	Fenpropimorph	Scan	14.3	128	303
Monocrotophos	SIM	11.4	192	127	Cyanazine	SIM,Scan	14.3	225	172
alpha-BHC	Scan	11.4	219	181	Chlorpyrifos	Scan	14.3	314	197
Dichloran	SIM,Scan	11.6	176	206	4,4'-Dichlorobenzophenone	Scan	14.3	250	139
Dimethoate	Scan	11.7	87	125	Nitrothal-isopropyl	Scan	14.5	236	254
Simazine	SIM,Scan	11.7	201	186	Triadimefon	SIM,Scan	14.5	208	181
Chlorbufam	SIM,Scan	11.8	223	153	Isofenphos oxon	Scan	14.5	229	201
Carbofuran	SIM,Scan	11.8	149	131	Chlorthal-dimethyl	Scan	14.5	301	332
Dimethipin	SIM	11.8	118	210	Fthalide	Scan	14.6	243	272
Atrazine	Scan	11.8	200	215	Diphenamid	Scan	14.6	167	239
Clomazone	Scan	11.9	204	125	Bromophos-methyl	Scan	14.6	331	125
Propazine	Scan	11.9	229	214	Chlorfenvinphos-1	SIM	14.8	267	323
beta-BHC	Scan	12.0	219	181	Allethrin-1	SIM	14.8	123	136
Gamma-BHC	Scan	12.1	181	219	Allethrin-2	SIM	14.8	123	136
Quintozene	Scan	12.1	237	214	Dimethametryn	Scan	14.9	212	255
Terbufos	SIM,Scan	12.2	231	288	Thiabendazole	SIM	15.0	201	174
Cyanophos	Scan	12.2	243	109	Penconazole	Scan	15.0	248	159
Propyzamide	SIM,Scan	12.2	175	145	Allethrin-3	SIM	15.0	123	136
Pyroquilon	Scan	12.2	130	172	Allethrin-4	SIM	15.0	123	136
Diazinon	Scan	12.3	304	179	Chlorfenvinphos-2	SIM	15.0	267	323
Pyrimethanil	Scan	12.3	198	199	Isofenphos	SIM,Scan	15.1	121	213
Terbacil	SIM,Scan	12.5	161	117	Triadimenol-1	SIM	15.1	168	128
Prohydrojasmon-1	SIM,Scan	12.5	153	184	Fipronil	Scan	15.1	367	369
delta-BHC	Scan	12.6	219	181	Methoprene-1	SIM	15.1	111	153
Tefluthrin	Scan	12.6	177	197	Diclocymet-1	Scan	15.1	277	221
Isazophos	SIM,Scan	12.7	161	172	Methoprene-2	SIM	15.1	111	153
Tri-allate	Scan	12.7	268	86	Dimepiperate	Scan	15.1	119	145
Iprobenfos	Scan	12.8	204	91	Triadimenol-2	SIM	15.2	168	128
Prohydrojasmon-2	SIM,Scan	12.9	153	184	Procymidone	Scan	15.2	283	96
Pirimicarb	Scan	12.9	166	238	Flutriafol	SIM,Scan	15.3	123	164
Benoxacor	Scan	12.9	120	259	Methidathion	Scan	15.4	145	85
Dichlofenthion	Scan	13.0	279	223	Fenothiocarb	Scan	15.5	72	160
Phosphamidon	SIM	13.1	264	127	Diclocymet-2	Scan	15.5	277	221
Propanil	SIM,Scan	13.1	161	217	Tetrachlorvinphos	Scan	15.6	329	331
Bromobutide	Scan	13.2	119	232	Butachlor	Scan	15.7	176	160
Dimethenamid	Scan	13.2	230	154	Endosulfan-alpha	SIM,Scan	15.7	195	241
Vinclozolin	Scan	13.3	285	187	Butamifos	Scan	15.8	286	200
Chlorpyrifosmethyl	Scan	13.3	286	125	TCMTB	SIM,Scan	15.8	180	238
Acetochlor	Scan	13.3	223	146	Fenamiphos	SIM	15.8	303	154
Spiroxamine-1	Scan	13.3	100		Napropamide	Scan	15.9	128	271
Simetryn	Scan	13.4	213	170	Flutolanil	Scan	15.9	173	145
Carbaryl	Scan	13.4	144	115	Isoxathion oxon	SIM	15.9	161	105
Ametryn	Scan	13.5	212	227	Imazalil	SIM	15.9	215	173
Alachlor	Scan	13.5	160	188	Hexaconazole	SIM,Scan	15.9	214	175
Prometryn	Scan	13.5	184	241	Profenofos	SIM	16.0	139	339

Pesticide	Analyte mode SIM or Scan	RT (min)	Target ion (m/z)	Qualitative ion (m/z)
Isoprothiolane	Scan	16.0	118	204
Fludioxonil	SIM,Scan	16.0	154	182
p,p-DDE	Scan	16.1	246	318
Uniconazole-P	SIM	16.1	234	165
Oxadiazon	Scan	16.1	175	258
Metominostrobin-E	Scan	16.1	196	238
Flamprop-methyl	Scan	16.1	276	105
Myclobutanil	SIM,Scan	16.2	179	150
Imibenconazole-desbenzyl	SIM	16.2	270	235
Oxyfluorfen	Scan	16.2	252	361
Carboxin	Scan	16.2	143	235
Bupirimate	Scan	16.2	273	316
Flusilazole	Scan	16.2	233	206
Imazamethabenz-methyl	SIM	16.3	176	214
Buprofezin	Scan	16.3	172	105
Azaconazole	Scan	16.3	217	173
Thifluzamide	Scan	16.3	449	427
Isoxathion	SIM	16.3	105	313
Kresoxim-methyl	Scan	16.3	116	206
Metominostrobin-Z	Scan	16.4	196	238
Chlorfenapyr	SIM	16.5	408	247
Endosulfan-beta	SIM,Scan	16.7	195	237
Pyriminobac-methyl-Z	Scan	16.8	302	256
p,p-DDD	Scan	16.8	235	165
Ethion	Scan	16.9	231	153
Fluacrypyrim	Scan	17.1	145	189
Triazophos	Scan	17.3	172	257
Endosulfan-sulfate	Scan	17.3	272	229
Quinoxifen	Scan	17.4	237	307
Propiconazole-1	SIM	17.4	259	191
Carfentrazone-ethyl	Scan	17.4	312	330
Benalaxyl	Scan	17.4	148	206
Trifloxystrobin	SIM	17.4	116	222
Pyriminobac-methyl-E	Scan	17.5	302	256
Pyraflufen ethyl	Scan	17.5	412	349
Propiconazole-2	SIM	17.5	173	259
Norflurazon	SIM,Scan	17.5	303	145
Tebconazole	SIM	17.7	250	125
Hexazinone	SIM,Scan	17.7	171	128
Diflufenican	Scan	17.8	266	394
Propargite	SIM	17.8	135	173
Diclofop-methyl	Scan	17.9	340	253
Picolinafen	Scan	18.1	376	238
Zoxamide	Scan	18.1	187	258
Mefenpyr-diethyl	Scan	18.1	253	299
Iprodione	SIM,Scan	18.2	314	187
Pyributicarb	Scan	18.2	165	181
Pyridafenthion	SIM	18.3	340	199
Acetamiprid	SIM	18.4	152	126
Phosmet	SIM,Scan	18.4	160	133
Bromopropylate	Scan	18.4	341	183
Piperophos	Scan	18.5	320	140

Pesticide	Analyte mode SIM or Scan	RT (min)	Target ion (m/z)	Qualitative ion (m/z)
Bifenthrin	Scan	18.5	181	166
Fenpropathrin	SIM,Scan	18.6	181	265
Methoxychlor	Scan	18.6	227	228
Etoazole	Scan	18.7	300	330
Bifenox	SIM,Scan	18.7	341	310
Fenamidone	Scan	18.7	268	238
Anilofos	Scan	18.8	226	125
Phenothrin-1	SIM,Scan	18.8	183	123
Iprodione metabolite	SIM	18.9	329	187
Tetradifon	Scan	18.9	356	159
Phenothrin-2	SIM,Scan	18.9	183	123
Azinphos-methyl	SIM,Scan	19.2	160	132
Pyriproxyfen	SIM,Scan	19.2	136	226
Cyhalothrin-1	SIM	19.2	181	197
Cyhalofop-butyl	Scan	19.2	256	357
Cyhalothrin-2	SIM	19.4	181	197
Fenarimol	Scan	19.6	139	219
Pyrazophos	SIM,Scan	19.7	221	232
Oryzalin	SIM	20.0	317	275
Bitertanol-1	SIM	20.0	170	112
Bitertanol-2	SIM	20.1	170	112
Spirodiclofen	SIM	20.1	312	259
Permethrin-1	SIM,Scan	20.2	183	163
Pyridaben	SIM,Scan	20.3	147	309
Permethrin-2	SIM,Scan	20.3	183	163
Fluquinconazole	SIM,Scan	20.5	340	108
Cyfluthrin-1	SIM	20.7	163	206
Cafenstrole	SIM,Scan	20.7	100	188
Cyfluthrin-2	SIM	20.8	163	206
Fenbuconazole	SIM,Scan	20.8	129	198
Cyfluthrin-3	SIM	20.8	163	206
Cyfluthrin-4	SIM	20.8	163	206
Cypermethrin-1	SIM	21.0	181	163
Cypermethrin-2	SIM	21.1	181	163
Cypermethrin-3	SIM	21.2	181	163
Cypermethrin-4	SIM	21.2	181	163
Flucythrinate-1	SIM	21.2	199	157
Etofenprox	SIM,Scan	21.3	163	376
Flucythrinate-2	SIM	21.4	199	157
Fluridone	SIM	21.6	328	329
Fenvalerate-1	SIM	21.9	167	125
Flumioxazin	SIM	21.9	354	287
Fluvalinate-1	SIM	22.1	250	181
Fenvalerate-2	SIM	22.1	167	125
Fluvalinate-2	SIM	22.2	250	181
Difenoconazole-1	SIM	22.4	323	265
Difenoconazole-2	SIM	22.4	323	265
Deltamethrin	SIM	22.7	253	181
Flumiclorac pentyl	SIM	22.9	423	308
Tolfenpyrad	SIM	23.2	383	171
Imibenconazole	SIM	23.8	253	375
Fluthiacet-methyl	SIM	24.4	403	405

