

Shizuoka-Ken Kankyō Eisei Kagaku
Kenkyūsho Hōkoku 59(2016)
ISSN 1343-246X

静岡県環境衛生科学研究所報告

平成 28 年度

Bulletin
of
Shizuoka Institute of
Environment and Hygiene

No.59 2016

静岡県環境衛生科学研究所

はじめに

静岡県は、美しい自然と活力ある多彩な産業に恵まれており、「低酸素社会」、「循環型社会」及び「自然共生社会」の3つの視点で環境政策を展開しています。地球温暖化対策を進め、清冽な空気や水を当然に享受できる環境を後世に引き継いでいくことは、現代を生きる我々の重要な使命であると考えています。

また、保健衛生の分野においても、食中毒や感染症の頻発、危険ドラッグの流通など、ケースによっては国際的な規模で健康を脅かす問題が発生してきています。

静岡県環境衛生科学研究所は、環境と保健衛生の科学的・技術的中核機関として、本県の環境と県民の健康を守るため、調査研究、試験検査、常時監視・測定などの業務を実施しています。

このうち、調査研究においては、富士山を中心とした水資源の有効利用、PM2.5の注意喚起、大気・水質環境の保全対策、病原微生物の迅速検査法、医薬品・食品の新たな検査技術などを重要課題として継続的に研究しており、特に、ファルマバレープロジェクトの一翼を担う創薬探索に関連して、顕著な成果をあげています。

その他、県民生活に密着した商品の品質テスト結果も含めて、ここに平成28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.59」として取りまとめましたので、御高覧の上、御指導・御助言を賜れば幸いです。

平成 29 年 7 月

静岡県環境衛生科学研究所長 杉山 浩一

目 次

論 文

環境科学部

- 1 ペーパーラッシュ焼却灰を利用した水性塗料の排水処理方法の開発
鈴木光彰, 伏見典晃, 香田梨花, 平松裕志 ----- 1

微生物部

- 2 静岡県における抗インフルエンザ薬耐性株の出現状況に関する疫学的解析
酒井悠希子, 原稔美, 池ヶ谷朝香, 阿部冬樹, 佐原啓二 ----- 7
- 3 ノロウイルスによる大規模食中毒防止対策に関する研究
原稔美, 荒畑沙織, 酒井悠希子, 池ヶ谷朝香, 阿部冬樹,
佐原啓二 ----- 11
- 4 静岡県におけるレプトスピラの汚染実態に関する研究
村田学博, 牧田幸久, 鈴木秀紀, 森主博貴, 松橋平太,
山田俊博, 長岡宏美, 佐原啓二 ----- 17

医薬食品部

- 5 医薬品等試験検査における妥当性確認について
今津佳子, 渡辺陽子, 金子亜由美, 瀧野瑠衣, 岩切靖卓,
浜尾 俊, 小和田和宏 ----- 21
- 6 加工食品中に混入された農薬の一斉分析法の開発 (第2報)
山崎喜与子, 渡邊愛子, 竹下由布子, 小和田和宏 ----- 25
- 7 除菌・消臭スプレアの除菌消臭効果の検証
辻むつみ, 長倉美由紀, 小和田和宏 ----- 33
- 8 ジャガイモ食中毒事例による緊急検査
渡邊愛子, 山崎喜与子, 竹下由布子, 小和田和宏 ----- 39
- 9 ワサビのイソチオシアネート類のGC/MS分析における前処理方法の検討
竹下由布子, 渡邊愛子, 山崎喜与子, 辻むつみ,
小和田和宏, 西島卓也 ----- 43

10 菓子, 清涼飲料水等に含まれる「糖質」および「甘味料」について 長倉美由紀, 辻むつみ, 小和田和宏	47
11 抗カリシウイルス活性を有する化合物の探索 大場 舞, 安藤隆幸, 岩切靖卓, 渡辺陽子, 小和田和宏, 山崎喜与子, 荒畑沙織, 池ヶ谷朝香, 川森文彦, 岡智一郎, 高木弘隆, 小郷尚久, 浅井章良	53
大気水質部	
12 PM2.5 大気自動測定器捕集フィルターによる水溶性成分の把握 本間信行, 井口大輔	59
13 浜名湖の流動と水質環境に関する研究 —第3報 外海水流入の状況— 内山道春, 山内 悟, 後藤裕康, 鈴木恒雄, 菅谷則子, 清水麻希, 小山祐人, 岡辺拓巳	65
他誌に発表した論文	73
学会・研究会の報告	74
表彰等	77

CONTENTS

PAPERS

• Department of Environment Science

- 1 Development of Wastewater Treatment for Water-based Paint by Paper Sludge Ash
Mitsuaki SUZUKI, Noriaki FUSHIMI, Rika KODA
and Hiroshi HIRAMATSU ----- 1

• Department of Microbiology

- 2 Epidemiological analysis on the appearance of anti-influenza drug resistant strain
in Shizuoka Prefecture
Yukiko SAKAI, Toshimi HARA, Asaka IKEGAYA,
Fuyuki ABE and Keiji SAHARA ----- 7
- 3 Study on Prevention of Foodborne *Norovirus* Outbreaks
Toshimi HARA, Saori ARAHATA, Yukiko SAKAI,
Asaka IKEGAYA, Fuyuki ABE and Keiji SAHARA ----- 11
- 4 A study concerned with pollution status of *Leptospira* in Shizuoka Prefecture
Michihiro MURATA, Yukihiisa MAKITA, Hideki SUZUKI,
Hirotaka MORINUSHI, Heita MATSUHASHI, Toshihiro YAMADA,
Hiromi NAGAOKA and Keiji SAHARA ----- 17

• Department of Drug and Food Science

- 5 Validation and Verification of Quality Test Methods for Medicines
Yoshiko IMAZU, Yoko WATANABE, Ayumi KANEKO,
Rui TAKINO, Yasutaka IWAKIRI, Syun HAMAO
and Kazuhiro OWADA ----- 21
- 6 Development of Simultaneous Analysis Method of the Agricultural Chemicals Mixed
in the Processed Food (2nd Report)
Kiyoko YAMAZAKI, Aiko WATANABE, Yuko TAKESHITA
and Kazuhiro OWADA ----- 25
- 7 Verification of Disinfectant Deodorizer Spray
Mutsumi TSUJI, Miyuki NAGAKURA and Kazuhiro OWADA ----- 33

8	Urgent Determination of α -Solanine and α -Chaconine in Potato Aiko WATANABE, Kiyoko YAMAZAKI, Yuko TAKESHITA and Kazuhiro OWADA -----	39
9	Study of Pretreatment Method for GC/MS Analysis of Isothiocyanates in Wasabi Yuko TAKESHITA, Aiko WATANABE, Kiyoko YAMAZAKI, Mutsumi TSUJI, Kazuhiro OWADA and Takuya NISHIJIMA -----	43
10	Investigation of Sugars and Sweeteners in Sweets, Cooling Drink and so on Miyuki NAGAKURA, Mutsumi TSUJI and Kazuhiro OWADA -----	47
11	Screening and Identification of Anti-calicivirus Agents Mai OHBA, Takayuki ANDO, Yasutaka IWAKIRI, Yoko WATANABE, Kazuhiro OWADA, Kiyoko YAMAZAKI, Saori ARAHATA, Asaka IKEGAYA, Fumihiko KAWAMORI, Tomoichiro OKA, Hiroataka TAKAGI, Naohisa OGO and Akira ASAI -----	53
• Department of Pollution Control		
12	Essential research of water soluble ion components in PM _{2.5} by analyzing sampling filter used at auto measuring machine for PM _{2.5} . Nobuyuki HONMA and Daisuke IGUCHI -----	59
13	Research on Lake Current and Water Quality in Lake HAMANA -Report 3 The Actual Condition of Outer Sea Water flow in Lake HAMANA - Michiharu UCHIYAMA, Satoru YAMAUCHI, Hiroyasu GOTO, Tsuneo SUZUKI, Noriko SUGAYA, Maki SHIMIZU, Yuto KOYAMA and Takumi OKABE -----	65
SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS -----		73
 PRESENTATIONS AT CONFERENCES AND/OR SOCIETY MEETINGS -----		74
 COMMENDATION -----		77

ペーパースラッジ焼却灰を利用した 水性塗料の排水処理方法の開発

環境科学部 環境科学班 鈴木光彰, 伏見典晃, 香田梨花
平松裕志

Development of Wastewater Treatment for Water-based Paint
by Paper Sludge Ash

Mitsuaki SUZUKI, Noriaki FUSHIMI, Rika KODA
and Hiroshi HIRAMATSU

大気汚染の原因の1つとされる揮発性有機化合物 (VOC) の排出規制が施行されたことに伴い、塗装現場では油性塗料から水性塗料への切り替えが進んでいる。これに、塗装道具等の洗浄廃液が発生するため排水処理が必要となり、処理費用は塗装事業者にとって大きな負担となっている。そこで、安価なペーパースラッジ焼却灰 (PS 灰) とポリ塩化アルミニウム (PAC) を併用した凝集沈殿法を検討したところ、中和処理を必要としない低コストで簡便な水性塗料の排水処理方法を見出した。

Key words: ペーパースラッジ焼却灰, 水性塗料, 排水処理, 凝集沈殿
paper sludge ash, water-based paint, wastewater treatment, coagulation settling

はじめに

大気汚染の原因の1つとされる揮発性有機化合物 (VOC) の排出を抑制するため、平成18年4月にVOCの排出規制が施行されたことに伴い、塗装現場では油性塗料から、水性塗料への切り替えが進んでいる¹⁾。また、シックハウス症候群が問題になり、住宅内装材にも低VOCである水性塗料の利用が進んでいる²⁾。水性塗料は油性塗料に比べて、90%程度のVOC排出抑制効果がある。しかしながら、塗装道具等の洗浄廃液の処理が問題になる³⁾。廃液処理において基本的な処理工程として凝集沈殿法が用いられるが、ポリ塩化アルミニウム (PAC) や高分子凝集剤などが大量に必要となり、高コストとなるため、塗装事業者にとって大きな負担となる。

一方、ペーパースラッジ焼却灰 (PS 灰) は、古紙からトイレットペーパー等再生紙を製造する際、排水中に流失した短繊維や無機物を濃縮し脱水した製紙汚泥を焼却した物質 (残灰) である⁴⁾。PS 灰は主に埋め立て処分されているが、一部セメント原料や土壌改良材に再利用されている。また、PS 灰には、凝集沈殿効果があることが報告されてい

る⁵⁾。そのため、PS 灰を水性塗料の凝集剤として使用することで、低コストの水性塗料排水処理が期待できる。なお、PACは100円/kg、PS 灰は2円/kg程度である。

本研究では、現在行われている水性塗料の処理方法について現状を調査し、課題を精査するとともに、安価なPS 灰を活用し、排水処理設備を持たない中小塗装事業者でも導入しやすく、低コストで簡便な水性塗料の排水処理方法を検討したので報告する。

方法

1 アンケート調査

水性塗料廃液の処理方法の現状を把握するため、一般社団法人日本塗装工業会静岡県支部の会員 (55社) を対象に「水性塗料の廃棄処理・排水処理について」のアンケート調査を行い、12社から回答を得た。

2 水性塗料液での凝集沈殿実験

使用されている水性塗料はアクリル樹脂系およびシリコン樹脂系が中心であり、洗浄廃液の塗料濃度は、0.05%~1%程度であることから¹⁾、今回、アクリル樹脂塗料およびシリコン樹脂塗料の0.5%、1%、2%、4%の水性塗料液を作製した。これらの水性塗料液200mLに、PS 灰またはPAC (キンダ化学株式会社製) を表1と表2に示す濃度で添加後、攪拌し、塩酸または水酸化ナトリウムでpH7に中和して、凝集

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)

沈殿させた (PS 灰処理, PAC 処理). また, PS 灰と PAC を 1:1 量で添加したものは, 中和処理の必要はなく, 攪拌のみ行なった (PS 灰+PAC 処理). 凝集沈殿時間は 10 分程度であった. その凝集沈殿後の処理水 (上澄み液) の化学的酸素要求量 (COD) と全有機炭素 (TOC) を測定した. COD はデカンテーションによって上澄み液を回収したものを, TOC はさらにメンブランフィルター (ADVANTIC: DISMIC-25HP) によって濾過したものを TOC 計 (SHIMAZU: TOC-L) にて測定した.

アクリル樹脂塗料は, 和信ペイント株式会社製の「白木まもーる」, シリコン樹脂塗料は, 大日本塗料株式会社製の「極」, PS 灰は, 富士製紙協同組合製の「シリカパウダー」を使用した.

3 実排水の凝集沈殿実験

実排水として, 塗装事業者 (A 社) から提供された塗装道具の洗浄廃液を使用し, PS 灰, PAC, PS 灰+PAC を表 3 に示す添加量で処理を行い, 凝集沈殿効果を調べた. その凝集沈殿後の処理水(上澄液)の COD と TOC を測定した. なお, 今回使用した実排水の塗料濃度は, 約 0.1~2.0% であった.

結果

1 アンケート結果

水性塗料を使用している企業は 12 社中 10 社であった. 水性塗料の廃塗料は, その 10 社全てで産業廃棄物処理されていた. 一方, 塗装道具を洗浄する際に出る水性塗料廃液の処理方法については, 40%が凝集沈殿法で, 40%が一定量溜めた後, 産業廃棄物処理により行われていた (図 1).

水性塗料の廃液(道具などの洗浄液)はどのように処理していますか?(N=10)

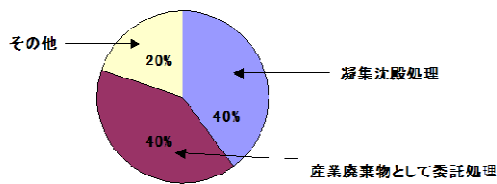


図1 水性塗料廃液の処理方法のアンケート結果

2 水性塗料液と実排水の凝集沈殿効果

アクリル樹脂塗料とシリコン樹脂塗料の 1%水性塗料液を使用した PS 灰処理, PAC 処理および PS 灰+PAC 処理による凝集沈殿効果を表 1 と表 2 に示す. また, 実排水における凝集沈殿効果を表 3 に示す.

表 1 1%アクリル樹脂塗料液における凝集剤の違いによる凝集沈殿効果

凝集剤 添加量(%)	1%アクリル樹脂塗料液		
	PS 灰処理	PAC 処理	PS 灰+PAC 処理
0.010	-	-	○
0.020	-	-	○
0.025	×	×	-
0.050	○	×	○
0.100	○	△	-
0.150	○	○	-
0.200	○	○	-

○沈降する ×沈降しない △上澄み液が白濁
-実験していない

表 2 1%シリコン樹脂塗料液における凝集剤の違いによる凝集沈殿効果

凝集剤 添加量(%)	1%シリコン樹脂塗料液		
	PS 灰処理	PAC 処理	PS 灰+PAC 処理
0.020	-	-	×
0.050	×	-	○
0.125	○	-	-
0.250	○	×	-
0.500	○	○	-
0.750	○	○	-

○沈降する ×沈降しない -実験していない

表 3 実排水における凝集剤の違いによる凝集沈殿効果

凝集剤 添加量(%)	実排水		
	PS 灰処理	PAC 処理	PS 灰+PAC 処理
0.010	-	-	○
0.020	-	-	○
0.025	-	△	○
0.050	△	○	○
0.100	△	○	○
0.200	○	-	-

○沈降する ×沈降しない △上澄み液が白濁
-実験していない

1%水性塗料液（アクリル樹脂塗料およびシリコン樹脂塗料）と実排水において、PS 灰処理や PAC 処理よりも、PS 灰と PAC を 1:1 量で併用した方が、少ない凝集剤量で凝集沈殿が起こった（図 2）。これは中和剤を必要としない方法であるため、PS 灰や PAC 単独で用いるよりも、簡便で処理費用が安くなる。

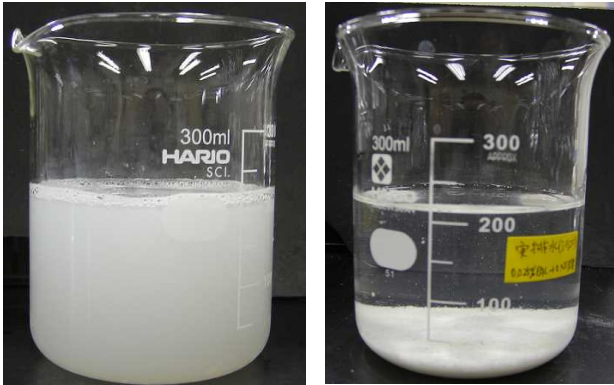


図 2 実排水における PS 灰+PAC 処理による凝集沈殿効果
（左：実排水，右：凝集沈殿後）

図 3 から図 5 に 1%アクリル樹脂塗料液，1%シリコン樹脂塗料液および実排水の処理水の TOC 濃度をそれぞれグラフで示す。各処理とも凝集沈殿が起きる最少の凝集剤濃度で処理水の TOC 濃度は大幅に低下し，その後凝集剤量を増加させても，処理水の TOC 濃度はほとんど変化しなかった。

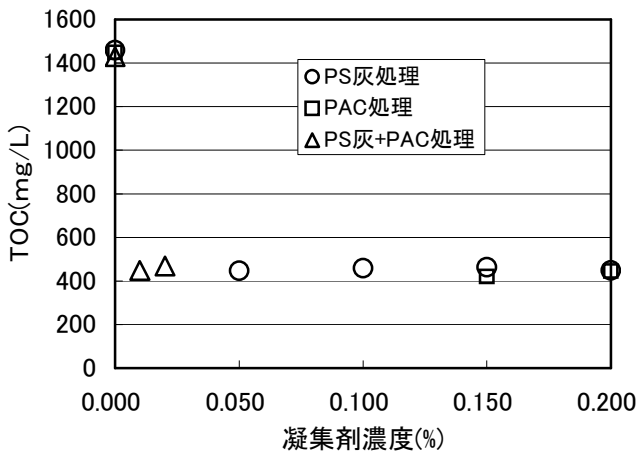


図 3 1%アクリル樹脂塗料の処理水の TOC

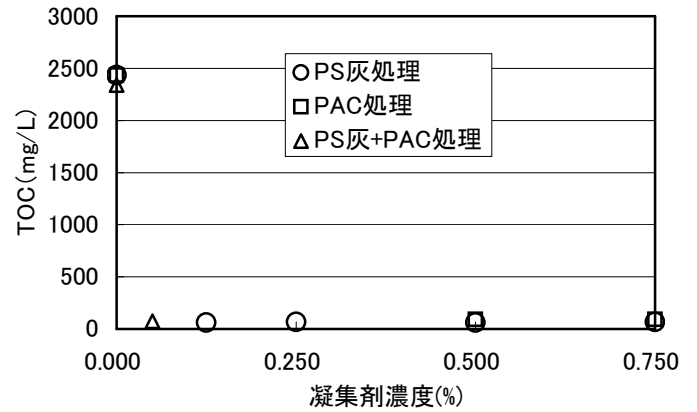


図 4 1%シリコン樹脂塗料の処理水の TOC

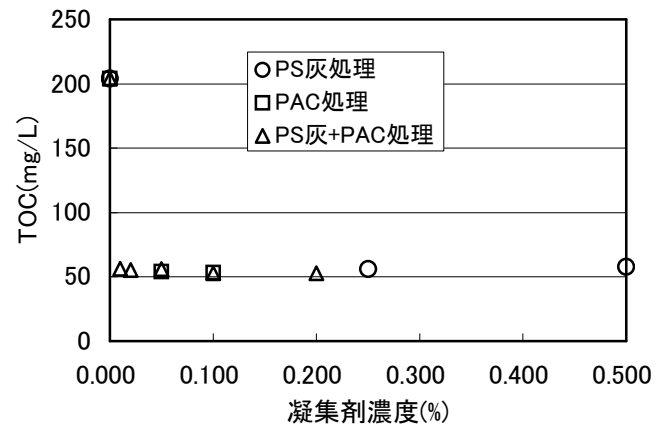


図 5 実排水の処理水の TOC

表 4 から表 6 に水性塗料液 (0.5~4.0%) の PS 灰処理, PAC 処理および PS 灰+PAC 処理による TOC および TOC 除去率を示す。凝集剤の添加量は，1%水性塗料液で凝集剤を増加しても，TOC 除去率に差がなかったことから，確実に凝集効果が得られる 0.01~1.0%で行った。

処理水の TOC 除去率は，どの処理方法においても，凝集剤の濃度にかかわらず，アクリル樹脂塗料で 66.3~68.6%，シリコン樹脂塗料で 91.1~97.7%となり，PS 灰を使用した処理方法は，PAC 処理と同等の TOC 除去効果が得られた。なお，試料濃度 4.0%では，PS 灰処理は凝集沈殿ができなかった。

表 4 水性塗料の PS 灰処理水の TOC と TOC 除去率

塗料の種類	水性塗料液		PS 灰処理水		
	塗料濃度(%)	TOC(mg/L)	凝集剤濃度(%)	TOC(mg/L)	TOC 除去率(%)
アクリル樹脂	0.5	729	0.05	240.5	67.0
	1.0	1,458	0.25	464.8	68.1
	2.0	2,916	0.25	953.4	67.3
	4.0	5,832	0.25~0.5	-	-
シリコン樹脂	0.5	1,287	0.125	42.5	96.7
	1.0	2,574	0.125	69.0	97.3
	2.0	5,148	0.125	130.1	97.5
	4.0	10,294	0.125~0.25	-	-

表 5 水性塗料の PAC 処理水の TOC と TOC 除去率

塗料の種類	水性塗料液		PAC 処理水		
	塗料濃度(%)	TOC(mg/L)	凝集剤濃度(%)	TOC(mg/L)	TOC 除去率(%)
アクリル樹脂	0.5	729	0.25	245.3	66.4
	1.0	1,458	0.25	491.9	66.3
	2.0	2,916	0.25	969.9	66.7
	4.0	5,832	0.25	1,934	66.8
シリコン樹脂	0.5	1,287	1.0	114.6	91.1
	1.0	2,574	1.0	122.4	95.2
	2.0	5,148	1.0	211.9	95.2
	4.0	10,294	1.0	239.0	97.7

表 6 水性塗料の PS 灰+PAC 処理水の TOC と TOC 除去率

塗料の種類	水性塗料液		PS 灰+PAC 処理水		
	塗料濃度(%)	TOC(mg/L)	凝集剤濃度(%)	TOC(mg/L)	TOC 除去率(%)
アクリル樹脂	0.5	713	0.02	224.9	68.5
	1.0	1,426	0.01	447.6	68.6
	2.0	2,852	0.05	907.8	68.2
	4.0	5,704	0.10	1,810	68.3
シリコン樹脂	0.5	1,170	0.02	40.1	96.6
	1.0	2,340	0.05	74.6	96.8
	2.0	4,680	0.05	124.2	97.3
	4.0	9,360	0.15	230.3	97.5

3 水性塗料液と実排水の処理水の TOC と COD の関係

水性塗料液の処理水の TOC と COD の関係を図6で示す。処理水において、TOC と COD は高い相関関係にあった。また、実排水の処理水においても同様の結果であった。

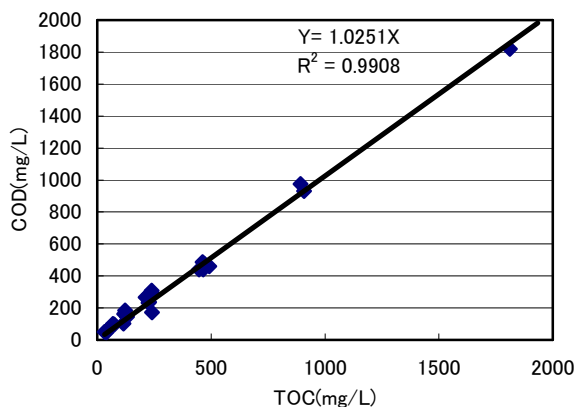


図6 水性塗料液の処理水の TOC と COD の関係

考察

アンケート結果から、水性塗料廃液は、事業者の40%が凝集沈殿法で処理しており、凝集沈殿法は、県内においても一般的に行われている水性塗料の廃液処理法と考えられた。また、40%が排水処理できずにそのまま廃棄物処理委託しており、排水処理導入にはコストと手間が課題となっている。

PS 灰処理、PAC 処理両方とも、それぞれ塩酸や水酸化ナトリウム等を用いた中和処理が必要である。しかし、PS 灰+PAC 処理の場合は中和処理が必要なく凝集沈殿ができる。さらに凝集剤の添加量もそれぞれ単独で使用するより、PS 灰+PAC 処理の方が少ない量で効果が得られるため、簡便かつ経済的であることが示された。

今回の研究では、凝集沈殿が起これば、凝集剤の添加量を増加させても、処理水の TOC 濃度はほとんど変化しなかったことから、有機物除去に関しては、凝集沈殿可能な最少の凝集剤量を添加すれば有効であることがわかった。

処理水の TOC の除去率は、アクリル樹脂塗料で約7割、シリコン樹脂塗料で9割以上であり、凝集沈殿法によって、水性塗料中の多くの有機物を除去できた。なお、塗装現場で使用されている水性塗料は、アクリル樹脂塗料またはシリコン樹脂塗料がほとんどであることから、現場でも PS 灰+PAC 処理が十分適用できると考えられた。

処理水において、TOC と COD は高い相関関係にあったことから、TOC 量は COD が排水基準に定められている海域および湖沼において排水する際の目安になると考えられる。なお、BOD については、測定を試みたが、生分解性が低いためののか、測定できなかった。

まとめ

アンケート調査結果から、水性塗料の廃液処理は、事業者の40%が凝集沈殿処理しており、40%がそのまま産業廃棄物として委託処理していた。

PS 灰と PAC を併用した処理方法は、中和処理も必要なく、簡便で低コストの水性塗料廃液処理になると考えられる。

また、PS 灰が凝集剤として、高い有効性、実用性が確認できたことから、PS 灰の有効活用による産廃の最終処分量の削減が期待できる。

謝辞

本研究を実施するにあたり、アンケート調査に御協力いただいた、一般社団法人日本塗装工業会静岡県支部の会員の皆様、PS 灰（シリカパウダー）を提供して下さった富士製紙協同組合様、塗料排水を提供して下さった塗装事業者様、TOC 測定の許可および助言をいただいた静岡県工業技術研究所環境科の皆様に深く感謝いたします。

文献

- 1) 荒川豊他：水性塗料濁水の浄化再利用装置，東京都立産業技術研究センター研究報告，4，76-77（2009）
- 2) 中尾忠弘：シックハウス問題に関する規制内容と当社の取り組み，塗料の研究，141，21-26（2003）
- 3) 西浦建貴他：建築用塗料の水性化に伴う廃水処理の調査・研究，日本建築仕上学会2008年大会学術講演会，35-38（2008）
- 4) 村松重緒他：製紙スラッジ焼却灰の紙へのリサイクル技術の開発，*Journal of the Society of Inorganic Material, Japan* 12 106-114（2005）
- 5) 江草清行他：ペーパースラッジ焼却灰系凝集固化剤による廃水の凝集効果改善，生活衛生，54，330-335（2011）

静岡県における抗インフルエンザ薬耐性株の 出現状況に関する疫学的解析

微生物部 ウイルス班 酒井悠希子, 原稔美, 池ヶ谷朝香*,
阿部冬樹, 佐原啓二

Epidemiological analysis on the appearance of anti-influenza drug resistant strain in Shizuoka Prefecture

Yukiko SAKAI, Toshimi HARA, Asaka IKEGAYA,
Fuyuki ABE and Keiji SAHARA

日本は世界最大の抗インフルエンザ薬の使用国であり、本治療薬の多用は今後も続くと考えられている。静岡県内で分離された季節性インフルエンザウイルスについて、現在国内で臨床使用されている4種の抗インフルエンザ薬（オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビル）に対する耐性の獲得状況を調べた。その結果、2015/2016 シーズンから2016/2017 シーズンにかけて分離された70株は抗インフルエンザ薬4種に対していずれも感受性であることが分かった。また、薬剤耐性株の検出法について、従来の方法より迅速かつ簡便に検出できる新たな方法を検討し、スクリーニング法として導入した。

Key words: インフルエンザ, 抗インフルエンザ薬耐性株, 新規蛍光基質, スクリーニング法
influenza, anti-influenza drug resistant strain, Novel fluorescent substrate, screening method

はじめに

日本は世界のオセルタミビル生産量の70%以上を臨床現場で使用しているとされている。日本感染症学会の指針¹⁾では、インフルエンザの治療に際し、重症化抑制のため抗インフルエンザ薬の早期投与を推奨しており、抗インフルエンザ薬の全国的な多用は今後も続くと考えられている。

現在国内で臨床使用されている抗インフルエンザ薬はオセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルの4種であり、これらの作用機序はいずれもノイラミニダーゼ (NA) 阻害である。2013/2014 シーズンには札幌市においてオセルタミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行が報告されている²⁾。また、2015/2016 シーズンにはオセルタミビルに耐性を持つ A(H1N1)pdm09 ウイルスが2565株中48株 (1.9%) 確認されており³⁾、全国的な広がりが懸念される。今後、抗インフルエンザ薬耐性株、特に耐性株出現の可能性が高い A(H1N1)pdm09 ウイルスについて解析強化が必須であ

り、Allele-specific RT-PCR 法による H275Y 変異の検出により、全国調査が行われている。

本研究では、静岡県内で分離された A(H1N1)pdm09 ウイルスについてオセルタミビル耐性獲得状況を調べた。また、抗インフルエンザ薬は A(H3N2) 亜型および B 型ウイルスによる感染時にも使用されており、これらのウイルスについても耐性株の出現の可能性があることから、A(H1N1)pdm09 以外のウイルスについても4種すべての治療薬に対する耐性の獲得状況を調べた。

調査方法

2015/2016 シーズンから2016/2017 シーズンにかけて静岡県内の感染症発生動向調査定点医療機関を受診した散発患者および学校集団発生患者から得られた咽頭ぬぐい液等から MDCK 細胞を用いて分離されたインフルエンザウイルスについて、以下の方法により耐性株の検出を試みた。

1 オセルタミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスの検出

当所において分離された A(H1N1)pdm09 ウイルス、2015/2016 シーズンに分離された28株および2016/2017 シーズンに分離された2株、計30株について、Allele-specific RT-PCR 法による H275Y 変異の検出によりオセルタミビルに対する耐性を調べた⁴⁾。分離株の赤血

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

表1 Allele-specific RT-PCR法を用いたH275Y変異の検出によるオセルタミビルに対する耐性株 (A(H1N1)pdm09ウイルス) の検出状況

供試株	感受性株	耐性株	合計
2015/2016シーズン分離株	28	0	28
2016/2017シーズン分離株	2	0	2
計	30	0	30

表2 BTP3-Neu5Acを用いた抗インフルエンザ薬に対する耐性株のスクリーニング検査結果

	オセルタミビル	ペラミビル	ザナミビル	ラニナミビル
A(H1N1)pdm09	0/28	0/28	0/28	0/28
A(H3N2)	0/23	0/23	0/23	0/23
B型山形系統	0/9	0/9	0/9	0/9
B型ビクトリア系統	0/10	0/10	0/10	0/10
計	0/70	0/70	0/70	0/70

球凝集価 (HA 価) を測定し, 8HA 価以上の株については培養上清を低速遠心して細胞由来成分を除去し, 滅菌蒸留水で 10 倍希釈したものを検体とし, 8HA 価未満のウイルス株の場合は RNA 抽出液を検体とした. Quantitect Virus+ROX Vial kit (QIAGEN) を使用しリアルタイム RT-PCR (ABI7500, Applied Biosystems) を行った. PCR 反応終了後, Allelic Discrimination 解析にて各検体の蛍光強度を測定し, Allelic Discrimination の図で Y275 陽性コントロールを結んだ線上にプロットされた検体をオセルタミビル耐性, H275 陽性コントロール上にプロットされた検体をオセルタミビル感受性と判定した.

2 新規蛍光基質(BTP3-Neu5Ac)を用いた耐性株の検出法の検討

BTP3-Neu5Ac には A 型および B 型ウイルスの NA 存在部位に強い蛍光を発する活性が報告されており⁵⁾, 本基質を用いたインフルエンザウイルスの耐性株の検出を行った.

MDCK 細胞を 96 穴マイクロプレートに撒き, 単層を形成するまで培養した. 細胞を PBS で洗浄し, 5 μg/mL アセチルトリプシン加 MEM 培地 80 μL に被検試料 (ウイルス培養液) 20 μL を加え, CO₂ インキュベーターで 34°C, 1 週間培養した. そこに抗インフルエンザ薬 4 種類を, ウェル内の最終薬剤濃度が設定した濃度となるよう添加し, CO₂ インキュベーターで 37°C, 30 分反応させた. 次に基質 (BTP3-Neu5Ac) を最終濃度が 100 μM とするよう添加し, CO₂ インキュベーターで 37°C, 最大 30 分反応させたのち, UV イルミネーター上で 365nm の紫外線を照射し蛍光像を観察した (図 1).

1) 薬剤濃度等の条件検討

被検試料のウイルス濃度については調整せず, ウイルス培養液をそのまま使用し, 新規蛍光基質濃度については一定の濃度 (100 μM) で使用した. 抗インフルエンザ薬濃度について, 各亜型の感受性株を用いて, 4 種それぞれについてスクリーニング法で使用するのに最適な濃度を検討した. すなわち, 図 1 に示した方法により, 最終濃度が 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1 および 0.5nM とするよう添加した. その後, 各亜型の耐性株を用いて, 設定した条件において蛍光がみられることを確認した.

2) スクリーニング検査

前項目 1) で設定した条件下で, 2015/2016 シーズンから 2016/2017 シーズンに当所で分離された 70 株 (A(H1N1)pdm09 : 28 株, A(H3N2) : 23 株, B 型山形系統 : 9 株, B 型ビクトリア系統 : 10 株) に対するスクリーニング検査を行い, 薬剤耐性の有無を確認した (図 2).

結果

1 オセルタミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスの検出状況

2015/2016 シーズンに分離された 28 株, 2016/2017 シーズンに分離された 2 株はいずれもオセルタミビル感受性と判定され, オセルタミビル耐性株は検出されなかった (表 1).

