

愛知県衛生研究所報

第 57 号 平成 19 年 3 月

目 次

調査研究

腸管凝集性大腸菌耐熱性腸管毒 EAST1 遺伝子 *astA* を保有する大腸菌（血清型 O1:H45）が
腸管毒素原性大腸菌と同時に検出された食中毒事例 1

山崎 貢、松本昌門、秦 眞美、小林慎一、皆川洋子、
松井博範、榮 賢司*、木村 隆、宮崎 豊
* 社団法人愛知県食品衛生協会

パッシブサンプリング法を用いた揮発性有機化合物の測定
シックハウス症候群患者の曝露量調査 13

近藤文雄、山崎 貢、林 留美子、木村 隆、鳥居新平^{1*}
^{1*} 医療法人愛生会 総合上飯田第一病院

LC-ICP-MS による愛知県の水道原水中ヒ素について 25

大沼章子、小池恭子、遠山明人

水中ヒ素化学形態別分析における試料の保存について 37

大沼章子、小池恭子、遠山明人

逆相 TLC / スキャニングデンシトメトリ - による生薬分析
- オウゴン、シャクヤク、カンゾウ、アロエ、ポタンピ、
センブリ、オウレン、センナの確認試験 - 49

大野 勉、池田清栄、三上栄一

畜水産食品中の PCBs、クロルデン類および有機塩素系農薬の一斉分析における
ゲル浸透クロマトグラフィーおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーの応用 55

椋島由佳、上野英二、大島晴美、大野 勉

他誌掲載論文抄録 65

Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health
(Aichi-ken Eisei Kenkyusyoho)

Volume57, March 2007

Contents

Original Papers

A food borne - outbreak caused by *Escherichia coli* (O1:H45 serotype) possessing *astA* gene of enteroaggregative *E.coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) and enterotoxigenic *E.coli* 1

Mitsugu Yamazaki, Masakado Matsumoto, Mami Hata, Shinichi Kobayashi,

Hiroko Minagawa, Hironori Matsui, Kenji Sakae*,

Takashi Kimura and Yutaka Miyazaki

*Aichi Prefectural Food Hygiene Association

Analysis of volatile organic compounds in indoor air samples using passive sampling: exposure level of sick-house syndrome patients to volatile organic compounds 13

Fumio Kondo, Mitsugu Yamasaki, Rumiko Hayashi, Takashi Kimura, Shinpei Torii

Arsenic Concentrations in Raw Waters for Water Supply in Aichi Prefecture using LC-ICP-MS 25

Shoko Ohnuma, Yasuko Koike , Akito Thoyama

Preservation of Water Samples in Analysis of Arsenic According to Chemical Form 37

Shoko Ohnuma, Yasuko Koike , Akito Thoyama

Analysis of Crude Drugs Using Reversed-Phase TLC/Scanning Densitometry Identification of Scutellaria Root, Peony Root, Glycyrrhiza, Aloe, Moutan Bark, Swertia Herb, Coptis Rhizome and Senna Leaf 49

Tsutomu Ohno, Seiei Ikeda, Eiichi Mikami

Application of Gel Permeation Chromatography and Silica Gel Column Chromatography for Analysis of PCBs, Chlordanes, and Organochlorine Pesticides in Stock Farm and Marine Products 55

Yuka Kabashima, Eiji Ueno, Harumi Oshima, Tsutomu Ono

Summeries of papers accepted in other journals 65

調 査 研 究

腸管凝集性大腸菌耐熱性腸管毒 EAST1 遺伝子 *astA* を保有する 大腸菌（血清型 O1:H45）が腸管毒素原性大腸菌と 同時に検出された食中毒事例

山崎 貢、松本昌門、秦 眞美、小林慎一、皆川洋子、
松井博範、榮 賢司*、木村 隆、宮崎 豊

*社団法人愛知県食品衛生協会

要 旨

2001年5月に、愛知県X市内で仕出し弁当を喫食した179名中98名(54.7%)が下痢と腹痛を主とする症状を呈した。患者32名の糞便について病因物質を検索した結果、血清型 O1:H45 の EAST1 遺伝子 *astA* を保有する大腸菌（以下、*astA*⁺ *E.coli*）が63%（20名/32名）から検出された。患者からは、その他に、血清型 O20ab:HUT（又は HNM）の耐熱性腸管毒（ST）産生性の腸管毒素原性大腸菌 ETEC が34%（11名/32名）から検出された。*astA*⁺ *E.coli* が検出された患者の50%（10名/20名）からは ETEC も同時に検出された。

培養検査では、*astA*⁺ *E.coli* と ETEC が全く検出されなかった患者11名のうち、残余検体を用いた検査が可能であった9名の糞便から DNA を抽出し、*astA* 及び ST の遺伝子 (*est*) の存在を調べたところ、*astA* が56%（5名/9名）から、*est* が67%（6名/9名）から検出されたが、うち4名からは *astA* と *est* が同時に検出された。

聞き取り調査において便性状を回答した82名の患者中、82%（67名）は水様便のみを排泄していたが、18%（15名）は粘液便を排泄していた。これは、ST 産生性 ETEC 感染者の便性状は水様便という一般的記載とは異なっていた。また、*astA*⁺ *E.coli* のみが検出された患者の88%（7名/8名）は粘液便を排泄し、これは *astA*⁺ *E.coli* と ETEC を同時に検出した患者の11%（1名/9名）及び両菌が非検出の患者の25%（2名/8名）のいずれと比較してもはるかに高率（各、 $p=0.003$ 、 $p=0.041$ ）であった。

以上、本食中毒の原因は *astA*⁺ *E.coli* と ETEC の混合感染であることが明らかとなった。また、ETEC と *astA*⁺ *E.coli* の混合感染は、ETEC の単独感染における水様便とは異なり粘液性の下痢を起こす可能性が示唆された。

Key words : 食中毒、腸管毒素原性大腸菌 , EAST1 , *astA*

序 文

腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E.coli* : EPEC)、腸管侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E.coli* : EIEC)、腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E.coli* : ETEC)、志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E.coli* : STEC) 及び腸管凝集性大腸菌 (Enteroaggregative *E.coli* : EAggEC もしくは EAEC) は、一般に重要な下痢原性大腸菌とされている¹⁾。

EAST1 (EAggEC *Escherichia coli* heat stable enterotoxin 1) は、元来 EAggEC から見出された腸管毒である²⁾。EAST1 をコードする遺伝子 *astA* は、EAggEC 以外の下痢原性大腸菌のカテゴリーからも検出され、さらに、健常者に由来する大腸菌からも検出されることが明らかになっている³⁾。*astA* と下痢症との関連はよく分かっていない^{3,4)}が、国内からは、下痢原性大腸菌の病原遺伝子を保有しないが *astA* を保有する大腸菌 (以下、*astA*⁺ *E.coli*) が原因と考えられた食中毒が 10 事例報告されている⁵⁻¹⁴⁾。

八柳ら⁵⁾は、1995年3月に秋田県で発生した *astA*⁺ *E.coli* (血清型 OUT:HUT) と ETEC (O148:H28) との混合感染による食中毒を報告し、また、Nishikawa ら⁶⁾は、1996年7月に大阪市内で発生した *astA*⁺ *E. coli* (O166:H15) 単独感染による食中毒 1 事例を報告している。この他に *astA*⁺ *E.coli* が原因と推定された事例は、1997年に福井県 (O166:H15)⁷⁾、1998年に岩手県 (OUT:H18)⁸⁾ 及び広島市 (O166:HUT)⁹⁾、2002年に広島市 (OUT:H33)¹⁰⁾、2003年に大分県 (O6:H10)¹¹⁾ 及び埼玉県 (OUT:H19)¹²⁾、2004年に福井県 (O169:HNM)¹³⁾ 及び岩手県 (O166:HUT)¹⁴⁾ より報告されている。

愛知県においても、2001年に *astA*⁺ *E.coli* (O1:H45) と ETEC の混合感染が原因の食中毒が発生している。これまでに報告されている *astA*⁺ *E.coli* が関連した食中毒においては *astA*⁺ *E.coli* と ETEC との混合感染事例は非常に稀なことが判明したので、国内 2 例目

となる *astA*⁺ *E.coli* と ETEC との混合感染事例について疫学的な解析結果を含め報告する。

1 食中毒の概要

食中毒の概要を表 1 に示した。2001年5月19日、愛知県 X 市内で仕出し弁当を喫食した団体 179 名中 98 名 (発症率 55%) が食中毒症状を示した。下痢は 96% (94 名/98 名) にみられ、下痢回数は平均 6 回 (1~30 回) であった。便性状 (回答者 82 名) は水様便が 82% (67 名/82 名) と最も多かったが、残り 18% は、水様便と粘液便 (8 名)、粘液便 (6 名) 及び粘血便 (1 名) であった。腹痛は 89% (87 名/98 名) と多数に見られた。発熱は 21% (21 名/98 名) で最高 38.2 (平均 37.5) と大半が微熱であった。嘔吐は 7% (7 名/98 名) と少なかった。潜伏期間は 1~52 時間と幅があったが 17~18 時間 (13%) が最頻値であった。喫食者 / 非喫食者間のカイ 2 乗検定による原因食品の推定では、ゆでエビ (p=8.24) とホタルイカの煮物 (p=5.13) が有意であったが、残品及び保存食がなく食品微生物検査による特定はできなかった。

2 保健所における検査の概要

愛知県の試験検査体制に従い、最初の食中毒菌の検査は保健所の試験検査室で実施された。検査材料は、患者 32 名及び調理従事者 6 名から提出された糞便であった。患者 32 名のうち 6 名が医療機関を既に受診していた。

検査の結果、15 種類の食中毒菌 (サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ、ウエルシュ菌、セレウス菌、エルシニア菌、カンピロバクター、ナグビブリオ、コレラ、赤痢菌、チフス菌、パラチフス菌、エロモナス、プレシオモナス、及びビブリオ・フルビアリス) は全て陰性であった。下痢原性大腸菌の検索は、まず DHL 及び SS 寒天培地に発育した赤色集落から 1 検体あたり 5 株程度を釣菌し、TSI、LIM、VP、及びシモンズクエン酸の各確認培地ならびにチトクロームの生化学性状から同定した大腸菌株を対象に、O 型

表1 食中毒の概要

発生年月日	2001.5.19 ~ 5.21		
発生場所	愛知県O市内		
原因食品	不明(仕出し弁当) カイ2乗検定 ゆでエビ(p=8.24)、ホタルイカ(p=5.13) 微生物学的検査:残品がなく検査不能		
摂食者数	179名		
患者数	98名(男性36名、女性62名、年齢5~82歳:最頻値35~39歳、21%)		
死者	0名		
発症率	54.7%		
症状(98名中)			
発熱	21%(37.0~38.2、平均37.5)		
下痢	96%(1~30回、平均6回)		
便性状	(回答者82名中)		
	水様便	67名	
	水様便及び粘液便	8名	
	粘液便	6名	
	粘血便	1名	
嘔吐	7%(嘔吐回数は1~6回、平均2回)		
腹痛	89%		
	臍を中心とした腹痛の位置(回答者63名中)		
	上部	42名	
	中心	3名	
	下部	18名	
潜伏期間	1~52時間(最頻値:17~18時間、13%)		
病因物質	腸管毒素原性大腸菌(ETEC) (血清型O20ab:HUT、HNM、ST陽性) その他の大腸菌 <i>astA</i> ⁺ <i>E.coli</i> (血清型O1:H45、 <i>astA</i> 陽性)		

別用の病原大腸菌免疫血清1号セット(デンカ生研)を用いて下痢原性大腸菌をスクリーニングした。その結果、患者32名中17名の糞便からO1型43株及びO型別不能(OUT)1株が分離された。このOUT1株は、混合血清5に凝集するが単味O血清のいずれにも非凝集であった。これら44株の大腸菌について、次にペロ毒素産生試験(大腸菌ペロトキシン検出用キット、デンカ生研)及びPCR法によるペロ毒素遺伝子(*stx*)検査¹⁵⁾が行なわれたが、44株は全てペロ毒素陰性でありSTECではなかった。調理従事者6名からは上記食中毒菌は全く検出されなかった。

材料及び方法

衛生研究所における病因物質の検査

大腸菌分離株の病原因子及びノロウイルス検出の目的で、保健所で分離された上記大腸

菌44株及び冷凍保存されていた糞便(患者32名及び調理従事者6名分)が衛生研究所微生物部に搬入された。

1) 保健所で分離された大腸菌44株の血清型、生化学性状及び病原因子

(1) O:H血清型別分類

OUT(混合血清5凝集)大腸菌1株について、保健所で検査した1号セット(Lot.54011)とは異なるロット(Lot.1016, 39512, 9177, 33910)を用いて再度O型別分類を試みた。さらに1号セットに含まれない抗O血清(O4, O5, O7, O9, O17, O19, O20ab, O34, O36, O60, O62, O71, O78)(Difco社)を用いて、スライド凝集試験及び試験管定量法によるO型別分類も実施した。H型別は2号セット(デンカ生研)により実施した。

(2) 糖分解性状

API20E (日本ビオメリュー)により分離株の糖分解性状を調べた。

(3)下痢原性大腸菌の検索

下痢原性大腸菌のカテゴリーについて保健所で実施済みの STEC 以外 (ETEC、EIEC、EPEC、及び EA_ggEC) の病原性試験を実施した。ETEC の易熱性腸管毒 (LT) は VET-RPLA (デンカ生研) を、耐熱性腸管毒 (ST) はコリスト EIA (デンカ生研) を用いて調べた。EPEC、EIEC、及び EA_ggEC は PCR 法を用い、EPEC は接着因子 intimin の遺伝子 *eaeA*¹⁶⁾ と束線毛の遺伝子 *bfpA*¹⁷⁾ を、EIEC は侵入因子の遺伝子 *invE*¹⁵⁾ を、また EA_ggEC は凝集線毛の産生を促進する遺伝子 *aggR*¹⁷⁾ を調べた。その他に、EAST1 の遺伝子 *astA*¹⁷⁾ の有無を調べた。

(4) パルスフィールド電気泳動 (PFGE) による DNA パターンの解析

PFGE による解析は、泉谷ら¹⁸⁾の条件を少し変更して行なった。即ち、抽出した DNA を制限酵素 *NotI* または *XbaI* で切断した後、LKB2015 Pulsaphor (Parmacia) の泳動装置を用いて PFGE を、200V/cm、4 - 8 秒 : 6 時間、8 - 4 秒 : 1 分、4 - 8 秒 : 6 時間、8 - 50 秒 : 10 時間の泳動条件で行なった。泳動したゲルは臭化エチジウムで染色後紫外線照射下で撮影し、DNA 断片の泳動パターンを解析した。

(5) 薬剤感受性試験

下痢原性大腸菌と推定された大腸菌の薬剤感受性試験は、センシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用い、アンピシリン (A B P C)、クロラムフェニコール (C P)、セファロリジン (C E R)、コリスチン (C L)、ストレプトマイシン (S M)、ナリジクス酸 (N A)、カナマイシン (K M)、ピペミド酸 (P P A)、テトラサイクリン (T C)、ミノマイシン (M N O)、ホスホマイシン (F O M)、及びノルフロキサシン (N F X) の 12 薬剤感受性試験を実施した。

2) ノロウイルス遺伝子の検出

RT-PCR 法¹⁹⁾により行なった。

3) 糞便検体からの大腸菌再分離

患者糞便からの *astA*⁺ *E. coli* の再分離には、ラムノースを 1% 添加したマッコンキー寒天培地 (RMAC)²⁰⁾ に糞便を塗抹培養し、無色の発育集落から O1 血清による凝集試験と PCR 法による *astA* の検索を行なった。O1 血清に凝集する *astA* 保有株についてはさらに大腸菌の同定と H 型別分類を行なった。一方、ETEC の再分離には、糞便を DHL 寒天に塗抹培養し、発育した赤色集落から混合 5 血清に対する凝集反応と ST の遺伝子 (*est*) を標的としたプライマー (ESH-1/2, Takara) を用いた PCR 法による ETEC の検索を行なった。分離した ETEC については、さらに大腸菌の同定と O:H 型別分類を行なった。