結果および考察

1 GC/MS測定項目の添加回収試験

加工食品10種および農産物の例としてトマトの農薬218成分の添加回収試験の結果を表4及び図2に示した。

GC/MS回収率において、みそを除く加工食品については回収率50~200%を満たす成分数は176~215成分で、おおむね良好な結果が得られた。

みそについては回収率50~200%を満たす成分数は41成分となり他の加工食品に比べて著しく悪い結果となった。この原因として、みそがアセトニトリル溶液によって凝固してしまい農薬成分を抽出できにくいこと、あるいは他の加工食品に比べて炭水化物含有量が多いことから、抽出・精製効率や分析を

阻害しているのではないかと考えられた。

また、脂質を多く含む加工食品である、ピーナツツクリーム及びぎょうぎ等は回収率150%以上となる農薬成分が多い傾向があった。これは、脂質をC18カラムによる処理で十分除去できなかったために、脂質による正のマトリックス効果^{5,6)}が生じていることが原因として考えられた。

2 LC/MS/MS測定項目添加回収試験

加工食品10種および農産物の例としてトマトの農薬88成分の添加回収試験の結果を表5および図3に示した。

LC/MS/MSでは、回収率50~200%を満たす成分数は67~78成分であり、生鮮食品とくらべても差異はなかった。これは、マトリックス検量線から回収

表4 GC/MS添加回収率結果

	きのこ水煮	加工食品 さつまいも	はりはり漬	中華 れんこん	鮭 フレーク	さば みそ煮	がんもどき	クリーン ピーナツ	ぎょうぎ	みそ	みそ(水 抽出)	トマト
200%<	0	0	0	3	2	1	5	29	30	0	0	0
150%-200%	0	0	8	6	0	9	8	26	34	1	2	0
120%-150%	18	10	56	14	4	51	24	20	62	0	3	0
70%-120%	194	201	146	138	200	143	154	130	78	14	134	193
50%-70%	3	1	2	27	1	1	11	4	2	26	59	14
<50%	3	6	6	30	11	13	16	9	12	177	20	11
50%-200%	215	212	212	185	205	204	197	180	176	41	198	207
測定可能 成分比 (%)	99	97	97	85	94	94	90	83	81	19	91	95

※測定可能成分比率100%のとき218成分

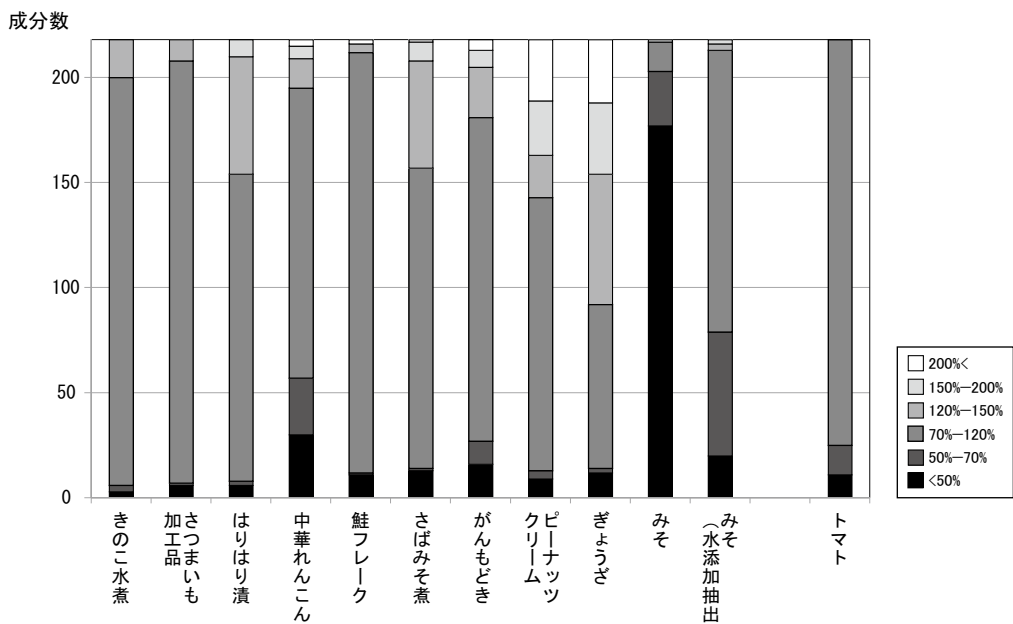


図2 GC/MS 添加回収率結果

率を算出したこと、およびLC/MS/MSはGC/MSに比べ高選択性を有することに起因するためであると考えられる。

しかし、GC/MS回収率結果と同様に、みそは他の食品に比べて回収率が低かった。その原因としては、GC/MS同様に、みそが抽出の際にアセトニトリル溶液によって凝固してしまい農薬成分を抽出できなかったことが考えられた。

3 みその分析法検討

みその抽出工程の検討をGC/MS成分について行った。

含水アセトニトリルは幅広い農薬の抽出を可能に

すると西名らによる報告⁷⁾があることから、アセトニトリル50mLの抽出を、まず水10mLを加えて攪拌し、15分程静置してからアセトニトリル40mLを加える工程に改めた。遠心分離を行った際、図4に示すように、他の加工食品には見られない2層の不溶層が確認されたが、アセトニトリル層のみを分取した。回収率を算出するための検量線もマトリックス検量線を用いた。結果、回収率50~200%を満たす成分数は表4に示しているように198成分となり飛躍的に増加した。したがって、みそについては、水を含んだ抽出溶媒により抽出することが有用であることがわかった。

表5 LC/MS/MS添加回収率結果

	きのこ水煮	加工品 さつまいも	はりはり漬	中華 れんこん	鮭 フレーク	さば みそ煮	がんも どぎ	ピー ナッツ クリー ム	ぎ ょう ぎ	み そ	ト マ ト
200% <	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
150%-200%	5	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
120%-150%	5	7	4	2	6	0	1	2	2	0	3
70%-120%	53	58	61	66	58	67	55	65	57	41	81
50%-70%	10	4	4	9	5	10	13	10	8	35	2
<50%	14	17	17	13	18	10	19	10	21	12	2
50%-200%	73	70	70	78	70	78	69	78	67	76	86
測定可能 成分比 (%)	83	80	80	89	80	89	78	89	76	86	98

※測定可能成分比率100%のとき88成分

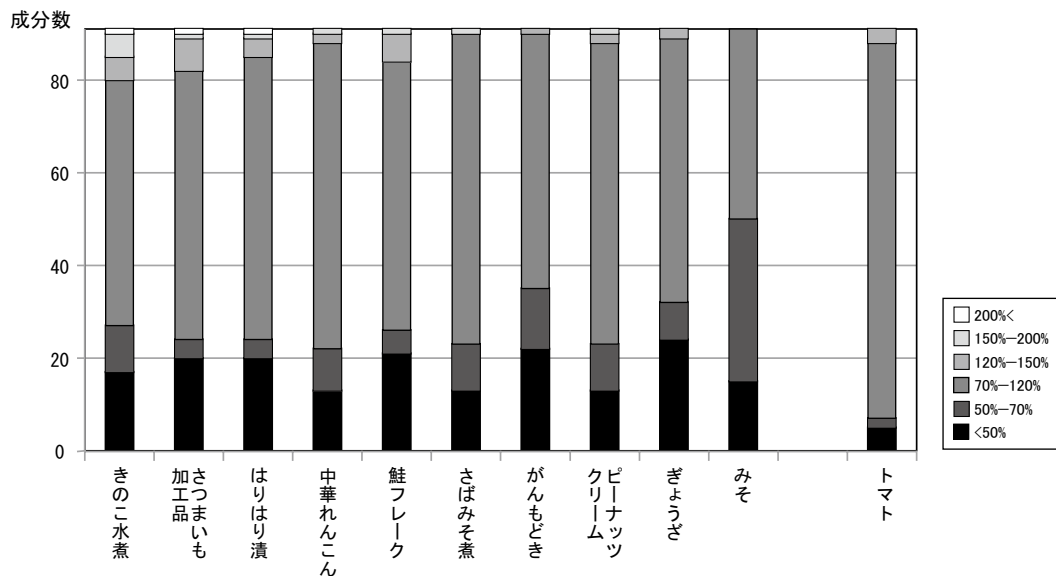


図3 LC/MS/MS 添加回収率結果

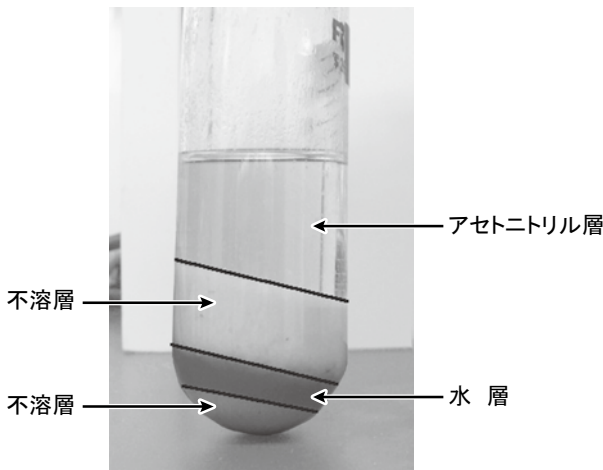


図4 みそ水添加抽出遠心分離直後

4 みそ及びぎょうざのマトリックスについて

図5にみそ、ぎょうざ、トマトおよび農薬218種混合標準溶液のGC/MSトータルイオンクロマトグラフを示した。

生鮮食品のトマトと比較して、みそ、ぎょうざは共存成分の数が多く、またそのピーク強度も数倍高いことがわかった。

みそは、保持時間20分までに共存成分のピーク本数が多いが、保持時間10~20分については多数の農薬成分が溶出してくるため、これら共存成分が、農薬成分の定性・定量を困難にしていると考えられた。