2 BTP3-Neu5Ac を用いた耐性株のスクリーニング検出状況

濃度等の条件を検討し, 設定した条件において各亜型の耐性株に蛍光がみられることを確認した. 以上の条件でスクリーニング検査を行ったところ, 2015/2016 シーズンから 2016/2017 シーズンに分離された 70 株

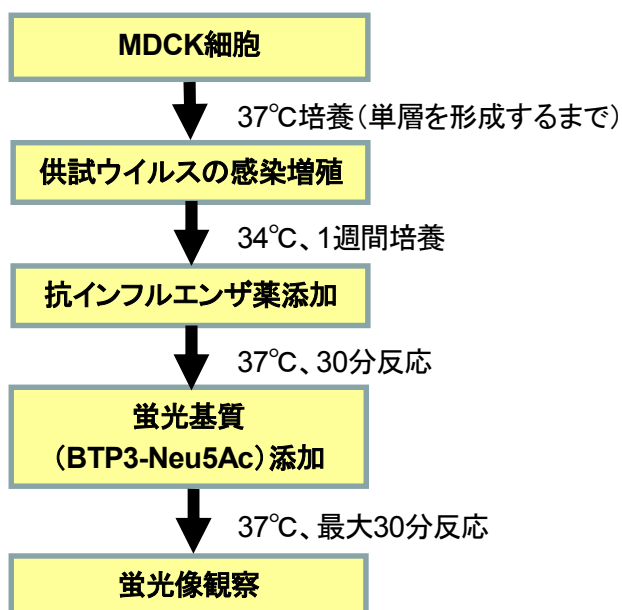


図1 BTP3-Neu5Acを用いた耐性株検出法の手順

(A(H1N1)pdm09: 28株, A(H3N2): 23株, B型山形系統: 9株, B型ビクトリア系統: 10株)は, 抗インフルエンザ薬4種に対していずれも感受性であることが分かった(表2)。スクリーニング検査においてほとんどの株が判定可能であったが, 70株中3株(4.3%)は判定に苦慮する程度の蛍光が見られたため, 確認検査(4-(methylumbelliferyl)-N-acetylneuraminic acid (MUNANA)基質を用いる蛍光法)を実施した。

考察

2015/2016シーズンから2016/2017シーズンにかけて県内で分離されたA(H1N1)pdm09ウイルス30株は, いずれもオセルタミビル感受性であり, オセルタミビル耐性株は検出されず, 懸念されていた耐性株の拡大は認められなかった。

オセルタミビル耐性のA(H1N1)pdm09ウイルス以外の耐性株についてはAllele-specific RT-PCR法により検出することができない。そのため他の方法として①ノイラミニダーゼ(NA)の塩基配列を決定し, アミノ酸変異の有無を調べる方法, ②MUNANA基質を用いる蛍光法および化学発光法(NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit, Applied Biosystems)により薬剤感受性試験を実施し, 感受性株の100倍以上のIC₅₀値(NA活性を50%阻害する薬剤濃度)を示した株を耐性株と判定する方法がある⁴⁾。これらの方法の欠点として, ①既

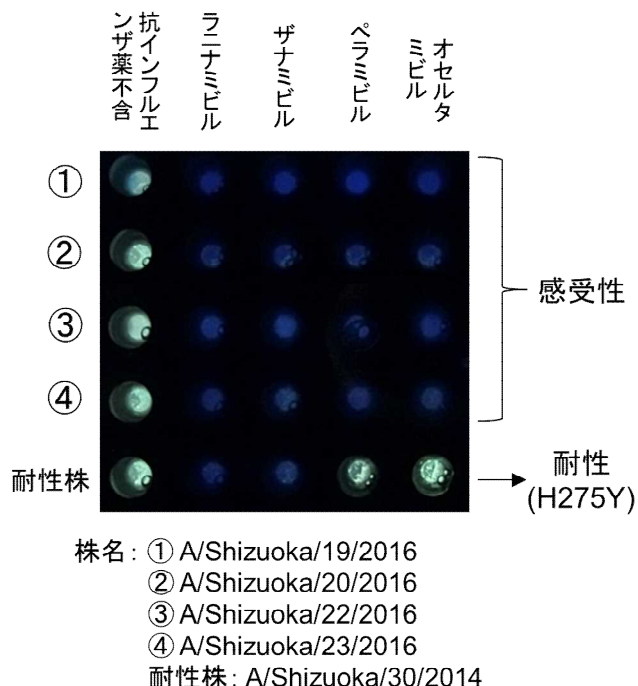


図2 BTP3-Neu5Acを用いたA(H1N1)pdm09株の耐性株スクリーニング検査の蛍光像

知の耐性獲得と関連のある変異のみの検出に限定される, ②高コストかつ操作が煩雑なため検査件数が限られる等があった。

そこで, BTP3-Neu5Acを用いた耐性株の検出法について検討した。本基質にはA型およびB型ウイルスのNA存在部位に強い蛍光を発する活性が報告されており⁵⁾, A型およびB型ウイルスのNAと反応すると, 蛍光色素であるBTP3が切り離され, そこに365nmの紫外線を照射すると強い蛍光を発するという特性を利用することにより, 耐性株を検出するためのスクリーニング法として利用できると考えた。

スクリーニング検査においてほとんどの株が判定可能であったが, 一部の株について判定に苦慮する程度の蛍光が見られたため, 確認検査を要した。このような現象が見られた原因として, 当該ウイルス株の増殖するスピードが速く, BTP3-Neu5Ac添加の時点でウイルス濃度が濃くなりすぎたことが考えられる。このように確認検査が必要となる事例は一定数みられると考えられ, 今後の課題である。

本法は従来の方法より迅速かつ簡便に耐性株を検出できる点, マイクロプレートを使用することにより一度に多数の検体を検査できる点等において優位性の高い方法であることが分かり, 本研究で検査方法を確立したため, 今後, 全国の地方衛生研究所が本法をスクリーニング法として採用することができれば, 耐性株サーベイランス

が飛躍的に充実すると期待される。

本法により、当所での 2015/2016 シーズンから 2016/2017 シーズンの分離株 70 株について、NA 阻害薬 4 種に対する薬剤耐性を調べることができた。その結果、耐性株は検出されず、現在（2017 年 3 月 15 日）のところ静岡県内において耐性株の侵淫はないことが推察された。2016/2017 シーズンにおいては国内で耐性株は検出されていない⁶⁾が、今後検出される可能性もあるため、耐性株の検出状況について引き続き継続して調査していく必要がある。耐性株の検出状況を県内の医療機関に情報提供することにより、抗インフルエンザ薬の選定等治療に役立つほか、国立感染症研究所に報告し、国がビッグデータを持つことで全国的な流行状況を把握するための一助となるので、今後も調査を続けていく。

文 献

- 1) 社団法人日本感染症学会・インフルエンザ委員会: 社団法人日本感染症学会提言 2012, 4-5, 平成 24 年 8 月 20 日
- 2) 国立感染症研究所他: インフルエンザ 2013/14 シーズン, 病原微生物検出情報, **35**, 1-3 (2014)
- 3) 国立感染症研究所他: 2015/2016 シーズンのインフルエンザ分離株の解析, 病原微生物検出情報, **37**, 4-9 (2016)
- 4) 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター他: インフルエンザ診断マニュアル (第 3 版), 58-82, 平成 26 年 9 月
- 5) Kurebayashi, Y. et al.: Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells, *Sci. Rep.*, **4**, 4877 (2014)
- 6) 国立感染症研究所: 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2017 年 3 月 15 日,
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/influ-resist.html>

ノロウイルスによる大規模食中毒防止対策に関する研究

微生物部 ウイルス班 原稔美, 荒畑沙織*, 酒井悠希子,
池ヶ谷朝香, 阿部冬樹, 佐原啓二

Study on Prevention of Foodborne *Norovirus* Outbreaks

Toshimi HARA, Saori ARAHATA, Yukiko SAKAI
Asaka IKEGAYA, Fuyuki ABE and Keiji SAHARA

ノロウイルスによる大規模食中毒防止対策のため、衛生手袋の耐久性の検討、便性状と便中のウイルス遺伝子量の関係及びトイレの拭き取り検査の有用性について検討を行った。他の素材の衛生手袋と比較し、低密度ポリエチレンおよびポリエチレン手袋は高熱に弱い、通常の使用方で衛生手袋を使用した場合は、ウイルス透過の可能性は極めて低いことが分かった。また、便の色および性状とウイルス遺伝子量に明瞭な関連性は認められず、自覚症状のみでウイルス感染の有無を判断するのは難しいことが分かった。トイレ拭き取り検査の検討については、ウイルスの検出されやすい場所が特定され、より安価で簡便な検査方法を見つけることができた。トイレの拭き取り検査を定期的に行うことは、保菌者の検出や従業員の衛生教育に役立つことから、食品取り扱い業者のリスク管理の1つとなることが期待される。本研究の結果を食品取扱業者へ普及啓発することで、ノロウイルス食中毒防止対策に寄与すると考えられる。

Key words: ノロウイルス, 衛生手袋, 便性状, ウイルス遺伝子量, トイレの拭き取り
norovirus, sanitary glove, fecal property, virus gene dosage, wipe test of toilet

はじめに

ノロウイルスによる食中毒は発生件数においても患者数においても毎年上位を占めており、効果的な防止対策が求められている。平成26年1月に浜松市で発生した学校給食の食パンを原因食品とする大規模事例では、毎日の従業員の健康チェックが行われ、検品作業には衛生手袋を使用していたにもかかわらず、不顕性感染者による食パンへのウイルス汚染を防ぐことができなかった¹⁾。

こうした状況を鑑みて、ノロウイルスによる大規模食中毒を防止するため、衛生手袋の素材別の耐久性の検討、従事者の便性状と便中のウイルス遺伝子量の関連性の解明、従業員の使用するトイレの拭き取り検査の有用性の検証の3つの課題について検討を行った。

材料および方法

1 衛生手袋の耐久性の検討

食品製造施設で使用される低密度ポリエチレン、ポリエチレン、ニトリルおよびポリオレフィンの4つの素材の衛生手袋の耐久性を検証した。それぞれの素材の衛生手袋に対し、食品取り扱い施設で想定される劣化要因に感作させた(図1)。その後、手袋内側に水を入れて1時間保持した後、劣化手袋からの水の漏出を指標としてウイルスの透過性を検証した。なお、各条件ごとに3検体ずつ実験を行った。

2 便性状とウイルス遺伝子量の関連性の解明

1) 対象検体の便の色および性状の記録

平成26年12月から平成28年1月に静岡県内で発生したノロウイルス集団感染事例において当所に搬入された調理従事者便346検体について、色および性状を記録した。なお、色は、陽性および陰性の糞便をそれぞれ5種類に大別し、性状は水様、軟、ふつう、硬の4つの区分に大別した。

2) ノロウイルス遺伝子量の測定

糞便からのノロウイルス遺伝子量の測定は、厚生労働

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

省課長通知²⁾に準じて行った。便をPBSに懸濁し10%乳剤を作成し、10,000rpm、4℃20分間遠心後、得られた上清140μLをRNA抽出に供した。RNA抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) (以下RNA抽出キット)を用いた。抽出RNAについて、DNase処理を行い、Prime Script RT Reagent Kit (TaKaRa)を用いて、RT処理した。得られたcDNA 2μLのウイルス遺伝子量をリアルタイムPCRにて*Premix Ex Taq* (Probe qPCR) (TaKaRa)を用いて測定した。

3 トイレの拭き取り検査の検討

1) 拭き取り検体

調理従事者が使用するトイレについて、4カ所(①水洗レバー・個室ドアの取っ手, ②便座表裏(洋式の場合), ③便器ふち・ふち裏, ④床(和式の場合))を拭き取り場所として選定し、食中毒疑い施設調査時に、あらかじめ内部の緩衝液を5mLに減らしたふきふきチェックII(栄研化学)(以下拭き取りキット)を用いて、トイレの拭き取りを行った。

2) 拭き取り検体の前処理

拭き取りキットの緩衝液に、10%Beef extract 加PBS 3mLを加え、30分間振盪した。10,500rpm 20分間遠心後、上清を3%ショ糖液に重層し、50,000rpm 2時間超高速遠心した。遠心分離後のペレットを1×Toris/Glycine/SDS buffer 145μLに懸濁させ、12,000rpm、5分間遠心し、上清140μLをRNA抽出に供した。RNA抽出とノロウイルス遺伝子測定については、前述(2.2))のとおり実施した。

3) 前処理方法の比較

模擬的に拭き取りキットでノロウイルスの付着した面を拭き取るため、ステンレストレイを100cm²に区画し、各区画に糞便乳剤を塗布後、風乾させた。各区画を拭き取りキットで拭き取り、A法、B法およびC法の3つの前処理方法を実施し、前述(2.2))のとおりノロウイルス遺伝子測定を行い、結果を比較した。

①A法(超高速遠心法)

前述の3.1) 2)のとおり前処理を行い、RNAキットを用いて抽出を行った。

②B法(非晶性リン酸カルシウム微粒子法³⁾)

拭き取りキットの緩衝液に非晶性リン酸カルシウム0.1gを加え、1時間振盪した。9,300rpm 10分遠心し、非晶性リン酸カルシウム微粒子を集めた。RNA抽出キットのAVL 250μL, TRIZOL-LS 750μL, クロロホルム 200μLを加え、懸濁し、12,000rpm 15分間遠心して、水層を回収した。水槽に0.8倍量のエタノールを加え、RNA抽出キットを用いて、RNA抽出を行

った。

③C法(絞り出し法⁴⁾を改変)

拭き取りキットの緩衝液をすべて捨て、拭き取りを行った。綿棒の綿球を140μLのPBSに懸濁し、絞り取ったPBSをRNA抽出に供した。RNA抽出には、RNA抽出キットを用いた。

劣化要因	各条件
温度(°C) (3時間)	-20
	4
	37
	65
	100
薬剤 (3時間)	次亜塩素酸Na
	エタノール
	アミラーゼ
	トリプシン
pH (3時間)	酸性(pH4)
	中性
	塩基性(pH8)

図1 衛生手袋劣化条件の検討

結果

1 衛生手袋の検証

紫外線照射済みの低密度ポリエチレン手袋およびポリエチレン手袋を100℃に感作したところ、それぞれ3検体中2検体で水の漏出が認められた。他の素材や他の温度感作では漏出は認められなかった(表1)。紫外線照射未実施のものでも同様に、低密度ポリエチレン手袋3検体中2検体、ポリエチレン手袋3検体中1検体で水の漏出が認められたが、他の素材や他の温度感作では、水の漏出は認められなかった。

紫外線照射済みの手袋を薬剤やpHに感作させた場合、すべての実験条件で水の漏出は認められなかった(表2)。紫外線照射未実施のものも同様であった。

2 便の色および性状と便中のウイルス遺伝子量の関連性調査

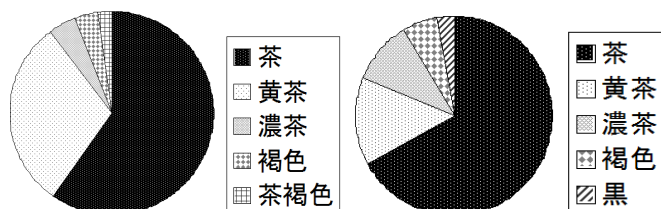
ノロウイルス遺伝子陽性の糞便と陰性の糞便では、糞便の色の割合に大きな違いは認められなかった(図2)。糞便の性状に関しても、陽性検体と陰性検体で性状の割合に大きな違いがなかった(図3)。陽性検体についてウイルス遺伝子量と便性状の関連性を調べたところ、糞便の性状ごとにウイルス遺伝子量に特徴的な所見は認められなかった。また、硬い糞便であっても10⁹copise/1g以

表1 手袋の劣化条件（温度）別の水の漏出結果

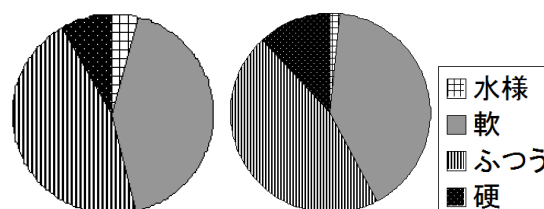
	温度				
	-20℃	4℃	37℃	65℃	100℃
低密度ポリエチレン（低PE）	0	0	0	0	2
ポリエチレン（PO）	0	0	0	0	2
ニトリル（Nit）	0	0	0	0	0
ポリオレフィン（PO）	0	0	0	0	0

表2 手袋の劣化条件（薬剤，酵素，pH）別の水の漏出結果

	次亜塩素酸 ナトリウム	エタノール	アミラーゼ	トリブシン	酸性 (pH4)	中性	塩基性 (pH8)
低PE	0	0	0	0	0	0	0
PE	0	0	0	0	0	0	0
Nit	0	0	0	0	0	0	0
PO	0	0	0	0	0	0	0



ノロウイルス陽性検体 ノロウイルス陰性検体
図2 ノロウイルス感染の有無別の糞便の色の割合



ノロウイルス陽性検体 ノロウイルス陰性検体
図3 ノロウイルス感染の有無別の性状の割合

上のウイルスが検出された検体も認められた（図4）。

3 トイレの拭き取りの検討

調理従事者便からノロウイルスが検出された施設 10 施設のうち 4 施設のトイレからノロウイルス遺伝子が検出された。拭き取り場所別では、水洗レバー・個室ドアの取っ手 7.7% (1/13)，便座表裏 50% (4/8)，便器ふち・ふち裏 33.3% (4/12)，床 0% (0/5) であり、便座表裏が最も高かった。リアルタイム PCR 実測値別では、 10^0 コピー以下の数コピー検出された検体が最も多かった（表3）。

また、3 種類の前処理方法を比較すると、 5.2×10^2 コピーのウイルスを塗布した場合は、いずれの前処理方法でも、1 コピー前後検出された。 5.2×10^3 コピーのウイルスを塗布した場合は、A 法は比較的検出量が低く、B 法と C 法の検出量はほぼ同等であった（表4）。

考察

食品取り扱い施設で使用する衛生手袋について、低密度ポリエチレンおよびポリエチレン手袋は、他の素材の

衛生手袋と比較して、高熱により劣化しやすいことが分かった。しかし、 100°C に 3 時間感作という極端な条件であり、通常の使用方法であれば、ウイルスが手袋を透過する可能性は低いと考えられる。さらに、今回の劣化条件では、薬剤や pH 同様に紫外線照射は手袋の劣化要因となっていないことが分かった。以上のことから、手袋を介してウイルスが食品に付着しないようにするためには、素材にかかわらず、手袋着用前に十分な手洗いをすることや着用時に手袋の食品に触れる部分に素手で直接触れないこと、手袋着用後に食品以外の物を触れないようにすることが重要であると考えられる。

糞便の色や性状とノロウイルス感染の有無には明らかな関連性は認められず、自覚症状のみからウイルス感染の有無を判断することは難しいことが分かった。このことから、食品取り扱い施設では、健康チェック（定期的な検便、自己申告やリーダーの点検等）以外の管理方法を検討する必要がある。同時に、下痢をしていなくても保菌をしている可能性があることから、用便後の衛生管理の徹底を啓発することや、ウイルス感染者の従事を前提とした日頃からの衛生管理の啓発が必要であることが

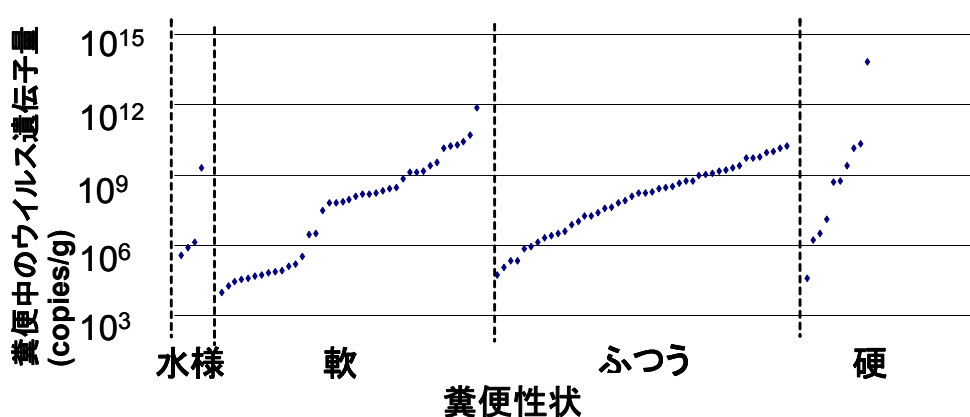


図4 糞便性状とウイルス遺伝子量

表3 トイレの拭き取り場所ごとのウイルス遺伝子検出量

拭き取り場所	リアルタイムPCR 実測値 (オーダー)						計
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰ 以下	Ud	
水洗レバー・ ドアの取っ手	0	0	0	0	1	12	13
便座表・裏	1	0	0	1	2	4	8
便器ふち・ふち裏	0	0	1	0	3	8	12
床	0	0	0	0	0	5	5

Ud:undetermined

表4 前処理方法別の拭き取り検体からのノロウイルス検出量の平均値の比較

	ステンレストレイに塗布したウイルス量 (copies)		
	5.1×10	5.2×10 ²	5.2×10 ³
A法	Ud	1.4	3.2
B法	Ud	1.6	21.5
C法	0.7	0.9	21.9

Ud:undetermined n=4

再認識された。

トイレの拭き取り検査では、調理従事者便がノロウイルス陽性の10施設中4施設のトイレからノロウイルスが検出された。便座表裏や便器のふちは比較的検出率が高く、検査のための拭き取り場所として適当と考えられた。便器より便座での検出率が高い理由は、便座では用便時に跳ね返った便が流されずにそのまま付着しているからと推測された。

また、拭き取り検査で検出されたノロウイルス遺伝子の検出量は、通知法に基づく行政検査において陰性と判定される10コピー未満の検体が多かった。そのため、より感度の高い検査方法で実施することにより、より多くの検体からウイルスを検出することができる可能性が示

唆された。

そこで、3つの前処理方法を比較検討したところ、ウイルス遺伝子の検出量は、B、C法がほぼ同等であり、通常用いられているA法より優れていた。また、試薬等のコストや処理時間の点では、C法が最も優れており、検査方法としてより適していると考えられた。C法を用いることで、従来法より安価に早く結果を知ることができ、陽性になった場合は保菌者の存在を意味するので、衛生管理の徹底などの早期の対応が可能である。

実際に、定期的なトイレの拭き取り検査をすることで、保菌者がいることを確認できた事例もあった⁵⁾。近年、セントラルキッチン の普及や給食施設のセンター化により食中毒が大規模化しやすく、また、小規模施設を含め

た食中毒でも金銭的損害が1施設あたり約180万円と大きいことから⁶⁾、拭き取り検査が安価となれば、リスク管理のための投資として十分見合うと考えられる。これらのことから、C法を用いた定期的なトイレの拭き取り検査は、従業員の不顕性感染者を把握するための新たな管理の手法の1つとなることが期待される。加えて、モニタリングを行うことによる調理従事者への衛生教育の検証にも役立つことが期待される。

本研究の結果を食品取扱業者へ普及啓発することで、ノロウイルス防止対策に寄与すると考えられる。

謝辞

拭き取り検査の検体収集にあたり、ご協力いただいた保健所担当者の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 古田敏彦他：浜松市内におけるノロウイルス集団食中毒事例，病原微生物検出情報，**35**，164-165（2014）
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全監視安全課長通知：食安監発第0514004号（平成19年5月14日）「ノロウイルスの検出法について」
- 3) 峯岸俊貴他：非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いたふきとり検体からのウイルス検出法，日本食品微生物学会第37回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集，**32**，（2016）
- 4) 鈴木理恵子他：ふきとり検体におけるノロウイルスの検出について，神奈川県衛生研究所研究報告，**46**，18-21（2016）
- 5) 高橋明子他：給食施設拭き取り検査から見えたトイレの衛生管理～ノロウイルス検出事例からの一考察と衛生指導への活用～，平成28年度全国食品衛生監視員協議会第56回関東ブロック研修大会抄録，32-35（2016）
- 6) 静岡県健康福祉部：食中毒発生による損害，平成27年 静岡県の食中毒，**11**，（2016）

静岡県におけるレプトスピラの汚染実態に関する研究

微生物部 細菌班 村田学博, 牧田幸久*, 鈴木秀紀,
森主博貴, 松橋平太, 山田俊博,
長岡宏美, 佐原啓二

A study concerned with pollution status of Leptospira in Shizuoka Prefecture

Michihiro MURATA, Yukihisa MAKITA, Hideki SUZUKI,
Hirotaka MORINUSHI, Heita MATSUHASHI, Toshihiro YAMADA
Hiromi NAGAOKA and Keiji SAHARA

静岡県内のレプトスピラ汚染実態を調べるため、静岡県動物管理指導センターに収容されたイヌと野外で捕獲、採取されたイノシシ、ネズミ、及びたまり水を用いて、病原性レプトスピラの検出に有用な鞭毛遺伝子 (*flaB*)¹⁾を探索した。ヒトへの身近な感染源であるイヌ 96 頭では *flaB* は検出されず、イヌがヒトへの感染源になる可能性は低いと考えられた。自然環境からの感染源となるイノシシでは 371 頭中 39 頭 (10.5%)、ネズミでは 95 匹中 6 匹 (6.3%) で *flaB* が検出され、さらにたまり水 55 検体より分離されたレプトスピラのうち 5 検体 (9.1%) で *flaB* が検出された。このことから病原性レプトスピラは県内自然環境に潜んでいることが確認され、本菌との接触の場となり得るアウトドア活動時には、その感染に注意する必要があることが示唆された。

Keywords: 病原性レプトスピラ, レプトスピラ症, *flaB*, アウトドア活動
pathogenic leptospires, leptospirosis, *flaB*, outdoor activity

はじめに

レプトスピラは、通常長さ 6~20 μm 、直径 0.1 μm のらせん状の細菌で淡水中や土壌中等の環境中に広く存在しており、病原性レプトスピラと非病原性レプトスピラに大別される。病原性レプトスピラは保菌動物(ウシ、シカ、イノシシ、ブタ、ネズミ、イヌ等)の尿あるいは尿で汚染された水や土壌との直接的な接触により経皮的に感染しレプトスピラ症を引き起こすことが知られている²⁾。

ヒトのレプトスピラ症は感冒様症状の軽症型から黄疸、腎障害を呈する重症型まであり、以前は全国で年間 50~250 人程度が死亡していたが、現在は環境の清浄化や農作業の機械化などにより、その発生は減少している²⁾。

静岡県においては 1960 年頃まで天竜川流域で秋疫や天竜病として流行していたが、近年その発生は少なくな

ってきた。しかし平成 25 年にトライアスロン大会の参加者が発症した事例³⁾や、猟犬の集団発生事例⁴⁾があり、県内の病原性レプトスピラの汚染が今も継続している可能性が改めて示唆された。近年増加するキャンプやハイキング等のアウトドア活動が感染の場となることも考慮すると、再びレプトスピラ症が流行することが危惧されたため、ヒトに身近な感染源としてのイヌ、及び自然環境からの感染源としてイノシシ、ネズミ及びたまり水について病原性レプトスピラの汚染実態を調査した。

調査方法

1 イヌにおける病原性レプトスピラ感染及び抗体保有状況
供試材料として動物管理指導センターに収容されたイヌ 96 頭の腎臓及び血清を用い、国立感染症研究所のレプトスピラ症病原体検査マニュアル⁵⁾に従い遺伝子検査と抗体検査を行った。

1) 遺伝子検査: イヌの腎臓から、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いて、DNA を抽出し NestedPCR で病原性レプトスピラの鞭毛遺伝子である *flaB*¹⁾の探索を行った。

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)

* : 静岡県東部健康福祉センター

2) 抗体検査(顕微鏡下凝集試験(Microscopic Agglutination Test: MAT)) : 56°C30 分加熱して非働化したイヌの血清を PBS (-) で希釈し, 国立感染症研究所より分与された 4 種類の血清型の病原性レプトスピラ抗原 (Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Hebdomadis, Australis) と混合し, 30°C で 3 時間反応させ, コントロールと比較して凝集していない菌数が 50% 以下になっているかを暗視野顕微鏡 (×100 倍) で観察した. 血清の希釈倍率が 100 倍以上で陽性像が確認されたものを陽性と判定した.

2 野生イノシシ, 野ネズミ及びたまり水の汚染実態調査

県内の野山や河川周辺で捕獲採取されたイノシシ 371 検体及びネズミ 95 検体の腎臓と, たまり水 55 検体について, 国立感染症研究所のレプトスピラ症病原体検査マニュアル⁵⁾に従い遺伝子検査を行った.

遺伝子検査: イノシシ及びネズミの腎臓から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し, NestedPCR で *flaB* を探索した. たまり水については採取したものを 1 日静置後, その上清 1ml を 5 種類の抗生剤 (サルファメトキサゾン, 40 μg/mL ; トリメトプリム, 20 μg/mL ; アンフォテリシン B, 5 μg/mL ; フォスホマイシン, 400 μg/mL ; 5-フルオロウラシル, 100 μg/mL) を添加した EMJH 培地 5ml に接種し 30°C で培養した⁶⁾. さらに 1 週間ごとにレプトスピラの増殖を暗視野顕微鏡で観察し, 増殖が見られれば DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出をおこない NestedPCR で *flaB* を探索した.

結果

1 イヌにおける病原性レプトスピラ感染状況と抗体保有状況(表1)

動物管理指導センターに収容されたイヌ 96 頭中 8 頭 (8.3%) がレプトスピラに対する抗体を保有していた. 一方, *flaB* の保有は確認されなかった.

表1 イヌにおける *flaB* 検出状況及び抗体保有状況

検査頭数	<i>flaB</i> 陽性数	抗体陽性数 (%)	血清型内訳			
			Ict*	Aut*	Heb*	Aus*
96	0	8 (8.3)	4	0	2	2

* Ict ...Icterohaemorrhagiae Aut ...Autumnalis
 Heb ...Hebdomadis Aus ...Australis

2 野生イノシシ, 野ネズミ及びたまり水の汚染実態

県内の野山や河川周辺で採取されたイノシシ, ネズミ及

びたまり水で, *flaB* 陽性はイノシシで 371 頭中 39 頭 (10.5%), ネズミで 95 匹中 6 匹 (6.3%), たまり水 55 検体中 5 検体 (9.1%) であった(表2).

また陽性検体は, 県西部, 中部, 東部の全ての地域で確認された(図1).

表2 野生動物及び環境における *flaB* 検出状況

	イノシシ		ネズミ		たまり水	
	検査数	陽性数 (%)	検査数	陽性数 (%)	検査数	陽性数 (%)
西部	117	15 (12.8)	32	0 (0)	21	1 (4.8)
中部	107	12 (11.2)	24	4 (16.7)	11	3 (27.2)
東部	147	12 (8.1)	39	2 (5.1)	23	1 (4.3)
計	371	39 (10.5)	95	6 (6.3)	55	5 (9.1)

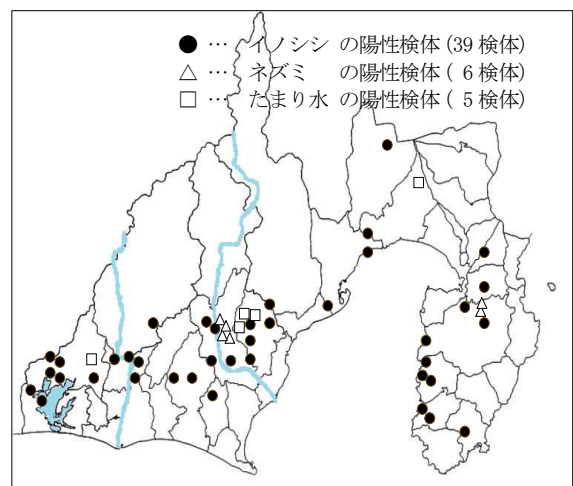


図1 イノシシ, ネズミ及びたまり水の *flaB* 陽性検体分布

考察

今回調査した動物管理指導センターに収容されたイヌについては, 病原性レプトスピラの鞭毛遺伝子である *flaB* が検出されなかったことから, イヌからヒトが感染する可能性は低いと思われる. しかし, 一方で抗体の保有率が 8.3% と低いことから, イヌが病原性レプトスピラに暴露された場合には感染防御ができず, ヒトに身近な感染源になる可能性が高いと思われた. 抗体を保有していたイヌについては, 犬種や保護時の状況等から過去に飼養されていた可能性が高く, イヌのレプトスピラワクチンを接種していたことによるものと推察された. これらのことから野外にイヌを連れて行く場合には, 野生動物との接触, たまり水への入水及び飲水等に注意が必要であると思われた.

環境の汚染指標として野山や河川等で捕獲、採取されたイノシシ、ネズミ、たまり水を調査したところ、過去の流行地であった西部地域以外でも *flaB* 陽性検体が分布していた。検体採取場所はヒトの生活圏とは異なるものの、これら地域の野外における野生動物との接触、たまり水への入水等は病原性レプトスピラ感染のリスクがあることが示唆された。

近年の病原性レプトスピラの感染要因としては、河川（滝や池を含む）でのレジャーや労働によるものの報告が多い⁷⁾。加えてレプトスピラ症の存在やその予防方法があまり知られていないことを考慮し、今後も県内のレプトスピラ症に対する監視を行っていく必要があると思われた。

まとめ

今回、県内の病原性レプトスピラ汚染実態調査を行い、依然として本菌が自然環境に潜んでいることが確認された。今後はレプトスピラ症が流行する前に発生防止対策をとることが危機管理上重要である。レプトスピラ症の予防方法として病原体に直接触れないことが重要であり、また仮に発症した場合でも患者からレプトスピラ症を疑わせる申告があれば早期診断、治療につながり重症化を防ぐことが出来る。そのため今回の調査に基づいた啓発資料を作成し、本症の予防方法や症状等を周知していく。

文献

- 1) Natarajaseenivasan K . et al : FlaB PCR-based Identification of Pathogenic Leptospiral Isolates J Microbiol Immunol Infect, **43**, 1, 62-69(2010)
- 2) 小泉信夫 他：レプトスピラ症の最新の知見，モダンメディア，**52**，10，299－306(2006)
- 3) 田島靖久 他：静岡県で開催されたトライアスロン参加後に感染したと推定されたレプトスピラ症の1例，病原体検出情報，**35**，1，16(2014)
- 4) 公益財団法人静岡県獣医師会：レプトスピラ感染症について（注意喚起），平成25年11月19日付事務連絡
- 5) 国立感染症研究所：レプトスピラ症 病原体検査マニュアル <http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/leptospirosis.ver2015-2-2.pdf>
- 6) Chalraborty A. et al:a novel combination of selective agents for isolation of Leptospira species, Microbiol Immunol, **55**, 7, 494-501(2011)
- 7) レプトスピラ症 2007年1月～2016年4月，病原体検出情報，**37**，6，1-2(2016)

医薬品等試験検査における妥当性確認について

医薬食品部 医薬班 今津佳子, 渡辺陽子*, 金子亜由美,
瀧野瑠衣, 岩切靖卓, 浜尾 俊,
小和田和宏

Validation and Verification of Quality Test Methods for Medicines

Yoshiko IMAZU, Yoko WATANABE*, Ayumi KANEKO,
Rui TAKINO, Yasutaka IWAKIRI, Syun HAMAO
and Kazuhiro OWADA

当研究所は、1997年度の食品GLPの法制化を端緒として、1999年度から医薬品等の試験検査に関して業務管理による試験検査結果の信頼性確保に取り組んできた。2013年度からは医薬品等の試験検査に関する公的認定試験検査機関として静岡県健康福祉部生活衛生局薬事課からの認定を受け、品質管理監督システムによる管理を実施している。この中で認定権者からは認定の要件である試験方法の「妥当性確認」の実施を求められている。

しかし、PIC/S（医薬品査察協議会及び医薬品査察共同スキーム）のGMPガイドラインには試験方法の妥当性確認について具体的な方法は示されていない。そこで、当県が実施するGMPに基づく収去検査の迅速化と信頼性向上に役立てるため、当研究所における試験方法の「妥当性確認」の手順を明確化するための基本的な判断フローを作成したので、その有用性や課題について報告する。

Key words: 医薬品, 試験検査方法, 妥当性確認, 公的認定試験検査機関

medicine, quality test method, validation and verification, official medicines control laboratory

はじめに

静岡県は、都道府県別の医薬品および医療機器の出荷額において常に上位を占めており¹⁾、わが国における主要な医薬品等の生産県として医薬品等製造業者の育成に力を入れてきた。当研究所は、県内で製造・流通する医薬品および医薬部外品（以下、医薬品等）の品質を確保するため、県薬事課から公的認定試験検査機関として認定を受け、保健所等が収去した医薬品等について製造販売承認書等（以下、承認書等）の規格及び試験方法により、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保に関する法律（医薬品医療機器法）に基づく収去検査を実施している。

医薬品等の製造における分業や流通の国際的な広がりに伴い、欧州の調査当局を中心としてPIC/S（医薬品査

察協議会及び医薬品査察共同スキーム）という枠組みがある²⁾。加盟国間での査察品質の維持向上や査察情報の共有等により、医薬品等使用者の保護、行政リソースの有効活用、日本の製薬業界の地位確保・サポート等に寄与するため、我が国は国内の制度・体制を整え、2014年7月にPIC/Sへの加盟を果たした。

PIC/Sへの加盟にあたり、地方衛生研究所である当研究所は、GMP調査要領³⁾に示された公的認定試験検査機関の要件の一つとして、認定権者である県薬事課から、医薬品等の試験方法の「妥当性確認」について手順書に明記し実施することが求められた。ここでいう「妥当性確認」は、試験方法が開発された製造販売業者等とは異なる試験環境である当研究所でも収去された医薬品等の試験検査を問題なく実施できることを確認するためのもので、公定書に規定された試験方法や承認書等に規定されたバリデーション済みの試験方法についてもその実施が求められる。

試験方法が、確認試験や定量の目的を果たし、結果の適否の判断に支障がなく妥当な方法であるかどうかを確認するためには、日本薬局方の参考情報に掲載されてい

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)

* : 静岡県富士健康福祉センター

る分析法バリデーション⁴⁾を行うことが望ましい。しかし、地方衛生研究所の立場では、標準品等を収去検査に必要な量を超えて入手することは困難であり、分析法バリデーションで必要とされる主成分抜き製剤の入手は不可能である。そこで、当研究所では、2013年度から、実施可能な範囲での「妥当性確認」に取り組んできた。

当研究所における医薬品等の収去検査方法の多くは、試験品を入手してから詳細が判明するため、予め手順を作成することができない。従って、収去の都度、承認書等の試験方法から試験検査手順を記載した文書を作成している。すなわち、当該試験方法を行うに当たって「妥当性確認」できる手法を各担当者が考え、試験検査責任者および試験法妥当性確認責任者が確認するというトリプルチェックを行い実施する手順となっていたため、準備作業がやや煩雑化していた。

そこで、当研究所で実施すべき試験方法の「妥当性確認」方法を検討し、標準化することにより、公的認定試験検査機関として試験検査結果の信頼性向上に寄与するとともに、試験検査実施の迅速化および効率化に役立つため、2015年度までの「妥当性確認」の結果をもとに、「妥当性確認」の方法を設定するときの考え方を示した基本フローを作成し、2016年度にそのフローに基づき試行し支障ないことを確認した。

方 法

1 「妥当性確認」の方法

当研究所では、承認書等に記載された規格及び試験方法について、原則として全項目を実施している。

「妥当性確認」の方法として、分析法バリデーションを行う場合に要求される分析能パラメーターを考慮の上、収去試験の前または同時に、主成分抜き製剤を用いず、かつ、標準品を原則として規格及び試験方法に記載の量を超えて使わない方法で実施した。主な実施項目を以下に示す。