4) 糞便 DNA 中の *astA* 及び *est* 遺伝子の検出

保健所及び衛生研究所の細菌培養検査では *astA*⁺ *E. coli* と ETEC のいずれも陰性であった患者 11 名のうち、再検査可能な量が残っていた 9 名の糞便 (-20 に凍結保存) から DNA を抽出し、*astA* と *est* の検出を試みた。DNA 抽出には QIAamp DNA stool Mini kit (Qiagen 社) を用い、説明書に従い約 200mg の糞便から抽出した DNA を試料として、PCR 法により *astA* と *est* の検索を行なった。

5) 統計

カイ 2 乗検定 (Fisher's exact test) は SPSS ver.11.5 を用いて行なった。

成 績

1 保健所で分離された 44 株の大腸菌 O:H 血清型、生化学性状、病原因子

患者 17 名に由来する O1 型の大腸菌 43 株の H 型別分類を行なった。その結果、13 名由来 34 株 (79.1%) が H45 に型別分類された。残り 9 株は、H19 (3 株、2 名)、H7 (2 株、1 名)、H4 (1 株、1 名)、HNM (1 株、1 名) 及び H 型別不能の HUT (2 株、1 名) であった。一方、O1:H45 が検出された患者 1 名から同時に検出された 1 株 (混合血清 5 に凝集) の O 型別を、保健所で調べたロットとは異なる 4 ロットの 1 号セットを用いて行なった結果、2 ロット (Lot.1016、

表2 32名の患者における *astA*⁺ *E.coli* 及び ETEC の検出患者数

	<i>astA</i> ⁺ <i>E.coli</i> O1:H45	ETEC O20ab:HUT(HNM)	<i>astA</i> ⁺ <i>E.coli</i> と ETEC の同時検出 (再掲)
総検出患者数	20名 (63%)	11名 (34%)	10名
1回目分離 (保健所)	13名	1名	1名
再分離 (衛生研究所)	7名*	10名**	9名
患者数	32名 (100%)	32名 (100%)	

* 1回目の分離で、*astA*⁺ *E.coli* 陰性であった患者18名における陽性者数。

** 1回目の分離で、ETEC 陰性であった患者30名における陽性者数。

Lot.39512) で、抗 O20 血清に凝集した。さらに、Difco 社の抗血清では抗 O20ab 血清に凝集した(凝集価 640 倍; 陽性判定基準: 320 倍以上)。この成績から混合血清 5 凝集株 1 株を O20ab 型に分類した。また、この O20ab 株の H 型は型別不能 (HUT) であった。

API20E を用いて、2 株の O1:H45 株及び 1 株の O20ab:HUT の糖分解性状を調べたところ、O1:H45 は 2 株共にラムノース非分解の非典型的な大腸菌の性状を示した。O20ab:HUT には特記すべき性状はなかった。

下痢原性大腸菌の病原因子を検索した結果、血清型 O1:H45 の全 34 株(患者 13 名に由来) は *astA* 陽性であったが、下痢原性大腸菌の指標として調べた病原因子は全て陰性であったので *astA*⁺ *E.coli* に分類した。一方、O20ab:HUT 株は、ST 産生性であったことから ETEC に分類した。なおこの ETEC は *astA* 非保有株であった。また、検査対象患者 32 名全員ノロウイルス陰性、調理従事者 6 名は食中毒菌及びノロウイルス陰性であった。

2 糞便検体からの *astA*⁺ *E.coli* 及び ETEC の再分離

最初に行なわれた保健所の検査で O1:H45 が検出されなかった 19 名の糞便を RMAC 培地に塗抹培養して *astA*⁺ *E.coli* の分離を試みた。7 名からラムノース非分解性 28 株が分離され、全てが O1 に型別された。また、これら 7 名から任意に選んだ 7 株は全て *astA* を保有し、かつ H45 に型別された。一方、ETEC

については、保健所の検査では O20 ab HUT が検出されなかった患者 30 名の糞便を DHL 培地に塗抹培養して分離を試みた。その結果、11 名から白糖分解株 50 株を分離した。うち 11 名由来 22 株が混合血清 5 に凝集した。11 名中 9 名から任意に選んだ 9 株は、血清型 O20ab:HUT(9 株中 1 株は HNM)で ST 産生性であったことから ETEC と同定した。残り 2 名については、分離株全株(3 株)が ST 非産生性であった。

3 *astA*⁺ *E.coli* 及び ETEC の検出率

表 2 に示すとおり、保健所の分離株と衛生研究所の再分離株を合わせると、*astA*⁺ *E.coli* (O1:H45) は全対象患者の 63% (20 名/32 名) から検出され、また、ETEC(O20ab:HUT または HNM) は 34% (11 名/32 名) から検出された。さらに *astA*⁺ *E.coli* 検出患者の 50% (10 名/20 名) からは ETEC が同時に検出された。

4 菌検出結果と症状等の疫学情報との関係

表 3 のとおり、菌の検出結果から検査した全患者 32 名を、a 群: *astA*⁺ *E.coli* と ETEC を検出(10 名、受診者なし) b 群: *astA*⁺ *E.coli* のみ検出(10 名、うち受診 1 名) c 群: ETEC のみを検出(1 名、うち受診 1 名) 及び d 群: 両方とも非検出(11 名、受診 4 名) の 4 グループに分類し、1 名と少なかった c 群を除き、菌の検出結果と聞き取り調査に基づく症状との関係を検討した。

便性状との関係をみると、粘液便を排泄し

表3 患者32名の糞便からの菌及び病原遺伝子の検出、下痢性状、及び受診状況

患者番号	菌検出		糞便DNA中の遺伝子検出		便性状	下痢の回数	受診	
	<i>astA</i> ⁺ <i>E.coli</i>	ETEC	<i>astA</i>	<i>est</i>				
a群 (10名)	2	+	+	NT	NT	水様便	4	
	4	+	+	NT	NT	水様便	1	
	9	+	+	NT	NT	不明	不明	
	10	+	+	NT	NT	水様便	5	
	13	+	+	NT	NT	粘液便	2	
	16	+	+	NT	NT	水様便	5	
	20	+	+	NT	NT	水様便	2	
	21	+	+	NT	NT	水様便	12	
	23	+	+	NT	NT	水様便	2	
	24	+	+	NT	NT	水様便	5	
平均 4回								
b群 (10名)	8	+	-	NT	NT	不明	4	
	12	+	-	NT	NT	粘液便	2	有
	17	+	-	NT	NT	不明	不明	
	18	+	-	NT	NT	水様便・粘液便	4	
	19	+	-	NT	NT	水様便	10	
	26	+	-	NT	NT	水様便・粘液便	5	
	28	+	-	NT	NT	粘液便	7	
	29	+	-	NT	NT	粘液便	2	
	30	+	-	NT	NT	水様便・粘液便	2	
	32	+	-	NT	NT	水様便・粘液便	2	
平均 4回								
c群 (1名)	22	-	+	NT	NT	不明	不明	有
d群 (11名)	1	-	-	-	-	水様便	30	有
	5	-	-	-	-	水様便・粘液便	5	
	14	-	-	+	-	不明	不明	有
	15	-	-	-	+	水様便	30	有
	27	-	-	-	+	水様便	不明	
	3	-	-	+	+	水様便	2	
	6	-	-	+	+	水様便	7	
	11	-	-	+	+	粘液便	5	
	25	-	-	+	+	不明	5	
	7	-	-	NT	NT	不明	5	
	31	-	-	NT	NT	水様便	10	有*
平均11回								

NT：検査を実施せず。

* 抗生物質の投与を受けたことが確認できた患者。

た患者(粘液便と水様便を排泄した患者を含む)は、b群の有回答者の約88%(7名/8名)であったのに対し、a群、d群ではそれぞれ約11%(1名/9名)、25%(2名/8名)と低率(各、 $p=0.003$ 、 $p=0.041$)であった。一方、a群とd群においては水様便のみを排泄した患者がそれぞれ89%(8名/9名)、75%(6名/8名)と高率を占めていた。下痢回数(平均値)との関係を見ると、d群は11回と頻回の下痢があったのに対し、a群とb群は4回と比較的少なかった。発熱や潜伏期間等の他の症状と菌検出との間には特記すべき関

係は認められなかった。

5 12薬剤に対する感受性試験

患者20名に由来する*astA*⁺*E.coli* 20株の薬剤感受性を調べた結果、19株はABPC、SM、及びTCに耐性、CERに中等度耐性、CP、CL、NA、KM、PPA、MNO、FOM、及びNFXには感受性を示した。1株はABPC、SM、およびTCに耐性、CERを含む9剤に感受性であった。一方、ETECの薬剤感受性は菌株によりパターンが異なっていた。即ち、患者11名に由来する11株を調べた結果、TC

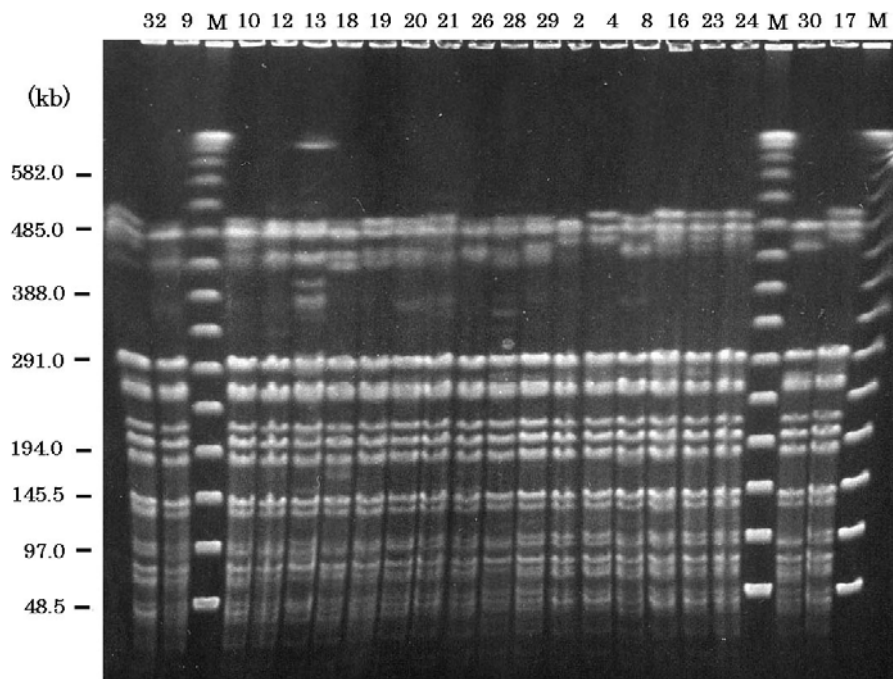


図1 *astA*⁺*E. coli*(O1:H45型) 株の *NotI* 切断によるPFGEパターン
数字:患者番号 M:Lambda ladder

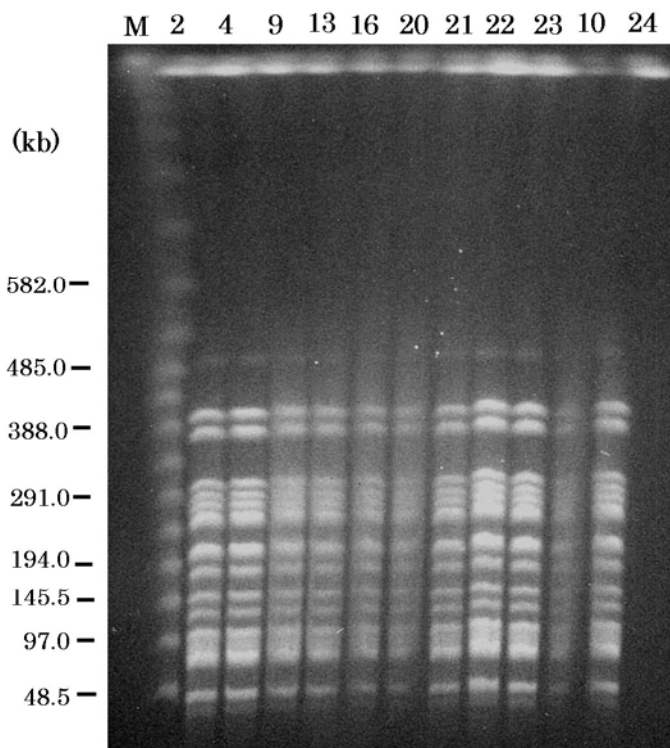


図2 ETEC (O20ab:HUT, HNM型) 株の *NotI* 切断によるPFGEパターン
数字:患者番号 M:Lambda ladder

耐性株が5株、TC耐性かつSM中等度耐性株が2株、*astA*⁺*E. coli*と同一パターン(ABPC、SM及びTC耐性、CER中等度耐

性)が1株であった。残り3株は全薬剤に感受性を示した。

6 PFGE パターン

図 1 と図 2 に、感受性試験に用いた菌株の PFGE パターン (Not I) を示した。20 株の *astA*⁺ *E.coli* の PFGE パターンは、同一もしくはきわめて類似していた。また、11 株の ETEC の PFGE パターンは全株とも同一であった。これら *astA*⁺ *E.coli* 及び ETEC を *Xba*I で切断した場合も各群の PFGE パターンは一致していた (data not shown)。

7 糞便 DNA からの *astA* 及び *est* 遺伝子の検出

再分離を行っても検査対象患者 32 名中 11 名からは *astA*⁺ *E.coli* と ETEC は検出されなかったため、病原性大腸菌の有無を確認するために、検体が残っていた 9 名の糞便から DNA を抽出し、*astA* 及び *est* 遺伝子の検出を試みた。その結果、*astA* が 56% (5 名/9 名)、*est* が 67% (6 名/9 名) から検出された。うち、4 名からは *est* と *astA* が同時に検出された。

考 察

今回の検討において、98 名の患者のうち調査を実施した患者 32 名中、*astA*⁺ *E.coli* が 63% (20 名/32 名) から、ETEC が 34% (11 名/32 名) から検出されたこと、両菌が非検出の患者 11 名中検査可能であった 9 名の糞便 DNA から *astA* 及び *est* が各々 56% (5 名/9 名)、67% (6 名/9 名) と高率に検出されたこと、さらに、血清型、薬剤感受性、及び PFGE パターンを調べたところ、ETEC 株間に薬剤感受性の差異 (6 株/11 株) は認められたものの、それ以外は *astA*⁺ *E.coli* 及び ETEC とほぼ一致していたことから、本食中毒は国内 2 例目の *astA*⁺ *E.coli* 及び ETEC 混合感染事例と考えられた。

2006 年 11 月までに、国内から *astA*⁺ *E.coli* が関連していた集団食中毒は 10 事例⁵⁻¹⁴⁾ が報告されている。うち、1995 年に秋田県で発生した事例は ETEC と *astA*⁺ *E.coli* の国内初の混合感染例として八柳ら⁵⁾ が報告している。*astA*⁺ *E.coli* と ETEC の検出率 (検査対象患者数 13 名) は、*astA*⁺ *E. coli* (OUT:HUT) 38%、ETEC (O148:H28) 46% とほぼ同程度の検出率であった⁵⁾。これに対し、今回の