一方、ぎょうざは、保持時間20分以降に共存成分の高いピークが観測されたが、20分以前はみそほど共存成分のピークが観測されていない。そのため、ぎょうざはみそほど、農薬成分の定性・定量が困難ではなかったと考えられた。

図5からも明らかのように、加工食品に関して、共存成分の影響が大きく、これらが農薬成分の定性・定量を困難にしている。このことから、引き続き前処理法の検討を行っていくこと、あるいは測定機器に関して、今回はGC/MSにより分析を行ったが、より高選択性を有するGC/MS/MSを導入すること等が分析精度の向上に有効であると考えられた。

5 加工食品の測定結果

2008年度に当センターに持ち込まれた加工食品48検体について、残留農薬は検出されなかった。

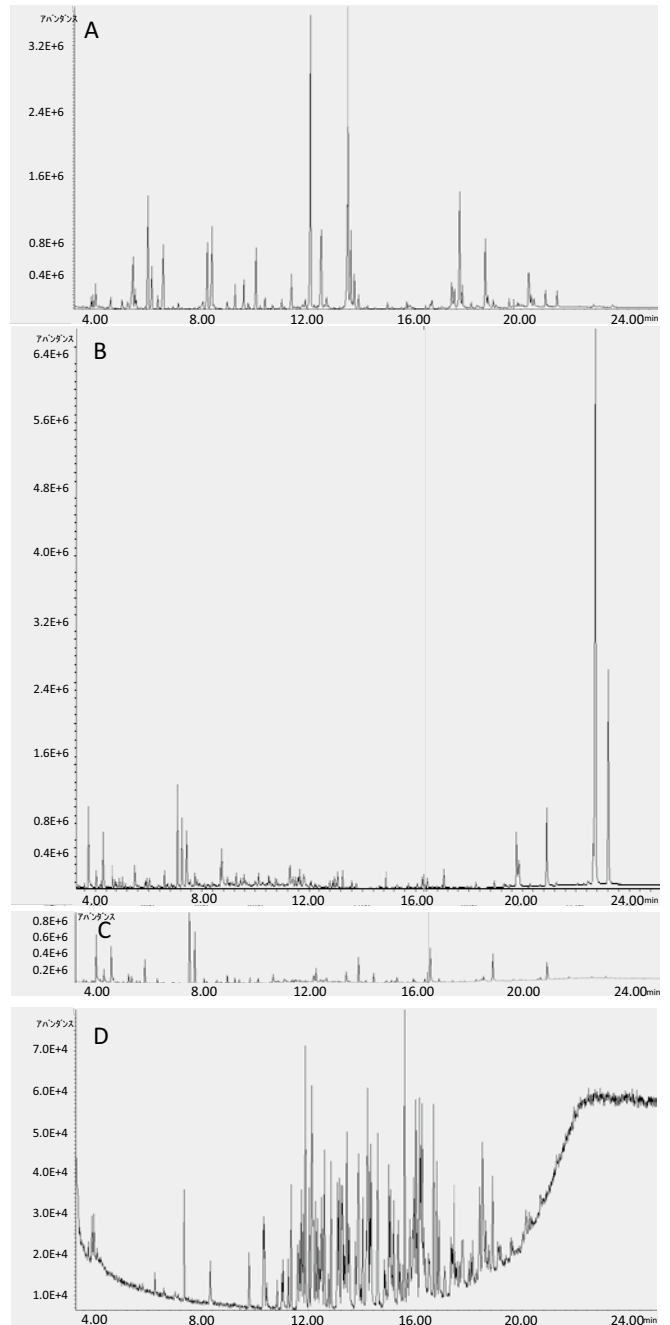


図5 加工食品のGC/MSトータルイオンクロマトグラフ
A: みそ, B: ぎょうざ, C: トマト,
D: 218成分農薬混合標準液(100ppm)

ま と め

生鮮食品に関する通知法が、多くの加工食品でも十分にスクリーニング検査に適用可能であることが確認できた。

しかし、ピーナツクリーム、ぎょうざ等の脂質が多く含まれる食品についてはGC/MSによる測定で回収率が高くなる傾向があり、定量の際はマトリックスマッチ検量線を作成することが望ましい。

また、みそについては、通知法による分析では回収率がGC/MSおよびLC/MS/MSともに、他の加工食品に比べ低くなる傾向であったが、抽出時に水を加えて攪拌することで、回収率が改善されることが確認できた。

生鮮食品と加工食品を比較すると、加工食品のほうが70~120%を満たす農薬成分数が全体的に少ないこと、妨害ピークが多く観測されることから、引き続き前処理法の検討が必要である。また、より高選択性を有する機器の導入（GC/MS/MS）についても検討の必要がある。

2008年度に当センターに持ち込まれた加工食品48検体について、残留農薬は検出されなかった。

クロマトグラフ/タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)を用いた食品中の残留農薬迅速分析法の検討(第1報), 熊本県保健環境科学研究所報, 35, 51-56(2005)

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0124001号「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
- 2) 岡本葉, 高取聡, 住本健夫, 尾花裕孝: 加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発(1) - LC/MS/MSを用いた検討 -, 第96回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, 95(2008)
- 3) 北川陽子, 起橋雅浩, 住本健夫, 尾花裕孝: 加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発(2) - GC/MS及びGC/MS/MSを用いた検討 -, 第96回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, 96(2008)
- 4) 松本苗緒, 吉川真弓, 江田邦章, 金来広文: GC/MSおよびLC/MS/MSによる加工食品原材料中235農薬分析における簡易前処理法, 食品衛生学雑誌, 49(3), 211-222(2008)
- 5) 飛野敏明, 松下豪, 柳井誠二郎, 飛野敏明: キャピラリーGC/MSを用いた農産物中残留農薬分析における試料マトリックスの影響, 熊本県保健環境科学研究所報, 29, 40-46(2005)
- 6) Tanizawa, H., Shima, M., Ikehara, C., Kobata, M., Sato, M. Multi-residue method for screening of pesticides in crops by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 46, 185-197(2005)
- 7) 西名武士, 村川弘, 福島孝兵, 飛野敏明: 液体

フグ食中毒事例におけるTTX分析について

森崎澄江, 溝腰利男, 山下秀門

Analysis of Tetrodotoxin in Case of Food poisoning Caused by *S.Porphyreus* (Mafugu)

Sumie Morisaki, Toshio Mizokoshi, Hideto Yamashita

Key words : テトロドトキシン Tetrodotoxin, 食中毒 Food poison
高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 LC/MS/MS

はじめに

大分県ではフグを原因食品とする食中毒（フグ中毒）は最近の10年間で9件発生し、患者は12名（死者なし）であった。フグの入手経路としては、釣りが4件で飲食店や鮮魚販売店が5件、フグの種類別ではトラフグ3件、ヒガンフグ2件のほかコモンフグ、クサフグ及びマフグなど多様であった。

これまで、フグ中毒の原因物質であるテトロドトキシン(TTX)の同定は、魚体や調理食品の残品(以後調理残品)について、公定法¹⁾のマウス毒性試験法を用いて行ってきたが、マウスが常時購入できないため迅速な検査が困難であること、魚体や調理食品が残っていない場合は同定ができない等の問題があった。

これらの問題を解決するため、近年TTXの分析方法として高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS法)²⁻⁵⁾を使用した分析法が報告されていることから、2009年2月に本県で発生したフグ食中毒事例の調理残品、吐物及び患者尿を試料として公定法及びLC/MS/MS法で分析を行い、その有用性について検討した。

試料及び検査方法

1 試料

2009年2月6日に、販売が禁止されているマフグの卵巣を購入し、煮付けにして食べた大分市内の男性1名と、1パックを分けてもらい調理して食べた由布市の男性1名がしびれなどを訴えて入院した事

例における以下の試料(判別記号A~F)を用いた。
卵巣の調理残品：大分市男性分317g (A), 由布市男性分315g (B)
吐物：大分市男性分48g (C), 由布市男性分217g (D)
尿：大分市男性分 (E), 由布市男性分 (F)

2 試薬等

TTX標準品：和光純薬工業株式会社製生化学用を使用した。標準原液は標準品1mgを精製水に溶解し20mlとし、標準溶液は適宜0.1%酢酸で希釈した。

その他の試薬：和光純薬工業株式会社製残留農薬用又は特級品を用いた。

C18カートリッジ：Waters社製 Sep-Pak VAC 6cc(1g)をあらかじめメタノール5ml及び精製水10mlでコンディショニングして使用した。

HILICカートリッジ：SeQuant社製 ZIC-HILIC SPE 6ml(1g)をあらかじめ精製水5mL, アセトニトリル10ml, 80%メタノール10mlでコンディショニングして使用した。

3 試料調整

3.1 マウス毒性試験法(以後マウス法)

卵巣の調理残品は公定法¹⁾により行った。また、吐物は3000rpmで10分間遠心分離した後、上澄み液をマウスアッセイに供した。

3.2 LC/MS/MS 試験法(以後LC/MS/MS法)

卵巣の調理残品及び吐物はマウス法で得られた0.1%酢酸抽出液を測定可能な濃度まで希釈し、

0.45 μmセルロースフィルターで濾過し測定に供した。

尿は赤木らの方法⁴⁾に準じる方法で処理し測定に供した。

図1及び図2に検査方法のフローを示す。

4 装置及び測定条件

4.1 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent社製 1100シリーズ

質量分析装置：Applied Biosystems社製 API 2000

4.2 測定条件

カラム	Inertsil HILIC 5 μm 2.1mm×150mm
カラム温度	40°C
溶離液	A:0.05%ギ酸 B:アセトニトリル
流速	200 μl/min
グラジエント	pre 5min 0-2min B:90%→15 min B: 0%→18 min B: 0%
注入量	5 μl+5 μl (インジェクター 2液混合法)
MS/MS	イオン化モード ESI (+)

