

Shizuoka-Ken Kankyō Eisei Kagaku
Kenkyūsho Hōkoku 54(2011)
ISSN 1343-246X

静岡県環境衛生科学研究所報告

平成 23 年度

Bulletin
of
Shizuoka Institute of
Environment and Hygiene

No.54 2011

静岡県環境衛生科学研究所

はじめに

静岡県は、美しい自然環境と活力ある多彩な産業に恵まれており、自然と調和した持続可能な社会の実現を目指し、「低炭素社会」、「循環型社会」及び「自然共生社会」の3つの社会づくりを基本として環境政策を展開しています。

大気汚染及び水質汚濁の関係については、年々改善がみられ、環境基準の達成率は向上していますが、更なる向上と生活環境の保全に向け今後とも努力してまいりたいと考えております。

一方、近年、新型インフルエンザなどの感染症や指定薬物等、県民の生命と健康を脅かす新たな問題が発生しています。このため、迅速な検査法や予防技術の確立に関する調査研究が一層重要となっています。

このような背景を受け、静岡県環境衛生科学研究所は、環境や感染症等のデータ解析、分析技術の開発・普及など、環境と保健衛生の技術的中核機関として静岡県の環境と県民の健康を守るための各種試験検査及び調査研究を実施しております。

現在、調査研究の取り組みとしてファルマバレー構想の一翼を担う「創薬の構造最適化等に関する研究」、静岡県の新成長戦略研究として「富士山における水循環の解明と持続可能な地下水利用に関する研究」及び「ノロウイルス不活化剤の探索とその実用化に関する研究」のほか、新たに医療と連携した「腎臓移植後患者におけるBKウイルス腎症に関する研究」や、他研究機関と連携した「浜名湖の水質保全」などを重点研究と位置付け、学識経験者からなる研究アドバイザー（顧問）の指導や外部評価委員会の評価をいただきながら、効果的・効率的に研究を進め、併せて職員のレベルアップに努めることとしております。

ここに、平成23年度の調査・研究の成果を「静岡県環境衛生科学研究所報告No.54」としてまとめましたので、御高覧の上、御批判、御指導をいただければ幸いです。

平成25年1月

静岡県環境衛生科学研究所長 松本昭司

目 次

論 文

環境科学部

- 1 食品加工所からの汚泥または汚泥焼却灰の農業資材としての有用性の検討
…………… 中川寛基, 山下晶平, 古屋洋一, 久米一成 …………… 1
- 2 静岡県における外来種 (フロリダマミズヨコエビ) の生態調査
…………… 古屋洋一, 今津佳子, 久米一成, 金子亜由美 …………… 13

微生物部

- 3 県内における結核菌の VNTR 法による分子疫学調査
…………… 八木美弥, 道越勇樹, 飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり,
柴田真也, 西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治 …………… 21
- 4 市場使用海水や魚介類加工用海水の腸炎ビブリオ汚染実態調査
…………… 柴田真也, 道越勇樹, 飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり,
八木美弥, 西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治 …………… 25
- 5 食品等からのノロウイルス高感度検出法の検討
…………… 長岡宏美, 湊 千壽, 小柳純子, 山田俊博, 川森文彦, 杉山寛治 …………… 29
- 6 浴槽水の衛生管理への ATP 測定法の応用に関する検討
…………… 神田 隆, 道越勇樹, 高橋奈緒美, 八木美弥, 柴田真也,
西尾智裕, 杉山寛治 …………… 33
- 7 リケッチア感染症の迅速診断法に関する研究
…………… 川森文彦, 小柳純子, 山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治 …………… 37

医薬食品部

- 8 自然毒等の有害性化学物質の迅速分析法に関する研究
…………… 宮本憲吾, 内田恭之, 上村慎子, 渡辺陽子, 前田有美恵,
坂根弓子 …………… 41

9	医薬品の溶出性の安定性に関する研究	
	— PTP 包装医薬品の加湿保存による変化 —	
	…………… 上村慎子, 渥美加代子, 内田恭之, 宮本憲吾, 渡辺陽子, 前田有美恵, 坂根弓子 ……………	45
10	加工食品中の脂肪酸に関する調査	
	— 冷凍食品や菓子類等のトランス脂肪酸および必須脂肪酸 —	
	…………… 横山玲子, 小林千恵, 相曾いずみ, 坂根弓子 静岡県立大学 井上広子, 桑野稔子 ……………	49
11	食品に含まれる有害化学物質等に関する調査	
	— 加工食品中のアクリルアミド含有実態調査 —	
	…………… 横山玲子, 小林千恵, 坂根弓子 ……………	55
12	コエンザイム Q10 含有サプリメントの品質等について	
	…………… 小林千恵, 横山玲子, 坂根弓子 ……………	61
	他誌に発表した論文 ……………	67
	学会・研究会の報告 ……………	69
	表彰等 ……………	72
	学位取得 ……………	72

CONTENTS

PAPERS

Department of Environment Science

- 1 Study on Effective Utilization of Sludge or Sludge Burned Ashes
as Agricultural Materials to be Discharged from the Food-processing Place
Hiroki NAKAGAWA, Shohei YAMASHITA, Youichi FURUYA
and Kazunari KUME 1
- 2 Biological Research on an Alien Species (*Crangonyx floridanus*)
in Shizuoka Prefecture
Youichi FURUYA, Yoshiko IMAZU, Kazunari KUME
and Ayumi KANEKO..... 13

Department of Microbiology

- 3 Molecular Epidemiological Research of *Mycobacterium tuberculosis*
using VNTR Analysis in Shizuoka Prefecture
Miya YAGI, Yuki MICHIGOSHI, Natsuko IIDA, Naomi TAKAHASHI,
Midori HIROI, Shinya SHIBATA, Tomohiro NISHIO, Takashi KANDA
and Kanji SUGIYAMA 21
- 4 Investigation of Seawater Contamination by *Vibrio parahaemolyticus*,
using at Fish Market or Factories for Processing Fish and Shellfish.
Shinya SHIBATA, Yuki MICHIGOSHI, Natsuko IIDA, Naomi TAKAHASHI,
Midori HIROI, Miya YAGI, Tomohiro NISHIO, Takashi KANDA
and Kanji SUGIYAMA 25
- 5 Study of High-sensitivity Detection Methods of Norovirus
from Foods and Wipe Samples
Hiromi NAGAOKA, Chihiro MINATO, Junko KOYANAGI, Toshihiro YAMADA,
Fumihiko KAWAMORI and Kanji SUGIYAMA..... 29
- 6 Study of ATP Assay for Hygiene Control of Bath Water
Takashi KANDA, Yuki MICHIGOSHI, Naomi TAKAHASHI, Miya YAGI,
Shinya SHIBATA, Tomohiro NISHIO and Kanji SUGIYAMA..... 33

7	Study of Prompt Diagnostic Assaies for Rickettsial Infections Fumihiko KAWAMORI, Junko KOYANAGI, Toshihiro YAMADA, Hiromi NAGAOKA and Kanji SUGIYAMA	37
---	--	----

Department of Drug and Food Science

8	Study on Rapid Analysis of Noxious Chemical Substances such as the Natural Poison Kengo MIYAMOTO, Takayuki UCHIDA, Mitsuko KAMIMURA, Yoko WATANABE, Yumie MAEDA and Yumiko SAKANE.....	41
---	---	----

9	Study on Stability of Dissolution of Drugs during Storage —Changes in Dissolution Profile of Drugs of Press through Pack during Storage under Humid Condition— Mitsuko KAMIMURA, Kayoko ATSUMI, Takayuki UCHIDA, Kengo MIYAMOTO, Yoko WATANABE, Yumie MAEDA and Yumiko SAKANE.....	45
---	---	----

10	Study on Fatty Acids in Processed Food —Trans Fatty Acid and Essential Fatty Acid in Cooked Frozen Foods and Baked Food Products— Reiko YOKOYAMA, Chie KOBAYASHI , Izumi AISO, Hiroko INOUE, Toshiko KUWANO and Yumiko SAKANE.....	49
----	--	----

11	Study on Risk Products in Food —Investigation of Acrylamide Contents in Processed Foods— Reiko YOKOYAMA, Chie KOBAYASHI and Yumiko SAKANE.....	55
----	--	----

12	Relating to Quality of Coenzyme Q10 containing Supplement Chie KOBAYASHI, Reiko YOKOYAMA and Yumiko SAKANE	61
----	---	----

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS	67
--	-----------

PRESENTATIONS AT CONFERENCES AND/OR SOCIETY MEETINGS	69
---	-----------

COMMENDATION	72
---------------------------	-----------

DOCTORATE	72
------------------------	-----------

食品加工所からの汚泥または汚泥焼却灰の 農業資材としての有用性の検討

環境科学部 環境科学班 中川寛基, 山下晶平, 古屋洋一,
久米一成

Study on Effective Utilization of Sludge or Sludge Burned Ashes
as Agricultural Materials to be Discharged from the Food-processing Place

Hiroki NAKAGAWA, Shohei YAMASHITA, Youichi FURUYA
and Kazunari KUME

本研究では、県内の水産加工所からの排水処理余剰汚泥を乾燥した乾燥汚泥の肥料効果および乾燥汚泥を焼成した汚泥焼成灰中のリンの有機酸による利用率の向上に関して検討を行った。

乾燥汚泥施用により、チンゲンサイの生育に障害はなく、有機質肥料としての効果が期待できると考えられた。乾燥汚泥中の窒素と乾燥汚泥および汚泥焼成灰中のリン(P_2O_5)は、市販の水溶性の普通肥料と比較して溶脱しにくく、栽培ポット中に残存していると考えられた。

汚泥焼成灰中のリン酸を溶出させると考えられた有機酸、特にクエン酸は、汚泥焼成灰からリン酸を比較的多く溶出させたが、栽培試験では効果が認められず、施用量を再考する必要があると考えられた。

Key words: 排水処理汚泥, 農業資材, 乾燥汚泥, 汚泥焼成灰, クエン酸
treatment waste sludge, agricultural materials, dried sludge,
sludge incineration ash, citric acid

はじめに

静岡県では、古くから中部地域を中心に、駿河湾の豊かな水産資源を利用した食品製造業や水産加工業が盛んである。そして、県内のこれらの工場から排出される排水処理余剰汚泥の排出量は、年間数千トンにのぼり¹⁾、その汚泥の中には窒素・リンを含むものがある。

リンは農業、工業、食品、医薬品分野等さまざまな分野で必要な物質であり、世界的にみると数十年で枯渇が懸念されている。我が国では、リン資源のほぼ全量を輸入に依存しており、アメリカ合衆国によるリン鉱石の輸出規制(2008年)や中国による肥料およびリン鉱石の関税率の引き上げ(2008年)による影響等、価格高騰のリスクを抱えている²⁾。また、産業廃棄物として処分され

る汚泥は、処理費用がかかり、今後、処理費用の高騰も懸念されることから、資源として有効活用することが望ましい。

水産加工所から排出される汚泥の乾燥物である乾燥汚泥は、窒素とリンを含み、乾燥汚泥を800℃で焼成した汚泥焼成灰は、低品位のリン鉱石と同レベルのリンを含有(10~18%)しており、土壤に添加して培養した試験では、培養液中に重金属類の溶出がほとんどないことが示された^{3,4)}。また、汚泥焼成灰を施用したチンゲンサイの栽培試験では、チンゲンサイの生育に障害はなく、リン酸質肥料としての効果が期待できる一方、含有リン(P_2O_5)の利用率が低いことがわかった⁵⁾。そこで本報では、チンゲンサイへの乾燥汚泥による施用栽培試験を行い、その成長の差および投入した栄養素の収支によって肥料効果および特性を確認した。また、汚泥焼成灰中のリン(P_2O_5)の利用率を上げるため、簡易試験としてpH値を3~6に調整した3種の有機酸(クエン酸, グルコン酸, シュウ

酸) 溶液を汚泥焼成灰に加えて、リン酸の溶出量を確認した。これにより、同じ pH 値のとき最もリン酸の溶出量の多かったクエン酸をチンゲンサイの栽培試験に使用し、成長の差と施用した肥料中のリン(P_2O_5)成分の溶脱量について調査したので報告する。

実験方法

1 試料の調製

1) 乾燥汚泥の調製

本研究で用いた水産加工汚泥は、焼津水産化学工業株式会社榛原工場から排出された最終汚泥(脱水ケーキ)を用いた。採取した汚泥は、腐敗防止のため、特注の煙突と脱臭装置(株式会社デンケン製白金触媒式脱臭装置 KDF-ES71S)を接続した送風乾燥機(タバイエスペック株式会社製恒温器 PH-201)を用い、 $120^{\circ}C$ で12時間以上乾燥して水分を除去し、乾燥汚泥とした。

栽培試験に用いた乾燥汚泥は、粉碎し $500\mu m$ のふるいを通したもの(1作目:2010年11月17日~2011年1月5日)と $212\mu m$ のふるいを通したもの(2作目:2011年5月23日~6月17日)を使用した。

2) 汚泥焼成灰の調製

汚泥焼成灰の調製は、目開き $500\mu m$ のふるいを通した乾燥汚泥 100g を平底蒸発皿($\phi 150mm$)に量り取り、ガス置換型電気炉(株式会社デンケン製卓上マッフル炉 KDF-P90G)に8枚積み重ねて空気を $5dm^3/分$ で導入しながら、温度 $800^{\circ}C$ にて5時間焼成した。

汚泥焼成灰は、炉内で放冷後、 $212\mu m$ のふるいを通し、シリカゲル入りデシケーター内で保管した。

2 リン酸の溶出に有効な有機酸の種類と量の選定

1) 汚泥焼成灰からのリン酸溶出試験

汚泥焼成灰からリン酸を効率的に溶出させる有機酸の種類と pH 値(水溶液として)を選定するため、pH 値を 3, 4, 5, 6 に調整した有機酸(クエン酸, グルコン酸, シュウ酸)溶液 400mL に汚泥焼成灰 2g を加え、225回/分で1時間振とう抽出後、抽出液の pH 値を測定した。また、ろ紙(No. 131)およびシリンジフィルター($0.20\mu m$)にてろ過し、イオンクロマトグラフ装置でリン酸(PO_4^{3-})の濃度を測定し、汚泥焼成灰からのリン酸の溶出率を算出した。

2) クエン酸添加によるチンゲンサイへの影響

1/5000a ポットに、砂土約 5.5kg, 汚泥焼成灰 3.11g および苦土石灰 3g をよく混ぜたものを充填し、700mL かん水した後、それぞれにチンゲンサイの苗(本葉 2~3 枚)を1株ずつ定植したものを5つ用意した。200mL の水にクエン酸 1, 3, 5, 7, 10g を溶かした水溶液をそれ

ぞれポットにかん水し、翌日チンゲンサイの様子を観察した。

なお、使用した砂土は浜岡砂土の砂丘未熟土で、72%が粗砂、残りが細砂で、シルト、粘土分はほとんど含まず、リン酸吸収係数は $50\sim 60mgP_2O_5/100g$ 乾土⁶⁾、充填後の仮比重は 1.4 程度であった。

もう一方で、96 に分画されたセルトレイ(1分画当たり $4cm^2$)に砂土を充填し、水と液肥(住友液肥1号)で育苗したチンゲンサイ(本葉 2~3 枚)に、200mL の水にクエン酸を 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1, 3, 5, 7, 10g 相当を溶かしたクエン酸溶液の各 0.329mL を、5分画ずつ(クエン酸 0.01~1g/200mL 相当)と2分画ずつ(クエン酸 3~10g/200mL 相当)に加え、2日後チンゲンサイの苗の様子を観察した。

なお、クエン酸 0.01~10g/200mL 水の pH 値(理論値)を表 1 に示した。

表1 クエン酸溶液の pH 値(96 分画セルトレイ栽培)

クエン酸量(g)	水溶液(200mL)の pH
0.01	3.67
0.05	3.17
0.1	2.97
0.5	2.56
1	2.40
3	2.15
5	2.03
7	1.95
10	1.87

3 汚泥肥料を施用したチンゲンサイ栽培試験

1) 栽培概要(1作目)

乾燥汚泥の肥料効果および汚泥焼成灰へのクエン酸添加による効果を確認するため、表 2 に示すように、①対照(市販肥料)区、②半量(対照区の半量:K,P について)区、③乾燥汚泥区、④乾燥汚泥 2 倍区、⑤乾燥汚泥+半量区、⑥乾燥汚泥+過リン酸石灰区、⑦乾燥汚泥+クエン酸添加区、⑧汚泥焼成灰区、⑨汚泥焼成灰+クエン酸添加区を設定し、砂土約 5.5kg(⑧, ⑨区は約 5.0kg)を充填し、肥料を混ぜ込んだ 1/5000a ポットにチンゲンサイの苗(本葉 2~3 枚)を1株ずつ定植したものを各区 5 ポットで栽培試験を実施した。

①~⑨区の施肥量(投入量)は、表 3 に示すように $607\sim 520\sim 607mg/ポット$ ($N-P_2O_5-K_2O : 30\sim 26\sim 30kg/10a$, $50,000$ 株/10a)を基準として⁷⁾、設定した成分量になるよう、各栽培区の施肥量を調整した(表 2)。

表2 1作目の施肥量 (g)

肥料成分の割合(%)	市販肥料				汚泥肥料	
	化成肥料	硫安	過リン酸石灰	硫酸加里	乾燥汚泥	汚泥焼成灰
	N-P ₂ O ₅ -K ₂ O 8-8-8	N 21	P ₂ O ₅ 17.5	K ₂ O 50	N-P ₂ O ₅ -K ₂ O 5.48-1.79-0.31	N-P ₂ O ₅ -K ₂ O 0-8.36-0.60
①対照区	6.5	0.41		0.17		
②半量区	3.3	0.21		0.69		
③乾燥汚泥区				1.1	11.1	
④乾燥汚泥2倍区				1.1	22.1	
⑤乾燥汚泥 +半量区	3.3	0.21		0.62	11.1	
⑥乾燥汚泥 +過リン酸石灰区			1.8	1.1	11.1	
⑦乾燥汚泥 +クエン酸添加区				1.1	11.1	
⑧汚泥焼成灰区		2.9		1.1		6.2
⑨汚泥焼成灰 +クエン酸添加区		2.9		1.1		6.2

表3 1作目の投入肥料成分量

処理	投入肥料成分量(mg)		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
①対照区	607	520	607
②半量区	304	260	607
③乾燥汚泥区	607	198	607
④乾燥汚泥2倍区	1213	396	607
⑤乾燥汚泥+半量区	911	458	607
⑥乾燥汚泥+過リン酸石灰区	607	520	607
⑦乾燥汚泥+クエン酸添加区	607	198	607
⑧汚泥焼成灰区	607	520	607
⑨汚泥焼成灰+クエン酸添加区	607	520	607

ただし、肥料分析法に基づく分析で得られた結果から、乾燥汚泥は窒素(N)-リン(P₂O₅)-カリウム(K₂O)を5.48%-1.79%-0.31%含み、汚泥焼成灰は0%-8.36%-0.60%含んでいた³⁾ため、市販肥料で調整した。施用した肥料の成分量は、表2に示す以外に苦土石灰3g/ポット(100kg/10a)を各群に与えた。チンゲンサイの苗の定植時に、表2の半量を元肥として与え、2週間栽培後、茎を囲むようにもう半量を与え、軽く砂土で覆った。定植後、2週間は週2回、1ポット当たり水500mL(⑧、⑨区は450mL)を、その後3週間は週2回、ポット当たり水1000mL(⑧、⑨区は700mL)をかん水した。クエン酸添加区は、かん水2回に1回の頻度で、かん水の際の水にク

エン酸0.025g、0.05g、0.10g、0.25g、0.50gを加えてよく溶かして与えた。この時かん水したクエン酸溶液のpHの理論値は表4に示した。

チンゲンサイの苗を2010年11月17日に定植後、11月19日から試験を開始し、クエン酸添加群には11月29日からクエン酸を添加(作期中、全5回添加)し、2011年1月5日にチンゲンサイを抜き取り生重等について調査した。

ポットからの排水の肥料成分を調査するため、ポットの下にポットを重ね、1回/週、下のポットに溜まった水の量を量り、冷蔵庫で分析まで保存(1~4ヶ月間)した。

2) 栽培概要 (2作目)

乾燥汚泥の肥料効果および汚泥焼成灰へのクエン酸添加による効果を再度確認するため、表5に示すように、①対照(市販肥料)区、②被覆肥料区、③乾燥汚泥区、④乾燥汚泥2倍区、⑤汚泥焼成灰区、⑥汚泥焼成灰+クエン酸添加区、⑦乾燥汚泥+汚泥焼成灰区を設定し、砂土約5.5kgを充填し、肥料を混ぜ込んだ1/5000aポットにチンゲンサイの苗(本葉2~3枚)を1株ずつ定植したものを各5ポットで栽培試験を実施した。

①~⑦区の施肥量(投入量)は、1作目と同様、表6に示すように607-520-607mg/ポット(N-P₂O₅-K₂O:30-26-30kg/10a、50,000株/10a)を基準として⁷⁾、設定した成分量になるよう、各栽培区の施肥量を調整した(表5)。

表4 クエン酸水溶液のpH値(ポット栽培)

ポット栽培 クエン酸(g)	水溶液のpH値			
	450mL水	500mL水	700mL水	1000mL水
0.025	3.62	3.66	3.77	3.89
0.05	3.40	3.43	3.54	3.66
0.1	3.19	3.22	3.32	3.43
0.25	2.94	2.96	3.06	3.16
0.5	2.76	2.78	2.87	2.96

施用した肥料の成分量は、表5に示す以外に苦土石灰 3g/ポット (100kg/10a) および熔成微量要素複合肥料 0.1g を各群に与えた。チンゲンサイの苗の定植時に表5に示した肥料の半量を元肥として与え、2週間栽培後、茎を囲むようにもう半量を与え、軽く砂土で覆った。かん水は、1ポット当たり 0.85L 保水するため、土壌水を入れ替えることを目的に 1L/回、2回/週行い、クエン酸添加区は、かん水の際の水にクエン酸 0.10g を加えてよく溶かして与えた。チンゲンサイの苗を 2011 年 5 月 23 日に定植し、クエン酸添加群には 5 月 30 日からクエン酸を添加(作期中、全 5 回添加)し、2011 年 6 月 17 日にチンゲンサイを抜き取り生重等について調査した。

ポットからの排水の肥料成分を調査するため、ポットの下にポットを重ね、1回/週、下のポットに溜まった水の量を量り、冷蔵庫で分析まで(5ヶ月間)保存した。

3) 生育状況の比較

チンゲンサイの地上部を採取し、直後の重さ(生重)と葉の枚数を計測した。対照群との Tukey の多重検定により、処理によるチンゲンサイの生育量の差を確認した(1作目および2作目)。

4) チンゲンサイの成分分析

採取したチンゲンサイを 70°C で風乾し、重量を測定後、粉碎し、風乾物を得た。風乾物中の窒素成分を NC アナライザー(住友化学製 SUMIGRAPH NC-22F)により分析し、窒素含有率および株当たりの窒素含有量を算出した。リン、カリウム、カルシウム、マグネシウムの分析は、風乾物 0.5g を乾式灰化法^{8,9)}に基づき、電気炉にて常温→500°C(2時間30分)→500°C3時間で灰化後、0.2N 塩酸 20mL を加えて、軽く振り混ぜ、ろ過(ろ紙:No. 131)し、ろ液を 3 倍希釈して ICP 発光分光分析装置(SII 社製 SPS3000)により濃度を測定した。この濃度と風乾物量から各成分の吸収量を算出した。

表5 2作目の施肥量(g)

肥料成分の割合(%)	市販肥料				汚泥肥料	
	化成肥料	被覆肥料 1	被覆肥料 2	硫酸加里	乾燥汚泥	汚泥焼成灰
	N:P ₂ O ₅ :K ₂ O 8:8:8	N:P ₂ O ₅ :K ₂ O 14:12:14	N:P ₂ O ₅ :K ₂ O 20:0:13	K ₂ O 50	N:P ₂ O ₅ :K ₂ O 5.48:1.79:0.31	N:P ₂ O ₅ :K ₂ O 0:8.36:0.60
①対照区	6.5		0.44	0.061		
②被覆肥料区		4.3				
③乾燥汚泥区				1.1	11	
④乾燥汚泥 2 倍区				1.1	22	
⑤汚泥焼成灰区			3.0	0.35		6.2
⑥汚泥焼成灰 +クエン酸区			3.0	0.35		6.2
⑦乾燥汚泥 +汚泥焼成灰区				1.1	11	3.8

表6 2作目の投入肥料成分量

処理	投入肥料成分量(mg)		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
①対照区	607	520	607
②被覆肥料区	607	520	607
③乾燥汚泥区	607	198	607
④乾燥汚泥2倍区	1213	396	607
⑤汚泥焼成灰区	607	520	607
⑥汚泥焼成灰 +クエン酸区	607	520	607
⑦乾燥汚泥 +汚泥焼成灰区	607	520	607

5) ポット排水の分析

ポット排水のNH₃-N, NO₂-N, NO₃-N およびPO₄-Pをイオンクロマト法(DIONEX社製DX3000, DX1500)により濃度を測定し、濃度と排水量を乗じて溶脱量を算出した。

6) チンゲンサイ中の窒素およびリン(P₂O₅)の収支

チンゲンサイ栽培試験における窒素およびリン(P₂O₅)の収支の算出は、投入量=吸収量+溶脱量+残存量とし、残存量は残存量=投入量-吸収量-溶脱量として算出した。

結果および考察

1 リン酸の溶出に有効な有機酸の種類と量の選定

1) 汚泥焼成灰からのリン酸溶出試験

それぞれの有機酸溶液による汚泥焼成灰からのリン酸の溶出率を汚泥焼成灰中に含まれるリン(P₂O₅)の量と振とう抽出液のリン酸濃度から算出し、表7に示した。

汚泥焼成灰からのリン酸の溶出量は、有機酸溶液のpH値が小さくなるほど増加し、硫酸pH3溶液(溶出率12%)と比べて、クエン酸(同48%)、グルコン酸(同24%)、シュウ酸(同15%)の順で溶出量が増加した。

以上の結果から、汚泥焼成灰からリン酸を効率的に溶出させるには、クエン酸が有効であると考えられた。

2) クエン酸添加によるチンゲンサイへの影響

ポット栽培による、クエン酸溶液添加前と添加した翌日のチンゲンサイの様子を図1に示した。クエン酸3, 5, 7, 10g/200mLを加えたチンゲンサイは萎れるなどの可視被害がみられた。

96分画セルトレイによる、クエン酸溶液添加前と添加した2日後のチンゲンサイの様子を図2に示した。クエン酸3, 5, 7, 10g/200mLに相当濃度のクエン酸溶液を加えたチンゲンサイは萎れるなどの可視被害がみられた。

表7 有機酸溶液による焼成灰からのリン酸溶出率

有機酸の種類	水溶液 pH	焼成灰添加後 pH	振とう後リン酸濃度(ppm)	リン酸溶出率(%)
クエン酸	3	5.65	267	48
クエン酸	4	6.96	9.15	1.6
クエン酸	5	7.15	2.64	0.47
クエン酸	6	7.26	2.39	0.43
グルコン酸	3	5.71	134	24
グルコン酸	4	6.98	7.83	1.4
グルコン酸	5	7.16	3.06	0.55
グルコン酸	6	7.13	2.53	0.45
シュウ酸	3	4.02	82.0	15
シュウ酸	4	6.79	4.66	0.83
シュウ酸	5	7.06	2.37	0.42
シュウ酸	6	7.36	2.28	0.41
硫酸	3	5.73	64.5	12
ミリQ	7.08	6.95	2.18	0.39
BL 硫酸	3	焼成灰無添加	2.18 未満	0.39 未満
BL ミリQ	7.08	焼成灰無添加	2.18 未満	0.39 未満

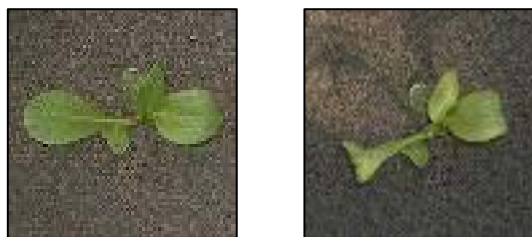


図1 クエン酸添加によるチンゲンサイへの影響 (ポット)



図2 クエン酸添加によるチンゲンサイへの影響 (セルトレイ)

以上の結果から、1/5000a ポットを用いたチンゲンサイの栽培には、クエン酸 3g/200mL より低い濃度のクエン酸溶液を用いることが適当であると考えられた。

2 汚泥肥料を施用したチンゲンサイ栽培試験

1) 生育状況の比較

チンゲンサイの栽培結果を表8に示した。

各栽培区におけるチンゲンサイの生重を比較検討した結果、1作目では、①対照区と比べ、④乾燥汚泥2倍区、⑧汚泥焼成灰区、⑨汚泥焼成灰+クエン酸添加区では重く、③乾燥汚泥区は差が認められなかった (Tukey の多重検定⁵⁾)。2作目では、①対照区と比べ、③乾燥汚泥区では軽く、⑧汚泥焼成灰区、⑨汚泥焼成灰+クエン酸添加区では重かった (Tukey の多重検定)。これらの傾向は、風乾物重の比較でも同様であった。なお、1作目と2作目の乾燥汚泥区の成長の差は、乾燥汚泥を均一にする目的から、212 μ m のふるいを通したが、このことが乾燥汚泥の粒子を細かくし、土壌との相互作用により肥料成分 (特にリン (P₂O₅)) の溶出を抑制した可能性が考えられた。

図3に栽培試験中(1作目)のチンゲンサイの生育状況を示した。④乾燥汚泥2倍区を含め今回の栽培試験では、乾燥汚泥等による発育障害は、1作目、2作目ともに認められなかった。

2) チンゲンサイの成分分析

チンゲンサイ中(風乾物)の窒素、リンおよび金属類の含有率を表9、1株当たりの含有量を表10に示した。

1作目の窒素、リンおよびカリウムの含有率および含有量は、①対照区と③乾燥汚泥区および⑧汚泥焼成灰区と⑨汚泥焼成灰+クエン酸区の間に処理による差はなかった。2作目の窒素およびリンの含有率および含有量は、①対照区と③乾燥汚泥区および⑤汚泥焼成灰区と⑥汚泥焼成灰+クエン酸区の間に処理による差はなく、カリウムの含有率は①対照区と比べて③乾燥汚泥区で低く、⑤汚泥焼成灰区と⑥汚泥焼成灰+クエン酸区の間に処理による差はなかった。汚泥焼成灰群へのクエン酸の添加の結果、クエン酸のリンに対するキレート作用により、リンの利用率が増加することを期待したが、差は認められなかった。

3) チンゲンサイ中の窒素およびリン (P₂O₅) の収支

チンゲンサイのポット栽培における窒素収支を表11に示した。乾燥汚泥区における溶脱窒素量は、市販肥料区と比べて少なく、ポット中に残存したと考えられた。

チンゲンサイのポット栽培におけるリン (P₂O₅) 収支を表12に示した。被覆肥料中のリン (P₂O₅) は全量水溶性であるが、溶脱したリン (P₂O₅) はわずかであった。乾燥汚泥から供給されるリン (P₂O₅) はほとんど溶脱せず、ほぼ全量がポット中に残存していると考えられた。

以上のことから、乾燥汚泥施用により障害はなく、窒素・リン (P₂O₅) を含む有機質肥料としての効果が期待できると考えられた。また、汚泥焼成灰にクエン酸を添加した場合、リン (P₂O₅) は溶出されるものの、栽培試験においてはリン (P₂O₅) の利用率の促進効果が認められなかった。これは土壌の緩衝作用やクエン酸の分解促進等のためと考えられ、適切なクエン酸量を再度検討する必要がある。

今後、ポット中に残存した窒素、リン (P₂O₅) の植物の利用の可否、乾燥汚泥や汚泥焼成灰の肥料成分保持能の有無、クエン酸による汚泥焼成灰中のリン (P₂O₅) 利用率の向上に関する検討等が必要であると考えられた。また、乾燥汚泥と汚泥焼成灰の肥料化 (製品化) に向けて、汚泥中の栄養素量の保証、植害試験等、さらに詳細な調査を行う必要があると考えられた。

表8 チンゲンサイの栽培結果

処理	生重(g)	葉数(枚)	風乾物重(g)
①対照区	15.6	11.4	1.9
②半量区	12.1	10.8	1.5
③乾燥汚泥区	18.0	11.4	2.2
1 ④乾燥汚泥2倍区	27.5	12.4	3.0
作 ⑤乾燥汚泥+半量区	21.7	11.4	2.4
目 ⑥乾燥汚泥+過リン酸石灰区	14.5	11.6	1.8
⑦乾燥汚泥+クエン酸区	20.3	11.6	2.4
⑧焼成灰区	28.3	12.2	3.0
⑨焼成灰+クエン酸区	27.6	12.2	2.8
①対照区	13.1	7.6	0.86
②被覆肥料区	16.5	8.6	0.84
2 ③乾燥汚泥区	7.7	7.4	0.57
作 ④乾燥汚泥2倍区	9.8	7.8	0.82
目 ⑤焼成灰区	18.4	9.2	0.89
⑥焼成灰+クエン酸区	18.2	8.8	0.99
⑦乾燥汚泥+焼成灰区	9.3	7.2	0.80

Tukeyの多重検定で、1作目は、(①, ⑧), (②, ④), (②, ⑧), (②, ⑨), (④, ⑥), (⑥, ⑧), (⑥, ⑨)に差があり、2作目は、(②, ③), (②, ④), (②, ⑦), (③, ⑤), (③, ⑥), (④, ⑤), (④, ⑥), (⑤, ⑦), (⑥, ⑦)に差があった(生重).