事例 (検査対象患者数 32 名) では、*astA*⁺ *E.coli* (63%) の検出率が ETEC (34%) の検出率の約 2 倍と高かった。一方、*astA*⁺ *E.coli* と ETEC のいずれも検出されなかった患者 9 名の糞便 DNA 中からの *astA* と *est* の検出率は各々 56% 及び 67% とほとんど差がなく、対象検体数は小さいが *astA*⁺ *E.coli* と ETEC の病原遺伝子 DNA はほぼ同程度に検出されていた。著者らは *astA*⁺ *E.coli* が ETEC に比べ、培養では約 2 倍の検出率を示した原因は、両菌の定着性の差ではないかと考えている。すなわち、患者の多くは最初に *astA*⁺ *E.coli* と ETEC に同時に感染したが、定着性に優る *astA*⁺ *E.coli* が ETEC よりも腸管内に長く留まったため菌分離培養による検出率に差が生じたのではないかと推測している。このほか *astA*⁺ *E.coli* と ETEC の感染菌量の違いや、両菌の分離培養効率に関わる技術的な要素などの影響も考えられる。

患者の症状に関して、Zen-yoji らは 1974 ~ 1975 年に東京都内で発生した 6 事例の ST 産生性 ETEC (O159:H20) のみが検出された集団下痢症を調査し、患者合計 141 名中、137 名 (97%) が下痢を起こしたが、粘血便及び血便患者は皆無 (0%) と報告している²¹⁾。国内で発生していた *astA*⁺ *E.coli* が関連していた集団事例 10 事例の報告をみると、*astA*⁺ *E.coli* の感染患者の下痢便性状に関する詳細な記載はなされていない。本事例における食品衛生監視員による聞き取り情報によると、水様便のみを排泄した患者が 82% (67 名/82 名) と多数を占めていたが、残り 18% (15 名/82 名) の患者は粘液便 (水様便及び粘液便、及び粘血便を含む) を申告していた。この結果は、ST を単独に産生する ETEC 感染症の一般的症状²¹⁾ とは異なっていた。

そこで、検査を実施した 32 名の患者を a 群: *astA*⁺ *E.coli* と ETEC を検出した 10 名、b 群: *astA*⁺ *E.coli* のみ検出した 10 名、c 群: ETEC のみを検出した 1 名、及び d 群: 両方とも非検出の 11 名に分類し、1 名と少なかった c 群を除き、菌の検出結果と聞き取り調査に基づく症状との関係を検討した。その結

果、*astA*⁺ *E.coli* のみが検出され ETEC が検出されなかった患者群において高率(約 88%、7名/8名)に認められた粘液便の排泄の理由としては今回検出された *astA*⁺ *E.coli* が腸管粘膜に何らかの障害を与えた可能性を示唆するものと考えられる。

国内で報告されている *astA*⁺ *E.coli* が関連していた集団食中毒 10 事例⁵⁻¹⁴⁾のうち、4 事例は *astA*⁺ *E.coli* が O 型別不能 (OUT) 株であり、*astA*⁺ *E.coli* 検出は比較的困難と考えられる。原因菌分離の詳細が報告されている 2 事例をみると、1995 年の秋田県の事例⁵⁾では、PCR 法を用いた *astA* 等スクリーニング試験陽性検体より菌を分離している。また、2002 年の広島市の事例¹⁰⁾では、*astA*⁺ *E.coli* が乳糖遅分解という非典型的な性状を示したため、*astA*⁺ *E.coli* の効率的な分離に成功している。一方、今回の我々の事例では、保健所の検査において *astA*⁺ *E.coli* (O1:H45) 陽性の 13 名中 1 名から同時に検出された 1 株のみが O 型別分類の困難な ETEC であった。従って本事例は、血清型別によるスクリーニング検査のみでは ETEC との混合感染が見逃される可能性が非常に大きかったと思われる。今後も国内での *astA*⁺ *E.coli* が関連する食中毒発生が危惧されるが、*astA*⁺ *E.coli* と下痢症の関係を明らかにするには、O 型別分類の困難な *astA*⁺ *E.coli* の存在や、ETEC との混合感染の可能性まで想定した検査を行なう必要があると思われる。

謝 辞

稿を終えるに当たり当該事例を担当した食品衛生監視員及び試験検査課職員の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Nataro J.P. and Kaper J.B. :Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., 11, 142-201, 1998
- 2) Savarino S.J., Fasano A. et al.:Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents

another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90,3093-3097. 1993

- 3)Savarino S.J., McVeigh A. et al :Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteraggregative *E. coli*. J. Infect. Dis., 173,1019-1022. 1996
- 4)Menard L.P. and Dubreuil J.D. :Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist (Review) .Crit.Rev. Microbiol., 28,43-60. 2002
- 5)八柳 潤,木内 雄,他:腸管集合性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 (EAST-1) 遺伝子を保有する食中毒様事例由来病原血清型大腸菌,感染症誌,70,73-79,1996
- 6)Nishikawa Y., Ogasawara J. et al. :An outbreak of gastroenteritis in Japan due to *Escherichia coli* O166.Emerg.Infect. Dis., 5,300, 1999
- 7)国立感染症研究所:病原微生物検出情報, 19(1), S3, 1998
- 8)国立感染症研究所:病原微生物検出情報, 19(12), S3, 1998
- 9)石村勝之,児玉 実,他:*astA* 遺伝子保有大腸菌 O166:H15 が原因菌と考えられた集団食中毒事例,広島市衛研年報,20, 79-81, 2002
- 10)石村勝之,毛利 好江,他:*astA* 遺伝子保有大腸菌 OUT:H33 が原因菌と考えられた集団下痢症事例,広島市衛研年報,22, 114-115, 2003
- 11)緒方喜久代,成松浩志,他:既知の病原因子を保有しない大腸菌 O6:H10(*astA* 保有)が検出された下痢症集団事例 - 大分県,国立感染症研究所:病原微生物情報,25, 101-102, 2004
- 12)佐藤秀美,小林留美子,他:集団下痢症において患者便および井戸水から *astA* を保有する大腸菌が検出された事例について,第 25 回食品微生物学会,号外,41, 2004

- 13) Ishiguro F., Kyota Y., et al: An outbreak of diarrhea caused by *Escherichia coli* serogroup O169:HNM harboring a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (*astA*) in Fukui Prefecture. Jpn.J.Infect.Dis. 58, 119-20,2005
- 14) 藤井伸一郎, 佐藤卓: 腸管凝集性付着大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌 O166:HUT が原因と考えられた食中毒事例(岩手県)食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究,平成 16 年度総括/分担研究報告書(厚生労働省科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業), 45-46, 2005
- 15) 伊藤文明, 荻野武雄, 他: 感染症 - 遺伝子診断と分子疫学 - 混合プライマーを用いた PCR による下痢原性大腸菌の病原遺伝子の同時検出法, 日本臨床, 50, 343-347, 1992
- 16) Yamazaki M., Saito M. et al: *eaeA* genes in *Escherichia coli* derived from Japanese patients with sporadic diarrhea. Kansenshogaku Zasshi. 71,1059-1065, 1997
- 17) 森屋一雄, 角典子, 他: 散発下痢症患者及び健常乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌 (EPEC,EAaggEC) 関連遺伝子, *eaeA*, *aggR*, *astA* の保有状況について, 感染症誌, 74, 134-141, 2000
- 18) Izumiya H., Tearajima J. et al: Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol., 35,1675-1680,1997
- 19) 国立感染症研究所ウイルス第二部・衛生微生物レファレンス委員会: ウイルス性下痢症診断マニュアル, ノロウイルスの RT-PCR 法, 第 3 版, p44-66, 平成 15 年
- 20) 平松礼司, 松本昌門, 他: 腸管出血性大腸菌 O26 の生化学性状及びその選択分離培地に関する検討. 感染症誌 73, 407-413, 1999
- 21) Zen-Yoji H., Kudo Y., et al, 1977, Epidemiological aspects of outbreaks of enteritis due to heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli*, occurring in Tokyo. p.41-47, In Proceedings of the 12th Joint Conference U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera Panel, Symposium on cholera Sapporo, 1976, Fukumi H. and Zinnaka Y., National Institute of Health, Tokyo.

A food borne - outbreak caused by *Escherichia coli* (O1:H45 serotype) possessing *astA* gene of enteroaggregative *E.coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) and enterotoxigenic *E.coli*

Mitsugu Yamazaki, Masakado Matsumoto, Mami Hata, Shinichi Kobayashi, Hiroko Minagawa, Hironori Matsui, Kenji Sakae*, Takashi Kimura and Yutaka Miyazaki

*Aichi Prefectural Food Hygiene Association

In May 2001, an outbreak of food poisoning occurred among a group in Aichi Prefecture, Japan. Among 179 members of the group who ate lunches provided by a same caterer, 98 persons (54.7%) developed diarrhea and abdominal pain as main symptoms.

As a result of examination of feces from 32 patients, *E.coli* of serotype O1:H45 possessing *astA* gene of EAST1 (*astA*⁺ *E.coli*) was isolated in 20 of the 32 patients (63%). Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) of serotype O20ab:HUT (or HNMM) producing heat-stable enterotoxin (ST) was also isolated from 11 of the 32 patients (34%). From 10 of the 20 patients having *astA*⁺ *E.coli* (50%), ETEC were simultaneously isolated.

DNA extracted from feces from 9 of 11 patients, in whom neither *astA*⁺ *E.coli* nor ETEC were isolated by a culture method, were investigated for *astA* gene and *est* gene of ST. The results were as follows, *astA* was detected in 6 of the 9 patients (67%) and *est* was detected in 5 of the 9 patients (56%). *astA* and *est* were simultaneously detected from four patients. Consequently, it became clear that this outbreak was the mixed infectious case of *astA*⁺ *E.coli* and ETEC.

According to the hearing investigations about properties of feces among 82 respondents, 67 of them (82%) reported only watery diarrhea, but 15 patients (18%) reported mucus diarrhea. This finding is quite contrast to the reported characteristics of diarrhea caused by the outbreaks of ST (+)- ETEC in which all of the patients developed only watery diarrhea.

It should be noted that 88% of patients (7/8), from whom only *astA*⁺ *E.coli* was isolated, excreted mucus diarrhea. This rate was substantially higher than 11% of patients (1/9) having *astA*⁺ *E.coli* and ETEC simultaneously, or 25% of patients (2/8) having neither *astA*⁺ *E.coli* nor ETEC (respectively, p=0.003 and p=0.041).

Key words: food borne-outbreak, ETEC, EAST1, *astA*

調 査 研 究

パッシブサンプリング法を用いた揮発性有機化合物の測定 シックハウス症候群患者の曝露量調査

近藤文雄、山崎 貢、林 留美子、木村 隆、鳥居新平^{1*}

^{*}1 医療法人愛生会 総合上飯田第一病院

要 約

揮発性有機化合物 (volatile organic compounds, VOCs) は、シックハウス症候群との関連が強く懸念されている。今回、できる限り多数の主要な VOCs を迅速かつ簡便に測定する方法の確立を目指し、パッシブサンプリング法を用いた VOCs 測定法を検討した。その結果、トルエン、キシレン、パラジクロロベンゼン等 22 物質と、すでにパッシブサンプリング法による測定法が確立しているホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの 2 物質を加えた計 24 物質を同時に測定する方法を確立した。次に、本法を用いて、シックハウス症候群患者 22 名、非患者 13 名の VOCs に対する個人曝露濃度及び室内空气中 VOCs 濃度調査を実施した。その結果、検出された VOCs の数は 4~20、24 物質の濃度合計値は 35~1600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と、被験者によって大きく異なっていた。また、24 物質の濃度合計値を患者群と非患者群で比較した場合、室内濃度は患者群の方が非患者群よりも有意 ($p<0.05$) に低く、個人曝露濃度においても患者群の方が低い傾向を示した。従って、今回の調査結果から症状の生じる VOCs の個人曝露及び室内濃度の閾値を集団として明確にするのは困難であると考えられた。今後、VOCs に対する曝露量と健康影響との関連を解明するためには、シックハウス症候群患者等の実態調査を継続し、より多くのデータを集積することが重要と考えられた。

キーワード：揮発性有機化合物、シックハウス症候群、パッシブサンプリング法、個人曝露量、健康影響

序 文

住宅の高気密化に伴い、建材、内装材等から放散される化学物質、それに、ダニ、カビ等から派生する様々な室内空気汚染物質による健康被害が大きな社会問題となってきた¹⁾。中でも揮発性有機化合物 (volatile organic compounds, VOCs) は、いわゆるシックハウス症候群との関連が強く懸念されて

いる²⁾。シックハウス症候群は医学的に定義された疾病ではなく、また、その発症の機序についても不明な点が多い¹⁾。その症状としては、鼻粘膜、皮膚の刺激症状をはじめ、めまい、頭痛などの不定愁訴が含まれている。症状のほとんどは、問題となる建物を離れば消失する。厚生労働省はこれまでにホルムアルデヒド等 13 項目については室内濃度指

針値を、総 VOC 量については暫定目標値を設定している³⁾。

これまで、シックハウス症候群の原因究明に関する様々な研究が行われているが、VOCsに対する曝露とシックハウス症候群発症の直接的な関連を示す明確な結果は報告されていない²⁾。最近、Saijoらは、VOCsの室内濃度と喉及び呼吸器症状との間には、有意な相関が認められることを報告したが、検出されたVOCs濃度は比較的低い値を示していた⁴⁾。我々は、シックハウス症候群患者及び非患者の血中VOCs濃度を測定したが、患者群と非患者群の間に有意な血中濃度の違いは認められず、また、血中VOCsレベルと症状との間にも関連は認められなかった⁵⁾。

従来、室内空気中のVOCsの測定は、国が標準的測定法として示した測定マニュアルに従って行われている³⁾。本マニュアルによる室内空気中のVOCsの採取は、捕集管をサンプリングポンプに接続し、空気を一定量吸引するアクティブサンプリング法により行われている。しかし、ポンプの設置場所、電源の確保、サンプリング中の騒音などの多くの問題点を抱えている⁶⁾。一方、気体分子の分子拡散と吸着剤への吸着を応用したパッシブサンプリング法は、サンプラーを測定場所に一定時間吊すだけの簡便なサンプリング法である。しかし、本法を用いてVOCs濃度を算出するためには、個々の物質について予め捕集係数を求めておくことが必要である。

今回、室内空気中のVOCsの簡便な測定法の確立を目指し、パッシブサンプリング法を検討した。さらに、パッシブサンプリング法を利用して、シックハウス症候群患者等のVOCsに対する個人曝露量及びVOCsの室内濃度を測定し、VOCsに対する曝露と健康影響との関連について検討を加えた。

方 法

1 調査対象及び内容

愛知県内の一般住宅33軒（延べ38検体）を対象として、アクティブ及びパッシブサンプリング法で室内外の空気を採取し、VOCs40物質

の測定法の検討を行った。

シックハウス症候群患者22名及び非患者13名を対象として、VOCsに対する個人曝露濃度及び室内VOCs濃度調査を実施した。なお、患者は、転居、建物の増築、広範な改築をきっかけとして発症し、問題になった場所から離れると症状がなくなるなどの一定の診断基準の該当者を対象とした。非患者は、愛知県衛生研究所職員、保健所を通じて県内住民などから募集した人の中で、診断基準に該当しない者を対象とした。

また、症状発症の要因について聞き取り調査を行った。

2 測定対象物質

(1) アクティブ及びパッシブサンプリング法(40物質)

脂肪族炭化水素類；n-ヘキサン、n-ヘプタン、n-オクタン、n-ノナン、n-デカン、n-ウンデカン、n-ドデカン、n-トリデカン、n-テトラデカン、n-ペンタデカン、n-ヘキサデカン、2,4-ジメチルペンタン、2,2,4-トリメチルペンタン