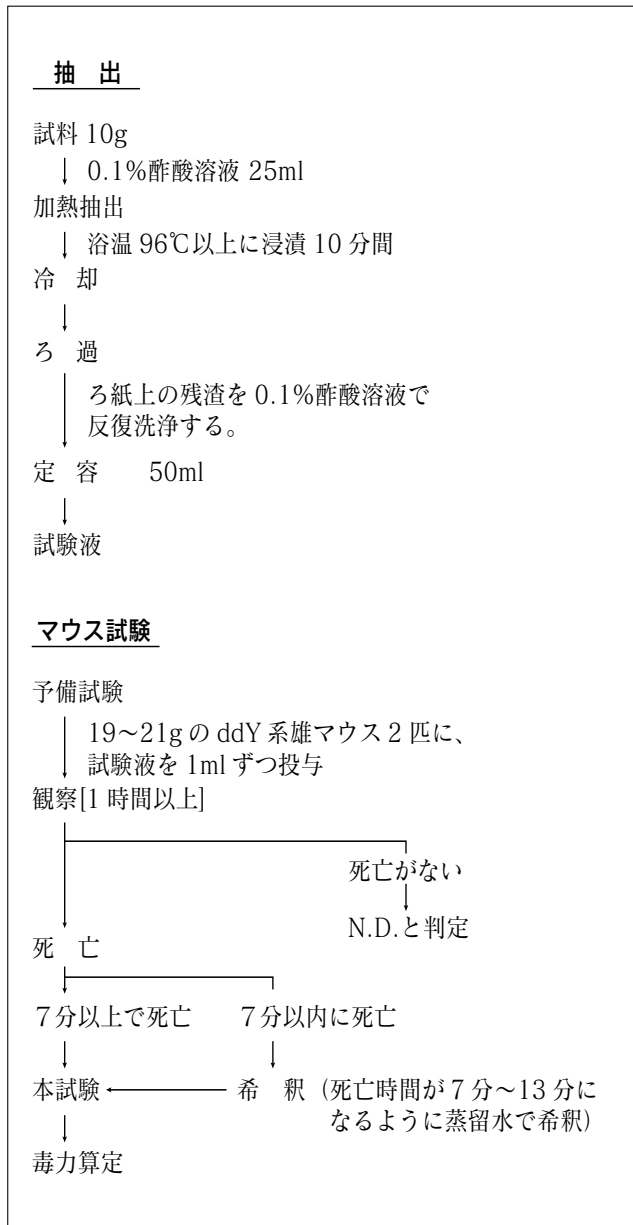


図1 公定法によるフグ毒検査フロー図

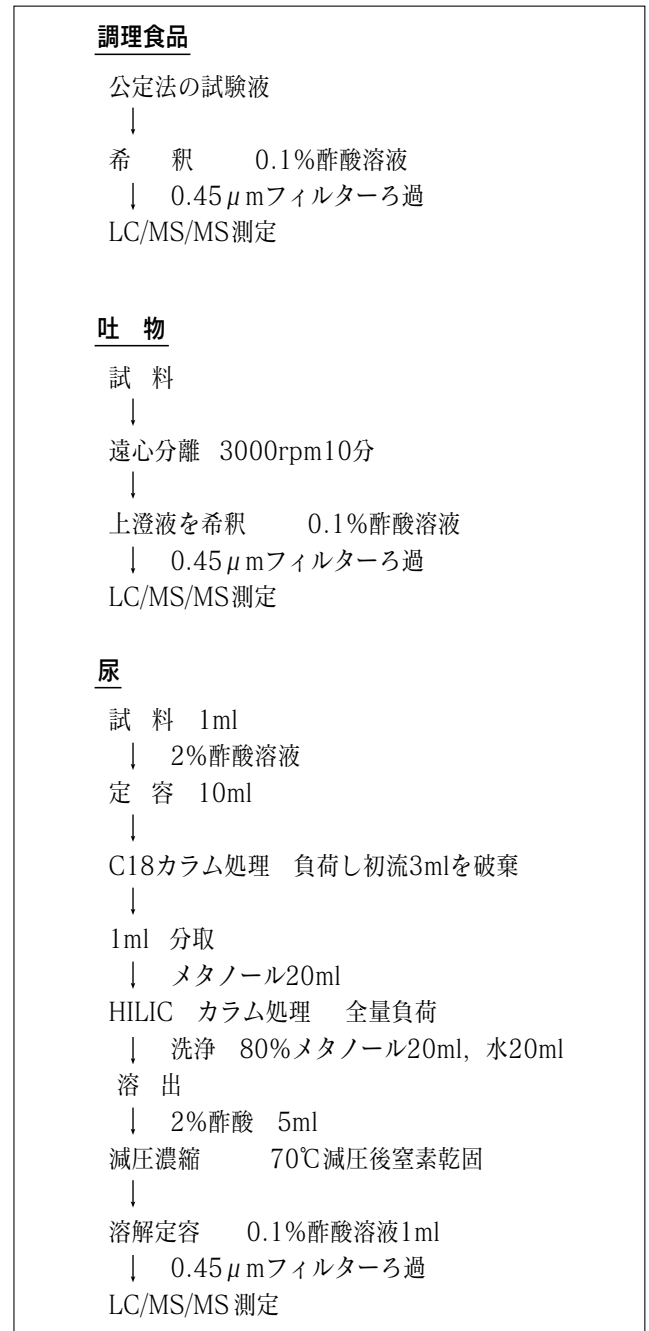


図2 LC/MS/MS法の処理フロー図

測定モード MRM
 イオンプレー 5500V
 ターボガス 500℃
 測定イオン Q1/Q2 320/302 (CE:35 eV) ,
 320/162 (CE:50 eV)

結果及び考察

1 検量線

一般的に、LC/MS/MSを用いた分析ではマトリックスによりイオン化効率が異なるため、マトリックス検量線を用いて定量するが、本事例では調理残品及び吐物についてマトリックス検量線作成の試料が入手できなかったことから、絶対検量線法により定量した。

マトリックスによるイオン化阻害をできる限り低減し、ピーク形状がよく、強度の再現性も得られる表1の条件を選び検量線を作成したところ、5~50 ng/mlの範囲で良好な直線性が得られ、検出下限値は0.5ng/mlであった。

また、一般人の尿の調製溶液を用いて、インジェクターでの2液混合法(標準溶液5μl+マトリックス5μl)によるマトリックス検量線を作成したところ標準溶液5点の平均強度は絶対検量線に比べ約30%減少した。

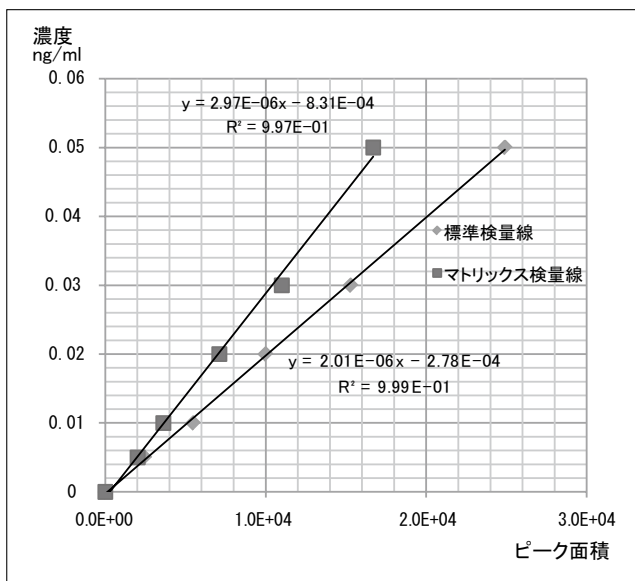


図3 LC/MS/MS法によるTTX (Q1/Q2 : 320/162) の検量線

2 尿による添加回収試験

尿1mlに200ngのTTXを添加 (n=5) し、上記のマトリックス検量線を用いて回収率を求めた結果、平均回収率98.0%、変動率4.3%と良好であった。

表1 尿を用いたテトロドトキシン回収試験 (n=5)

サンプル量	尿 1ml
添加量	TTX 200ng
希釈倍率	10
平均値	19.6ng/ml
標準偏差	0.84ng/ml
平均回収率	98%
変動率	4.3%

3 フグ中毒検体の測定結果

各試料をマウス法及びLC/MS/MS法により分析し、1 MU/gは0.22 μg/gに相当する¹⁾ ことからLC/MS/MS法の測定値をMU/gに換算し比較した。

3.1 卵巣の調理残品

大分市男性分 (A) がマウス法では305MU/g、LC/MS/MS法ではTTX62.5 μg/g (換算値284MU/g)、由布市男性分 (B) が同様に101MU/g、22.0 μg/g (換算値100MU/g) となり両測定法の相関比は0.99、0.93と良好であった。

3.2 吐物

大分市男性分 (C) がマウス法では14.9MU/g、LC/MS/MS法ではTTX3.16 μg/g (換算値14.4MU/g)、由布市男性分 (D) が同様に2.1MU/g、1.04 μg/g (換算値4.7MU/g) となった。

両測定法の相関比は、大分市男性分 (C) で0.96と良好であったのに対し、由布市男性分 (D) では2.24となりLC/MS/MS法が高くなった。これは、後者の濃度が公定法の検出下限値 (5 MU/g) 未満であったことから、希釈を行わず原液を用いて測定したことによる影響が考えられた。

3.3 尿

マウス法では検出下限値 5 MU/ml (TTX1.1 μg/ml) で、尿の原液を使った場合でも1 MU/g (TTX0.22g/l) であるため患者試料の測定はできなかった。