上から順に①対照区, ②半量区, ③乾燥汚泥区, ④乾燥汚泥2倍区, ⑤乾燥汚泥+半量区



上から順に⑥乾燥汚泥+過リン酸石灰区, ⑦乾燥汚泥+クエン酸区, ⑧汚泥焼成灰区, ⑨汚泥焼成灰+クエン酸区

図3 チンゲンサイ栽培試験の結果

表9 チンゲンサイ中の窒素, リン, カリウムおよびその他金属類の含有率(風乾物: %)

処理	N	P	K	Ca	Mg
①対照区	1.7	1.6	2.8	7.1	0.75
②半量区	1.7	1.4	3.1	7.1	0.82
③乾燥汚泥区	2.1	1.6	3.3	5.6	1.1
1 ④乾燥汚泥2倍区	2.4	1.7	3.0	4.6	0.92
作 ⑤乾燥汚泥+半量区	2.3	1.8	3.1	5.9	0.87
目 ⑥乾燥汚泥+過リン酸石灰区	2.2	2.0	3.4	6.3	0.96
⑦乾燥汚泥+クエン酸区	2.0	1.7	3.7	4.6	0.92
⑧汚泥焼成灰区	2.2	1.5	3.5	4.6	0.89
⑨汚泥焼成灰+クエン酸区	2.3	1.7	3.9	4.9	0.97
①対照区	4.9	1.2	5.9	2.8	0.40
②被覆肥料区	5.9	1.3	5.6	3.3	0.64
2 ③乾燥汚泥区	5.1	1.3	3.8	2.9	0.60
作 ④乾燥汚泥2倍区	5.9	1.3	4.2	2.6	0.61
目 ⑤汚泥焼成灰区	6.2	0.81	6.1	2.7	0.55
⑥汚泥焼成灰+クエン酸区	5.7	0.75	6.0	2.5	0.51
⑦乾燥汚泥+汚泥焼成灰区	5.1	1.2	4.8	2.6	0.55

Tukey の多重検定で, 1 作目の窒素は, (①と④, ⑤, ⑨), (②と④, ⑤, ⑨)で差があり,

1 作目のリンは, (①と⑤, ⑥), (②と③, ④, ⑤, ⑥, ⑦, ⑨), (⑤と⑧),

(⑥と③, ④, ⑦, ⑧, ⑨)で差があり,

1 作目のカリウムは, (①と⑦, ⑧, ⑨), (⑦と②, ④, ⑨), (⑨と②, ③, ④, ⑤)で差があり,

2 作目の窒素は, (②と③, ④, ⑦), (⑤と③, ④, ⑦), (⑥と③, ④, ⑦)で差があり,

2 作目のリンは, (⑤と①, ②, ③, ④, ⑦), (⑥と①, ②, ③, ④, ⑦)で差があり,

2 作目のカリウムは, (③と①, ②, ⑤, ⑥), (④と①, ⑤, ⑥)で差があった.

表10 チンゲンサイ中の窒素，リン，カリウムおよびその他金属類の含有量(mg/株)

処理	N	P	K	Ca	Mg
①対照区	32	29	160	130	14
②半量区	27	21	135	102	12
③乾燥汚泥区	45	35	213	121	23
1 ④乾燥汚泥2倍区	72	50	264	138	28
作 ⑤乾燥汚泥+半量区	55	42	222	140	21
目 ⑥乾燥汚泥+過リン酸石灰区	38	35	183	111	17
⑦乾燥汚泥+クエン酸区	49	41	270	114	22
⑧汚泥焼成灰区	66	46	318	138	27
⑨汚泥焼成灰+クエン酸区	64	47	330	138	27
①対照区	43	10	52	24	3.5
②被覆肥料区	50	11	48	27	5.3
2 ③乾燥汚泥区	30	7.6	35	17	3.4
作 ④乾燥汚泥2倍区	48	10	38	21	4.9
目 ⑤汚泥焼成灰区	55	7.3	55	24	4.8
⑥汚泥焼成灰+クエン酸区	56	7.5	59	25	5.1
⑦乾燥汚泥+汚泥焼成灰区	41	10	45	21	4.4

Tukey の多重検定で、1 作目の窒素は、(①と④, ⑧, ⑨), (②と④, ⑧, ⑨), (⑥と④, ⑧, ⑨)で差があり、
 1 作目のリンは、(①と④, ⑨), (②と④, ⑤, ⑧, ⑨)で差があり、
 1 作目のカリウムは、(⑧と①, ②, ⑥), (⑨と①, ②, ③, ⑥)で差があり、
 2 作目の窒素は、(③と②, ⑤, ⑥)で差があり、
 2 作目のリンは差がなく、
 2 作目のカリウムは、(③, ⑥)で差があった。

表11 チンゲンサイのポット栽培における窒素 (N) 収支 (mg/ポット)

処理	投入量	吸収量	溶脱量	残存量
①対照区	607	32	251	324
②半量区	304	27	183	94
③乾燥汚泥区	607	45	73	489
1 ④乾燥汚泥2倍区	1213	72	147	994
作 ⑤乾燥汚泥+半量区	911	55	240	616
目 ⑥乾燥汚泥+過リン酸石灰区	607	38	67	502
⑦乾燥汚泥+クエン酸区	607	49	63	495
⑧焼成灰区	607	66	81	460
⑨焼成灰+クエン酸区	607	64	124	419
①対照区	607	43	186	378
②被覆肥料区	607	50	177	380
2 ③乾燥汚泥区	607	30	83	494
作 ④乾燥汚泥2倍区	1213	48	165	1000
目 ⑤焼成灰区	607	55	178	375
⑥焼成灰+クエン酸区	607	56	152	398
⑦乾燥汚泥+焼成灰区	607	41	91	475

四捨五入のため、収支が一致しない部分がある。

表12 チンゲンサイのポット栽培におけるリン (P₂O₅) 収支 (mg/ポット)

処理	投入量	吸収量	溶脱量	残存量
①対照区	520	66	208	246
②半量区	260	47	75	138
③乾燥汚泥区	198	80	1.0	117
1 ④乾燥汚泥2倍区	396	114	6.5	278
作 ⑤乾燥汚泥+半量区	458	97	48	313
目 ⑥乾燥汚泥+過リン酸石灰区	520	79	35	406
⑦乾燥汚泥+クエン酸区	198	94	1.0	103
⑧焼成灰区	520	106	1.7	412
⑨焼成灰+クエン酸区	520	108	1.3	411
①対照区	520	23	168	329
②被覆肥料区	520	25	27	468
2 ③乾燥汚泥区	198	17	7.0	174
作 ④乾燥汚泥2倍区	396	24	16	356
目 ⑤焼成灰区	520	17	2.5	501
⑥焼成灰+クエン酸区	520	17	2.6	500
⑦乾燥汚泥+焼成灰区	520	22	7.8	490

まとめ

リン・窒素を含む水産加工汚泥の農業での利活用を目的に、乾燥汚泥の有機質肥料としての効果と汚泥焼成灰へのクエン酸添加による効果をチンゲンサイ栽培により検討した。

- 1 汚泥焼成灰に有機酸溶液を作用させることにより、汚泥焼成灰中のリン酸が溶出された。ただし、この効果を得るためには、一定濃度以上(pH=3~4)の有機酸溶液を作用させる必要があり、その作用が最も強いのはクエン酸であった。
- 2 一定濃度(3g/200mL)以上のクエン酸溶液をチンゲンサイの栽培ポットに投入すると、チンゲンサイが萎れた。このため、3g/200mLより低い濃度で栽培試験を行う必要があることがわかった。
- 3 乾燥汚泥施用による発育障害は認められなかった。チンゲンサイの生重および風乾物重で①対照区と比べ、③乾燥汚泥区は差が認められず(1作目)、有機質肥料としての効果が認められた。ただし、乾燥汚泥を肥料として用いる場合には、粒子径は細かすぎないある程度の大きさ(500 μ m以上)が適当であると考えられた。
- 4 クエン酸(0.025~0.5g/500~1000mL)を添加したことによるリン(P₂O₅)利用率の向上は認められなかった。
- 5 乾燥汚泥区において、窒素・リン(P₂O₅)の溶脱量は少なく、ポット中に残存していると考えられた。
今後、汚泥を原料にした肥料の製品化を目指し、汚泥中の肥料成分のロットごとの変動、植害試験(発芽、成長試験)、汚泥中の有害金属成分の分析が必要であると考えられた。

謝辞

本研究を実施するにあたり、水産加工汚泥を提供していただいた焼津水産化学工業株式会社、汚泥の肥料化に関する助言をいただいたジェイカムアグリ株式会社、分析機器の使用許可をいただいた静岡県農業技術研究所果樹研究センターに深く感謝致します。

文献

- 1) 静岡県環境森林部：平成16年静岡県廃棄物実態調査報告書(平成15年度実績)，平成17年3月(2005)
- 2) 越野正義：リンの現状と展望，環境浄化技術，**4**(7)，1-4(2005)
- 3) 村松重緒他：含リン汚泥の新規用途の開発-汚泥焼成灰の諸物性-，静岡県環境衛生科学研究所報告，**48**，85-90(2005)

- 4) 杉浦秀治他：含リン汚泥の新規用途の開発-汚泥焼成灰の農業資材としての可能性-，静岡県環境衛生科学研究所報告，**49**，71-76(2006)
- 5) 村中康秀他：含リン汚泥焼成灰の農業資材としての有用性，静岡県環境衛生科学研究所報告，**50**，63-68(2007)
- 6) (独)農業環境技術研究所：つくば，土壤モノリスの収集目録及びデータ集，17-38(2007)
- 7) 静岡県農業水産部研究調整室：持続的農業を推進する静岡県土壌肥料ハンドブック，260-261，静岡(2005)
- 8) 作物分析法委員会：栄養診断のための栽培植物分析測定法，59-60，東京(1975)
- 9) 西口靖彦他：飼料中マグネシウム、カリウム、カルシウム含量の迅速測定法，近中四農研報，**6**，133-139(2007)

静岡県における外来種（フロリダマミズヨコエビ）の生態調査

環境科学部 環境科学班 古屋洋一, 今津佳子, 久米一成,
金子亜由美*

Biological Research on an Alien Species (*Crangonyx floridanus*)
in Shizuoka Prefecture
Youichi FURUYA, Yoshiko IMAZU, Kazunari KUME
and Ayumi KANEKO

静岡県内の河川 39 地点におけるフロリダマミズヨコエビ *Crangonyx floridanus* の分布状況と、その生態的特長、ワサビに対する食害の有無について調査を行った。

その結果、本種の生息地域は 2003 年から 2006 年における国土交通省による「河川水辺の国勢調査」や文献で報告された地域とよく一致し、本県河川で繁殖・定着していることが確認された。新たな生息地域として確認されたのは 1 地点のみであり、現時点において本県における急激な分布拡大は見られなかった。経月により実施した定点調査により、1 年を通して繁殖・生殖可能といわれている本種の生態が確認された。広い温度範囲での適応性や耐塩性を持つことが実験的に確認され、県内河川の大半は生息可能地域であることが推定された。また、ワサビをエサとして使用した捕食試験結果から本種のワサビに対する食害の可能性が示唆された。

Key words: 外来種, フロリダマミズヨコエビ, ワサビ, 食害
alien species, *Crangonyx floridanus*, *Wasabia japonica*, feeding damage

はじめに

近年、外来生物による生態系、人の生命・身体、農林水産業への被害が問題となるなか、平成 17 年に「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」（外来生物法）が施行された。法に指定された特定外来生物については、輸入、飼育、保管、運搬、野外への放逐が禁止されているが、一度拡大した外来生物を完全に排除することは困難である。

米国フロリダ州を原産とする淡水性のヨコエビである外来種フロリダマミズヨコエビ *Crangonyx floridanus* は、特定外来生物として指定はされていないが、1989 年に千葉県我孫子市の古利根沼ではじめて発見¹⁾されて以降、2000 年代に急速に分布を拡大し、近年では北海道から九州地方に至るまでの広い範囲で生息が確認されている²⁾。静岡県内においても、2003 年から国土交通省の実

施する「河川水辺の国勢調査」³⁾ や文献^{4,5)} で、その生息が報告されている。

国内への侵入経路に関しては、ホテイアオイなどの観賞用の水草に付着して侵入したことなどが考えられている²⁾ が、明らかではない。国内での本種の分布拡大は、(1)川の流れや水鳥の活動など自然的な要因、(2)淡水魚類の放流、釣り餌、水草の流通・植栽など人の活動での要因によるものと考えられている⁵⁾。

本種による生態系や在来種への影響ははっきりしていないが、在来種ヨコエビについては以前からワサビへの食害が知られており⁶⁾、生息地域の拡大は生態系のみならず、本県の特産品であるワサビ栽培などの農業方面への影響も懸念される。

そこで本研究では、(1)フロリダマミズヨコエビの県内河川における分布状況を把握すること、(2)その生態特性に関して調査を行い拡大可能地域を推定すること、(3)ワサビに対する食害の有無を確認しワサビ被害の未然防止を図ることを目的とし調査を行ったので報告する。

方法

1 フロリダマミズヨコエビの県内生息状況調査

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

* : 静岡県工業技術研究所

1) 調査河川

①過去の調査報告書・文献等^{1,3-5)}によりフロリダマミズヨコエビの生息が確認されている河川(図1)を中心に大井川以東の主な河川(瀬戸川, 安倍川, 富士川, 沼川及び狩野川の本支流: 18地点)を対象とした。

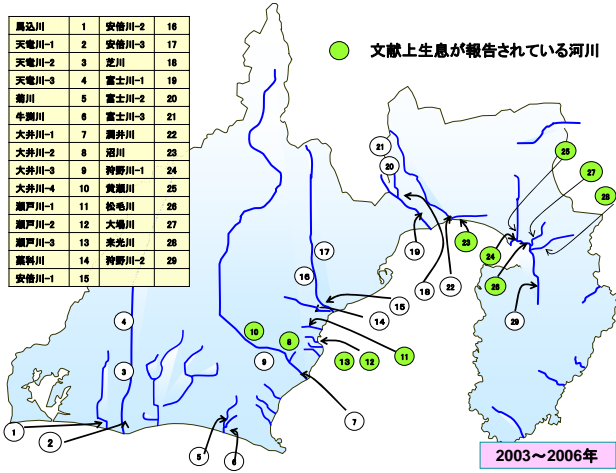


図1 静岡県内におけるフロリダマミズヨコエビの生息報告状況

②前述の①で調査が行われていなかった, 大井川以西の河川と伊豆市ワサビ栽培地域周辺河川(21地点)を対象とした。

2) 調査期間

- ①2010年2月1日から3月2日
- ②2011年6月23日から12月21日

3) 調査内容

金田ほか⁵⁾, 富川⁷⁾のヨコエビの同定手法を参考に種の同定を行い, 各河川におけるフロリダマミズヨコエビの生息状況を調査した。

2 フロリダマミズヨコエビの生態調査

1) 定点河川における経月調査

①調査地点

フロリダマミズヨコエビの生息が確認されている瀬戸川支流の青池および姥ヶ池を調査定点に設定した。

②調査期間および調査頻度

2010年2月から2011年1月までの期間, 月1回調査を行った。

③調査内容

フロリダマミズヨコエビの生息状況, 水温, pH, 電気伝導度(EC)等について調査・測定を行った。

2) 水温変化に対する適応性試験

フロリダマミズヨコエビの水温変化による生息適応性を探るため, 1~30℃の範囲で6段階の試験温度における飼育を行った。

①水温の設定

- A : 1℃, B : 5℃, C : 7.5℃, D : 10℃, E : 15℃,
- F : 30℃

②飼育方法

飼育水を入れた容器に, フロリダマミズヨコエビ5匹と水草(コカナダモ *Elodea nuttallii*)を入れ, 14日間飼育した。

1℃の飼育には冷蔵庫を, 5~30℃の飼育には恒温器を用いた。

3) 塩分濃度に対する適応性試験

フロリダマミズヨコエビの塩分濃度変化による生息適応性を探るため, 河川水に海水と河川水の混合割合を5~100%の範囲で7段階に調整した試験水における飼育を行った。

①塩分濃度の設定

- A : 5%, B : 10%, C : 20%, D : 30%, E : 50%,
- F : 70%, G : 100%

②飼育方法

飼育水を入れた容器に, フロリダマミズヨコエビ5匹と水草(コカナダモ)を入れ, 14日間飼育した。

3 ワサビに対する食害の調査

1) ワサビ栽培地域におけるヨコエビ被害に関する聞き取り調査

ワサビに対するヨコエビの食害が報告されている3地域の研究所(島根県農業技術センター, 信州大学理学部生物科学科, 静岡県農業技術研究所わさび課)に対して, ヨコエビの被害状況について聞き取り調査を行った。

2) ワサビに対する食害の確認試験

本来であれば, ワサビ田を実験室的に再現し, 地中に根を張っているワサビに対してフロリダマミズヨコエビを放流して飼育試験を行う方法が最善であると考えられるが, 常時温度管理された清浄な水を流し続けることが必要なワサビ田の実験系を再現することは技術的・経済的に困難であると考え, 今回は簡易的な方法で実施した。

①試験1(ワサビの根茎, 葉に対する捕食試験)

静岡県農業技術研究所より提供されたワサビを根茎(1本), 葉の部分(3枚)に分離し, 河川水を満たした水槽に入れ, フロリダマミズヨコエビ5匹による捕食状況を観察した。

②試験2(ワサビの葉に対する捕食試験)

河川水を満たした水槽を2器用意し, 一方には, フロリダマミズヨコエビ(5匹), ワサビの葉(直径3~8cm, 4枚)を入れ, もう一方にはワサビの葉のみを入れ, それぞれ室温で28日間飼育を行い, 捕食状況を観察した。

③試験3(ワサビの葉に対する嗜好性の確認試験)

河川水を満たした水槽に, フロリダマミズヨコエビ(10

匹), ワサビの葉 (直径3~8cm, 4枚), 水草 (コカナダモ, 5本) を入れ, 室温で1ヶ月間飼育し捕食状況を観察した。

結果と考察

1 フロリダマミズヨコエビの県内生息状況調査

2010年2月1日から3月2日に実施した調査結果を表1に, 2011年6月23日から12月21日に実施した調査結果を表2に, また表1, 2から県内の分布状況を図2に示した。

狩野川, 沼川, 瀬戸川, 大井川の各水系において, フ

ロリダマミズヨコエビが確認された。2003年から2006年に生息が報告されている^{1,3,4,5)} 地点では, 約5~8年後に相当する今回の調査においてもその生息が確認され, 本種が既に繁殖・定着していると考えられる。

なお, 本種の生息が報告されている狩野川水系の上流部にあたる伊豆市のワサビ田周辺河川調査では, ヨコエビは確認されなかった。ヨコエビが自力で河川の上流に移動していく可能性は少ないと思われるが, 河川水や水草, 魚類, 器具等に混入して移動したり, 水鳥が関与した場合, その拡大が上流域のワサビ田に及ぶ可能性が考えられる。

表1 フロリダマミズヨコエビ・在来種ヨコエビの生息状況 (2010年調査)

調査日	河川名	地点	市町名	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	EC (μS/cm)	フロリダ	在来種
2010/2/1	1 瀬戸川-1	青池、緑町	藤枝市	9.0	15.8	7.7	195.0	○	×
	2 瀬戸川-2	姥ヶ池、立花	藤枝市	8.8	15.8	7.3	193.5	○	×
	3 大井川	大津谷川合流点付近	藤枝市	9.0	7.2	8.1	140.7	×	×
4 狩野川-1	狩野川(黒瀬橋周辺)	沼津市	-	-	-	-	×	×	
2010/2/17	5 狩野川-2	榑田川(榑田橋右岸) 榑田川(榑田橋左岸)	清水町	4.2	14.5	7.8	175.0	×	○
	三島市		3.0	14.7	7.8	183.3	×	○	
	6 狩野川-3	玉川(清住緑地)	三島市	-	-	-	-	×	×
	7 狩野川-4	大場川(水の園緑地)	三島市	-	-	-	-	×	×
	8 狩野川-5	松毛川	沼津市・三島市	-	-	-	-	×	×
9 狩野川-6	狩野川(日守大橋周辺)	函南町	-	-	-	-	×	×	
2010/2/22	10 安倍川-1	中河内川(中西橋下)	静岡市	-	-	-	-	×	×
	11 安倍川-2	足久保川(松崎橋)	静岡市	-	-	-	-	×	×
	12 安倍川-3	新聞谷川(新聞)	静岡市	-	-	-	-	×	×
13 沼川-1	五社神社、原田	富士市	8.5	12.7	7.8	108.4	○	×	
14 沼川-2	鏡ヶ淵公園、原田	富士市	8.4	8.9	7.9	113.9	○	○	
2010/3/2	15 沼川-3	鑑石園、原田	富士市	-	-	-	-	×	×
	16 沼川-4	滝不動	富士市	-	-	-	-	×	×
	17 富士川-1	養鱒場	富士宮市	-	-	-	-	×	○
	18 富士川-2	白糸の滝	富士宮市	-	-	-	-	×	○

○ : 生息確認 × : 生息確認できず

表2 フロリダマミズヨコエビ・在来種ヨコエビの生息状況 (2011年調査)

調査日	河川名	地点	市町名	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	EC (μS/cm)	フロリダ	在来種
2011/6/23	19 湯日川	湯日公園	鳥田市	29.4	24.8	7.7	461.0	○	×
	20 坂口谷川	坂口	牧之原市	-	-	-	-	×	×
2011/7/13	21 朝比奈川	山ヶ谷	御前崎市	-	-	-	-	×	×
	22 高松川	坂里	掛川市	-	-	-	-	×	×
	23 東大谷川	東大谷	掛川市	-	-	-	-	×	×
2011/9/30	24 逆川	高御所	掛川市	-	-	-	-	×	×
	25 初馬川	初馬	掛川市	-	-	-	-	×	×
	26 家代川	遊家	掛川市	-	-	-	-	×	×
2011/10/6	27 敷地川	向笠竹之内	磐田市	-	-	-	-	×	×
	28 太田川	三ヶ野	磐田市	-	-	-	-	×	×
	29 天童川	匂坂中	磐田市	-	-	-	-	×	×
2011/11/18	30 本谷川	杉本	伊豆市	-	-	-	-	×	×
	31 大見川	筏場	伊豆市	-	-	-	-	×	×
2011/12/5	32 吉奈川	棚場	伊豆市	-	-	-	-	×	×
	33 地藏堂川	地藏堂	伊豆市	-	-	-	-	×	×
2011/12/12	34 花川	花川運動公園	浜松市	-	-	-	-	×	×
	35 築地川	半田山	浜松市	-	-	-	-	×	×
	36 馬込川	県立森林公園	浜松市	-	-	-	-	×	×
2011/12/21	37 都筑大谷川	三ヶ日町大谷	浜松市	-	-	-	-	×	×
	38 宇利山川	三ヶ日町平山	浜松市	-	-	-	-	×	×
	39 今川	湖西市大知波	湖西市	-	-	-	-	×	×

○ : 生息確認 × : 生息確認できず

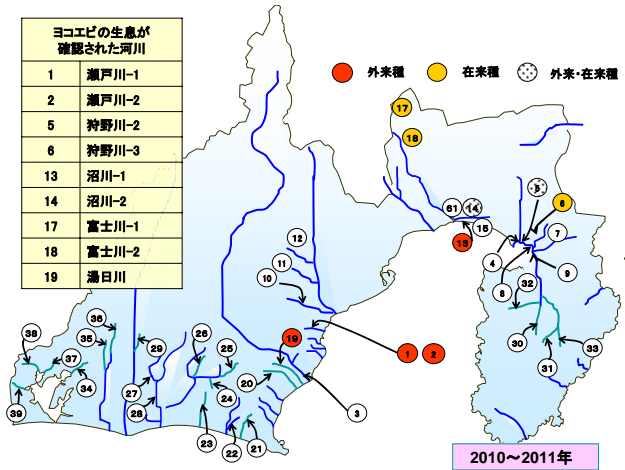


図2 ヨコエビ生息調査河川

今回、新たに大井川水系の湯日川に生息地点を確認したが、2006年までの調査報告と比較して、県内における急激な分布拡大は認められなかった。しかしながら、これ以上の分布拡大を防止するため、今回明らかになった生息地域をホームページなどで一般に周知し、生息河川から他の河川への河川水や魚類・水草などの移動を控えるように情報発信を行う必要があると考えられる。

2 フロリダマミズヨコエビの生態調査

1) 定点河川における経月調査

調査結果を表3に示した。フロリダマミズヨコエビは、夏場を除きほぼ年間を通じて生息が確認され、6月、11月、1月には抱卵個体が確認された。在来種は1月～5月の水温の低い時期が産卵期といわれているが、以前からフロリダマミズヨコエビは年間を通じて産卵・生殖可能であり⁸⁾、在来種に比較して強い繁殖力を持つといわれてきた。今回の調査で6月の水温が高い時期においても抱卵個体が確認されたことで、その生態的特徴が裏付けられた。

2) 水温変化に対する適応性試験

試験結果を表4に示した。各種設定温度における飼育試験で、いずれも14日間以上の生存が確認され、幅広い温度環境に適応していける生態特性が確認された。

3) 塩分濃度に対する適応性試験

試験結果を表5に示した。海水を最大30%の割合に含む飼育水においても14日間以上の生存が確認された。本種は淡水性でありながら、ある程度の汽水域でも生存可能であり、河川の中・下流にも定着できることが推定された。

表3 フロリダマミズヨコエビの経月調査結果

調査日	地点	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	EC (μS/cm)	フロリダ	在来種
2010/02/01	青池	9.0	15.8	7.7	195	○	×
	姥ヶ池	8.8	15.8	7.3	194	○	×
2010/04/26	青池	-	16.8	-	-	○	×
	姥ヶ池	-	16.8	-	-	○	×
2010/05/19	青池	-	19.0	7.5	200	○	×
	姥ヶ池	-	19.4	7.8	190	○	×
※2010/06/17	青池	28.0	20.0	7.9	200	○	×
	姥ヶ池	28.3	20.3	8.1	181	○	×
2010/07/06	青池	26.5	19.9	7.6	197	○	×
	姥ヶ池	27.0	21.8	8.4	174	○	×
2010/08/17	青池	32.7	20.9	7.4	165	×	×
	姥ヶ池	35.0	22.6	7.4	167	○	×
2010/09/02	青池	30.9	21.3	7.6	184	×	×
	姥ヶ池	31.8	24.6	8.6	186	×	×
2010/10/08	青池	23.3	19.1	7.1	183	×	×
	姥ヶ池	25.5	22.9	7.8	186	×	×
※2010/11/11	青池	14.8	15.5	6.9	177	○	×
	姥ヶ池	14.1	16.4	6.8	194	○	×
2010/12/17	青池	10.4	13.5	7.6	186	○	×
	姥ヶ池	7.4	13.2	8.1	185	○	×
※2011/01/07	青池	6.4	13.8	7.4	183	○	×
	姥ヶ池	5.6	12.0	7.5	186	○	×

○：生息確認 ×：生息確認できず ※：抱卵個体を確認

表4 水温変化によるフロリダマミズヨコエビの適応性試験

	A	B	C	D	E	F
水温(°C)	1	5	7.5	10	15	30
14日後	○	○	○	○	○	○

○:生存 ×:死滅 n=5匹

表5 塩分濃度変化によるフロリダマミズヨコエビの適応性試験

	A	B	C	D	E	F	G
河川水(mL)	95	90	80	70	50	30	0
海水(mL)	5	10	20	30	50	70	100
割合(海水/検水:%)	5	10	20	30	50	70	100
検水塩分濃度(ppm)	944	1,888	3,776	5,664	9,440	13,216	18,880
20分後	○	○	○	○	○	○	×
3時間後	○	○	○	○	○	×	
30時間後	○	○	○	○	×		
14日後	○	○	○	○			

海水の塩分濃度:18,880ppm ○:生存 ×:死滅 n=5匹

在来種のヨコエビは、水温の低い季節や環境において繁殖が可能であるとされ⁹⁾、主として源流域や湧水環境に生息している。今回の生態調査の結果から、本種が幅広い温度環境や汽水域でも生息可能であることが明らかとなり、県内河川の大半が生息可能地域であることが推定された。

3 ワサビに対する捕食の調査

1) ワサビ栽培地域におけるヨコエビ被害に関する聞き取り調査

①島根県

島根県では静岡県のワサビ田と異なり、水の流れが少なく落ち葉が多いため、場所によってはヨコエビによる被害が発生している。ワサビ田で生息が確認されているのは、在来種のニッポンヨコエビ *Gammarus nipponensis* のみであるとの回答であった。