芳香族炭化水素類；ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、キシレン、1,2,4-トリメチルベンゼン、1,3,5-トリメチルベンゼン、1,2,3-トリメチルベンゼン、1,2,4,5-テトラメチルベンゼン、スチレン、

ハロゲン類；四塩化炭素、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1,2-ジクロロエタン、1,1,1-トリクロロエタン、パラジクロロベンゼン、1,2-ジクロロプロパン、クロロジプロモメタン、クロロホルム

テルペン類； α -ピネン、リモネン

エステル類；酢酸エチル、酢酸ブチル

アルコール類；1-ブタノール

ケトン類；メチルイソブチルケトン、メチルエチルケトン

アルデヒド類；ノナナール、デカナール

(2) パッシブサンプリング法のみ(2物質)

ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド

(3) パッシブサンプリング法のみ(9物質)
シロアリ駆除剤等;ジクロルボス、フェノブカルブ、ダイアジノン、クロルピリホスメチル、フェントロチオン、クロルピリホス、ピフェントリン、ペルメトリン、エトフェンブロックス

3 試料採取

採取場所は、室内は部屋の中央の床上約1.2 m、外気は軒下等の地面から約1.2 mの高さとした。個人曝露量では、被験者の胸元にパッシブサンプラーを装着した。

捕集管として、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの採取にはスペルコ製DSD-DNPH(パッシブサンプリング法)を、それ以外のVOCsの採取には、スペルコ製ORBO91LとORBO101を直列で接続したもの(アクティブサンプリング法)及びスペルコ製VOC-SD(パッシブサンプリング法)を、シロアリ駆除剤等のバイオサイドの採取には、前段に石英フィルター(2500QAT-UP、直径47 mm、東京ダイレック製)、後段にODSフィルター(Empore DiskC18 Fast Flow、直径47 mm、3M製)を用い、四フッ化エチレン樹脂製のろ紙ホルダーにセットしたもの(アクティブサンプリング法)を用いた。

アクティブサンプリング法は、それぞれの捕集管をサンプリングポンプに接続し、100 mL/分(VOCs)及び1 L/分(シロアリ駆除剤等)で空気を吸引した。採取時間は、アクティブ及びパッシブサンプリング法ともに24時間とした。

4 測定方法

(1) VOCs40 物質

採取後のORBO91LとORBO101から捕集剤を取り出してバイアル瓶に移し、二硫化炭素2 mL及び内部標準溶液(100 µg/mLトルエン-d₈)2 µLを加えて密栓し、時々軽く振とうしながら2時間放置したものを分析用試料溶液とした。この試料溶液1 µLをガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)に注入し、分析を行った。

(2) ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド
採取後のDSD-DNPHからアセトニトリル5 mLでHCHO-2,4-DNPH及びCH₃CHO-2,4-DNPHを溶出させ、分析用試料溶液とした。この試料溶液20 µLを高速液体クロマトグラフ(HPLC)に注入し、分析を行った。

(3) シロアリ駆除剤等

採取後の石英フィルターとODSフィルターをバイアル瓶に移し、アセトン10 mL及び内部標準溶液(100 µg/mLクロルピリホス-d₁₀)1 µLを加えて密栓し、10分間超音波抽出した。抽出液を窒素気流下で10倍濃縮後、3000 rpmで5分間遠心分離し、上清を分析用試料溶液とした。この試料溶液2 µLをガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)に注入し、分析を行った。

5 検量線及び定量

(1) ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド

ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの標準液(各100 ppm)をアセトニトリルで希釈して、それぞれの濃度が5 ppm、10 ppmとなるように混合溶液を調製した。さらに、この混合標準溶液をアセトニトリルで50倍、100倍、250倍、500倍希釈した。検量線は、各濃度の混合標準溶液をHPLCで測定し、測定した標準物質の量と、検出された測定対象物質のピーク高さから作成した。

(2) VOCs40 物質

VOCs混合標準原液を、その濃度が0.1、0.5、2.0、5.0 ppmとなるように二硫化炭素で段階的に希釈した。また、内部標準溶液としてトルエン-d₈を0.1 ppmとなるように添加した。検量線は、各濃度の混合標準溶液をGC/MSで測定し、測定した標準物質の量と、検出された測定対象物質及びその安定同位体内部標準物質のピーク面積から作成した。

(3) シロアリ駆除剤等

9種のシロアリ駆除剤等を、その濃度が

0.02、0.05、0.2、0.5 ppm となるようにアセトンで段階的に希釈した。また、内部標準溶液としてクロルピリホス-d₁₀を 0.1 ppm となるように添加した。検量線は、各濃度の混合標準溶液を GC/MS で測定し、測定した標準物質の量と、検出された測定対象物質及びその安定同位体内部標準物質のピーク面積から作成した。

6 分析条件

(1) GC/MS 条件 (VOCs40 物質)

装置：島津製作所製 QP5050A

カラム：DB-1 (0.25 mm × 60 m、膜厚 1.0 μm)

カラム温度：40 で 5 分間保持し、150 まで毎分 5 で昇温。その後毎分 10 で昇温後、250 で 18 分間保持。

キャリアガス：He (カラム流量 1.1 mL/分)

注入口温度：250

試料注入法：スプリット

検出器温度：280

イオン化：EI

測定モード：選択イオン検出

(2) HPLC 条件 (ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド)

ポンプ：島津製作所製 LC-6AD

検出器：島津製作所製 SPD-10A

カラム：Wakosil-II 5C18 RS 250 mm × 4.6 mm I.D.

移動相：アセトニトリル：水 = 6 : 4

流速：1 ml/min

注入量：20 μL

検出波長：360 nm

(3) GC/MS 条件 (シロアリ駆除剤等)

装置：Agilent 6890N GC/5973N MSD

カラム：HP-5MS SV (0.25 m × 30 mm、膜厚 0.5 μm)

カラム温度：80 で 3 分間保持し、240 まで毎分 20 で昇温。その後毎分 10 で昇温後、300 で 5 分間保持。

キャリアガス：He (カラム流量 1.2 mL/分)

注入口温度：250

試料注入法：パルスドスプリットレス

四重極温度：150

イオン源温度：230

イオン化：EI

検出法：選択イオン検出

7 室温および湿度の測定

温度、湿度の測定は、温湿度データロガー (ティアンドデイ製、TR-72S) を用いて行ない、24 時間平均値を求めた。

8 パッシブサンプリング法の捕集係数の算出及び濃度計算

VOCs40 物質のパッシブサンプリング法による捕集係数は、以下に示す式を用いて算出した。

捕集係数 (ng/(ppb×h)) =

捕集速度 × 分子量 × 60 × (273.15 / ((273.15 + 測定温度))) × 22.414 × 1000

捕集速度 =

アクティブ法とパッシブ法での捕集量の関係をプロットして得られるグラフの一次回帰式の傾き × 100

ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドのパッシブサンプリング法による捕集係数は、安藤ら⁷⁾によってメーカーが設定した捕集係数 (ng/(ppb×h)、ホルムアルデヒド；0.00530、アセトアルデヒド；0.00642) が適用可能であることが確認されているため、メーカー設定値をそのまま使用した。

パッシブサンプリング法による濃度計算は、以下に示す式を用いた。

濃度 (ppb) =

捕集量 (ng) / 捕集係数 (ng/(ppb×h)) / 捕集時間 (h)

9 統計処理

統計処理は SPSS for Windows を用い、検定は χ^2 、Fisher 直接確率法及び Mann-Whitney の U-テストで行い、有意水準を 5% とした。

表1 アクティブサンプリング法とパッシブサンプリング法の相関係数とパッシブサンプリング法の捕集係数

属性別	化合物名	相関係数 (例数)	捕集係数 (ng/(ppb x h))
芳香族 炭化水素	ベンゼン	0.900 (30)	10.1
	トルエン	0.939 (37)	10.1
	エチルベンゼン	0.970 (36)	11.1
	m,p-キシレン	0.956 (37)	11.8
	o-キシレン	0.936 (35)	11.4
	1,3,5-トリメチルベンゼン	0.808 (34)	11.3
	スチレン	0.829 (36)	5.47
脂肪族 炭化水素	ヘキサン	0.971 (11)	7.73
	オクタン	0.826 (22)	8.97
	ノナン	0.848 (32)	8.62
	デカン	0.876 (26)	9.68
	ウンデカン	0.864 (29)	6.26
	テトラデカン	0.967 (17)	5.07
テルペン	-ピネン	0.880 (34)	14.1
	リモネン	0.976 (28)	10.2
アルコール	1-ブタノール	0.977 (14)	16.4
アルデヒド・ケトン	メチルエチルケトン	0.859 (30)	9.53
	メチルイソブチルケトン	0.989 (24)	20.3
	ノナナール	0.841 (16)	8.69
ハロゲン化 炭化水素	トリクロロエチレン	0.871 (19)	14.4
	パラジクロロベンゼン	0.999 (34)	11.5
エステル	酢酸エチル	0.991 (24)	15.4
	酢酸ブチル	0.999 (29)	14.0

結果及び考察

1 パッシブサンプリング法での捕集係数の算出

我が国の住宅内空気中から高頻度に検出され、かつ一般的に測定されている 40 種の VOCs について、パッシブサンプリング法とサンプリングポンプを用いるアクティブサンプリング法による捕集量との相関より捕集係数を求めた。その結果、38 検体中両法で検出された例数が 10 以上で、かつ捕集量の相関係数が 0.800 以上の高い相関を示したのはトルエン、キシレン、パラジクロロベンゼン等 22 物質 (キシレンは o-, m-, p-キシレンで 1 物質とした) で、両法の捕集量の比から捕集係数を算出した (表 1)。なお、今回検討を行った VOCs と同様にシックハウス症候群との関連が強く懸念されているホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドについては、パッシブサンプリング法による測定法がすでに確立している。従って、今回捕集係数を算出した 22 物質に、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの 2 物質を加えた計 24 物質について、パッシブサンプリング法により同時に測定す

ることが可能となった。

パッシブサンプリング法は、サンプリングポンプ等の機器を必要としないため、簡便でしかも複数箇所の同時測定を容易に行えるという利点を有している、さらに、被験者の胸元にサンプラーを装着することによって個人曝露濃度を容易に測定できるため、より幅広い調査が可能になると考えられた。

2 患者及び非患者の実態調査

聞き取り調査を行った結果、患者の症状発症の要因は、新築あるいは改築が 45% (10/22)

表2 自覚症状の訴え率

症状	訴え率 (%)		P値
	患者群	非患者群	
鼻	77	23	0.033
のど	77	5	<0.001
気道	68	9	0.005
消化器	68	9	0.005
目	64	18	0.086
神経	64	14	0.035
皮膚	64	9	0.012
心理状態	59	5	0.004
筋肉・関節	59	5	0.001
泌尿・生殖器	45	0	0.005

表3 シックハウス症候群患者及び非患者の実態調査結果

属性別	化合物名	患者群(n=22)				非患者群(n=13)			
		個人曝露		室内		個人曝露		室内	
		検出率 (%)	範囲 [*] ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	検出率 (%)	範囲 [*] ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	検出率 (%)	範囲 [*] ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	検出率 (%)	範囲 [*] ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
芳香族 炭化水素	ベンゼン	5	3.2	0		0	0		
	トルエン	95	3.7~41	91	3.7~41	92	3.7~49	92	7.4~48
	エチルベンゼン	32	4.3~13	32	4.2~22	54	4.3~13	69	4.3~13
	キシレン	95	4.3~26	91	4.3~310	85	4.3~26	77	4.3~26
	1,3,5-トリメチルベンゼン	23	4.8~5.0	23	4.9~5.0	8	4.8	8	4.8
脂肪族 炭化水素	スチレン	18	4.2~8.5	9	4.2~34	31	4.2~21	31	4.2~25
	ヘキサン	68	3.4~7.1	45	3.4~7.1	46	3.5	46	3.5~7.0
	オクタン	50	4.6~9.3	55	4.5~4.7	77	4.6~4.7	46	4.6~9.2
	ノナン	77	5.1~16	73	5.1~16	62	5.1~10	46	5.2~10
	デカン	18	5.8~12	14	5.8~12	8	5.7	8	11
テルペン	ウンデカン	50	13~25	45	13~25	38	13~31	46	13~31
	テトラデカン	50	24~720	36	8.1~1400	54	16~32	31	16~24
	-ピネン	32	5.5~160	27	5.5~99	62	5.5~44	69	5.5~66
	リモネン	82	5.4~28	77	5.5~33	85	11~33	85	5.5~33
アルコール	1-ブタノール	14	3.0~6.1	9	6.0~9.1	38	3.0~9.0	38	3.0~12
	ホルムアルデヒド	100	4.8~70	100	4.0~160	100	14~100	100	19~270
	アセトアルデヒド	100	2.8~24	100	1.8~40	100	4.4~200	100	1.6~230
	メチルエチルケトン	59	2.9~38	59	2.9~120	54	2.9~5.8	54	2.9~8.7
	メチルイソブチルケトン	14	4.1~8.2	5	8.2	8	12	15	4.1~20
アルデヒド・ケトン	ノナノール	91	5.7~160	68	5.7~130	77	5.8~120	62	12~80
	トリクロロエチレン	5	5.3	5	11	0		0	
ハロゲン化 炭化水素	パラジクロロベンゼン	41	5.9~18	36	5.8~29	77	6.0~350	77	6.0~720
	酢酸エチル	77	3.5~47	77	3.5~32	85	3.5~28	77	7.1~21
エステル	酢酸ブチル	27	4.7~14	36	4.6~14	46	4.7~9.4	46	4.7~19
	濃度合計値	100	42~930	100	35~1600	100	90~570	100	43~890

* 検出された値についてのみの値

シロアリ駆除が14% (3/22)、仕事で有機溶剤を使用が9% (2/22)、殺虫剤の使用が9% (2/22) などであった。患者群の中で女性が91% (20/22) を占め、過去の調査結果と同様の傾向を示した⁸⁾。患者群の年齢は、29歳以下が14% (3/22)、30~49歳が50% (11/22)、50歳以上が36% (8/22) であった。代表的な症状を次に示す10のグループに分類した⁹⁾: 目(チカチカ、かゆい)、鼻(むずむず、つまる)、のど(ひりひり、かゆい)、気道(せき、たん)、皮膚(湿疹、ちくちく)、神経(頭痛)、心理状態(不眠・いらいら)、筋肉・関節(いたい、ふるえ)、消化器(下痢、吐き気、便秘)、泌尿・生殖器(頻尿、月経痛、帯下)。患者群と非患者群の有症率を比べた場合、目の症状を除き、患者群の方がいずれも有意に高い値を示していた(表2)。また、患者が体調不良の原因と考えている臭いとしては、壁や床の建材、シャンプー・化粧・香水など77% (17/22)、塗料73% (16/22)、殺虫剤、芳香剤68% (15/22)、家具、洗濯洗剤、印刷物64% (14/22)、防虫剤59% (13/22)、消臭剤、電気製品55% (12/22)、エアコンをつけた時、ファンヒーター、汗止めス

プレーなど45% (10/22)、ペット14% (3/22) であった。

パッシブサンプリング法を用いて、シックハウス症候群患者22名、非患者13名のVOCsに対する個人曝露量及び室内VOCs濃度調査を実施した(表3)。ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドがすべての検体から検出され、検出濃度範囲はそれぞれ4.0~270 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、1.6~230 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。次いで高頻度に検出されたのはトルエン(検出率91~95%)で、検出濃度範囲は3.7~49 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。その他、リモネン(検出率77~85%、検出濃度範囲5.4~33 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、酢酸エチル(検出率77~85%、検出濃度範囲3.5~47 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)などが高頻度に検出された。24物質の濃度合計値(以下、「濃度合計値」と略す)は、個人曝露濃度が42~930、室内濃度が35~1600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と、被験者により大きく異なっていた。また、室内濃度が国で定めた室内濃度指針値を超過したのは、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、パラジクロロベンゼン及びテトラデカンが各1件であった。