一方、LC/MS/MS法では大分市男性分 (E) が0.040 μg/ml、由布市男性分 (F) 0.056 μg/mlであった。

表 2 食中毒試料フグ毒分析結果

検体情報				マウス試験		LC/MS/MS 試験				MU比
番号	種別	採取場所	搬入量	測定時 希釈倍率	MU/g	測定方法	測定時 希釈倍率	TTX 濃度 $\mu\text{g/g}$ *1	換算 MU/g *2	LCMS/ マウス
A	卵巣 調理残品	大分市	317g	60 倍希釈	305	公定法抽出/ 絶対検量線法	500 倍希釈	62.5	284	0.93
B		由布市	315g	22 倍希釈	101	公定法抽出/ 絶対検量線法	500 倍希釈	22.0	100	0.99
C	吐物	大分市	48g	11 倍希釈	14.9	遠心分離/ 絶対検量線法	100 倍希釈	3.16	14.4	0.96
D		由布市	217g	希釈なし	2.1	遠心分離/ 絶対検量線法	100 倍希釈	1.04	4.7	2.24
E	尿	大分市 (2月7日分)	約 10ml			カラム処理/ マトリックス検量線法	10 倍希釈	0.040	0.18	
F		由布市 (2月7日分)	約 10ml			カラム処理/ マトリックス検量線法	10 倍希釈	0.056	0.25	

*1 : 尿は $\mu\text{g/ml}$ *2 : $1\text{MU/g}=0.22\mu\text{g/g}$ とした

この値は中毒患者の尿から $0.024\sim 0.078\mu\text{g/ml}$ を検出した秦野らの報告値⁴⁾及び $0.015\sim 0.150\mu\text{g/ml}$ を検出した赤木らの報告⁵⁾と比較して同等の濃度であった。

まとめ及び考察

- 1 TTX測定法としてLC/MS/MS法を検討した結果、 $5\sim 50\text{ng/ml}$ の範囲で良好な検量線が得られ、尿を用いたマトリックス検量線の平均強度は絶対検量線に比べ約30%減少した。
- 2 中毒時の尿中TTX濃度はマウス法では測定できないが、LC/MS/MS法では $n=5$ の平均回収率98%、変動率4.3%と精度よく測定できた。
- 3 2009年2月に本県で発生したフグ中毒事例において、公定法及びLC/MS/MS法で比較検討した結果、調理残品では両測定法の相関比は0.99、0.93と非常によかった。

また、吐物ではマウス法で希釈して測定した検体は、相関比0.96と同等の結果であったが、検出下限値(5 MU/g)未満であったことから、原液を用いて測定した検体については2倍以上の濃度差がみられた。

- 4 以上の結果から、フグ中毒の原因物質TTXの同定手法として、標準溶液の 1ng/ml 付近の低濃度まで測定できるLC/MS/MS法は、希釈及びミニカラム処理等マトリックスの影響を削減する対策をとることにより、マウス法の代替法として有効と考えた。

参考文献

- 1) 厚生労働省監修,「食品衛生検査指針・理化学編」日本食品衛生協会(2005)
- 2) 堀江正一,石井里枝 他: LC/MSによるフグ毒テトロドキシンの分析,日本食品衛生学雑誌,43(4),234(2002)
- 3) 盛岡浩文,山本雄三他: コモンフグによる食中毒事例,宮崎県衛生環境研究所年報,17,58(2005)
- 4) 秦野真澄,難波江芳子他: LC/MS/MSによる尿中のテトロドキシンの分析,愛媛県衛生環境研究所年報,8,17(2005)
- 5) 赤木浩一,畑野和広: LC/MS/MSによるフグ組織およびヒト血清・尿中のテトロドキシンの分析,日本食品衛生学雑誌,47(2),46(2006)

低特異性PCR法による高感度ウイルス検出法の確立

長岡健朗*, 加藤聖紀, 本田顕子

Identification of wide spectrum of viruses using low-specific annealing PCR technique

Kenro Nagaoka, Miki Kato, Akiko Honda

Key word : AP-PCR, 遺伝子配列解析 Sequencing

要旨

E. Desmarais¹⁾らのUniversal sequencing primersを用いてPCR反応を行い, そのPCR産物の遺伝子解析を行うことにより, 不特定のRNAウイルスを高効率で低コストに検出することが可能となった。逆転写反応に際し, あらかじめ検体とフォワードプライマーを混合, 急冷させることで高効率に非特異反応を起こすことができた。

はじめに

近年, PCR法といった遺伝子検査による病原体検索法が発達し, ウイルス検査においてもその比重は非常に大きなものとなっている。通常のPCR反応ではターゲットとなる遺伝子に対して特異的なプライマーを使用する。例えば, ノロウイルスの検査ではノロウイルスに対するプライマーで反応があれば陽性, なければ陰性と判定するという, いわばyes/noを問う検査である。したがって, 考えられるすべてのプライマーで検査しても検出できないと手詰まりの状態になってしまう。本研究の目的は, 特異性の低い条件でPCR反応を起こさせ, 非特異反応で生じたPCR産物の遺伝子配列解析を行い, それが何 (what)であるかを検索できるようにすることである。プライマーと被検遺伝子とのランダムな結合を利用した技術としてRAPD法やAP-PCR法がある。この両者は, 特異性が低くなる条件の下でプライマーと被検遺伝子を反応させるという点では類似しているが, 10bp程度の短いプライマーを利用するものはRAPD法と, それより長いプライマーを利用するものはAP-PCR法と呼ばれ区別されてい

る。これらの反応は通常, 細菌や真核生物の遺伝子を対象とし, 複数のバンドが出現するパターンを比較して遺伝子の多様性を比較するのに用いられることが多い。今回, 我々はAP-PCR法でRNAウイルスの遺伝子を増幅し, そこで増幅された遺伝子の断片をシークエンス (遺伝子配列解析) することにより, ターゲットに対するプライマーを用いずにウイルスを同定する方法を検討した。ウイルスはゲノムのサイズが細菌や真核細胞より小さいため, 通常の条件でAP-PCR用のプライマーで増幅を行っても, 非特異反応はあまり生じず, シークエンス反応に用いることができるPCR産物の数も限られ, また, 再現性も低い傾向にあった。RNAウイルスを逆転写する際に, あらかじめ検体とAP-PCRフォワードプライマーを混合し, 氷冷により非特異アニーリングを促進したところ, PCR効率が大幅に改善され, 再現性も改善した。この方法により, 従来の方法では検出できなかったウイルスの同定が可能になった。現時点では, この技術は細胞で分離されたRNAウイルスに対して応用可能であることが確認された。最終的な目標では, DNAウイルスも含めたあらゆるウイルスを臨床検体から直接同定可能にすることである。未知ウイルスによる感染症の発生の際には迅速な対応を可能にすることが期待される。

*大分県宇佐家畜保健衛生所

材料及び方法

1 材料

1.1 プライマー

被検ウイルスの遺伝子を増幅するPCR反応にはE. Desmaraisら¹⁾のUniversal sequencing primersを用いた。このシステムは、フォワード側の-40USPプライマー（17塩基）とリバーズ側のDALPRプライマー（24塩基）でなっており、さらにフォワード側プライマーとして、-40USPの3'末端に異なった配列の2から4個の塩基を加えた8種類のプライマーを配している（図1）。

1.2 検体

1.2.1 試行1

試行1では、平成20年度に培養細胞で分離されたが、同定に至らなかったウイルス5株（s195, s311, s345, s366, s368）について本法による同定を試みた。

1.2.2 試行2

試行2では、ウイルスの種類によらず広くRNAウイルスが検出できるかどうかを確認するため既知のウイルスについて本法による同定を試みた。被検ウイルスとしては日本脳炎ウイルス（フラビウイルス科）、パラインフルエンザウイルス（パラミクソウイルス科）、エコーウイルス（ピコルナウイルス科）およびインフルエンザウイルス（オルソミクソウイルス科）の4種の科の異なるウイルスを選定した。

2 方法

検体をRNA分解酵素（RNase）処理し、細胞等に由来するウイルス粒子外のRNAを除去した後、QIAamp Viral RNA Mini KitでウイルスRNAを抽出した。抽出したRNAはDNA分解酵素（DNase）処理を行い、細胞やコンタミネーションに由来するDNAを除去した後、-40USPをプライマーとして逆転写反応を行った。アニーリング効率を高めるために、逆転写反応の際は、まず、鋳型RNAとプライマーを混合し、70℃に加温した後、一気に氷冷した。その後逆転写酵素等を加え逆転写反応を行い、cDNAを作成した。

cDNAの増幅は2段階に分けて行った。第1段階ではプライマーに-40USPとDALPRを用いた。なお、この反応では最初の1サイクルのみ低いアニー

リング温度と長い伸長反応時間で、効率的に非特異反応を引き起こした。第2段階では、第1段階の生成物を鋳型にして、フォワード側プライマーには異なった配列が加えられた8種のプライマーを、リバーズ側プライマーにはDALPを用いた。第2段階のPCR産物は、電気泳動で確認し、明瞭なバンドをゲルから切り出し、遺伝子配列解析に供した。

電気泳動で遺伝子配列解析に好適な濃いバンドが得られない場合は、DALPプライマーを他の任意プライマー（他の遺伝子を検出する目的で作成したプライマー）に置き換え、再度第1段階からPCR反応を行った。工程の概略を図2に示す。

結 果

1 試行1

試行1では供試ウイルス全てが同定され、s311, s345, s366およびs368はパレコウイルスであることが分かった。s195はレオウイルスであった。これらの結果は電子顕微鏡での観察で推察される結果とも一致し（s368は電子顕微鏡観察未実施）、また、パレコウイルスについては、後に作成したパレコウイルス検出用プライマーを用いてのRT-PCR法で、その結果が確認された。

2 試行2

試行2では、DALPRプライマーを用いて行ったPCRでは、あまりはっきりとしたバンドが確認されず、特にパラインフルエンザウイルスとインフルエンザウイルスでは、明瞭なバンドは観察されなかった。その中から、日本脳炎ウイルスでおよびパラインフルエンザウイルスではそれぞれ3本、エコーウイルスとインフルエンザウイルスではそれぞれ1本のバンドを切り出し、遺伝子解析を行った。そのうち4本のバンド（パラインフルエンザウイルスの検体で2本、日本脳炎ウイルス、エコーウイルスの検体でそれぞれ1本）が遺伝子解析できたが、目的ウイルスの遺伝子であったのは日本脳炎ウイルスの1検体だけであった。