②長野県安曇野市

長野県安曇野市では、ワサビ田にヨコエビの被害が発生しているとして、2009年5月に地元誌の信濃毎日新聞に記事が掲載された。この件に詳しい信州大学理学部生物科学科の東城准教授に確認したところ、食害の大半は在来種のオオエゾヨコエビ *Jesogammarus jesoensis* が関与しており、フロリダマミズヨコエビの食害への関与については確認できておらず、仮に食害をしているとしてもオオエゾヨコエビの食害と比べると僅かなものであると思われる、という回答であった。

③静岡県伊豆市

静岡県伊豆地域におけるヨコエビによる被害の事例は多くないが発生しており、中伊豆地区では水生生物による被害を防止するためにパイプ栽培を行っている。静岡県農業技術研究所の所有する棚場試験地において年間を通して水生生物調査を行ったところ、10月と11月にヨコエビが確認されたが¹⁰⁾、種の同定まで行っていないので、在来種・外来種の別は不明であるとのことであった。

以上の聞き取り調査から、ヨコエビの被害地域においてもフロリダマミズヨコエビがワサビに対して食害を及ぼすという明確な確認をすることはできなかった。

2) ワサビに対する捕食の確認試験

①試験1 (ワサビの根茎、葉に対する捕食試験)

試験開始後に根茎からの滲出物で飼育水に濁りが発生し、7日後にはワサビの根茎が腐敗した。

ワサビの根茎を用いて捕食試験を行った場合には、本来の環境条件を再現することは困難であると判断された。

②試験2 (ワサビの葉に対する捕食試験)

根茎を試験に用いることが困難であるため、根茎に対する食害を推測する目的で、ワサビの葉のみを用いて飼育試験を行った。フロリダマミズヨコエビを入れた水槽におけるワサビの葉は試験開始約14日後から、部分的に黄色くなり始め、28日後の試験終了時には葉の半分以上が食べられた状態となった。試験終了時、5匹のフロリダマミズヨコエビはすべて生存していた。また、飼育期間中の観察において、フロリダマミズヨコエビがワサビの葉を食べている様子が観察された。一方、フロリダマミズヨコエビを入れていない水槽の葉は、28日後においても外見上ほぼ変化がみられなかった(図3)。

③試験3 (ワサビの葉に対する嗜好性の確認試験)

フロリダマミズヨコエビがワサビの葉を捕食することが確認されたので、次に本種のワサビの葉に対する嗜好性を確認するための試験を行った。

試験開始1ヶ月後にワサビの葉はほとんど食い尽くされているのに対して、コカナダモは大半が残っていることが確認された(図4)。試験終了時、10匹のフロリダマミズヨコエビはすべて生存していた。試験に使用したコカナダモはフロリダマミズヨコエビが実際に生息していた地点(姥ヶ池)から捕集してきた物で、通常エサとして捕食することが確認されている物である。今回の実験結果から、フロリダマミズヨコエビにとってワサビの葉は、日常の生息地に存在する水草以上に嗜好性を持つエサとして認識されることが明らかとなった。

試験2,3の結果から、フロリダマミズヨコエビはワサビの葉を積極的に捕食することが確認された。この結果が根茎への食害に結びつくかどうかは明らかではないが、ワサビの葉にも根茎と同様に、ワサビの辛味成分であり

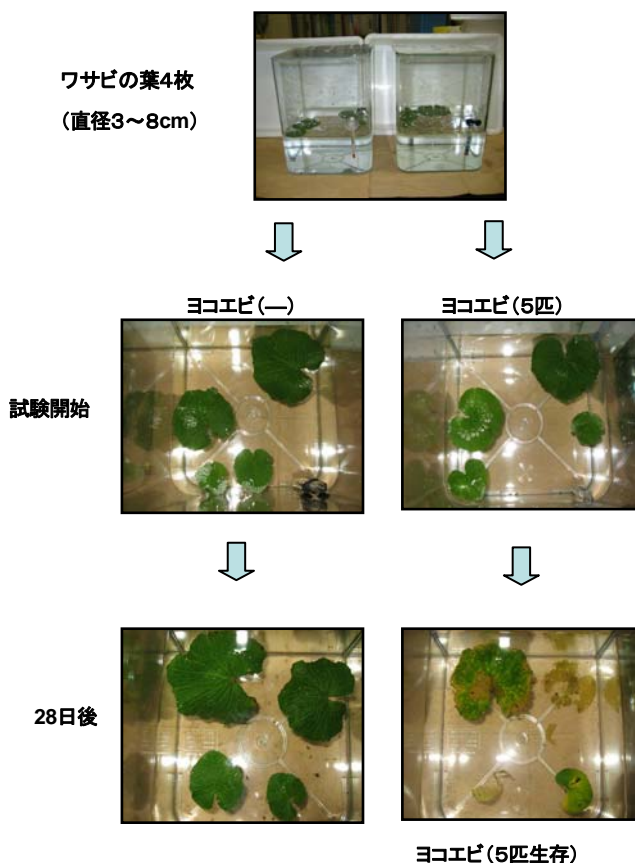


図3 ワサビの葉に対する捕食試験

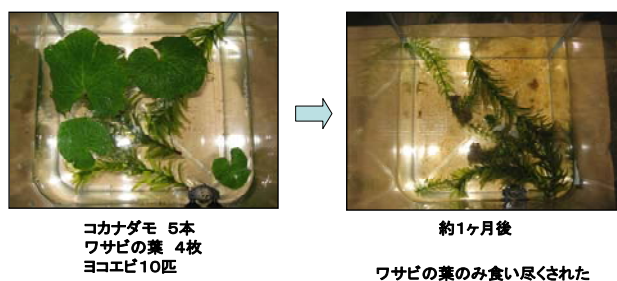


図4 ワサビの葉に対する嗜好性の確認試験

防腐・殺菌効果を持つアリルイソチオシアネートを主体とする揮発性成分が含まれるといわれている¹¹⁾。これら成分を含む葉を捕食するという結果は、根茎に対する食害の可能性を示唆するものと考えられる。

フロリダミズヨコエビによる食害防止対策は、在来種に対して用いられている方法を利用すればよいと考えられるが、そのひとつとしてパイプ栽培が知られている¹²⁾。また最近、生分解性のバイオマスプラスチックで製造された biopot[®] を使用し、ワサビへの被害を防止するための試験栽培が試みられている。これらの方法に加えて、ワサビ田における水量の確保、ヨコエビの温床となりやすい落ち葉の除去などの方法が有効であると考えら

れる。

まとめ

外来種フロリダミズヨコエビについて、静岡県内における分布状況やその生態特性、ワサビに対する食害の有無について検討した。

フロリダミズヨコエビは、一度棲み付いた場合、その駆除は困難である。在来種のヨコエビに比較して、より高い環境適応力と季節を選ばない旺盛な繁殖力により今後ますます県内の分布域を拡大する可能性がある。またワサビに対して食害を及ぼす危険性があり、ワサビ栽培地域への侵入等その動向には今後も注意を払う必要があると考えられる。

文献

- 1) Morino, H. et al. : Description and distribution of *Crangonix floridanus* (Crustacea: Amphipoda: Crangonyctidae) in Japan, an introduced freshwater amphipod from North America, *Contr. biol. Lab. Kyoto Univ.*, **29**, 371-381 (2004).
- 2) 東城幸治: 平成 20 年度 河川整備基金助成事業 「外来種フロリダミズヨコエビと在来ヨコエビ種間の個体群ダイナミクス追及、ならびに外来種の分布拡大防止策検討」(2008)
- 3) 国土交通省: 平成 18 年度狩野川水系庭生動物調査報告書
- 4) 草野晴美: 湧水性端脚類ヒメアナンデルヨコエビ *Jesogammarus fulvialis* Morino の地理的分布と生息環境, *陸水学雑誌*, **69**, 223-236(2009)
- 5) 金田彰二他: 日本における外来種フロリダミズヨコエビ *Crangonyx floridanus* の分布の現状, *陸水学雑誌*, **68**, 449-460(2007)
- 6) 足立昭三: ワサビ栽培, 153-154, 秀潤社, 東京(1987)
- 7) 富川 光: *Jesogammarus* 属 (甲殻綱: 端脚目: キタヨコエビ科) の分類と系統, 広島大学大学院教育学研究科紀要, **56**, 23-29(2007)
- 8) Tojo, K. et al. : Reproductive Biology and Adaptability of the Invasive Alien Freshwater Amphipod *Crangonyx floridanus* (Crustacea: Amphipod, Crangonyctidae), *ZOOLOGICAL SCIENCE*, **27**, 522-527 (2010)
- 9) 東城幸治: 外来種フロリダミズヨコエビの生態—移入・分布拡大の背景と繁殖生態(1)—, *うみうし通信*, **68**, 5-7(2010)

- 10) 芳賀 一他：ワサビにおける総合的病害虫管理 5. 伊豆地域のワサビ田に生息する水生動物の発消長，関西病虫研報，139-140(2010)
- 11) 塩澤竜志：ワサビの保持栽培に関する研究，静岡県立大学環境リレーコラム，41-44(2010)
- 12) 島根県農業技術センター：ワサビの総合的作物管理 (ICM) マニュアル，島根県(2009)

県内における結核菌の VNTR 法による分子疫学調査

微生物部 細菌班 八木美弥, 道越勇樹, 飯田奈都子,
高橋奈緒美*¹, 廣井みどり, 柴田真也,
西尾智裕*², 神田 隆, 杉山寛治

Molecular Epidemiological Research of *Mycobacterium tuberculosis* Using VNTR Analysis
in Shizuoka Prefecture

Miya YAGI, Yuki MICHIGOSHI, Natsuko IIDA,
Naomi TAKAHASHI*¹, Midori HIROI, Shinya SHIBATA,
Tomohiro NISHIO*², Takashi KANDA and Kanji SUGIYAMA

近年, 結核の調査に結核菌遺伝子を用いた分子疫学検査が行われている. 当所でも JATA(12)-VNTR 分析法を採用し分析を始めた. 今回, 静岡県内全域で分離された 238 株について JATA(12)-VNTR 分析法による解析を実施し, その多様性を検証した. その結果, 全体の多様性は JATA8 の領域以外はすべて HGDI 値が 0.6 を上回り, 北京型別で分けると北京型よりも非北京型の方が多様性は高かった. また, 22 のクラスターが確認され, このうち 10 株で構成された最大クラスターのタイプは, 全国的にも多数見られることが報告されていて, 県内も 4 病院のすべてから検出され, 同様な傾向があると思われた.

Key words: 結核菌, 分子疫学調査, 北京型, JATA(12)-VNTR 分析法
Mycobacterium tuberculosis, molecular epidemiological research, Beijing genotype, JATA(12)-VNTR analysis

はじめに

結核は年々減少しているが, 2010 年の新登録結核患者数は国内で 23,261 人, 静岡県内で 640 人となり¹⁾, 今もなお毎年多くの患者が発生している感染症である. 結核は空気感染をするため, その感染拡大防止対策には疫学調査が重要となってくるが, 従来からある患者の接触者や行動から得られる情報を分析した疫学調査に加え, 近年, 結核菌遺伝子を用いた分子疫学検査が取り入れられている. そのひとつである Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法は, 遺伝子中の数十塩基からなる配列が繰り返し存在する多重反復配列領域において, 株により繰り返し回数 (Tandem Repeats) が異なることを利用する方法である²⁾. 日本では北京型の結核菌が多く, 国際標準とする方法では識別が難しいという背景で, Japan

Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR 法が国内標準法として提唱され³⁾, 当所では 2007 から 2008 年度に JATA(12)-VNTR 分析法の検討を行った⁴⁾. 本研究はそれを利用して, 静岡県内で分離された結核菌の分子疫学調査を実施したので報告する.

検体及び方法

検体は県内全域を調査することを目的に, 2009 年度以降静岡県の保健所から依頼のあった結核菌 21 株と, 結核病床を有する静岡県内 4 病院に依頼して菌株分与された 193 株, 2009 年度以前に当所へ依頼または提供のあった 29 株の合計 243 株のうち, すべての分析結果が得られた 238 株を対象とした. VNTR 分析は前田らの方法³⁾に従い, JATA(12)-VNTR 分析法の 12 領域 (Mtub04, MIRU10, Mtub21, Mtub24, QUB11b, VNTR2372, MIRU26, QUB15, MIRU31, QUB3336, QUB26, QUB4156) について分析した. 各領域の多様性については Hunter Gaston Discrimination Index (HGDI 値)⁵⁾で表記し, 12 領域のコピー数が全て一致したものについて同一クラスターとして判定した. 併せて Warren らの方法⁶⁾に従って, 北京型および非北京型への分類を行った.

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*1: 静岡県下水道公社静岡事務所

*2: 静岡県下水道公社天竜川左岸事務所

結果

北京型および非北京型への分類は238株中、北京型が64% (153株) 非北京型が36% (85株) で、日本人のみに限定すると前者が69%、後者が31%であった。国内の状況は約7割が北京型といわれている³⁾ように、県内も同様に北京型が優勢であった。

JATA(12)-VNTR分析の各領域の多様性は表1に示すとおり、JATA5(QUB11b)のHGDI値が0.842と最も高く、JATA11(QUB26)、JATA12(QUB4156)の領域においても0.7以上を示し、多様性が高かった。逆にJATA8(QUB15)の領域においては、0.403と低い結果となった。全体としてはJATA8の領域以外はすべて0.6を上回るが、北京型別で分けると北京型よりも非北京型の方が多様性は高く、非北京型の場合では5領域で0.7を超えるのに対し北京型のみでは6領域で0.5を下回り、近いタイプが多く見られた。

同一クラスターは22確認され(表2)、その内訳は北京型のものが17個、非北京型が5個であった。クラスター同士にも近いタイプのものがいくつか見られた。10株で構成された最大のクラスターは、4病院のすべてから検出されたが、このクラスターのタイプは、和田らの報告⁷⁾で地域や年度に関わらず散見される多発性大規模感染の候補型として注視しているとされるタイプの1つと同じであった。

国立感染症研究所の協力でMST解析を行ったところ(図1)、北京型、非北京型で両者は大きく異なり、北京型ではいくつかのクラスターを含む複数の房状となったが全体は1つに集積し、非北京型では分散され多様性が高いことが確認できた。

外国籍患者由来株は25株あり、その国籍はフィリピン、インドネシア、中国、ブラジル、ミャンマー、ネパールお

表1 JATA(12)-VNTR分析の分布と各領域の多様性

JATA No.	Alias	Copy number of tandem repeat unit(s)														多様性(HGDI)			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	全体	北京型
J01	Mtub04	2	16	63	36	113	7	0	1								0.679	0.512	0.608
J02	MIRU10	0	47	20	131	18	18	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0.642	0.455	0.769
J03	Mtub21	3	30	38	127	24	4	2	0	1	9	0	0	0	0	0	0.665	0.361	0.704
J04	Mtub24	0	11	65	120	39	3	0	0								0.645	0.642	0.627
J05	QUB11b	0	6	26	51	23	25	32	60	6	7	1	0	1	0	0	0.842	0.778	0.810
J06	VNTR2372	0	15	50	122	42	7	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0.660	0.527	0.643
J07	MIRU26	0	10	12	5	5	49	21	126	5	3	2	0	0	0	0	0.666	0.355	0.658
J08	QUB15	0	0	18	7	181	28	0	4								0.403	0.383	0.424
J09	MIRU31	0	3	18	53	45	112	6	1								0.690	0.433	0.601
J10	QUB3336	0	0	1	1	12	3	5	136	13	10	18	7	19	10	2	0.653	0.358	0.869
J11	QUB26	0	0	29	5	12	20	12	41	96	12	10	0	1	0	0	0.779	0.671	0.842
J12	QUB4156	0	2	25	80	52	78	1	0								0.724	0.639	0.640

表2 クラスターのVNTRアレルプロファイル

No.	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	構成株数	
1	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	北京
2	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	5	北京
3	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	3	4	北京
4	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	4	非北京
5	3	3	3	4	7	3	7	5	4	7	2	5	3	北京
6	4	3	3	3	3	3	7	4	4	7	10	4	3	北京
7	2	3	3	3	3	3	7	4	3	7	7	4	2	北京
8	4	1	3	2	6	4	7	4	5	4	8	5	2	北京
9	4	1	3	2	7	4	4	4	5	7	8	5	2	北京
10	4	3	3	3	2	3	9	4	5	7	7	3	2	北京
11	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	9	5	2	北京
12	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	2	北京
13	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	2	北京
14	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	10	4	2	北京
15	4	3	4	3	5	3	7	4	4	7	8	3	2	北京
16	4	3	4	3	1	3	7	4	5	7	8	3	2	北京
17	3	3	3	4	5	3	7	5	6	7	2	5	2	北京
18	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	2	北京
19	0	2	0	3	3	1	5	5	3	10	5	1	2	非北京
20	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	5	3	2	非北京
21	2	5	2	1	2	3	1	2	3	12	7	4	2	非北京
22	2	5	2	1	2	2	1	2	1	13	8	4	2	非北京

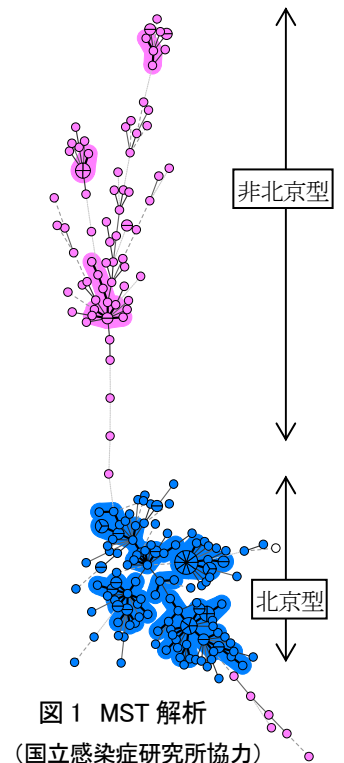


図1 MST解析 (国立感染症研究所協力)

よびモンゴルであった。これらは日本人由来株とは逆に、北京型が24%、非北京型が76%で非北京型の方が多かった。この中でフィリピン国籍患者由来株は8株あり、そのすべては非北京型であった。これらの多様性を分析するとJATA5のみ高かったが、それ以外は低く特に4領域は8株全てで一致していた(表3)。

表3 フィリピン国籍患者由来株のアリルプロファイル

性別	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	北京/ 非北京
男	1	4	9	3	10	1	2	4	4	7	7	2	非北京
女	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	非北京
女	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	非北京
女	1	3	9	2	9	1	2	4	3	7	7	2	非北京
女	1	4	8	3	5	1	2	2	4	7	7	2	非北京
男	1	4	9	3	7	1	2	4	2	7	2	2	非北京
男	1	4	9	3	9	2	2	4	4	7	4	2	非北京
女	1	4	3	3	8	1	2	4	4	7	7	2	非北京

考 察

今回初めて静岡県内の結核菌株の動向を調査したところ、238株中にはJATA(12)-VNTR分析法で22のクラスターが存在し、10株で構成された最大クラスターのタイプは、全国的にも多数見られることが報告されていて、県内も同様な傾向があると思われた。しかし、この12領域では一致しても領域の追加や違う領域の選定とすれば必ずしも同一クラスターであるとは限らず、その有用性や領域の選定はまだ議論の域にあり統一した見解が出ていないのが現状である。また、今回分析した非北京型のフィリピン国籍患者株ではその多くが同様の解析結果となり、本県は外国籍患者の割合が多く、このような外国籍由来株についても今後どう対応すべきか検討が必要であると思われた。

このように、まだ発展途上ではある結核菌VNTR法による検査は完全とは言えないまでも、感染疑い調査など1つの判断材料として利用されてきている。試行錯誤ではありながら分析数を増やしていくことで行政側の利用の仕方も定まり、よりよいものへと発展していく可能性を持つと感じた。今後は本県のみならず近県や全国のデータとも比較、共有していくことで、流行株の把握や感染経路の推定等に役立つことが期待される。

謝 辞

検体提供に御協力くださいました県内保健所と天竜病院、静岡県立総合病院、市立島田市民病院、富士市立中央病院

の皆様深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 公益財団法人結核予防会：結核の統計 2011
- 2) Supply, P. et al. : Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.*, **36**, 762-771(2000)
- 3) 前田伸司他：国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム, *結核*, **83**(10), 673 - 678(2008)
- 4) 杉山寛治他：結核菌の遺伝子解析と疫学調査への応用, *静岡県環境衛生科学研究所報告*, **51**, 1-3 (2009)
- 5) Jiao, W. W., et al. : Evaluation of New Variable-Number Tandem-Repeat Systems for Typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing Genotype Isolates from Beijing, China, *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 1045-1049(2008)
- 6) Warren, R. M., et al. : Patients with Active Tuberculosis often Have Different Strains in the Same Sputum Specimen, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **169**, 610 - 614(2003)
- 7) 和田崇之他：結核菌の縦列反復多型(VNTR)解析に基づく分子疫学とその展望, *結核*, **85**(12), 845 - 852(2010)

市場使用海水や魚介類加工用海水の 腸炎ビブリオ汚染実態調査

微生物部 細菌班 柴田真也, 道越勇樹, 飯田奈都子,
高橋奈緒美*¹, 廣井みどり, 八木美弥,
西尾智裕*², 神田 隆, 杉山寛治

Investigation of Seawater Contamination by *Vibrio parahaemolyticus*,
using at Fish Market or Factories for Processing Fish and Shellfish.

Shinya SHIBATA, Yuki MICHIGOSHI, Natsuko IIDA,
Naomi TAKAHASHI*¹, Midori HIROI, Miya YAGI,
Tomohiro NISHIO*², Takashi KANDA and Kanji SUGIYAMA

腸炎ビブリオを原因とする食中毒は近年減少傾向にあり、県内では2008年、2009年と発生していない。腸炎ビブリオ食中毒の発生件数減少には、市場使用海水や魚介類加工用海水の浄化が一因と考えられる。そこで、これらの海水中の腸炎ビブリオTDH（耐熱性溶血毒）産生株の定量検査を実施して海水の洗浄度を確認し、腸炎ビブリオ食中毒の防止効果を検証した。

また、病原株の菌数を確認する際に、従来法（MPN-PCR法）とリアルタイムPCR法を比較検討し、従来法に比べ迅速かつ検査手順が簡便なリアルタイムPCR法による定量法を確立した。

Key words: 腸炎ビブリオ, 耐熱性溶血毒(TDH), 海水, リアルタイムPCR法
Vibrio parahaemolyticus, Thermostable Direct Hemolysin:TDH, seawater,
real-time PCR analysis

はじめに

魚介類を生で食する機会の多いわが国では、腸炎ビブリオ食中毒の発生防止は食品衛生上重要な課題である。静岡県では、2008年と2009年の夏季（7月～9月）の腸炎ビブリオを原因とする食中毒は0件と、近年発生件数は減少傾向にある¹⁾。これは、夏季食品一斉監視、腸炎ビブリオ食中毒注意報等の食中毒防止対策が奏功した結果であり、今後もこの状況を維持していくことは我々行

政の使命と考える。

漁港の市場海水は、魚介類の洗浄・運搬・活魚用いけすの海水として使用される。生食用鮮魚類の腸炎ビブリオ規格基準（2001年）設定にあたり、市場使用海水は通常海から汲み上げられ滅菌処理を行い使用されることになったが、その方法は漁港の設備によって異なり、これらの海水が腸炎ビブリオに汚染されていた場合は2次汚染の原因となる。

そこで、腸炎ビブリオ食中毒のリスクの高い夏季（7月～9月）に、漁港から市場使用海水や魚介類加工用海水を採取し、腸炎ビブリオ病原株（*tdh*陽性）の汚染菌数を従来法（MPN-PCR法）とリアルタイムPCR法で定量し、これらの海水の洗浄度を確認を行った。

静岡県環境衛生科学研究所
〒420-8637, 静岡市葵区北安東4-27-2)
Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*1 静岡県下水道公社静岡事務所

*2 静岡県下水道公社天竜川左岸事務所

材料および方法

1 検査材料

市場使用海水採取の許可が得られた県内の漁港（下田，沼津，焼津，小川，大井川，吉田，片浜，相良，地頭方，御前崎，福田）で海水採取をした。

調査した漁港と検体数を表 1 に、各漁港の滅菌装置の設置状況を表 2 に示した。

表 1 調査した漁港と検体数

	2010年	2011年
漁港	8	11
検体数	8	13 ^{注)}

注：沼津では活魚用水槽と貝類用水槽の海水も採取

表 2 滅菌装置の設置状況

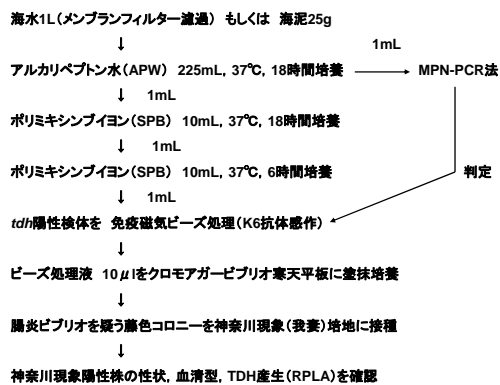
滅菌装置	2010年	2011年
砂ろ過UV殺菌	1	3
海水電解防汚除装置	5	4
ポンプアップ(未滅菌)	2	3
	8	10

2 検体処理

採取した各海水 1000mL をメンブランフィルターで濾過した。

1) MPN-PCR 法

濾過液を 3 段階（原液，10 倍希釈，100 倍希釈）に希釈後，1 系列につき 3 本ずつ，37°C18 時間培養。培養液 1mL を抽出キット（NucleoSpin Tissue Kit）で DNA を抽出し，抽出液 5 μL を用いて MPN-PCR 法を行った。（図 1）PCR 法の結果より，TDH(+) となった本数から、最確数表をもとに菌数を求めた^{2,3)}。

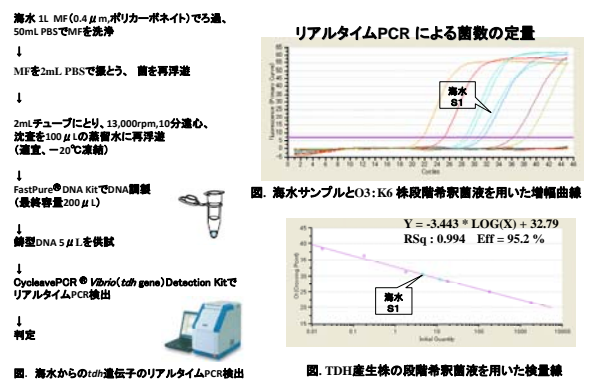


海水、海泥からの TDH 産生腸炎ビブリオの検出方法(従来法)

図 1 従来法のフローチャート

2) リアルタイム PCR 法

濾過液から培養を行わず直接菌浮遊液を作製し，抽出キット（NucleoSpin Tissue Kit）を用いて DNA を抽出した。抽出液 5 μL を，タカラ・バイオ製 CycleavePCR® *Vibrio* (*tdh gene*) Detection Kit と Thermal Cycler Dice® Real Time System でリアルタイム PCR を行った⁴⁾。その際検量線は，腸炎ビブリオ TDH 産生株の段階希釈液を用いて，検体と同時にリアルタイム PCR 法を実施した。（図 2）



海水の *tdh* 保有腸炎ビブリオ定量検査へのリアルタイム PCR 法の応用

図 2 リアルタイム PCR 法のフローチャート

結果

1 市場使用海水の汚染状況の現状

2010 年は県内 8 漁港，2011 年は前年の 7 漁港（1 港は廃港）に新たに前年未実施だった 3 港を加え 10 港の市場海水調査を行った。リアルタイム PCR 法で TDH 産生腸炎ビブリオは，2010 年は 3 港，2011 年は 1 港から検出された（表 3）。2010 年に検出された 3 港は海水電解防汚除装置が設置されていたが，2011 年の 1 港は滅菌装置が設置されていない漁港であった。

表 3 従来法とリアルタイム PCR 法の検出成績

漁港	2010年7月26日		2010年8月30日		2011年8月1日		2011年8月31日		2011年9月7日	
	MPN-PCR	q-PCR	MPN-PCR	q-PCR	MPN-PCR	q-PCR	MPN-PCR	q-PCR	MPN-PCR	q-PCR
下田	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	0	0-0-0 0	0	ND	ND
沼津	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	0	0-0-0 0	0	ND	ND
焼津	0-0-0 0	0	1-0-0 36/100ml	1.42E+00	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	0
小川	0-0-0 0	0	0-0-0 0	0	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	0
大井川	0-0-0 0	0	0-1-0 30/100ml	0	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	0
吉田	0-0-0 0	0	2-1-0 150/100ml	0	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	7.83E+00
片浜	0-0-0 0	0	3-1-0 430/100ml	4.14E-01	廃港	廃港	廃港	廃港	廃港	廃港
相良	0-0-0 0	0	3-1-0 430/100ml	4.50E-01	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	0
地頭方	0-0-0 0	0	1-2-0 110/100ml	0	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	0
御前崎	0-0-0 0	0	0-0-0 0	0	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	0
福田	ND	ND	ND	ND	0-0-0 0	0	0-0-0 0	0	ND	ND

注：網掛けの漁港は滅菌装置が未設置

2 リアルタイム PCR 法による海水中の腸炎ビブリオ病原株の定量法の確立

今回海水中の TDH 産生腸炎ビブリオの定量法を、従来法 (MPN-PCR 法) とリアルタイム PCR 法で比較検討を行った。その結果を表 4 に示したが、従来法では、検体の培養等の検査工程が煩雑であり、結果の判定には非特異的の反応が出現しバンドの判定がしづらかった。しかし、リアルタイム PCR 法は検査方法が簡便で、従来法は検体処理から結果が出るまでに 2 日かかるのに対して半日で結果を出すことが可能である。また、従来法よりもデータ特異性に優れ、検体のコンタミネーションのリスクが低いことから、リアルタイム PCR 法の方が従来法よりも有用性が高いと考えられた。

表 4 従来法とリアルタイム PCR 法の比較

	MPN-PCR法	リアルタイムPCR法
培養	あり	なし
所要時間	2日間	半日
手技	煩雑	簡便
検体のコンタミネーション	リスク高い	リスク低い
検査感度	低	高
データ特異性	低	高

考 察

今回検討したリアルタイム PCR 法に定量法は、従来法に比べ海水中の腸炎ビブリオ病原株を迅速かつ簡便に測定することが可能である。この方法を用いることで、今後は漁港周辺海域や市場海水の汚染状況を確認し、食中毒警報などの行政等に必要データを迅速に提供することが可能となる。これにより、市場使用海水の洗浄度が確認され、県内で水揚げされる魚介類は 2 次汚染のリスクが低く安全性が高いとアピールできると考えられる。

まとめ

県内の腸炎ビブリオを原因菌とする食中毒は表 5 のように年々減少傾向にある¹⁾。しかし、今回の調査では、滅菌設備の有無が必ずしも腸炎ビブリオ病原株の検出と一致する結果とはならなかった。これは、海水中の腸炎ビブリオ汚染菌数や滅菌装置の運転の不具合などによって、腸炎ビブリオを滅菌しきれていない可能性も考えられる⁵⁾。よって、今後も夏季の食中毒発生状況を、注意深く見守る必要があると思われる。

表 5 県内の発生件数の推移

	食中毒の発生件数	腸炎ビブリオが原因菌の事例
16年	26	1
17年	27	6
18年	26	1
19年	23	1
20年	28	0
21年	27	0
22年	29	4
23年	18	0