1) 特異性の確認

確認試験、純度試験および定量などを対象とし、規格及び試験方法で空試験が設定されていない項目について、試料溶液の調製に用いる溶媒や操作ブランク等を測定し、妨害がないこと等を確認した。

2) 直線性の確認

定量について、検量線が設定されている場合はその検量線について、1点検量線が設定されている場合であって設定された濃度以外の濃度の標準溶液を2点調製可能な場合にはそれらを追加で測定し、3点検量線として信号値と濃度の関係の直線性の確認を行った。

3) 標準溶液の測定精度の確認

システムの再現性の許容限度値の設定のない定量については、標準溶液の信号値の相対標準偏差を指標として測定精度の確認を行った。

4) 試験品測定の間行精度の確認

定量に関して、繰り返し数3回で定量値の相対標準偏差を指標として間行精度の確認を行った。

5) 添加回収率の確認

定量に関して、2段階以上希釈して標準溶液を調製する場合など、測定対象成分を含む試験品に追加で添加可能な場合について、回収率の確認を行った。添加量は、当該成分の表示量の20%を基本としてホールピペット等を用いて正確に添加できる量とした。添加量が当該成分の表示量の20%のとき、回収率20%の誤差は、表示量に対し4%に相当する。

2 「妥当性確認」に関する事例の収集および解析

2013～2016年度までに医薬品等の収去検査の際に実施した「妥当性確認」の結果を集計した。そのうち実施頻度が高い液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)を用いた定量について直線性および精度等に関する指標の分布を確認した。

3 「妥当性確認」に関する基本的なフローの作成および試行

2の結果のうち、2015年度までに得られた結果や、医薬品等の試験検査における過去の問題事例⁵⁻¹⁴⁾等を参考に、「妥当性確認」を試験方法の手順の中に設定するときの考え方を記載した基本フローの原案を作成した。

そして、その原案を2016年の収去検査に利用し、問題がないか確認した。

結果および考察

1 「妥当性確認」の実績

1) 医薬品等の収去検査項目数

2013年度～2016年度の医薬品等の収去検査品目数お

表1 医薬品等の収去検査検体数および試験した項目数

年度	医薬品		医薬部外品		計	
	検体数	項目数	検体数	項目数	検体数	項目数
2013	32	288	12	86	44	374
2014	27	232	12	102	39	334
2015	27	222	12	115	39	337
2016	25	216	12	128	37	344
計	111	958	48	431	159	1,389

および試験項目数は、表1のとおりであった。

2) 主な「妥当性確認」項目に関する実施件数

2013年度～2016年度に実施した主な「妥当性確認」項

表2 「妥当性確認」件数(2013～2016年度)

主な妥当性確認項目	延べ件数	HPLC 定量件数(再掲)
特異性：ブランクの測定	708	159
直線性	182	108
精度：標準溶液の測定精度	109	43
精度：試験品測定の併行精度	280	159
真度：添加回収試験	92	76
計	1,371	545

目の件数は表2のとおりであった。

特異性の確認を目的としたブランクの測定は実施可能な試験項目で実施しており、その数は試験項目の半数にのぼる。直線性、試験品測定の併行精度および添加回収試験は、標準溶液の調製方法により実施の可否が左右されるが、「妥当性確認」実施件数のうち HPLC 定量に関する件数が過半数を占めた。

3) HPLC 定量に関する結果

収去試験で汎用されており「妥当性確認」の実施件数が多かった HPLC 定量について、直線性の確認結果として相関係数と測定濃度の関係を図1に、添加回収試験における回収率と試験品測定の併行精度の関係を図2に示す。

直線性の確認を行った延べ108件のうち、目標として設定した相関係数 0.999 以上を達成できたものは延べ105件であった(図1)。目標を達成できなかった事例は、いずれも絶対検量線法であり、かつ、測定濃度が低いものであったが、定量値の適否の判定に支障のあるレベル

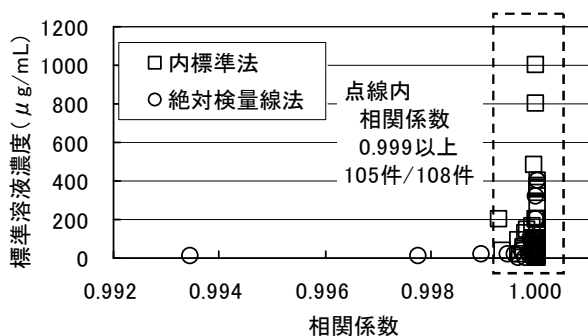


図1 直線性の確認結果 (測定濃度との関係)

ではないと考えられた。

添加回収試験を行った延べ76件のうち、延べ71件で回収率80～120%、試験品測定の併行精度3%以下を満たした(図2)。回収率が低かった2件の事例は、いずれも液液抽出を行う前に、試験品の抽出に用いるものとは異なる組成の溶媒に溶かした標準溶液を添加した事例であり、試験品の定量では問題はないと考えられた。また、試料

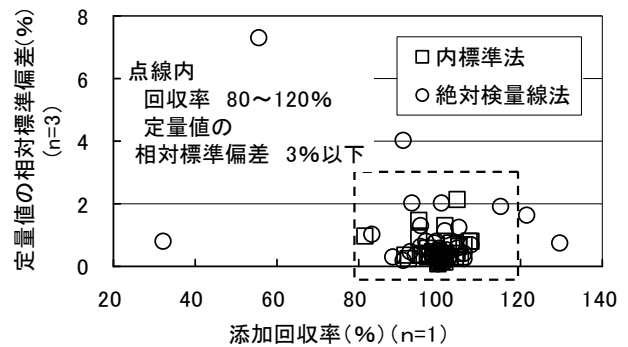


図2 添加回収率の確認結果 (試験品測定の併行精度との関係)

測定の相対標準偏差が3%を超える事例について確認したところ、植物エキス由来の成分を定量する方法であって規格幅が広く設定されており、適否の判定には支障ないと考えられた。

2 「妥当性確認」の基本フローの作成および試行の結果

2013～2015年度までの「妥当性確認」の集計結果等をもとに、確認試験、純度試験および定量等について「妥当性確認」を設定するための考え方を示した基本フロー

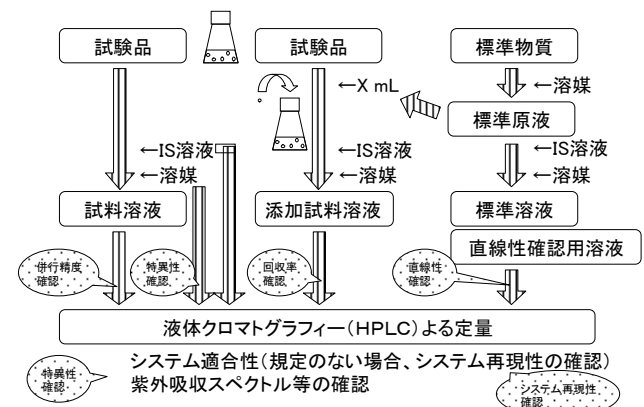


図3 「妥当性確認」の基本フローの例 (HPLCによる定量の例)

を作成した。そのうち、HPLC 定量の例を示す(図3)。

このほか、試験品の性状等に応じたブランクの調製方法を明記し、HPLC 定量で試料溶液と標準溶液を等量混合して測定した場合、ピーク形状の変化など妨害がないことを確認する手順などの手法を加えた。

このように作成した基本フローを用いて 2016 年度に試行したところ、「妥当性確認」方法を支障なく設定できることが確認できた。

以上の検討結果から、「妥当性確認」の主な項目について、表3に示目標値を設定した。

3 「妥当性確認」に関する課題

1) 目標値について

表3 「妥当性確認」における目標値

分析能	指標	目標
特異性	ブランク試料の測定結果等	判定に支障ないこと
直線性	検量線の相関係数 (3点検量線)	0.999以上
精 度	標準溶液測定時の信号値の 相対標準偏差 (n=6)	2.0%以下
	試験品の測定結果の 相対標準偏差 (n=3)	3.0%以下
真 度	試験品への添加回収試験の 回収率 (n=1)	80~120%

前項で、「妥当性確認」結果に関する目標値を掲げたが、回収率は、多くの試験方法で採用されている定量の規格幅 10~20%の試験品を想定した一律のものとなっており、例えば生薬エキスが配合された試験品など、多くの成分を含み天然物由来成分として広い規格幅が設定された試験品に適用するには厳しい目標となっている可能性がある。今後も事例を収集し、見直していきたい。

2) 「妥当性確認」の基本フローについて

本研究では、「妥当性確認」の基本フローとして支障ないものができたが、これらは、汎用される試験方法を想定して作成したものであり、収去検査で用いる可能性のある試験方法を網羅できていないわけではないため、今後、当研究所での事例を蓄積した上でより良いものにしていきたい。

まとめ

収去検査を実施する上での「妥当性確認」の方法の設定は、これまで試験方法の入手の都度各担当者が行い、確認者によるトリプルチェックを行っていたが、収去試験の準備期間の短縮による迅速化と結果の信頼性向上を目的として、「妥当性確認」の手順の明確化のための検討を行った。

2013~2015年度の「妥当性確認」の記録および集計結果から、「妥当性確認」を試験手順の中に設定するための基本フローを作成し、2016年度にそれを用いて試行したところ、支障なく用いることができた。また、これらの検討結果から、「妥当性確認」項目に関する目標値を設定した。

今後も事例を蓄積し、国や他県の公的認定試験検査機関と情報交換しながら、より良いものにしていきたい。

また、これらの検討の結果や「妥当性確認」の過程で得られる知識経験を、収去検査だけでなく、知事権限の

医薬品等製造販売承認申請における規格及び試験方法の審査業務や医薬品等製造業者等に関する相談業務等への対応に役立てることにより、県民が利用する医薬品等の品質・有効性・安全性の確保の一助としていきたい。

文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ薬事工業生産動態統計調査：結果の概要,
<http://www.mhlw.jp/toukei/list/105-lc.html>
- 2) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課：PIC/AのGMPガイドラインを活用する際の考え方について、平成24年2月1日、事務連絡
- 3) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知：GMP調査要領の制定について、平成24年2月16日、薬食監麻発0216第7号
- 4) 厚生労働省：第十七改正日本薬局方、平成26年3月7日付厚生労働省告示第64号
- 5) 山本政利他：医薬品等の規格試験法に関する問題点、静岡県衛生環境センター報告、31、97-101(1988)
- 6) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点(第二報)、静岡県衛生環境センター報告、38、71-77(1995)
- 7) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点(第三報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、43、21-24(2000)
- 8) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点(第四報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、45、19-24(2002)
- 9) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点(第五報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、46、19-22(2003)
- 10) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点(第六報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、47、23-26(2004)
- 11) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点(第七報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、48、23-26(2005)
- 12) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点(第八報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、50、25-28(2007)
- 13) 上村慎子他：医薬品等の規格試験法に関する問題点(第九報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、53、59-62(2010)
- 14) 渡辺陽子他：医薬品等の規格試験法に関する問題点(第十報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、57、25-28(2014)

加工食品中に混入された農薬の一斉分析法の開発 (第2報)

医薬食品部 食品班 山崎喜与子, 渡邊愛子, 竹下由布子,
小和田和宏

Development of Simultaneous Analysis Method of the Agricultural Chemicals
Mixed in the Processed Food (2nd Report)

Kiyoko YAMAZAKI, Aiko WATANABE, Yuko TAKESHITA,
and Kazuhiro OWADA

2013年12月に冷凍食品に農薬であるマラチオンが混入された事件が発生したが、それ以前にも類似の農薬混入事件が発生している。現在、冷凍食品の消費量は1989年に比べ約2倍となっており、冷凍食品に農薬等が人為的に混入された場合、健康被害拡大の危険性は否めない。このため、より迅速な検査対応が求められる。

加工食品は、農作物と異なり原材料が多岐にわたるため夾雑物質が多く、脂質の含有量も多いため精製が簡易な方法では測定機器への負担が大きくなる。そこで、抽出精製方法が簡便で、かつ精製の精度がよい分析法として、QuEChERS法による抽出とC18カラムおよびENVI-Carb/LC-NH₂SPEカラムを連結した精製による方法を開発し¹⁾、GC/MS/MSおよびLC/MS/MSを用いて6品目の加工食品で性能評価を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

Key words: QuEChERS, 農薬, 一斉分析, 加工食品, 性能評価

QuEChERS, pesticide, simultaneous analysis, processed food, efficiency valuation

はじめに

現在、冷凍食品の消費量は1989年に比べ約2倍となっており、全国への流通量も増加傾向にある。

2013年には、アクリフーズ社製冷凍食品からマラチオンが高濃度に検出された事件が発生し、意図的に農薬が混入された事件として大きく報じられた。

この際、静岡県内では健康被害が疑われた冷凍食品5品目、35検体の検査依頼があったため、当研究所で検査を行った。検査法は、平成25年3月26日付け事務連絡「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法」²⁾で示された迅速検出法-1を用いることとした。この方法を選択した理由として、迅速検出法-2,3で示されていたカラムの即時入手が困難であったことがあげられる。

カラム精製のない迅速検出法-1で検査を行ったが、精製が不十分であったためか、測定を行ったLC/MS/MSの感度低下が生じた。また、事務連絡に示されたとおり事前に対象の加工食品で性能評価を行うことが必要であ

り、実際の検査までに時間がかかった。

これらのことから、今後このような加工食品に意図的に農薬等が混入された事件が発生した際に、より迅速に対応するため、当所で汎用的に使用する固相カラムを用いた分析法を開発し、その性能評価を行ったので報告する。

試料および方法

1 試料

静岡市内のスーパーで購入した冷凍食品ピザ、パイシート、からあげ、ぎょうざ、コロッケおよび炒飯の6品目を用いた。

2 試薬等

標準品は、関東化学(株)製、和光純薬工業(株)製および林純薬(株)製の農薬標準品を用いた。混合標準液は、各標準品をアセトンに溶解して調製した1000ppmの標準原液および市販混合標準品を用い、これらをアセトン:ヘキサシロタン混液(1:1)で希釈し1ppm混合標準液を調製後、適宜希釈した標準溶液を検量線の作成に用いた。

固相抽出カラムは、Supelco社製のENVI-Carb/LC-NH₂SPE (500mg/500mg)およびジーエルサイエンス(株)製InertSepC18(1g)を用いた。

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)

3 方法

1) 検討対象項目

現在農作物の残留農薬検査で対象としている項目から一般的に入手可能な農薬 250 種を用いて検討を行った(表 1)。

2) QuEChERS 法による前処理

粉碎し均一化した試料 10g を 50mL のポリプロピレン製遠心管に採取し、アセトニトリル 20mL を加え、1 分間ホモジナイズした。これに、塩化ナトリウム 1g、無水硫酸マグネシウム 4g、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5g およびクエン酸三ナトリウム 2 水和物 1g を加え、1 分間振とうした。その後、遠心分離 (2,500rpm, 10 分間) し、得られたアセトニトリル層を 20mL に定容し、抽出液とした(図 1)。

3) カートリッジ固相カラムによる精製

InertSepC18(1g), ENVI-Carb/LC-NH₂SPE (500mg/500 mg)の順で連結し、アセトニトリル：トルエン(3:1)混液 10 mL を用いてコンディショニングを行った後、抽出液 2 mL をカラムに負荷し、同じくアセトニトリル：トルエン(3:1)混液 20 mL で溶出した。得られた溶出液について減圧下で溶媒を留去し、測定溶液とした(図 2)。

4) 性能評価

均一化した試料 10g に 0.1ppm となるよう各農薬を添加し、3 回の繰り返し試験を行った。

①対象とした加工食品

ピザ、パイシート、からあげ、ぎょうざ、コロッケおよび炒飯の 6 種類を用いた。

②添加した農薬

GC/MS/MS で測定を行う 188 項目および LC/MS/MS で測定を行う 127 項目を用いた(表 1)。

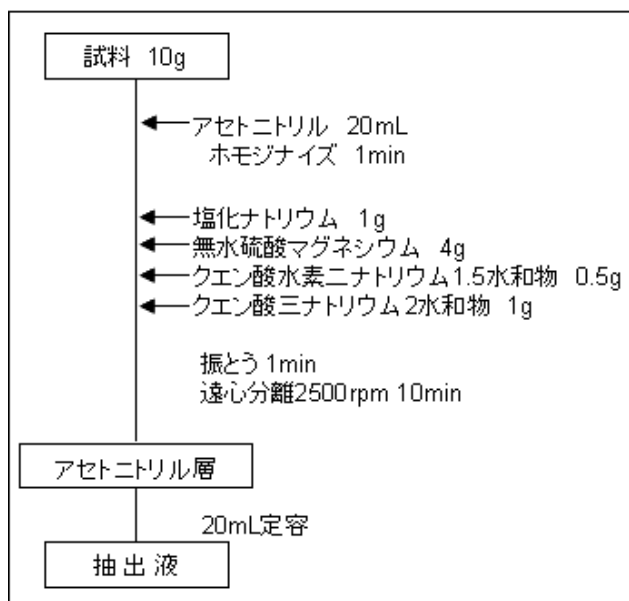


図 1 QuEChERS 法による抽出

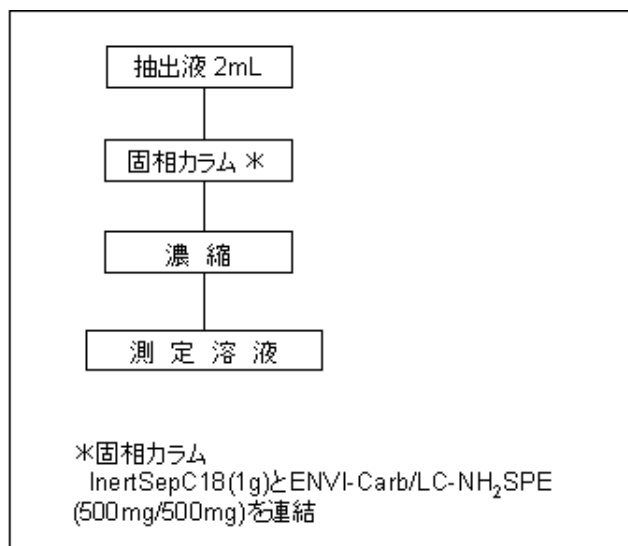


図 2 固相カラムによる精製

③検量線

混合標準液 (1ppm) を適宜希釈し、0.01ppm から 0.5ppm の間で標準溶液を調製して 5 点マトリクス検量線を作成した。

④性能パラメーター

事務連絡に基づき、選択性、真度 50~200%および併行精度 ≤30% を判定基準とした。

4) GC/MS/MS の分析条件

① 装置

ガスクロマトグラフは、CP-3800(Varian 社製)、質量分析計は、GC/MS/MS1200(Varian 社製)を用いた。

② GC 条件

カラム：VF-5ms (Agilent Technologies 社製)

(0.25mm×30m, 膜厚 0.25 μm)

キャリアガス：ヘリウム(1.2mL/min)

注入口温度：260℃

カラム昇温：50℃(1min)→25℃/min→125℃(4min)→5℃/min→300℃(6min)

注入量：2 μL

注入方法：パルスドスプリットレス(パルス圧 40psi, 1min)

トランスファーライン温度：280℃

③ MS 条件

イオン源温度：230℃

イオン化エネルギー：70eV

イオン化法：EI

分析モード：MRM

表1 加工食品ごとの性能評価 (続き)

NO	項目名	ピザ		パイシート		ぎょうぎ		コロッセ		からあげ		炒飯	
		GCMS	LCMS	GCMS	LCMS	GCMS	LCMS	GCMS	LCMS	GCMS	LCMS	GCMS	LCMS
		選択性				真度50%~200%				併行精度 ≤ 30%RSD			
213	プロホスチル	○		○		○		○		○		○	
214	ヘキサコナゾール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
215	ヘキサジノン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
216	ヘキサフルムロン		○		○		○		○		○		○
217	ヘキシチアゾックス		○		○		○		○		○		○
218	ヘナキシル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
219	ヘキサコール	○		○		○		○		○		○	
220	ヘフタクロル	○				○		○				○	
221	ヘフタクロルエホキシトA	○				○		○		○			
222	ヘフタクロルエホキシトB	○		○		○		○		○		○	
223	ヘルメリン	○		○		○		○		○		○	
224	ヘンコナゾール	○		○		○		○		○		○	
225	ペンシクロン		○		○		○		○				○
226	ペンゾフェナップ		○		○		○		○		○		○
227	ペンダイオカルブ	○		○		○		○		○		○	
228	ペンテイメタリン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
229	ペントキサゾン		○		○		○		○		○		○
230	ペンフルラリン	○		○				○		○		○	
231	ペンフレセート	○		○		○		○		○		○	
232	ホサロン(ルビトックス)	○		○		○		○		○		○	
233	ホスチアセート	○		○		○		○		○		○	
234	ホスファミドン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
235	ホスメット	○		○		○		○		○		○	
236	ホルペット							○				○	
237	マラチオン	○		○		○		○		○		○	
238	マイクロタニル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
239	メタベンズチアズロン		○		○		○		○		○		○
240	メタラキシル	○		○		○		○		○		○	
241	メチチオン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
242	メキシクロル	○		○		○		○		○		○	
243	メキシフェノジト		○		○		○		○		○		○
244	メミノストロピンE	○		○		○		○		○		○	
245	メミノストロピンZ	○		○		○		○		○		○	
246	メラクロール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
247	メリブジン	○		○		○		○		○		○	
248	メプロニル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
249	ルフェエロン		○		○		○		○		○		○
250	レナシル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

5) LC/MS/MS の分析条件

高速液体クロマトグラフは ACQUITY UPLC H-Class(Waters 社製), 質量分析計は Xevo TQ-S micro(Waters 社製)を使用した。

①LC 条件

カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm (φ 2.1mm × 100mm, 粒径 1.8 μm) (Waters 社製)

カラム温度: 50°C

流速: 0.333mL/min 注入量: 2 μL

移動相: A液 H₂O B液 メタノール

C液 100mM 酢酸アンモニウム溶液

グラジエント条件(A:B:C(min)): 80:15:5(0)→

55:40:5(0.4)→55:40:5(1.4)→45:50:5(2.4)→40:55:5(3.2)→

0:95:5(7.0)→80:15:5(12.0)→80:15:5(16.0)

②MS 条件

イオン源温度: 150°C

イオン化法: ESI±

分析モード: MRM

結 果

今回検討を行った一斉分析法について、6 品目の加工食品を用いて、農薬 250 項目を添加し、性能評価を行った。

その結果、ピザは231項目、パイシートは238項目、からあげは225項目、コロッケは239項目、ぎょうざは223項目、炒飯は238項目が適合した。このことから、今回検討した一斉分析法は、加工食品に人為的に農薬が混入された際の分析法として良好であると考えられた。

考 察

今回、加工食品中に混入された農薬の一斉分析法として、以前当研究所で農作物を用いて検討を行っていた抽出法^{3,4)}である QuEChERS 法と 2 種の固相カラムを連結し、加工食品でも検査が可能な分析法とすることを検討した。QuEChERS 法を用いたことで、回収率の適合と合わせて抽出時間が短縮することができ、カラムの連結では、人為的に混入されることを想定した添加濃度で回収率も良好であった。6 種の原材料が異なる加工食品で分析法の性能評価を行い、全ての加工食品で 9 割近くの農薬について検査が可能と考えられた。このことより、マラチオン事件と同様の農薬等が意図的に混入される事件が発生した際に、より迅速に検査を行い、健康被害の防止に寄与することが可能であると思われる。

文 献

- 1) 山崎喜与子他:過去の事例から学ぶ健康危機管理事例 31 農薬マラチオン混入事件静岡県における対応とこれから,公衆衛生情報, **46**(3),26-29(2016)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課:加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について,平成 25 年3月 26 日,事務連絡
- 3) 小林千恵他:農産食品中の残留農薬一斉分析法に関する検討,静岡県環境衛生科学研究所報告, **55**, 45-49 (2012)
- 4) 小林千恵他:農産食品中の残留農薬一斉分析法に関する検討(第 2 報),静岡県環境衛生科学研究所報告, **56**, 57-62 (2013)

除菌・消臭スプレーの除菌消臭効果の検証

医薬食品部 食品班 辻むつみ, 長倉美由紀, 小和田和宏

Verification of Disinfectant Deodorizer Spray

Mutsumi TSUJI, Miyuki NAGAKURA and Kazuhiro OWADA

車用消臭・除菌スプレーについて、除菌・消臭成分の含有量、消臭効果および除菌効果を調査した。

除菌・消臭成分の含有量について 20 銘柄を対象に調査し、12 銘柄から除菌剤成分である塩化ベンザルコニウムが検出され、その含有量は 0.14~477 $\mu\text{g/mL}$ であった。3 銘柄で塩化ベンゼトニウム (0.01~0.02 $\mu\text{g/mL}$)、1 銘柄で塩化セチルピリジニウム (0.01 $\mu\text{g/mL}$)、8 銘柄で銀 (0.02~5.96 $\mu\text{g/mL}$)、3 銘柄で亜塩素酸イオン (0.5~5.3 $\mu\text{g/mL}$) を検出した。

消臭効果の官能試験では、20 銘柄を対象に調査を実施し、60%以上のテスターが消臭効果ありと回答した銘柄は酢酸のニオイに対して 17 銘柄、タバコのニオイに対して 11 銘柄であった。

除菌効果について 10 銘柄を対象に調査したところ、細菌全般に除菌効果が見込める製品が 5 銘柄、対象とする細菌によって効果が異なる製品が 2 銘柄、除菌効果が認められない製品が 2 銘柄、製品への細菌混入により判定不能な製品が 1 銘柄であった。

Key words: 消臭スプレー, 除菌剤, 除菌効果, 消臭効果

deodorizer spray, bacteria elimination content, bacteria-elimination effect, deodorizing effect

はじめに

消費者の清潔志向の上昇に伴い、現在各社から様々な種類・用途の消臭剤が販売されている。

「芳香消臭脱臭剤協議会」によると、消臭剤等の市場規模はおおよそ 500 億円で、近年横ばいの状況が続いている¹⁾。タイプ別ではスプレー型や液体型の製品は増加傾向にあり、用途別では、トイレ用や冷蔵庫用の生産量が横ばいや減少の傾向にある一方で、居室用や車用は増加傾向にある¹⁾とみられている。

家庭用品等に使用される菌制御を表現する用語として「除菌」は定着しつつあるが、学術的な専門用語として使われる言葉ではなく、対象とする菌や程度についての厳密な定義はない。一方で、消費者は「除菌」に対して、大部分の菌を取り除くことをイメージしており、身体や健康に害を与える菌を取り除くというイメージが比較的強いという調査結果が出ている²⁾。また、製品の表示やテレビコマーシャルでは「除菌率 99.9%」といった大きな効果を謳ったものが散見され、消費者がその効果に過

度な期待を持つことが懸念される。

そこで、消費者への除菌・消臭スプレーの適切な使用の啓発を目的に、車用の除菌・消臭スプレーについて成分含有量調査および除菌効果・消臭効果の調査を実施したので報告する。

試料および方法

1 調査対象

静岡市内の車用品店およびホームセンターで購入した“自動車用”かつ“除菌”の旨の表示のあるミスト式の消臭スプレー 20 銘柄を対象とした (表 1)。

2 表示, 価格調査

成分, 内容量, 除菌効果等についてポップを含む製品表示および価格を調査した。

3 除菌・消臭成分の含有量調査

1) 調査対象物質

塩化ベンザルコニウム (炭素数 12, 14, 16 のもの, 以下 BZK-C12, 14, 16), 塩化ベンゼトニウム (以下 BZT), グルコン酸クロルヘキシジン (以下 CH), 塩化セチルピリジニウム (以下 CPC), 銀および亜塩素酸イオンを測定対象とした。

2) 試薬等

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)

表1 調査対象スプレー

No	品名	内容量 (mL)	価格 (円)	除菌効果の表示
1	自動車用消臭芳香剤	250	626	除菌&抗菌
2	自動車用消臭芳香剤	250	626	除菌&抗菌
3	自動車用消臭芳香剤	250	626	除菌&抗菌
4	自動車用消臭剤	250	399	銀イオン効果：除菌・防カビ効果に優れ、医療分野でも使用されています。
5	自動車用消臭剤	250	399	銀イオン効果：除菌・防カビ効果に優れ、医療分野でも使用されています。
6	自動車用消臭剤	250	399	銀イオン効果：除菌・防カビ効果に優れ、医療分野でも使用されています。
7	除菌消臭剤	300	718	除菌
8	持続型多機能スプレー	200	1,280	ウイルス・菌ニオイを徹底除去、99.9%の除菌力除菌・抗菌・防カビ・ウイルス除去 2000種類以上の菌に効果のある原体使用
9	消臭剤	220	342	除菌
10	記載なし	250	848	積極付着で菌・悪臭・ウイルスを強力除去！配合成分は医療機関や飲食店で業務用としても使われています
11	記載なし	250	1,080	積極付着で菌・悪臭・ウイルスを強力除去！配合成分は医療機関や飲食店で業務用としても使われています
12	記載なし	250	615	銀イオンの効果・・・除菌・防カビ効果も高く、医療分野でも使われています。
13	記載なし	250	615	銀イオンの効果・・・除菌・防カビ効果も高く、医療分野でも使われています。
14	布製品用消臭剤	210	398	車中のしつこいニオイにダブル除菌
15	布製品用消臭剤	210	398	消臭・除菌もしっかりしてくれます
16	消臭剤	250	648	除菌強化 ニオイ菌 ウイルス
17	消臭剤	250	648	消臭&除菌
18	消臭剤	250	648	消臭&除菌
19	自動車用消臭剤	250	198	除菌もできる
20	自動車用消臭剤	250	198	除菌もできる

■ は除菌効果の調査対象スプレーを示す

10%BZK 溶液, BZT, CH, CPC, 銀標準液 (1,000ppm, 原子吸光分析用) および亜塩素酸イオン標準液

(ClO₂:1,000ppm, イオンクロマトグラフ用) は和光純薬工業株式会社, その他試薬類は試薬特級またはそれ以上のものを使用した。

3) BZK-C12, 14, 16, BZT, CH, CPC の測定

① 試料溶液の調製

検体は 0.2%ギ酸 - 10%アセトニトリル溶液で 1~500 倍に希釈し, 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過して試料とした。

② 装置および分析条件

装置

LC 部 : ACQUITY UPLC H-Class(Waters 株式会社)

MS 部 : ACQUITY TQD(Waters 株式会社)

カラム : Mightysil RP-18GP Aqua

(150mm×2.0mm, 3 μm, 関東化学株式会社)

カラム温度:40℃

移動相:A 液 H₂O, B 液アセトニトリル, C 液 1%ギ酸
グラジエント条件(A:B:C(min)):70:10:20(0)→50:30:20
(3)→40:40:20(5)→20:60:20(13)→0:99:1(18)→70:
10:20(22)→70:10:20(25)

流速 : 0.2mL/min

注入量 : 5 μL

測定モード : MRM(ESI+)

その他条件は表 2 に示した。

表 2 測定条件

項目	測定イオン	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー(eV)
BZK-C12	304.8>212.3	40	30
BZK-C14	332.4>240.2	40	30
BZK-C16	360.4>268.2	40	25
BZT	412.1>320.2	20	30
CH	253.4>170.0	30	20
CPC	304.3>80.0	30	40

4) 銀の測定

① 試料溶液の調製

検体は2%硝酸で1~100倍に希釈して測定した。

② 装置および分析条件

装置：ContrAA300

(アナリティクイエナジャパン株式会社)

測定波長：328nm

5) 亜塩素酸イオンの測定³⁾

試料20mLにリン酸緩衝液1mLおよびヨウ化カリウム溶液0.2mLを加えて混和後、5分間静置したものを試験溶液Aとした。

別に試料10mLにヨウ化カリウム溶液0.2mLおよび硫酸(1+99)1mLを加えて混和し、5分間静置した。次に、炭酸水素ナトリウム溶液1mLを加えた後、水で20mLとし、リン酸緩衝液1mLを加えて混和したものを試験溶液Bとした。

試験溶液にSBT試薬0.2mLを加えて混和したものを検液としてV-660型紫外可視分光光度計(日本分光株式会社)にて675nmにおける吸光度を測定した。なお、吸光度の測定はSBT試薬を添加してから30秒後に行った。

試験溶液Aの吸光度をa、試験溶液Bの吸光度をbとし、次式により得られた値を亜塩素酸イオンの検量線に照らして濃度を求めた。

$$\text{亜塩素酸イオンの吸光度} = b - a/2$$

4 除菌効果の調査⁴⁾

1) 調査対象

表1の除菌・消臭スプレー20銘柄のうち、同一メーカーの香りやタイプの違い等のシリーズ商品は、そのうち1銘柄を選抜し、10銘柄を対象とした。

2) 対象菌株

細菌は細胞壁を構成するペプチドグリカン層の薄いグラム陰性菌と、厚いグラム陽性菌に大別される。そのため、消毒や抗菌を謳う製品の評価時の対象細菌の第一選択は、グラム陰性菌の大腸菌(*Escherichia coli*)とグラム陽性菌の黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)で、この2菌株に対する効果を見ることにより、細菌全般に対する効果がある程度代表できると考えられる。本試験でも同2菌株を試験対象とした。

3) 除菌評価

各菌株をニュートリエントブロス液体培地中37℃にて一晩振とう培養し、1,610×gで15分間遠心した。上清を捨て、リン酸緩衝液(PBS)3mLで2回洗浄した後、2mLのPBSに再懸濁して菌原液とした。菌原液をPBSで10倍段階希釈して、10⁵~10⁷倍希釈液100μLをトリプトソイ平板培地2枚ずつに塗布し、37℃にて一晩静置培養後、2枚の菌数の平均値から生菌数を求めた。

直径35mmのシャーレに木片を入れ、その上にカバーガラス(18mm×18mm)を置いて試験片とした。大腸菌は1×10⁶cfu/mL、1×10⁷cfu/mL、1×10⁸cfu/mL、黄色ブドウ球菌は1×10⁵cfu/mL、1×10⁶cfu/mL、1×10⁷cfu/mLとなるように希釈した菌液を、試験片上に100μL滴下し、2~3時間風乾した。試験片に30cm真上から除菌・消臭スプレーを、陰性コントロールとして滅菌超純水を1スプレー吹きつけ、10分間静置した。トリプトソイブイオン1mLで試験片から生菌を洗い出し、回収した菌液のうち100μLをトリプトソイ平板培地に塗布し、37℃にて一晩静置培養した。陰性コントロールの平板上の生菌数が300個以上認められた場合に試験成立と判断し、3枚の平板の生菌数の平均を求め、次式により除菌率を算出した。

$$\text{除菌率(\%)} = \frac{\text{試験片に滴下した生菌数} \times 0.1 - \text{平板上の生菌数}}{\text{試験片に滴下した生菌数} \times 0.1} \times 100$$

なお、試験片に滴下した菌液は適宜希釈し、トリプトソイ平板培地に塗布、37℃にて一晩静置培養し、生菌数を確認した。

5 官能試験による消臭効果の調査

当研究所および静岡県中部健康福祉センターの職員16名をテスターとし、酢酸およびタバコのニオイに対する消臭効果の官能試験を実施した。

1) 酢酸のニオイに対する消臭効果の官能試験

10cm四方に切断した布にスプレー容器で10%酢酸を布の片面につき1回、両面で計2回吹きつけ、30分間静置した後、約30cm離して除菌・消臭スプレーを布の片面2回、両面で計4回吹きつけ、10分間静置した。水を吹きつけた対象と比較して、タバコのニオイが「強い」(効果なし)、「同じ」(変化なし)、「弱い」(効果あり)の3段階で判定した。

2) タバコのニオイに対する消臭効果の官能試験

10cm四方に切断した布をチャック付きビニール袋に入れ、さらにタバコ(メビウス100's、日本たばこ産業株式会社)の主流煙250mL分を入れて15分間静置し、ニオイをつけた。ビニール袋から布を取り出し、酢酸のニオイに対する消臭効果の官能試験と同様に、除菌・消臭スプレーで処理して試験を実施した。

結果および考察

1 表示調査

調査対象の20銘柄の品名は自動車用消臭剤5銘柄、消臭剤4銘柄、自動車用消臭芳香剤3銘柄、布製品用消臭剤2銘柄、除菌消臭剤1銘柄、持続型多機能スプレー1銘柄、品名表示のないものが4銘柄であった(表1)。

内容量は200~300mL、購入価格は198~1,280円で、

100mLあたりの価格は79~640円であった。

保管上の注意として、「40℃以上になる所に置かない」等、高温での保管を避ける旨の表示が、全ての銘柄に確認された。真夏の車内温度は40℃以上に達する報告がある⁵⁾ことから、今回調査対象とした製品を車中に保管する際は注意が必要である。