そこで、DALPRプライマーをLCMVOFプライマー（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス検出用のプライマー）に替え、再度PCR反応を行ったところ、4種全てのウイルスで明瞭なバンドが認められた。それらのうちパラインフルエンザウイルス、日

逆転写反応		-40USP	GTTTTCCCAGTCACGAC
1次増幅	フォワード	-40USP	GTTTTCCCAGTCACGAC
	リバース	DALPR ※	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
2次増幅 (選択増幅)	フォワード	DALP221	GTTTTCCCAGTCACGAC GC
		DALP231	GTTTTCCCAGTCACGAC AGC
		DALP232	GTTTTCCCAGTCACGAC GAC
		DALP233	GTTTTCCCAGTCACGAC ACG
		DALP234	GTTTTCCCAGTCACGAC CAG
		DALP235	GTTTTCCCAGTCACGAC CAC
		DALP241	GTTTTCCCAGTCACGAC TCAG
		DALP242	GTTTTCCCAGTCACGAC CTAG
	リバース	DALPR ※	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
シーケンス反応		-40USP	GTTTTCCCAGTCACGAC

※:リバースプライマーはDALPRの代わりに他の任意プライマーも用いた。今回マリンバクテリア性脈絡髄膜炎検出用プライマー(LCMVDF)を用いた。

図1 使用したプライマー

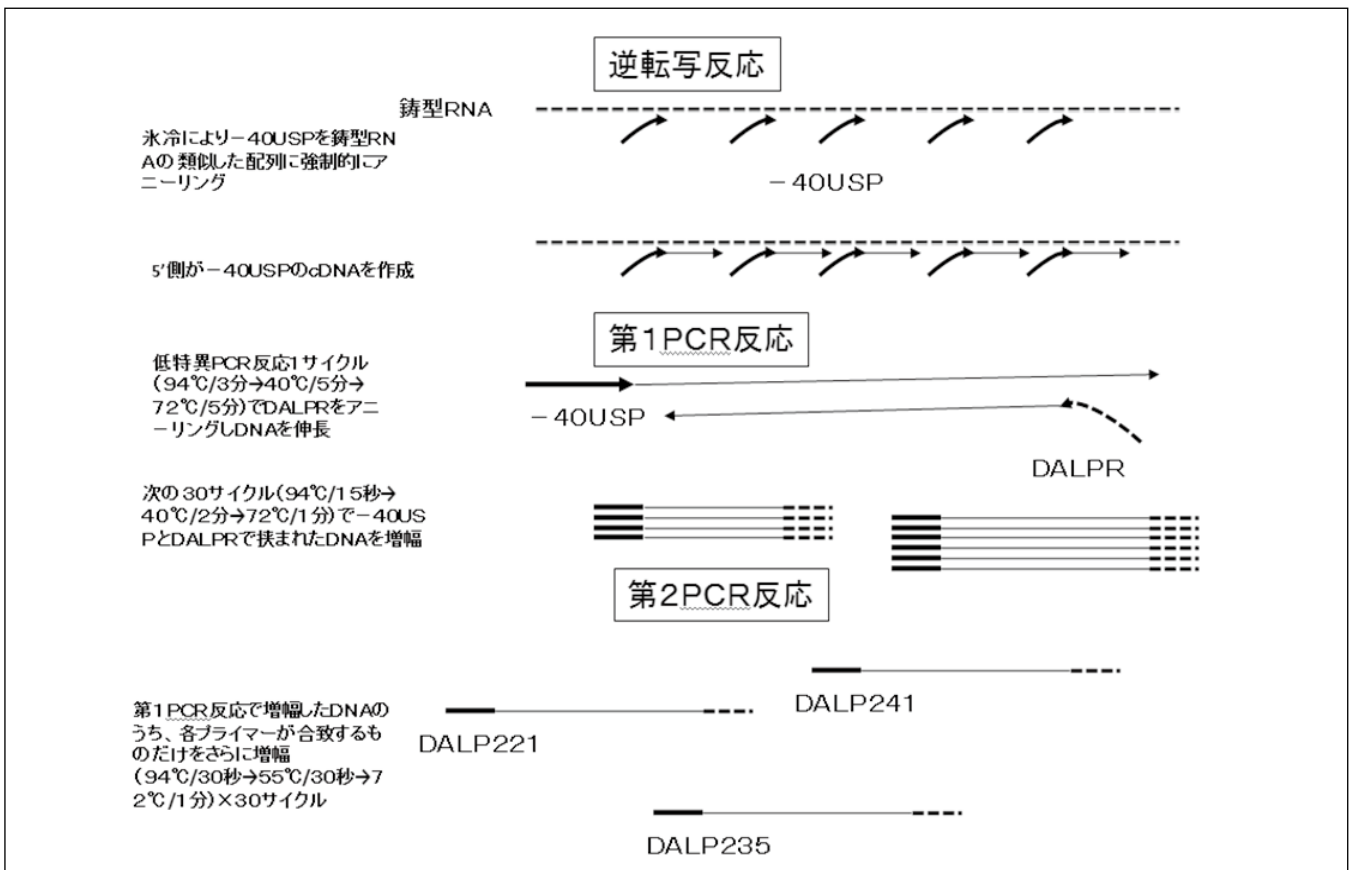


図2 工程の概略

表 1 試行 2 結果まとめ (1)

リバープライマー	ウイルス	フォワードプライマー							
		DALP 2 2 1	DALP 2 3 1	DALP 2 3 2	DALP 2 3 3	DALP 2 3 4	DALP 2 3 5	DALP 2 4 1	DALP 2 4 2
DALPR	日本脳炎ウイルス	ND	×	×	ND	ND	◎	ND	ND
	パラインフルエンザウイルス	×	バクテリア	ND	ND	ND	バクテリア	ND	ND
	エコーウイルス	ND	ND	ND	ND	ND	ND	マイコプラズマ	ND
	インフルエンザウイルス	ND	ND	ND	ND	ND	ND	×	ND
LCMVOF	日本脳炎ウイルス	ND	ND	◎	ND	◎	◎	×	×
	パラインフルエンザウイルス	ND	細胞成分	ND	ND	◎	◎	×	◎
	エコーウイルス	ND	◎	×	ND	◎	◎	×	ND
	インフルエンザウイルス	Acholeplasma	ND	Acholeplasma	Acholeplasma	ND	ND	Acholeplasma	ND

◎ : 目的ウイルスの遺伝子を検出

× : 遺伝子検査不能

ND : 実施せず

本脳炎ウイルス, エコーウイルスの検体でそれぞれ5本, インフルエンザウイルスの検体で4本のバンドを切り出し, 遺伝子解析を行ったところ, パラインフルエンザウイルス, 日本脳炎ウイルス, エコーウイルスの検体ではそれぞれ3検体で目的ウイルスの遺伝子が検出された。一方, インフルエンザウイルスの検体では4本のバンド全てが解析できたが, 全て目的ウイルスの遺伝子ではなく, マイコプラズマ (Acholeplasma) の遺伝子であった (表1)。

リバープライマーおよびウイルスごとに, 検査数, 解析が可能であったものの数および目的ウイルスの遺伝子が検出された数を表2にまとめた。シーケンスを行った全検体数 (27検体) に対して, 遺伝子配列の解析が可能であったものは18検体 (66.7%) であり, そのうち10検体 (37.0%) で目的ウイルスの遺伝子が検出できた。

表 2 試行 2 結果まとめ (2)

リバープライマー	ウイルス	検査数	解析可	目的ウイルス
DALPR	日本脳炎ウイルス	3	1	1
	パラインフルエンザウイルス	3	2	0
	エコーウイルス	1	1	0
	インフルエンザウイルス	1	0	0
LCMVOF	日本脳炎ウイルス	5	3	3
	パラインフルエンザウイルス	5	4	3
	エコーウイルス	5	3	3
	インフルエンザウイルス	4	4	0
対検査数比		100%	66.7%	37.0%
対解析比			100%	55.6%

考 察

試行2では, インフルエンザウイルスの遺伝子は検出できなかった。

Acholeplasmaは, ヒトの咽頭等に常在し, また, 培養細胞に潜在的にコンタミネーションを起こしていることも多い。今回の成績も, 検体に高度にAcholeplasmaが存在していたため, インフルエンザウイルスの検出が妨げられたものと思われる。このような検体でのウイルス検出を行う際にはあらかじめ抗生物質でAcholeplasma等のマイコプラズマ類を除去しておくことが有効であると思われる。

マイコプラズマ除去剤MC210(大日本製薬)でウイルスおよび細胞を処理し再検査したがそこでもAcholeplasmaが検出され, インフルエンザウイルスの遺伝子は検出されなかった (データ非表示)。MC210処理後もAcholeplasmaの汚染を根絶できなかったためと考えられた。Acholeplasmaが存在しない条件ではインフルエンザウイルスの遺伝子も検出可能であるかどうかには結論づけることができなかった。

試行2全体でシーケンスを行った数に対して, 66.7%遺伝子配列の解析が可能であり, 残りの33.3%では遺伝子の解析ができなかった。これは, ランダムにリバープライマーがアニーリングしているため両端にフォワード側プライマーがアニーリングして増幅されたバンドが含まれているためと思われる。偶然のアニーリングの頼っているこの検査法では, 不可避なコストだと思われる。

インフルエンザウイルスでの成績を除けば, シーケンスを行った数 (22検体) に対して, 10検体 (45.5%) で遺伝子配列の解析が可能であった。したがって, 遺伝子配列検索に供しうる明瞭なバンドが4~5本程度できれば, ほぼ確実に目的ウイルスの遺伝子を検出できるものと考えられる (理論

上, 検出率を45%とした時, 検体数4で95.9%, 検体数5で98.2%)。プライマーと目的遺伝子の結合は偶然によるため, 常に解析可能なレベルに遺伝子が増幅されるとは限らない。リバープライマーを何種が用意し, 十分な数の明瞭なバンドが得られるようにすれば確実にウイルスが同定できるものと思われる。