謝 辞

市場使用海水採取にあたり、御協力をいただいた各漁港関係者、静岡県賀茂健康福祉センター衛生薬務課の皆様深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 静岡県健康福祉部：平成 22 年静岡県の食中毒
- 2) 尾畑浩魅他：腸炎ビブリオ食中毒事例における PCR 法を用いた食品からの耐熱性毒素 (TDH) 産生菌の分離、感染症学雑誌, 80 (4), 383-390 (2006)
- 3) 三輪憲永他：腸炎ビブリオ食中毒原因菌の食品・環境における分布調査と検査法の検討, 静岡県環境衛生科学研究所報告, No45,1-4 (2002)
- 4) 杉山寛治：FastPure®DNA Kit, CycleavePCR® *Vibrio*(*tdh* gene)Detection Kit, Thermal Cycler Dice®Real Time System を用いた腸炎ビブリオ TDH 産生菌定量法の検討, BIO VIEW No55, 28-29 (2008)
- 5) 柏木淳子他：鳥取県内の海水及び魚介類からの腸炎ビブリオ検出状況, 鳥取県衛生環境研究所報 第 43 号, 31-34 (2003)

食品等からのノロウイルス高感度検出法の検討

微生物部 ウイルス班 長岡宏美, 湊 千壽*, 小柳純子,
山田俊博, 川森文彦, 杉山寛治

Study of High-sensitivity Detection Methods of Norovirus from Foods and Wipe Samples

Hiromi NAGAOKA, Chihiro MINATO*, Junko KOYANAGI,
Toshihiro YAMADA, Fumihiko KAWAMORI and Kanji SUGIYAMA

ノロウイルスによる集団胃腸炎事例において、その感染源が食品に由来するか否かを判断する上で食品や拭き取り検体からのノロウイルスの検出の有無は重要な根拠の一つとなる。しかし、食品などの検体の処理方法については一般化された優れた方法がなく、検出率が低いことから行政需要に十分対応できていないのが現状であった。そこで、食品検体についてはPEG沈殿法、拭き取り検体については振り出し法を用いた前処理法を検討したところ、検出率は食品で34%、拭き取り検体で17.6%と良好な結果が得られた。

Key words: ノロウイルス, 高感度検出法, 食品, 拭き取り検体
norovirus, high-sensitivity detection methods, food, wipe sample

はじめに

現在のノロウイルスによる食中毒は、調理従事者から直接的に、あるいは調理器具等を介して間接的に汚染を受けた食品を原因とする事例が多数を占めている。

したがって、あらゆる食品に汚染のリスクがあり、多種多様な食品からのウイルス検出法が必要とされている。しかし、食品検体の処理方法については、現在の通知法（平成19年5月14日付け食安監発第0514004号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知）では二枚貝を対象としたものしかなく、対応困難な食品が多く、食中毒事例において二枚貝以外の食品からウイルスを検出し得た事例は少ない。

また、拭き取り検体については、付着しているウイルス量が少ないため検出が難しく、検体の前処理段階で効率よ

くウイルスを濃縮する方法の開発が課題となっている。

今回は、表面汚染が推定される食品および拭き取り検体からのノロウイルス高感度検出法を検討した。

材料および方法

1 供試材料

2010年4月から2011年8月に当所に搬入された食中毒(疑いを含む)関連検体のうち、7事例の食品79検体および拭き取り検体165検体を供試した。

2 表面汚染が推定される食品の前処理(PEG沈殿法)

A型肝炎ウイルスを対象とした検査法(平成21年12月1日付け食安監発1201第2号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知)を応用した方法で食品の前処理を実施した。すなわち、食品と10倍量のPBS(-)をストマッキング袋に入れ、30分間振とうして表面を洗い出した。洗い出した液を10,000 x g, 20分遠心し、その上清25mlにポリエチレンリコール(PEG)6000を最終濃度12%, NaClを最終

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*: 静岡県中部健康福祉センター

濃度 1M になるように加えて完全に溶解させ、10,000 x g, 30 分間遠心後、得られた沈殿物を SDS-Tris Glycine 液 200 μ l に再浮遊させた。

3 拭き取り検体の前処理(振り出し法)

拭き取り検体 5~10ml に SDS-Tris Glycine 液 3ml を加え、1 時間振とう後、30%シヨ糖溶液に重層して 218,000 x g で 2 時間超高速遠心し、沈殿物を SDS-Tris Glycine 液 200 μ l に再浮遊させた。

4 RNA 抽出・ノロウイルスの検出および遺伝子解析

前処理で得られた試料を 13,000 x g で 5 分間遠心し、上清 140 μ l から QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、通知法に従いノロウイルス検出用の RT-PCR 法を実施した。PCR 陽性検体については、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、遺伝子型を解析した。

結果

1 食品からのノロウイルス検出状況

供試した 79 検体中 27 検体 (34.2%) からノロウイルス遺伝子が検出され、陽性となった食品の種類は多様であった (表1)。検出されたノロウイルスの遺伝子型は GII/2 と GII/3 であり、Case5 を除き、それぞれの事例で確認された患者および調理従事者由来のノロウイルスの遺伝子型と一致していた。なお、ウイルス検出量は 1 検体を除き、1g 当たり 1000 コピー未満であった。

2 拭き取り検体からの検出状況

165 検体中 29 検体 (17.6%) からノロウイルスが検出された。陽性率はトイレ関連が調理室関連に比べ高い傾向がみられ、調理室関連で高率にノロウイルスが検出された採取場所は、排水溝や手指が頻繁に触れる取っ手類 (手洗い設備取っ手、包丁取っ手、冷蔵庫取っ手など) が多かった (表2)。

考察

ノロウイルス検査は、細菌検査と異なり、培養が不可能であるため遺伝子検査を基本としている。遺伝子検査は基本的に迅速、簡便、高感度であるが、食品や拭き取り検体からのウイルス検出の場合は、検体に存在する微量のウイルス粒子を検体から分離濃縮する必要があり、試料調整段階で多くの困難性を伴う。

食品からのノロウイルス検査法については、食品からウイルス粒子をより効率よく分離するために、様々な条件変更や新たな手法が検討されてきた¹⁾。食品からのウイルス溶出効率を上げるために、pH9 以上のグリシン緩衝液を用いてアルカリ条件下で食品の乳剤化あるいは浸透処理を行い、その後 pH を中性に戻した後濃縮する方法²⁻⁵⁾ が考案された。それ以外にも、ウイルス回収効率を上げる目的でパンソルビン・トラップを用いた方法⁶⁾ や細菌吸着による前処理を用いた方法⁷⁾ などが報告されてきたが、いずれの方法も操作が煩雑で特殊な抗体を必要とするなどの理由により検査法としての普及に至っていない。

今回、著者が検討した PEG 沈殿法においては、食品からの検出率が 34.2% と良好な成績が得られた。本法は特別な試薬等が不要で操作法も比較的簡便であることから、食品からのウイルス検査法として有用であると思われる。

拭き取り検体からのノロウイルス検出については、これまで報告例が少なかったが、今回検討した振り出し法を用いることにより、17.6% の検出率が得られた。ノロウイルスが検出された場所は、ドアノブ、取っ手、水道栓など手指が頻繁に触れる場所が多かったことと、近年のノロウイルス食中毒が、従事者等が保有していたウイルスが直接あるいは間接的に食品を汚染した事例が多いことを考え合わせ、食品の汚染源としてウイルスの付着した手指を重要視していく必要があるものと思われる。

今後、本研究で検討したそれぞれの方法をベースとし、より簡便で精度の高い検査法の普及に向け改良を重ねていく予定である。

表1 表面汚染が推定された食品からのノロウイルス検出状況

事例	原因施設	陽性数／検体数 (検出率)	ノロウイルスが 検出された食品名	copy 数 (実測値)		遺伝子型
				実測値	1g 当たり	
Case1	老人福祉施設 (集団給食)	3/13 (23%)	ホキのママレード焼き	9.2	60	GⅡ／3
			白菜の塩昆布和え	1.3	10	GⅡ／3
			アジのしょうゆ焼き	ND	ND	GⅡ／3
Case2	病院給食	6/41 (15%)	パン	13.4	80	GⅡ／2
			レタス	12.2	80	GⅡ／2
			ご飯	12.9	80	GⅡ／2
			肉	16.3	100	GⅡ／2
			ジャガイモ	13.2	80	GⅡ／2
			茶碗蒸し	0.7	4	GⅡ／2
Case3	飲食店(食堂)	1/1	馬刺し	91.9	600	GⅡ／3
Case4	飲食店(食堂)	1/1	しめ鯖	39.1	200	GⅡ (型別不能)
Case5	飲食店(食堂)	3/4 (75%)	生ハンバーグ	51	300	GⅡ (型別不能)
			生ハンバーグ	40	300	GⅡ／2
			生ハンバーグ	102.8	600	GⅡ (型別不能)
Case6	飲食店 (仕出し屋)	11/17 (65%)	弁当 (プール)	7.7	50	GⅡ／3
			鶏肉の甘辛揚げ	144.6	900	GⅡ／3
			キャベツ	5.2	30	GⅡ／3
			ツナじゃが煮	5.9	40	GⅡ／3
			魚のみそ焼き	7.7	50	GⅡ／3
			豆もやし	341.5	2000	GⅡ／3
			切干大根の煮物	2.3	10	GⅡ／3
			ちくわの磯辺揚げ	1.6	10	GⅡ／3
			春雨炒め	ND	ND	GⅡ／3
			魚のフライ	ND	ND	GⅡ／3
Case7	飲食店 (仕出し屋)	2/2	佃煮	3.3	20	GⅡ／3
			キハダマグロ	ND	ND	GⅡ／3
			こんにゃくまんじゅう	0.7	5	GⅡ (型別不能)

表2 拭き取り検体からのノロウイルス検出状況

場 所	陽性数／検体数 (検出率)	
トイレ関連	便器	3／10 (30%)
	ドアノブ	7／23 (30%)
	便座	1／2 (50%)
	手洗い水道栓	2／12 (17%)
調理室関連	シンク水道栓	2／17 (12%)
	冷蔵庫取っ手	5／33 (15%)
	ガスコックつまみ	1／7 (14%)
	シンク内	1／11 (9%)
	排水溝内	1／3 (33%)
	手洗い設備取っ手	2／10 (20%)
	まな板	2／20 (10%)
	冷蔵庫内壁	1／11 (9%)
	包丁取っ手	1／6 (17%)

文 献

- 1) Stals, A. et al.: Extraction of food-borne viruses from food samples: A review, *Int. J. Food Microbiol.*, **153**, 1-9 (2012)
- 2) Cheonng, S. et al.: Concentration method for the detection of enteric viruses from large volumes of foods, *J. Food Prot.*, **72**, 2001-2005 (2009)
- 3) Stals, A. et al.: Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results, *J. Food Prot.*, **74**, 425-431 (2011)
- 4) Scherer, K. et al.: Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak, *J. Virol. Methods*, **169**, 22-27 (2010)
- 5) Butot, S. et al.: Procedure for rapid concentration and vegetables, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 186-192 (2007)
- 6) 斉藤博之他:食品からのノロウイルス回収を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発, 第56回日本ウイルス学会学術集会抄録集, **195** (2008)
- 7) 秋葉哲哉他:細菌添加培養処理によるカキなどからのノロウイルス検出率の向上, *食品衛生学雑誌*, **49**, 407-410 (2008)

浴槽水の衛生管理への ATP 測定法の応用に関する検討

微生物部 細菌班 神田 隆, 道越勇樹, 高橋奈緒美*¹,
八木美弥, 柴田真也, 西尾智裕*²,
杉山寛治

Study of ATP Assay for Hygiene Control of Bath Water

Takashi KANDA, Yuki MICHIGOSHI, Naomi TAKAHASHI*¹,
Miya YAGI, Shinya SHIBATA, Tomohiro NISHIO*²
and Kanji SUGIYAMA

浴槽水の簡便な衛生管理法として ATP 測定法の有用性を検討するため、温泉等の浴槽水について ATP 値の測定、レジオネラ属菌数、一般生菌数および従属栄養細菌数を測定した。その結果、一般生菌数、従属栄養細菌数が高くなると ATP 値が高くなり、レジオネラ属菌の分離率も高くなる傾向がみられ、ATP 値から浴槽水の衛生状態を推測することが可能と思われた。しかし、ATP 値が低い場合でもレジオネラ属菌が検出される場合があった。ATP 値によって浴槽水の衛生状態を把握するためには、施設毎に日常的な浴槽水の ATP 値と細菌数を把握しておくとともに、過去におけるレジオネラ属菌の汚染の有無を把握した上での活用が必要と思われた。

Key words: レジオネラ属菌, 浴槽水, ATP 測定法
Legionella, bath water, ATP assay

はじめに

レジオネラ感染症は感染症で 4 類感染症に分類される全数把握の感染症で、毎年 800 名前後の患者が報告され、そのうち 40~50 名が死亡する重要な呼吸器感染症の一つである。国内においてはレジオネラ属菌に汚染された浴槽水からの感染が多く報告され、本感染症を予防するため浴槽水の衛生管理が重要な課題になっている。浴槽水の衛生管理にはレジオネラ属菌の汚染の有無を早期に把握し、効果的な対策を行うことが重要であるが、浴槽水のレジオネラ属菌の確認には 7 日~10 日間を要する検査が必要で、日常的に浴槽水の衛生状態を把握する簡易な方法が求められている。

現在、食品衛生分野では生物の持つエネルギー物質である ATP (アデノシン三リン酸) が食品製造施設等の衛

生状態 (微生物学的清浄度) の指標として広く用いられている。また、浴槽水については杉山ら¹⁾ が ATP 測定法について浴槽水の衛生管理手法としての有用性を報告している。今回は、入浴施設の現場で ATP 測定法を応用するための検討を行った。

方法

材料は 2010 年 4 月~2012 年 2 月にレジオネラ属菌の行政検査 (38 検体) および関連調査 (27 検体) として当所に搬入された浴槽水 (計 65 検体)、本調査のために協力の得られた旅館、ホテルおよび入浴施設 (13 施設) 等の浴槽水を用いた。採取した検体の泉質は、単純泉、アルカリ単純泉、塩化物泉、硫酸泉、井水、水道水またはこれらを混合したもので、pH は 6.7~9.3、残留塩素濃度は 0~4.0 mg/L であった。

浴槽水の ATP 測定は簡易測定キット (ルシパックワイド・キッカーマン) と専用の測定器 (ルミテスター PD-10N) を用いて行った。浴槽水そのままのもの (原液) と滅菌メンブランフィルター (孔径 0.45 μ m) でろ過したものについて、各 100 μ L をマイクロピペットでルシパックワ

静岡県環境衛生科学研究所
(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)
Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*1: 静岡県下水道公社静岡事務所

*2: 静岡県下水道公社天竜川左岸事務所

イドの測定用チューブの先端部分に入れ、試薬と反応させて測定した。原液の ATP 値は微生物および生物に由来する汚れも含めた浴槽水中の全 ATP 値、原液の ATP 値からろ過測定した ATP 値を差し引いた ATP 値を微生物由来 ATP 値とした。また、一部の検体については測定用チューブに添付されている綿棒を浴槽水に浸漬したものを測定チューブに挿入し、ATP 値を測定した。

また、各検体についてレジオネラ属菌数、一般生菌数（標準寒天培地、37℃、2日間培養）および従属栄養細菌数（R2A培地、42℃、7日間培養）を測定した。

結果と考察

行政検査（38 検体）では 11 検体からレジオネラ属菌（10～1,200CFU/100mL）が分離された。全 ATP 値は 3～694RLU、微生物由来 ATP 値は 1～202RLU であった。一般生菌数、従属栄養細菌数はいずれも検出限界以下（<10CFU/mL）～30,000CFU 以上/mL であった。

関連調査（27 検体）では 13 検体からレジオネラ属菌（10～5,500CFU/100mL）が分離された。全 ATP 値は 6～76RLU、微生物由来 ATP 値は 1～72RLU の範囲であった。1 mL 当たりの一般生菌数は検出限界以下～12,600CFU 以上/mL、従属栄養細菌数は検出限界以下～30,000CFU 以上/mL であった。

協力施設（16 検体）の調査では 8 検体からレジオネラ属菌（10～900CFU/100mL）が分離され、全 ATP 値は 3～304RLU、微生物由来 ATP 値は 1～253RLU の範囲であった。一般生菌数は 120～174,000CFU/mL、従属栄養細菌数は 1,400～734,000CFU/mL であった。

レジオネラ属菌が分離されなかった検体を含む行政検査、関連調査および協力施設の計 81 検体の全 ATP 値は 1～813RLU、微生物由来 ATP 値は 1～253RLU で、一般生菌数、従属栄養細菌数はいずれも検出限界以下～30,000CFU 以上/mL であった。

ATP の測定値は、原液の測定値に比べろ過測定値が低い値となり、ろ過により細胞（細菌）の ATP を除外し、両者の差（微生物由来 ATP 値）からより正確な浴槽水中の細菌汚染度を推定することが出来ると思われた。今回の検討では、レジオネラ属菌が検出された 32 検体中 13 検体で微生物由来 ATP 値が 1RLU 以下であった。また、レジオネラ属菌は残留塩素が 1～2mg/L の濃度でも生残する場合のあることが報告²⁾されている。本調査でも残留塩素が 1mg/L でレジオネラ属菌が検出された検体では全 ATP 値が 694RLU で微生物由来 ATP 値が 1RLU 以下となり、残留塩素濃度が高い場合、塩素消毒により浴槽水中の多くの微生物は死滅し、微生物由来 ATP 値が低くなったもののレジオネラ属菌は生残していたと考えられた。これ

らのことから、浴槽水中の微生物汚染（レジオネラ属菌汚染）を推定する指標としては微生物由来 ATP 値ではなく、全 ATP 値が指標として適していると考えられた。

また、一部の検体で実施した綿棒による測定では ATP 値は無処理（ろ過処理無し）測定値に比べ若干低い値となったが、綿棒のみでの検査でも細胞以外の汚れも含めた浴槽水の汚染度を知ることが出来ると思われた。

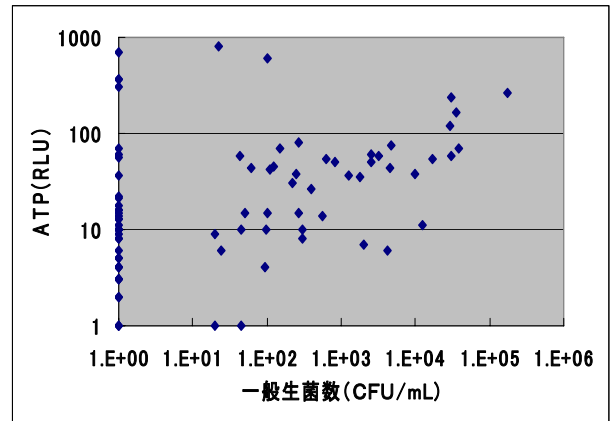


図1 一般生菌数と ATP (浴槽水 n=81)

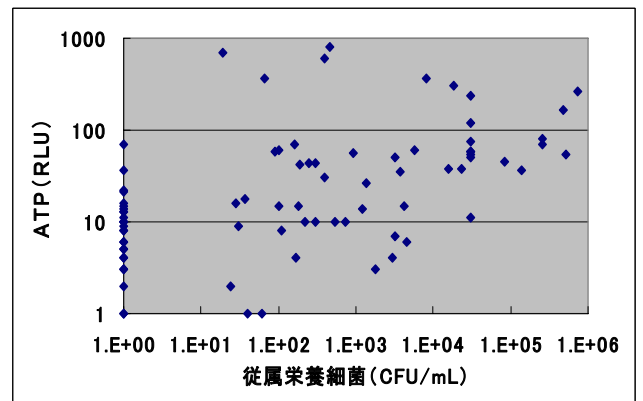


図2 従属栄養細菌数と ATP (n=81)

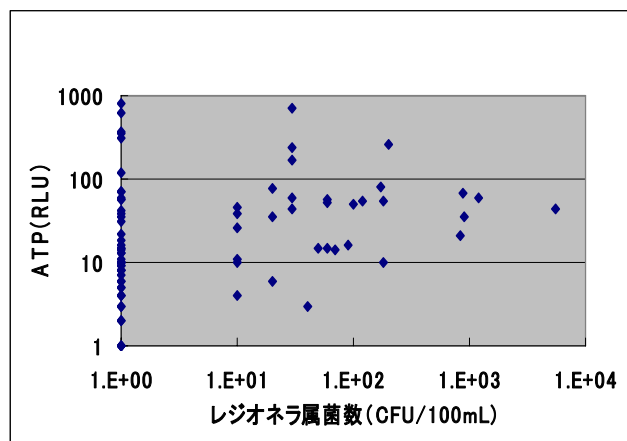


図3 レジオネラ属菌数と ATP (n=81)

全 ATP 値と一般生菌数，従属栄養細菌数，レジオネラ属菌数の結果を図 1, 2, 3 に示した。ATP は pH や NaCl などの温泉に含まれる成分により反応に影響が出ることが知られている。また，塩素消毒の影響などもあり ATP 値と各菌数は必ずしもきれいな相関とはならなかったが，菌数が高くなると ATP 値も高くなる傾向がみられた。

全 ATP 値とレジオネラ属菌の陽性検体数の結果を表 1 に示した。ATP 値が 10RLU 未満でも 24 検体中 3 検体 (12.5%) でレジオネラ属菌が検出されたが，ATP 値の範囲別にみると 10~24RLU で 38.1%，25~29RLU で 54.5%，50~99RLU では 66.6% の検体でレジオネラ属菌が陽性となり，全 ATP 値の上昇とともにレジオネラ属菌の陽性率が高くなった。

表1 ATP 値とレジオネラ属菌 (n=81)

ATP 値 RLU	レジオネラ属菌 (CFU/100mL)			
	0	10~90	100~900	1000≤
<10	21	3	0	0
10~24	13	6	2	0
25~49	4	5	1	1
50~99	5	4	5	1
100≤	6	3	1	0

平成 19~21 年度の厚生労働科学研究³⁾ でレジオネラ対策のための衛生管理手法として，浴槽水の ATP 測定により細菌汚染の推定する手法が検討され，50RLU を超えた浴槽水はレジオネラ属菌の汚染の可能性が高くなることから，衛生管理をする目安となると報告している。また，平成 22 年度地域保健推進事業 (東京多摩立川保健所)

4) でも同様の検討が行われ，浴槽水 (白湯) では 25RLU を越えるとレジオネラ属菌汚染の可能性が高くなり要注意としているが，温泉水については白湯と異なる ATP の反応がみられることを報告している。今回，ATP 値が低いにもかかわらずレジオネラ属菌が検出された事例では，その理由は明らかではないが，温泉泉質により ATP 反応が影響を受けた可能性や，浴槽水の微生物汚染は少なかったものの配管等のレジオネラ属菌の汚染源からレジオネラ属菌が遊出した可能性も考えられた。

したがって，ATP 測定法により浴槽水の衛生状態，レジオネラ属菌汚染の可能性を簡便に知るためには，各施設において日常的な浴槽水の ATP 値と細菌数を把握しておくとともに，過去におけるレジオネラ属菌の汚染の有無を把握した上での活用が必要と思われた。

今回の調査では協力施設の浴槽で入浴者の利用前後の状態 で検査を行った。その結果，掛け流し式浴槽 (塩素消毒なし) の A 施設では，宿泊客が利用した後の浴槽水と換水後の浴槽水を採取して測定した結果，換水後の浴槽水では利用後に比べ ATP 値，レジオネラ属菌数，一般生菌および従属栄養細菌が軽度低下した。また，循環式の B 施設では換水後 5 日間循環使用し夜間塩素消毒を停止した状態ではレジオネラ属菌が検出されたが，その後塩素消毒を実施した後の営業中の浴槽水ではレジオネラ属菌は不検出となり，全 ATP 値が 157RLU から 57RLU に低下し，従属栄養細菌も 4.7×10^5 CFU/mL から 9.3×10^2 CFU/mL に減少したことから，浴槽水中の ATP 値の測定は施設の洗浄効果の確認や塩素による消毒効果の確認にも利用できると思われた。

まとめ

浴槽水中では一般生菌や従属栄養細菌等の雑菌がまず増殖し，それを餌とするアメーバが増殖し，それに引き続いてレジオネラ属菌が増殖する。今回，浴槽水の ATP 値はそれら雑菌の増加とともに上昇し，レジオネラ属菌の陽性率も高くなる傾向が見られたことから，浴槽水中の ATP 値を測定することで，ある程度の浴槽水中の微生物による汚染度を推定することができると考えられた。ATP 値は直接レジオネラ属菌を検出するものではないが，微生物汚染の程度からレジオネラ属菌の汚染の可能性を推測し，衛生管理 (換水，配管洗浄や塩素の注入など) を強化する目安に利用することができると考えられた。

文献

- 1) 杉山寛治他：浴槽水等の衛生管理手法としての ATP 測定法の有用性，第 43 回静岡県公衆衛生研究会抄録集，3B，66-68 (2007)

- 2) 村上光一他：浴場施設でのレジオネラ属菌と宿主アメーバの関連，およびレジオネラ属菌を塩素消毒により制御する場合の問題点，防菌防黴，**36** (11)，749-756 (2008)
- 3) 倉文明他：ATP 測定による入浴施設の汚染度モニタリングに関する研究，平成 19 - 21 年度厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究総合研究報告，68-76 (2010)
- 4) 上木隆人：平成 22 年度地域保健総合推進事業「保健所のレジオネラ対策における簡便迅速な検査法の実用化と自主管理の推進に関する研究」報告書，3-40 (2011)

リケッチア感染症の迅速診断法に関する研究

微生物部 ウイルス班 川森文彦, 小柳純子, 山田俊博,
長岡宏美, 杉山寛治

Study of Prompt Diagnostic Assaies for Rickettsial Infections

Fumihiko KAWAMORI, Junko KOYANAGI, Toshihiro YAMADA,
Hiromi NAGAOKA and Kanji SUGIYAMA

つつが虫病, 日本紅斑熱およびその他の紅斑熱を識別して検出できる Multiplex real-time PCR ならびに紅斑熱群リケッチアを迅速かつ高感度に検出できる One-tube nested PCR の開発を試みた. 両方法とも国内の公定法のリケッチア感染症検出用 PCR 法に比べ同等以上の感度を有していた. 特異性に関しては, 前者は *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia japonica* およびその他の 6 種類の紅斑熱群リケッチアの遺伝子増幅を識別できたが, チフス群リケッチアの *R. typhi* の増幅はみられなかった. 後者は, *R. typhi* を含む 8 種類のリケッチア属菌の遺伝子増幅が確認され, *Fnu*HI による切断パターン解析により *R. japonica* を識別することが可能であった. また, 両検出法とも臨床検体に対する反応性も良好だったので, リケッチア感染症の迅速診断法として有用性は高いものと思われる.

Key words: リケッチア, オリエンチア, 診断法, PCR
Rickettsia, *Orientisa*, diagnostic assay, PCR

はじめに

つつが虫病 (病原体: *Orientia tsutsugamushi*) および日本紅斑熱 (病原体: *Rickettsia japonica*) の 2010 年の全国の届出数は, それぞれ, 406 例および 133 例であり, 4 類感染症 (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) の報告数では上位となっている. 国立感染症研究所が中心となって作成した診断マニュアルでは, つつが虫病については nested PCR³⁾が, 紅斑熱については single PCR および double PCR⁴⁾が遺伝子検出法として記載されており, 国内の公定法となっている.

つつが虫病と紅斑熱は, 症状 (発熱, 発疹, リンパ節腫脹など) が類似していることから, 両方の疾病を対象に検査を進める場合が多いので, これらの疾病を一度に短時間に診断できる real-time PCR 法は有用であると思

われる. また, 近年, 国内で *R. japonica* 以外の紅斑熱群リケッチア (SFGR) による感染症が確認されていることから¹⁾, *R. japonica* とその他の SFGR を識別できる PCR 系の開発が望まれている. 今回は, これらの需要を満たす *O. tsutsugamushi*, *R. japonica* およびその他の SFGR を識別できる multiplex real-time PCR 法の開発を試みた. また, SFGR に関しては, *R. japonica* 以外の SFGR も視野に入れ, PCR 増幅領域の塩基配列解析が必要となる場合が多いので, 検出感度が高く, 操作時間が短く, コンタミの危険性が少ない One-tube nested PCR 法の構築を試みた.

開発したこれらの PCR 法について, 特異性, 検出感度および臨床検体に対する反応性を評価したので報告する.

材料および方法

1 供試菌株および検体

R. japonica (YH 株), *R. asiatica*, *R. conorii*, *R. helvetica*, *R. honei*, *R. sibirica*, *R. tamurae*, *R. typhi* および *O. tsutsugamushi* 6 株 (血清型: Gilliam, Karp,

表 1 Multiplex real-time PCR および One-tube nested PCR の特異性

菌種 (血清型)	Multiplex real-time PCR の probe 種類			One-tube nested PCR
	<i>R. japonica</i>	その他 SFGR	<i>O. tsutsugamushi</i>	
<i>R. japonica</i>	+	-	-	+
<i>R. asiatica</i>	-	+	-	+
<i>R. conorii</i>	-	+	-	+
<i>R. helvetica</i>	-	+	-	+
<i>R. honei</i>	-	+	-	+
<i>R. sibirica</i>	-	+	-	+
<i>R. tamurae</i>	-	+	-	+
<i>R. typhi</i>	-	-	-	+
<i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam)	-	-	+	-
<i>O. tsutsugamushi</i> (Karp)	-	-	+	-
<i>O. tsutsugamushi</i> (Kato)	-	-	+	-
<i>O. tsutsugamushi</i> (Kawasaki)	-	-	+	-
<i>O. tsutsugamushi</i> (Kuroki)	-	-	+	-
<i>O. tsutsugamushi</i> (Shimokoshi)	-	-	+	-

Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi) を供試した. なお, これらの株は, L929 細胞で培養し, リケッチア感染細胞を DNA 抽出用検体とした.

臨床検体は, 間接蛍光抗体法でつつが虫病が確定された 5 症例, 日本紅斑熱が確定された 5 症例およびどちらの検査でも陰性となった 5 症例の感染初期の採取血液を PCR 用の検体とした.

リケッチア感染細胞および患者血液からの DNA 抽出には QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用い, 添付説明書に従って DNA 抽出を行った.

2 Multiplex real-time PCR

プライマーとプローブは, 我々が設計した SFGR の *gltA* 遺伝子の 82bp を増幅するプライマーセットとその増幅領域に設定した *R. japonica* 用 (FAM 標識) とその他の SFGR 用 (VIC 標識) のプローブならびに *O. tsutsugamushi* の 16S rRNA 遺伝子の 136bp を増幅するプライマーセットとその増幅領域に対応したプローブ (TAMRA 標識) を用いた. PCR 用試薬は, Premix EX Taq (タカラバイオ) を用い, 各プライマー 0.3 μM, 各プローブ 0.2 μM および DNA 抽出液 2.5 μl を加え, 総量 25 μl とした.

検出機器は, 7500 Real Time PCR System (アプライドバイオシステムズ) を用い, 95°C で 30 秒加熱後, 95°C 5 秒, 60°C 40 秒を 45 サイクル繰り返した.