「除菌・防カビ効果に優れ」、「99.9%の除菌力」、「菌・悪臭・ウイルスを強力除去」等、除菌効果に優れている旨を表示している銘柄は11銘柄であった。

除菌に関する使用成分の表示では、19銘柄において「除菌剤」、「抗菌剤」、「除菌成分」、「消臭・除菌剤」、「除菌・消臭剤」のいずれかの記載があった。記載のない1銘柄(No.9)には成分として「エタノール」の記載があり、「除菌剤」等の総称の表示よりも明確な表示であった。

消臭に関する成分の表示では20銘柄中17銘柄において「消臭剤」、「消臭成分」、「消臭・除菌剤」、「除菌・消臭剤」のいずれかの表示があったが、「消臭剤」等の記載がない3銘柄には「植物抽出エキス」、「アルコール」、「界面活性剤」などの記載があり、これら成分による消臭効果を期待して使用していると考えられた。

2 除菌・消臭成分の含有量調査(表3)

表3 各製品の除菌・消臭成分の含有量 (μg/mL)

No.	BZK			BZT	CH	CPC	銀	亜塩素酸イオン
	C12	C14	C16					
1	287	101	4.30	-	-	-	-	-
2	320	110	5.76	-	-	-	-	-
3	310	113	5.93	-	-	-	-	-
4	3.57	0.29	-	-	-	-	-	-
5	6.51	2.11	0.02	-	-	-	0.02	-
6	4.89	1.39	0.01	0.02	-	-	0.02	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	346	122	9.45	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	4.3
12	4.44	0.56	-	-	-	-	0.07	-
13	3.99	1.00	-	0.02	-	-	0.03	-
14	0.81	0.83	0.13	0.01	-	0.01	-	-
15	0.58	0.52	0.15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	5.96	0.5
17	-	-	-	-	-	-	1.09	1.0
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0.09	0.06	-	-	-	-	0.27	-
20	-	-	-	-	-	-	0.51	-

(有効数字3桁以下四捨五入)

調査した20銘柄中12銘柄でBZKを検出し、濃度はC12, 14, 16の合計で0.14~477μg/mLであった。3銘柄

でBZT(0.01~0.02μg/mL)、1銘柄でCPC(0.01μg/mL)、8銘柄で銀(0.02~5.96μg/mL)、3銘柄で亜塩素酸イオン(0.5~4.3μg/mL)を検出した。調査した20銘柄中4銘柄は今回測定対象とした物質は検出されず、製品の表示には「除菌剤」「消臭剤」等の表示があるものの、成分の特定には至らなかった。

3 除菌効果の調査

各スプレーの大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する除菌率一覧を表4に、除菌効果を評価したプレートの写真を図1に示した。

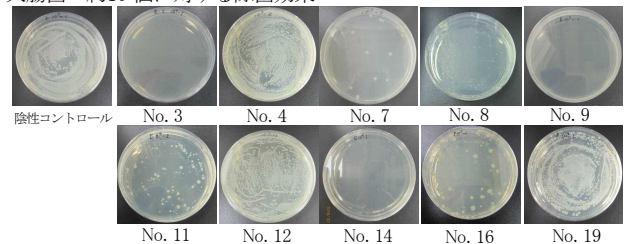
表4 大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する除菌率 (%)

No.	大腸菌			黄色ブドウ球菌		
	10 ⁷ cfu	10 ⁶ cfu	10 ⁵ cfu	10 ⁶ cfu	10 ⁵ cfu	10 ⁴ cfu
	オーダー	オーダー	オーダー	オーダー	オーダー	オーダー
3	99.99	100	100	100	100	-
4	0	0	0	0	0	-
7	0	99.95	99.97	99.95	99.95	99.82
8	一般細菌混入により判定不能					
9	100	100	100	100	100	100
11	0	99.87	99.97	99.74	99.93	99.74
12	0	0	0	0	0	-
14	99.99	100	100	100	100	0
16	0	99.99	99.96	0	0	85.69
19	0	0	0	0	99.87	99.53

-:試験不成立 (小数点以下3桁切り捨て)

試験に供した大腸菌の菌量は1試験片あたり10⁵cfu,

大腸菌 約10⁶個に対する除菌効果



黄色ブドウ球菌 約10⁵個に対する除菌効果

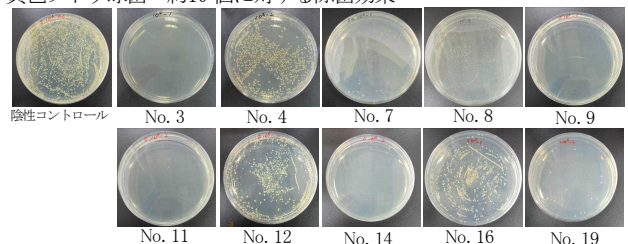


図1 大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する除菌効果

10⁶cfu, 10⁷cfu オーダーであるが, 10⁷cfu オーダーには除菌効果が認められないものの, 10⁵cfu, 10⁶cfu オーダーには除菌効果が認められたスプレーが3検体あり, 試験に使用する至適菌量は10⁵cfu, 10⁶cfu オーダーであると考えられた。また, 試験した黄色ブドウ球菌の菌量は10⁴cfu, 10⁵cfu, 10⁶cfu オーダーであるが, 10⁴cfu では試験不成立となる場合が多いことから, 黄色ブドウ球菌についても至適菌量は10⁵cfu, 10⁶cfu オーダーであると考えられた。

No.3, 9 および 14 のスプレーについては大腸菌, 黄色ブドウ球菌を100%除去でき, 図1のように評価に用いたトリプトソイ平板にコロニーは形成されなかった。No.7 および 11 については99.74%~99.97%除去できた。No.3, 7, 9, 11 および 14 の5銘柄はグラム陰性菌の大腸菌およびグラム陽性菌の黄色ブドウ球菌に対して高い除菌効果が認められたことから, この5銘柄については細菌全般に対して除菌効果が見込めると考えられた。

No.16 は1試験片あたり10⁶cfu オーダーの大腸菌を99.99%除去できたものの, 同量の黄色ブドウ球菌は処理できず, 10⁴cfu オーダーの黄色ブドウ球菌に対して85.69%の除菌効果を示し, 対象とする細菌の種類によって効果が異なることが予測された。

No.19 は10⁵cfu オーダーの黄色ブドウ球菌に対して99.87%の除菌効果を示したが, 大腸菌に対する除菌効果は認められず, 細菌全般を除菌できるとは言いがたいと思われた。

No.4 および No.12 は大腸菌, 黄色ブドウ球菌ともに試験が成立した全濃度において除菌効果は認められなかった。

No.8 は一般細菌の混入により, 除菌効果は判定できなかったことから, 製品中への細菌の混入が疑われたため, 未開封品を2ロット新たに購入し確認したところ, 液体の白濁や毛髪様異物が混入した製品が認められた(図2A~C)。このスプレー液をトリプトソイ平板にて培養したところ, 細菌のコロニーが発現した(図2D, E)。

各コロニーを分離培養後, DNAを抽出し, 16SrRNAの塩基配列を系統解析した結果, ラルストニア属菌(*Ralstonia mannitolilytica*), ヘルバスピリウム属菌(*Herbaspirillum* sp.) およびチオバシラス属菌(*Thiobacillus thioparus*) と同定された。

この異物(細菌)混入の結果は静岡県県民生活課を通して製造者および製造者を管轄する東京都へ情報提供し, 製造者は自主検査の実施と製造工程の見直しの意向を示している。

除菌・消臭スプレーは雑貨であり, 「除菌」の表示をするにあたって統一した基準は作られていない。各メーカーは独自の基準や根拠をもって「除菌」の表示をしてい

るものと考えられるが, 本試験の結果では, 細菌全般を除菌できるとは言いがたいものや, 除菌効果は認められなかったものがあつたことから, 表示について統一した基準の策定が望まれる。

消費者は除菌表示製品に対して, ニオイの原因となる菌を除去すること, 対象物を清潔に保つことを期待する傾向にあり²⁾, 車用の除菌・消臭スプレーについても同様の期待をしていると思われるが, 除菌を謳った製品には一定の基準がないこと, 必ずしもすべての菌に有効とは限らないことを理解し製品を選択していただきたい。

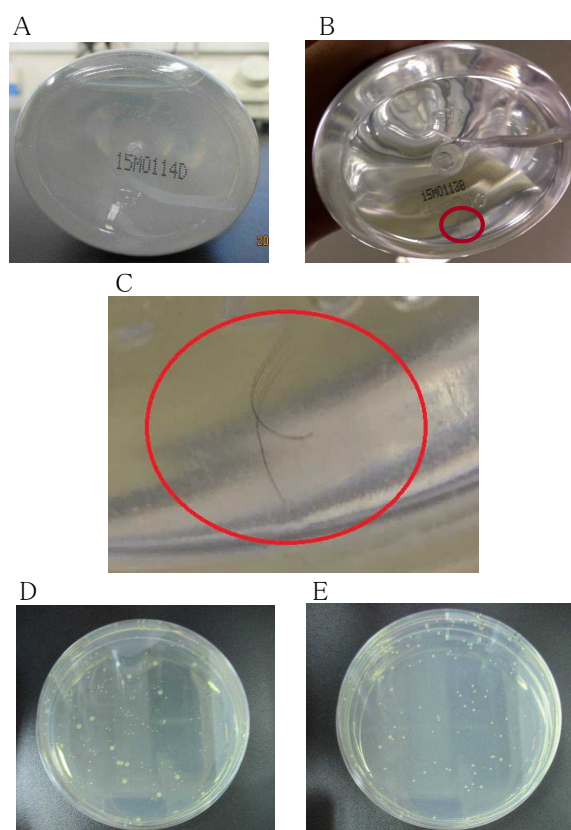


図2 白濁, 異物混入が認められた製品
A;液体が白濁した製品
B;毛髪様異物(○)が混入した製品
C;Bの毛髪様異物混入部分の拡大図
D;Aのロット番号の製品を培養した平板培地
E;Bのロット番号の製品を培養した平板培地

4 官能試験による消臭効果の調査

1) 酢酸のニオイに対する消臭効果の官能試験(図3)

酢酸のニオイに対する消臭効果について, テスター全員が消臭効果ありと回答した銘柄が3銘柄あつたのに対し, 効果ありと回答したテスターの割合が20%以下の銘柄も見られた。60%以上のテスターが効果ありと回答した銘柄は17銘柄であつた。ニオイの感じ方は個人によって異なるが, 全体としてはスプレーの消臭効果ありと回

答した割合が多く、酢酸のニオイに対して一定の消臭効果が見込まれる。

2) タバコのニオイに対する消臭効果の官能試験 (図4)

タバコのニオイに対する消臭効果について、60%以上のテスターが効果ありと回答した銘柄は11銘柄であった。

テスター全員が効果ありと回答した銘柄は認められず、酢酸のニオイに対する効果と比較して、タバコのニオイに対する消臭効果は弱くなる傾向が見られた。酢酸は単一臭であるのに対し、タバコは複合臭であることが効果が弱まった一因であると考えられる。

No.4の製品は酢酸のニオイに対してテスター全員が消臭効果ありと回答したものの、タバコのニオイに対して効果ありと回答したテスターは31%で、ニオイの種類によって効果が大きく異なる製品があると考えられる。

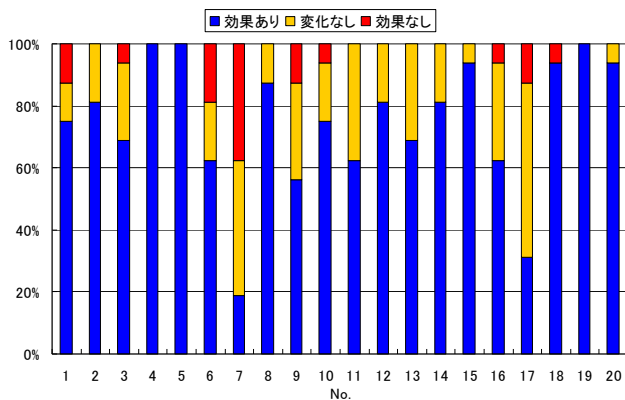


図3 酢酸のニオイに対する消臭効果調査結果

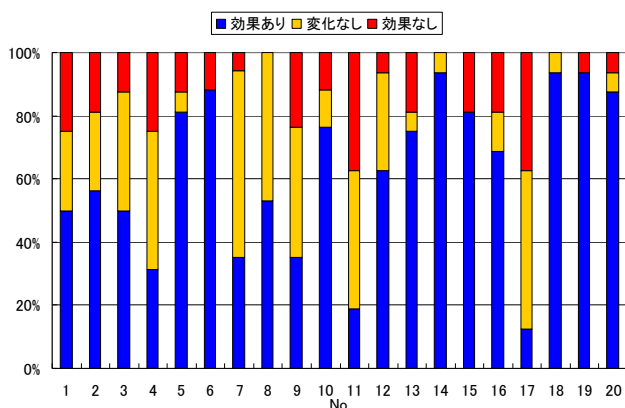


図4 タバコのニオイに対する消臭効果調査結果

まとめ

車用のミスト式除菌・消臭スプレーについて、静岡市内で市販されていた商品20銘柄を対象に、成分含有量、消臭効果および除菌効果等について調査したところ、以下のことが明らかとなった。

1 表示調査では、高温での保管を避ける旨の表示が全ての銘柄に確認された。除菌効果に優れている旨を表示

している銘柄は20銘柄中11銘柄であった。

- 成分含有量調査では12銘柄でBZK (0.14~477 μg/mL), 3銘柄でBZT (0.01~0.02 μg/mL), 1銘柄でCPC (0.01 μg/mL), 8銘柄で銀 (0.02~5.96 μg/mL), 3銘柄で亜塩素酸イオン (0.5~4.3 μg/mL) を検出した。
- 除菌効果の調査では10銘柄を対象に調査を実施し、細菌全般に除菌効果が見込めるものが5銘柄、対象とする細菌によって効果が異なると考えられるものが2銘柄、除菌効果が確認できなかったものが2銘柄、判定不能なものが1銘柄であった。
- 官能試験による消臭効果の調査では60%以上のテスターが消臭効果ありと回答した銘柄数は、酢酸のニオイに対して17銘柄、タバコのニオイに対して11銘柄であった。また、ニオイの種類によって消臭効果が異なる製品があることがわかった。

今回調査対象とした製品には、細菌および異物が混入した製品や、除菌効果が認められない製品、消臭効果が他製品と比較すると弱いものが含まれていた。本研究結果を製造者へ情報提供し、製造者の自主的な製品改善を促すことで、市場から粗悪な製品をなくし、間接的ではあるが消費者保護につなげたいと考える。

謝辞

本研究を実施するにあたり、除菌試験に関する御助言をいただきました静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科内藤博敬先生、消臭試験に御協力いただきました静岡県中部健康福祉センター化学検査課の皆様へ深謝します。なお、本研究の細菌に関する試験は当研究所微生物部細菌班の協力のもと、実施しました。

文献

- 長谷川靖之：芳香消臭脱臭剤の安全性への取り組み、芳香消臭脱臭剤協議会事務局 (2013)
- 除菌に対する消費者意識調査結果、日本石鹼洗剤工業会 (2006)
- 有賀孝成他：N,N'-ビス (2, 4-ジスルホベンジル) トリジン (SBT) 試薬による遊泳用プール水中の二酸化塩素、亜塩素酸イオンおよび残留塩素の定量、東京健康安全年報, 57, 333-337 (2006)
- 内藤博敬他：オゾン水評価法策定へ向けた細菌試験法の検討、医療・環境オゾン研究, 23 No.4, 127-131 (2016)
- JAF ユーザーテスト車内温度 / 夏, <http://www.jaf.or.jp/eco-safety/safety/userstest/temperture/dataii2.html>, 一般社団法人日本自動車連盟 (2012)

ジャガイモ食中毒事例による緊急検査

医薬食品部 食品班 渡邊愛子, 山崎喜与子, 竹下由布子
小和田和宏

Urgent Determination of α -Solanine and α -Chaconine in Potato

Aiko WATANABE, Kiyoko YAMAZAKI, Yuko TAKESHITA
and Kazuhiro OWADA

2016年7月、静岡県藤枝市内の小学校で、児童らが授業中に栽培したジャガイモを喫食したことにより食中毒が発生した。食中毒の原因がジャガイモであることを裏付けるため、ジャガイモ中の有毒成分である α -ソラニンおよび α -チャコニンの定量試験を実施することとなった。調理前、調理後の検体が搬入され、 α -ソラニンおよび α -チャコニンの合計の含有量を測定したところ、それぞれ138.6ppm、150.6ppmであり、今回発生した食中毒は、小学校の校庭で栽培したジャガイモを喫食したことによるソラニン類の食中毒であると判断された。静岡県におけるジャガイモによる食中毒発生は実に44年ぶりとなった。

Key words : ジャガイモ, α -ソラニン, α -チャコニン, 食中毒, 液体クロマトグラフータンデム質量分析計
potato, α -solanine, α -chaconine, food poisoning, LC-MS/MS

はじめに

2016年7月15日、静岡県中部保健所管内で、小学校の理科の授業で育てたジャガイモを喫食した児童らが、吐き気、腹痛および頭痛などの食中毒症状を呈した。同日中に症状を訴えた全員が回復し、重症者は出なかった。

ジャガイモはナス科の多年生植物でアンデス地方の高山地帯を原産とし、その塊茎は食用として世界中で利用されている¹⁾。一方で、ジャガイモは有毒成分であるグリコアルカロイドを含有し、その約95%を α -ソラニン、 α -チャコニンが占めている²⁾。これらソラニン類はジャガイモでは芽や皮に多く、特に緑化したものや未熟なものは含有量が高く、多量に摂取した場合には吐き気、嘔吐、腹痛などの食中毒症状を引き起こす²⁾。

市販されているジャガイモでは、適切に栽培や流通が行われているため、食中毒の発生は稀であるが、全国で1998年から毎年約1~3件のジャガイモによる食中毒事例が報告されており、発生場所の多くが小学校である^{3, 4)}。

当研究所では、静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課の依

頼を受けて、中部保健所管内の小学校で発生した食中毒の原因として疑われたジャガイモ中の α -ソラニンおよび α -チャコニンの検査を液体クロマトグラフータンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いて実施したので、その検査法や結果について報告する。

試料および方法

1 試料

調理前の生のジャガイモ(図1)と調理後の茹でたジャガイモ(図2)の2検体が搬入された。それぞれ皮が付いた状態のままミキサーで同量粉碎し、検査試料とした。



図1 試料① 調理前の生のジャガイモ



図2 試料② 調理後の茹でたジャガイモ

また、添加回収試験には、市販されているジャガイモを同様に粉碎したものをブランク用試料とした。

2 試薬

標準品は SIGMA-ALDRICH 社製 α -ソラニンおよび α -チャコニンを用いた。メタノール、アセトニトリルおよびギ酸は和光純薬工業株式会社製 LC/MS 用を用いた。

3 方法

1) 試料溶液の調製

食品衛生検査指針⁵⁾および2014年度地域保健総合推進事業関東甲信静ブロック精度管理事業の健康危機管理模擬演習で提示されたソラニン類検査試験法を参考に、試料溶液を調製、分析した。

試料5gをホモジナイザーカップに量り取り、メタノール30mLを加え、ホモジナイズした。メタノール15mLでホモジナイザーの刃を洗浄し、ホモジナイズされた試料溶液とともにガラスろ紙(60mm)を敷いた桐山ロートをを用いて吸引ろ過した。得られたろ液をメタノールで全量50mLとした。この溶液から正確に0.5mL量り取り、メタノールで全量100mLとしたものをLC-MS/MSの試験溶液とした(図3)。

2) 標準溶液の調製

α -ソラニン5mgを量りメタノールで10mLとし、 α -ソラニン標準溶液とした。 α -チャコニン2mgを量りメタノールで10mLとし、 α -チャコニン標準溶液とした。

α -ソラニン標準溶液および α -チャコニン標準溶液を混合し、混合標準溶液とした。これを0.005~0.2 μ g/mLの範囲に適宜メタノールで希釈して検量線を作成し、試料中の α -ソラニンおよび α -チャコニンの含有量を算出した。

3) 添加回収試験

ブランク用試料に α -ソラニン標準溶液500 μ g/mLを0.5mL(最終濃度50ppm)、 α -チャコニン標準溶液200 μ g/mLを1.25mL(最終濃度50ppm)添加し、それぞれの回収率を算出した。

4 装置および測定条件

1) 装置

高速液体クロマトグラフは ACQUITY UPLC H-Class

(Waters 社製), 質量分析計は Xevo TQ-S micro (Waters 社製) を用いた。

2) HPLC 条件

カラム: ACQUITY UPLC @HSS T3

(ϕ 2.1mmx100mm, 粒子径 1.8 μ m)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 0.25mL/min

注入量: 2 μ L

移動相: アセトニトリル: 水: 0.1%ギ酸 (25:70:5)

3) MS 条件

イオン化モード: ESI+

分析モード: MRM

測定イオン:

α -ソラニン; 868.5>98.0(定量イオン)

868.5>398.3(確認イオン)

α -チャコニン; 852.4>98.1(定量イオン)

852.4>84.9(確認イオン)

コーン電圧: α -ソラニン; 100V, α -チャコニン; 24V

コリジョンエネルギー:

α -ソラニン; 80eV(定量イオン), 72eV(確認イオン)

α -チャコニン; 80eV

ソース温度: 150 $^{\circ}$ C

脱溶媒温度: 500 $^{\circ}$ C

コーンガス流量: 50L/hr

脱溶媒ガス流量: 1000L/hr

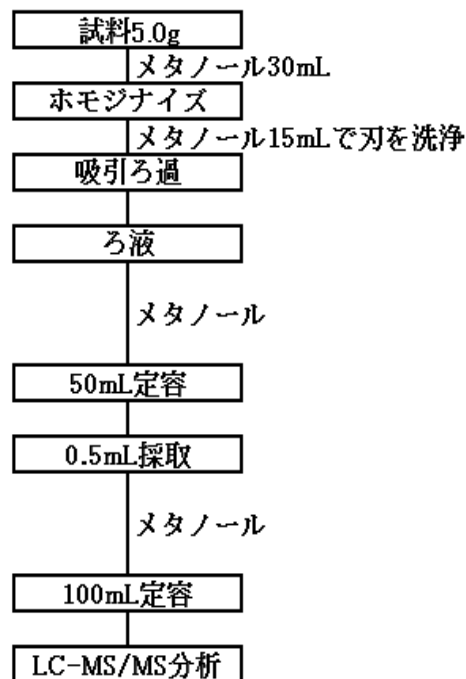


図3 試験溶液の調製方法

結果および考察

1 定性

試料溶液についてLC-MS/MSのMRMモードで分析を行ったところ、試験液から得られた定量イオンと確認イオンの比および保持時間が標準溶液と一致したため、検出されたピークはα-ソラニンおよびα-チャコニンであると同定した(図4)。

2 定量

α-ソラニンおよびα-チャコニンの検量線は0.005~0.2μg/mLの濃度範囲で相関係数が0.999以上と良好な直線性を示した。また、α-ソラニンおよびα-チャコニンをブランク用試料に最終濃度50ppmとなるよう添加し、添加回収試験を行ったところ、回収率がそれぞれ85.9%、92.3%と、妥当性評価ガイドラインで目標とされる回収率70~120%の範囲内であり、良好であった。

試料中のα-ソラニンおよびα-チャコニンの濃度はそれぞれ試料①39.3ppm、99.3ppm、試料②43.3ppm、107.3ppmであり、ソラニン類の合計値として試料①は138.6ppm、試料②は150.6ppmであった(表1)。

ソラニン類は耐熱性であり、170℃以上の加熱により分解が開始されるため、茹でた程度では分解しない⁶⁾。試料①と試料②のソラニン類濃度の差は、ジャガイモの個体差や加熱による水分減少のための濃縮が理由として考えられる。

通常、市販されているジャガイモの可食部には約75ppm程度のソラニン類が含まれていると言われている⁷⁾。今回、試料から検出されたソラニン類の濃度は通常の含有量の約2倍であった。成人の場合、ソラニン類を約50mg摂取することにより食中毒症状を呈するのに対し、子供の場合、ソラニン類を約20mg摂取すると中毒を起こすと報告されている⁷⁾。試料②を133g(今回のジャガイモの大きさでは約2個に相当する)喫食した場合、20mg程度のソラニン類を摂取することになるため、中毒症状を起こす可能性のあることが示唆された。

表1 試料中のソラニン類の濃度

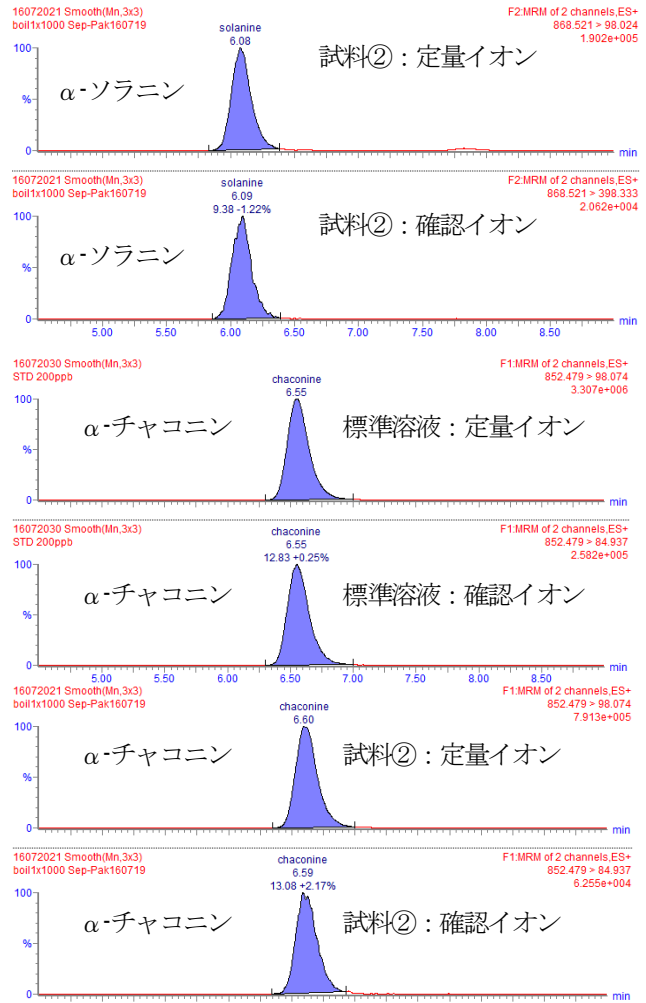
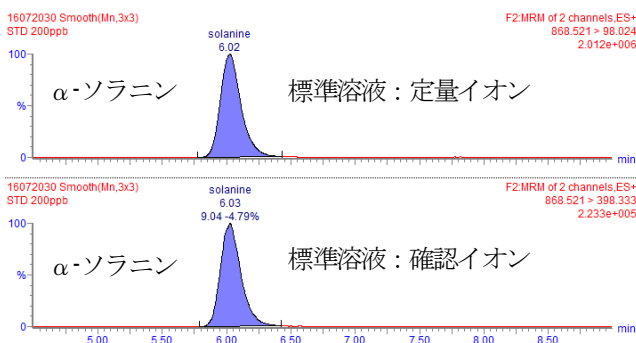


図4 ソラニン類のMRMのクロマトグラム

まとめ

食中毒の原因として疑われたジャガイモについて緊急検査を行ったところ、生のジャガイモでは138.6ppm、茹でたジャガイモでは150.6ppmのソラニン類を含有していたことが明らかになった。

今回、食中毒が発生した小学校で収穫されたジャガイモは未熟なものが多く、常温保存されていた。さらにほとんどの児童らが皮ごと喫食していたことから、通常、市販されているジャガイモよりもソラニン類の含有量が多くなり、食中毒が発生したと考えられる。

2009年に奈良市内の小学校において、校内で栽培したジャガイモを喫食したことによるソラニン類食中毒事件が発生した⁸⁾。これを受けて、厚生労働省は文部科学省を通じて同様の食中毒を防止する観点から、学校関係者に対し、①小学校内や家庭栽培等で栽培された未熟で小さいジャガイモは、全体にソラニン類が多く含まれていることもあるため喫食しないこと、②ジャガイモの芽や日光に当たって緑化した部分は、ソラニン類が多く含まれるため、これらの部分を十分に除去し、調理を行うこと、③ジャガイモは、

日光が当たる場所を避け、冷暗所に保管すること、について周知徹底を図るよう通達した⁹⁾。しかし、この厚生労働省の通達以降も、ほぼ毎年1~2校の小学校でソラニン類の食中毒が発生していることから³⁾、今一度注意喚起が必要と考えられる。

今回、静岡県では44年ぶりにジャガイモによる食中毒が発生した。このような突発的な緊急検査に際して県として迅速に対応していくために、今後も国や他の地方衛生研究所と情報共有を密にし、検査に対する技術や知識を高めていく所存である。

参考文献

- 1) 農林水産省ホームページ：ジャガイモ「どこからきたの？」, http://www.maff.go.jp/j/agri_school/a_tanken/zyaga/01.html (2016)
- 2) 公益社団法人日本薬学会：衛生試験法・注解 2015, 277-278, 金原出版株式会社, 東京 (2015)
- 3) 厚生労働省ホームページ：食中毒事件一覧速報, <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou-iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html> (2016)
- 4) 登田美桜他：わが国における自然毒による食中毒事例の傾向(平成元年～平成22年), 食品衛生学雑誌, **53** (2), 105-120 (2012)
- 5) 公益社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針理化学編 2015, 883-889, 大日本法令印刷株式会社, 東京 (2015)
- 6) 高木加代子他：ジャガイモ中の α -チャコニンおよび α -ソラニンの加熱調理による影響, 食品衛生学雑誌, **31** (1), 67-73 (1990)
- 7) 厚生労働省ホームページ：自然毒のリスクプロファイル：高等植物：ジャガイモ, <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000082078.html> (2016)
- 8) 奈良市保健所：保健所事業概況平成22年度版, 99 (2010)
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知：「ジャガイモの喫食によるソラニン類食中毒について」(平成21年8月10日, 食安発0810第3号)

ワサビのイソチオシアネート類の GC/MS 分析における前処理方法の検討

医薬食品部 食品班

竹下由布子, 渡邊愛子, 山崎喜与子
辻むつみ, 小和田和宏

農林技術研究所伊豆農業研究センター 西島卓也

Study of Pretreatment Method for GC/MS Analysis of Isothiocyanates in Wasabi

Yuko TAKESHITA, Aiko WATANABE, Kiyoko YAMAZAKI
Mutsumi TSUJI, Kazuhiro OWADA and Takuya NISHIJIMA

2015年4月に機能性表示食品制度が導入されたことにより、全国で機能性表示食品の開発が活発化し、産地間競争の激化が進んでいる。そこで、静岡県では2016年度より新成長戦略研究「健康長寿静岡の新たな機能性食品産業の創出」において、本県の特徴ある多様な農林水産物の機能性データベースの構築、機能性表示食品制度を活用した新商品の開発を目指して、県内の研究機関等が協力して研究を進めているところである。

今回、本県を代表する重要な特産品であるワサビの機能性評価面に着目し、機能性成分であるイソチオシアネート (ITC) 類のうち、アリルイソチオシアネート (AITC)、6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート (6-MSITC) の GC/MS 分析における検体前処理方法を検討した。前駆体からイソチオシアネートを発生させる最適酵素反応条件は37°C、10分間であり、高い回収率で定量的に ITC 類を分析することができた。また、ワサビを4つの部位に分けて分析したところ、部位毎に ITC 類の量に大きな差が認められた。なお、本研究は静岡県新成長戦略研究費（健康長寿静岡の新たな機能性食品産業の創出）により実施した。

Key words : ワサビ, イソチオシアネート類, 機能性成分, ガスクロマトグラフィー質量分析計
Wasabi, isothiocyanates, functional component, GC/MS

はじめに

ワサビは、静岡市葵区の間部が発祥¹⁾といわれており、貴重な香辛料として日本の食文化に大きく貢献し、各地に普及してきた。静岡県では、安倍川上流部、伊豆半島天城山系などの産地を主体に産出され、国内のワサビ産出額の約8割、栽培面積の約4割を占めるなど、本県を代表する重要な特産品となっており²⁾、さらなる産業振興が望まれる。

一方、2015年4月に機能性表示食品制度が導入されたことにより、全国で機能性表示食品の開発が活発化し、産地間競争の激化が進んでいる。そのため、農産物の機能性評価技術の開発は、地域ブランド競争力の強化を図る上で重要な課題である。

そこで本研究では、ワサビの機能性評価面に着目し、抗がん性³⁾、抗菌性^{4,5)}、抗酸化性^{6,7)}などさまざまな機能が報告されている香味成分であるイソチオシアネート (ITC) 類のうち、アリルイソチオシアネート (AITC)、6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート (6-MSITC) 含有量を調査するため、GC/MS 分析における検体前処理方法を検討した。

試料および方法

1 試料

ワサビは、静岡県伊豆市湯ヶ島の伊豆農業研究センター試験圃場で栽培された水ワサビを用いた。検体は約1cm角に細切し、粉碎機 (IKA社製) で検体とともにドライアイス投入し、凍結粉碎する方法、液体窒素で凍結した後粉碎する方法を用い、いずれも約10秒間粉碎したものを分析試料とした。なお、検体を長期保存する場合は、細断した後-20°Cで保存した。

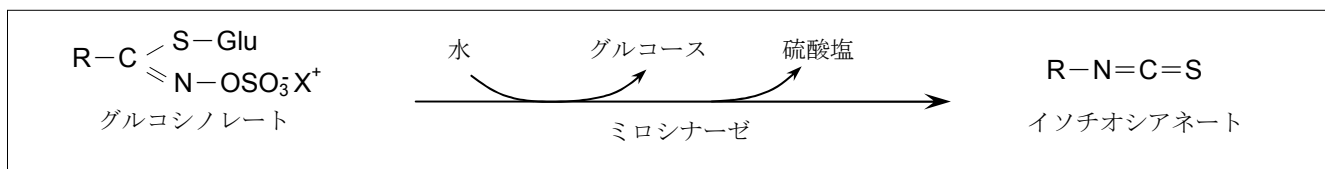


図1 ITC 類の生成

2 試薬等

AITC 標準品は Sigma-Aldrich 社製，6-MSITC 標準品は ABCAM 社製，その他試薬は，和光純薬株式会社製を用いた。

3 標準溶液の調製

AITC は標準品 40 mg を正確に量り取り，アセトンで全量を 20 mL とし，2,000 μg/mL の AITC 標準溶液とした。6-MSITC は標準品 10 mg を正確に量り取り，アセトンで全量を 10 mL とし，1,000 μg/mL の 6-MSITC 標準溶液とした。

4 装置および分析条件

1) 装置

ガスクロマトグラフは 450-GC (Varian 社製)，質量分析計は 240-MS (Varian 社製)を用いた。

2) 分析条件

カラム: DB-1ms (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm, Agilent 社製)
 注入口温度: 300°C
 カラム温度: 50°C (10 min) - 10°C/min - 250°C (30 min)
 スプリット比: 1:10

He 流量: 1.0 mL/min

Scan 範囲: m/z 50 - 350

5 試験溶液の調製方法

ITC 類は前駆体から酵素反応により発生するため，一定時間反応させる必要がある (図 1)。そこで，粉碎した試料を遠沈管に 0.5 g 採取し，一定温度で一定時間放置することにより ITC 類を発生させた。その後氷冷し，酢酸エチル約 5 mL および適量の無水硫酸ナトリウムを加えて激しく振とうした後，2,800 rpm で 10 分間遠心分離を行った。上澄液を採取し，残渣に再度酢酸エチル約 5 mL を加え，激しく振とうした後，同様に遠心分離を行った。上澄液をあわせ，10 mL にメスアップし，GC/MS 測定溶液とした (図 2)。

6 酵素反応条件の検討

1) 反応温度の検討

試料は，約 11 か月栽培の ‘グリーンサム’ の採取後約 2 か月冷凍保存した根茎を用いた。

37°C 水浴および室温 (約 23°C) において，10 分から 300 分保ったのち，試料溶液を調製した。

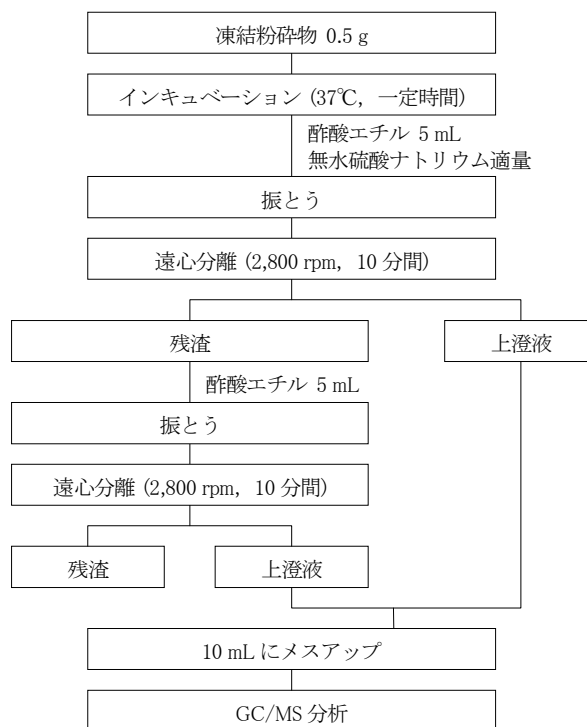


図2 試料溶液の調製

2) 品種による反応時間の検討

供試品種は，約 13 か月栽培の ‘真妻’，約 14 か月栽培の ‘伊づま’，約 14 か月栽培の ‘グリーンサム’ の 3 品種で，採取後約 3 週間冷凍保存した根茎を用いた。