本法は, 検体のRNase処理から遺伝子解析までの全ての工程を2日で行うことができる。同時に何種類かのリバープライマーを用いてPCR反応をスタートさせておけば, おおむね1回の検査で, ウイルスの同定が可能であると思われる。

本法と同様に, 不特定のウイルスの遺伝子を増幅して同定する方法として, 水谷らの方法がある²⁾。水谷らは本法と同様に目的遺伝子を2段階で増幅しダイレクトシーケンスでその遺伝子を解析しているが, 水谷の方法では2度の遺伝子増幅に際して, いずれも遺伝子を断片化させ, そこにプライマーが結合する部位をアダプターとして取り付けている。本法では, 低温による非特異的なアニーリングによりPCR反応を起こしている点が大きく異なっている。本法はPCR反応とシーケンス法による遺伝子解析という地衛研等で通常行っている検査手技のみ(シーケンス解析を外注すればPCRのみ)でできることが長所として考えられる。

今回使用したウイルスは全て培養細胞で分離されたウイルスであった。咽頭ぬぐい液や脳脊髄液といった臨床検体から直接ウイルスが検出できれば, さらに本法の利用範囲は広くなるとと思われる。今後の検討課題である。

参 考 文 献

- 1) E. Desmarais, I.Lanneluc and J.Lagnel :
Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species 1458-1465
Nucleic Acids Research, 26(6), (1998)
- 2) 水谷 哲也 : 新興ウイルス感染症の網羅的検出方法 (RVD法) の確立と応用, ウイルス, 57(2), 127-226(2007)

Salmonella Braenderupによる小児重症感染事例と 大分県感染症発生動向調査におけるサルモネラ検出状況 (2004~2008年)

若松正人, 成松浩志, 緒方喜久代, 小河正雄, 糸長伸能*, 神野俊介*

Serious infection case of *Salmonella* Braenderup and Trend of *Salmonella* Surveillance in Oita Prefecture, 2004-2008

Masato Wakamatsu, Hiroshi Narimatsu, Kikuyo Ogata, Masao Ogawa
Nobuyosi Itonaga, Syunsuke Kanno

Key words : サルモネラ *Salmonella* , 感染症発生動向調査 Surveillance

はじめに

当所では、大分県内の主に小児における細菌性散発下痢症の発生動向を調査し、検出された細菌及び血清型等を医療機関に情報提供している。2009年2月に*S. Braenderup*による小児重症感染事例があったのでその概要及び2004~2008年における大分県内のサルモネラの検出状況について報告する。

事例

患者は2歳8ヶ月の男児で、2009年2月23日から発熱、腹痛、水様性下痢が10回程度続いたためA診療所を受診し、抗生物質等を処方され帰宅した。同日の夜、突然全身性強直性けいれんが出現し、数分間続いたため、大分県立病院に緊急入院となった。入院時体温は40.1℃で目線は合うが、四肢は伸展位のままで動かすと強直していた。熱性けいれん改善のためジアゼパム坐剤を投与した。白血球数8,920/ μ l, CRP3.32mg/dl, インフルエンザ抗原陰性、頭部CT正常、髄液所見は、無色透明で細胞数2/ μ lであった。

入院後の症状は、発熱、激しい水様下痢(ときに血液混入あり)、腹痛を認めた。

便培養検査で、*S. Braenderup*が検出され原因菌と考えた。

なお、患者は発症前日の朝食に生卵と納豆を混ぜ

たものや、夕食に焼鳥屋で鳥刺しを食べた箸でつくね等を食べていた。

患者には、整腸剤内服と輸液で治療を開始し、4病日より自然解熱し、便性・便回数も改善し、腹痛も消失したため、5病日に退院となった(図1)。

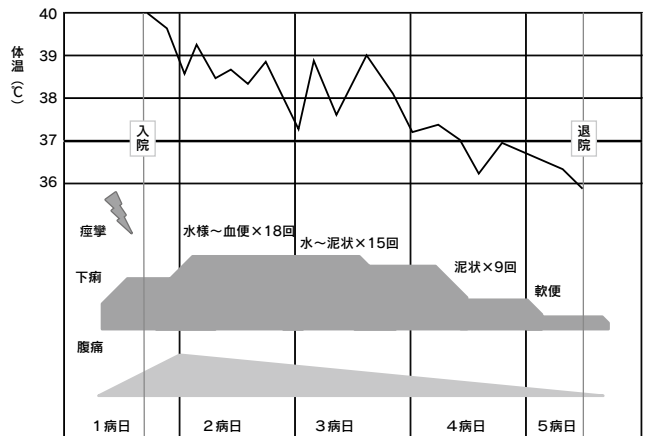


図1 経過図

サルモネラ検出状況

例年、医療機関から得られた下痢症患者便の検査件数の30%前後からサルモネラが検出されていたが、2005年には検出率が45.8%と急増し、その後2007年まで40%強の検出率であった。血清型では、1991年以来*S. Enteritidis*が首位を独占していたが、2007年には、*S. Braenderup*が第1位となった(表1)。

大分県内において*S. Braenderup*は、これまでほとんど検出されていない血清型であり2005年に突如21株検出され、2006年に13株、2007年には42株と全サルモネラ検出数の約半数を占めるまでに検出数が

*大分県立病院 小児科

表 1 大分県サルモネラ検出状況、2005～2008年（血清型上位10:細菌性下痢症サーベイランス患者由来）

順位	2004年		2005年		2006年		2007年		2008年	
1	Enteritidis	10	Enteritidis	86	Enteritidis	39	Braenderup	42	Enteritidis	13
2	Typhimurium	3	Braenderup	21	Braenderup	13	Enteritidis	31	Typhimurium	5
3	Infantis	3	Typhimurium	3	Typhimurium	5	Typhimurium	2	Hadar	4
4	Nagoya	2	Infantis	3	Infantis	2	Saintpaul	2	Stanley	3
5	Saintpaul	1	Saintpaul	1	Schwarzengrund	2	Infantis	1	Thompson	3
6	Litchfield	1	Litchfield	1	Saintpaul	2	Chester	1	Braenderup	2
7	Heidelberg	1	Manhattan	1	Manhattan	2	Derby	1	Saintpaul	2
8	Corvallis	1	Thompson	1	Miyazaki	2	Bareilly	1	Infantis	2
9	Agona	1	Anatum	1	Cerro	2	Montevideo	1	Derby	2
10	Bareilly	1	Montevideo	1	Stanley	1	Hadar	1	Schwarzengrund	1
	その他	4	その他	6	その他	7	その他	2	その他	10
合計		28		125		77		85		47

表 2 Braenderup の月別検出状況

	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
2005年				6	12	2	1		21
2006年				4	5	4			13
2007年		1	3	9	22	6	1		42
2008年		1			1				2
計	0	2	3	19	40	12	2	0	78

増加し、2005～2008年の4年間で計78株検出した。

他の血清型では、*S.Typhimurium*, *S.Infantis*, *S.Saintpaul*等が毎年検出されている。

*S.Braenderup*は2005～2007年の毎年9月をピークに8月から10月にかけて集中的に検出され（表2）、diffuse outbreakが疑われたため、検出された下痢症患者株（以下大分株）16株、九州近県からの譲渡株18株及び食肉衛生検査所から分与された豚盲腸便由来1株の計35株の*S.Braenderup*について、制限酵素*Xba* Iを用いたPFGE法を実施し、得られた泳動像をFingerprinting IIを使用してUPGMA法によるクラスター解析を行った。

解析の結果、PFGEパターンは数種に分かれ、大分株のパターンは、年度毎に差はなく9株は2005年

にB県の焼鳥屋で発生した食中毒由来の7株と同一であった。なお、豚盲腸便由来株のパターンとは異なっていた（図2）。

また、大分株13株については、12薬剤(ABPC, CET, KM, SM, TC, OFLX, CP, CPF, NA, NFLX, FOM, ST)の感受性試験を実施したところ、供試株は、全ての薬剤に感受性であった。

*S.Braenderup*による下痢症について共通の感染源の存在も疑われたが、感染源に結びつくような疫学情報は得られなかった。2008年の検出数は2株と減少し、流行が終息したものと考えられたが、2009年になり、上記事例のような重症例もあったことから今後も引き続き、サルモネラ症の発生動向に十分な注意が必要である。

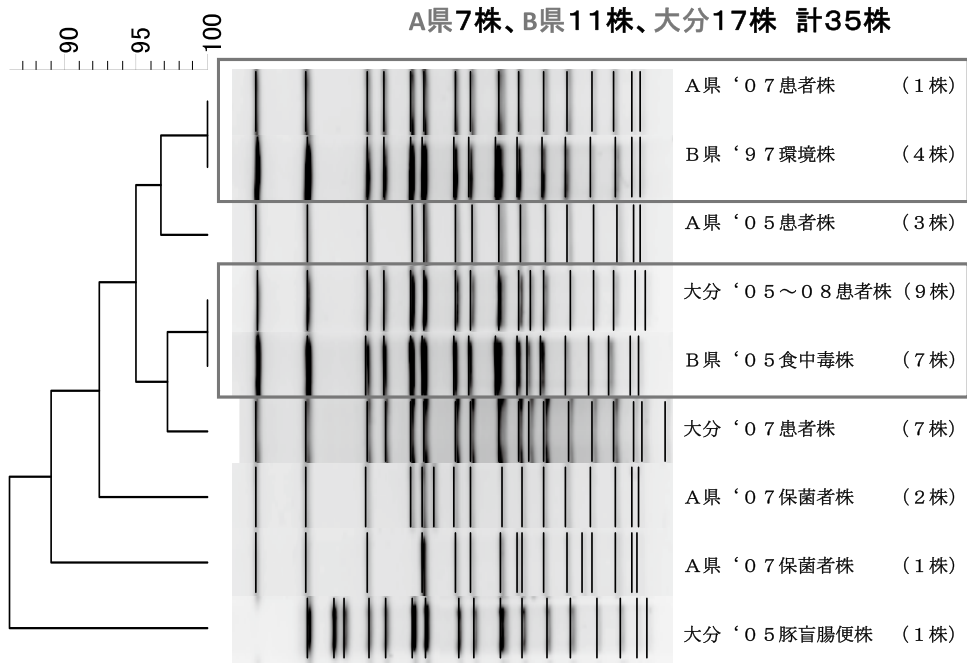


図2 PFPGの結果

大分県内の硝酸性窒素高濃度地域における地下水汚染の実態把握調査

中村千晴, 宮崎博文

Study on groundwater pollution contained a high concentration of Nitrate Nitrogen(NO₃⁻-N) in Oita Prefecture