室内濃度と個人曝露濃度の関連を濃度合計

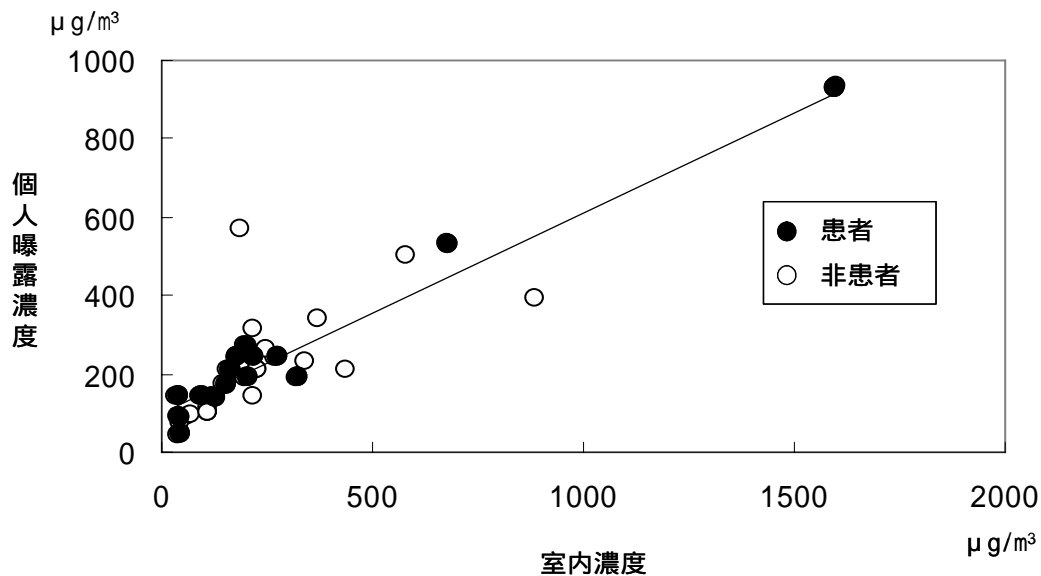


図1 室内濃度と個人曝露濃度の関係

表4 患者群と非患者群の比較

		検出VOCs数 (24物質のうち)			濃度合計値 (µg/m³)		
		平均	最小	最大	平均	最小	最大
個人曝露濃度	患者群	12.2	5	19	210	42	930
	非患者群	12.8	7	18	270	90	570
室内濃度	患者群	11.1	4	20	230	35	1600
	非患者群	12.2	4	19	310	43	890

*, p<0.05

値で比較した結果、高い相関性 ($r=0.873$ 、 $n=31$ 、 $p<0.0001$) が認められ、個人曝露濃度は室内濃度の影響を強く受けていることが明らかとなった(図1)。患者群と非患者群で比較した場合、検出VOCs数は個人曝露濃度、室内濃度ともにほぼ同じであった(表4)。一方、濃度合計値は、室内濃度で患者群の方が非患者群よりも有意 ($p<0.05$) に低く、個人曝露濃度も同様の傾向を示した。その要因の一つとして、患者は日常生活の中でVOCsに対する曝露を避けるための対策を講じていることが考えられた。また、検出VOCs数、濃度合計値と症状、原因となるにおいとの間連については、個人曝露濃度、室内濃度ともに有意な相関は認められなかった(相関係数 $-0.146 \sim 0.021$ 、P値 $0.516 \sim 0.942$)。従って、

今回の調査結果からは、症状の生じる個人曝露濃度及び室内濃度の閾値を集団として明確にするのは困難であると考えられた。

3 患者の追跡調査

今回調査対象とした患者の中で、ビニールやシャンプーなどの臭いに対して非常に敏感で、4、5年ほど前から体調が徐々に悪化してきている1名の患者の追跡調査を実施した。この患者の自宅室内空気中からは、パッシブサンプリング法を用いた測定で、脂肪族炭化水素であるテトラデカンが $1400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 検出されていた。この値は、厚生労働省が示した室内濃度指針値 $330 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の約4倍と非常に高い値であった。また、個人曝露濃度も $720 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と、室内濃度と同様に高い値を示して

表5 患者宅の精密測定結果

属性別	化合物名	気中濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	室内濃度指針値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
芳香族 炭化水素	ベンゼン	2.9	
	トルエン	23	260
	エチルベンゼン	5.1	3800
	キシレン	13	870*
	スチレン	ND	220
	1,3,5-トリメチルベンゼン	ND	
	1,2,4-トリメチルベンゼン	5.1	
	1,2,3-トリメチルベンゼン	2.9	
	1,2,4,5-テトラメチルベンゼン	ND	
	脂肪族 炭化水素	ヘキサン	5.8
2,4-ジメチルペンタン		ND	
2,2,4-トリメチルペンタン		ND	
ヘプタン		40	
オクタン		2.8	
ノナン		4.7	
デカン		5.3	
ウンデカン		5.1	
ドデカン		83	
トリデカン		470	
テトラデカン		190	330
ペンタデカン		4.7	
ヘキサデカン		2.8	
テルペン	-ピネン	ND	
	リモネン	5.3	
アルコール	1-ブタノール	ND	
アルデヒド・ ケトン	ホルムアルデヒド	39	100
	アセトアルデヒド	28	48
	メチルエチルケトン	ND	
	メチルイソブチルケトン	ND	
	ノナナール	19	
	デカナール	7.2	
ハロゲン化 炭化水素	クロロホルム	ND	
	1,2-ジクロロエタン	ND	
	1,1,1-トリクロロエタン	ND	
	四塩化炭素	ND	
	1,2-ジクロロプロパン	ND	
	トリクロロエチレン	ND	
	テトラクロロエチレン	ND	
	クロロジブロモメタン	ND	
	パラジクロロベンゼン	13	240
エステル	酢酸エチル	ND	
	酢酸ブチル	ND	
シロアリ 駆除剤等	ジクロルボス	ND	
	フェノブカルブ	ND	33
	ダイアジノン	ND	0.29
	クロルピリホスメチル	ND	
	フェニトロチオン	ND	
	クロルピリホス	ND	1 (0.1)*
	ピフェントリン	ND	
	ベルメトリン	0.018	
	エトフェンプロックス	ND	

*カッコ内は小児の場合の室内濃度指針値

ND ($\mu\text{g}/\text{m}^3$ 単位) : 2.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 未満

ただし、メチルエチルケトン、酢酸エチル、クロロジブロモメタン、酢酸ブチル、デカナールは6.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 未満、1-ブタノール、ノナナールは14 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 未満、シロアリ駆除剤等は0.005 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 未満。

いた。なお、テトラデカン以外の 23 物質の中で、特に高い値を示すものはなかった。

当該患者宅室内空気中のテトラデカンによる汚染の原因を追求するため、患者宅室内空気中の VOCs の精密測定及びシロアリ駆除剤等のバイオサイドの測定を実施した(表 5)。その結果、脂肪族炭化水素のトリデカン、テトラデカン及びドデカンがそれぞれ 470、190、83 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と、比較的高い濃度で検出された。また、シロアリ駆除剤、殺虫剤、燻蒸剤として使用されているピレスロイド系殺虫剤のペルメトリンが 0.018 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 検出された。

そこで、トリデカン、テトラデカン、ドデカン及びペルメトリンの発生源を調べた結果、以下の事実が判明した。

(1) 患者はゴキブリ駆除のために燻蒸剤及びスプレー式殺虫剤を頻繁に使用している。

(2) トリデカン、テトラデカン及びドデカンは、スプレー式殺虫剤に含まれるケロシンの主成分である。

(3) 患者は部屋を締め切りにすることが多く、換気はあまりしていない。

これらの調査結果を基に、燻蒸剤及びスプレー式殺虫剤を使用した直後の部屋での滞在時間を極力減らすこと、換気を十分に行うことなどを指導した。

4 まとめ

今回、サンプリングポンプを用いない空気中の VOCs 捕集法として、パッシブサンプリング法を確立した。本法により測定可能な 22 物質と、パッシブサンプリング法による測定法がすでに確立しているホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドを加えた計 24 物質について、パッシブサンプリング法でのサンプリングが可能となった。

パッシブサンプリング法を用いて、シックハウス症候群患者 22 名、非患者 13 名の VOCs に対する個人曝露量及び室内 VOCs 濃度調査を実施した。その結果、個人曝露濃度、室内濃度ともに、患者群の方が非患者群よりも低い値を示した。従って、本調査の結果から症状の生じる個人曝露濃度及び室内濃度の

閾値を集団として明確にするのは困難であると考えられた。

テトラデカンの個人曝露及び室内濃度が高い値を示した患者 1 名について、追跡調査を実施した結果、患者宅室内空気中からスプレー式殺虫剤の溶剤ケロシンの主成分であるトリデカン、テトラデカン及びドデカンが比較的高い濃度で検出されるとともに、ピレスロイド系殺虫剤のペルメトリンが検出された。

室内環境中に存在する化学物質とシックハウス症候群における症状との関連は、今回の調査結果も示すように依然として不明な点が多い。従って、今後、VOCs に対する曝露量と健康影響との関連を解明するためには、シックハウス症候群患者等の実態調査を継続し、より多くのデータを集積することが重要と考えられた。

文 献

- 1) 宮島江里子, 相澤好治: シックハウス症候群の概念整理と病態, 臨床免疫・アレルギー科 46(2), 161-164, 2006.
- 2) Hodgson, M.: Indoor environmental exposures and symptoms. Environ. Health Perspect., 110, 663-667, 2002.
- 3) 厚生労働省通知: 平成 14 年 2 月 7 日付け 医薬発第 0207002 号「室内空気中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について」
- 4) Saijo, Y., Kishi, R., Sata, F., Katakura, Y., Urashima, Y., Hatakeyama, A., Kobayashi, S., Jin, K., Kurahashi, N., Kondo, T., Gong, Y. Y. and Umemura, T.: Symptoms in relation to chemicals and dampness in newly built dwellings. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 77, 461-470, 2004.
- 5) Kondo, F., Ikai, Y., Goto, T., Ito, Y., Oka, H., Nakazawa, H., Odajima, Y., Kamijima, M., Shibata, E., Torii, S. and Miyazaki, Y. Serum levels of volatile

organic compounds in patients with sick building syndrome. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 77, 331-337, 2006.

- 6) 辻 清美, 長谷川一夫, 伏脇裕一: 室内空気中のVOC測定用パッシブサンプラーのフィールド試験による評価 神奈川県衛生研究所研究報告, 35, 23-26, 2005.
- 7) 安藤正典, 内山茂久. 平成13年度厚生労働科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)「化学物質過敏症等室内空气中化学物質に

関わる疾病と総化学物質の存在量の検討と要因解明に関する研究」報告書、661-667

- 8) Stenberg B., Wall S.: Why do women report 'sick building symptoms' more often than men? Soc Sci Med, 40, 491-502, 1995.
- 9) 小田島安平. 平成14年度厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)「シックハウス症候群に関する疫学的研究」報告書, 3-17, 2003.

Analysis of volatile organic compounds in indoor air samples using passive sampling: exposure level of sick-house syndrome patients to volatile organic compounds

Fumio KONDO, Mitsugu Yamasaki, Rumiko Hayashi, Takashi Kimura, Shinpei Torii

Volatile organic compounds (VOCs) pose possible health risks that could result from exposure to indoor airborne VOCs as suggested by the causal associations with symptoms of SBS. We established a simple method for measurement of 22 VOCs using passive sampling that is based on free flow of analyte molecules from the sampled medium to a collecting medium. Formaldehyde and acetaldehyde were measured together using previously established method.

Using passive sampling method, we measured VOCs in breathing-zone air and indoor air sampled from 22 sick-house syndrome patients and 13 volunteer controls, and found that the numbers (4 - 20) and levels (35 - 1600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) of detected VOCs varied from sample to sample. The sum of detected VOCs concentrations in both the breathing-zone air and indoor air samples from patients showed lower than in the controls. Therefore, we must consider that it is difficult to identify the responsible VOCs and their breathing-zone air and indoor air levels inducing sick-house syndrome symptoms from the results of this study. Further investigations are needed to evaluate the relationship between exposure to VOCs and sick-house syndrome symptoms.

調 査 研 究

LC-ICP-MS による愛知県の水道原水中ヒ素について

大沼章子、小池恭子、遠山明人

要 旨

愛知県内の水道原水 (n=36) 中のヒ素について、溶存化学形態別存在量を知るために LC-ICP-MS 測定を実施した。

いずれの水道原水からも有機ヒ素のモノメチルアルソン酸 (MMAA)、ジメチルアルシン酸 (DMAA)、アルセノベタイン (AB) は検出されず、検出された無機ヒ素〔ヒ素()、ヒ素()〕濃度の合計である総ヒ素濃度においても水道水質基準 0.01 mg/L を超えるものは存在しなかった。ヒ素()は水道原水の 22.2% (8/36) から検出 (定量下限値 0.1 µg/L) されたが、水源別では表流水 (n=10) や三河地区地下水 (n=7) からは検出されず、尾張地区地下水 (n=19) で検出率 42.1% (8/19) であった。また、ヒ素()は水道原水の 69.4% (25/36) から検出され、水源別の検出率は、表流水 50% (5/10)、地下水 76.9% (20/26)〔尾張地区地下水 94.7% (18/19)、三河地区地下水 28.6% (2/7)〕であった。総ヒ素はヒ素()と同様の検出状況であった。なお、井戸の深さが 100 m 以上の地下水で水道水質基準の 1/10 以上の無機ヒ素が検出される可能性が高いことが判明し、尾張地区地下水に顕著であった。これら尾張地区の地下水は還元的な状況の帯水層ほど、検出された無機ヒ素においてヒ素()のヒ素()や総ヒ素に対する濃度比も高くなることが明らかとなった。

キーワード：LC-ICP-MS、水道原水、ヒ素、愛知県

はじめに

毒物としてのヒ素の歴史は古く、また、和歌山ヒ素カレー事件 (1998 年) や茨城県神栖町における井戸水によるヒ素中毒事件 (2003 年) 等ヒ素による健康危機事例は多い。無機ヒ素化合物では、その酸化数によって毒性が大きく異なる¹⁾。三価の亜ヒ酸〔ヒ素()〕(LD_{50}^{*1} 0.0345 g/kg、 ID_{50}^{*2} 0.0007 mg/mL) は急性毒性が高く、シロアリ駆除剤として一般的である。五価のヒ酸〔ヒ素()〕(LD_{50}

比較データ無¹⁾、 ID_{50} 0.006 mg/mL) は急性毒性こそ高くないが、ヒ素()とともに自然界にあって慢性毒性の原因となっている。一方、有機ヒ素化合物は、人工的に化学兵器や農薬用に製造されているが、自然界にも存在する。一般に自然界に存在する有機ヒ素化合物には、MMAA (LD_{50} 1.8 g/kg、 ID_{50} 1.2 mg/mL)、DMAA (LD_{50} 1.2 g/kg、 ID_{50} 0.32 mg/mL)、AB (LD_{50} 10 g/kg 以上、 ID_{50} 10 mg/mL 以上) 等があるが、ヒ素()やヒ素()ほど毒性は

*1：マウスに対する急性毒性 (50%致死量)

*2：細胞毒性 (50%増殖阻害)

高くなく、AB はほとんど無毒と言われている。このようにヒ素はその化学形態によって毒性が大きく異なるため、健康危機発生時における毒性評価には化学形態別分析が必須である。そこで、平常時のバックグラウンド値の把握を目的に LC-ICP-MS (液体クロマトグラフ - 誘導結合プラズマ - 質量分析計) による愛知県の水道原水中ヒ素の化学形態別分析をヒ素(), ヒ素(), MMAA、DMAA、AB について実施したので、その結果と若干の解析を報告する。