3 One-tube nested PCR

我々が設計した SFGR の *rompB* 遺伝子の 646-661bp を増幅する 1st プライマーセットとその内側の 489-504bp を増幅する 2nd プライマーセットを用いた. PCR 用試薬は, KOD-Plus-Neo (東洋紡) を用い, 1st プライマー各 0.004 μM, 2nd プライマー各 0.4 μM および DNA 抽出液 2.5 μl

を加え, 総量 25 μl とした.

PCR 機器は, GeneAmp PCR System 5700 (アプライドバイオシステムズ) を用い, 94°C で 2 分加熱後, 98°C 10 秒, 68°C 40 秒を 30 サイクル繰り返した後, さらに, 98°C 10 秒, 58°C 20 秒, 68°C 30 秒を 30 サイクル実施した. アガロースゲル電気泳動で約 500bp 前後のバンドが確認された PCR 増幅産物について, *FnuA*HI (New England Biolabs) による制限酵素処理を行い, 切断パターンを比較した.

4 各検出系の特異性試験

Rickettsia 属菌 8 株および *O. tsutsugamushi* 6 株の DNA 抽出液をテンプレートとし, Multiplex real-time PCR と One-tube nested PCR を実施した.

5 各検出系の検出感度の比較試験

R. japonica と *O. tsutsugamushi* (Kawasaki 株) の DNA 抽出液について蒸留水で 10 倍段階希釈列を作製し, 各希釈の 2.5 μl を検体として, Multiplex real-time PCR と One-tube nested PCR を実施した. なお, リケッチア検査の公定法となっている *O. tsutsugamushi* 用の nested PCR³⁾ ならびに *R. japonica* 用と SFGR 用の double PCR⁴⁾ を併行して実施し, 感度を比較した.

6 臨床検体を対象とした各検出系による検査

リケッチア感染症 (疑い) 患者の 15 検体について, 今回開発した 2 種類の PCR 法とリケッチア検査の公定法となっている PCR 法を実施し, 結果を比較した.

結果

1 各検出系の特異性

Multiplex real-time PCR の各リケッチア株に対する反応性を調べたところ, *R. japonica* 用のプローブで増

幅が確認されたのは *R. japonica* のみ, その他の SFGR 用プローブに反応したのが *R. japonica* 以外の SFGR の 6 株であり, チフス群リケッチアの *R. typhi* はどちらのプローブにも反応しなかった (表 1). また, *O. tsutsugamushi* の 6 株は, いずれも *O. tsutsugamushi* 用のプローブで増幅が確認され, 他のプローブには反応しなかった.

One-tube nested PCR は, リケッチア 8 株 (*R. typhi* を含む) すべてで増幅が確認されたが, *O. tsutsugamushi* 株はすべて陰性であった (表 1). PCR 増幅産物について, *Fnu*4HI による切断パターンを比較したところ, *R. japonica* は他の 7 菌種と異なるパターンであることが確認された (図 1).

2 各検出系の検出感度

O. tsutsugamushi に対する Multiplex real-time PCR の検出感度は, 公定法の nested PCR と同等であった (表 2). また, *R. japonica* に対する検出感度は, Multiplex real-time PCR と one-tube nested PCR は同等の検出感度を有しており, 公定法の double PCR に比べ 10~100 倍検出感度が高かった (表 3).

3 臨床検体を対象とした各 PCR 法の検出結果

Multiplex real-time PCR は, つつが虫病症例の 5 検体は *O. tsutsugamushi* 用プローブのみに反応し, 日本紅斑熱患者検体は *R. japonica* 用プローブのみに反応した (表 4). つつが虫病と日本紅斑熱が血清学的に否定された患者検体は, すべて陰性であった.

One-tube nested PCR では, 血清学的に日本紅斑熱が確定された患者血液 5 検体のみが陽性となり, *Fnu*4HI による切断パターンは *R. japonica* と一致した.

公定法も併行して行ったが, *O. tsutsugamushi* 用 nested PCR では, つつが虫病患者 5 検体すべてが陽性となった. しかし, SFGR 検出用 double PCR では日本紅斑

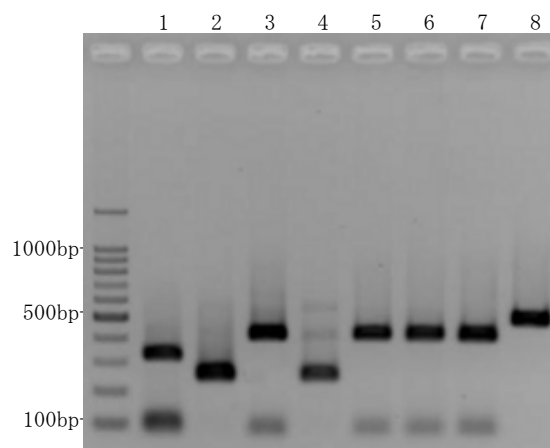


図1 One-tube nested PCR増幅産物の *Fnu*4HI切断パターン
1: *R. japonica*, 2: *R. asiatica*, 3: *R. conorii*
4: *R. helvetica*, 5: *R. honei*, 6: *R. sibirica*
7: *R. tamurae*, 8: *R. typhi*

熱患者 1 検体のみが陽性となり, *R. japonica* 検出用 double PCR はすべて陰性であった.

考 察

複数の菌種を検出する Multiplex real-time PCR は, 様々な病原微生物について報告されているが, リケッチア感染症関連では, アナプラズマとライム病ボレリアを検出する系²⁾, *O. tsutsugamushi* とリケッチア属菌を検出する系⁸⁾, *O. tsutsugamushi* と SFGR を検出する系⁶⁾などが報告されている. これらの PCR 系はいずれも迅速診断法としては, 優れているが, 国内で 4 類感染症に指定されている日本紅斑熱の病原体 (*R. japonica*) を特定することはできない. したがって, 今回開発した Multiplex real-time PCR は, *R. japonica* を短時間で識別できる検出法として, 感染症対策行政上

表 2 *O. tsutsugamushi* 検出用 PCR の検出感度

PCR の種類	<i>O. tsutsugamushi</i> (kawasaki 株) の希釈倍数						
	原液	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Multiplex real-time PCR	+	+	+	+	+	-	-
<i>O. tsutsugamushi</i> 用 nested PCR (公定法)	+	+	+	+	+	-	-

表 3 紅斑熱群リケッチア検出用 PCR の検出感度

PCR の種類	<i>R. japonica</i> の希釈倍数						
	原液	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Multiplex real-time PCR	+	+	+	+	+	+	-
One-tube nested PCR	+	+	+	+	+	+	-
SFGR 用 double PCR (公定法)	+	+	+	+	+	-	-
<i>R. japonica</i> 用 double PCR (公定法)	+	+	+	+	-	-	-

表4 各PCR法の臨床検体に対する検査結果

患者 No.	血清診断 結果	Multiplex real-time PCR	One-tube nested PCR	<i>O. tsutsugamushi</i> 用 Nested PCR*	SFGR 用 double PCR*	<i>R. japonica</i> 用 double PCR*
8014	日本紅斑熱	<i>R. japonica</i> 陽性	+	NT**	+	-
8019	日本紅斑熱	<i>R. japonica</i> 陽性	+	NT	-	-
8020	日本紅斑熱	<i>R. japonica</i> 陽性	+	NT	-	-
8023	日本紅斑熱	<i>R. japonica</i> 陽性	+	NT	-	-
8026	日本紅斑熱	<i>R. japonica</i> 陽性	+	NT	-	-
8054	つつが虫病	<i>O. tsutsugamushi</i> 陽性	-	+	NT	NT
8055	つつが虫病	<i>O. tsutsugamushi</i> 陽性	-	+	NT	NT
8066	つつが虫病	<i>O. tsutsugamushi</i> 陽性	-	+	NT	NT
8079	つつが虫病	<i>O. tsutsugamushi</i> 陽性	-	+	NT	NT
8081	つつが虫病	<i>O. tsutsugamushi</i> 陽性	-	+	NT	NT
8032	陰性	-	-	NT	NT	NT
8052	陰性	-	-	NT	NT	NT
8073	陰性	-	-	NT	NT	NT
8074	陰性	-	-	NT	NT	NT
8080	陰性	-	-	NT	NT	NT

*: 公定法, **: 検査せず

の有用性は大きいものと思われる。

1本のチューブ内で nested PCR を行う方法は、数種類の病原微生物の検出に応用されているが^{5, 7, 9)}、リケッチア属菌の検出法に関する報告は見当たらない。今回試作した One-tube nested PCR は、1st と 2nd プライマー間で Tm 値に大きな差を設け、1 回目の PCR 時（高いアニーリング温度）に 2nd プライマーを反応させない方法を採用し、高感度で非特異反応の少ない PCR 法を実現させた。通常の nested PCR に比べコンタミの危険性が少なく、操作時間も single PCR とあまり変わらないので、real-time PCR が使えない状況や、SFGR の塩基配列を比較する必要があるときは、有用な方法であると考えられる。

今回作製した 2 種類の PCR 法は、いずれも臨床検体を用いた診断結果も良好であったので、今後、リケッチア感染症の迅速診断法として、活用されていくことが期待される。

文献

- 1) Ando, S. et al.: Human *Rickettsia heilongjiangensis* infection, Japan. Emerg. Infect. Dis., **16**, 1307-1308 (2010)
- 2) Courtney, J. W. et al.: Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*, J. Clin. Microbiol., **42**, 3164-3168 (2004)
- 3) Furuya, Y. et al.: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction, J. Clin. Microbiol., **31**, 1637-1640 (1993)
- 4) Furuya, Y. et al.: Specific amplification of *Rickettsia japonica* DNA from clinical specimens by PCR, J. Clin. Microbiol., **33**, 487-489 (1995)
- 5) Gookin, J. L. et al.: Single-tube nested PCR for detection of *Trichomonas foetus* in feline feces, J. Clin. Microbiol., **40**, 4126-4130 (2002)
- 6) 川森文彦他: Multiplex リアルタイム PCR による「つつが虫病」および「紅斑熱」の迅速診断, 感染症誌, **84**, 678 (2010)
- 7) Mathis, A. et al.: Simplified sample processing combined with a sensitive one-tube nested PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens, J. Clin. Microbiol., **35**, 1691-1695 (1997)
- 8) Paris, D. H. et al.: Real-time multiplex PCR assay for detection and differentiation of rickettsiae and orientiae, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **102**, 186-193 (2008)
- 9) Pujol-rique, M. et al.: Design of a hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods, J. Med. Microbiol., **48**, 857-862 (1999)

自然毒等の有害性化学物質の迅速分析法に関する研究

医薬食品部 医薬班 宮本憲吾, 内田恭之, 上村慎子,

渡辺陽子, 前田有美恵, 坂根弓子

Study on Rapid Analysis of Noxious Chemical Substances such as the Natural Poison

Kengo MIYAMOTO, Takayuki UCHIDA, Mitsuko KAMIMURA,
Yoko WATANABE, Yumie MAEDA and Yumiko SAKANE

突発的に発生する有害性化学物質による健康被害に際し, その原因物質を把握するためには, 有害性化学物質の迅速分析法を確立しておく必要がある. 本研究においては, 自然毒, 特にアルカロイド類を中心とした植物性自然毒についてLC/MSによるスクリーニング試験法を検討した. この結果, 当研究所で確立した健康食品中の医薬品成分のスクリーニング法の分析条件が活用できることが明らかになった. また, 逆相-陽イオン交換ミックスモードの固相抽出法による前処理はスクリーニング試験として十分な回収率が得られた. 本法は非常に簡便な方法であり, 健康被害発生時の迅速な対応が可能であると考えられる.

Key words: LC/MS, 植物性自然毒, 固相抽出, 健康危機管理

LC/MS, phytotoxin, solid-phase extraction, health risk management

はじめに

厚生労働省健康危機管理基本指針¹⁾によれば, 健康危機管理とは「医薬品, 食中毒, 感染症, 飲料水その他何らかの原因により生じる国民の生命, 健康の安全を脅かす事態に対して行われる健康被害の発生予防, 拡大防止, 治療等に関する業務」を指し, 厚生労働省設置の地域保健対策検討会で取りまとめた中間報告(2005年5月)²⁾では地方衛生研究所には, 「地域における健康危機管理に対応する機関として, 保健所等の職員に対する専門研修の実施という重要な役割を再確認するとともに, 従来の機能(試験検査, 調査研究, 研修指導等)に加え, 新たに, 地域及び広域における健康危機管理の科学的・技術的中核としての機能を保持すること」が求められている. 昨今, いわゆる健康食品から医薬品成分が検出される事例や, 化学物質による食品の汚染が散見されており, これらによる健康被害も報告されている^{3, 4)}. 県内で健康被害が発生した場合には環境衛生科学研究所は中核の検査機関となる. 突発的に発生する有害性化学物質による

健康被害に際し, その原因物質を把握するためには, 有害性化学物質の迅速分析法を確立しておく必要がある.

当研究所におけるこれまでの研究で, 無機化学物質や医薬品成分等について分析法を検討し, 検査体制の整備を行ってきた⁵⁻⁷⁾. 一方, 自然毒等の有害性化学物質に関しては体系的な分析法の整備がまだなされていない. 自然毒による健康被害は, 発生件数としては頻発するものではないが, 重篤な症状を呈することが多く, 健康被害発生時には迅速な原因物質の究明が求められる. そこで, 本研究においては, 当研究所であまり検討されていなかった自然毒等, 特にアルカロイド類を中心とした有害性化学物質に関して迅速分析法を検討し, 検査体制を整備することとした.

方法

1 標準品および試薬

アコニチン, ゲルセミンおよびソラニン は Sigma-Aldrich 製試薬, ベラトラミンは Toronto Research Chemicals 製試薬, カフェインは関東化学製試薬, リコリン塩酸塩はフナコシ製試薬, アトロピン硫酸塩, ジギトキシンおよびジゴキシンはレギュラトリーサイエンス財団製試薬, コニイン, コルヒチン, スコポラミン臭化水素酸 n 水和物およびストリキニーネ硝酸塩は和光純薬

工業製試薬を用いた。

各標準品は、メタノールに溶解して 0.2mg/mL の溶液を調製し、標準原液とした。

その他の試薬は特級以上のものを使用した。

2 LC/MS 装置および分析条件

装置：Waters Quattro Micro API (Waters)

カラム：Atlantis dC18(2.1mm i.d. × 150mm, 3 μm) (Waters)

移動相：A液 10mmol/L ギ酸アンモニウム(pH3.5)

B液 アセトニトリル

グラジエント条件(B%)：0 min(2.5%)→15 min(40%)→25 min(70%)→27 min(90%)→27.5 min(2.5%)→40 min(2.5%)

流量：0.2mL/min

カラム温度：40°C

注入量：10 μL

イオン化法：ESI+

測定モード：SCAN (測定範囲 m/z=100~900) および SIM

3 ESI-MS 分析

標準原液を 10mmol/L ギ酸アンモニウム/アセトニトリル(1:1)混液で希釈して 1 μg/mL の溶液を調製した。この液をフローインジェクション法により MS へ導入し、イオン化条件の最適化を行った。

4 添加回収試験

模擬試料への添加回収試験は、試料 1mL あたり各成分 1 μg を添加し、図 1 に示した前処理を行い LC/MS で分析した。固相抽出カラムは Waters 社の Oasis MCX 3cc(60mg) Extraction Cartridge を用いた。

結果および考察

1 一斉分析条件の検討

検討対象成分は、厚生労働省に報告される食中毒事件より、植物性自然毒を原因物質としているものを抽出し、その毒性成分を検索して、最終的に試薬として購入可能であった 13 成分とした。

1) イオン化条件の検討

LC/MS による分析条件を決定するために、フローインジェクション法によるイオン化条件の最適化を検討した。ジゴキシンおよびジギトキシンはプロトン付加分子イオン ($[M+H]^+$) がほとんど検出されず、m/z 値が分子量より 18 大きいイオンが最も高感度で得られた。これは移動相に含まれるギ酸アンモニウム由来のアンモニウムイオン付加体 ($[M+NH_4]^+$) であると考えられた⁸⁾。ESI ネガ

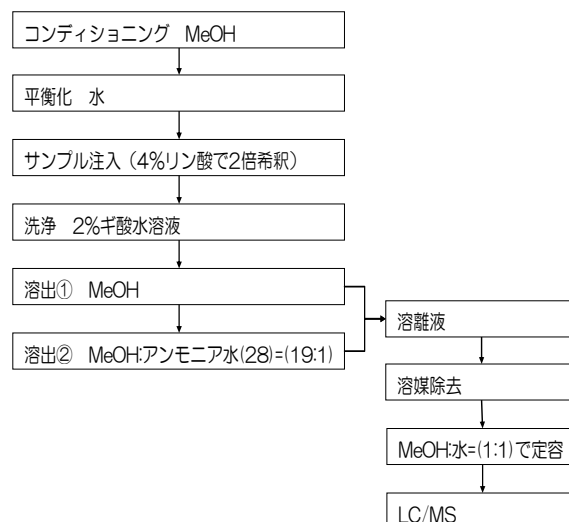


図1 固相抽出による前処理プロトコル

ティブモードで測定すると、脱プロトン化分子イオン ($[M-H]^-$) が検出されるが、 $[M+NH_4]^+$ のイオンと比較すると感度が約 10 倍低かった。このため、モニターイオンとして $[M+NH_4]^+$ を選択した (ジゴキシンは 798.4, ジギトキシンは 782.4)。なお、 $[M+NH_4]^+ / [M+H]^+$ (面積比) はジゴキシンが約 85%, ジギトキシンが約 98% であり、後述する濃度域でこの比率はほとんど変化しなかった。

その他の 11 成分は $[M+H]^+$ が高感度に検出されたため、このイオンをモニターイオンとした。

また、検討対象である 13 成分以外の成分の検出も考慮して SIM に加えて SCAN による測定を併用することとし、各成分のコーン電圧を 20V, 40V および 60V の 3 条件にグルーピングした (表1)。

2) HPLC 条件の検討

近年、いわゆる健康食品から医薬品成分が検出される事例や違法ドラッグから麻薬や指定薬物が検出される事例が頻発していることから、当研究所では約 90 成分の医薬品成分や指定薬物の LC/MS による一斉分析法を開発し、行政検査に使用している^{6,7)}。この方法は広範囲の成分をカバーするように設計されているため、今回対象とする 13 成分にも適用可能であるか検討した。

13 成分の混合標準液 (各 1 μg/mL) を分析したところ、各成分とも単独で分析した場合と同様の保持時間に良好なピークが検出され、この HPLC 条件が適用可能であると考えられた。また、他成分による妨害は確認されなかった。

この分析条件で標準品による直線性の確認を行ったところ、各成分とも注入量で 0.08~10ng の範囲において相関係数 0.99 以上と良好な直線性が得られた。

表1 LC/MS 分析条件

成分	分子式	分子量	保持時間 (min)	至適イオン化条件		モニターイオン m/z		SCAN cone(V)
				cone(V)	collision(eV)	precaser	product	
aconitine	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁	645.3	24.2	58	32	646.3	586.4	60
atropine	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	289.2	15.1	38	22	290.2	124.2	40
caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.1	13.2	36	18	195.2	138.1	40
colchicine	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	399.2	20.1	42	24	400.1	358.2	40
coniine	C ₈ H ₁₇ N	127.1	11.5	30	16	128.2	69.0	20
digitoxin	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	764.4	27.6	20	14	782.4	635.4	20
digoxin	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄	780.4	22.3	20	14	798.4	651.4	20
gelsemine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.2	13.9	42	26	323.2	236.2	40
lycorine	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287.1	8.4	38	28	288.1	147.1	40
scopolamine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303.1	13.1	32	22	304.1	156.1	20
solanine	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅	867.5	20.4	90	60	868.4	772.5	60
strychnine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	334.2	14.9	56	40	335.2	184.2	60
veratramine	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂	409.3	21.6	44	28	410.3	295.3	40

2 前処理法の検討

1) 固相抽出法の検討

前処理法には簡便な方法が望ましく、また、植物性自然毒の多くはアルカロイドであるため（今回対象とした成分は強心配糖体 2 種、アルカロイド 11 種）、塩基性化合物の選択的抽出に適する「逆相-陽イオン交換ミックスモード」の固相抽出法について検討した。Waters 社が示している標準的なプロトコルでは溶離液として 1 段目にメタノール、2 段目にアンモニア塩基性メタノールを使用することで、各分画に弱酸性化合物、塩基性化合物がそれぞれ溶出される。そこで、今回検討する成分がどちらの分画に溶出するか確認した。ジゴキシンおよびジゴキシンは 1 段目の分画に、カフェインおよびコルヒチンは両方の分画に、その他の成分は 2 段目の分画にそれぞれ溶出していた（表2）。このため、溶離液は両方を用い、各分画を合わせて後の操作を行うこととした。

2) 添加回収試験

食中毒事故事例を検索したところ、有毒植物を味噌汁にして誤食している事例が散見されたことから、模擬試料としてレトルトの汁物製品 2 種を選択した。製品に記載されている調理方法に従って調理した後、試料 1mL 当たり各成分 1 μ g を添加し、固相抽出による前処理を行い LC/MS で測定した。回収率は全成分で 69~123%であり、スクリーニング試験として問題ないレベルであると考えられた（表3）。

また、マトリックスによる測定の妨害について確認するため、模擬試料単独で前処理を行い、溶媒留去した後の残渣に混合標準液を加えて LC/MS で測定したが、特に妨害は確認されなかった。

3) 本法の検出感度の検証

このスクリーニング試験における検出感度について、今回検討した成分で最も中毒性が高いアコニチンを例にとって検証した。アコニチンはトリカブトに含有される中毒成分であり、トリカブト葉 1g の摂取で重篤な中毒例が報告されている⁹⁾。葉のアコニチン含量は 0.2~1.2%とされることから、最小量 0.2%として算出した 2mg がコップ 1 杯(200mL)中に含有するものを摂取したと想定した場合、前処理の回収率約 90%を考慮してアコニチン 90ng を測定することになる。アコニチン標準品 0.016ng 測定時の S/N 比は 56 であり、また 13 成分の中で最も感度の低かったジゴキシンでは標準品 0.4ng 測

表2 Oasis MCX による各分画の溶出割合

成分名	溶出割合 (%)	
	1 段目	2 段目
aconitine	0	100
atropine	0	100
caffeine	90	10
colchicine	78	22
coniine	0	100
digitoxin	99	1
digoxin	99	1
gelsemine	0	100
lycorine	0	100
scopolamine	0	100
solanine	0	100
strychnine	0	100
veratramine	0	100

表3 添加回収試験結果

成分名	回収率(%)	
	検体 A	検体 B
aconitine	89.8±3.4	94.2±0.7
atropine	89.9±2.2	94.2±0.8
caffeine	85.0±2.4	88.9±1.3
colchicine	93.2±1.6	91.3±1.4
coniine	85.9±8.7	89.7±0.1
digitoxin	72.8±7.9	69.0±0.8
digoxin	79.5±3.4	73.3±1.7
gelsemine	80.6±6.9	90.7±1.3
lycorine	103.4±3.5	123.4±2.0
scopolamine	89.3±2.9	90.7±0.9
solanine	88.4±3.5	92.4±1.5
strychnine	81.7±5.6	90.9±1.3
veratramine	87.5±1.9	91.9±2.2

n=3 (平均値±標準偏差)

定時の S/N 比は 5 であった。これらは一般的に検出限界とされる 3 を超えており、スクリーニング試験として十分な感度を有していると考えられた。

今回は汁物の前処理法について検討を行ったが、誤食での調理法には、汁物の他、揚げ物、炒め物、お浸し等がみられるため、前処理法には更なる検討が必要である。

また、近年インターネット等により入手が容易となっている生薬やハーブ等の中に健康被害の発生が懸念される植物由来成分が含有されていることがある（アトロピン、ストリキニーネ等）¹⁰⁾。そのため、今回の自然毒の検討内容は、いわゆる健康食品のスクリーニング試験にも利用が可能であると考えられる。

まとめ

1 自然毒 13 成分について LC/MS による一斉分析法を確立した。

2 逆相-陽イオン交換ミックスモードの固相抽出法について添加回収試験を行ったところ、69~123%の回収率であり、検出感度を考慮すると、今回検討した方法は、スクリーニング試験として十分な能力を有していると考えられた。

文献

1) 厚生労働省ホームページ：厚生労働省健康危機管理基本指針, <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/kenkou/sisin/index.html>

- 2) 厚生労働省ホームページ：地域保健対策検討会中間報告, <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/05/d1/s0523-4b.pdf>
- 3) 厚生労働省ホームページ：健康被害情報・無承認無許可医薬品情報, <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyouinin.html>
- 4) 独立行政法人国立健康・栄養研究所「健康食品」の安全性・有効性情報ホームページ：被害関連情報, <https://hfnet.nih.go.jp/contents/index1.html>
- 5) 栗田浩幸他：蛍光X線分析装置による有害金属迅速分析法, 静岡県環境衛生科学研究所報告, **50**, 29-32 (2007)
- 6) 栗田浩幸他：いわゆる健康食品中の医薬品成分の LC/MS による迅速分析, 静岡県環境衛生科学研究所報告, **49**, 31-35 (2006)
- 7) 栗田浩幸他：いわゆる健康食品中の医薬品成分の LC/MS による迅速分析 (第 2 報), 静岡県環境衛生科学研究所報告, **51**, 21-25 (2008)
- 8) EL Øiestad. Et al.: Determination of Digoxin and Digitoxin in Whole Blood, *J. Anal. Toxicol.*, **33**, 372-378 (2009)
- 9) 財団法人日本中毒情報センターホームページ：中毒情報データベース, <http://www.j-poison-ic.or.jp/homepage.nsf>
- 10) 高橋市長他：HPLC/PDA によるいわゆる健康食品中の植物性自然毒スクリーニング分析法について, 千葉県衛研年報, **59**, 74-78 (2010)

医薬品の溶出性の安定性に関する研究 —PTP 包装医薬品の加湿保存による変化—

医薬食品部 医薬班 上村慎子, 渥美加代子, 内田恭之,
宮本憲吾, 渡辺陽子, 前田有美恵,
坂根弓子

Study on Stability of Dissolution of Drugs during Storage
- Changes in Dissolution Profile of Drugs of Press
through Pack during Storage under Humid Condition -

Mitsuko KAMIMURA, Kayoko ATSUMI, Takayuki UCHIDA,
Kengo MIYAMOTO, Yoko WATANABE, Yumie MAEDA
and Yumiko SAKANE

ノルフロキサシン錠 (100mg) の 5 銘柄について PTP 包装の状態での保存したところ、湿度の影響により 4 銘柄の溶出性が変化した。銘柄により溶出が遅れるものと早まるものがあり、湿度の影響の受け方に銘柄間の差があることが明らかとなった。また、チャック付袋に乾燥剤を同封して保存することで、簡便に湿度の影響を軽減することができ、医薬品が使用されるまでの品質を確保するためには、この保存方法が有効であると考えられた。

Key words: 溶出性, 保存安定性, 高湿度, PTP 包装, ノルフロキサシン
dissolution, stability for storage, humid condition, press through pack, norfloxacin

はじめに

医薬品の溶出性は、生物学的同等性に関する重要な情報を与える¹⁾ことから、有効性を保証する品質項目の一つとして、医薬品が使用されるまで安定に確保される必要があると考えられる。しかし、溶出性は経時的に変化する場合があり、有効期限内に品質規格を満たさなくなり、回収される事例も見られる²⁾。また、薬局や家庭では、PTP 包装 (ブリスター包装) の状態で保存される場合もあり、品質の変化が懸念される。そこで、PTP 包装での保存による溶出性の変化を調査し、医薬品が使用されるまで品質を確保するための対策について検討した。

方法

1 試料および試薬・試液

1) 試験製剤

静岡県環境衛生科学研究所
(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)
Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

ノルフロキサシン錠 (100mg) の先発品 1 銘柄および後発品 4 銘柄の計 5 銘柄各 1 ロット (A~E) を試験製剤とした。

2) 保存用包装資材

チャック付袋は、PE (ポリエチレン) 単層製 (株生産日本社製ユニパック D-8) およびアルミ多層 (PET: ポリエチレンテレフタレート/AL: アルミニウム/PE: ポリエチレン) 製 (株生産日本社製ラミジップ AL-10) の 2 種類を使用し、乾燥剤は 3g 入り粒状シリカゲル (株鳥繁産業製) を使用した。

3) 試薬および試液

ノルフロキサシン標準品は生化学用 (和光純薬工業株製) を用いた。標準品をそれぞれの試験液に溶かし、標準溶液とした。

試験液は以下の試液を使用した。

- pH1.2: 日本薬局方³⁾ 溶出試験第 1 液
- pH4.0: 0.05mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液
- pH6.8: 日本薬局方溶出試験第 2 液
- 水: イオン交換水

2 装置および条件

1) 溶出試験

溶出試験器は、全自動溶出試験装置 RT-3 (株大日本精機製) を使用し、分光光度計は、UV-1600 (株島津製作所製) を使用した。

日本薬局方および日本薬局方外医薬品規格第三部⁴⁾ (以下、局外規) の試験方法に準じて実施した。45°Cで2時間保温して脱気した試験液 900mL を用い、パドル法 (50rpm) で行った。測定時間は、pH1.2 および 4.0 では、5, 10, 15, 30, 45 分とし、pH6.8 および水では、5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 分とした。ディスクフィルターモードで溶出液を循環させ、吸光度測定法 (測定波長: 272nm, 層長: 1mm) により溶出率を算出した。

溶出挙動の類似性の判定は、「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」¹⁾ の判定基準に従い、平均溶出率の差または f 2 関数の値を比較した。

2) 安定性試験

安定性試験器は、LH33-12P および LH21-11M (ナガノサイエンス株製) を使用し、温度 30°C, 湿度 80% の定値運転とした。

結果と考察

1 試験剤の溶出挙動

各試験剤について、4 試験液における溶出曲線を作成した。図1に先発品の4試験液での溶出曲線を示した。後発品 4 銘柄について先発品との類似性の判定を行ったところ、pH6.8 および水での溶出挙動は、すべての銘柄で先発品の溶出挙動と「類似である」と判定された。pH1.2 および pH4.0 では、2 銘柄が「類似」であり、2 銘柄が「類似でない」と判定された。局外規の溶出規格 (pH6.8, 60分 80%以上) にはすべての銘柄が適合した。

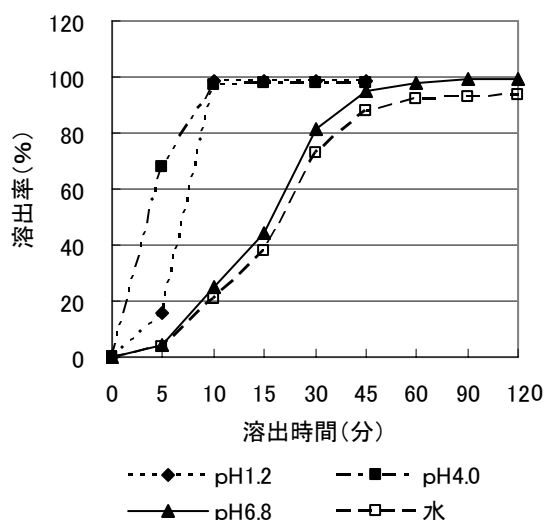


図1 ノルフロキサシン錠先発品の4試験液での溶出挙動

表1 保存による溶出挙動の変化

試験液	保存前	8週間後
pH1.2	—	1 銘柄が変化
pH4.0	—	2 銘柄が変化(低下)
pH6.8	—	4 銘柄が変化
水	—	(3 銘柄低下, 1 銘柄上昇)
局外規	すべて適合	3 銘柄不適合