Chiharu Nakamura , Hirofumi Miyazaki

Key word : 地下水 groundwater , 硝酸性窒素 Nitrate Nitrogen ,
環境基準 environmental standard ,
トリリニアダイアグラム trilinear diagram

はじめに

1999年2月, 水質汚濁にかかる環境基準及び地下水の水質汚濁に係る環境基準が改正され, 硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素が環境基準項目に追加された。

環境省が公表している全国の地下水調査結果では, 硝酸性窒素の環境基準超過が顕在化しており, 大分県においても表1のとおり, 一部の調査井戸において基準を超過している。

今回, 地下水中の硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素に

ついて環境基準超過地域の現状を把握するため, 地下水の調査を行ったので報告する。

方 法

硝酸性窒素が環境基準を超える井戸の集中する一地域を選定し, 現状をおおまかに把握するため硝酸性窒素の簡易水質測定 ((株)共立理化学研究所パックテスト) を実施した。

その結果から詳細調査井戸を選定し, 表2の項目

表1 大分県における硝酸性窒素の環境基準超過状況 (2006年度)

調査区分	調査井戸数(本)	検出数(本)	検出率(%)	基準超過数(本)	基準超過率(%)
概況調査	92	85	92.4	1	1.1
汚染井戸周辺地区調査	48	48	100	14	29.2
定期モニタリング調査	26	26	100	9	34.6

表2 水質測定項目及び測定方法

水質測定項目		測定方法		
現地	気温	日本工業規格(以下JIS) K0102の7.1に定める方法		
	水温	JIS K0102 7.2に定める方法		
現地及び試験室	電気伝導率	JIS K0102 13に定める方法		
	pH (25℃)	JIS K0102 12.1	ガラス電極法	
試験室	陽イオン	ナトリウムイオン	JIS K0102 48.3	イオンクロマトグラフ法
		カリウムイオン	JIS K0102 49.3	
		カルシウムイオン	JIS K0127	
		マグネシウムイオン	JIS K0127	
		アンモニウムイオン	JIS K0102 42.5	
	陰イオン	塩化物イオン	JIS K0102 35.3	
		硝酸イオン	JIS K0102 43.2.5	
		亜硝酸イオン	JIS K0102 43.1.2	
		硫酸イオン	JIS K0102 41.3	
		リン酸イオン	JIS K0102 46.1.1	
	炭酸水素イオン	JIS K0102 15.1	酸消費量(pH 4.8)による測定	

について採水調査を行った。

結果及び考察

2008年7月31日から8月5日にかけて行った硝酸性窒素の簡易水質測定の結果, 107の井戸のうち, 1mg/L未満が30か所(28%), 1~10mg/Lが49か所(46%), 10mg/L以上が28か所(26%)あり, 畑を取り囲んだように高濃度の井戸が分布していた。

これらの結果に井戸深度等の情報を参考として, 詳細調査井戸20か所, 水路1か所, 河川1か所の計22か所の測定地点を選定した。これらの地点において10月29日に採水調査を実施し, 表2の項目の水質測定を行った。その結果を硝酸性窒素濃度が10mg/L未満(図1)と10mg/L以上(図2)に分けてトリリニアダイアグラムにプロットした。

図1及び図2のトリリニアダイアグラムから調査箇所傾向を見ると, 地下水中の硝酸性窒素濃度が高くなるに従って, 図3のI型からIII型に移行していることがわかる。I型のアルカリ土類炭酸塩型は汚染の少ない一般河川水や不圧地下水の指標とされており, III型のアルカリ土類非炭酸塩型は肥料等の人為的汚染がある地下水の指標をされている。III型上部に深度10m未満の浅井戸が集中しており, 肥料から溶出したカルシウムイオン, マグネシウムイオン, 硫酸イオンの影響を強く受けていることが示唆された。また一部の井戸については硫酸イオン濃度も高くなる傾向が見られた。

次に各成分濃度の相関係数を表3に示す。硝酸性窒素と高い相関を示している成分はカルシウムイオン, マグネシウムイオン, 電気伝導率であり, いずれも0.8以上という非常に高い相関があった。また, カルシウムイオンと硫酸イオンの間にも0.8以上の相関があった。

表3から高い相関関係が明らかになった硝酸性窒素, カルシウムイオン, マグネシウムイオンは一般的に肥料の主成分であり, このことから当該地域の地下水汚染の原因が肥料からの溶出によるものであることが推測される。また, 硫酸イオンや塩化物イオンについても比較的高い相関関係があり, 使用される肥料の種類や量について, さらに調査を進める必要がある。

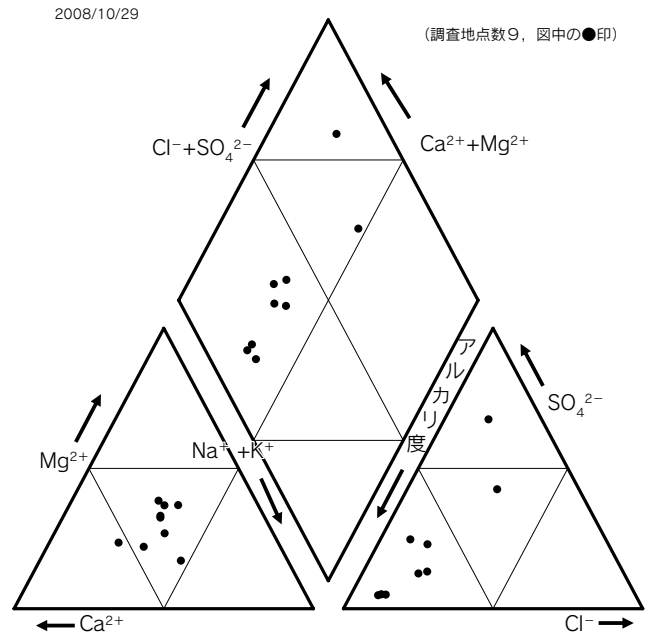


図1 硝酸性窒素10mg/L未満

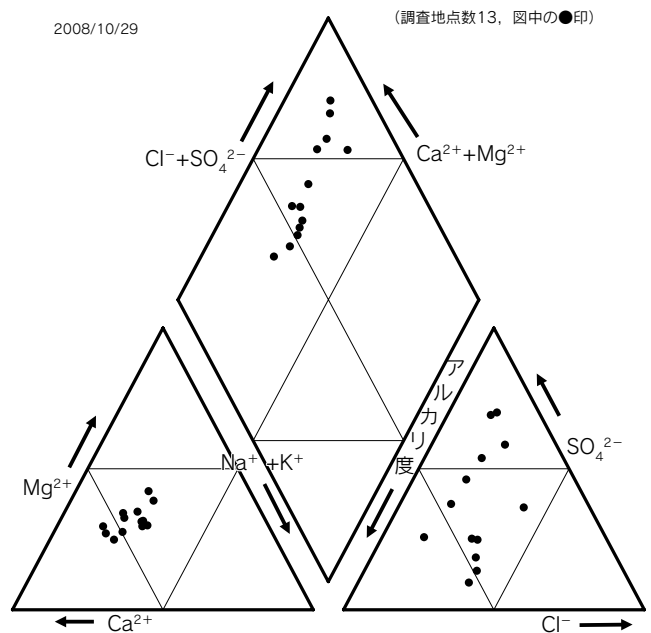


図2 硝酸性窒素10mg/L以上

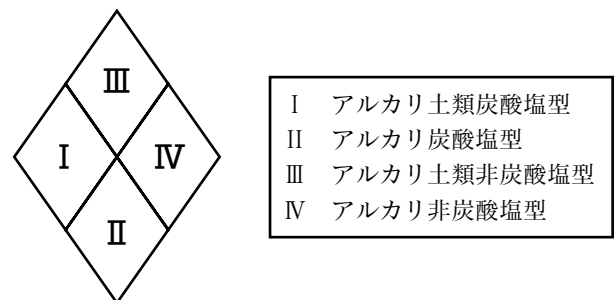


図3 トリリニアダイアグラムの型

表3 濃度相関マトリックス

	NO ₃ ⁻ -N	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	EC
NO ₃ ⁻ -N	1.000								
SO ₄ ²⁻	0.599	1.000							
Cl ⁻	0.785	0.159	1.000						
HCO ₃ ⁻	(0.424)	(0.701)	(0.334)	1.000					
Na ⁺	0.687	0.306	0.812	(0.280)	1.000				
K ⁺	0.345	(0.160)	0.386	0.379	0.453	1.000			
Ca ²⁺	0.882	0.839	0.508	0.508	0.468	0.126	1.000		
Mg ²⁺	0.897	0.450	0.614	(0.077)	0.591	0.460	0.750	1.000	
EC	0.975	0.710	0.699	(0.413)	0.680	0.328	0.944	0.888	1.000

参 考 文 献

- 1) 公害研究対策センター：硝酸性窒素による地下水汚染対策の手引(2002)
- 2) 環境省水・大気環境局：平成18年度地下水質測定結果(2007)
- 3) 大分県：公共用水域及び地下水の水質測定結果報告書(2008)
- 4) 日本地下水学会編：地下水・土壌汚染の基礎からの応用(2006)
- 5) (社)日本水環境学会：第13回日本水環境学会市民セミナー講演資料集(2004)
- 6) 北海道立中央農業試験場他：北海道農耕地における硝酸性窒素による地下水の汚染リスクと軽減対策(2009)
- 7) 愛媛県立衛生環境研究所：愛媛県衛生環境研究所年報, 8, 31-36(2005)