調査方法

1) 対象試料

対象試料は 2003 年度に採取された愛知県内の水道原水 36 件で、Fig.1 に採取場所と地下水の井戸の深さを図示した。水源の内訳は表流水が 7 件、伏流水が 3 件、残り 26 件は地下水であった。試料は、採取後即日実験室に運搬されたもので、濁りのある試料については 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過処理を実施し、LC のオートサンプラー用バイアルに移してセプタム付の栓で密栓して速やかに測定した。なお、速やかに測定できなかった場合はバイアルを冷蔵庫 (4) 保存と

し、遅くとも数日以内には LC-ICP-MS にて測定した。なお、定量下限値は、0.1 μg/L とした。

2) 測定機種及び測定条件

ICP-MS 装置 : Agilent 7500i (測定質量数 m/z:75)

LC 装置 : Agilent 1100 Series

本カラム : Anion exchange columns G1836A #101

ガードカラム : Anion exchange columns G1836A #102

移動相 : 2.0 mM PBS/0.2 mM EDTA pH6.0 (NaOH にて調整)

流量 : 1.0 mL/min カラム温度 : 室温

注入量 : 0.05 mL 分析時間 : 11.5 min

結果と考察

1. 水源別水道原水中ヒ素

愛知県の水道の現状について、一日最大給水量 (2004 年 3 月末現在) を基に Table 1 にまとめた。愛知県内の水道水源は多くを河川水に依存しており、水源別に見ると木曾川、長良川、矢作川、豊川を水源とする県企業庁供給水を含む表流水 (以降、含伏流水) からの給水が 87.0% で、地下水からの給水は 13.0% であった。今回調査した水道原水は、Fig.1 に示した水源位置からも明らかなよ

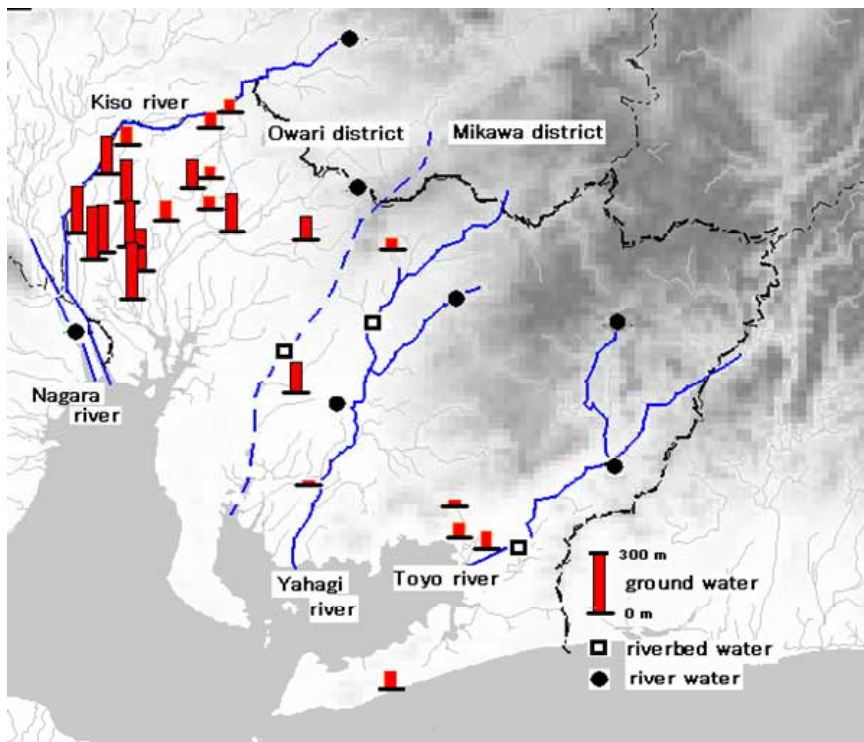


Fig.1 Sampling points with the depth

うに県内の水源の水平分布を大まかに反映したものであると考えられた。なお、地下水を取水する井戸の深さを Table 2-1、2 にも示したが、尾張地区地下水 (n=19) が 65-300 m で平均 175 m であったのに対して三河地区地下水 (n=7) では 22-165 m で平均 79 m であり、尾張地区地下水の方が深い帯水層から取水している傾向も明らかであった。

愛知県内の水道原水中ヒ素の化学形態別分析結果を Table 2-1 に、そして、それらを統計処理した結果を Table 2-2 に、水源別に示した。Table 2-1、2 では、MMAA、DMAA、AB の 3 種の有機ヒ素化合物をまとめて有機ヒ素としたが、有機ヒ素化合物はいずれの原水からも検出されなかった。ヒ素 () は水道原水の 22.2 % (8/36) から検出され、最大値は 3.1 µg/L、平均値 0.4 µg/L (中央値 0.1 µg/L 未満) であった。水源別のヒ素 () の検出状況は、表流水や三河地区地下水からは検出されず、検出されたのは尾張地区地下水 8 件のみで検出率は 42.1 % (8/19) であった。これらヒ素 () 検出の尾張地区地下水からは同時にヒ素 () も検出された。ヒ素 () は水道原水の 69.4 % (25/36) から検出され、最大値は 8.3 µg/L、平均値 1.2 µg/L (中央値 0.2 µg/L) であった。水源別のヒ素 () の検出状況は、表流水 50 % (5/10)、地下水 76.9 % (20/26) [尾張地区地下水 94.7 % (18/19)、三河地区地下水 28.6 % (2/7)] で、ヒ素 () が尾張地区地下水のみから検出されたのに比してヒ素 () は表流水及び両地区地下水から検出された。総ヒ素は、ヒ素 () とヒ素 () の両方を検出した水道原水 (8 件) にヒ素 () のみを検出した水道原水 (17 件) を加えた水道原水の 69.4 % (25/36) から検出され、最大値は 8.3 µg/L、平均値 1.6 µg/L (中央値 0.2 µg/L) であった。したがって、水源別の総ヒ素の検出状況はヒ素 () の検出状況に一致した。総ヒ素濃度を

水源別に見ると、表流水では最大値 0.4 µg/L、平均値 0.1 µg/L (中央値 0.1 µg/L) と低く、地下水では最大値 8.3 µg/L、平均値 2.1 µg/L (中央値 0.6 µg/L) と表流水に比して中央値で 6 倍高い傾向にあった。しかし、この地下水については、三河地区地下水では最大値 0.1 µg/L、平均値 0.1 µg/L 未満 (中央値 0.1 µg/L 未満) と表流水よりもむしろ低い傾向にあった。一方、尾張地区地下水では 8.3 µg/L、平均値 2.9 µg/L (中央値 2.1 µg/L) と三河地区地下水や表流水に比して中央値で 20 倍以上高い傾向にあった。

以上述べたように、愛知県の水道原水では、いずれの原水からも有機ヒ素は検出されず、総ヒ素においても水道水質基準 (ヒ素及びその化合物として) の 0.01 mg/L を超えるものは存在しなかった。ここで、井戸の深さ別ヒ素濃度を見るために、これら水道原水中ヒ素の化学形態別分析結果のうち不検出の有機ヒ素を除いた測定結果について、表流水も深さを 0 m としてその他の伏流水や地下水と共に深さ別に図示した。Fig.2-1 は全ての水道原水について、Fig.2-2 は尾張地区地下水について、Fig.2-3 は三河地区地下水についてプロットした。Fig.2-1 で明らかなように、愛知県内の水道原水では、井戸の深さが 100 m 以上の地下水で水道水質基準の 1/10 以上の無機ヒ素が検出される可能性が高いことが判明した。なお、このことは、Fig.2-2 で明らかなように尾張地区地下水に顕著であった。一方、三河地区地下水については、Fig.2-3 における 100 m 以上のプロットが少ないために明確ではないが、すでに述べたようにヒ素 () の検出率が 0 % で、ヒ素 () の検出率 (尾張地区の 1/3) も検出濃度 (中央値で尾張地区の 1/20) も低いことから、その可能性が低いことが予測された。

Table 1 Present condition of water supply in Aichi prefecture (as of March, 2004)

water resource	
water that Aichi Prefecture supplies	44.8 %
surface water	39.2 %
riverbed water	3.0 %
ground water	13.0 %

2. 単一ストレーナーを持つ地下水を水源とする
水道原水中ヒ素

Table 2-1 で示したように、一般に地下水は井戸の深さが明確に示されている場合、複数以上の帯水層を貫通して掘られている場合は埋設管に複数以上のストレーナーを設置して複数の帯水層から地下水を汲み上げている場合が多い。地下水の賦存状況やそれに伴う水質成分は帯水層毎に異なることが予測される。

今回調査した地下水のうち明らかに単一ストレー

ナーを持つ水道原水について、総ヒ素の測定結果を Fig.3 に採取場所、井戸コード(当所水質データベースにて使用)と共に棒グラフで表した。三河地区については水源が地域的に散在しており調査件数も少ないこと及びヒ素濃度も定量下限値以下であるため、ここからの議論は明らかに単一ストレーナーを持つ尾張地区地下水(n=8)を対象とする。一般にヒ素()はヒ素()より還元的な条件下に存在することは化学的な事実である²⁾ことから、まず、それらのうち、井戸の深さが100 m

Table 2-1 Concentrations of arsenic according to chemical form of raw waters for water supply in Aichi prefecture

water resource	code	organic As* (μg/L)	As() (μg/L)	As() (μg/L)	total As (μg/L)	depth (m)	strainer (m)
surface water (including riverbed water)							
	A199-01	<0.1	<0.1	0.4	0.4	-	Kiso river
	NAGA-02	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	Nagara river
	E104-05	<0.1	<0.1	0.2	0.2	-	Jagahora river
	M112-17	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	Yahagi river
	X201-01	<0.1	<0.1	0.1	0.1	-	Tomoe river
	Y201-01	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	Toyo river
	T211-01	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	Tuge river
	B102-01	<0.1	<0.1	0.3	0.3	0	riverbed water of Toyo river
	L111-25	<0.1	<0.1	0.1	0.1	12	riverbed water of Yahagi river
	K119-02	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	1	riverbed water of Sakai river
ground water in Owari district							
	R146-01	<0.1	<0.1	0.1	0.1	65	16-25,25-35,53-60
	V163-01	<0.1	<0.1	0.2	0.2	70	31-66
	P106-09	<0.1	<0.1	0.2	0.2	70	unknown
	P175-13	<0.1	<0.1	0.2	0.2	80	unknown
	D242-01	<0.1	<0.1	1.6	1.6	93	unknown
	V162-01	<0.1	2.0	4.8	6.8	100	54-90
	E104-09	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	126	unknown
	P332-03	<0.1	<0.1	0.3	0.3	150	unknown
	I110-01	<0.1	1.1	2.5	3.6	150	128-140
	Q139-04	<0.1	1.0	1.7	2.7	200	103-110,15-176
	G113-17	<0.1	0.8	0.1	0.9	200	56-68,80-110,138-168,180-186
	S173-04	<0.1	<0.1	8.3	8.3	220	unknown
	I155-01	<0.1	1.4	1.5	2.9	220	152-158,164-176
	I167-04	<0.1	3.1	3.2	6.3	246	200-230
	I110-09	<0.1	1.3	0.7	2.0	250	230-240
	I253-01	<0.1	<0.1	2.1	2.1	250	212-226
	I174-01	<0.1	<0.1	7.3	7.3	252	238-246
	I110-03	<0.1	2.1	0.7	2.8	280	262-272
	I170-14	<0.1	<0.1	7.3	7.3	300	unknown
ground water in Mikawa district							
	N176-03	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	22	18
	H147-01	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	30	20-23
	L214-03	<0.1	<0.1	0.1	0.1	60	unknown
	H129-01	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	82	53-73
	Z243-01	<0.1	<0.1	0.1	0.1	97	unknown
	h160-03	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	100	unknown
	K136-07	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	165	62-67,94-98,111-107

Table 2-2 Statistic of measurement results

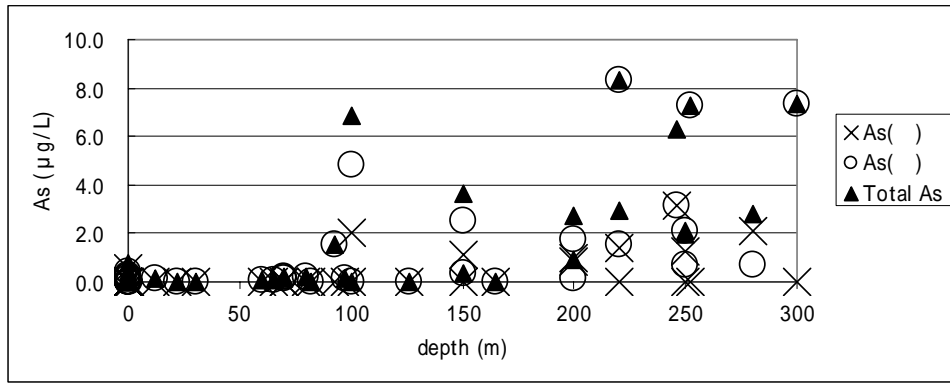
water resource	code	organic As*	As()	As()	total As	depth (m)
total water resource						
	n	36	36	36	36	-
	max ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	3.1	8.3	8.3	-
	min($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-
	av ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	0.4	1.2	1.6	-
	median ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	0.2	0.2	-
	detection(%)	0.0	22.2	69.4	69.4	-
surface water (including riverbed water)						
	n	10	10	10	10	-
	max ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	0.4	0.4	-
	min($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-
	av ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	0.1	0.1	-
	median ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	0.1	0.1	-
	detection(%)	0.0	0.0	50.0	50.0	-
total ground water						
	n	26	26	26	26	26
	max ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	3.1	8.3	8.3	300
	min($\mu\text{g/L}$)	<0.1	0.0	0.0	0.0	22
	av ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	0.5	1.7	2.1	149
	median ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	0.0	0.3	0.6	138
	detection(%)	0.0	30.8	76.9	76.9	-
ground water in Owari district						
	n	19	19	19	19	19
	max ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	3.1	8.3	8.3	300
	min($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	65
	av ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	0.7	2.3	2.9	175
	median ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	1.5	2.1	200
	detection(%)	0.0	42.1	94.7	94.7	-
ground water in Mikawa district						
	n	7	7	7	7	7
	max ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	0.1	0.1	165
	min($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	22
	av ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	79
	median ($\mu\text{g/L}$)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	82
	detection(%)	0.0	0.0	28.6	28.6	-

* : including Monomethylarsonic acid, Dimethylarsinic acid, Arsenobetaine

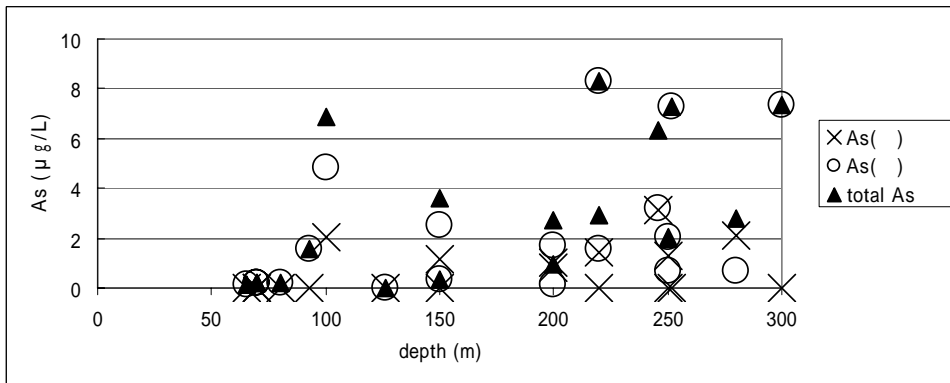
以上でヒ素()が検出されているにもかかわらずヒ素()が検出されていない地下水2件(1253-01、1174-01)を除いた地下水6件について、以下の考察を試みた。