変化なし: 溶出挙動が保存前と類似である
変化: 溶出挙動が保存前と類似でない

2 保存による溶出挙動の変化

事前調査において、ノルフロキサシン錠は、高湿度条件で溶出性が変化したことから、保存条件は、静岡県内の梅雨期から夏期の気候⁵⁾ を想定した条件とした。

各試験剤を市場に流通している状態の最終包装形態ではなく、PTP 包装のみの状態で保存した後、溶出挙動をそれぞれの保存前と比較した。溶出挙動の類似性を評価し、「類似でない」と判定された場合に「溶出性が変化した」とみなした。結果の概要を表1に示した。pH6.8 および水では、8週間後に溶出性が変化したが、先発品を含め4銘柄あった。そのうち、保存前よりも溶出性が低下したものが先発品を含め3銘柄、上昇したものが1銘柄あった。局外規の溶出規格については、8週間後に先発品を含めて3銘柄が規格に適合しなかった。pH1.2では、8週間後に1銘柄の溶出性が変化したが、その変化は、全体として上昇とも低下とも分類できなかった。pH4.0では、8週間後に先発品を含め2銘柄の溶出性が変化し、保存前より低下した。

8週間保存後の各試験剤の pH6.8 における溶出曲線を図2に示した。

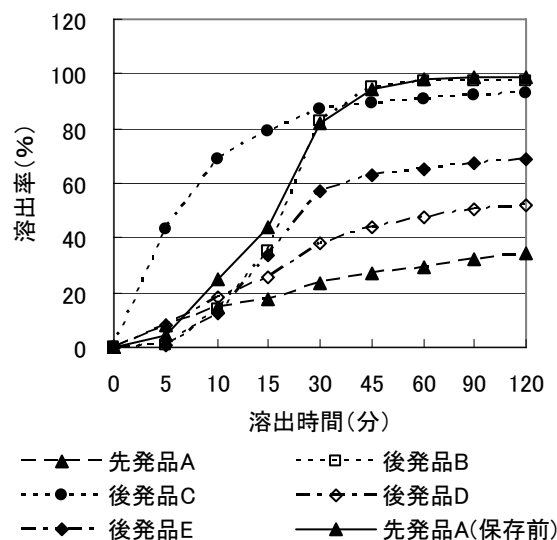


図2 ノルフロキサシン錠の溶出試験第2液 (pH6.8) での溶出挙動 (保存条件: 30°C, 80%RH, 8週間)

3 保存形態の検討

先発品について、2種類の材質のチャック付袋のそれぞれに乾燥剤の有無を組み合わせ保存し、溶出挙動を保存前と比較した結果の概要を表2に示した。乾燥剤を同封して4週間保存した場合には、いずれのチャック付袋でも、すべての試験液で変化しなかった。一方、乾燥剤を同封しないPE単層製の袋で保存した場合は、2週間後にpH6.8、4週間後に水の溶出性が変化した。また、4週間後には局外規の規格を満たさなかった。pH1.2およびpH4.0では、4週間後まで変化がなかった。乾燥剤を同封しないアルミ多層製の袋では、4週間後に、pH6.8の溶出挙動が変化し、pH1.2、pH4.0および水では変化がなかった。4週間保存後のpH6.8での溶出曲線を図3

表2 チャック付袋での保存による溶出挙動の変化

試験液	乾燥剤を同封		乾燥剤を同封せず	
	PE単層	アルミ多層	PE単層	アルミ多層
pH1.2	変化なし		変化なし	
pH4.0	変化なし		変化なし	
pH6.8	変化なし		2週間後変化	4週間後変化
水	変化なし		4週間後変化	変化なし
局外規	適合		4週間後 不適合	適合

変化なし：溶出挙動が保存前と類似である
 変化：溶出挙動が保存前と類似でない

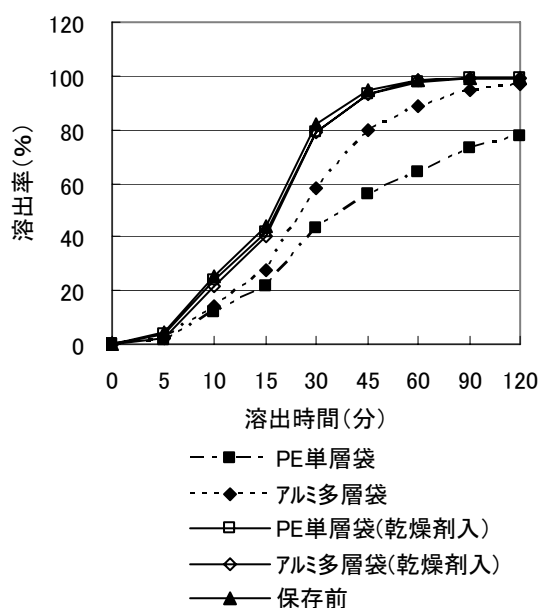


図3 チャック付袋で保存後のノルフロキサシン錠の溶出試験第2液 (pH6.8) での溶出挙動 (保存条件：30℃, 80%RH, 4週間)

に示した。なお、先発品をチャック付袋に入れずに、PTP包装のみで4週間保存した場合、pH4.0、pH6.8および水で溶出性が変化した。

シリカゲルのインジケーターは、吸湿するに従って青色から赤色に変化するが、4週間後のインジケーターの色は、アルミ多層製の袋のものは青色がやや薄くなっており、PE単層製の袋のものは淡赤色に変化していた。このことから、チャック付袋では完全に水蒸気を遮断することはできず、また、その材質等によって水蒸気の透過性が異なったが、今回検討した保存条件および保存期間では、乾燥剤の効果により、溶出性の変化を減少させることができたと考えられる。

なお、加湿下で保存した試験剤の外観は、質感が若干変化したものの、使用時に品質の変化を見分けることは困難と思われた。

まとめ

ノルフロキサシン錠は、高湿度下で保存すると、水和物を生成して溶出性が低下することが知られている⁶⁾。今回の検討で、保存による溶出性の変化が銘柄によって異なることが明らかとなり、原料、製造方法、PTP包装等の違いによって湿度の影響の受け方が異なることが考えられた。また、これらの影響は、PTP包装ごと乾燥剤を同封して保存することで軽減することが可能であった。従って医薬品が使用されるまでの品質を確保するためには、この保存方法が有効であると考えられた。

今回得られた結果をもとに、医薬品が使用されるまでの品質の安定性の確保に役立つ情報を病院や薬局へ提供していきたい。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知：後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について、平成24年2月29日、薬食審査発0229第10号
- 2) (独)医薬品医療機器総合機構ホームページ医薬品等の回収に関する情報、
<http://www.info.pmda.go.jp/kaisyuu/menu.html>
- 3) 厚生労働省：第十六改正日本薬局方、平成23年3月24日付厚生労働省告示第65号
- 4) 厚生労働省医薬局：日本薬局方外医薬品規格第三部(一部改正)、平成13年7月3日付医薬発第719号
- 5) 静岡地方気象台ホームページ静岡県の平年値、
<http://www.jma-net.go.jp/shizuoka/heinen.html>
- 6) 四方田千佳子：経口固形剤の品質をめぐる諸問題、
医薬品研究, 38, 195-213 (2007)

加工食品中の脂肪酸に関する調査 —冷凍食品や菓子類等のトランス脂肪酸および必須脂肪酸—

医薬食品部 食品班 横山玲子, 小林千恵, 相曾いずみ*

坂根弓子

静岡県立大学 食品栄養科学部 井上広子, 桑野稔子

Study on Fatty Acids in Processed Food

—Trans Fatty Acid and Essential Fatty Acid in Cooked Frozen Foods and Baked Food Products—

Reiko YOKOYAMA, Chie KOBAYASHI, Izumi AISO,
Hiroko INOUE, Toshiko KUWANO and Yumiko SAKANE

身近な加工食品のうち、若者に人気が高い冷凍食品、レトルト食品および菓子類について、トランス脂肪酸、必須脂肪酸等の脂肪酸に関する調査を行った。また、大学生を対象として、秤量法による食物摂取状況調査を実施し、青年期の脂質やトランス脂肪酸等の摂取状況を算出した。

その結果、食品 100 g 当たりの総トランス脂肪酸含有量は 0.02~1.50g であり、パイやクッキーなど菓子類における含有量が高かった。WHO/FAO 合同専門家会合では、生活習慣病の予防のための目標値を公表しており、トランス脂肪酸については「一日当たりの総エネルギー摂取量の 1%未満」としている。一日 2,000kcal を摂取する人が、今回調査した加工食品を 100g 喫食した場合、この目標値を上回ることにはなかった。しかし、大学生を対象とした食物摂取状況調査では、目標値 1%を超えるトランス脂肪酸を摂取した可能性のある学生が認められ、脂肪エネルギー比率が 30%を超えた学生もあったことから、トランス脂肪酸を含む脂質の適切な摂取に関する注意喚起が必要と考えられた。

Key words: トランス脂肪酸, 必須脂肪酸, 加工食品, 食物摂取状況調査

trans fatty acid, essential fatty acid, processed food, food intake survey

はじめに

日本人の食生活は、流通や加工技術の進化、生活形態や外食産業の発達など社会情勢の変化に伴い、穀物中心であった従来の日本型食生活から、欧米化、多様化してきている。その結果、従来の食生活とは異なる種類や量の食品を摂取できる機会が増え、米の消費が減少し畜産物や油脂の消費が増加するなど、食生活に大きな変化が生じてきて

いる。また、これら食品中の脂質にはトランス脂肪酸が含まれることがあり、口溶けを良くするなどの食感を改善する効果が期待される¹⁾。

トランス脂肪酸は、油脂の加工や精製などの段階で生じるほか、反芻動物の乳や脂肪にも含まれ^{1,2)}、さらにはこれらを原材料として製造された加工食品にも含まれている²⁾。「食事、栄養及び慢性疾患予防に関する WHO/FAO 合同専門家会合」では、生活習慣病の予防のための目標値を盛り込んだ報告書を 2003 年に公表した³⁾。この中で、その摂取量を「一日当たりの総エネルギー摂取量の 1%未満」とすることを目標値に掲げている。また海外における大規模コホート研究によると、トランス脂肪酸の摂取は、心血管系疾患のリスク増加につながる可能性があるとし

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

* : 静岡県中部健康福祉センター

ている⁴⁾。

世界の国々の中には、トランス脂肪酸摂取量を制限するために食品中の含有量の表示や摂取量の上限值を設定している国がある⁵⁾。一方日本においては、平成23年2月、消費者庁が「トランス脂肪酸の情報開示に関する指針」⁶⁾を発表しており、トランス脂肪酸に関する消費者の関心は、さらに高まっていくことが考えられる。

そこで今回、静岡県内に流通する加工食品について、脂質や脂肪酸等の含有量の実態を把握するため、調査を行った。また大学生を対象として秤量法による食物摂取状況調査を行い、青年期における脂質摂取量およびトランス脂肪酸摂取量を調査したので報告する。

調査対象および方法

1 調査対象

1) 調査対象食品

「子どもの食生活データ総論」⁷⁾において、若者に人気が高いとされている調理加工食品および菓子類について、静岡市内の店頭で購入したものを調査対象食品とした。その内訳は、冷凍食品6種類（から揚げ4銘柄、ギョウザ4銘柄、ハンバーグ等4銘柄、グラタン5銘柄、チャーハン4銘柄、フライドポテト2銘柄）、カレー5銘柄、ピザ1銘柄、即席焼きそば1銘柄、ケーキ3銘柄、パイ3銘柄およびクッキー4銘柄の合計40銘柄である。

2) 食物摂取状況調査の対象者

静岡県内にあるS大学に通学する学生のうち、本研究について説明した後同意を得た32人（平均年齢20.6±0.7歳、女子31人、男子1人）を対象とした。なお、調査に当たっては、S大学研究倫理委員会の承認を得て行った。

2 試薬および標準品

- 1) トリフェニルエチレン：Alfa Aesar 社製
- 2) パルミチン酸メチルエステル、脂肪酸メチルエステル混合標準液：NU-CHECK-PREP, Inc 社製
- 3) trans-6-Petroselaidic Methyl Ester, trans-9-Elaidic Methyl Ester, trans-11-Vaccenic Methyl Ester, Linoleic Methyl Ester isomer Mix：SUPELCO 社製
- 4) 三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液：和光純薬社製
- 5) その他の試薬：特級またはそれ以上のもの

3 方法

1) 試料の調製

冷凍食品等の調理加工食品については、検体を外袋の「作り方」に従って調理したのち、フードカッタ

ーで細切り、均一化したものを試料とした。菓子類については、検体をフードカッターで細切して均一化したものを試料とした。

2) 脂質の抽出

脂質の抽出は、Folch法⁸⁾に準じて行った。試料約5gを正確に量りとり、メタノール25mLを加えて1分間ホモジナイズした。続いてこれにクロロホルムを加え、さらに1分間ホモジナイズしたのち、3000rpmで10分間遠心分離して上澄を得た。続いて、残渣にクロロホルム：メタノール(2:1)100mLを加え、ホモジナイズした後遠心分離し、上澄をあわせた。さらに、残渣にクロロホルム：メタノール(2:1)20mLを加えて同様に操作し、上澄をあわせた。これに、0.88%塩化カリウム水溶液93mLを加えて軽く振とうし、一晚放置した。クロロホルム層を分取し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水してろ過した後、溶媒を留去し脂質を得た。その後、105℃において60分間乾燥して重量を測定し、これを脂質量とした。

3) 内部標準物質

前田らの方法⁹⁾を参考に、他の脂肪酸ピークと良好に分離できることが確認できたトリフェニルエチレン(TPE)を選択した。

4) 脂肪酸のメチル化

脂肪酸のメチル化法は、「基準油脂分析試験法」¹⁰⁾に記載のある、三フッ化ホウ素-メタノール法に準じて行った。あらかじめTPE2mgを正確に採取してあるスクリーキャップ付試験管に、3)脂質の抽出にて得た脂質約50mgを精密に分取した。これに、0.5mol/L水酸化ナトリウム-メタノール溶液1.5mLを加え、100℃で9分間加熱して、油滴がないことを確認した。続いて、三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液1mLを加え、100℃で7分間加熱した。冷却後、ヘキサン3mLを加えて3分間激しく振とうし、さらに、飽和食塩水6mLを加えて軽く振とうした。ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、試験溶液とした。

5) 装置および測定条件¹¹⁾

装置：島津GC-2010（島津製作所社製）

検出器：FID

カラム：SP-2560（φ0.25mm×100m、膜厚0.25μm）
（SUPELCO社製）

注入口温度：230℃

検出器温度：230℃

オープン温度：180℃（60分）-4℃/分-200℃（50分）

注入方法：スプリット（スプリット比50：1）

キャリアガス：ヘリウム (1mL/min)

注入量：1μL

4 食物摂取状況調査

1) 調査内容

特別な行事を除く連続した平日3日間において、起床から就寝までに摂取したすべての食品について、自記式秤量記録法¹²⁾により調査対象者自らが調査票に記載する方法で調査した。なお、対象者には、事前に調査票の記載方法を説明し、食品の秤量方法およびその記入方法について、意思の統一を図った。

2) 栄養素等・トランス脂肪酸摂取量の解析

食品からの総エネルギー摂取量および脂質摂取量は、エクセル栄養君 Ver. 4.0 を用いて算出した。またトランス脂肪酸摂取量は、「食品に含まれるトランス脂肪酸の評価基礎資料調査報告書」¹³⁾に準じ、総エネルギーに占めるトランス脂肪酸摂取量の割合または脂肪エネルギー比率を算出した。

結果および考察

1 脂質含有量

加工食品中の脂質含有量を表1に示した。食品中の脂質量は、から揚げ11.5~15.9%、ギョウザ6.0~12.0%、ハンバーグ等11.5~12.5%、グラタン5.2~10.0%、チャーハン1.5~7.2%、フライドポテト4.9~10.0%、カレー3.8~9.8%、ピザ13.7%、即席焼きそば8.2%、ケーキ10.5~20.7%、パイ15.9~27.1%およびクッキー16.4~24.2%であった。平均含有量を比較すると、から揚げやギョウザなどの肉類よりもパイやクッキーなど菓子類が高い傾向が認められた。

表1 調査対象食品中の脂質含有量

種類	脂質含有量 (%)					
	1	2	3	4	5	平均
から揚げ	15.9	13.0	11.5	15.8		14.1
ギョウザ	8.3	10.2	12.0	6.0		9.1
ハンバーグ	12.3	11.8	11.5	12.5		12.0
グラタン	7.4	10.0	5.2	5.9	6.5	7.0
チャーハン	7.2	3.3	1.5	3.9		4.0
フライドポテト	10.0	4.9				7.4
カレー	4.4	4.4	6.7	3.8	9.8	5.8
ピザ	13.7					—
即席焼きそば	8.2					—
ケーキ	11.2	20.7	10.5			14.1
パイ	23.1	15.9	27.1			22.0
クッキー	20.5	20.9	16.4	24.2		20.5

2 トランス脂肪酸含有量

調査対象としたトランス脂肪酸は、主な対象食品が調理加工食品であり、調理の際には植物油が使用されることが多い¹⁾と考えられるため、炭素数18のトランス脂肪酸を調査対象物質とした。食品100g当たりの総トランス脂肪酸含有量(表2)は、から揚げ0.02~0.13g、ギョウザ0.02~0.04g、ハンバーグ等0.21~0.28g、グラタン0.11~0.23g、チャーハン0.02~0.06g、フライドポテト0.05~0.09g、カレー0.03~0.24g、ピザ0.30g、即席焼きそば0.12g、ケーキ0.05~0.12g、パイ0.58~1.50gおよびクッキー0.07~0.68gであった。また、加工食品の種類ごとに見たトランス脂肪酸平均含有量(表4)は、から揚げ0.08g、ギョウザ0.03g、ハンバーグ等0.26g、グラタン0.16g、チャーハン0.04g、フライドポテト0.07g、カレー0.14g、ケーキ0.08g、パイ0.93gおよびクッキー0.37gであり、パイやクッキーにおいて含有量が高い傾向であった。このようなトランス脂肪酸含有量の違いは、原材料として使用した油脂の種類と割合に起因するものと考えられた。

平成19年度国民健康・栄養調査¹⁴⁾における食品群別摂取量から日本人一日当たりのトランス脂肪酸摂取量を推計(積み上げ方式)すると、0.7g(摂取エネルギーに占める割合0.3%)となり、食品100gを喫食することでこれを上回る可能性のある銘柄が認められた。一方、WHO/FAO合同専門家会合では、生活習慣病の予防のための目標値を公表しており¹⁾、トランス脂肪酸については「一日当たりの総エネルギー摂取量の1%未満」としている。今回の調査の結果最も含有量が高かったパイ100gを喫食した場合、トランス脂肪酸からのエネルギーは13.5kcalであり、一日2,000kcalを摂取する人が今回調査した加工食品を

表2 調査対象食品中の総トランス脂肪酸含有量

種類	総トランス脂肪酸含有量 (g/100g食品)					
	1	2	3	4	5	平均
から揚げ	0.08	0.13	0.02	0.10		0.08
ギョウザ	0.02	0.03	0.03	0.04		0.03
ハンバーグ	0.21	0.28	0.27	0.26		0.26
グラタン	0.17	0.16	0.12	0.23	0.11	0.16
チャーハン	0.02	0.05	0.02	0.06		0.04
フライドポテト	0.09	0.05				0.07
カレー	0.10	0.24	0.03	0.14	0.21	0.14
ピザ	0.30					—
即席焼きそば	0.12					—
ケーキ	0.12	0.09	0.05			0.08
パイ	0.58	0.71	1.50			0.93
クッキー	0.68	0.22	0.07	0.50		0.37

100g 喫食した場合においても、この目標値を上回る可能性は低いと考えられた。

3 必須脂肪酸含有量

調査対象とした必須脂肪酸は、リノール酸 (C18:2)、 γ -リノレン酸 (C18:3, n-6)、 α -リノレン酸 (C18:3, n-3)、アラキドン酸 (C20:4) およびドコサヘキサエン酸 (C22:6) の5種類とした。食品100g当たりの含有量 (表3) は、から揚げ 1.51~5.86g、ギョウザ 0.59~1.16g、ハンバーグ等 0.50~0.95g、グラタン 0.46~0.88g、チャーハン 0.27~0.70g、フライドポテト 0.80~1.95g、カレー 0.06~0.42g、ピザ 1.08g、即席焼きそば 0.82g、ケーキ 0.95~1.91g、パイ 1.82~3.86g およびクッキー 0.42~3.18g であった。また、加工食品の種類ごとに見た必須脂肪酸平均

表3 調査対象食品中の総必須脂肪酸含有量

種類	総必須脂肪酸含有量 (g/100g 食品)					平均
	1	2	3	4	5	
から揚げ	2.81	5.86	1.51	3.69		3.47
ギョウザ	0.59	0.79	0.90	1.16		0.86
ハンバーグ	0.50	0.67	0.95	0.62		0.68
グラタン	0.80	0.46	0.88	0.57	0.48	0.63
チャーハン	0.44	0.63	0.27	0.70		0.51
フライドポテト	1.95	0.80				1.38
カレー	0.27	0.26	0.06	0.27	0.42	0.26
ピザ	1.08					-
即席焼きそば	0.82					-
ケーキ	1.91	1.83	0.95			1.56
パイ	3.86	2.81	1.82			2.83
クッキー	2.16	3.18	0.42	2.33		2.02

表4 食品100g中の各脂肪酸量

種類	平均トランス脂肪酸量 (g/100g 食品)				平均必須脂肪酸量 (g/100g 食品)					
	18:1t	18:2t	18:3t	合計	18:2 リノール酸	18:3 γ -リノレン酸	18:3 α -リノレン酸	20:4 アラキドン酸	22:6 DHA	合計
から揚げ	0.02	0.03	0.03	0.08	3.21	0.01	0.25	0.00	0.00	3.47
ギョウザ	0.01	0.01	0.01	0.03	0.77	0.00	0.09	0.00	0.00	0.86
ハンバーグ	0.22	0.02	0.01	0.26	0.61	0.00	0.07	0.00	0.00	0.68
グラタン	0.12	0.02	0.02	0.16	0.54	0.00	0.09	0.00	0.00	0.63
チャーハン	0.02	0.01	0.01	0.04	0.46	0.00	0.05	0.00	0.00	0.51
フライドポテト	0.01	0.01	0.04	0.07	1.05	0.00	0.33	0.00	0.00	1.38
カレー	0.13	0.01	0.00	0.14	0.24	0.00	0.01	0.00	0.00	0.26
ピザ	0.26	0.02	0.02	0.30	0.97	0.00	0.11	0.00	0.00	1.08
即席焼きそば	0.08	0.02	0.01	0.12	0.78	0.00	0.04	0.00	0.00	0.82
ケーキ	0.02	0.02	0.05	0.08	1.24	0.00	0.32	0.00	0.00	1.56
パイ	0.82	0.07	0.04	0.93	2.63	0.00	0.20	0.00	0.00	2.83
クッキー	0.25	0.05	0.07	0.37	1.76	0.00	0.25	0.00	0.00	2.02
全体平均	0.157	0.024	0.025	0.205	1.165	0.001	0.143	0.001	0.002	1.311

含有量 (表4) は、から揚げ 3.47g、ギョウザ 0.86g、ハンバーグ等 0.68g、グラタン 0.63g、チャーハン 0.51g、フライドポテト 1.38g、カレー 0.26g、ケーキ 1.56g、パイ 2.83g およびクッキー 2.02g であった。すべての銘柄において、主な必須脂肪酸は、リノール酸および α -リノレン酸であり、調査した5種類の必須脂肪酸のうち、この2種類が総必須脂肪酸の95%以上であった。また、このほかの必須脂肪酸は、含まれないか、含まれていてもごく少量であった。

4 青年期の脂質およびトランス脂肪酸摂取量

青年期におけるトランス脂肪酸摂取量を把握するため、大学生を対象とした3日間の「食物摂取状況調査」から算出した脂質およびトランス脂肪酸摂取量について、摂取動向を算出した。

1) 脂質の摂取状況

調査対象者のそれぞれ一日当たりの脂質摂取量の摂取エネルギーに占める比率 (脂肪エネルギー比率) は6.7~50.0%であり、中には一日の総摂取エネルギーの半分を脂肪から摂取している可能性のある学生があった。また、3日間の平均脂質摂取量の平均摂取エネルギーに占める比率 (平均脂肪エネルギー比率) は12.3~42.8%であり、人数の分布は図1に示した。

「日本人の食事摂取基準[2010年版]」¹⁵⁾によると、18~29歳の脂質摂取量 (%エネルギー) は、男性27.1%、女性29.3%であり、目標値は20~30%となっている。今回の調査結果では、脂質摂取量の総摂取エネルギーに占める割合が20~25%の範囲の人は、32人中12人 (37.5%)、25~30%は7人 (21.9%) であり、全体では約6割が、脂肪を適切に摂取して

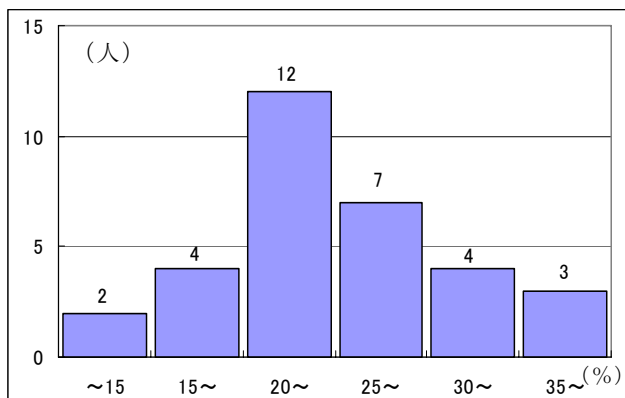


図1 3日間の平均トランス脂肪酸エネルギー比率 (%エネルギー)

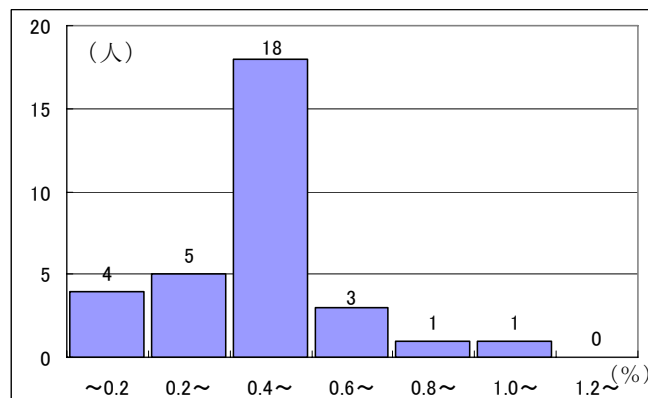


図2 3日間のトランス脂肪酸平均摂取量 (%エネルギー)

いると考えられた。一方、総摂取エネルギーに占める割合が30%を超えたのは7人(21.9%)であり、これらの学生は、脂肪を過剰に摂取している可能性があることから、食生活に注意する必要があると考えられた。

2) トランス脂肪酸の摂取状況

調査した3日間において摂取したトランス脂肪酸量について、それぞれの一日当たりの摂取量を見ると、0.08~2.28gであり、平均0.82gであった。また、1日当たりのエネルギー摂取量に占めるトランス脂肪酸の割合(%エネルギー)は、0.04~1.18%であり、人数の分布は図2に示した。対象者32人の3日間の平均摂取量(%エネルギー)は、0.16~1.05%であり、平均0.48±0.20%であった。

日本人一日当たりのトランス脂肪酸摂取量は、0.7g(摂取エネルギーに占める割合0.3%)と推計されており¹⁴⁾、今回の調査では、対象者のトランス脂肪酸の平均摂取量はその推計より約0.1g(約0.2%)多かった。一方、3日間の平均摂取量が摂取エネルギーの1%を超えた学生が1人(3.1%)あった。この学生は、他の学生と比較して穀類の摂取量が少なく、乳および菓子類の摂取量が多い傾向が見られた。乳や菓子類は、トランス脂肪酸を比較的多く含むと考えられることから、総摂取エネルギーに占める割合が1%を超えたと考えられた。

まとめ

若者に人気が高い調理加工食品および菓子類を対象食品として、脂肪酸含有量等に関する調査を行った。あわせて、大学生を対象に、食物摂取状況調査を実施し、脂質およびトランス脂肪酸摂取に関する解析を行ったところ、以下の結果を得た。

1 加工食品中の脂質含有量は、から揚げやハンバーグな

どの肉類と比較して、パイやクッキーなどの菓子類のほうが高かった。

- トランス脂肪酸は、パイやクッキーなどにおける含有量が高い傾向がうかがわれたが、これは、原材料として使用した油脂の種類と割合に起因すると考えられた。
- 一日2,000kcalを摂取する人が、調査した加工食品を100g喫食した場合では、WHO/FAO合同専門家会合報告書³⁾における目標値である「一日の総摂取エネルギーの1%未満」を超える銘柄は認められなかった。
- 調査対象とした加工食品中に主に含まれる必須脂肪酸は、リノール酸およびα-リノレン酸であり、この2種が総必須脂肪酸量の95%以上を占めた。
- 食物摂取状況調査では、調査対象とした大学生32人中1人について、WHO/FAO合同専門家会合が公表した生活習慣病の予防のための目標値「一日当たりの総エネルギー摂取量の1%未満」を超過している可能性があり、注意喚起の必要性が示唆された。
- トランス脂肪酸は、ヒトの健康に影響を及ぼすとする議論がある。平成23年2月、消費者庁が「トランス脂肪酸の情報開示に関する指針」⁶⁾を公表したことから、今後、さらに正確な情報が開示されて消費者のもとに届くようになることが望まれる。

文献

- 都築和香子：トランス脂肪酸を取り巻く状況(平成23年7月シンポジウム「トランス脂肪酸の情報開示に向けて」)、食品衛生学雑誌, 53(1), J-13-J-17(2012)
- 江崎治：体にいい油, 悪い油, ヘルシスト183, 31(2), 22-27(2007)
- WHO(2003):Diet nutrition and the prevention of chronic diseases, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO Technical Reports Series 916,

World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations(2003)

- 4) Mozaffarian, D. et al.: Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **63**, S22-S33(2009)
- 5) 農林水産省：トランス脂肪酸に関する各国・地域の取り組み, http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans_fat/t_kokusai/overseas.html
- 6) 平成 23 年 2 月 21 日付消食表第 65 号, 「トランス脂肪酸の情報開示に関する指針」の公表について
- 7) 日本能率協会総合研究所: 子どもの食生活データ総覧, 276, 生活情報センター, 東京(2006)
- 8) Folch, J. et al.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509(1957)
- 9) 前田有美恵他: 食品中の脂肪酸の簡易分析法, *食品衛生学雑誌*, **28**(5), 384-389(1987)
- 10) 山岡正和他: 基準油脂分析試験法, 暫 12-₂₀₀₃, 日本油化学会, 東京(2003)
- 11) 横山玲子他: 加工食品中の脂肪酸に関する調査研究—マーガリン及びファットスプレッド中のトランス脂肪酸及び必須脂肪酸—, 静岡県環境衛生科学研究所報告, **50**, 55-59(2007)
- 12) 日本栄養改善学会: 食事調査マニュアル, 南山堂, 東京(2005)
- 13) 食品に含まれるトランス脂肪酸の評価基礎資料調査報告書, 1-11, 内閣府食品安全委員会, 東京(2007)
- 14) 厚生労働省: 平成 19 年度国民健康・栄養調査結果について, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou09/01.html>
- 15) 春日雅人他: 日本人の食事摂取基準[2010 年版], 77-103, 第一出版, 東京(2009)

食品に含まれる有害化学物質等に関する調査 —加工食品中のアクリルアミド含有実態調査—

医薬食品部 食品班 横山玲子, 小林千恵, 坂根弓子

Study on Risk Products in Food

—Investigation of Acrylamide Contents in Processed Foods—

Reiko YOKOYAMA, Chie KOBAYASHI and Yumiko SAKANE

近年, 食品に関連した事件や事故が発生し, 消費者は食品の安全性に強い関心を寄せている. そこで, 食品中の有害化学物質調査として, スナック菓子を中心とした菓子類を対象にアクリルアミド含有実態調査を行った結果, 菓子 1g 当たりの含有量は 0.064~2.66 μg であった. このうち主な原材料にジャガイモを使用した菓子類は, トウモロコシや米, あるいは小麦粉が原材料である菓子類と比較して, アクリルアミド含有量が銘柄ごとに大きな差があり, 平均含有量も高い傾向であった. また, 商品 1 袋当たりの含有量は 5.5~169.2 μg であり, 1 日に 1 袋を一人で食べた場合, 日本人の推定一日摂取量を上回る可能性のある銘柄が認められた.