37°C 水浴中，10 分から 300 分保ったのち，試料溶液を調製した。

3) 検体保存状態による反応時間の検討

試料は約 15 か月栽培した ‘グリーンサム’ の採取後 1 日冷蔵保存した根茎を用い，2) の約 14 か月栽培の 3 週間冷凍保存したグリーンサムの結果と比較した。なお，両検体は同一圃場の同一日に定植し，栽培された水ワサビである。

37°C 水浴中，10 分から 300 分保ったのち，試料を調製した。

7 添加回収試験

粉碎試料 0.5 g に，AITC は 2,000 μg/g，6-MSITC は 200 μg/g となるよう標準溶液を添加した。標準溶液はアセトン溶液として保存しており，標準溶液を添加すると酵素が失活することが考えられたため，ブランク試料，

添加試料ともに、加温せずに添加回収試験を行った。回収率は、添加試料の定量値からブランク試料の定量値を減じて算出した。

8 部位別の ITC 類生成量の比較

試料は‘グリーンサム’の採取後1日間冷蔵保存した根茎を用いた。

ワサビを根茎、根、葉柄、葉に分け(図3)、それぞれについて試料溶液を調製した。酵素反応は37℃10分間の加温により行った。

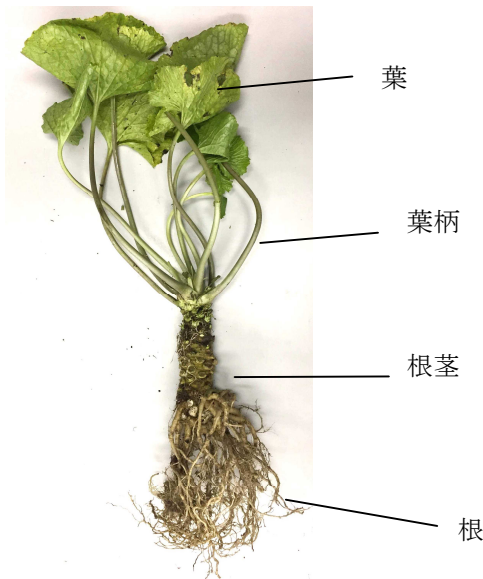


図3 ワサビの形態

結果および考察

1 酵素反応条件の検討

ITC類を酵素反応により効率的に発生させる条件を検討するため、1) 反応温度、2) 品種による反応時間、3) 保存状態による反応時間を検討し、その結果を図4に示した。

1) 反応温度の検討

AITC、6-MSITCともに37℃水浴においては10分、室温(約23℃)においては60分の時点で生成量は最大に達した後、時間の経過とともに減少していく傾向が認められた。沢ワサビのミロシナーゼは至適温度が37℃であるため¹⁾、37℃の方が短い時間で反応が最大に達したと考えられる。最大生成量は37℃と室温で大きな差は認められなかったが、室温では反応温度の管理が困難なことから、反応温度を37℃とした。

2) 品種による反応時間の検討

‘真妻’、‘伊づま’および‘グリーンサム’の3品種を用いて品種による最適な反応時間を検討した。AITCは、‘真妻’、‘伊づま’が10分、‘グリーンサム’が30分で、生成量が最大となった。6-MSITCは、‘真妻’が10分、‘伊づま’が30分、‘グリーンサム’が120分で、生成量が最大となり、品種により反応時間に違いが認められた。

本試験では、6-MSITCにおいて、全ての品種で生成量が最大になった後、ほぼ定常状態となり、1)とは異なる結果となった。これは、本試験での検体が新鮮であった

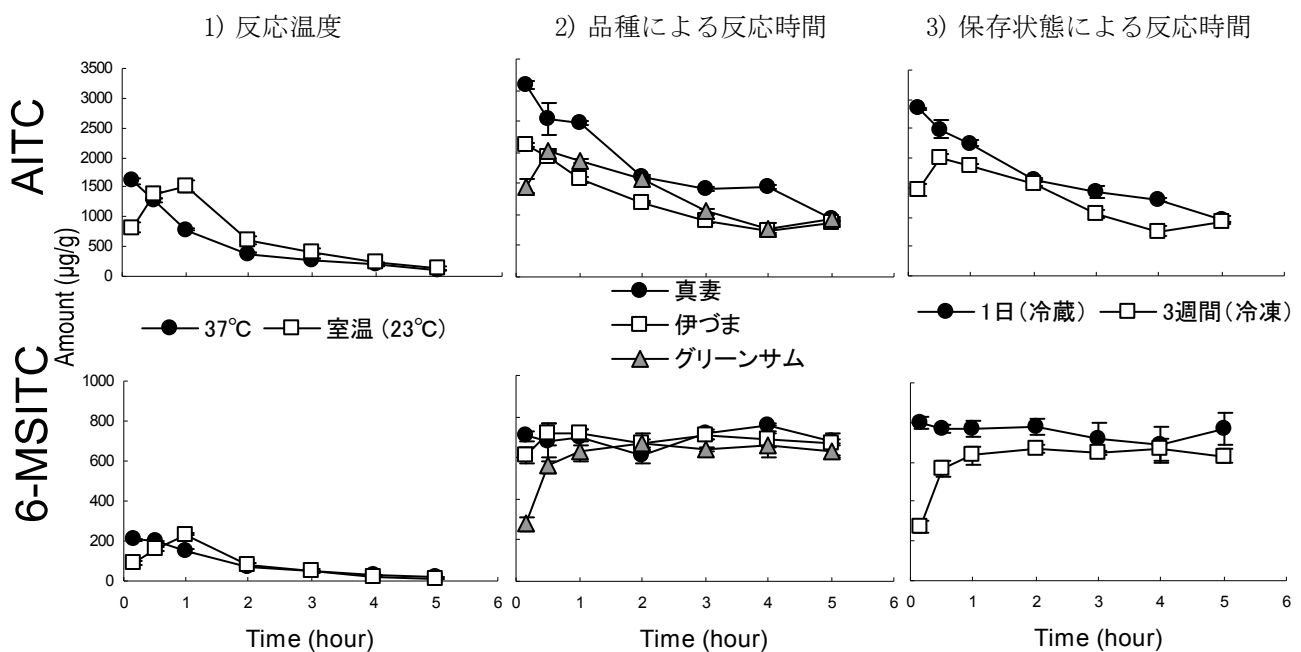


図4 酵素反応条件の検討

のに対し、1) では、約2か月冷凍保存した検体であったため、酵素活性が低下していたことなどが原因であると推察される。

3) 検体保存状態による反応時間の検討

検体の保存状態による最適な反応時間について検討した。2) で生成量が最大になるのに最も時間のかかった‘グリーンサム’でも、1日間冷蔵の検体ではAITC、6-MSITCともに、10分で生成量が最大となった。このことから、検体採取後速やかに処理を行えば、反応時間は、AITC、6-MSITCともに10分間が適当であると考えられた。以上の結果より、酵素反応条件は37℃、10分間の加温が最適であると考えられた。また、検体は採取後速やかに処理をする必要がある。

2 添加回収試験

粉碎試料にAITCおよび6-MSITC標準溶液を添加した結果、AITCの添加回収率は90.4%、6-MSITCでは85.4%と良好であり、相対標準偏差は5%以下と、ばらつきも少なかった(表1)。ITC類は揮発性成分であるが、濃縮乾固等の揮発を伴う操作を行わずに測定溶液を調製することにより、定量的に分析が可能であると考えられた。

表1 添加回収試験結果

化合物名	定量値 (μg/g)	相対標準 偏差 (%)	回収率 (%)
AITC	1,809	2.1	90.4
6-MSITC	171	3.3	85.4

3 部位別のITC類生成量の比較

‘グリーンサム’の部位別ITC類生成量の違いを図5に示した。根茎と根がほぼ同程度の量であったのに対し、葉柄、葉では根茎と比較し、AITCは1/6、6-MSITCは1/3程度と、部位による違いが認められた。

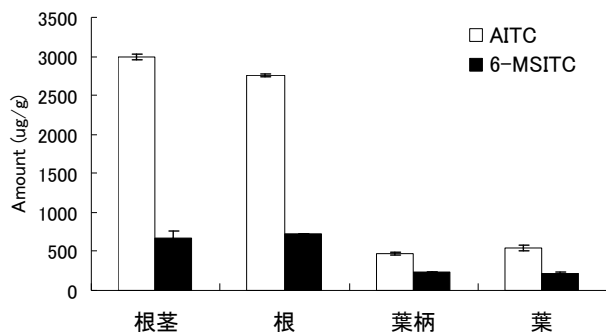


図5 ‘グリーンサム’の部位別ITC類生成量

まとめ

ワサビの機能性成分であるITC類のうち、AITCおよ

び6-MSITCのGC/MS分析における検体前処理方法を検討し、揮発性成分であるITC類を、簡便な方法で定量的に測定することが可能となった。

今後は、本検討で確定した前処理方法を用い、ワサビの部位別、品種別、季節別のITC類含有量の調査を行い、機能性成分の差を明らかにし、本県農林水産物の機能性データベースに掲載することで、県内産品の利活用役に立てていきたい。

参考文献

- 1) 木苗直秀他：ワサビのすべて 日本古来の香辛料を科学する, 62, 学会出版センター, 東京 (2006)
- 2) 静岡県公式ホームページ: わさびの産出額, 栽培面積, 水ワサビ栽培面積日本一 (https://www.pref.shizuoka.jp/j-no1/m_wasabi.html)
- 3) 小野晴寛他: 沢わさびの胃がん細胞増殖抑制成分の精製と構造解析, 日本食品科学工学会誌, 43, 10, 1092-1097 (1996)
- 4) K. ISSHIKI et al.: Preliminary Examination of Allyl Isothiocyanate Vapor for Food Preservation, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 9, 1476-1477 (1992)
- 5) C.-M. LIN et al.: Antibacterial Mechanism of Allyl Isothiocyanate, *J. food Prot.*, 63, 6, 727-734 (2000)
- 6) 奥西勲他: 日本食品化学工学会第48回大会講演集, 3Bp13 (2001)
- 7) 奥西勲他: 日本食品化学工学会第51回大会講演集, 2Ca3 (2004)

菓子, 清涼飲料水等に含まれる「糖質」および「甘味料」について

医薬食品部 食品班 長倉美由紀, 辻むつみ, 小和田和宏

Investigation of Sugars and Sweeteners in Sweets, Cooling Drink and so on

Miyuki NAGAKURA, Mutsumi TSUJI and Kazuhiro OWADA

一般に「糖類」および「甘味料」に関する表示は紛らわしいものが多く, 消費者に誤解を与えやすい。そこで, 消費者が商品を選ぶ際の参考に資するため, 市販されている菓子, 清涼飲料水等に含まれる「糖質」および「甘味料」について調査を行った。

その結果, 「ノンシュガー」, 「無糖」といった製品からは, 基準を超える「糖類」は検出されなかったが, 「微糖」と表示された製品でも, 含まれる「糖類」の濃度にはおよそ 1.8 倍もの差があった。「砂糖不使用」の製品でも, 原材料由来の「糖類」が入っていることがあった。強調表示のない製品には, 「糖類」が多く含まれる傾向があった。

Key words: 甘味料, 糖質, 糖類, 糖アルコール, 栄養強調表示
sweetener, sugar, saccharide, sugar alcohol, nutrient content claims

はじめに

「甘味料」の使用目的は, 時代により変遷してきた。第二次世界大戦直後の物資が乏しかった時代には, 「砂糖」に代わって食品に甘味をつけるための「甘味料」(サッカリン等)がよく用いられた。「砂糖」は高価で贅沢品であったため, 「甘味料」が使用された主な目的はコストを抑えることであった¹⁾。

近年は, コストを抑えるためというよりはむしろ, 生活習慣病の予防やダイエットのために, 「砂糖」よりカロリーの低い「糖類」を使用したり, 甘味と虫歯予防効果をそなえた「甘味料」(キシリトールなど)がガムやキャンデーに用いられたりするようになった。これは消費者の健康志向が強くなってきたことを反映している²⁾。しかし, 食品安全委員会が一般消費者に行ったアンケートにおいて, 食品添加物は「食品の安全性について不安に思うこと」の第1位(52%)に挙げられるなど, 添加物の使用に不安を持つ消費者は少なくない³⁾ことから, 実際に製品にどの程度の「糖質」あるいは「甘味料」が含まれているのかに関心のある消費者も多いと考えられる。

一方で, 商品が多様化するにつれ, 「甘味料」に関する表現も複雑になっている。

まず, 「糖類」と「糖質」は混乱しやすいが, 区別されるものである。「糖質」とは「糖類」, オリゴ糖, 多糖類, 「糖アルコール」等の総称である。「糖類」は「単糖類」や「二糖類」を指し, 「糖アルコール」は含まない⁴⁾(図1)。つまり, 単に「糖類ゼロ」といった場合は, 製品に「糖アルコール」が使用されている場合もありうる。

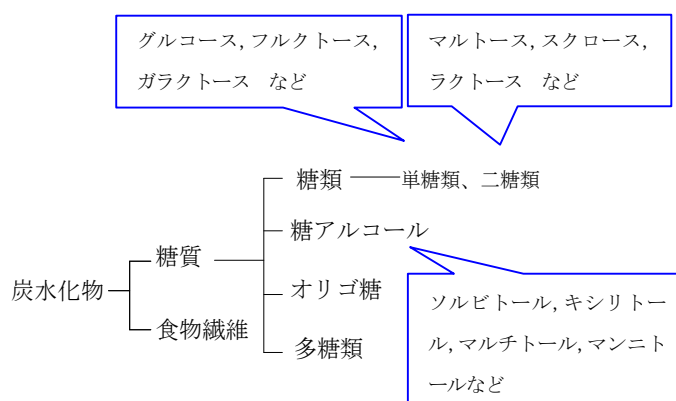


図1 炭水化物の分類

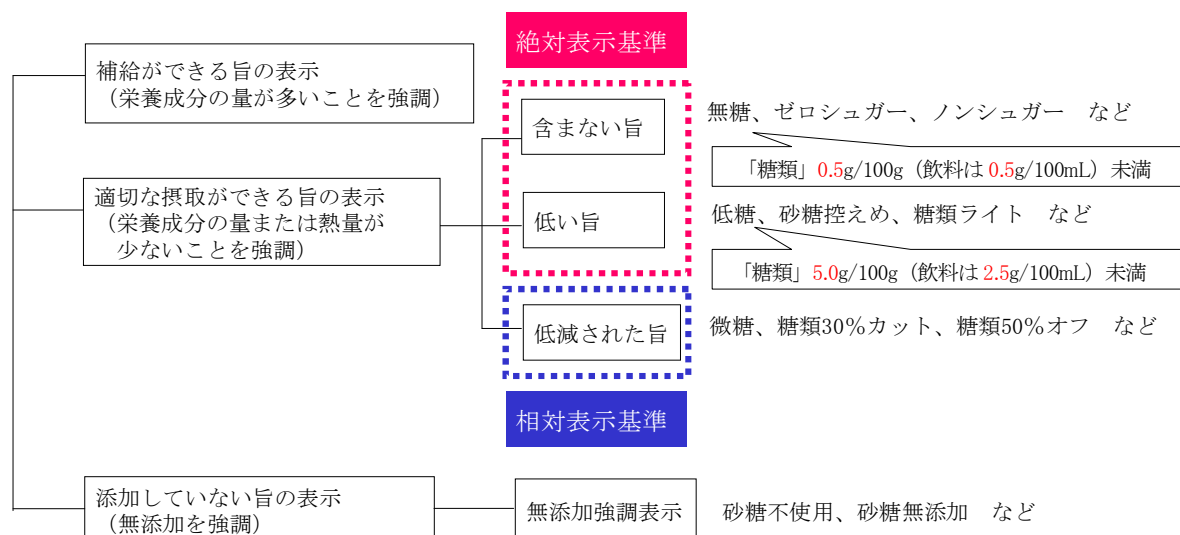


図2 栄養強調表示の分類（「糖類」の場合）

あるが、意味について消費者には理解されにくい。

栄養強調表示は、その欠乏や過剰な摂取が国民の健康の保持増進に影響を与えている栄養成分についての表示で、「補給ができる旨の表示」、「適切な摂取ができる旨の表示」、「添加していない旨の表示」の3つに大別される⁵⁾ (図2)。

このうち、「適切な摂取ができる旨の表示」は栄養成分の量又は熱量が少ないことを強調するものであり、「絶対表示」と「相対表示」に分けられる。消費者には特にこの「絶対表示」と「相対表示」の違いも認識しづらい。

さらに「絶対表示」は「含まない旨」と「低い旨」に2分され、それぞれに基準値がある。「無糖」、「ゼロシュガー」、「ノンシュガー」は前者の「含まない旨」の表示であるが、「糖類」の含有量が0.5g/100g（一般に飲用に供する液状の食品は0.5g/100mL）未満という基準値がある。一方、「低糖」は後者の「低い旨」の表示であり、「糖類」の含有量が5g/100g（一般に飲用に供する液状の食品は2.5g/100mL）未満の場合に使用できる。すなわち、「絶対表示」には統一された基準値がある。

このような「絶対表示」に対し、「相対表示」は、「低減された旨」の表示で、統一された基準値がない。「微糖」は「相対表示」の一種とみなされる場合もあるが、他の食品と比べた低減量やその割合を示せば、5g/100g（飲料は2.5g/100mL）未満という基準を満たさなくても表示ができる（ただし、低減された割合は25%以上であること）。

最後の「添加していない旨の表示」は、無添加であることを強調するもので、例えば「砂糖不使用」とは製造の過程で「糖類」を添加しなかったという意味であり、その食品本来の成分として「糖類」が含まれている場合がある。

以上のように「甘味料」に関する紛らわしい表示は、消費者の混乱や誤解を招きやすい。しかし、普段の生活でこのような違いを意識することはなく、注意して表示を見ないと見過ごしてしまう。一方で、健康志向の高まりから、実際に製品にどの程度の「糖質」あるいは「甘味料」が含まれているのかに関心のある消費者も多いと考えられる。

そこで、消費者が製品を選ぶ際の参考情報とするため、紛らわしい表示の意味とともに、「糖質」および「甘味料」の含有量、「甘味料」や強調表示の使用される製品の傾向等について調査を行った結果を報告する。

試料および方法

1 テスト対象

静岡県内の食料品店、ドラッグストア等で購入した清涼飲料水、菓子等を対象とした。特に「糖類」に関しての強調表示の多いコーヒー（16銘柄）、清涼飲料水（8銘柄）、乳酸菌飲料およびはっ酵乳（6銘柄）、茶系飲料（8銘柄）、ガム（8銘柄）、ラムネ（8銘柄）、アメ（8銘柄）をテスト対象とした。

2 試薬および標準品

アセルフアムカリウム、アスパルテーム、スクラロース、ガラクトース、キシリトール、D-ソルビトール、マルチトール、D-マンニトール：東京化成株式会社

グルコース、フルクトース、マルトース、スクロース、ラクトース：関東化学株式会社

その他の試薬：特級またはそれ以上のもの。

3 調査項目

1) 表示

製品に記載されている原材料,成分および栄養成分表示等の表示を調査した.特に,「糖類」および「糖アルコール」の含有量,強調表示の有無,「甘味料」の使用の有無について確認した.

2) 測定項目

「糖類」： グルコース,フルクトース,ガラクトース,マルトース,スクロース,ラクトース

「糖アルコール」： マルチトール, D-マンニトール, D-ソルビトール, キシリトール

「甘味料」(「糖アルコール」以外)： アセスルファムカリウム, スクラロース, アスパルテーム

4 「糖類」・「糖アルコール」の測定

1) 試験溶液の調製

①液体試料

試料 5 mL を遠沈管に正確に量り取り, 50 %エタノールを加えて 50mL に定容し, 20 分間超音波抽出したのち, 3,200rpm にて 10 分間遠心分離した. 上清を 0.20 μ m のメンブランフィルターでろ過し, HPLC 用試験溶液とした.

②固体試料

・アメ, ラムネ⁶⁾

試料約 5~10g を遠沈管に量り取り, 水を約 25mL 加え, 振とう器で一晩振とうして溶解し, 30 分間超音波抽出した. これにエタノールを 25mL 加え, 水で 50mL に定容したのち, 転倒混和し, さらに 30 分間超音波抽出した. 3,200rpm にて 60 分間遠心分離したのち, 上清を 0.20 μ m のメンブランフィルターでろ過し, 適宜 50 %エタノールで希釈して HPLC 用試験溶液とした.

・ガム⁶⁾

試料約 5g をはさみで刻み, 60°Cの水 15mL を加え, 30 分間超音波抽出し, 一晩静置した. エタノールを 25mL 加え, 水で 50mL に定容したのち, 転倒混和し, さらに 30 分間超音波抽出した. 3,200rpm にて 60 分間遠心分離したのち, 上清を 0.20 μ m のメンブランフィルターでろ過し, 適宜 50 %エタノールで希釈して HPLC 用試験溶液とした.

2) 測定条件⁶⁾

装置： Chrom NAV LC-2000 Plus (日本分光株式会社製)

カラム： Shodex Asahipak NH₂P-50 (4.6mm×250mm, 5 μ m, Shodex 株式会社製)

移動相： アセトニトリル/水 =80/20

カラム温度： 30°C

流量： 1mL/min

検出器： 示差屈折率検出器

3) 定量下限

0.005g/mL または 0.005g/g

5 「甘味料」(「糖質」系を除く)の測定⁷⁾

1) 試料の調製

4 の 1) と同様に調製したものを水で適宜希釈して調製した.

2) 測定条件

装置： ACQUITY UPLC H-Class (Waters 株式会社製)

カラム： ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1mm×100mm, 3 μ m, Waters 株式会社製)

移動相： (A)0.1%ギ酸水溶液, (B)0.1%ギ酸含有アセトニトリル

A:B=90:10(0min) → 90:10 (1min) → 40:60(4min) →

40:60(5min) → 0:100(5.1min) → 0:100(6.1min) →

90:10(6.2min) → 90:10 (9.5min)

カラム温度： 40°C

流量： 0.4 mL/min

測定モード： MRM (ESI-)

測定イオン：

アセスルファムカリウム 148.00→83.90

アスパルテーム 293.28 → 146.08, 293.28 → 173.86,
293.28 → 200.06, 293.28 → 217.16,
293.28→261.19

スクラロース 395.15→34.89

3) 定量下限

0.001mg/g

結果

「無糖」, 「低糖」, 「微糖」といった強調表示がされている製品はすべて図 2 の表示基準を満たしていた. また, 検出された「甘味料」の中で, 食品衛生法の使用基準もしくは一日許容摂取量 (ADI) を超えたものはなかった.

1 コーヒー(表 1)

含まれていた「糖類」はスクロースが主で, ラクトースを含むものもあった. スクロース, ラクトース以外の「糖類」および「糖アルコール」は検出されなかった.

含まれていた「甘味料」はアセスルファムカリウムが主であった. 「無糖」のコーヒーからは「糖質」, 「甘味料」ともに検出されなかったが, 「低糖」・「微糖」のコーヒーには「糖質」と「甘味料」の両方が含まれていた.

「糖類」について表示がないコーヒーには, 5 銘柄中 3 銘柄で「糖類」しか含まれておらず, その量は最大で, 100mL 中 5.6g であった.

2 清涼飲料水(表 1)

含まれていた「糖類」はグルコース, フルクトース, スクロースであった. コーヒー飲料などと比べて, グルコース, フルクトースといった「単糖類」の含量が多いのが特徴で, その結果, 「糖類」の合計量もコーヒー飲料より多

表 1 飲料に含まれる糖質および甘味料 (100mL 当たりの量(g))

銘柄No.	単糖類			二糖類			糖アルコール			甘味料			表示	
	ガラクトース	フルクトース	グルコース	ラクトース	スクロース	マルトース	マンニトール	マルチトール	ソルビトール	キシリトール	アセスルファムK	アスハルテム		スクラロース
K-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無糖
K-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無糖
K-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無糖、ブラック
K-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無糖
K-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無糖
K-6	-	-	-	0.80	1.00	-	-	-	-	-	0.016	-	-	微糖
K-7	-	-	-	-	1.32	-	-	-	-	-	0.008	-	-	低糖
K-8	-	-	-	-	1.28	-	-	-	-	-	0.017	-	-	微糖(糖類1.8g)
K-9	-	-	-	-	1.64	-	-	-	-	-	0.014	-	-	微糖
K-10	-	-	-	-	2.66	-	-	-	-	-	0.006	-	-	低糖(糖類60%減)
K-11	-	-	-	-	2.26	-	-	-	-	-	0.007	-	-	微糖(糖類50%減)
K-12	-	-	-	-	4.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-13	-	-	-	-	5.46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-14	-	-	-	0.53	5.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-15	-	-	-	-	2.25	-	-	-	-	-	0.034	-	-	-
K-16	-	-	-	-	1.73	-	-	-	-	-	0.012	-	0.003	-
J-1	-	6.19	1.93	-	1.88	-	-	0.55	-	-	-	-	-	砂糖不使用
J-2	-	4.85	3.76	-	1.77	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-3	-	3.13	2.94	-	1.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-4	-	3.17	2.98	-	1.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-5	-	6.32	4.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.012	-	0.013	ゼロシュガー
J-7	-	5.56	4.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-8	-	3.91	2.87	-	2.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-1	-	1.86	2.11	2.91	2.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-2	-	0.55	0.65	2.61	0.51	-	-	-	-	-	0.004	-	-	低糖(44%カット)
N-3	-	-	-	2.95	3.90	-	-	-	-	-	-	-	-	甘さすっきり
N-4	-	4.93	1.88	-	1.29	-	-	-	-	-	-	-	-	砂糖不使用
N-5	-	0.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002	糖質オフ
N-6	-	0.97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.003	糖質50%オフ
T-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-4	-	2.74	1.99	-	1.74	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-5	-	3.37	2.23	-	0.59	-	-	-	-	-	0.001	-	-	-
T-6	-	1.22	0.86	-	1.59	-	-	-	-	-	-	-	-	甘さすっきり、ストレート
T-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ティー
T-8	-	2.26	2.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無糖
														No Sugar Added, No Artificial Sweeteners

- : 検出しない

表 2 菓子に含まれる糖質および甘味料 (100g 当たりの量(g))

銘柄No.	単糖類			二糖類			糖アルコール			甘味料			表示	
	ガラクトース	フルクトース	グルコース	ラクトース	スクロース	マルトース	マンニトール	マルチトール	ソルビトール	キシリトール	アセスルファムK	アスハルテム		スクラロース
G-1	-	-	-	-	-	-	-	34.71	-	28.08	-	0.13	-	シュガーレス
G-2	-	-	-	-	-	-	-	34.15	-	38.14	0.12	-	0.029	シュガーレス
G-3	-	-	-	-	-	-	-	30.67	-	27.48	0.024	-	-	シュガーレス
G-4	-	-	-	-	-	-	-	32.14	-	28.29	0.028	0.056	-	シュガーレス
G-5	-	-	-	-	-	-	-	38.07	-	4.97	0.058	0.059	-	シュガーレス
G-6	-	-	8.71	-	51.16	-	-	-	0.58	-	-	0.019	-	-
G-7	-	-	-	-	-	-	-	3.66	-	22.51	-	-	-	砂糖不使用
G-8	-	-	5.14	-	57.95	6.43	-	-	0.78	-	-	0.063	-	-
R-1	-	-	-	-	-	-	-	86.11	-	10.06	-	-	-	シュガーレス
R-2	-	-	-	-	-	-	-	7.52	-	65.45	-	-	-	シュガーレス
R-3	-	-	-	-	-	-	-	7.97	-	66.50	-	-	-	シュガーレス
R-4	-	-	73.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R-5	-	1.21	1.23	-	94.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R-6	-	0.54	67.21	-	14.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R-7	-	-	79.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R-8	-	7.87	7.92	-	44.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-1	-	-	-	-	-	-	-	52.58	2.74	0.73	0.040	-	-	ノンシュガー
A-2	-	-	-	-	-	-	-	58.66	3.51	23.16	-	-	-	ノンシュガー
A-3	-	-	-	-	-	-	-	20.19	3.49	-	-	0.11	-	ノンシュガー
A-4	-	-	-	-	-	-	-	56.54	1.71	-	0.0025	-	0.0013	ノンシュガー
A-5	-	-	-	-	-	-	-	47.32	2.97	-	-	-	0.0081	ノンシュガー
A-6	-	-	-	-	-	-	-	55.65	3.06	-	-	-	0.037	ノンシュガー
A-7	-	2.55	4.51	-	60.27	24.00	-	-	-	-	-	-	-	-
A-8	-	4.51	10.22	-	67.57	16.58	-	-	-	-	-	-	-	-

- : 検出しない

くなっていた。「ゼロシュガー」と表示された J-6 からは「糖質」は検出されず、代わりに「甘味料」であるスクラロースおよびアセスルファムカリウムが検出された。

3 乳酸菌飲料およびはっ酵乳(表 1)

含まれていた「糖類」はグルコース、フルクトース、スクロース、ラクトースであった。「低い旨」または「低減された旨」の強調表示のあった N-2, N-5, N-6 は、「糖類」の含有量が他と比べて少なく、「甘味料」が検出された。N-3, N-4 については、「甘さすっきり」、「砂糖不使用」とあるものの、「糖類」の含有量は比較的多かった。

4 茶系飲料(表 1)

緑茶である T-1~T-3 からは、「糖質」・「甘味料」はともに検出されなかった。

紅茶飲料のうち T-4~T-6 から検出された「糖類」は、グルコース、フルクトース、スクロースであった。T-6 は、「ストレートティー」、「甘さすっきり」と表示がされていたが、「糖類」が含まれていた。「無糖」の強調表示のある T-7 からは「糖類」は検出されなかった。

ピーチティーである T-8 は、「No Sugar Added」と表示されており、「ノンシュガー」と混同されやすいがこれは「砂糖不使用」の意味である。実際、紅茶飲料と同程度の量のグルコースおよびフルクトースが検出された。

5 ガム(表2)

「シュガーレス」と表示された G-1~G-5 からは、「糖アルコール」であるキシリトールとマルチトールが検出され、「糖類」は検出されなかった。また、5 銘柄すべてから「甘味料」が検出された。

「糖類」に関する強調表示のない G-6 からは、「甘味料」とともに、ソルビトール、スクロース、グルコースが検出され、G-8 についてはさらにマルトースも含まれていた。G-7 は、「砂糖不使用」と表示されており、実際「糖類」は検出されなかった。

6 ラムネ(表2)

「シュガーレス」と表示された R-1~R-3 からは、キシリトールとマルチトールが検出された。

「糖類」に関する強調表示のない R-4~R-8 からは、グルコース、スクロース、フルクトースが検出された。また、「甘味料」は全ての製品において検出されなかった。

7 アメ(表2)

「ノンシュガー」の表示があった A-1~A-6 からは、マルチトール、ソルビトール、キシリトールといった「糖アルコール」が検出された。A-1 および A-3~A-6 には「甘味料」が使用されており、一方で「甘味料」の含まれない A-2 には「糖アルコール」が多く含まれていた。

強調表示のない A-7, A-8 からはスクロース、マルトース、フルクトース、グルコースが検出され、「甘味料」は検出されなかった。

考 察

1 「含まない旨」の表示(「無糖」、「ノンシュガー」、「ゼロシュガー」など)

今回調査した製品のうち、「糖類」を「含まない旨」の表示があったものは、コーヒーで5 銘柄(K-1, K-2, K-3, K-4, K-5)、清涼飲料水で1 銘柄(J-6)、茶系飲料で1 銘柄(T-7)、ガムで5 銘柄(G-1, G-2, G-3, G-4, G-5)、ラムネで3 銘柄(R-1, R-2, R-3)、アメで6 銘柄(A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6)、合計21 銘柄であった。

これらのうち、飲料からは「糖アルコール」も検出されなかったが、菓子からは多量の「糖アルコール」が検出された。これらの「糖アルコール」は、「糖類」と異なり血糖上昇作用やう蝕作用は弱いものの、「糖類」の5~7 割程度のカロリーを有している。また、これらの「糖アルコール」は過剰摂取により緩下作用を示し、おなかがゆるくなる場合もある。したがって、「糖類」を含まないからといって食べすぎないように注意が必要である。

例えば、緩下作用におけるキシリトールの無作用量は0.3g/kg 体重以下であり、体重60kg の成人であれば18g 程度が目安となる。

今回、キシリトール濃度が最も高かった菓子は、R-3 で、100g 当たり66.5g であった。1 袋(35g)中のキシリトールの含有量は約23.3g となり、成人の無作用量を超える可能性があるが、一日の摂取目安量とされる3 粒(約1.8g)中のキシリトール含有量は約1.2g となり、無作用量を超える心配はない。また、ガムの中でキシリトール濃度が最も高かった G-2 は、100g 当たり38.1g であるが、1 袋(21g)のキシリトール量は約8.0g となり、無作用量を超えない。

このように、1 製品を少しずつ食べる分には無作用量を超える懸念はないが、1 製品を一度に食べてしまうと、緩下作用が発現する可能性があるため、製品に記載された目安量を超えないよう注意が必要である。

2 「低い旨(「絶対表示」)」と「低減された旨(「相対表示」)」(「微糖」、「低糖」、「糖質〇〇%オフ」など)

今回調査した製品のうち、「糖類」が「低い旨(「絶対表示」)」もしくは「低減された旨(「相対表示」)」を表示していたものはコーヒーが6 銘柄、乳酸菌飲料が3 銘柄で、各表示と含まれていた「糖類」の濃度の関係は表3 のようになった。

同じ「微糖」の表示でも、含まれる「糖類」の濃度には差があり、たとえば K-11(「相対表示」と K-8(「絶対表示」とでは含まれる「糖類」の濃度が約1.8 倍違うことがわかった。また、N-2 は「低糖」すなわち「低い旨」の表示をしながらも、「44%カット」と「低減された旨」を表示し、「糖類」が100mL 中2.5g 以上である紛らわしい表示であった。「低減された旨(「相対表示」)」をうたう製品を買う際は、どれだけの量の「糖類」が低減されているのかが表示されているので、「低糖」「微糖」といった表示が絶対表示と相対表示のどちらで、どの程度の糖類が含有されているのか、違いを見るように心がけたい。

表3 「低い旨(「絶対表示」)」または「低減された旨(「相対表示」)」の製品の「糖類」含有量

銘柄No.	100mLあたりの糖類 (g)	表示	表示の種類
K-6	1.8	微糖	絶対表示
K-7	1.3	低糖	絶対表示
K-8	1.3	微糖	絶対表示
K-9	1.6	微糖	絶対表示
K-10	2.7	低糖(60%減)	相対表示
K-11	2.3	微糖(50%減)	相対表示
N-2	4.3	低糖(44%カット)	相対表示
N-5	0.8	糖質オフ	絶対表示
N-6	1.0	糖質50%オフ	相対表示

3 「添加していない旨」の表示(「砂糖不使用」、「砂糖無添加」など)

今回調査した製品のうち、「糖類」を「添加していない旨」を表示していたのは4 銘柄であった(J-1, N-4, T-8, G-7)。各表示と含まれていた「糖類」の濃度の関係を表4 に示す。検出された「糖類」は原材料に由来するものと

予測されるが、その量は「無糖」の表示基準の 100mL あたり 0.5g 未満という値を上回っている。「糖類」が添加していないからといって、製品に「糖類」が全く含まれていないとは限らないことがわかる。

「糖類」を「添加していない旨」を表示していた製品から検出された「糖類」のうち、グルコース、スクロースは、急激な血糖上昇作用を有する。こういった「糖類」の摂取によって血糖値が急激に上がると、インスリンが分泌され、血糖値は急激に下降する。このような血糖値の急激な上昇・下降は疲れを感じる原因となる。さらに、使用されなかったグルコースは脂肪に変換後、蓄えられ、これが過剰になると生活習慣病の危険因子となる。

今回の測定より、「糖類」を「添加していない旨」を表示している製品にも一定量の「糖類」が含まれていることがわかった。なかには「No Sugar Added」というように、「糖類」が「含まれない旨」と混同されうる表示もあった。

これらの「糖類」を「添加していない旨」の表示のある製品は、血糖値を意識する人、生活習慣病への懸念のある人などは、「添加していない旨」と「含まれない旨」というような強調表示には意味の違いがあることを理解し、「糖類」を過剰摂取しないように心がけることは有意義であろう。