単一ストレナーを持つ尾張地区地下水6件について、井戸の深さに対するヒ素()濃度、ヒ素()濃度、総ヒ素濃度、及びヒ素()/ヒ素()の濃度比、ヒ素()/総ヒ素の濃度比、ヒ素()/総ヒ素の濃度比との相関を見た。その結果、井戸の深さに対するヒ素()/ヒ素()の濃度比は相関係数0.873(危険率5%)で、同様にヒ素()/総ヒ素の濃度比は相関係数0.948(同1%)及びヒ素()/総ヒ素の濃度比は相関係数-0.948(同

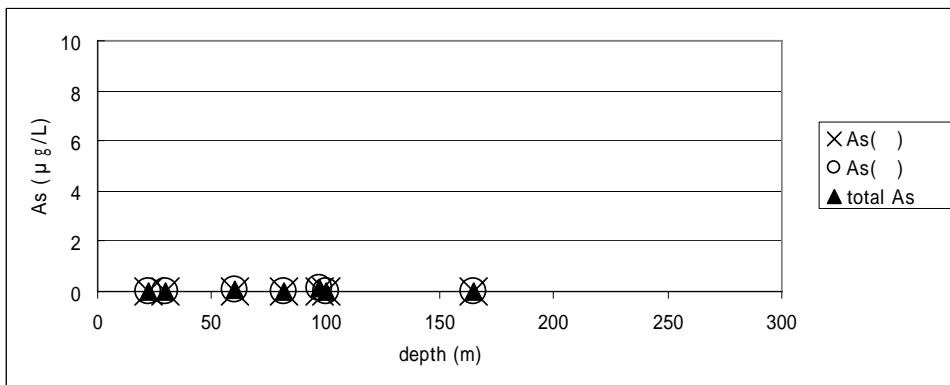
1%)で有意な相関が認められた。総ヒ素濃度はヒ素()とヒ素()の濃度の合計値であるため、後者2つの相関係数の絶対値は一致した。そこで、ヒ素()/総ヒ素の濃度比の場合は省略して、Fig.4に井戸の深さを横軸に示し、ヒ素()/ヒ素()の濃度比、ヒ素()/総ヒ素の濃度比を縦軸にプロットした。Fig.4で明らかなように、これら単一ストレナーを持つ尾張地区地下水は、井戸の深さが深くなるほどヒ素()の総ヒ素に占める割合が高くなり、深い帯水層ほど還元的な状況にあると考えられた。また、当所の水質データベースを活用して、今回の調査結果や井戸の深さに対する他の化学成分等(水温、pH、電気伝導率、



1) Total water resources



2) Ground waters in Owari district



3) Ground waters in Mikawa district

Fig. 2 Concentrations of arsenic (), arsenic () and total arsenic according to the depth of the wells

蒸発残留物、過マンガン酸カリウム消費量、アンモニウムイオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、フッ素イオン、塩化物イオン、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、炭酸水素イオン、リン酸水素イオン、硫酸イオン、メタケイ酸)との相関を見た。それらの結果について、有意な相関(危険率5%以下)を示した項目のみに着目して、相関係数の抜粋を

Table 3 に示した。Table 3 で明らかなように、ヒ素()について総ヒ素及びpH と正の相関(危険率5%)が認められた。ヒ素()と総ヒ素については、両者間及びナトリウムイオンやリン酸水素イオンといずれも正の相関(危険率5%以下)が認められ、過マンガン酸カリウム消費量とは負の相関(危険率1%)が認められた。すでに当所の調査によって尾張地区の地下水ではリン酸が還元的

な条件下で再溶出してくることは明らかにしており³⁾、ここにおいても特にリン酸水素イオンとの正の相関が認められたことによって、単一ストレーナーを持つ尾張地区のこれら地下水が還元的な状況にあることが確認された。したがって、前述のこととあわせると、還元的な状況の帯水層ほどヒ素()や総ヒ素の濃度も高いことが明らかとなり、ヒ素()のヒ素()や総ヒ素に対する濃度比も高くなることが明らかとなった。

しかし、これら無機ヒ素とその他溶存成分等による地下水の解析においては、帯水層毎の地質や水の賦存状態も重要である。ここからは、明らかに単一ストレーナーを持つ尾張地区地下水(n=8)のうち、一旦議論の外においた2地下水(I253-01、I174-01)も加えて議論する。Fig.5-1に、単一ストレーナーを持つ尾張地区地下水(n=8)の主成分組成を鍵座標図上にプロットし、さらに、Fig.5-2に総ヒ素濃度も鍵座標図上の相当位置に棒グラフで表した。鍵座標図は、水の主成分から水質組成の違いを見ることに有用である。V163-01はストレーナーが31-66 mと比較的浅いところにあつて鍵座標図上で表流水的水質組成を示しており、総ヒ素濃度も0.2 µg/Lと低かった。V162-01はスト

レーナーが54-90 mで鍵座標図上(位置)からは地下水が接する地質(粘土層)からの溶存物を含んでいることが考えられ、総ヒ素濃度も6.8 µg/Lであった。鍵座標図上[位置 ()]で典型的なナトリウム・カルシウム-炭酸水素塩型の水質組成を示すI110-01、I110-09、I110-03は地図上も殆ど同一の採取場所であった。これらのストレーナー位置は128-140 m、230-240 m、262-272 mと順次深くなっていたが、総ヒ素濃度は3.6 µg/L、2.0 µg/L、2.8 µg/Lとほぼ同様な値を示していた。そして、これらのヒ素()/総ヒ素の濃度比は、0.31、0.65、0.75と順次大きくなっていった。したがって、これらの地下水はストレーナー位置が深いほど還元的な状態にあることは明らかであったが、地下水としてはまだ進化の途上であり、さらに地下水が接する地質(粘土層)とのイオン交換が進めば最終的にはI167-04が示すようなナトリウム-炭酸水素塩型(鍵座標図位置)の進化の進んだ地下水の水質組成を示すようになることが予測された。また、I167-04はストレーナー位置が200-230 mの深さにあつて少なくともI110-09やI110-03よりも浅く、地層が南西方向に傾斜している尾張地区においてそれ

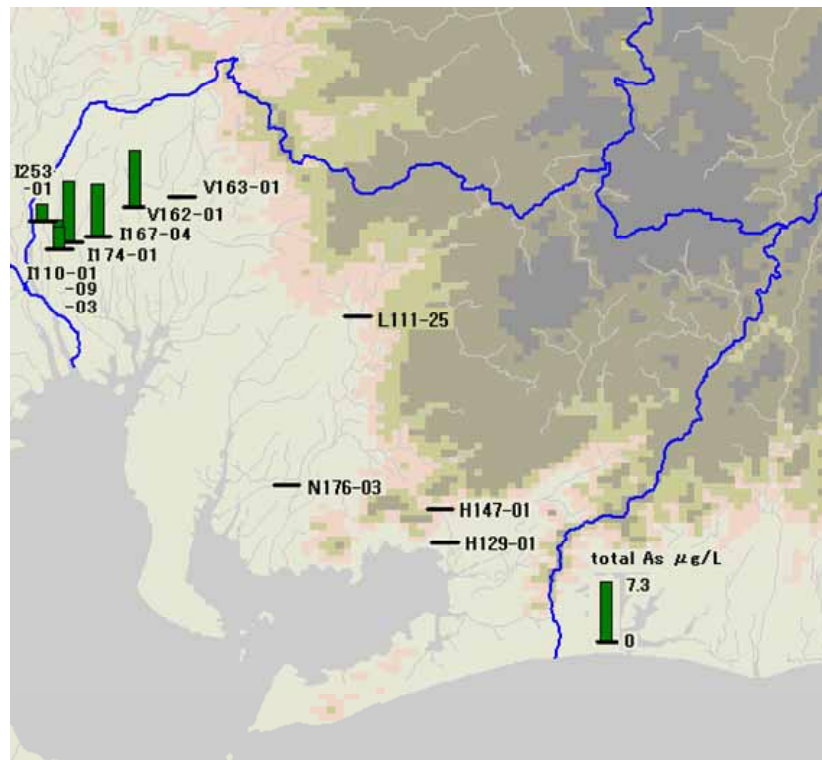


Fig.3 Total As concentrations in ground waters with single strainer

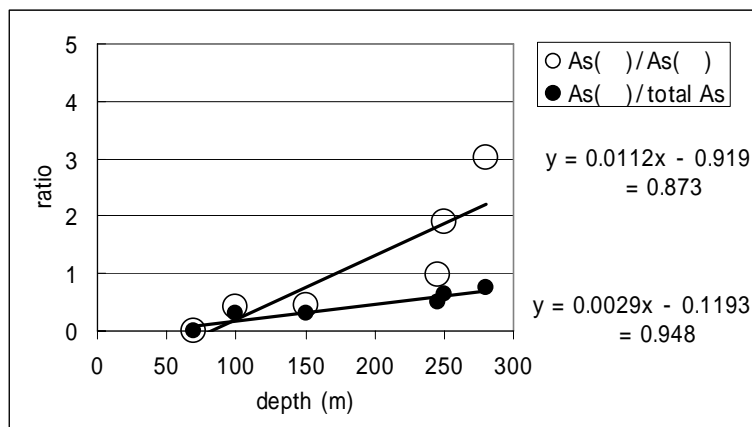


Fig.4 Mutual concentration ratio between arsenic (), arsenic () and total arsenic for six ground waters with single strainer in Owari district

Table 3 Correlation coefficients of inorganic arsenic and another components with six ground waters with single strainer in Owari district (Only the item with the correlation was excerpted)

	As()	As()	total As	PH	KMNO ₄ consumption	Na	HPO ₄
depth	0.606	-0.237	0.084	0.714	0.688	-0.007	0.205
As()	1.000	0.571	0.816*	0.884*	-0.516	0.675	0.770
As()	0.571	1.000	0.940**	0.483	-0.980**	0.812*	0.866*
total As	0.816*	0.940**	1.000	0.706	-0.983**	0.851*	0.929**

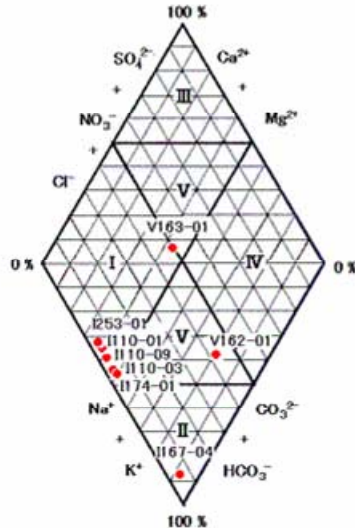
* : Level of significance is 5 %

** : Level of significance is 1 %

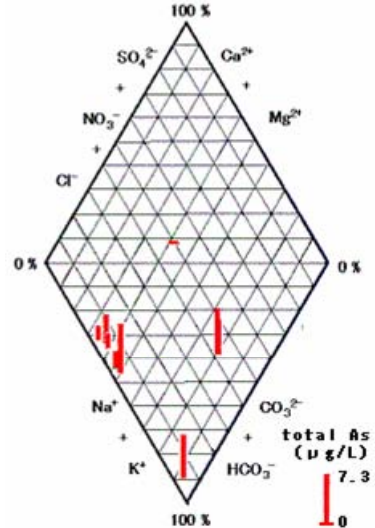
らの2井戸より北東部に位置しながら進化の進んだ地下水の水質組成を示すことは、取水している帯水層の水の賦存状態の違いによるものと推測された。すなわち、濃尾平野南部に位置する尾張地区の地下水は、主に第一帯水層(第一礫層) 第二帯水層(第二礫層)に賦存するが、その他さらに第三~第七帯水層も存在する^{4, 5)}。主な地下水の流れとしては、木曾川が長野県や岐阜県の山間部から初めて愛知県に流入する犬山扇状地において伏流し涵養源となった西南方向への流れ、岐阜県大垣市(大垣自噴帯)方面からの南南東から南方向への流れがある。これらの地下水の流れに加えて、この地域の断層(北西から南東方向に走る岐阜-一宮線、大藪-津島線、大垣-今尾線、木曾岬線、木曾岬線に直交する弥富線⁶⁾)の存在が、地下水の水質に影響を与えているものと推測された。したがって、一旦議論の外においた2地下水、I253-01とI174-01はナトリウム・カルシウム-炭酸水素塩型の水質組成を示すが、ストレーナー

位置が212-226 m、238-246 mと深いにもかかわらず、総ヒ素濃度が2.1 µg/L、7.3 µg/Lに対してヒ素()が検出されず全てヒ素()であったことは、少なくとも他のナトリウム・カルシウム-炭酸水素塩型のI110-01、I110-09、I110-03やナトリウム-炭酸水素塩型のI167-04とはヒ素の溶存状態が異なっており興味深い。しかし、今回の調査ではこれ以上の解析は困難であった。

なお、水道原水以外の地下水については、愛知県環境部によって環境基準(水道水質基準と同じ0.01 mg/L)に基づく監視がなされており、その監視測定結果が年度毎に公表されている⁷⁾が、環境基準を超える地下水も存在した。また、当所水質データベースにおける地下水中ヒ素濃度の最高値は、稲沢市大塚町の専用水道の0.055 mg/L(1977年調査)であり、1992年の水道法改正以前の水道水質基準0.05 mg/Lをも超えるものであった。これら基準値を超えて検出された地下水については、その原因が人為的なものか、自然由来によるもの



5-1) Key diagram with the code



5-2) Key diagram with total arsenic concentration

Fig.5 Key diagram and total arsenic concentrations for ground waters with single strainer in Owari district

かについての議論もなされた。この場合、自然由来のヒ素の起源については、地史的に新生代第四紀洪積層熱田層上部には御嶽山の火山活動によって放出された浮石が含まれていたことによる火山由来、または、これより古い洪積層熱田層下部が熱田海進によって海成堆積層であったことによる海成層由来が議論されている。ちなみに、第一礫層は熱田層上部の上層に埋没段丘群を挟んで存在し、第二礫層は熱田層下部の直下に存在するが、地下水の涵養源や流れの違い、さらに断層の存在によって帯水層間の相互影響（地下水の混合）も推測され、それらの議論を困難にしているものと考えられた。したがって、本調査結果も併せて、尾張地区地下水においては、今後、個別の帯水層に着目した水質調査も必要であると考えられた。

まとめと今後の課題

ヒ素はその化学形態によって大きく毒性が異なるため、愛知県内の水道原水についてヒ素の化学形態別存在量を知るために LC-ICP-MS 測定を実施した。

水道原水 (n=36) について、いずれの水源からも有機ヒ素の MMAA、DMAA、AB は検出されず、検出された無機ヒ素〔ヒ素()、ヒ素()〕濃度の合
なると考えているが、今後とも、地下水の安全と保全を確保するためには、その他微量元素濃度

計である総ヒ素濃度においても水道水質基準の 0.01 mg/L を超えるものは存在しなかった。ヒ素()は水道原水の 22.2% (8/36) から検出し、水源別の検出(0.1 µg/L 以上)状況は、表流水 (n=10) や三河地区地下水 (n=7) からは検出されず、尾張地区地下水 (n=19) で検出率 42.1% (8/19) であった。また、ヒ素()は水道原水の 69.4% (25/36) から検出し、水源別の検出状況は、表流水 50% (5/10)、地下水 76.9% (20/26)〔尾張地区地下水 94.7% (18/19)、三河地区地下水 28.6% (2/27)〕であった。総ヒ素はヒ素()と同様の検出状況であった。なお、井戸の深さが 100 m 以上の地下水で水道水質基準の 1/10 以上の無機ヒ素が検出される可能性が高いことが判明し、尾張地区地下水に顕著であった。これら尾張地区の地下水は還元的な状況の帯水層ほど、検出された無機ヒ素においてヒ素()のヒ素()や総ヒ素に対する濃度比も高くなることが明らかとなった。