一方, アクリルアミドは家庭における調理においても生成される可能性がある. 食品からの健康リスクを最小限にするためには, バランスの取れた食生活の重要性および食品の安全性等に関する情報を発信し, 広く消費者に普及することが重要であると考えられた.

Key words: アクリルアミド, 加工食品
acrylamide, processed food

はじめに

近年, 食品に異物や毒物が混入するなどの事件や事故が発生¹⁾, 食品の安全性については, 消費者が強い関心を寄せている. 一方, 異物等の混入ではなく, 食品の加工段階において, 意図せずに生成される化学物質があり, その中には生物に対して有害な影響を及ぼすとされる有害化学物質がある.

農林水産省は, 科学的知見に基づき, リスク管理すべき化学物質をリストアップしている²⁾. この中で, 調理・加工などで生成する化学物質として, 優先的にリスク管理が必要(直ちに含有実態調査などが必要)な物質には, アクリルアミド, クロロプロパノール類, 多環芳香族炭化水素を, その他管理が必要(毒性や含有の可能性等関連情報

の収集が必要)な物質にはトランス脂肪酸およびフランを挙げている.

このうちアクリルアミドは, 産業界においては, 凝集材, 土壌改良剤, 接着剤や塗料などの材料となるポリアクリルアミドを製造するための原料として用いられている³⁾. かつてスウェーデンにおいて, 建設工事現場で働く作業員や周辺の住民に対し, 工事で使用されたアクリルアミドによる健康調査を行ったところ, アクリルアミドに接しておらず健康被害がないはずの人の体内から, 低濃度のアクリルアミドが検出された⁴⁾. このことから, 建設工事のほかに汚染源が存在する可能性が考えられた. そして, 食品中のアクリルアミドを調査し, 2002 年, スウェーデン食品庁が, 「炭水化物を含む食材を高温で加熱した食品にアクリルアミドが含まれている」と発表⁵⁾したことから, 食品中のアクリルアミドに注目が集まった.

その後研究が進み, アミノ酸の一種であるアスパラギンと還元糖を含む食品を高温で加熱調理したときにアクリルアミドが生成しやすいことが明らかになった⁶⁾. 身近な

ほとんどの食品中には、アミノ酸と糖が存在すると考えられることから、アクリルアミドは、多くの種類の加工食品中に存在する可能性がある。また、アクリルアミドに暴露された場合、末梢神経や中枢神経など神経系に対する悪影響や遺伝毒性がある^{3,7)}とされ、国際がん研究機関 (IARC) は、アクリルアミドの発がん性分類について、危険性が高いほうから2番目の「ヒトに対しておそらく発がん性がある物質 (グループ2A)」と分類⁸⁾し、ベンツピレン、クレオソートと並ぶ危険性を指摘している。しかし農林水産省は、リスク管理を進めるうえで、いまなお不足しているデータとして、国内の食品の含有実態や低減技術を挙げており⁹⁾、具体的なデータは不十分な状態と言える。

そこで、県内に流通している身近な加工食品のうち、特に「おやつ」として子供たちに人気が高い、スナック菓子を中心とした菓子類に着目し、アクリルアミド含有量の実態調査を行ったので報告する。

試料および方法

1 調査対象食品

静岡市内の店頭で購入した、ポテトチップス8銘柄、ポテトスナック8銘柄、コーンスナック8銘柄、せんべい8銘柄およびビスケット等7銘柄の合計39銘柄を調査対象食品とした (表1)。なお、ビスケット等とは、主な原材料として小麦粉を使用したビスケット、クッキーおよびクラッカーを含む。

2 試薬および標準品

- 1) アクリルアミド標準液 (1mg/mL, 水質試験用) (関東化学社製)
- 2) ¹³C₃-アクリルアミド標準液 (1mg/mL) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc)
- 3) その他の試薬: LC/MS用のもの
- 4) 固相抽出カートリッジ: Oasis HLB (200mg/6cc), Oasis MCX (150mg/6cc) (Waters社製)

3 方法

- 1) 試料の調製
検体は、およそ3mm以下となるように細切し、試料とした。

2) 試験溶液の調製¹⁰⁻¹²⁾

試料の前処理方法を図1に示した。試料約1gを精密に量り、1μg/mLまたは100ng/mL¹³C₃-アクリルアミド溶液1mLを正確に加え、さらに水9mLを加えてボルクテクスで約15秒間混合した。次に、約20分間ゆるやかに振とうしたのち、4°C、3000rpmにて30分間遠心分離して、水層約5mLを採取し、0.45μmのフィルターにてろ過した。

この水層1.5mLを分取し、あらかじめメタノール

表1 調査対象とした菓子類

No	品名	種類	原材料	内容量	価格
1	ポテトチップ	ポ	ジャガイモ	60 g	¥78
2	ポテトチップス	テ	ジャガイモ	60 g	¥98
3	スナック菓子	ト	ジャガイモ	60 g	¥98
4	油菓子	チ	ジャガイモ	140 g	¥208
5	油菓子	ッ	ジャガイモ	70 g	¥148
6	油菓子	プ	ジャガイモ	65 g	¥128
7	ポテトチップス	ス	ジャガイモ	60 g	¥138
8	スナック菓子		ジャガイモ	60 g	¥98
9	スナック菓子	ポ	ジャガイモ	85 g	¥98
10	スナック菓子	テ	ジャガイモ	115 g	¥198
11	ポテトチップス	ス	ジャガイモ	33 g	¥148
12	スナック菓子	ス	ジャガイモ	75 g	¥148
13	スナック菓子	ナ	ジャガイモ	54 g	¥120
14	スナック菓子	ック	ジャガイモ	61 g	¥105
15	スナック菓子		ジャガイモ	63 g	¥105
16	スナック菓子		ジャガイモ	80 g	¥98
17	スナック菓子	コ	トウモロコシ	75 g	¥98
18	スナック菓子	ー	トウモロコシ	75 g	¥98
19	スナック菓子	ン	トウモロコシ	80 g	¥98
20	スナック菓子	ス	トウモロコシ	58 g	¥98
21	菓子	ナ	トウモロコシ	75 g	¥158
22	スナック菓子	ック	トウモロコシ	58 g	¥98
23	スナック菓子		トウモロコシ	160 g	¥315
24	スナック菓子		トウモロコシ	50 g	¥108
25	米菓	せ	米	95 g	¥315
26	米菓	ん	米	112 g	¥298
27	米菓	べ	米	8 枚	¥278
28	揚げせんべい	い	米	17 枚	¥158
29	米菓		米	220 g	¥378
30	米菓		米	8 枚	¥278
31	米菓		米	9 本	¥158
32	米菓		米	24 枚	¥158
33	ビスケット	ビ	小麦粉	24 枚	¥158
34	ビスケット	ス	小麦粉	63 g	¥100
35	ビスケット	ケ	小麦粉	24 枚	¥100
36	ビスケット	ッ	小麦粉	105 g	¥128
37	ビスケット	ト	小麦粉	16 枚	¥158
38	クッキー	等	小麦粉	2枚×7袋	¥158
39	クラッカー		小麦粉	39 枚	¥138

5mL および水 5mL でコンディショニングした Oasis HLB に負荷し、通過液は捨て、水 0.5mL で洗浄した後、この通過液も捨てた。次に、あらかじめメタノール 3mL および水 3mL で洗浄した Oasis MCX を Oasis HLB の下部に接続し、Oasis HLB の上から水 3mL を注入して溶出液はすべて採取した。

必要に応じて窒素パージにより1mL以下まで濃縮したのち、0.20μmのフィルターを通過した液を試験溶液とした。

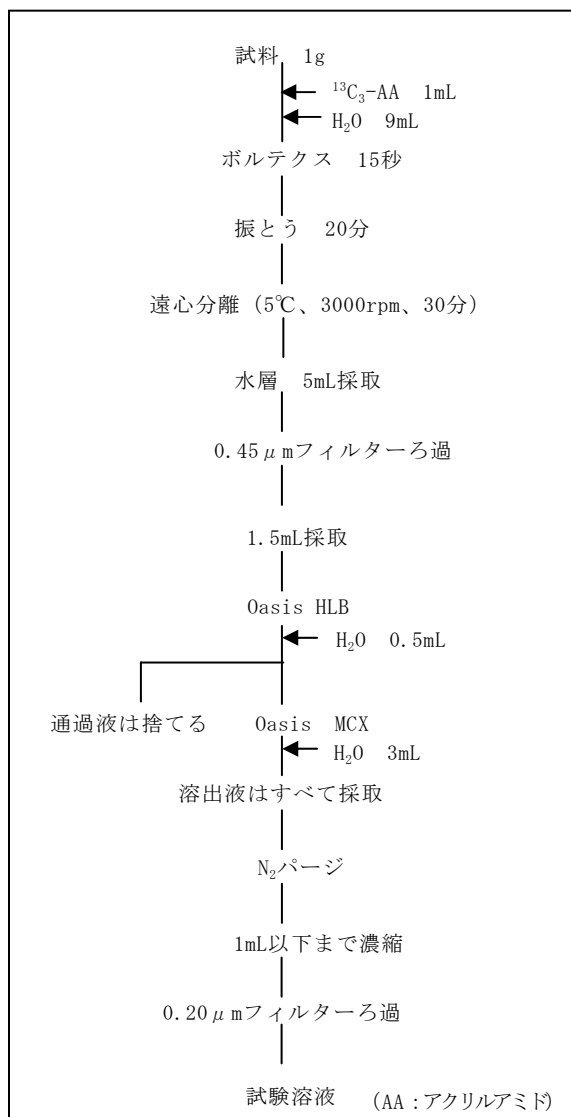


図 1 試料の前処理

3) 装置および測定条件¹⁾

測定機器は、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた。測定条件は、以下のとおりである。

装置：ACQUITY TQD (Waters 社製)

測定モード：ESI+ (MRM)

測定イオン：アクリルアミド 72→55

¹³C₃-アクリルアミド 75→58

溶離液：0.1%酢酸：メタノール (99.5：0.5)

流速：0.2mL/min

オープン温度：40°C

カラム：Atlantis dC18 2.1×150mm, 3μm (Waters 社製)

注入量：10μL

4) 定量

¹³C₃-アクリルアミドを内部標準物質とし、ピーク面

積比対アマウント比により検量線を作成し、定量した。

結果

調査対象とした菓子類 39 銘柄のアクリルアミド含有量を表 2 に示した。その結果、食品 1g 当たりの含有量は、ポテトチップス 0.408~2.66μg, ポテトスナック 0.242~2.57μg, コーンスナック 0.099~0.373μg, せんべい 0.075~0.217μg, ビスケット等 0.064~0.481μg であり、今回の結果は、国内における報告^{8,13,14)}と同程度の含有量であった。また、コーンスナック、せんべい、ビスケット等では、その含有量は低めであり、銘柄によるばらつきが少なかったが、ポテトチップスやポテトスナックでは、銘柄ごとに含有量の違いが大きかった (図 2)。

次に、食品 1g 当たりの平均含有量を比較すると、ポテトチップス 1.30μg, ポテトスナック 1.19μg, コーンスナック 0.227μg, せんべい 0.148μg およびビスケット等 0.191μg であり、全体の平均は 0.621μg であった (図 3)。

今回の調査結果では、主な原材料としてジャガイモを使用した菓子類は、トウモロコシ、米あるいは小麦粉が原材料である菓子類と比較するとアクリルアミド平均含有量が高い結果であった。

一方、商品一袋に含まれるアクリルアミドの量を算出すると (図 4)、ポテトチップス 24.5~159.6μg, ポテトスナック 19.4~169.2μg, コーンスナック 5.5~59.7μg, せんべい 7.3~40.1μg, ビスケット等 6.2~63.5μg となった。

考察

トータルダイエットスタディによる推計では、日本人のアクリルアミド推定一日摂取量は体重 1kg 当たり 0.3~2.2μg とされている⁹⁾。体重 1kg 当たり 2.2μg のアクリルアミドを摂取したと仮定すると、体重 60kg の人では 132μg を摂取することになるが、一日で 1 袋すべてを一人で喫食した場合、今回の結果の中には、日本人の推定一日摂取量を上回る可能性のある銘柄が複数認められた。60kg より体重の少ない子供が、一日に一人で 1 袋を喫食した場合には、さらに多くの銘柄がこれを上回る可能性が示唆された。現在のところ、アクリルアミドのヒトの健康への影響については研究段階であり、日本においても厚生労働科学研究などにおいて調査が進められている¹⁵⁾。

一方、アクリルアミドは、アミノ酸の一種であるアスパラギンと還元糖を含む食品を高温で加熱調理することで生成しやすいと言われており⁶⁾、ほとんどの食品においてはアミノ酸と糖を含むと考えられることから、身のまわりの様々な加工食品中に存在する可能性がある。しかし、現

在の状況において、消費者自らが、商品の外観や表示などからその含有量を知ることは困難である。さらに、家庭における「焼く」、「揚げる」などの調理においても生成される可能性がある。

今回調査対象物質として取り上げた「食品中のアクリルアミド」に関する国内における規制はなく、現在までに、海外においても基準を設けている国はない。しかし、健康

への影響が懸念されている物質であることから、食品からの健康リスクを最小限にするために、科学的なデータに基づく情報提供により、バランスのとれた食生活の重要性および食品の安全性等に関する情報を消費者に発信し、広く普及することが重要であると考えられる。

表2 調査した菓子類中のアクリルアミド含有量

No	種類	測定値	平均値	AA量	平均値
		μg/g		μg/袋	
1	ポテトチップス1	2.53		151.8	
2	ポテトチップス2	1.17		70.2	
3	ポテトチップス3	1.27		76.2	
4	ポテトチップス4	0.646	1.30	90.4	76.2
5	ポテトチップス5	0.517		36.2	
6	ポテトチップス6	1.17		76.1	
7	ポテトチップス7	2.66		159.6	
8	ポテトチップス8	0.408		24.5	
9	ポテトスナック1	1.99		169.2	
10	ポテトスナック2	0.589		67.7	
11	ポテトスナック3	2.57	1.19	84.8	67.1
12	ポテトスナック4	0.582		43.7	
13	ポテトスナック5	0.470		25.4	
14	ポテトスナック6	1.68		102.5	
15	ポテトスナック7	1.41		88.8	
16	ポテトスナック8	0.242		19.4	
17	コーンスナック1	0.159	0.227	11.9	18.3
18	コーンスナック2	0.298		22.4	
19	コーンスナック3	0.303		24.2	
20	コーンスナック4	0.099		5.7	
21	コーンスナック5	0.309		23.2	
22	コーンスナック6	0.163		9.5	
23	コーンスナック7	0.373		59.7	
24	コーンスナック8	0.110		5.5	
25	せんべい1	0.130	0.148	12.4	18.6
26	せんべい2	0.097		10.9	
27	せんべい3	0.205		23.0	
28	せんべい4	0.122		13.9	
29	せんべい5	0.142		31.2	
30	せんべい6	0.217		24.3	
31	せんべい7	0.075		7.3	
32	せんべい8	0.193		40.1	
33	ビスケット等1	0.244	0.191	34.0	21.6
34	ビスケット等2	0.135		8.5	
35	ビスケット等3	0.158		23.7	
36	ビスケット等4	0.143		15.0	
37	ビスケット等5	0.113		16.6	
38	ビスケット等6	0.064		6.2	
39	ビスケット等7	0.481		63.5	

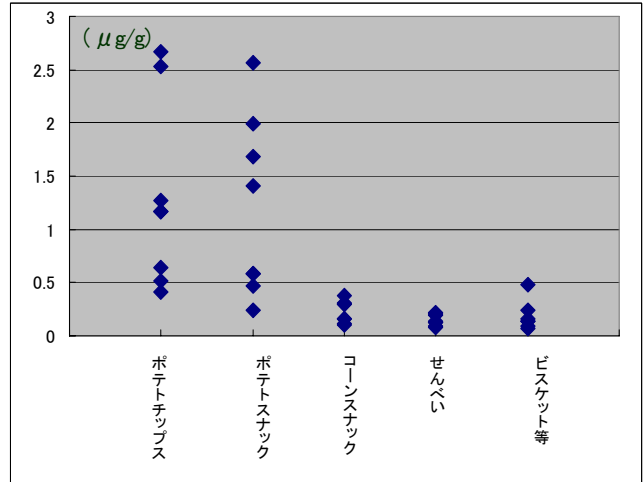


図2 食品1g当たりのアクリルアミド含有量

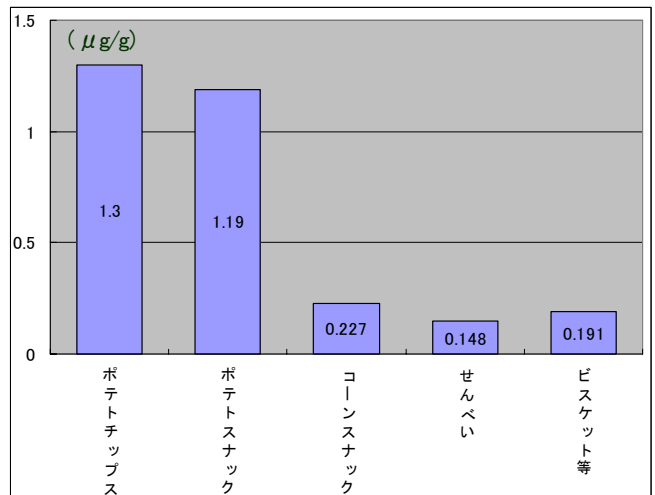


図3 食品1g当たりのアクリルアミド平均含有量

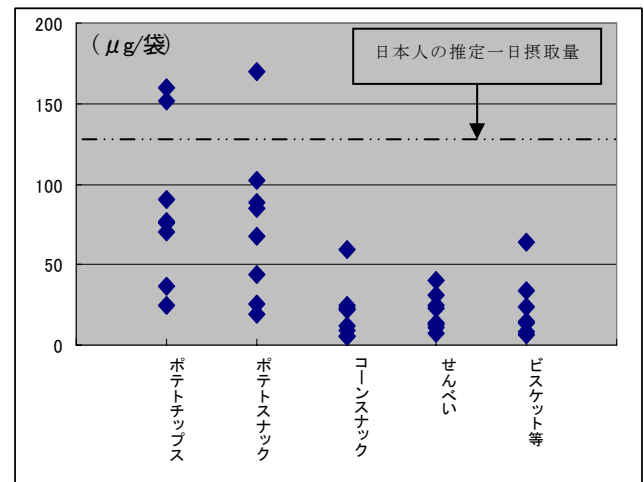


図4 商品1袋当たりのアクリルアミド含有量

まとめ

子供のおやつとして人気が高い、スナック菓子を中心とした菓子類について、静岡市内で市販されていた 39 銘柄を対象にアクリルアミド含有実態を調査したところ、以下のことが明らかとなった。

- 1 今回調査した銘柄のアクリルアミド含有量は、食品 1g 当たり 0.064~2.66 μg であり、国内における報告値と同程度の含有量であった。
- 2 食品 1g 当たりの平均含有量を比較すると、主な原材料にジャガイモを使用した菓子類は、トウモロコシ、米あるいは小麦粉を原材料とした菓子類と比較して平均含有量が高い結果であった。
- 3 コーンスナック、せんべい、ビスケット等では、その含有量は低めで、銘柄によるばらつきが少なかったが、ポテトチップスやポテトスナックでは、銘柄ごとに含有量の差が大きかった。
- 4 今回調査した銘柄の中には、一日で 1 袋すべてを一人で喫食した場合、日本人の推定一日摂取量を上回る可能性のある銘柄が複数認められた。
- 5 アクリルアミドは、アスパラギンと還元糖を含む食品を高温で加熱することで生成すると言われており、家庭における調理の際にも生じる可能性が考えられる。食品からのリスクを最小限にするためには、バランスの取れた食生活の重要性および食品の安全性などに関する正しい情報を消費者に確実に発信し、広く普及することが重要であると考えられた。

参考文献

- 1) 厚生労働省：報道発表資料, <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/index.html>
- 2) 農林水産省：個別危害要因への対応(有害化学物質), http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/hazard_chem.html
- 3) 食品安全委員会：加工食品中のアクリルアミドについて, <http://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets.html>
- 4) 農林水産省：アクリルアミドの食品からの発見の経緯～アクリルアミド問題の背景について～, http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/acryl_amide/a_syosai/about/keii.html
- 5) National Food Administration(April 26, 2002) Press Release, Uppsala, Sweden, <http://www.mindfully.Org/Food/Acrylamide-Heat-Processed-Foods26apr02.htm>
- 6) Yaylayan, V.A. et al.: Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective, J. AOAC Int., **88**(1), 262-267 (2005)

- 7) 農林水産省：アクリルアミドの健康影響, http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/acryl_amide/a_syosai/about/eikyuu.html
- 8) 厚生労働省：加工食品中アクリルアミドに関する Q&A, <http://www.mhlw.go.jp/topics/2002/11/tp1101-1.html>
- 9) 農林水産省：食品安全に関するリスクプロファイルシート, http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/chem_aa.pdf
- 10) Cheng, W.C. et al. : Validation of an improved LC/MS/MS method for acrylamide analysis in foods, J. Food Drug Anal., **17**(3), 190-197 (2009)
- 11) Young, S.C. et al. : Solid-phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry, J. AOAC Int., **87**(4), 961-964(2004)
- 12) 木村圭介他：調理食品中のアクリルアミド, 平成 22 年度全国衛生化学技術協議会年会講演集, 140-141 (2009)
- 13) 寺田久屋他：カラムスイッチング HPLC を利用した UV 検出による加工食品中のアクリルアミドの定量, 食品衛生学雑誌, **44**(6), 303-309 (2003)
- 14) Takatsuki, S. et al. : Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching, J. Food Hyg. Soc. Japan, **44**(2), 89-95(2003)
- 15) 厚生労働科学研究成果データベース, <http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIST00.do>

コエンザイム Q10 含有サプリメントの品質等について

医薬食品部 食品班 小林千恵, 横山玲子, 坂根弓子

Relating to Quality of Coenzyme Q10 containing Supplement

Chie KOBAYASHI, Reiko YOKOYAMA and Yumiko SAKANE

県民の食生活の向上および健康増進に役立てるため、錠剤、カプセル剤の形状をしたコエンザイム Q10 を含有するサプリメント中のコエンザイム Q10 量およびコエンザイム Q10 と併せて配合されているビタミン E 量を測定した。また、錠剤、カプセル剤の崩壊試験を行い、サプリメントの品質を検討した。その結果、サプリメントに含有されるコエンザイム Q10 およびビタミン E 量は、商品の栄養成分表示等に記載されているとおりの量が含まれていたが、銘柄により含有量に差がみられた。コエンザイム Q10 は、サプリメント等からの摂取により、嘔吐等の健康被害事例が報告されている成分であるため、症状が現れた際には医師に相談し、自己の判断で摂取しないように注意することが必要と考えられた。一方、サプリメントの錠剤、カプセル剤の崩壊性は、銘柄により異なっており、医薬品と比較すると崩壊しにくいものがあった。

サプリメントを利用する際は、医薬品とは品質等が異なることを認識し、必要成分は毎日の食事からバランスよく取り入れるように心がけることが望ましいと考えられた。

Key words: コエンザイム Q10, ビタミン E, サプリメント
coenzyme Q10, vitamin E, supplement

はじめに

現在、消費者の健康志向は高く、サプリメントは栄養補給等を目的に多くの人に利用されている。サプリメントは、特定の栄養成分を自己判断で手軽に摂取することが可能であるが、医薬品とは異なり、購入時に医師や薬剤師の意見を聞くことはほとんどない状況であるため、過剰摂取等による健康への影響が懸念されている。

今回、県民にサプリメントの摂取に関する留意点について情報提供するため、加齢や美容に関心の高い人を対象に販売されているコエンザイム Q10 含有サプリメントに着目した。コエンザイム Q10 は、「ユビデカレノン」として日本薬局方¹⁾に収載され、従来医薬品分野ではうつ血性心不全の治療薬として用いられている成分であるが、現在では食品成分としての利用も認可されている。

そこで、錠剤、カプセル剤の形状をしたコエンザイム Q10 含有サプリメントにおけるコエンザイム Q10 およびビタミン E の含有量を調査した。また、医薬品の品質評価手法である崩壊試験を行い、サプリメントの品質を検討したので併せて報告する。

試料および方法

1 テスト対象

静岡市内のドラッグストアで購入した 9 銘柄のサプリメントをテスト対象とした。また、コエンザイム Q10 は医薬品成分でもあることから、結果を比較するため「ユビデカレノン」含有医薬品 3 銘柄を購入した (表 1)。

2 試薬

ユビキノン-10 標準品 (和光純薬工業株)、ビタミン E 定量用標準試薬 (和光純薬工業株)

その他の試薬は、特級またはそれ以上のものとした。

3 方法

表1 購入したサプリメントおよび医薬品

銘柄No.	形状	表示されていた 1日摂取目安量あたりの コエンザイムQ10含有量
1	ソフトカプセル	60mg
2	ハードカプセル	60mg
3	ソフトカプセル	90mg
4	ソフトカプセル	120mg
5	サプリメント	ソフトカプセル 60mg
6	ソフトカプセル	100mg
7	錠剤	8mg
8	ソフトカプセル	90mg
9	ソフトカプセル	60mg
10	錠剤	30mg (1日服用量)
11	医薬品	錠剤 30mg (1日服用量)
12	ハードカプセル	30mg (1日服用量)

1) 表示

商品に記載されている栄養成分等について調査した。

2) コエンザイム Q10 含有量の測定

① 試料の調製

形状が錠剤のものについては、20錠をすりつぶして均一にしたものを試料とした。また、ソフトカプセルおよびハードカプセルについては、20カプセル中の内容物をとりだし均一にしたものを試料とした。

② 試験溶液の調製

すべての銘柄において、第十五改正日本薬局方「ユビデカレノン」の定量法に準じて調製したが、No. 9については、公益財団法人日本健康・栄養食品協会「コエンザイム Q10 食品 品質規格基準」の定量法²⁾に準じた試験溶液の調製も併せて行った。

第十五改正日本薬局方「ユビデカレノン」の定量法における調製は以下のとおりである。試料 1.0g を精密に量り、エタノール 20mL を加えて 10 分間超音波抽出後、50°C で 3 分間加温して溶かした。冷後、エタノールを加えて適宜希釈し、メンブランフィルター(0.45 μm)でろ過したものを HPLC 用試験溶液とした。

また、公益財団法人日本健康・栄養食品協会「コエンザイム Q10 食品 品質規格基準」の定量法を以下に示す。試料 0.1g を精密に量り、ヘキサン 10mL を加えて 10 分間超音波抽出後、ヘキサンを加えて正確に 20mL にした。この液 4mL を正確にとり、塩化第二鉄溶液 2mL を加えた後、エタノールを加えて 20mL に調製し、メンブランフィルター(0.45 μm)でろ過したものを HPLC 用試験溶液とした。

③ HPLC 測定条件

カラム：Mightysil ODS-3 (4.6mm×150mm, 5 μm, ジーエルサイエンス(株))

移動相：メタノール/エタノール混液(13 : 7)

カラム温度：35°C

流量：1.2mL/min

検出器：フォトダイオードアレイ検出器(275nm)

3) ビタミン E 含有量の測定

栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について³⁾(衛新第 13 号 平成 11 年 4 月 26 日付)に準じて α, β, γ, δ-トコフェロールの含有量を測定した。

① 試料の調製

2)の①と同じとした。

② 試験溶液の調製

試料 250mg を精密に量り、ヘキサンに溶解し、正確に 50mL にしたものを HPLC 用試験溶液とした。

③ HPLC 測定条件

カラム：Inertsil NH₂ (4.6mm×250mm, 5 μm, ジーエルサイエンス(株))

移動相：酢酸/イソプロピルアルコール/ヘキサン混液 (5:6:1000)

カラム温度:40°C

流量:1.2mL/min

検出器:励起波長 298nm, 蛍光波長 325nm

4) サプリメントの崩壊試験

サプリメントには溶けやすさに関する基準等がないため、錠剤、カプセル剤の溶けやすさに規定がある医薬品の試験法を参考にした。第十五改正日本薬局方「6.09 崩壊試験法」に準じ、水を用いて錠剤 30 分、カプセル剤 20 分の試験時間とした。崩壊しなかった銘柄については、第十四改正日本薬局方⁴⁾で使用が認められていた補助盤を用い、同様の試験時間で再度試験した。

結果および考察

1 表示

1) コエンザイム Q10 に関する記載について

サプリメント 9 銘柄 (No. 1~9) のうち 7 銘柄 (No. 1~5, 8, 9) については、「体内でエネルギーを作り出す時に欠かせない」、「加齢とともにその産生量が減少する」、「若々しくキレイに」など、コエンザイム Q10 が美容のために必要な成分であると消費者に感じさせる記載がされていた。

2) 栄養成分表示について

No. 1~9 のすべての銘柄において栄養成分表示があり、どの銘柄にもビタミン類等が含有されていることが読み取れた。また、対象とした銘柄の半数以上 (No. 1~4, 9) にビタミン E の記載がされていた。

2 コエンザイム Q10 含有量

サプリメント (No. 1~9) および医薬品 (No. 10~12) について、コエンザイム Q10 含有量を測定した。サプリメン

トについては1日摂取目安量(1日に摂取する錠剤またはカプセルの個数)当たりの分析値, 医薬品(No. 10~12)については1日服用量(1日に服用する錠剤またはカプセルの個数)当たりの分析値をコエンザイム Q10 含有量とし, 各銘柄 3 回の分析結果の平均値と標準偏差を図1に示した。