表 4 「添加していない旨」の表示のある製品の「糖類」含有量

銘柄No.	表示	100mLまたは100gあたりの糖類 (g)
J-1	砂糖不使用	6.2(フルクトース), 1.9(グルコース), 1.9(スクロース)
N-4	砂糖不使用	4.9(フルクトース), 1.9(グルコース), 1.3(スクロース)
T-8	No Sugar Added	2.3(フルクトース), 2.1(グルコース)
G-7	砂糖不使用	糖類不検出

4 強調表示ではない表示(「甘さすっきり」など)

今回調査した製品のうち、「無糖」や「微糖」といった強調表示のない製品には、「甘さすっきり」と書かれているものもあった(N-3, T-6)。こういった「甘さ」に関する表示は、あくまで味覚に関する表現であり、強調表示の対象とならない。実際、含まれている「糖類」の量も、「無糖」や「微糖」といった強調表示の基準より多いことがわかった(表 5)。

また、「無糖」や「微糖」といった強調表示のある製品にはすべて、「糖類」または「糖質」の具体的な含有量(例 100mL あたり 2.7g など)が記載されていたが、強調表示のない製品には、「糖類」または「糖質」の具体的な含有量は記載されていなかった(N-1, T-3, R-4 を除く)。K-12, K-13, T-2 については、栄養成分表示そのものが省略されていた(なお、この 3 製品については、2015 年より施行された食品表示法において、栄養成分表示が義務

務化された食品にあたるが、現在は 5 年間の移行経過措置期間内なので、表示が省略されていても法的な問題はない)。

表 5 味覚に関する表示の製品の「糖類」含有量

銘柄No.	表示	100mLまたは100gあたりの糖類の量
N-3	甘さすっきり	6.9g
T-6	甘さすっきり	3.7g
無糖の基準(飲料)	-	0.5g未満
微糖の基準(飲料)	-	2.5g未満

まとめ

コーヒーをはじめ、清涼飲料水、はっ酵乳・乳酸菌飲料、茶系飲料、ガム、ラムネ、アメの「糖類」および「甘味料」を調査して、以下のことが明らかとなった。

- 1 「ノンシュガー」、「無糖」といった製品からは、基準を超える「糖類」は検出されなかったが、「糖アルコール」を多く含むものもあったので、カロリーの取りすぎにならないように注意することが大切である。
- 2 「微糖」、「低糖」などと表示された製品には、「相対表示」と「絶対表示」のものがあり、同じ「微糖」と表示された製品でも、含まれる「糖類」の濃度には約 1.8 倍の差があった。
- 3 「砂糖不使用」の製品でも、原材料由来の「糖類」が入っていることがあった。また、強調表示のない製品には、「糖類」が多く含まれる傾向があった。
- 4 「無糖」、「微糖」、「低糖」、「砂糖不使用」といった表示は、それぞれ意味が異なる。明確な基準値があるものもあれば、数値による基準がないものもある。言葉のイメージにとらわれず、意味を理解して製品を選択することが重要である。

文献

- 1) 日本食品衛生協会:正しく知ろう 食品添加物(2005)
- 2) 食品化学新聞社:「糖質」の科学—機能・物性・役割を知ろう—,月刊フードケミカル,375 (2016)
- 3) 内閣府食品安全委員会事務局:『食品の安全性に関する意識等について』の結果報告(2014)
- 4) 厚生労働省告示第176号:栄養表示基準(2003)
- 5) 東京都福祉保健局ホームページ:栄養強調表示
- 6) 日本薬学会:「衛生試験法注解」(2015)
- 7) 日本ウォーターズ株式会社ホームページ:ACQUITY UPLC H-Class システムおよび ACQUITY QDa 検出器を用いたさまざまな食品中に含まれる「甘味料」の高速一斉分析

抗カリシウイルス活性を有する化合物の探索

医薬食品部 医薬班

食品班

微生物部 ウイルス班

国立感染症研究所

静岡県立大学大学院 創薬探索センター

大場 舞, 安藤隆幸, 岩切靖卓,

渡辺陽子*¹, 小和田和宏

山崎喜与子

荒畑沙織*², 池ヶ谷朝香, 川森文彦*³

岡智一郎, 高木弘隆

小郷尚久, 浅井章良

Screening and Identification of Anti-calicivirus Agents

Mai OHBA, Takayuki ANDO, Yasutaka IWAKIRI,
Yoko WATANABE, Kazuhiro OWADA, Kiyoko YAMAZAKI,
Saori ARAHATA, Asaka IKEGAYA, Fumihiko KAWAMORI,
Tomoichiro OKA, Hirotaka TAKAGI, Naohisa OGO
and Akira ASAI

カリシウイルス科には、ヒトや動物に感染・発症する多種類のウイルスが属し、特にヒトノロウイルスやヒトサポウイルスは、急性胃腸炎の集団発生で社会的な問題となっている。そこでカリシウイルス感染制御手段の将来的な確立を目指し、抗ウイルス化合物の探索を行った。

ヒトノロウイルスおよびヒトサポウイルスの代替ウイルスとして、同科に属し、培養細胞での増殖系が確立されているマウスノロウイルス、ブタサポウイルスおよびネコカリシウイルスを用いた CPE (cytopathic effect) reduction assay を行い、化合物ライブラリーからヒット化合物の探索を行ったところ、紅茶ポリフェノールであるテアフラビン類が、使用した3種のウイルス全てに抗ウイルス活性を示した。

ネコカリシウイルスを用いた評価の結果、テアフラビン類はウイルスの宿主細胞への侵入以前に作用し、その活性の発現にはベンゾシクロヘプテノン環上の水酸基が重要であることが示唆された。

Key words : カリシウイルス, ノロウイルス, サポウイルス, テアフラビン類
calicivirus, norovirus, sapovirus, theaflavin

はじめに

カリシウイルス科のウイルスは、エンベロープを持たず、一本鎖 (+)RNA をゲノムとして持ち、ベシウイルス、ラゴウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、ネボウイルスの5つの属に分類される^{1,2)}。ヒトや動物に感染・発症する多種類のウイルスが属するが、特にヒトノロウイ

ルスやヒトサポウイルスは、急性胃腸炎の集団発生で社会的な問題となっている^{3,4)}。そこでカリシウイルス感染制御手段の将来的な確立を目指し、抗ウイルス化合物の探索を行うこととした。

ヒトノロウイルスおよびヒトサポウイルスの効率的な細胞培養系が確立されていないため、同科に属し、培養細胞での増殖系が確立されているマウスノロウイルス (MNV)、ブタサポウイルス (PoSaV) およびネコカリシウイルス (FCV) 等が代替ウイルスとして用いられている⁵⁾。本研究では、これらのウイルスを用いた CPE reduction assay によって、静岡化合物ライブラリー⁶⁾か

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 静岡県富士健康福祉センター, *2 静岡県中部健康福祉センター, *3 静岡県立大学

ら抗カリシウイルス化合物の探索を行った。さらに、ヒット化合物として得られたテアフラビン類については、抗ウイルスメカニズムおよび構造活性相関の検討も行った。

材料および方法

1 試薬

スクリーニングには、ファルマバレーセンターが所有する静岡化合物ライブラリーに登録されている化合物を、未精製のまま使用した。アバメクチン、アベルメクチン B1a (以上、和光純薬社製)、(-)-エピガロカテキンガラート水和物 (東京化成社製)、タンニン酸 (ナカライテスク社製)、テアフラビン (TF1)、テアフラビン-3-O-ガラート (TF2A)、テアフラビン-3'-O-ガラート (TF2B) (以上、長良サイエンス社製)、テアフラビンモノガラーツ (マイクロソース社製)、テアフラビン-3,3'-O,O'-ジガラート (TF3) (マイクロソース社製または長良サイエンス社製)、テアフラビン 40% 含有品 (粗精製物)、テアフラビン 90% 含有品 (カフェイン、カテキン除去) (以上、焼津水産化学工業社製) は、未精製のまま評価および反応に供した。5-Bromo-N-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)-thiophene-2-carboxamide (BFTC) は既報の文献⁷⁾ によって合成した。評価に供した化合物は、あらかじめ 1 mM, 10 mM または 100 mM のジメチルスルホキシド (ナカライテスク社製) 溶液を調製し、-20 °C で保管したものをを用いた。

2 アセチル化テアフラビン類の合成

テアフラビン 90% 含有品 (10 mg) を無水酢酸に溶解し、室温にてピリジンを添加した。3 時間後、薄層クロマトグラフ (メルクミリポア社製) にて原料の消失を確認し、メタノールを加えて過剰の無水酢酸を分解した。減圧下反応液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ (ナカライテスク社製) (eluent : EtOAc / Hexane = 1 : 1) にて精製し、アセチル化テアフラビン類 (12 mg) を淡黄色粉末として得た。

生成物を液体クロマトグラム-質量分析計 (LC/MS) (Waters 社製) を用いて確認した。分析用カラムには、COSMOSIL Packed Column Cholest (2.0 mm I.D. × 50 mm, ナカライテスク社製) を使用した。得られたアセチル化テアフラビン類は複数の生成物の混合物であり、主生成物は、テアフラビンモノガラートの 11 個の水酸基のうち 9 個がアセチル化された化合物であった。ESIMS m/z 1118 [M+H+Na]²⁺

3 細胞

1) RAW264.7 細胞 (ATCC cat. code; TIB-71)

Dulbecco's modified Eagle's medium (15 mg/L フェノ

ールレッド, 4500 mg/L グルコース, 4 mM L-グルタミンおよび 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid (HEPES) 添加) に、抗生物質 (100 U/mL ペニシリン, 100 μg/mL ストレプトマイシンおよび 0.25 μg/mL アムホテリシン B 含有), 1 mM ピルビン酸ナトリウム (ライフテクノロジー社製), 非働化した 10% FBS (バイオセラ社製) を添加した培地を用いて, 37 °C, 5% CO₂ インキュベーター内で継代培養した。

2) LLC-PK1 細胞 (ATCC cat. code; CL-101)

Minimum essential medium (MEM) に, 10 mg/L フェノールレッド, 1% 非必須アミノ酸溶液, 抗生物質 (100 U/mL ペニシリン, 100 μg/mL ストレプトマイシンおよび 0.25 μg/mL アムホテリシン B 含有) (ライフテクノロジー社製), 5% FBS (バイオセラ社製) を添加した培地を用いて, 37 °C, 5% CO₂ インキュベーター内で継代培養した。

3) CRFK 細胞 (ATCC cat. code; CCL-94)

MEM (10 mg/L フェノールレッド, 1000 mg/L グルコースおよび 2 mM L-グルタミン添加) に, 1% 非必須アミノ酸溶液, 抗生物質 (100 U/mL ペニシリン, 100 μg/mL ストレプトマイシンおよび 0.25 μg/mL アムホテリシン B 含有), 10 mM HEPES, 1 mM ピルビン酸ナトリウム (ライフテクノロジー社製), 非働化した 5% FBS (バイオセラ社製) を添加した培地を用いて, 37 °C, 5% CO₂ インキュベーター内で継代培養した。

スクリーニングには, 5.0 × 10³ cells/well の割合で 96 ウェルプレートに播種し, 24 時間以上培養したものをを用いた。

4 ウイルス

MNV S-7 株 (日本大学生物資源科学部獣医学科獣医微生物学研究室 遠矢幸伸教授より分与) をフラスコ内にシート状に培養した RAW264.7 細胞に接種し, 37 °C, 5% CO₂ インキュベーター内で 2-3 日間培養した。培養上清を 10,000 × g, 1 時間遠心し, 遠心上清を使用時まで -80 °C で保管した。

PoSaV cowden 株 (オハイオ州立大学 Linda J. Saif 教授らにより分離された株), FCV-2280 株 (ATCC cat. code; VR-2057) および FCV-F9 株 (ATCC cat. code; VR-782) は, LLC-PK1 細胞または CRFK 細胞を用いて, MNV と同様の方法で培養, 保管した^{5, 8)}。

TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) 値は既報の文献の方法によって算出した⁹⁾。

5 GPE-based スクリーニング

FBS 不含培地で希釈した化合物溶液 (50 μM) およ

びウイルス液 (100 TCID₅₀/50 μL) を96穴プレート中で120 μLずつ混和し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で30分間静置した。反応液100 μLを96穴プレートにシート状に培養した細胞へ接種し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で1時間静置した (ウイルス感染ステップ)。細胞上清を除去し、100 μL/wellのFBS不含培地 (CRFK細胞) または増殖培地 (RAW264.7細胞) を添加して3-7日間培養した (ウイルス複製、増殖ステップ)。ただし、PoSaVを用いたアッセイでは、500 TCID₅₀/50 μLのウイルス液を用い、ウイルス感染ステップ後の培地の置換は、胆汁酸 (glycochenodeoxycholic acid : GCDCA) (50 μM, シグマ-アルドリッチ社製) を添加したFBS不含培地を150 μL/well使用した。化合物非処理のウイルスを接種した細胞にCPEが観察された段階で全ウェルを観察し、CPEを阻止した化合物をヒット化合物とした。

ヒット化合物については、ウイルス感作時の終濃度が6.4-100 μMとなるよう2倍段階希釈列を作製し、同様の操作を行うことによって最小有効濃度を算出した。また、細胞毒性はalarBlue (ライフテクノロジーズ社製) を用い、マニュアルに記載の手法に基づいて測定した。

6 遠心式フィルターを用いたTCID₅₀アッセイ

FBS不含培地で希釈した化合物溶液およびウイルス液 (5000-8000 TCID₅₀) の混合液 (50 μL) を遠心フィルター付きチューブ (Amicon Ultra-0.5 (MWCO 100 k (Da)), メルクミリポア社製) 内で室温下静置した。所定の時間反応させた後、FBS不含培地450 μLを加えて20,000×g、1分間遠心し、再びFBS不含培地450 μLを加え、20,000×g、1分間遠心した。ウイルスはチューブのマニュアルに記載の手法に基づいて回収し、FBS不含培地にて5倍段階希釈列を作製した。各希釈液を96ウェルプレートに播種した細胞に接種し、3日後、CPEの観察とTCID₅₀値の算出を行った。

抜し、抗ウイルス活性のスクリーニングを行った。柿抽出物やブドウ種子などの天然物について抗ノロウイルス効果の報告が多いこと^{10,11)}、他のウイルスに対する阻害薬についてノロウイルスへの適応拡大の報告があることから¹²⁾、天然物や抗ウイルス薬とそれに近い構造を持つものを中心に選抜した。アルキル化薬は、DNAをアルキル化することで細胞増殖抑制効果を示すため、同様の機序でウイルスRNAをアルキル化することを期待して選抜した。界面活性剤は非エンベロープ型のウイルスには効きにくいとされているが²⁾、その効果を再検証するために用いた。合成低分子化合物としては、in-house合成したものや市販化合物の中から構造的多様性を主眼にして選択した。また、近年注目されているドラッグ・リポジショニングの観点から、抗炎症薬や抗がん薬など活性既知の化合物も選抜した。

表1 スクリーニング対象の化合物

天然物ライブラリー	771
抗ウイルス薬と構造類縁体	312
アルキル化薬と構造類縁体	29
界面活性剤	30
合成低分子化合物	784
生理活性化合物	154
	2,080

抗カリシウイルス化合物の探索にあたり、まずは作用機序を限定せず、ウイルス増殖によるCPEを抑制する化合物を探索するスクリーニング系を構築した。また、より広いスペクトルをもつ化合物を得るために、先述の3種の代替ウイルス (MNV S-7株, FCV-2280株, PoSaV cowden株) を用いた。化合物溶液 (終濃度25 μM) とウイルス液 (100-500 TCID₅₀/50 μL) を等量混合した後、37 °Cのインキュベーター内で静置し、30分後、混合液を96穴プレートに播種した細胞に接種した。化合物の細胞への影響を避けるため、1時間後、細胞上清をデカントし、培地に置き換えた。判定までに要する時間はウイルスにより異なるが、3日から7日後にウイルスによって引き起こされるCPEを顕微鏡で観察し、CPEが見

結果および考察

1 スクリーニング

静岡化合物ライブラリーから2,080化合物 (表1) を選

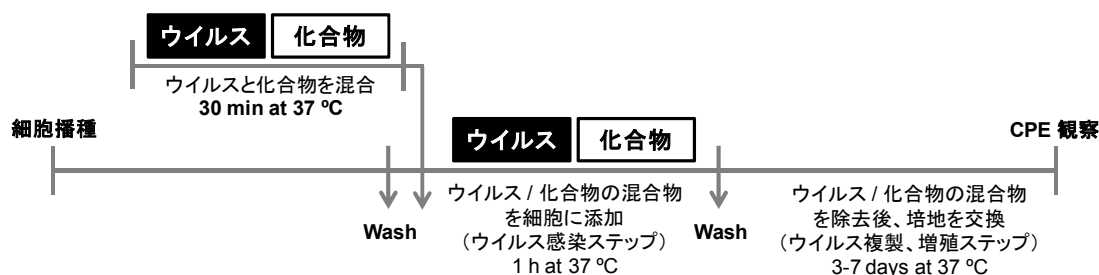


図1 スクリーニングのプロトコール

られなかったウェルの化合物をヒット化合物とした (図 1).

2 ヒット化合物

上述したプロトコルで化合物を数回評価し、すべて、もしくはいずれかのウイルスに対して再現性よく CPE を阻止したものの 6 種をヒット化合物として同定した。ヒット化合物について、ウイルス感作時の終濃度を 6.4–100 μ M としてスクリーニングと同様の操作を行うことにより、最小有効濃度を算出した (表 2).

表 2 ヒット化合物と最小有効濃度

ヒット化合物	最小有効濃度 (μ M)		
	FCV	MNV	PoSaV
Theaflavin monogallates (mixture)	100	50	50
Theaflavin digallate	25	50	25
BFTC	>100	25	>100
Abamectin (avermectin B1a & B1b)	>100	>100	12.5
Avermectin B1a	>100	>100	25
EGCG hydrate	>100	>100	25

FCV-2280 株, MNV S-7 株, PoSaV cowden 株使用

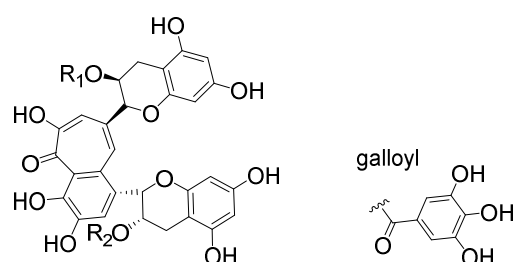
紅茶ポリフェノールであるテアフラビン類が、3 種のウイルスすべてに抗ウイルス活性を示した。テアフラビン類には、高い抗酸化作用や抗インフルエンザウイルス作用など、さまざまな生理活性が知られている^{13, 14)}。合成低分子化合物の BFTC は MNV 特異的に CPE を阻止した。我々は、BFTC の構造最適化によって 70 倍高活性な誘導体を創出したことを既に報告している⁷⁾。天然物のアバメクチン (アベルメクチン B1a および B1b の混合物)、アベルメクチン B1a および (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) 水和物は PoSaV 特異的な CPE 阻止作用を示した。アベルメクチンは、GABA (γ -aminobutyric acid) アゴニスト活性を有するマクロサイクリックラクトン系の殺虫剤であり、幅広い殺虫、殺ダニ、殺線虫活性を示す^{15, 16)}。EGCG は緑茶カテキンであり、抗酸化作用、抗菌作用、抗肥満作用および抗アレルギー作用など多くの生理活性が報告されている^{17, 18)}。今回の条件では抗 FCV 活性は確認できなかったが、Oh らは、高濃度の EGCG (12 mg/mL, 約 26 mM) が抗 FCV 活性を示すことを報告している¹⁹⁾。

ヒット化合物の中から、3 種のウイルスの CPE を阻止したテアフラビン類について、活性評価と抗ウイルスメカニズムに関する検討を行うこととした。なお、6 種のヒット化合物は、最小有効濃度において細胞毒性を示さ

なかった (データ省略)。

3 テアフラビン類の活性評価と作用メカニズムの解析

テアフラビン類は、茶葉から紅茶を製造する過程でカテキン類 (エピカテキン, エピカテキンガレート, エピガロカテキン, エピガロカテキンガレート) が酸化重合して生成する。没食子酸エステルの数, 結合位置によって 4 種類のテアフラビン類 (テアフラビン (TF1), テアフラビン-3-O-ガレート (TF2A), テアフラビン-3'-O-ガレート (TF2B), テアフラビン-3,3'-O,O-ジガレート (TF3)) が生成する (図 2)¹⁴⁾。スクリーニングにおけるヒット化合物である "Theaflavin monogallates" は TF2A と TF2B の混合物 (混合比は不明) であり, "Theaflavin digallate" は, TF3 である。



TF1 (Theaflavin); $R_1 = R_2 = H$

TF2A (Theaflavin-3-O-gallate); $R_1 = \text{galloyl}, R_2 = H$

TF2B (Theaflavin-3'-O-gallate); $R_1 = H, R_2 = \text{galloyl}$

TF3 (Theaflavin-3,3'-O,O-digallate); $R_1 = R_2 = \text{galloyl}$

図 2 テアフラビン類の構造式

各種テアフラビン類を収集し、ウイルスへの作用を評価した。すなわち、テアフラビン類とウイルス液を混合して室温で 1 時間感作させた後、遠心式フィルターを用いてテアフラビン類を除去し、回収したウイルス液を細胞に接種し、TCID₅₀ アッセイを行った。より広域なスペクトルを有する化合物であることを検証するため、ウイルスは、スクリーニングとは異なる FCV-F9 株 (ATCC VR-782) を用いた。陽性対照としては、抗 FCV 活性が報告されているタンニン酸²⁰⁾を用いた。テアフラビン 40%含有品はカテキン類と茶葉から合成した粗精製物で、90%含有品はカフェインおよびカテキンを除去してテアフラビン類の含量を高めたものである (テアフラビン類の混合比は不明)。混合物の濃度は、TF2 の分子量 716.6 を用い、他のサンプルと同じ終濃度である 225 μ M になるよう調製した (0.16 mg/mL に相当)。

TCID₅₀ アッセイの結果、いずれのテアフラビン類も FCV-F9 株への抗ウイルス活性を示し、ウイルス感染における宿主細胞への接着・侵入以前に作用することが示唆された。また、粗精製物であるテアフラビン 40%含有品を含むすべてのサンプルが同程度の抗 FCV 活性を示

した (1.9–2.3 (\log_{10} TCID₅₀/mL) units) の減少 (図 3). 分子中に没食子酸エステルを有さないテアフラビン (TF1) も TF2A, TF2B, TF3 と同様に活性を示すことから, 没食子酸エステル部は活性に寄与していないことが示唆された. 実際にスクリーニングに供した 2,080 化合物の中に没食子酸が含まれていたが, 各ウイルスへの活性は確認できなかった.

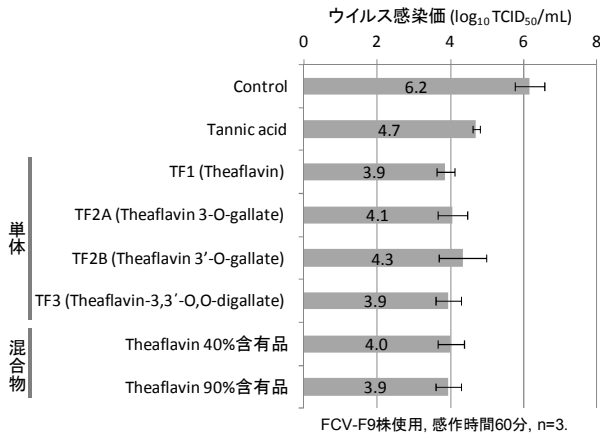


図 3 テアフラビン類の抗 FCV 活性

実用性を踏まえ, また, テアフラビン類のみの作用を評価するため, テアフラビン 90%含有品を用いて濃度変化による活性を比較したところ, テアフラビン類の活性は濃度依存的に向上し, 1.6 mg/mL では 3.0 (\log_{10} TCID₅₀/mL) units 感染価が減少した (図 4).

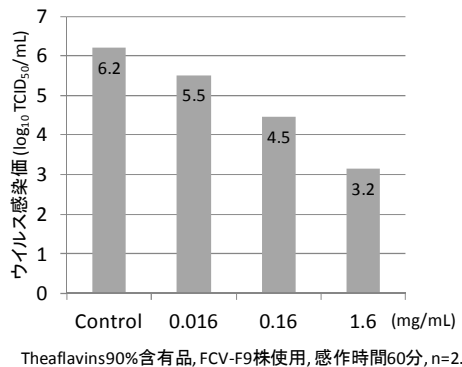


図 4 テアフラビン類濃度の検討

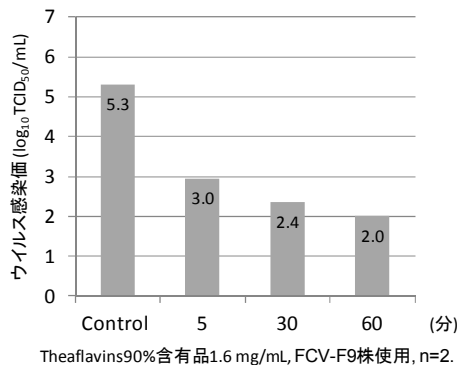


図 5 テアフラビン類感作時間の検討

次に, 感作時間による抗 FCV 活性の変化を比較した結果, ウイルスの感染価は感作時間の増加にともなって減少する傾向があるが, 5 分間の感作でも 2.3 (\log_{10} TCID₅₀/mL) units 感染価が減少した (図 5).

4 テアフラビン類の構造活性相関

構造活性相関を検証するため, テアフラビン 90%含有品のアセチル化による水酸基の保護および成体体の活性評価を行った. テアフラビン類の構造中に存在する複数の水酸基は無水酢酸およびピリジンによって容易にアセチル化され, LC/MS によって, テアフラビンモノガレートの 11 個の水酸基のうち 9 個がアセチル化された化合物を主生成物として確認した. しかし, アセチル体を FCV-F9 株で評価したところ, 活性が著しく減弱した (図 6). このことから, テアフラビン類の水酸基が活性の発現に重要であることが示唆された. また, 別途行った約 40 種のポリフェノールの評価の結果, C 環に類似した構造の化合物では活性が確認できなかったことから, ベンゾシクロヘプテノン環 (A 環および B 環) 上の水酸基が特に重要だと考えられる (データ省略).

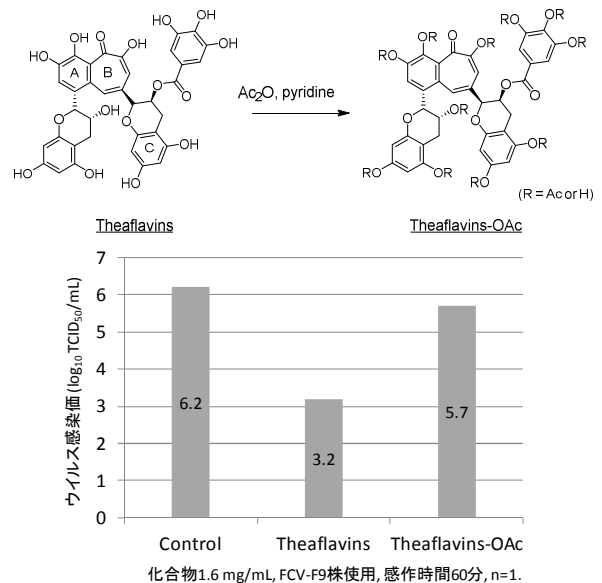


図 6 アセチル化テアフラビン類の合成と活性評価

まとめ

抗カリシウイルス活性を有する化合物の探索の結果, 紅茶ポリフェノールであるテアフラビン類が 3 種のウイルスに活性を示した. FCV-F9 株を用いて行った検討の結果, テアフラビン類はウイルスの宿主細胞への侵入以前に作用し, その活性の発現にはベンゾシクロヘプテノン環上の水酸基が重要である可能性が示唆された²¹⁾. 現時点では汎用的かつ効率的なウイルス増殖系が確立されていないものの, 今後, ヒトノロウイルスやヒトサポウイルスに対する抗ウイルス活性の評価が必要である.

謝 辞

本研究の実施にあたりブタサポウイルスを用いた検討等、御協力いただいた米国オハイオ州立大学 Linda J. Saif 先生および Qihong Wang 先生、化合物ライブラリーを御提供いただいた(公財)静岡県産業振興財団ファルマバレーセンター 佐々木康夫コーディネーターおよび大坪昌広主査、マウスノロウイルスを御提供いただいた日本大学 遠矢幸伸先生に感謝いたします。

本研究は、静岡県新成長戦略研究(2011~2015 年度)として実施した。

参考文献

- 1) International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2015 Release, Available at: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases
Accessed on 29 March 2017.
- 2) Green, K. Y.: Fields Virology 6th edn (eds Knipe, D. M. et al.), 950–979, Lippincott Williams and Wilkins, USA (2013)
- 3) Robilotti, E. et al.: Norovirus, Clin. Microbiol. Rev., **28**, 134–164 (2015)
- 4) Oka, T. et al.: Comprehensive review of human sapoviruses, Clin. Microbiol. Rev., **28**, 32–53 (2015)
- 5) Wang, Q. et al.: Stability of and attachment to lettuce by a culturable porcine sapovirus surrogate6 for human caliciviruses, Appl. Environ. Microbiol., **78**, 3932–3940 (2015)
- 6) 静岡県ファルマバレープロジェクト, Available at: <http://www.pref.shizuoka.jp/sangyou/sa-580/pharma/index.html>
Accessed on 29 March 2017.
- 7) Ohba, M. et al.: Discovery and synthesis of heterocyclic carboxamide derivatives as potent anti-norovirus agents, Chem. Pharm. Bull., **64**, 465–475 (2016)
- 8) Oka, T. et al.: Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells, Antiviral Res., **90**, 9–16 (2011)
- 9) Kitajima, M. et al.: Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses, J. Virol. Methods, **169**, 269–273 (2010)
- 10) Kamimoto, M. et al.: Antiviral effects of persimmon extract on human norovirus and its surrogate, bacteriophage MS2, J. Food Sci., **79**, M941–946 (2014)
- 11) Su, X. et al.: Grape seed extract for foodborne virus reduction on produce, Food Microbiol., **34**, 1–6 (2013)
- 12) Arias, A. et al.: Progress towards the prevention and treatment of norovirus infections, Future Microbiol., **8**, 1475–1487 (2013)
- 13) Yang, Z. F. et al.: Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis, Fitoterapia, **93**, 47–53 (2014)
- 14) Li, S. et al.: Black tea: chemical analysis and stability, Food Funct., **4**, 10–18 (2013)
- 15) 農薬評価書 アバメクチン, 第 31 回中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会参考資料, **3**, 1–72 (2012)
- 16) Campbell, W. C.: History of avermectin and Ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactones antiparasitic agents, Curr. Pharm. Biotechnol., **13**, 853–865 (2012)
- 17) 石井剛志: 茶カテキン類の安定性の向上を目指した凝集・沈殿反応の解析, 東洋食品研究所研究報告書, **29**, 183–189 (2013)
- 18) Ali, N. et al.: Food and beverage consumption and health (Eds. Wu, W.), 33–74, Nova Biochemical, USA (2013)
- 19) Oh, E.-G. et al.: Antiviral activity of green tea catechins against feline calicivirus as a surrogate for norovirus, Food Sci. Biotechnol., **22**, 593–598 (2013)
- 20) Su, X. et al.: Inactivation of human norovirus surrogates by benzalkonium chloride, potassium peroxymonosulfate, tannic acid, and gallic acid, Foodborne Pathog. Dis., **9**, 829–834 (2012)
- 21) Ohba, M. et al.: Antiviral effect of theaflavins against caliciviruses, J. Antibiot., **70**, 443–447 (2017)

PM2.5 大気自動測定器捕集フィルターによる 水溶性成分の把握

大気水質部 大気騒音環境班 本間信行, 井口大輔

Essential research of water soluble ion components in PM2.5 by analyzing sampling filter used at auto measuring machine for PM2.5.