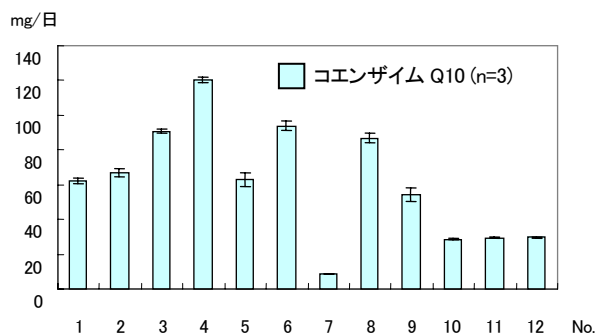


図1 コエンザイムQ10含有量(1日摂取目安量当たり)

第十五改正日本薬局方「ユビデカレノン」の定量法は酸化型のコエンザイム Q10 を抽出する方法である。この定量法により試験溶液を調製し, 測定した結果を表示値と比較したところ, サプリメント No. 1~8 のコエンザイム Q10 含有量は, 表示値の 94~112%であった。コエンザイム Q10 は栄養成分ではないため, 健康増進法に基づく栄養表示基準の適用を受けることはないが, 栄養成分である脂溶性ビタミンの場合は, 同法で定められた分析方法による分析値が表示値の 80~150%であることを許容範囲としている。これを参考に今回の分析結果をみると, No. 1~8 については許容範囲内であった。また, 医薬品(No. 10~12)については, 商品に記載されているとおりの含有量であった。一方, No. 9 の含有量は表示値の 34%であり著しく低い量であった。そのため, No. 9 については, 還元型のコエンザイム Q10 も含めた含有量を測定することとし, 公益財団法人日本健康・栄養食品協会「コエンザイム Q10 食品 品質規格基準」の定量法²⁾により試験溶液を調製し, 改めて測定した。その結果, 含有量は表示値の 90%であり, 健康増進法の栄養表示基準に対しても許容範囲内であった。No. 9 については, 酸化型が経時的に還元型に変化した可能性があると考えられたが, その原因は不明である。

一方, サプリメント(No. 1~9)のコエンザイム Q10 含有量については, 8.7~120.4mg と銘柄により幅が見られ, No. 7 を除くすべての銘柄において, 医薬品(No. 10~12)よりも多く含まれていた。コエンザイム Q10 は, 日本人の食事摂取基準における耐容上限量(健康障害をもたらすリスクがないとみなされる習慣的な摂取量上限)⁵⁾等が設定されている成分ではない。しかし, コエンザイム Q10 含有食品の摂取を原因とする嘔吐などの健康被害が

報告されている⁶⁾ため, 内閣府食品安全委員会では安全性の評価を行っている⁶⁾。その評価結果および厚生労働省通知⁶⁾において, 医薬品の摂取量(承認用量 30mg/日)を超えるサプリメントについては, 事業者の責任で用量を考慮した長期摂取での安全性の確認, 消費者の健康被害事例の収集等を徹底することとしている。公益財団法人日本健康・栄養食品協会では, 厚生労働省からの依頼を受け, コエンザイム Q10 含有食品の規格基準を作成しているが, 1日摂取目安量の上限については当分の間設定せず, 販売後調査結果などによる安全性評価, 国際的動向などにより新たな知見が得られた段階で評価検討を行うとしている⁷⁾。また, 当協会は 1日摂取目安量が 300mg までの安全性については確認されていると報告している⁷⁾。今回対象とした銘柄は, 最も含有量が高い銘柄であっても No. 4 の 120mg/日であり, 安全性が確認されている範囲内であるため, 商品に記載されている 1日摂取目安量に従って摂取すれば, 過剰摂取による健康障害を引き起こす可能性は低いと考えられた。しかし, コエンザイム Q10 は, 降圧薬や血糖降下剤との併用により薬の作用を増強する⁸⁾ため, 利用者によっては注意が必要であると考えられた。コエンザイム Q10 は肉類や魚介類などの食品に含まれるため, 日頃からバランスのとれた食生活を心がけ, サプリメントは食生活の補足として上手に利用することが大切だと考えられた。

3 ビタミン E 含有量

原材料表示および栄養成分表示に「ビタミン E」の記載がある No. 1~4, 9 を対象とし, α , β , γ , δ -トコフェロールの含有量を測定した。図2には, 1日摂取目安量当たりのビタミン E 含有量について, 各銘柄 3 回の分析結果の平均値と標準偏差を示した。

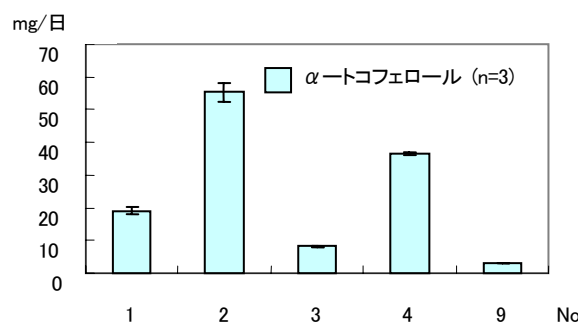


図2 ビタミンE含有量(1日摂取目安量当たり)

ビタミン E は α -トコフェロールとして含有されており, β , γ , δ -トコフェロールは定量限界未満(0.025mg/mL)であった。 α -トコフェロールの分析値は, 栄養成分表示に記載されている値の 92~122%であり, 健康増進法に基づく許容範囲内(80~150%)であった。また, 含有量については, 3.0~55.3mg と銘柄により差が

見られた。

平成 20 年度国民健康栄養調査報告⁹⁾によると、20 歳以上のビタミン E 補助食品摂取者のビタミン E 摂取量は男性 58.9mg/日、女性 67.9mg/日であり、非摂取者については男性 7.1mg/日、女性 6.6mg/日と示されている。また、日本人の食事摂取基準(2010 年版)におけるビタミン E の目安量(ある一定の栄養状態を維持するのに十分な量)は、18 歳以上の男性 7.0mg/日、女性 6.5mg/日である¹⁰⁾ため、補助食品非摂取者であっても目安量程度のビタミン E を摂取でき、補助食品摂取者は必要以上にビタミン E を摂取していると考えられた。さらに、ビタミン E の過剰摂取は、出血作用との関連があるため、日本人の食事摂取基準(2010 年版)では、 α -トコフェロールの耐容上限量が設定されている¹¹⁾。値については年齢や性別により多少の差はあるが、6~7 歳の小児の場合は男女ともに 300mg/日、18~29 歳の成人の場合は、男性 800mg/日、女性 650mg/日である¹⁰⁾。そのため、今回の対象銘柄については、商品に記載されている 1 日摂取目安量に従って摂取すれば、ビタミン E の過剰摂取となる可能性は低いと考えられた。ビタミン E は緑葉植物、魚類等の食品に幅広く含有される^{12,13)}ため、バランスの良い食生活を心がけることにより必要量を充足できると思われる。

4 サプリメントの崩壊試験

第十五改正日本薬局方に準じ、補助盤を使用せずにサプリメント 9 銘柄について試験したところ、カプセル剤 6 銘柄 (No. 1, 3, 4, 6, 8, 9) が規定時間内に崩壊しなかった。この 6 銘柄について、補助盤を用いて再度試験したところ、すべての銘柄が規定時間内に崩壊した(表 2)。

表 2 日本薬局方「6.09 崩壊試験法」における水に対する試験結果

銘柄No.	形状	結果	
		補助盤なし	補助盤あり
1	ソフトカプセル	×	○
2	ハードカプセル	○	-
3	ソフトカプセル	×	○
4	ソフトカプセル	×	○
5	ソフトカプセル	○	-
6	ソフトカプセル	×	○
7	錠剤	○	-
8	ソフトカプセル	×	○
9	ソフトカプセル	×	○
10	錠剤	○	-
11	錠剤	○	-
12	ハードカプセル	○	-

○:規定時間内に崩壊した

×:規定時間内に崩壊しなかった

一方、医薬品 3 銘柄 (No. 10~12) については、補助盤を使用せずに規定時間の半分以下の時間で崩壊を確認で

きた。

第十五改正日本薬局方では、補助盤の使用を原則的に禁止している¹⁴⁾。補助盤を使用せずに崩壊した 3 銘柄のサプリメントは、現在求められている医薬品と同等の崩壊性を有すると考えられるが、補助盤を使用することで崩壊した 6 銘柄については、医薬品と比較すると崩壊性に優れていないと考えられた。今回対象としたサプリメントは、銘柄により崩壊性が異なる結果であったため、体内への吸収性についても異なる可能性があり、医薬品と同じ成分が含有されていても、品質は医薬品とは異なるものがあることを認識する必要があると考えられた。

まとめ

1 コエンザイム Q10 含有食品の摂取について

- 1) サプリメントに含有されるコエンザイム Q10 およびビタミン E は、商品に表示されているとおりの量であることを確認した。
- 2) 今回対象とした銘柄における 1 日摂取目安量当たりのコエンザイム Q10 含有量は、8.7~120.4mg と含有量に幅があり、ほとんどの銘柄が医薬品の 1 日服用量(承認用量:30mg/日)を超えるものであった。
- 3) コエンザイム Q10 は、高用量でも安全性が高いと考えられている⁸⁾が、コエンザイム Q10 含有食品の摂取により嘔吐などの健康被害事例があり、また、医薬品ユビデカレノン製剤の副作用として、胃部不快感などがある⁶⁾。これらの消化器系症状が現れた場合は、医師に相談し、自己の判断で摂取しないように注意することが必要と考えられた。
- 4) コエンザイム Q10 は、降圧薬や血糖降下剤との併用による相互作用に注意が必要であることから、治療中の人は、自己判断で利用せず医師等に相談してから利用することが大切だと考えられた。
- 5) 対象としたコエンザイム Q10 含有サプリメントに含まれるビタミン E 含有量は、銘柄により大きく異なっていたが、1 日摂取目安量に従って摂取すれば耐容上限量を上回ることはなく、過剰摂取にはならないと考えられた。

2 サプリメントの溶けやすさ(崩壊性)について

今回調査したサプリメントは、すべての銘柄が医薬品に規定されている崩壊試験に適合したが、補助盤を用いないと崩壊しない銘柄もあり、銘柄によって崩壊性が異なっていた。

以上より、サプリメントを利用する際には、医薬品とは品質等が異なることを認識して食生活の補足として利用し、基本は、毎日の食事から必要成分をバランスよく取り入れるように心がけることが望ましいと考えられ

た.

文 献

- 1) 厚生労働省：第十六改正日本薬局方，平成 23 年 3 月 24 日付厚生労働省告示 65 号
- 2) (財)日本健康・栄養食品協会：コエンザイム Q10 食品 品質規格基準，5，(財)日本健康・栄養食品協会，東京 (2009)
- 3) (財)日本食品分析センター：栄養表示のための成分分析のポイント，229-232，中央法規出版(株)，東京 (2007)
- 4) 厚生労働省：第十四改正日本薬局方，平成 13 年 3 月 30 日付厚生労働省告示第 111 号
- 5) 安斉正郷：日本人の食事摂取基準 (2010 年版)，7-9，第一出版(株)，東京 (2009)
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課新開発食品保健対策室長通知「コエンザイム Q10 を含む食品の取扱いについて」，平成 18 年 8 月 23 日付け食安新発第 0823001 号
- 7) 公益財団法人日本健康・栄養食品協会ホームページ：「コエンザイム Q10 食品」規格基準の公示及びコエンザイム Q10 の安全性に関する協会の考え方について，<http://www.jhnfa.org/topic71.html>
- 8) (社)静岡県薬剤師会：スキルアップのためのサプリ・トクホ相談 Q&A，188-189，(株)南山堂，東京 (2008)
- 9) 厚生労働省ホームページ：平成 20 年国民健康・栄養調査結果の概要について，<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2009/11/h1109-1.html>
- 10) 安斉正郷：日本人の食事摂取基準 (2010 年版)，146，第一出版(株)，東京 (2009)
- 11) 安斉正郷：日本人の食事摂取基準 (2010 年版)，130-132，第一出版(株)，東京 (2009)
- 12) 国立健康・栄養研究所ホームページ：話題の食品成分の科学情報，<https://hfnet.nih.go.jp/contents/index31.html>
- 13) Pravst I, et al. : Coenzyme Q10 Contents in Foods and Fortification Strategies, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **50**(4), 269-280 (2010)
- 14) (財)日本公定書協会：日本薬局方技術情報 2006 JPTI 2006，216-217，(株)じほう，東京 (2006)

他誌に発表した論文

環境科学部

- 1) エキシマー蛍光誘導体化法による河川水中のビスフェノールAの液体クロマトグラフ分析

山下晶平、今津佳子

環境化学 Vol16(No2), 181-187 (2011)

環境中のビスフェノール類の分析は、一般にガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) が用いられる。しかしながら、対象物質の検出において感度が十分とはいえない場合がある。本研究では、河川水中のビスフェノール A の測定において、ピレン化合物である 4-(1-ピレン) 塩化ブチリルを用いたエキシマー蛍光誘導体化による液体クロマトグラフ分析を試みた。この方法は、ポリアミン、ポリフェノール、ジカルボン酸といった生体関連物質の分析において高い選択性と検出感度を有するが、環境中のビスフェノール A の分析への適用性が検討されていない。そこで、静岡県内の 6 河川において採取した試料のビスフェノール A の濃度をエキシマー蛍光誘導体化法により定量した。定量値は 0.0016-0.17 μ g/L であった。これらの値は GC/MS を用いた従来法による定量値とよく一致した。

微生物部

- 1) Prevalence of β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals.

Hiroi M., Yamazaki F., Harada T., Takahashi N., Iida N., Noda Y., Yagi M., Nishio T., Kanda T., Kawamori F., Sugiyama K., Masuda T., Hara-kudo Y., and Ohashi N.

J. Vet. Med. Sci., 74, 189-195 (2012)

To evaluate the diversity of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) genes among food-producing animals, 48 isolates of ESBL-producing *Escherichia coli* isolates were obtained from rectal samples of broilers, layers, beef cattle and pigs, at the slaughterhouse level. ESBL-carrying *E. coli* were isolated from 60.0% of individual broiler rectal samples, 5.9% of layers, 12.5% of beef cattle and 3% of pigs. One ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* was isolated from a broiler. The ESBL-positive *E. coli* isolates from broilers harbored various ESBL genes: bla (SHV-12), bla(CTX-M-2), bla(CTX-M-14), bla(CTX-M-15) and bla(CTX-M-44). The plasmid DNAs were analyzed by restriction patterns. Homogeneous band patterns were yielded in those of *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates harboring the bla(CTX-M-2) gene from different farms. No genetic relation between the 2 CTX-M-14 ESBL-producing strains was found by pulsed-field gel electrophoresis, although 2 plasmids in these strains, obtained from different broiler farms, were similar to each other. This study provides evidence that the proliferation of CTX-M-producing *E. coli* is due to the growth of indigenous CTX-M-producing strains and the possible emergence of strains that acquired CTX-M genes by horizontal transfer in different broiler farms. CTX-M-producing coliforms in broilers should be

controlled due to the critical importance of cephalosporins and the zoonotic potential of ESBL-producing bacteria.

- 2) 牛肉からの腸管出血性大腸菌検出法の検討

廣井みどり, 大塚佳代, 飯塚信二, 多賀賢一郎, 杉山寛治, 小西良子, 工藤由起子

国立医薬品食品衛生研究所報告, 129, 61-67 (2011)

食肉を対象とした腸管出血性 O111 の検出法について、培養法と遺伝子検出法などを組み合わせて検討を行った。その結果、牛肉から腸管出血性大腸菌 O111 を検出する場合においては、mEC 培地よりも NmEC 培地を用い 42°C で増菌培養を行う方法が優れていた。また、増菌培養液からの検出に関しては、LAMP 法、直接塗抹、免疫磁気ビーズ塗抹法の間で有意差は認められなかった。また、分離用寒天培地の種類による検出結果に関しても有意差は確認されなかった。

医薬食品部

- 1) High dose dietary pyridoxine induces

T-helper type 1 polarization and decreases contact hypersensitivity response to fluorescein isothiocyanate in mice.

Chie Kobayashi, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai
Biol. Pharm. Bull., 35, 1-7 (2012)

Pyridoxine (vitamin B₆) is commonly used as a dietary supplement and beneficial effects of it are expected. However, excess ingestion of pyridoxine has been shown to cause a severe sensory neuropathy in humans and experimental animals. We have been studying the linkage between the nervous and immune systems using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-induced contact hypersensitivity (CHS) mouse model. We have found that activation of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA 1), which is expressed on sensory neurons, enhances skin sensitization to FITC. Another feature of FITC-induced CHS is its dependence on T helper 2 (Th 2) type responses. We hypothesized that the excess intake of pyridoxine may affect sensitization to FITC and influence helper T-cell polarization. We examined FITC-induced CHS in BALB/c mice fed a diet containing excess pyridoxine (120 mg/kg diet) for 3 weeks. We found that mice fed on the excess-pyridoxine diet exhibited a lower response as to FITC-induced CHS compared with ones fed on a diet with a standard pyridoxine content (6.0 mg/kg diet). Moreover, the IFN- γ /IL-4 ratio produced by draining lymph node cells was significantly higher with the excess-pyridoxine diet. This suggested that the cytokine balance was shifted toward Th 1 with the excess-pyridoxine diet. Consistently, Th 1-dependent oxazolone-induced CHS was enhanced with the excess-pyridoxine diet. These results suggested that an excess pyridoxine intake actively influences the immune system by altering helper T cell polarization.

2) ガスクロマトグラフィーによる日本薬局方 *l*-メントール試験法の検討

高橋一則、上村慎子、尾藤孝弘、水野くみ子、上野千恵、山本真也、内田恭之、宮本憲吾、渡辺陽子、前田有美恵、坂根弓子

静岡県薬剤師会報, 197, 59-60(2012)

日本薬局方に定められる医薬品の規格及び試験法の問題点については、県内の製造業者等からも改正を望む声がしばしば聞かれている。*l*-メントールの定量は、水酸基のアセチル化反応と滴定による方法であるが、立体異性体を含めて定量しており、操作が煩雑であった。GCによる定量法及び純度試験法を検討した結果、簡便な方法で、*l*-メントールを特異的に精度よく分析できたほか、不快臭を有する有機溶媒であるピリジン及び反応性の高い無水酢酸を使用せず、作業者の負担を軽減することができた。医薬品の品質管理上必要な公定試験法について問題点を改善することは、県内で製造、流通する医薬品の品質確保のためにも非常に有意義であると考えられる。

学会・研究会の報告

環境科学部

- 1) エキシマー蛍光誘導体化による河川水中のビスフェノール A の液体クロマトグラフ分析
山下晶平
第 20 回環境化学討論会
2011. 7. 16~18 (熊本)
- 2) 富士山の地下水と湧水保全
村中康秀
世界寿司フォーラム準備会
2011. 8. 2(静岡)
- 3) 富士山周辺域の湧水の地域特性
神谷貴文, 渡邊雅之, 村中康秀
第 1 回同位体環境学シンポジウム
2011. 9. 29~30(京都)
- 4) 静岡県における外来種 (フロリダマミズヨコエビとヤンバルトサカヤスデ) の生息状況について
古屋洋一, 久米一成, 今津佳子, 神谷貴文, 飯田奈都子
平成 23 年度自然系調査研究機関 調査研究・活動事例発表会
2011. 11. 15~16 (春日)
- 5) 静岡県における外来種の現状と課題について
久米一成
第 38 回環境保全・公害防止研究発表会
2011. 11. 28~29 (青森)
- 6) 静岡県の河川におけるホルモン受容体結合活性の検出状況について
中川寛基
平成 23 年度東海地区環境試験研究機関会議 水質・化学物質分科会
2012. 1. 19 (各務原)
- 7) 富士山の恵み「食・農・健康」を支える地下水・湧水の保全と活用
村中康秀
フーズサイエンスヒルズプロジェクトふじのくに食と農 健康づくりフェア 2012
2012. 2. 2 (静岡)
- 8) 食品加工所からの汚泥または汚泥焼却灰の農業資材としての有用性の検討
中川寛基
第 48 回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10(静岡)
- 9) 微量元素・安定同位体でみる富士山周辺湧水の地域特性
神谷貴文, 渡邊雅之, 村中康秀
全国環境研協議会研究集会
2012. 3. 16 (東京)

- 10) 富士山の地下水・湧水の保全と活用
村中康秀
平成 23 年度ふじさんネットワーク富士山勉強会
2012. 3. 20 (三島)

微生物部

- 1) リアルタイム PCR 法による食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法の検討
飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり, 八木美弥, 西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治
平成 23 年度全国食品衛生監視員協議会第 51 回関東ブロック研修大会
2011. 8. 26 (川崎)
- 2) 静岡県におけるマダニ採取状況およびマダニの紅斑熱群リケッチア保有状況
川森文彦, 湊 千尋, 山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治
平成 23 年度獣医公衆衛生学会 (中部地区)
2011. 8. 27 (福井)
- 3) アルカリ泉掛け流し式浴槽に対するモノクロラミン消毒の導入
杉山寛治, 神田 隆, 縣 邦雄, 久保田 明, 泉山信司, 小坂浩司, 遠藤卓郎, 倉 文明
日本防菌防黴学会第 38 回年次大会
2011. 8. 31 (大阪)
- 4) 静岡県内で分離されたインフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性状況
山田俊博, 小柳純子, 長岡宏美, 川森文彦, 杉山寛治
第 26 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究部会
2011. 9. 29 (静岡)
- 5) 静岡県内で分離されたヒト由来 STEC の血清型、Stx 型および薬剤感受性に関する研究
廣井みどり, 飯田奈都子, 原田哲也, 川森文彦, 高橋奈緒美, 神田 隆, 杉山寛治, 増田高志
第 32 回日本食品微生物学会学術総会
2011. 10. 6 (東京)
- 6) リアルタイム PCR 法による食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法の検討
飯田奈都子, 福島 博, 高橋奈緒美, 廣井みどり, 八木美弥, 西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治
第 32 回日本食品微生物学会学術総会
2011. 10. 6 (東京)

- 7) LAMP法を用いた食肉等からの志賀毒素産生性大腸菌の検出
神田 隆, 道越勇樹, 飯田奈都子, 廣井みどり,
八木美弥, 柴田真也, 杉山寛治
第32回日本食品微生物学会学術総会
2011. 10. 6 (東京)
- 8) リアルタイムPCR法による食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法の検討
飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり, 八木美弥,
西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治
平成23年度全国食品衛生監視員研修会
2011. 10. 20 (東京)
- 9) リケッチア分離法の検討
川森文彦
第19回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー
2011. 11. 4 (広島)
- 10) 食鳥処理場および養鶏農場の肉用鶏から分離された基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生菌群の解析
廣井みどり, 飯田奈都子, 原田哲也, 川森文彦,
高橋奈緒美, 神田 隆, 杉山寛治, 増田高志
第46回東海北陸地区鶏病技術研修会
2011. 11. 25 (静岡)
- 11) 静岡県におけるマダニ採取状況およびマダニの紅斑熱群リケッチア保有状況
川森文彦, 湊 千尋, 山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治
平成23年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会
2012. 2. 3 (札幌)
- 12) 食品および拭き取り検体からのノロウイルス高感度検出法の検討
長岡宏美, 小柳純子, 山田俊博, 川森文彦,
杉山寛治
第48回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 13) 静岡県におけるオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの検出状況
山田俊博, 小柳純子, 長岡宏美, 川森文彦,
杉山寛治
第48回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 14) 県内で分離された結核菌VNTR法による分子疫学調査
八木美弥, 道越勇樹, 飯田奈都子, 廣井みどり,
柴田真也, 神田 隆, 杉山寛治, 高橋奈緒美,
西尾智裕
第48回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 15) 市場使用海水における腸炎ビブリオ汚染実態調査について
柴田真也, 道越勇樹, 飯田奈都子, 廣井みどり,
八木美弥, 神田 隆, 杉山寛治, 高橋奈緒美,
西尾智裕
第48回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 16) 浴槽水の衛生管理へのATP測定法の応用に関する検討
神田 隆, 道越勇樹, 飯田奈都子, 廣井みどり,
八木美弥, 柴田真也, 杉山寛治, 高橋奈緒美,
西尾智裕
第48回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 17) アルカリ泉掛け流し式浴槽に対するモノクロラミン消毒の導入
神田 隆, 高橋奈緒美, 八木美弥, 西尾智裕,
杉山寛治, 縣 邦雄, 久保田 明, 泉山信司,
小坂浩司, 遠藤卓郎, 倉 文明
第24回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会
2012. 2. 17 (茨城)
- 18) 静岡県内で分離された結核菌VNTR法による分子疫学調査
八木美弥, 道越勇樹, 飯田奈都子, 廣井みどり,
柴田真也, 神田 隆, 杉山寛治, 高橋奈緒美,
西尾智裕
第24回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会
2012. 2. 17 (茨城)

医薬食品部

- 1) ハイポキシシアを標的とした抗がん剤の探索
小郷尚久, 海野雄加, 鈴木神之, 津金桃実,
山崎竜太, 丹治健一, 浅井章良
日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会
2011. 5. 25 (東京)
- 2) 知事承認医薬部外品染毛剤の確認試験におけるTLC一斉分析法について
上村慎子, 山本真也, 内田恭之, 宮本憲吾,
渡辺陽子, 前田有美恵, 坂根弓子
第48回全国薬事指導協議会総会
2011. 10. 20 (京都)
- 3) 医薬品等の規格試験法に関する問題事例
前田有美恵, 山本真也, 内田恭之, 宮本憲吾,
上村慎子, 渡辺陽子, 坂根弓子
第48回全国衛生化学技術協議会年会
2011. 11. 10~11 (長野)

- 4) ガスクロマトグラフィーによる日本薬局方 I-メントール試験法の検討
上村慎子, 尾藤孝弘, 水野くみ子, 上野千恵, 山本真也, 内田恭之, 宮本憲吾, 渡辺陽子, 前田有美恵, 坂根弓子
第 44 回東海薬剤師学術大会
2011. 11. 27 (三重)
- 5) 指定薬物 JWH-081 の検出事例について
宮本憲吾, 内田恭之, 上村慎子, 渡辺陽子, 前田有美恵, 坂根弓子
第 48 回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 6) 医薬品・医薬部外品の知事承認申請のための技術的支援について
上村慎子, 内田恭之, 宮本憲吾, 渡辺陽子, 前田有美恵, 坂根弓子
第 48 回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 7) 加工食品中のアクリルアミド含有実態調査
横山玲子, 小林千恵, 坂根弓子
第 48 回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 8) テトラサイクリン系抗生物質の分析法の検討—分析法改善に向けた問題点の把握—
影山知子, 瀧井美樹, 浅賀彦人, 堀池あずさ, 坂根弓子
第 48 回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 9) PTP 包装医薬品の保存による溶出性の変化
上村慎子, 渥美加代子, 内田恭之, 宮本憲吾, 渡辺陽子, 前田有美恵, 坂根弓子
平成 23 年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第 24 回理化学研究部会総会・研究会
2012. 2. 17 (群馬)
- 3) 富士山麓ブナ林の生理活性と大気環境調査
石井 聖, 金子智英, 三宅健司, 瀧本俊晴, 篠原英二郎, 萱沼広行
II 型「ブナ林生態系における生物・環境モニタリングシステムの構築」に係る検討会
2011. 10. 20 (静岡)
- 4) 浜名湖の環境と生物 (講演)
後藤裕康
応用生態工学会名古屋支部
都田川フィールドシンポジウム
2011. 11. 26 (静岡)
- 5) 静岡県内の砒素による地下水汚染のモニタリング手法の効率化
清水麻希, 濱口浩太, 内山道春, 後藤裕康, 三好廣志, 杉本勝臣, 青木一永
第 48 回静岡県公衆衛生研究会
2012. 2. 10 (静岡)
- 6) 浜名湖の環境と生物
後藤裕康
汽水湖調査検討会
2012. 2. 29 (東京)
- 7) 富士山麓ブナ林の生理活性と大気環境調査
石井 聖, 金子智英, 三宅健司, 瀧本俊晴, 篠原英二郎, 萱沼広行
II 型「ブナ林生態系における生物・環境モニタリングシステムの構築」に係る検討会
2012. 3. 11 (茨城)

大気水質部

- 1) オキシダント濃度とアサガオへの被害
金子智英
植物のオゾン被害とストレス診断に関する検討会
2011. 9. 14~15 (長崎)
- 2) 石綿除去現場等における繊維状物質漏洩の迅速な確認方法について
石井 聖, 中西隆之, 篠原英二郎, 萱沼広行
平成 23 年度全国環境研協議会関東甲信静支部大気専門部会
2011. 9. 22 (横浜)

表 彰 等

微生物部

- 1) 平成 23 年度日本獣医三学会中部地区学会会長賞
「静岡県におけるマダニ採取状況およびマダニの紅斑熱群リケッチア保有状況」
2011. 8. 27
川森文彦
- 2) 第 32 回日本食品微生物学会優秀発表賞
「リアルタイム PCR 法による食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法の検討」
2011. 10. 7
飯田奈都子
- 3) 平成 23 年度全国食品衛生監視員研修会 厚生労働省医薬食品局食品安全全部長表彰
「リアルタイム PCR 法による食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法の検討」
2011. 10. 21
飯田奈都子
- 4) 第 48 回静岡県公衆衛生研究会第 3 分科会優秀賞
「食品および拭き取り検体からのノロウイルス高感度検出法の検討」
2012. 2. 10
長岡宏美
- 5) 厚生労働科学研究費補助金（平成 22 年度～平成 24 年度）
「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」
2010. 4. 1
杉山寛治

医薬食品部

- 1) 独立行政法人医薬基盤研究所 「保健医療分野における基礎研究推進事業」 研究助成（平成 21 年度～平成 25 年度）
「Aggrus を標的とした低分子化合物の開発研究」
2009. 4. 1
小郷尚久
- 2) 厚生労働科学研究費補助金（平成 23 年度～平成 25 年度）
「がん幹細胞を標的とした化学療法及び放射線療法の PARC 阻害剤による効果増強法の実用化研究」
2011. 11. 4
小郷尚久

学 位 取 得

医薬食品部

- 博士（薬学） 静岡県立大学
「接触性皮膚炎マウスモデルにおけるピリドキシン過剰摂取による免疫系への影響」
2012. 3. 20
小林千恵

編集委員会

久米一成（委員長）

橋本守

川森文彦

小和田和宏

鈴木恒雄

村田和俊

渡邊雅之

佐原啓二

上村慎子

後藤裕康

静岡県環境衛生科学研究所報告

（第54号）

平成25年1月

編集発行 静岡県環境衛生科学研究所
静岡県静岡市葵区北安東4丁目27-2
電話 (054) 245-7655

E-mail kanki@pref.shizuoka.lg.jp

インターネットホームページ

[http:// www6.shizuokanet.ne.jp/eikanctr/](http://www6.shizuokanet.ne.jp/eikanctr/)

印刷所 有限会社東海美術社
静岡県静岡市葵区古庄2丁目3-21
電話 (054) 263-1700 (代)



環境の理想郷“ふじのくに”の創造