Nobuyuki HONMA and Daisuke IGUCHI

大気汚染常時監視測定局に設置されている微小粒子状物質(PM2.5)自動測定器の捕集フィルターを使用し、水溶性イオン成分を測定し、自動測定器の質量濃度と成分分析の結果と比較した。その結果、捕集フィルターのイオン濃度は、自動測定器の質量濃度や成分分析の結果と強い関連が認められた。また、材料由来の成分やガス状成分については溶出や揮散により定量が困難であったが、一部の成分は定量が可能であった。この手法を使って実施した成分分析を実施していない地点を含めた広域解析は、地点の状況が反映できており短期的な相対比較に有効であり、移流を含めた PM2.5 の地域的な挙動の把握に適用可能と考えられた。

Key words: PM2.5, 水溶性イオン, 自動測定器, 捕集フィルター, 地域的挙動

PM2.5, water soluble ion components, auto measuring machine, tape filter, local air movement

はじめに

県では大気汚染防止法に基づく微小粒子状物質(PM2.5)の常時監視として、大気汚染測定局の自動測定器により質量濃度を測定し、大気中の生成過程や挙動を解明するための成分分析調査(2地点, 4回/年)を実施している。成分分析調査は、地点数が少ない、調査期間が必ずしも高濃度にならない等の課題を抱えている。一方で、測定局のPM2.5自動測定器は、24時間365日、質量濃度の測定を行っており、24時間ごとにPM2.5を捕集したフィルターが保持されている。そこで、本研究はこのフィルターを活用して、PM2.5の主要な成分である水溶性イオンを分析する方法を検討し、成分分析調査よりも広域できめ細かい情報を収集し、本県におけるPM2.5の挙動解明への活用を検討した。

方法

1 試料

1) 捕集フィルター

大気汚染常時監視測定局に設置されているPM2.5自動測定器(ハイブリッドモニターSHARP5030(東京ダイレック株式会社), 図1)で使用される連続ガラス繊維濾紙(Thermo Scientific GF10 Grassfiber Filter)を使用した。ロットばらつきの確認調査では5ロットの捕集フィルター(X27.561-19, X27.587-11, X27.587-14, X27.596-22, X27.606-03)を使用した。測定局から回収される使用済みの捕集フィルターはロットを特定せず分析に供した。



図1 PM2.5自動測定器

2) 調査地点

以下の大気汚染常時監視測定局の自動測定器で捕集された微小粒子状物質(PM2.5)を対象とした。

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)

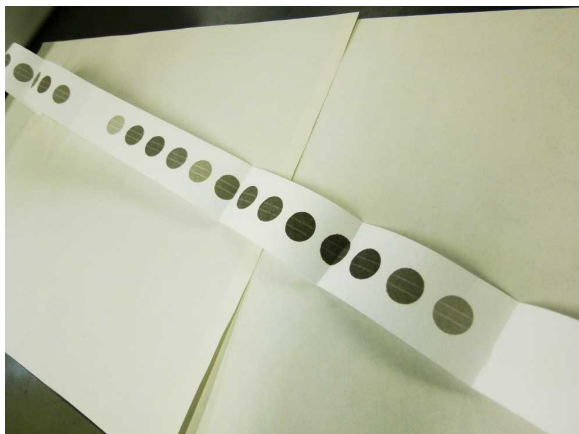


図2 PM2.5を捕集したフィルター

- ・ 熱海総合庁舎 (以下, 熱海)
- ・ 下田市役所 (以下, 下田)
- ・ 裾野文化センター (以下, 裾野)
- ・ 三島自動車排ガス測定局 (以下, 三島)
- ・ 富士救急医療センター (以下, 富士)
- ・ 島田市役所 (以下, 島田)
- ・ 掛川自動車排ガス測定局 (以下, 掛川)
- ・ 牧之原市役所大東支所 (以下, 大東)
- ・ 湖西市役所 (以下, 湖西)

3) 調査期間

捕集フィルターの材料影響や質量濃度との比較調査では、富士と湖西の地点について、平成26年10月1日～11月30日の2か月間を対象とし、成分分析調査との比較及び成分分析調査未実施地点への適用では、以下の秋季、冬季、春季、夏季の四季ごとに実施された成分分析調査期間とした。

秋季：平成26年10月22日（水）～11月5日（水）

冬季：平成27年1月21日（水）～2月4日（水）

春季：平成27年5月7日（木）～5月21日（木）

夏季：平成27年7月22日（水）～8月5日（水）

4) 装置及び条件

捕集フィルターはPM2.5自動測定器により、0-24時の24時間分のPM2.5を16.7L/minの実流量制御で1スポットに捕集する（図2）。一方、成分分析調査では専用の捕集装置を使い、捕集流量は同様だが10:00～翌日9:59の24時間分を1日分として捕集する。両者の結果を比較する際は、捕集フィルターの結果を24時間で按分して成分分析調査の結果と同時間帯に換算した。

イオン成分は捕集フィルターに捕集された直径16mmのスポットを半円状にカットした後（図3）、10ml超純水で20分間超音波抽出を行った。抽出液をメンブレンフィ

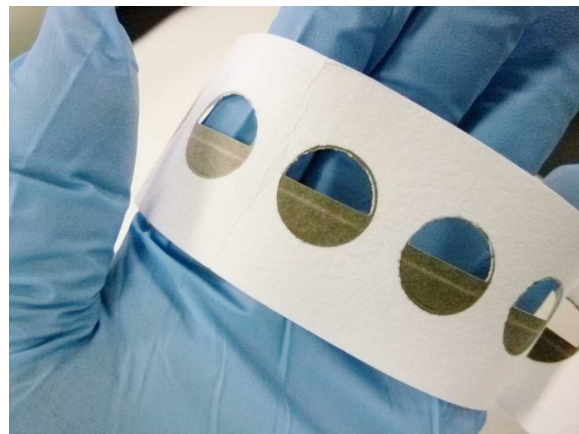


図3 分析用試料を採取した後の捕集フィルター

ルター（アドバンテック東洋株式会社 DISMIC 13HP045CN）でろ過した後、イオンクロマトグラフ（日本ダイオネクス株式会社 DIONEX DX-320）により、以下のイオン成分を分析した。

陽イオン：Na⁺、NH₄⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺

陰イオン：Cl⁻、SO₄²⁻、NO₃⁻

結果および考察

1 捕集フィルター材料と使用による影響の確認

1) フィルターのロットばらつき

未使用の捕集フィルター5ロットについてイオン成分を分析した結果（各n=3）を表1及び図4に示した。定量下限に近い濃度のMg²⁺とCa²⁺で変動係数がやや大きくなったが、他のイオン成分は変動が十分に小さくロットのばらつきによる影響はほとんどないと判断された。

2) フィルター材料の影響

PM2.5の成分分析ではイオン成分の定量に使用するフィルターは四フッ化エチレン樹脂（PTFE）か石英繊維を使用すること¹⁾とされており、フィルターから溶出するイオン成分の影響に配慮が必要とされている。一方、自動測定器で使用する捕集フィルターはガラス繊維であり、Na⁺、Cl⁻、SO₄²⁻が無視できない濃度レベルで検出され、イオンバランスは常に陽イオン過多となり、陰イオンに対する比率で1.1～1.3となった。これらの結果から材料由来のNa⁺が抽出操作の際に溶出しているものと考えられた。

3) 自動測定器での使用による影響

実際に自動測定器で使用した捕集フィルター（以下、使用后捕集フィルター）は、回収の際に使い捨て手袋を使って保守業者によりロール状に巻き取られて回収される。回収操作の一部は素手の作業があり、巻き取られることでフィルターにPM2.5のスポットが裏転写している

表1 ロットによるイオン成分の変動係数

イオン成分	変動係数 (%)
Na ⁺	3.6
NH ₄ ⁺	5.9
K ⁺	8.5
Mg ²⁺	20.6
Ca ²⁺	22.9
Cl ⁻	7.5
SO ₄ ²⁻	4.0
NO ₃ ⁻	不検出

表2 ブランク部の部位ごとの変動係数

イオン成分	変動係数 (%)		
	軸止め端	スポット直前部	切断端
Na ⁺	6	3	6
NH ₄ ⁺	42	40	41
K ⁺	18	20	12
Mg ²⁺	17	10	11
Ca ²⁺	27	9	22
Cl ⁻	8	7	4
SO ₄ ²⁻	5	9	6
NO ₃ ⁻	32	58	72

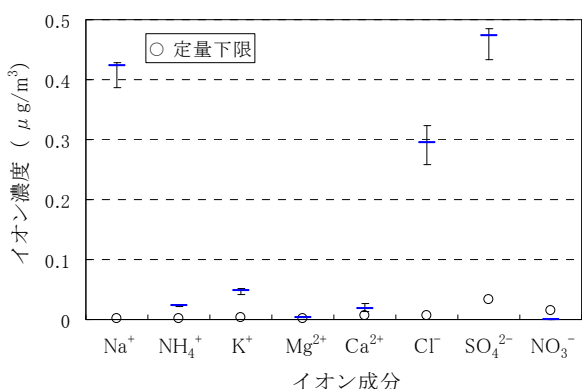


図4 イオン成分のロットばらつき

状況が確認された。これらの影響を確認する目的で未使用の捕集フィルターと、使用后捕集フィルターのブランク部についてイオン成分の濃度変化を比較した。使用后捕集フィルターには軸止め端と切断端があり、スポットの配置とブランク部の長さから、時系列の識別が可能となっている。ブランク部は軸止め端、切断端、スポット直前部の3部位から回収ごとにn=3で採取し、分析に供した(図5)。ブランク部の部位ごとの変動係数は、Ca²⁺で両端部とスポット直前部で13~18%の差が認められたが、定量下限の3倍程度と濃度が小さく、分析方法による影響の可能性が考えられた。使用により新たに検出されるNO₃⁻は、検出濃度が定量下限の5倍前後であったが、

変動係数が32~72%と大きく、安定した結果が認められなかった。NO₃⁻は使用による影響の他に、さらに大きな影響を及ぼす要因があることが予測された。他のイオンは変動係数の差が10%未満で、部位による差は認められなかった。

未使用のフィルターで検出されるイオンの濃度を1として使用后捕集フィルターのブランク部と比較した結果を表3に示した。Na⁺は使用により濃度が上昇し、NH₄⁺は濃度低下が認められた。K⁺、Cl⁻、SO₄²⁻は濃度変化が小さく、Mg²⁺、Ca²⁺は濃度が定量下限付近であるため影響はごく小さいと考えられた。NO₃⁻は未使用のフィルターでは不検出であるが、使用后捕集フィルターのブランク部でも検出されるため、自動測定器内での吸着による濃度上昇が想定された。そのため富士の測定局内の自動測定器に未使用の捕集フィルターを擬似的に配置し、標準的な回収期間である2週間について濃度変化を調べたところ、最大でも富士でのNO₃⁻年平均濃度の2%程度の濃度上昇であったため、自動測定器内での変化はごく小さく、捕集された試料から変質や揮散が起り、回収後に吸着が発生していることが推測された。

以上のことから、使用后捕集フィルターは材料や捕集試料からの影響を受けている可能性が高いため、回収ご

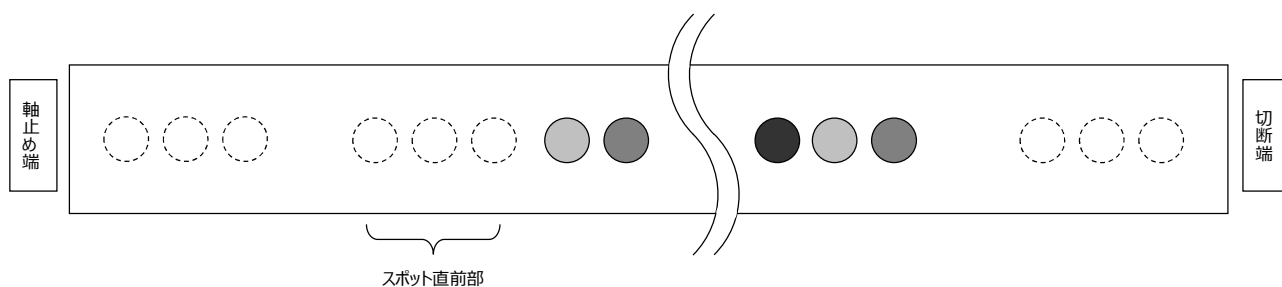


図5 回収捕集フィルターでの試料採取配置

表3 捕集フィルターの使用前後の比較

イオン成分	イオン濃度比 使用后/未使用	
	富士	湖西
Na ⁺	1.7	1.9
NH ₄ ⁺	0.3	0.1
K ⁺	0.9	0.7
Mg ²⁺	2.5	2.2
Ca ²⁺	1.2	1.3
Cl ⁻	1.2	1.1
SO ₄ ²⁻	1.3	1.1
NO ₃ ⁻	3.3※	8.8※

※NO₃⁻は使用前で不検出のため、定量下限に対する比を記載した。

とにブランク部の分析結果で補正処理することとした。

4) 自動測定器質量濃度との相関

PM2.5 の濃度変化に対応できる手法を確認するため、長期間の捕集フィルターを分析して、イオン濃度と自動測定器の質量濃度を比較した。平成26年10月1日～11月30日の2か月間の捕集フィルターを富士と湖西から回収して分析を実施した。その結果は、富士では相関係数0.80、湖西は0.70であった。また、平成26年秋季～平成27年夏季の通年期間について、富士から回収した捕集フィルターについて同様の比較を行ったところ、相関係数0.91の結果が得られた。両者の対応は良好で大気中の状況を良く反映できており、調査手法として利用可能と考えられた。

2 成分分析調査との比較

平成26年秋季～平成27年夏季の通年期間について、富士で回収した捕集フィルターの分析結果と成分分析調査のイオン濃度を比較した。その結果を成分分析に対する割合として図6に示した。ばらつきの程度は季節やイオンごとに異なるが、NH₄⁺、SO₄²⁻の2つのイオンは1年を通して定量結果の比率が安定しており、SO₄²⁻は比がほぼ1であるため直接定量ができ、NH₄⁺は換算等の工夫により定量が可能である結果が得られた。

3 成分分析調査未実施地点への適用

捕集フィルター分析を活用した解析事例として、平成27年夏季の県有測定局9地点で回収された捕集フィルターを分析し、結果を検討した。富士と湖西を除く7地点は成分分析調査を実施していない地点であり、PM2.5 のイオン成分についてのデータは今まで収集できていない。捕集フィル

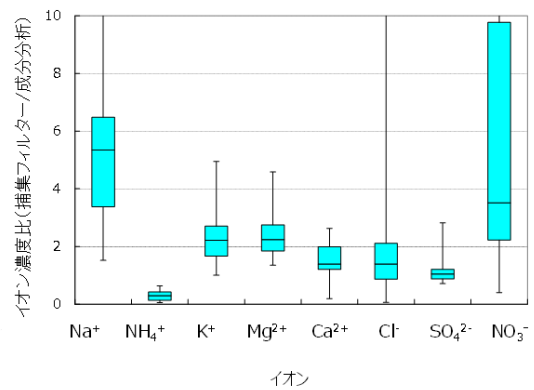


図6 捕集フィルターと成分分析調査のイオン比

ターによるPM2.5のイオン成分濃度を日ごとに積み上げたグラフを図7に示した。NO₃⁻と、Na⁺は不正確であるため除外して考えると、期間の前半で下田、大東、湖西でCl⁻が相対的に高くなっており、この期間は沿岸部で風速が3～9m/sとなったため²⁾、海塩の影響を受けた結果が表れたと考えられる。また、熱海で7/30～31の日にK⁺が相対的に高くなっており、これは7/30に開かれた花火大会³⁾の影響が表れたものと考えられた。さらに、期間の後半はNH₄⁺、SO₄²⁻の濃度が急に高くなっており、これはこの期間全国的に観測された大陸からの移流による影響⁴⁾の時期と一致しており、同じ要因で影響が表れたと考えられる。これらのことから、概ね地点の特徴を反映しており、各地点での時系列的な相対評価は可能と考えられた。

次に、捕集フィルターの分析で得られた結果から、SO₄²⁻による広域解析を実施した。図8は、地点の地理情報に基づき、SO₄²⁻の濃度を等高線グラフとして風向風速観測データとともに日ごとに作図した。作図にはフリーのGISソフトウェア(MANDARA 谷謙二)⁵⁾を使用した。地形や、静岡市、浜松市の情報は含まないため濃度域の境界は正確な表現ではなく、測定地点との距離と濃度の関係に依存している。濃度の推移を日を追って見ると、期間前半では濃度は低いが風が強く、27日に濃度が一旦下がるが、以降は風が弱まり富士から熱海を起点に濃度が上昇している。また並行して西からも濃度が上がっていき、8/2に湖西で濃度が急上昇し、以降は濃度が低下していることがうかがえる。このように、地点数が増えることで2次元的な広がりを持った、時間推移情報が得られた。

まとめ

捕集フィルターによるイオン成分の分析は、実試料の状況を良く反映し、成分分析調査の結果とも、強い関連が認められた。

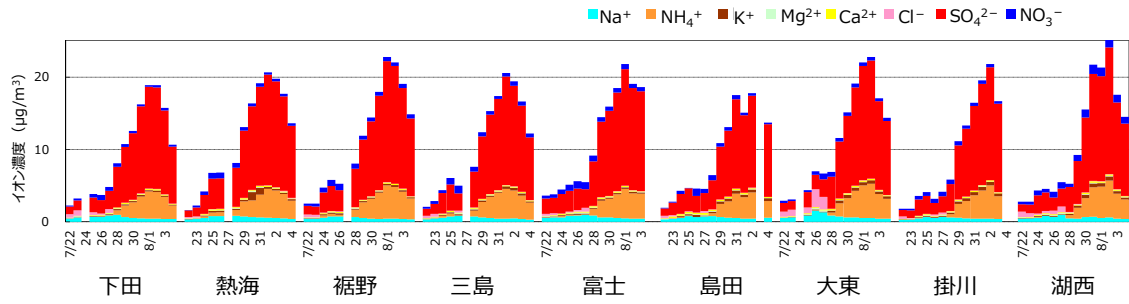


図7 成分分析調査未実施地点を含めたイオン成分の分析結果 (平成 27 年夏季)

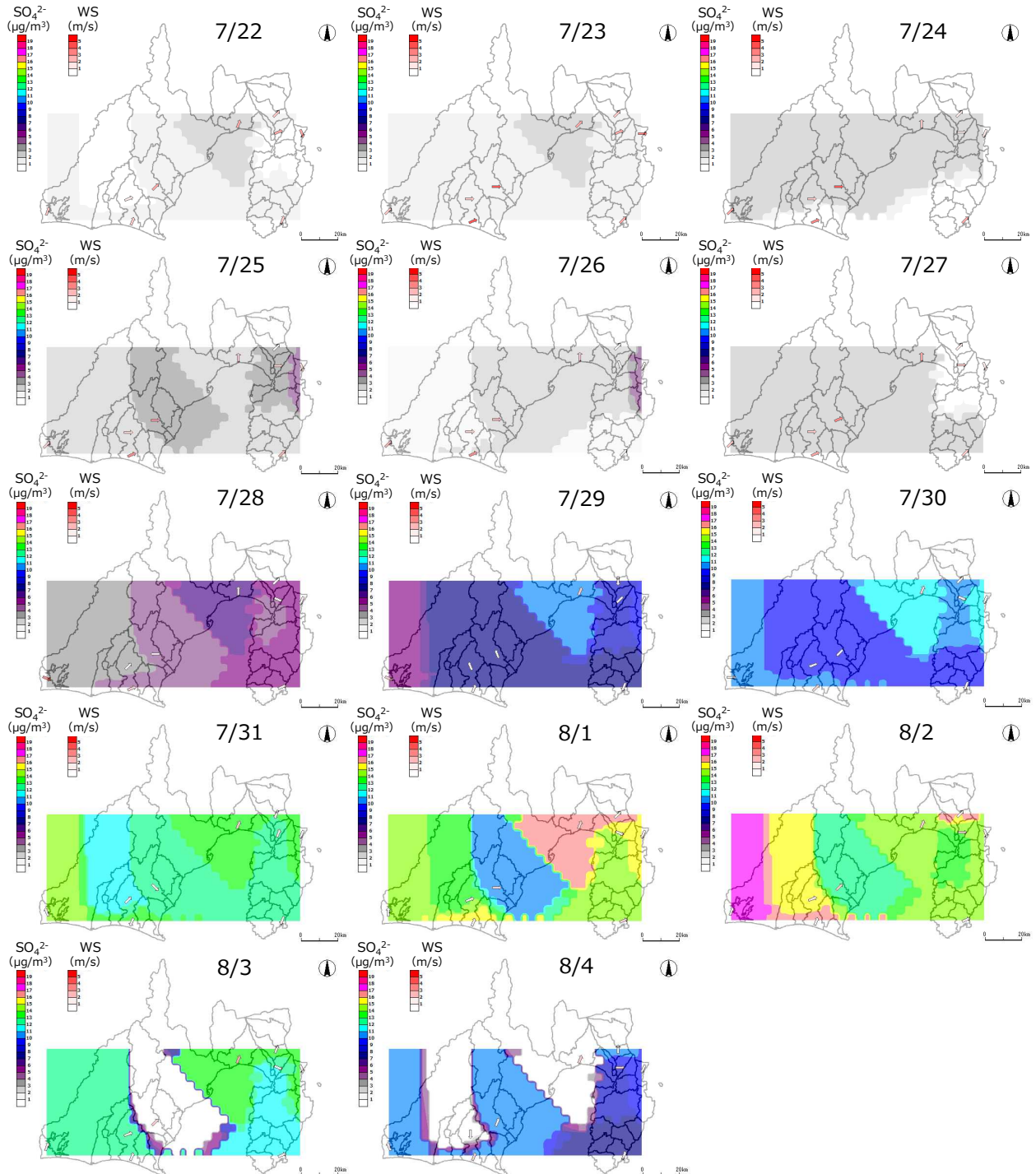


図8 SO_4^{2-} 濃度による広域濃度推移 (平成 27 年夏季)

しかし、一方で溶出や揮散により、 Na^+ 、 NH_4^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- については直接的な定量が困難であった。 SO_4^{2-} 、 NH_4^+ の2つは1年を通して定量結果が比較的安定しており、 NH_4^+ は換算等の工夫により間接的な定量が可能と考えられる。分析の結果から得られるイオン組成は、正確ではない結果を含んでいるものの、測定地点の状況を反映できており、その地点における短期的な相対比較には有効と考えられる。捕集フィルターを利用することで、成分分析未実施地点の状況把握が可能となり、 SO_4^{2-} を鍵成分として利用することで、移流を含めたPM_{2.5}の挙動把握が可能であることが分かった。

文 献

- 1) 環境省：微小粒子状物質（PM_{2.5}）の成分分析ガイドラインについて，平成23年7月29日，環水大大発第110729001号
- 2) 気象庁：過去の気象データ，
<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
- 3) 熱海ふふ：2015年熱海海上花火大会につきまして，
<http://www.atamifufu.jp/info/cc1zb/detod1zb.html>
- 4) 梶田奈穂子他：2015年7、8月におけるPM_{2.5}高濃度事例の解析，第57回大気環境学会年会講演要旨集，204，（公社）大気環境学会（2016）
- 5) 谷 謙二：MANDARA パーフェクトマスター，古今書院（2011）

浜名湖の流動と水質環境に関する研究

—第3報 外海水流入の状況—

大気水質部 水質環境班

内山道春, 山内 悟, 後藤裕康*¹,
鈴木恒雄, 菅谷則子, 清水麻希*²,
小山祐人*³

豊橋技術科学大学

岡辺拓巳*⁴

Research on Lake Current and Water Quality in Lake HAMANA
-Report 3 The Actual Condition of Outer Sea Water flow in Lake HAMANA -

Michiharu UCHIYAMA, Satoru YAMAUCHI, Hiroyasu GOTO,
Tsuneo SUZUKI, Noriko SUGAYA, Maki SHIMIZU,
Yuto KOYAMA and Takumi OKABE

浜名湖の水質は1993年頃から改善傾向にあったが、2004年頃からCOD値が上昇に転じ、一部の地点では環境基準の超過が続いている。そこでCOD値上昇の原因究明を前研究「浜名湖の水質保全について」で行った結果、夏季に栄養塩豊富な湖心部深層海水が浅海域へ移動していることが確認され、これがプランクトンの増殖を助長し、水質悪化の原因のひとつになっている可能性が示唆された。しかし、これまで知られていなかった湖心部深層海水の浅海域への移動（以降「湧昇」と記す）メカニズムは未解明のままであった。

そこで、データ・文献から湧昇の発生機構は潮汐拡大による湖心部底層への外海水の流入と、それに伴う深層海水の浅海域への横溢によるものと推察し、外海水流入状況の確認を試みた。冬季水温観測の結果、湖心部付近の水深10m地点の底層において外海水流入の影響による水温上昇が観測されたことから、湖心部深層海水の湧昇は潮汐の拡大と関連している可能性が示唆された。

Key words: 浜名湖, COD, 深層海水, 水温, 潮汐

Hamana lake, chemical oxygen demand, lower layer water, water temperature, tide

はじめに

近年の浜名湖では湖中央部の「新所」・「湖心」（図1参照）でCOD値が上昇傾向¹⁾（図2参照）にあり、その原因究明を前研究「浜名湖の水質保全について」で取り組んだ結果、栄養塩豊富な湖心部深層海水が夏季に「新所」（浅海域）へ湧昇することが確認²⁾された。

また、湧昇による栄養塩の供給がプランクトンの増殖につながり、水質悪化の原因のひとつになっていることが示唆²⁾された。

今後の水質動向を予測し抑制対策を策定するためには、湧昇の原因やメカニズムを明らかにする必要がある。そこで、これまでの研究データや文献から、湧昇の原因は海水交換量の拡大による湖心部底層への外海水流入と深層海水横溢とする仮説を立てた。

仮説の根拠としては、「新所」での25時間調査における潮位差が文献値³⁾より拡大していたこと、有田ら

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: 静岡県水産技術研究所深層海水科

*2: 退職

*3: 静岡県東部健康福祉センター

*4: 豊橋技術科学大学 建築・都市システム学系

による2012年の潮位観測⁴⁾において1980年及び2003年より潮汐の伝達時間短縮と潮位差の拡大が確認されたことなどが挙げられる。

海水交換量の拡大が1993年頃から顕著となって希釈効果が高まり、2004年頃に湖心部底層まで影響が及ぶようになって深層海水が湧昇するレベルに達したと仮定すれば、**図2**のCOD値の経年変動は極めて説明しやすい。

そのため、2014年4月14日に豊橋技術科学大学とともに今切口においてADCP（ドップラーソナー）による流速調査を実施し、海水交換量算出を試みたがノイズにより計算できなかった。

そこで湖南部冬季水温変動調査により、湖心部底層への外海水流入状況の確認を試みた。

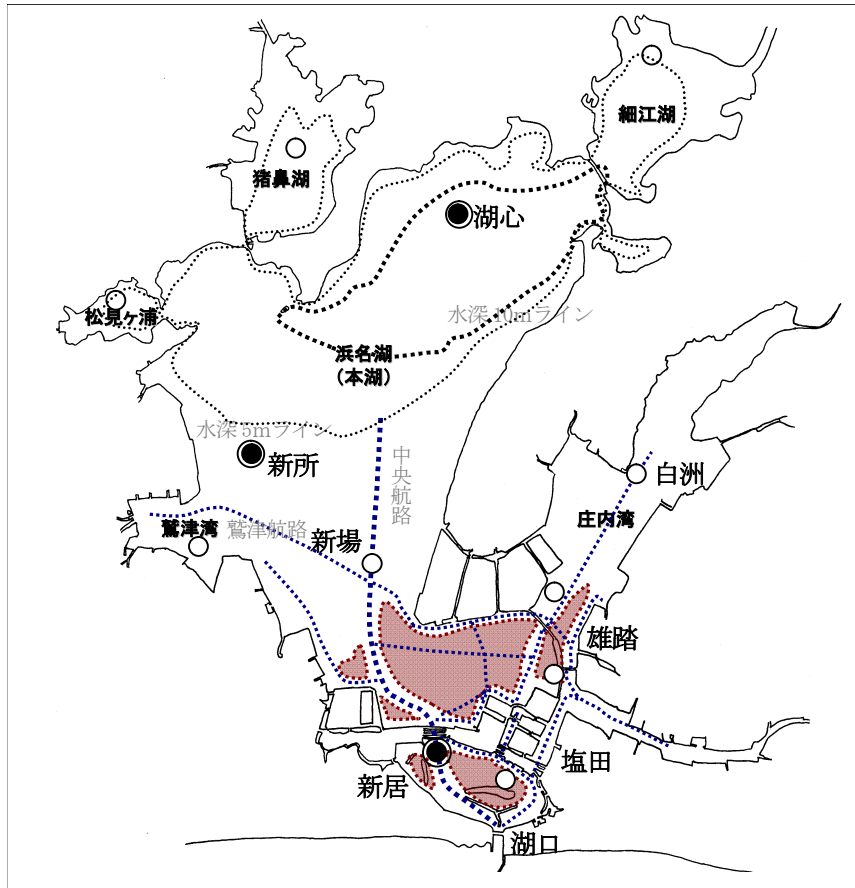


図1 浜名湖の測定地点・採水地点等

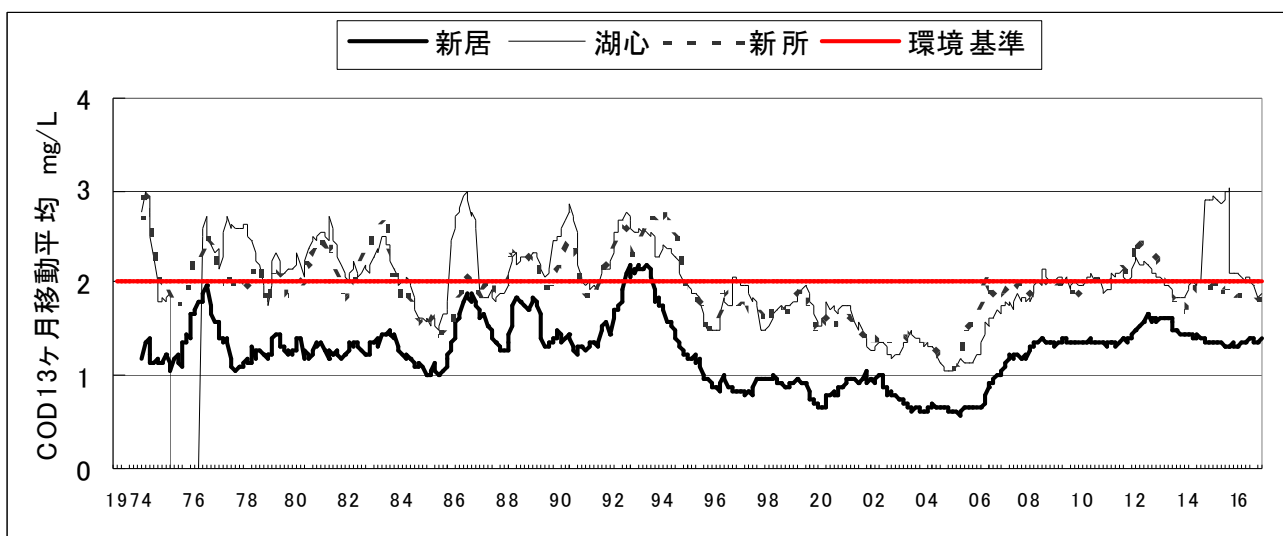
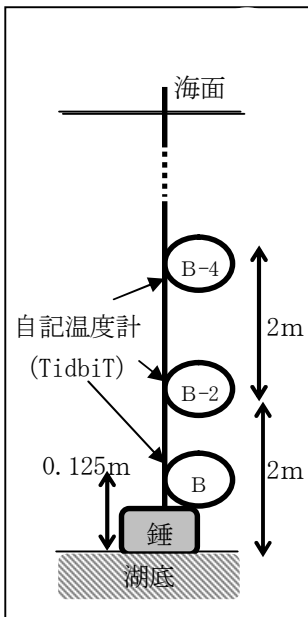


図2 浜名湖における水質の長期的変動

調査方法

冬季の湖内では表層から底層まで等温となる一方、湖外海水の方が高温となるため、外海水流入による水温上昇を検出することで、外海水の到達時間と範囲の確認を試みた。2015年12月16日から2016年2月8日まで湖内にサーミスタ・チェーン（図3）を設置し、水層ごとの水温変動を調査した。測定地点は図4、表1のとおりである。



注：自記温度計の設置水層は、設置海面よりロープを垂下した底層を「B」、底層2m上層を「B-2」（・・・以下同様）として表示

図3 サーミスタ・チェーン概略

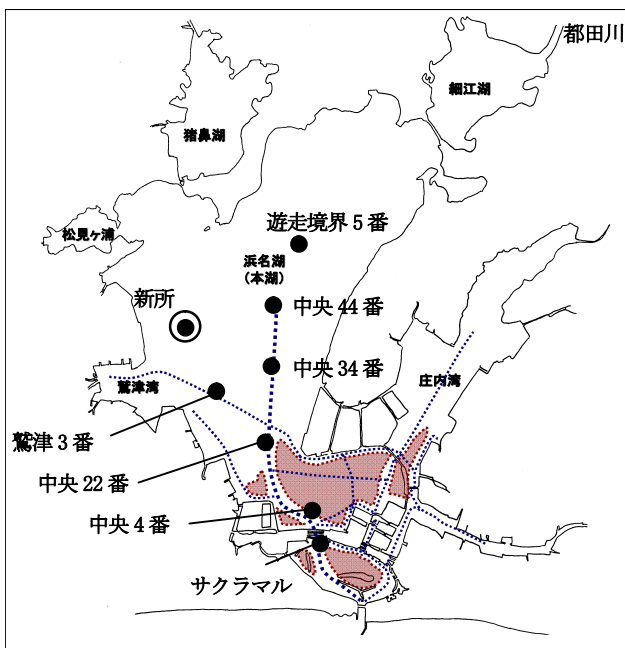


図4 冬季水温測定地点

表1 水温調査地点一覧

地点・ポール	水深	期間	調査水層
サクラマル	4.0m		B,B-2
中央4番	3.8m		B,B-2
中央22番	3.0m		B,B-2
中央34番	3.0m	12/16 ~2/8	B,B-2
中央44番	5.5m		B,B-2,B-4
遊走境界5番	9.5m		B,B-2,B-3,B-4, B-5,B-6,B-8
鷺津3番	2.5m		B,B-2
新所	3.5m		B,B-1,B-2

結果及び考察

外海水の流入による影響範囲を確認する目的で、2015年12月16日から翌年2月8日まで湖内で水温等を測定し、結果を図5-1~5-8に示した。各グラフには浜名湖湖外の表面水温（気象庁 日本近海の水温 日別表層水温を参照）を併記した。

また、豊橋技術科学大学が同時測定した塩分（中央4番ポール及び遊走境界5番ポール）、水深（中央22番・34番ポール及び鷺津3番ポール）のデータも併記した。

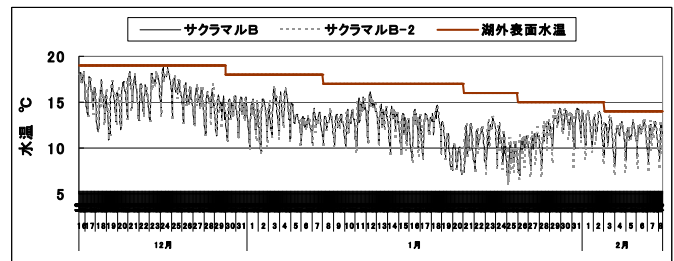


図5-1 サクラマルの水温変動

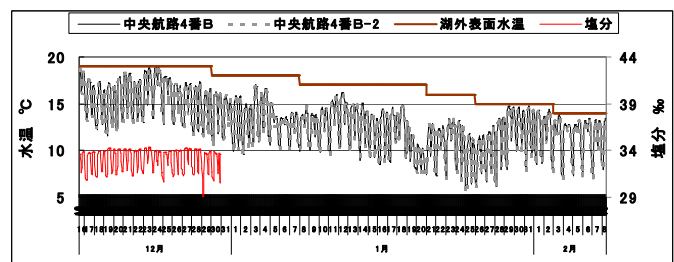


図5-2 中央4番ポールの水温と塩分の変動

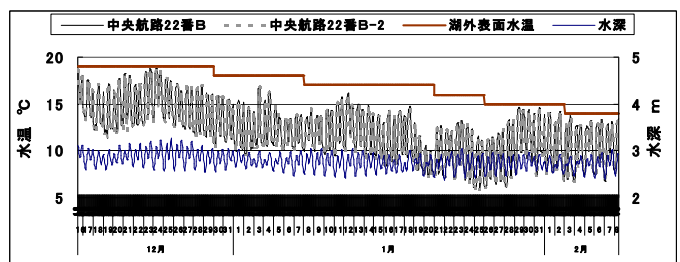


図5-3 中央22番ポールの水温と水深の変動

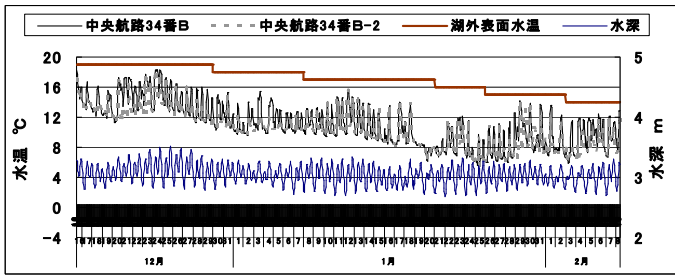


図 5-4 中央 34 番ポールの水温と水深の変動

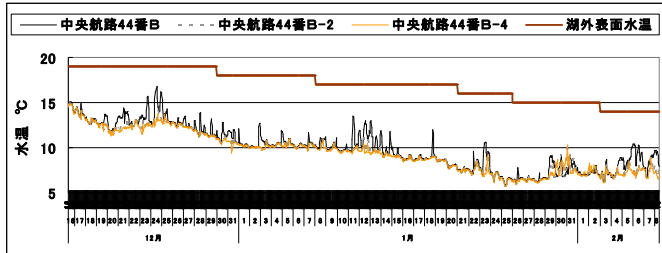


図 5-5 中央 44 番ポールの水温の変動

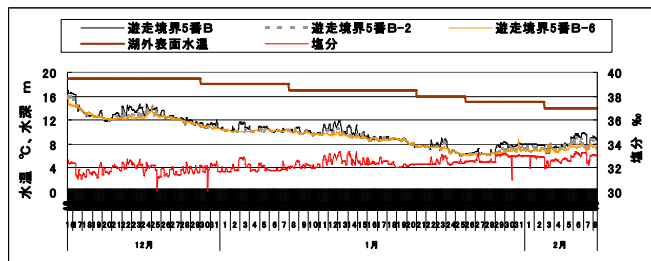


図 5-6 遊走境界 5 番ポールの水温と塩分の変動

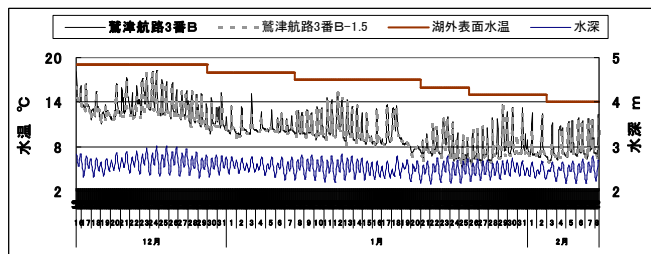


図 5-7 鷺津 3 番ポールの水温と水深の変動

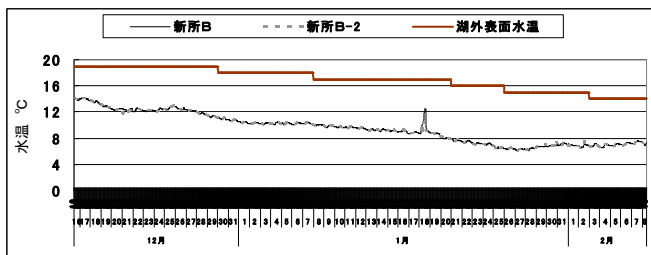


図 5-8 遊走境界 1 番ポール（新所）の水温の変動

1 水温変動の原因

これらのデータでは、短時間での水温の上下動が観測されたが、このうち中央 4 番ポールの水温と塩分の変動 (図 6) を比較したところ、極めて類似していた。散布図は図 7 のとおりであり、 $R^2=0.776$ と高かった。

また、図 5-1~5-8 ではいずれの測定水温も湖外の表面水温を上回ることにはなかった。

これらの結果から、各測定地点の水温変動は外海水の流入入によると考えられ、特に今切口に近い地点ほど最高水温は湖外の表面水温に近く、水温変動幅は大きかった。

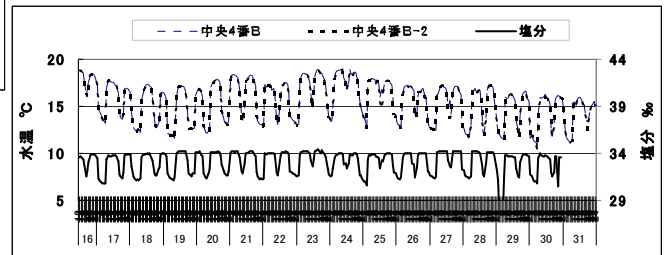


図 6 中央 4 番ポールの水温と塩分の変動 (2015 年 12 月 16 日-31 日を拡大)

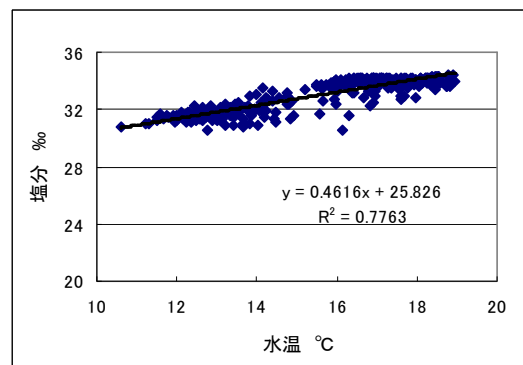


図 7 中央航路 4 番ポールの水温と塩分の関係

一方、今切口から最も離れた遊走境界 5 番ポールにおいても水温変動が観測された。ただし、水温変動は大潮時の底層部に限られ、水温変動幅は小さく、外海水温との差はさらに大きくなった。

そこで、中央 4 番ポールと同様に水温と塩分の変動から相関を検討したところ、全体での R^2 は 0.2 と小さかった。しかし、特徴的な水温ピークが観測される 12 月 19 日から 24 日、1 月 2 日から 4 日、1 月 11 日から 16 日、1 月 22 日から 24 日、2 月 5 日から 7 日についてそれぞれの R^2 を求めたところ、 $R^2=0.648\sim 0.919$ であった (図 8, 9 参照)。このことから、外海側からの流入の影響が湖心部底層まで及んでいることが確認された。

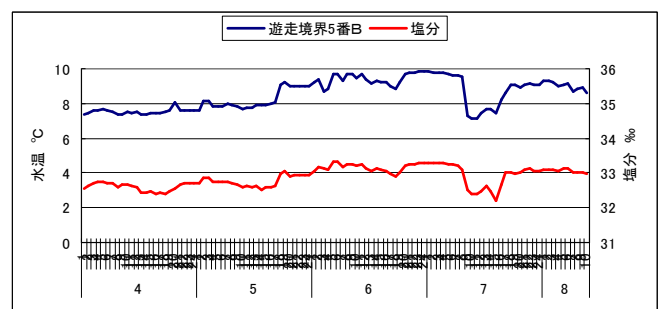


図 8 遊走境界 5 番ポール底層水温と塩分 (2016 年 1 月 1 日-6 日を拡大)

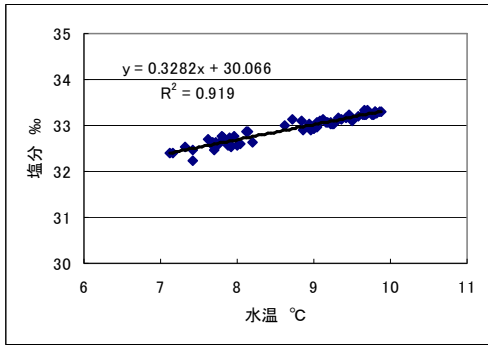


図9 遊走境界5番ポールの水温と塩分の関係

2 外海水流入の伝播速度

これらの外海水流入による影響の伝播速度を確認するため、表2の6地点について底層の水温上昇開始時刻を比較した。水温測定は15分毎に実施しており、大潮の12月24日と小潮の1月2日で比較を行った(表2, 表3, 図10, 図11)。

水温上昇開始時刻は、サクラマルを基点として中央4番ポールはほぼ同時ないし30分後、22番ポールでは45分から1時間45分後、34番ポールは2時間15分から4時間後と比較的短かった。44番ポールでは5時間15分

から13時間後、遊走境界5番ポールでは9時間から14時間15分後とかなり時間がかかることが判明した。

表2 水温上昇開始時刻と時間差 (12月24日大潮)

地点・ポール	水温上昇開始時刻	時間差
サクラマル	2:30	—
中央4番	3:00	30分後
中央22番	3:15	45分後
中央34番	4:45	2時間15分後
中央44番	7:45	5時間15分後
遊走境界5番	11:30	9時間後

表3 水温上昇開始時刻と時間差 (1月2日小潮)

地点・ポール	水温上昇開始時刻	時間差
サクラマル	7:30	—
中央4番	7:30	時間差なし
中央22番	9:15	1時間45分後
中央34番	11:30	4時間後
中央44番	20:30	13時間後
遊走境界5番	21:45	14時間15分後

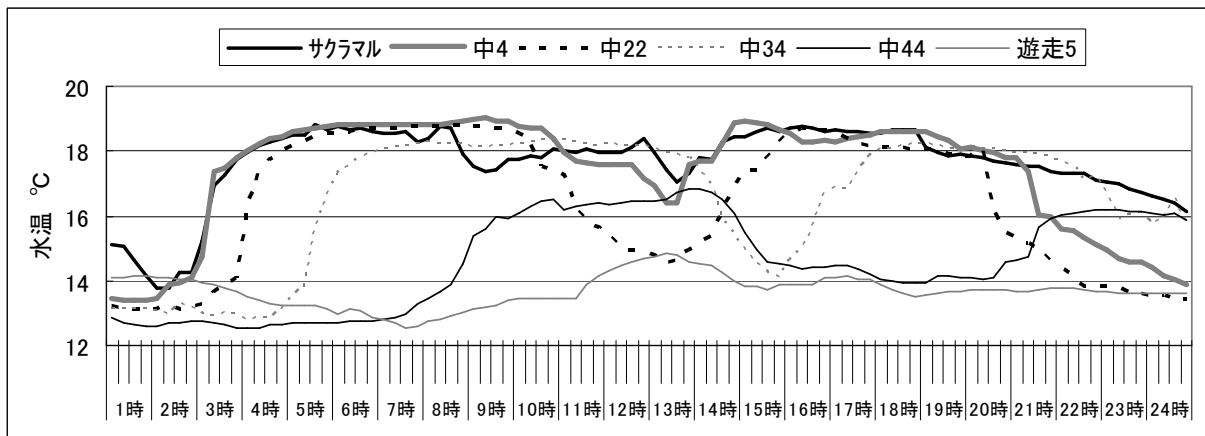


図10 底層水温の変動例 (12月24日)

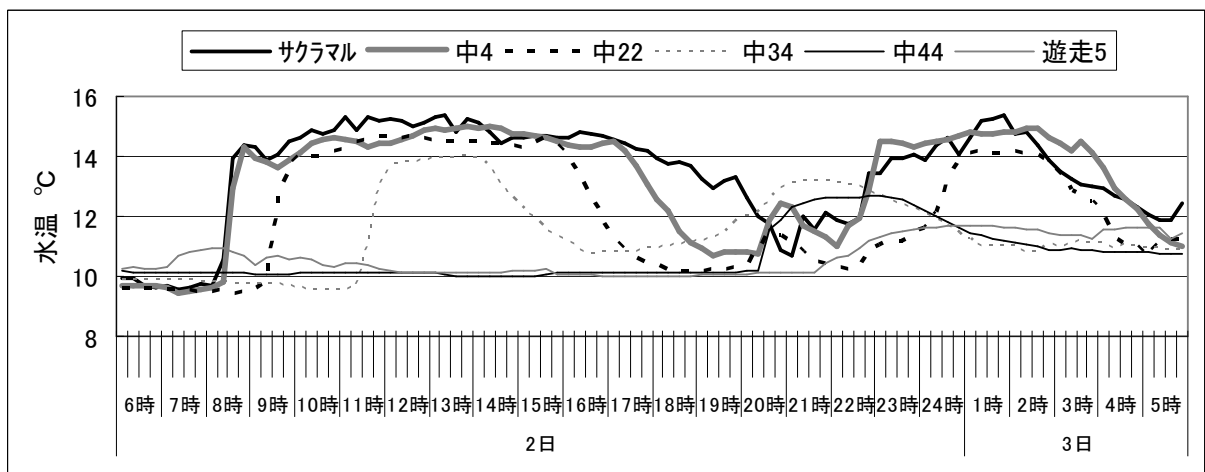


図11 底層水温の変動例 (1月2日～3日)

3 外海水の流入状況

各測定地点での底層と中層の水温を比較すると、サクラマル、中央4番・22番ポール（図5-1～5-3）では顕著な水温変動が毎日観測され、底層とその上層はほぼ等温で推移していた。これらの結果から、中央22番ポールまでは外海水が全層にわたって流入していると考えられた。

中央34番ポール及び鷺津3番ポール（図5-4、5-7）でも顕著な水温変動が毎日観測されたが、小潮時には底層の水温変動幅がその上層の水温変動幅より大きい事例が観測された。これらの結果から、中央34番ポール及び鷺津3番ポール付近では大潮時には外海水の全層流入するものの、小潮時には塩水楔を形成して流入する水域であると考えられた。

中央44番ポール及び遊走境界5番ポール（図5-5、5-6）では、水温変動は底層側のみで、毎日観測されなかった。また、水温変動幅は今切口に近い地点に比べて小さかった。これらの結果から中央44番ポール、遊走境界5番ポールでも外海水と入り混じった外海側湖水が底層に流入していると考えられた。

遊走境界1番ポール（「新所」）での水温変動は1月18日に一度観測されたのみであった（図5-8）。このことから、遊走境界1番ポールは外海水流入の影響をほとんど受けない地点であると考えられた。

以上の結果をまとめると、浜名湖湖心側への外海水流入の影響範囲は図12のように考えられる。中央22番までの太い実線の水域は全層外海水が流入しており、中央34番・鷺津3番までの細い実線の水域では潮位差が小

さい時期には外海水が直接流入するのは底層側に限られる。その先の細い点線までの水域は、外海水は直接流入しないが、外海に近い湖水が底層に流入・影響する水域と考えられる。

また、遊走境界1番ポールは外海水流入の影響をほとんど受けないこと及び湖心部深層海水が「新所」を経て鷺津航路に至っていた⁶⁾ことを考え合わせると、「都田川」から「湖口」に至る陸水の流出は、「湖心」通過後、湖底傾斜の緩やかな「新所」から鷺津航路を経由して「湖口」に流出する傾向があると予測される。

まとめ

湖心部深層海水湧昇の原因やメカニズムについて推定及び実証を試みたところ、得られた知見は以下のとおりであった。

- 1 冬季の水温と塩分の変動が高い相関を示すことから、水温変動の観測により外海水流入の影響を検知できることが確認された。
- 2 測定地点間の水温変動の比較により、外海水流入による影響の伝播速度が判明した。
- 3 水温変動及び水層間の水温差から外海水の流入範囲・影響範囲が確認された。
- 4 水深10mの遊走境界5番ポールの底層でも水温変動が確認され、外海側の流入の影響が及んでいることが確認された。

以上の結果から、潮汐による外海側の流入水による影響が湖心部底層まで到達していることが確認され、潮汐の拡大が深層海水湧昇の原因である可能性が示唆された。ただし、今回の調査では、湖心部底層にこの水温と塩分の変動をもたらした外海側の湖水流入が湧昇を発生させる原因として十分な量かどうかまでは評価できなかった。

謝辞

湖南部冬季水温変動調査における塩分・水深データは豊橋技術科学大学岡辺先生より提供いただきました。記して感謝申し上げます。

文献

- 1) 静岡県環境衛生科学研究所：静岡県公共用水域および地下水水質測定結果、(1971-2015)
- 2) 内山道春：静岡県環境衛生科学研究所報告, 55, 85-94, (2012)
- 3) 浜名湖地区水産振興協議会：浜名湖地区の水産, 12-13 (1992)
- 4) 有田守：海洋開発論文集, vol.20, 1073-1078 (2004)

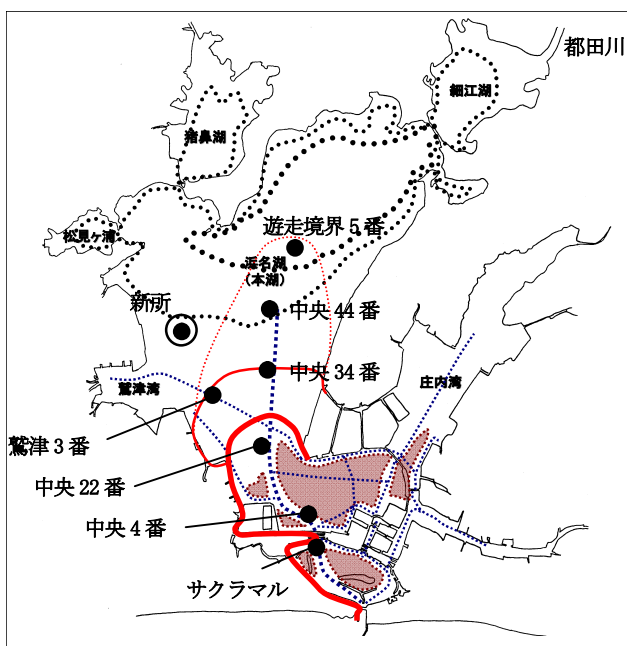


図12 外海水流入の影響範囲

- 5) 岡辺拓巳:平成 26 年度土木学会中部支部研究発表会講演概要集, CD-ROM, 2015.03.06, 豊橋技術科学大学
- 6) 内山道春:静岡県環境衛生科学研究所報告, **58**, 1-7, (2015)

他誌に発表した論文

環境科学部

- 1) 富士山南部における地下水の水質成分の地理的特徴とその起源

神谷貴文, 渡邊雅之, 村中康秀, 申基澈, 中野孝教

地学雑誌, 126(1), 43-71 (2017)

富士山南部地域において199地点で採取した地下水を湧水と井戸水に区分し, その主要溶存イオンの組成を降水の分析結果とあわせて解析した. ほとんどの地下水がCa-HCO₃型を示したが, 採水地点の標高, 地形, 地質, 人間活動を反映して, 水質の特徴は, 東部, 南東部, 南西部, 西部の4地域に分類された. 地下水のCl⁻のおもな起源は, 降水および海塩粒子であったが, 地下水中の陽イオンに対する降水の寄与率はCa (0.05), Mg (0.08), K (0.28), Na (0.29) であり, 玄武岩質の火山噴出物の化学的風化による寄与が非常に大きくなった. 東部の地下水はF⁻とPO₄³⁻に富んでおり, 御殿場泥流堆積物の分布域とよい一致を示すことから, 同堆積物を構成する古富士の火山噴出物に由来する可能性が高いと判断された. 南西部と南東部では, NO₃⁻濃度が環境基準を超える地下水が10か所でみられた. NO₃⁻が高濃度の地下水の分布は, 茶園の分布域およびその下流域にほぼ一致し, SO₄²⁻濃度も高いことから, 硫酸などの含窒素・硫黄肥料に由来すると考えられた. 湧水は井戸水に比べてNO₃⁻濃度が高い傾向があり, 湧水の方が涵養標高が低いと, 茶園からの肥料成分を含んだ降水浸透の影響を受けやすいと考えられた.

医薬食品部

- 1) Discovery and synthesis of heterocyclic carboxamide derivatives as potent anti-norovirus agents

Mai Ohba, Tomoichiro Oka, Takayuki Ando, Saori Arahata, Asaka Ikegaya, Hirotaka Takagi, Naohisa Ogo, Kazuhiro Owada, Fumihiko Kawamori, Qihong Wang, Linda J. Saif, Akira Asai

Chemical and Pharmaceutical Bulletin
64(5), 465-475 (2016)

There is an urgent need for structurally novel anti-norovirus agents. In this study, we describe the synthesis, anti-norovirus activity, and structure-activity relationship (SAR) of a series of heterocyclic carboxamide derivatives. Heterocyclic carboxamide **1** (50% effective concentration (EC₅₀) = 37 μM) was identified by our screening campaign using the cytopathic effect reduction assay. Initial SAR studies suggested the importance of halogen substituents on the heterocyclic scaffold and identified 3,5-di-bromo-thiophene derivative **2j** (EC₅₀ = 24 μM) and 4,6-di-fluoro-benzothiazole derivative **3j** (EC₅₀ = 5.6 μM) as more potent inhibitors than **1**. Moreover, their hybrid compound, 3,5-di-bromo-thiophen-4,6-di-fluoro-benzothiazole **4b**, showed the most potent anti-norovirus activity with an EC₅₀ value of 0.53 μM (70-fold more potent than **1**).

Further investigation suggested that **4b** might inhibit intracellular viral replication or the late stage of viral infection.

- 2) 過去の事例から学ぶ健康危機管理事例 31 農薬マラチオン混入事件 静岡県における対応とこれから

山崎喜与子, 岡山英光

公衆衛生情報, 46(8), 26-29(2016)

平成20年に中国産冷凍ぎょうざからの有機リン系農薬メタミドホスの検出事例に続き, 平成25年度には株式会社アクリフーズ群馬工場で製造された冷凍食品に農薬のマラチオンが意図的に混入された事件が発生したため, 静岡県においても健康被害の発生が疑われ, 残品があるものについて, 農薬マラチオンの検査を実施することとした.

当研究所では, 平成25年3月26日付け厚生労働省医薬安全局食品安全部基準審査通知「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について」の中から, 迅速検出法Iを選択して検査を実施したが, これら一連の対応から健康危機管理として健康被害拡大防止のための検査体制において「検体搬入から検査結果を出すまでの迅速性」及び「試薬・固相カラム等を含めた緊急時の試験検査方法の確立」が必要と考えられたため, 平成27年度から「加工食品に混入された農薬等の一斉分析法の開発」を研究テーマとして, 当研究所に適した緊急時の検査方法の確立を目指した. その結果, 今回の事件をきっかけに最新のLS-MS/MSが導入されたことにより, 分析感度の上昇や測定時間の短縮が図られたことから, 試験法の改良と合わせてより迅速な対応が可能になった.

- 3) Antiviral effect of theaflavins against caliciviruses

Mai Ohba, Tomoichiro Oka, Takayuki Ando, Saori Arahata, Asaka Ikegaya, Hirotaka Takagi, Naohisa Ogo, Chelsea Zhu, Kazuhiro Owada, Fumihiko Kawamori, Qihong Wang, Linda J Saif and Akira Asai

The Journal of Antibiotics, 70, 443-447 (2017)

Caliciviruses are contagious pathogens of humans and various animals. They are the most common cause of viral gastroenteritis in humans, and can cause lethal diseases in domestic animals such as cats, rabbits and immunocompromised mice. In this study, we conducted cytopathic effect-based screening of 2080 selected compounds from our in-house library to find antiviral compounds against three culturable caliciviruses: feline calicivirus, murine norovirus (MNV) and porcine sapovirus (PoSaV). We identified active six compounds, of which two compounds, both related to theaflavins, showed broad antiviral activities against all three caliciviruses; three compounds (abamectin, a mixture of avermectin Ia and Ib; avermectin Ia; and (-)-epigallocatechin gallate hydrate) were effective against PoSaV only; and a heterocyclic carboxamide derivative (BFTC)

specifically inhibited MNV infectivity in cell cultures. Further studies of the antiviral mechanism and structure-activity relationship of theaflavins suggested the following: (1) theaflavins worked before the viral entry step; (2) the effect of theaflavins was time- and concentration-dependent; and (3) the hydroxyl groups of the benzocycloheptenone ring were probably important for the anti-calicivirus activity of theaflavins. Theaflavins could be used for the calicivirus research, and as potential disinfectants and antiviral reagents to prevent and control calicivirus infections in animals and humans.

学会・研究会の報告

環境科学部

- 1) 駿河湾における富士山地下水海底湧出場所の推定(III)
村中康秀, 神谷貴文, 伊藤 彰, 大山康一,
渡邊雅之, 小野昌彦, 丸井敦尚
日本地球惑星科学連合 2016 年大会
2016. 5. 23 (千葉)
- 2) ストロニウム同位体比によるわさび産地判別の有用性(II)
神谷貴文, 中村佐知子, 伊藤 彰, 小郷沙矢香,
西島卓也, 申 基澈, 村中康秀
日本地球惑星科学連合 2016 年大会
2015. 5. 24 (千葉)
- 3) 防災カーテンに含まれる難燃剤の移行量と放散量測定
小郷沙矢香, 久米一成
第 25 回環境化学討論会
2016. 6. 8 (新潟)
- 4) 富士山の地下水の保全と活用について
村中康秀
大井川地域地下水利用対策協議会平成 28 年度定期総
会記念講演
2016. 7. 5 (島田)
- 5) 安倍川流域の地下水の特徴と熱利用に向けて
神谷貴文
静清地域地下水利用対策協議会平成 28 年度定期総会
記念講演
2016. 7. 15 (静岡)
- 6) Distribution, ecological characteristics, and gene
polymorphisms of the invasive millipede
Chamberlinius hualienensis Wang in Shizuoka,
Central Japan
Takafumi Kamitani, Natsuko Iida-Aoyama,
MasaruMurakami
International Colloquium on Soil Zoology
2016. 8. 24 (Nara)
- 7) 防災カーテンに含まれる難燃剤の放散量とダストへの
移行量測定
小郷沙矢香, 久米一成
環境科学会 2016 年会
2016. 9. 9 (横浜)
- 8) 静岡県安倍川下流域における地下水・湧水の水質・温度
特性
神谷貴文, 伊藤 彰, 大山康一, 小郷沙矢香,
鈴木光彰, 香田梨花, 伏見典晃, 村中康秀, 申 基澈
日本地下水学会 2016 年秋季講演会
2016. 10. 20 (長崎)
- 9) ゲノム網羅的な発現遺伝子を用いた富士山ブナ林の環
境影響評価
村中康秀, 小郷沙矢香, 中村佐知子, 神谷貴文,
大山康一, 齋藤秀之, 神村章子, 小林孝徳久,
和田尚之, 山田幸靖, 瀬々潤, 小倉 淳,
清水健太郎, 齋藤央嗣, 谷脇徹, 相原敬次
第 19 回自然系調査研究機関調査研究・活動事例発表
会
2016. 10. 27 (静岡)
- 10) 静岡県における外来種ヤンバルトサカヤスデの生態特
性と生息可能域の推定
神谷貴文
第 19 回自然系調査研究機関調査研究・活動事例発表
会
2016. 10. 27 (静岡)
- 11) 富士山からの恵み～駿河湾海底湧水発見～
村中康秀
第 19 回自然系調査研究機関連絡会議
2016. 10. 28 (静岡)
- 12) ストロニウム安定同位体比によるワサビ産地判別の
可能性
神谷貴文
第 19 回自然系調査研究機関連絡会議
2016. 10. 28 (静岡)

- 13) 防災カーテン中の難燃剤の挙動に関する研究
小郷沙矢香, 久米一成
平成 28 年度室内環境学会学術大会
2016. 12. 15 (つくば)
- 14) 静岡県安倍川下流域における湧水・地下水の水質・同位体特性
神谷貴文, 伊藤 彰, 大山康一, 小郷沙矢香,
鈴木光彰, 香田梨花, 伏見典晃, 村中康秀, 申 基澈
第 6 回同位体環境学シンポジウム
2016. 12. 22 (京都)
- 15) 低 VOC 型水性塗料の排水処理技術の開発
鈴木光彰, 伏見典晃, 香田梨花, 平松裕志
平成 28 年度しずおか環境調査研究推進連絡会議
2017. 1. 20 (浜松)
- 16) 先進事例調査報告～長野県環境保全研究所の取組～
大山康一
気候変動の影響への適応策検討庁内研究会
2017. 2. 6 (静岡)
- 17) 低 VOC 型水性塗料の排水処理技術の開発
鈴木光彰, 伏見典晃, 香田梨花, 平松裕志
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)
- 18) ストロンチウム安定同位体比によるわさび産地判別の可能性
神谷貴文, 中村佐知子, 伊藤 彰, 小郷沙矢香,
香田梨花, 伏見典晃, 村中康秀, 西島卓也
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)
- 19) 安倍川下流域における井戸水・湧水の水同位体比・温度特性
神谷貴文, 大山康一, 伊藤 彰, 鈴木光彰,
小郷沙矢香, 香田梨花, 伏見典晃, 村中康秀
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)
- 20) 富士山からの恵みー駿河湾海底湧水発見ー
村中康秀
とっりの地下水を考える勉強会
2017. 3. 29 (倉吉)
- 3) リアルタイム PCR を用いた食中毒起因菌検査法の検討
森主博貴, 鈴木秀紀, 村田学博, 松橋平太, 山田俊博
長岡宏美, 佐原啓二
第 37 回日本食品微生物学会学術総会
2016. 9. 15 (東京)
- 4) モノクロロミン消毒の事前適合性試験の提案
杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 和田裕久, 土屋祐司
市村祐二, 青木信司, 神野透人, 小坂浩司, 泉山信司,
八木田健司, 縣邦雄, 田中慶郎, 前川純子, 倉文明
日本防菌防黴学会第 43 回年次大会
2016. 9. 26-27 (東京)
- 5) マダニの SFTS 検査で抽出した RNA の活用について
池ヶ谷朝香, 原稔美, 酒井悠希子, 阿部冬樹,
佐原啓二
第 31 回地研全国協議会 関東甲信静支部ウイルス研
究部会研究会
2016. 9. 29-30 (千葉)
- 6) 静岡県のイノシシにおける E 型肝炎ウイルス保有状況
原稔美, 荒畑沙織, 酒井悠希子, 池ヶ谷朝香,
佐原啓二,
全国食品衛生監視員協議会
2016. 10. 27 (東京)
- 7) マダニの SFTS 検査で抽出した RNA の活用について
池ヶ谷朝香, 原稔美, 酒井悠希子, 阿部冬樹,
佐原啓二
第 23 回リケッチア研究会
2016. 12. 2-4 (東京)
- 8) 腸管出血性大腸菌 O157 における MLVA 法導入の効果につ
いて
山田俊博, 鈴木秀紀, 村田学博, 森主博貴, 松橋平太,
長岡宏美, 佐原啓二,
第 29 回地研全国協議会 関東甲信静支部細菌研究部
会研究会
2017. 2. 9-10 (甲府)
- 9) 静岡県の日本紅斑熱症例と媒介マダニの分布について
池ヶ谷朝香, 原稔美, 酒井悠希子, 阿部冬樹,
佐原啓二
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)

微生物部

- 1) 静岡県のイノシシにおける E 型肝炎ウイルス保有状況
原稔美, 荒畑沙織, 酒井悠希子, 池ヶ谷朝香,
佐原啓二
全国食品衛生監視員協議会第 56 回関東ブロック研修
会
2016. 8. 26 (横浜)
- 2) モノクロロミンの消毒条件に関する検討
鈴木秀紀, 牧田幸久, 長岡宏美, 森 健
平成 28 年度日本獣医公衆衛生学会 (中部地区)
2016. 8. 28 (名古屋)
- 10) インフルエンザ検査材料としての鼻かみ液の有用性の
検討
酒井悠希子, 原稔美, 池ヶ谷朝香, 阿部冬樹,
佐原啓二
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)
- 11) *Escherichia albertii* による食中毒における病因物質
の特定について
森主博貴, 鈴木秀紀, 村田学博, 松橋平太, 山田俊博,
長岡宏美, 佐原啓二, 泊明季, 岩田佐知子,
杉智登勢, 鈴木眞二, 高井健太, 平井愛,
西尾智裕, 野田佳宏
第 53 回静岡県公衆衛生研究会

2017. 2. 9 (静岡)

12) 病原大腸菌 0157 を病因物質と特定した食中毒事例について

村田学博, 鈴木秀紀, 森主博貴, 松橋平太, 山田俊博, 長岡宏美, 佐原啓二, 青木紋子, 栗原良博, 加藤訓子, 有田世乃, 神田隆, 高井健太, 平井愛, 西尾智裕, 野田佳宏, 高橋奈緒美, 八木美弥, 柴田真也, 高原勝行, 山下昭広
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)

医薬食品部

1) 柿の廃棄される部位の天然資源としての可能性に関する研究

石井康子, 安藤隆幸, 大場舞
US フォーラム 2016 (静岡県立大学学術フォーラム)
2016. 4. 20 (静岡)

2) Discovery and synthesis of heterocyclic carboxamide derivatives as potent anti-norovirus agents

Mai Ohba, Tomoichiro Oka, Takayuki Ando, Saori Arahata, Asaka Ikegaya, Hirotaka Takagi, Naohisa Ogo, Chelsea Zhu, Kazuhiro Owada, Fumihiko Kawamori, Qihong Wang, Linda J. Saif, Akira Asai
The 6th International Calicivirus Conference
2016. 10. 10-13 (GA, USA)

3) 医薬品等の試験検査方法の妥当性確認の試行について

今津佳子, 金子亜由美, 瀧野瑠衣, 岩切靖卓, 浜尾俊, 小和田和宏
第 53 回全国薬事指導協議会
2016. 10. 21 (さいたま)

4) ワサビの成分分析による機能性、信頼性評価技術の開発

竹下由布子, 渡邊愛子, 山崎喜与子, 辻むつみ, 神谷貴文, 久松奨, 西島卓也, 小和田和宏
第 53 回全国衛生化学技術協議会年会
2016. 11. 17-18 (青森)

5) 浅漬け、麴漬け等の調味液に関する調査

長倉美由紀, 横山玲子, 辻むつみ, 小和田和宏
第 53 回全国衛生化学技術協議会年会
2016. 11. 17-18 (青森)

6) 後発医薬品の品質確保に関する話題

金子亜由美, 渥美加代子, 岩切靖卓, 渡辺陽子, 今津佳子, 小和田和宏
第 53 回全国衛生化学技術協議会年会
2016. 11. 17-18 (青森)

7) 静岡県における危険ドラッグ検査への取組

岩切靖卓, 浜尾俊, 瀧野瑠衣, 金子亜由美, 今津佳子, 小和田和宏
第 53 回全国衛生化学技術協議会年会
2016. 11. 17-18 (青森)

8) 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(第 2 報)

大場舞, 岡智一郎, 安藤隆幸, 荒畑沙織, 池ヶ谷朝香, 高木弘隆, 小郷尚久, 小和田和宏, 川森文彦, 浅井章良

第 53 回全国衛生化学技術協議会年会
2016. 11. 17-18 (青森)

9) Discovery of novel anti-calicivirus agents

Takayuki Ando, Mai Ohba, Tomoichiro Oka, Saori Arahata, Asaka Ikegaya, Hirotaka Takagi, Naohisa Ogo, Chelsea Zhu, Kazuhiro Owada, Fumihiko Kawamori, Qihong Wang, Linda J. Saif, Akira Asai
The 3rd International Conference on pharma and food
2016. 11. 17-18 (Shizouoka)

10) 指定薬物の検出と迅速な県民への情報提供について

岩切靖卓, 浜尾俊, 瀧野瑠衣, 金子亜由美, 今津佳子, 小和田和宏, 前田有美恵
第 49 回東海薬剤師学術大会
2016. 11. 27 (岐阜)

11) 医薬品等試験検査の妥当性確認について (続報)

今津佳子, 浜尾俊, 岩切靖卓, 瀧野瑠衣, 金子亜由美, 小和田和宏, 渡辺陽子
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)

12) 定量 NMR 法を用いた試験検査用標準物質の供給

岩切靖卓, 浜尾俊, 大場舞, 瀧野瑠衣, 金子亜由美, 安藤隆幸, 今津佳子, 小和田和宏
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)

13) 医薬品の試験検査における問題事例について

浜尾俊, 岩切靖卓, 瀧野瑠衣, 金子亜由美, 今津佳子, 小和田和宏
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)

14) 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 (1) ~ 紅茶由来成分 テアフラビン類 ~

大場舞, 安藤隆幸, 荒畑沙織, 池ヶ谷朝香, 小和田和宏, 川森文彦, 岡智一郎, 高木弘隆, 小郷尚久, 浅井章良
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)

15) 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 (2) ~ 静岡オリジナル化合物 DBFTC ~

大場舞, 安藤隆幸, 荒畑沙織, 池ヶ谷朝香, 小和田和宏, 川森文彦, 岡智一郎, 高木弘隆, 小郷尚久, 浅井章良
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)

16) 車用除菌・消臭スプレーの除菌効果に関する調査

辻むつみ, 長倉美由紀, 小和田和宏
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9 (静岡)

- 17) 加工食品中に混入された農薬の一斉分析法の開発(第二報)
山崎喜与子, 渡邊愛子, 竹下由布子, 小和田和宏
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9(静岡)
- 18) 浅漬け、麴漬け等の調味液に関する調査
長倉美由紀, 辻むつみ, 横山玲子, 小和田和宏
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9(静岡)
- 19) ワサビのイソチオシアネート類の GC/MS 分析における前処理方法の検討
竹下由布子, 渡邊愛子, 山崎喜与子, 辻むつみ, 小和田和宏, 西島卓也
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9(静岡)
- 20) ジャガイモ中の α -ソラニン及び α -チャコニンの緊急検査について
渡邊愛子, 竹下由布子, 山崎喜与子, 小和田和宏
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9(静岡)
- 21) 代替ウイルスを用いたテアフラビン類の抗ウイルス活性の検討について
大場舞, 岡智一郎, 安藤隆幸, 荒畑沙織, 池ヶ谷朝香, 高木弘隆, 小郷尚久, 小和田和宏, 川森文彦, 浅井章良
第 32 回茶学術研究会特別講演会
2017. 3. 10(静岡)
- 22) テアフラビン類の抗カリシウイルス活性
大場舞, 岡智一郎, 安藤隆幸, 荒畑沙織, 池ヶ谷朝香, 高木弘隆, 小郷尚久, 小和田和宏, 川森文彦, 浅井章良
日本薬学会第 137 年会
2017. 3. 24-27(仙台)
- 2) 今之浦川於福橋(磐田市)における硝酸性窒素濃度と地下水の関係
山内 悟
平成 28 年度全国環境研協議会関東甲信静支部水質専門部会
2016. 10. 21(浜松)
- 3) PM2.5 大気自動測定器捕集フィルターによる水溶性成分の把握
本間信行, 井口大輔, 美澤克俊, 前田友幸, 結城 茜, 金子智英, 宮原鐘一, 川嶋久実
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9(静岡)
- 4) 今之浦川於福橋(磐田市)における地下水と硝酸性窒素濃度との関係
山内 悟, 菅谷則子, 鈴木恒雄, 内山道春, 川嶋久実, 小山祐人
第 53 回静岡県公衆衛生研究会
2017. 2. 9(静岡)
- 5) 富士山麓におけるオゾンのブナ林への影響について
美澤克俊
II 型研究「森林生態系における生物・環境モニタリング手法の確立」2016 年度第 2 回検討会
2017. 3. 15(東京)

大気水質部

- 1) 富士山麓におけるオゾンのブナ林への影響について
美澤克俊
II 型研究「森林生態系における生物・環境モニタリング手法の確立」2016 年度第 1 回検討会
2016. 10. 21(福井)

表 彰 等

環境科学部

- 1) 独立行政法人日本学術振興会科学研究費助成事業(平成 28 年度～平成 30 年度)
「重元素安定同位体をトレーサーとした産地判別手法の確立—ワサビに着目して—」
2016. 4. 1
神谷貴文
- 「室内環境中の未規制物質の網羅的解析に関する研究」
2016. 4. 1
小郷沙矢香
- 2) 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)(平成 26 年度～平成 28 年度)
- 3) 第 53 回静岡県公衆衛生研究会第 4 分科会優秀演題
「安倍川下流域における井戸水・湧水の水同位体比・温度特性」
2017. 3. 2

神谷貴文, 大山康一, 伊藤 彰, 鈴木光彰,
小郷沙矢香, 香田梨花, 伏見典晃, 村中康秀

- 4) ひとり1改革運動(やめる・へらす・かえる(業務の見直し)部門)部長表彰
「分析業務におけるQ&A作成」
2017. 3. 15
香田梨花

微生物部

- 1) 大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」
「静岡県における抗インフルエンザ薬剤耐性株の出現状況に関する疫学的解析」
2016. 10. 13
酒井悠希子
- 2) 第53回静岡県公衆衛生研究会第1分科会優秀演題
静岡県の日本紅斑熱症例と媒介マダニの分布について
2017. 3. 2
池ヶ谷朝香, 原稔美, 酒井悠希子, 阿部冬樹,
佐原啓二
- 3) 第53回静岡県公衆衛生研究会第3分科会優秀演題
「*Escherichia albertii*による食中毒における病因物質の特定について」
2017. 3. 2
森主博貴, 鈴木秀紀, 村田学博, 松橋平太, 山田俊博,
長岡宏美, 佐原啓二, 泊明季, 岩田佐知子,
杉山智登勢, 鈴木眞二, 高井健太, 平井愛,
西尾智裕, 野田佳宏

医薬食品部

- 1) 地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部長表彰
2016. 6. 30
今津佳子
- 2) 第53回静岡県公衆衛生研究会 第3分科会(薬事部門)優秀演題
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(1)～紅茶由来成分 テアフラビン類～
2017. 3. 2
大場舞
- 3) 平成28年度静岡県職員表彰(個人表彰)
紅茶の成分「テアフラビン類」でノロウイルスを不活化
2017. 3. 17
大場舞, 安藤隆幸, 池ヶ谷朝香, 荒畑沙織,
小和田和宏

大気水質部

- 1) 第53回静岡県公衆衛生研究会第4分科会優秀演題
「PM2.5大気自動測定器捕集フィルターによる水溶性成分の把握」
2017. 3. 2
本間信行

静岡県環境衛生科学研究所報告
(第 59 号)
平成 29 年 7 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/)



環境の理想郷“ふじのくに”の創造