愛知県内には水道水質基準や環境基準の 0.01 mg/L を超えるヒ素濃度の地下水も存在し、特に人工的な汚染が認められた場合以外は、ヒ素の起源について多くその地下水が賦在する地質に求められてきた。本調査結果もそうした場合や健康危機発生の場合には、それらの解析や対応の一助に等更なる水質データの蓄積とそれらを活用した地域別帯水層別地下水情報解析が必要と考えられる。

文 献

- 1) 湊 秀雄監修、日本地質学会環境地質研究委員会編：地質環境と地球環境シリーズ 4 砒素をめぐる環境問題 自然地質・人工地質の有害性と無害性、p.43、東海大学出版会、東京、1998
- 2) 湊 秀雄監修、日本地質学会環境地質研究委員会編：地質環境と地球環境シリーズ 4 砒素をめぐる環境問題 自然地質・人工地質の有害性と無害性、p.108、東海大学出版会、東京、1998
- 3) 富田伴一、茶谷邦男、加賀美忠明、大沼章子、莊加泰司、森田登喜子、浜村憲克：愛知県尾張地区の地下水中のリン酸濃度について、愛知衛所報、27、9-11、1976
- 4) 名古屋大学理学部地球科学教室 小穴研究室：濃尾平野の地下水、11、愛知県工場誘致委員会、1961
- 5) 愛知県環境部：地盤沈下の実態とその対策に関する調査研究報告 第 7 報 昭和 55 年度、23-27、1981
- 6) <http://www.jishin.go.jp/main/koufu/98/aichi.htm>：愛知県の活断層調査【岐阜 - 一宮断層帯及び養老 - 桑名 - 四日市断層帯に関する調査】、愛知県総務部消防防災対策室
- 7) <http://kankyojoho.pref.aichi.jp/Download/Download/tyosa/mizu/17/mizuh17-4.pdf>：平成 17 年度公共用水域及び地下水の水質調査結果について、地下水調査結果、平成 10 年度分より愛知県 HP に掲載

Arsenic Concentrations in Raw Waters for Water Supply in Aichi Prefecture using LC-ICP-MS

Shoko Ohnuma, Yasuko Koike , Akito Thoyama

We measured arsenic (As) concentrations according to chemical form in raw waters for water supply in Aichi Prefecture using LC-ICP-MS.

Neither monomethylarsonic acid (MMAA), dimethylarsinic acid (DMAA), nor arsenobetaine (AB) of organic As were detected from all raw waters for water supply (n=36), and total As detected as As () and As () did not exceed the water quality standard for drinking water (0.01 mg/L). As () was detected by 22.2 % (8/36) of all raw waters for water supply (detection limit was 0.1 µg/L). According to the water source, As () was detected by 0 % of surface waters (n=10) and ground waters in Mikawa district (n=7) and by 42.1 % (8/19) of ground waters in Owari district (n=19). As () was detected by 69.4% (25/36) of all raw waters for water supply. According to the water source, As () was detected by 50 % (5/10) of surface waters and 76.9 % (20/26) of ground waters [94.7 % (18/19) in Owari district and 28.6 % (2/7) of Mikawa district]. The detection situation of total As was similar to As (). It turned out that the possibility that inorganic As was detected by 1/10 or more of the water quality standard for drinking water in the ground waters of 100 m or more in depth of the well was high, and it was remarkable in the ground waters in Owari district. It was proved that the concentration ratio of As()/As () and As()/total As of these ground waters in Owari district grew by being in reduced condition with aquifer.

調 査 研 究

水中ヒ素化学形態別分析における試料の保存について

大沼章子、小池恭子、遠山明人

要 旨

5種[モノメチルアルソン酸(MMAA)、ジメチルアルシン酸(DMAA)、アルセノベタイン(AB)、ヒ素()、ヒ素()]混合ヒ素標準液を添加した試料(精製水、河川水、地下水)及び無添加の採取直後の実試料(井戸水)について、6通りの保存方法(室温放置、冷蔵保存、冷凍保存にEDTA添加の有無)による経時的な濃度変化をLC-ICP-MSによって2か月間測定した。

添加した有機ヒ素のMMAA、DMAA、ABは、いずれの試料及びいずれの保存方法においても測定バラツキを除けば保存実験中の濃度変化がなく、安定であった。一方、無機ヒ素のヒ素()とヒ素()は、主にヒ素()のヒ素()への酸化現象が数%から100%の範囲でいずれの試料及びいずれの保存方法においても見られた。この現象が顕著だったのはEDTA添加精製水以外の室温放置した全試料、それに保存方法とは関係なく地下水及びヒ素標準液無添加だが無機ヒ素を含有した井戸水(ヒ素の 価と 価が3:1の濃度比で混在)の場合であった。また、この現象が弱く認められたものは、EDTA添加精製水及び冷蔵保存の精製水と河川水であった。

したがって、水の化学形態別分析用ヒ素試料は、保存することなく速やかに測定することが原則であることが確認されたが、検討した6通りの保存方法では、河川水のように比較的空氣に接触して存在する酸化的な試料では冷蔵保存が有効であることが明らかとなった。また、EDTA添加は、精製水の室温保存では顕著に有効であり、また、井戸水の室温保存や冷蔵保存においても、EDTA無添加に比べて相対的な有効性が認められた。

なお、冷凍保存の有効性も示唆されたが、今回の実験では凍結(氷結)時から解凍時まで主に酸化を促進する何らかの化学作用の発現や保存容器破損のトラブル発生もあり、確認できなかった。

キーワード : LC-ICP-MS、MMAA、DMAA、AB、As()、As()、保存方法、経時変化

はじめに

一般に、水中のヒ素測定用試料の保存は酸性下で保存される。水道法¹⁾では、試料1Lに硝酸10mLを添加して保存し、速やかに試験できない場合は、冷暗所に保存し、1か月以内に試験することとしている。ヒ素測定法については、フレームレス-原子吸光光度計による一斉分析法、誘導結合プラズマ-質量分析装置による一斉分析法、水素化物発生-原子吸光光度計法、水素化物発生-誘

導結合プラズマ発光分析法を採用している。しかし、2003年茨城県神栖町で発生した旧日本軍の毒ガス成分関連事件など健康危機管理上の緊急時においては、ヒ素そのものの測定に加え迅速な化学形態別分析も必要となるため、液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ-質量分析(LC-ICP-MS)法による測定が有効である。この場合、LC部にイオン交換樹脂を用いるため、酸性度の違いにより保持時間が異なる。また、例えばヒ素()標準液の

1 %硝酸溶液の注入では 10 µg/L で 7.2 分、50 µg/L で 8.3 分、100 µg/L で 9.4 分と同じ酸濃度であっても高濃度のピーク程保持時間が長くなる傾向にあった。したがって、ICP-MS 検出器部でヒ素の測定質量数 ($m/z=75$) を限定したとしても、保存のための酸添加は正確な同定ができなくなる場合があると考えられる。また、試料の pH を、LC-ICP-MS に注入可能な pH に調製することも化学形態別分析では問題となることが考えられる。

そこで、水中ヒ素の化学形態別分析は検体採取後速やかに実施することが原則である²⁾が、実際には速やかに測定できない場合もあることが予測される。ここでは自然界に存在する 5 種類のヒ素化合物〔MMAA、DMAA、AB、ヒ素()、ヒ素()〕を標準添加した精製水、河川水、及び地下水について、保存方法の違いによる経時変化を追った。また、ヒ素含有井戸水について、混合ヒ素標準液を添加することなく採取直後からの保存方法による経時変化を追った。

実験方法

1. 水試料の保存方法

水中ヒ素の化学形態分析における試料の保存方法については文献的にも特に注目すべき記載はなかったが、LC-ICP-MS による化学形態分析時に鉄を代表とする遷移金属のマスクングを目的に EDTA・2Na を使用していた事例^{3, 4)}があった。そこで、以下に示した 3 つの保存温度条件について、EDTA 添加の有無による経時変化の差異について検討した。

保存容器：LC 用オートサンプラーバイアル
(容量 2 mL)

保存条件

保存方法	保存温度	EDTA・2Na	備考
室温放置	室温 (25 ~ 30)	無添加	特に遮光なし
		0.2 mM* になるように添加	
冷蔵保存	4 (冷蔵庫)	無添加	暗所
		0.2 mM* になるように添加	
冷凍保存	-20 (フリーザー)	無添加	暗所
		0.2 mM* になるように添加	

* LCの移動相液濃度と同じ濃度にした。

2. 保存期間と測定頻度

保存期間は 2003 年 6 月 25 日 ~ 8 月 27 日の 2 ヶ月間で、1 ~ 2 週間に 1 回測定。

3. 測定条件

ICP-MS 装置：Agilent 7500i

LC 装置：Agilent 1100 Series

本カラム：Anion exchange columns G1836A #101

ガードカラム：Anion exchange columns G1836A #102

移動相：2.0 mM PBS/0.2 mM EDTA pH6.0 (NaOH にて調整)

流量：1.0 mL/min カラム温度：室温

注入量：0.05 mL 分析時間：11.5 min

なお、クロマト図を Fig.1 に、検量線を Fig.2 に示した。定量下限値は 0.1 µg/L とした。

4. ヒ素の化学形態別標準液の調製

ヒ素の化学形態別標準原液を下記に示した。LC 移動相液にて原液を 100 倍に希釈して 5 種混合ヒ素標準液 10 mg/L を作製し、LC-ICP-MS 測定時の検量線用標準液 10、50、100 µg/L の調製や、添加濃度各々 10 µg/L の保存試料の調製に使用した。

モノメチルアルソン酸標準原液(1.0 mg/mL)

：トリケミカル研究所製メチルアルソン酸

($\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$, $\text{MW}=140$, $\text{As}\%=53.6\%$) 37.3 mg

を秤取り、LC 移動相液を用いて 20 mL とする。

ジメチルアルシン酸標準原液(1.0 mg/mL)

：和光純薬製カコジル酸ナトリウム

($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MW}=214.02$, $\text{As}\%=35.0\%$)

57.1 mg を秤取り、LC 移動相液を用いて 20 mL とする。

アルセノベタイン標準原液(1.0 mg/mL)

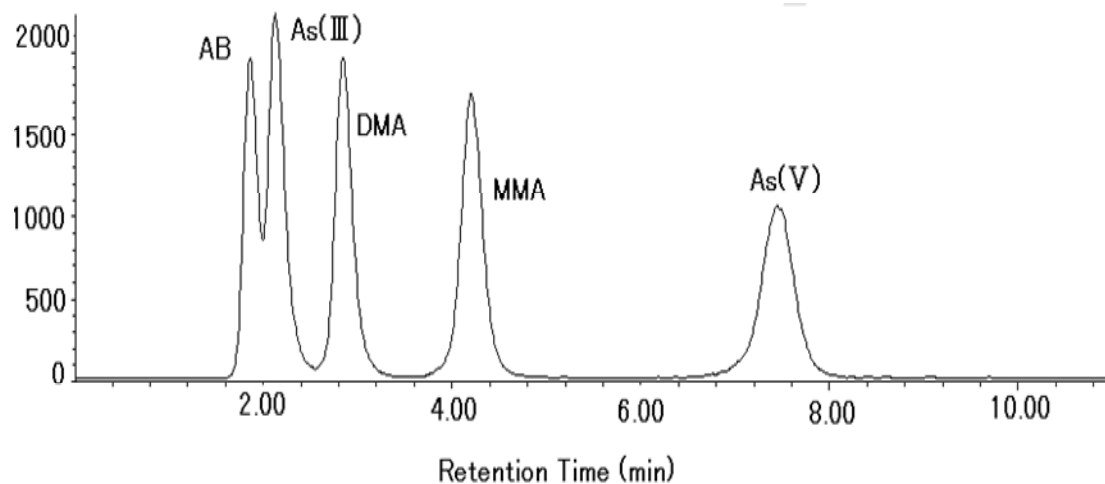
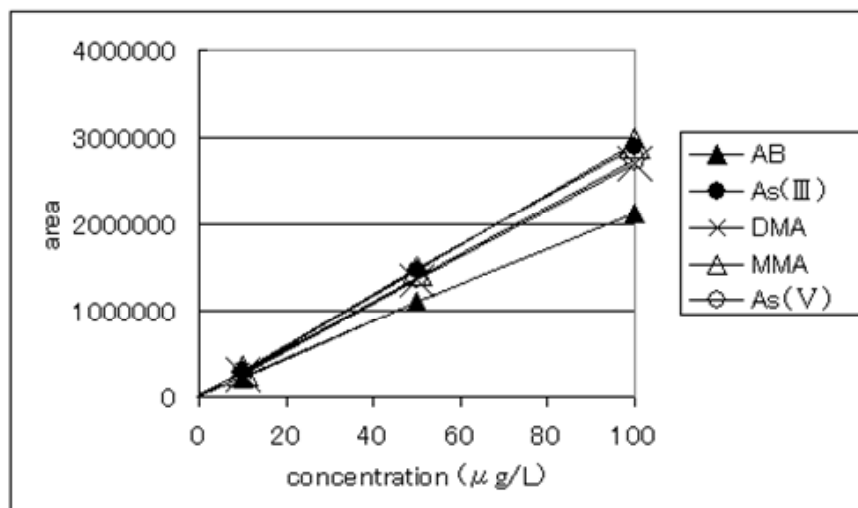


Fig.1 Chromatogram with five chemical forms of arsenic
 (Each concentration is 10 $\mu\text{g/L}$)
 (monitor mass (m/z) = 75)



arsenobetaine (AB)	: Y = 21290X + 14316	= 1.000
arsenic ()	: Y = 28852X + 4962.8	= 1.000
dimethylarsinic acid (DMAA)	: Y = 26967X - 6973.9	= 1.000
monomethylarsonic acid (MMAA)	: Y = 29222X + 2405.9	= 1.000
arsenic ()	: Y = 27376X + 880.62	= 1.000

Fig.2 Calibration curve

: トリケミカル研究所製アルセノベタイン
 ($(\text{CH}_3)_3\text{As}-\text{CH}_2\text{COO}$, $\text{MW}=178$, $\text{As}\%=42.1\%$) 47.5
 mg を秤取り、LC 移動相液で 20 mL とする。
 ヒ素 () 標準原液 (1.0 mg/mL)
 : 和光純薬製原子吸光用ヒ素標準液 1000 ppm
 (三酸化ニヒ素 As_2O_3)
 ヒ素 () 標準原液 (1.0 mg/mL)
 : 関東化学製ヒ酸二ナトリウム (Na_2HAsO_4 ,

$\text{FW}=312.01$, $\text{As}\%=24.0\%$) 83.3 mg を秤取り、LC
 移動相液で 20 mL とする。

5. 保存試料の種類と調製

標準添加した保存試料は下記に示した。ヒ素の
 初期濃度は全て 10 $\mu\text{g/L}$ に設定することとし、100
 mL のメスフラスコに 5 種混合ヒ素標準液 (10
 mg/L) を 0.1 mL とり、EDTA 添加の場合は 1M EDTA ·
 2Na 溶液を 0.02 mL とって、各保存試料水で 100 mL

とした。あらかじめ、LC用オートサンプラーバイアルに小分けして密栓後、それぞれの保存条件下に置いた。

精製水：ヤマト科学製WG25(活性炭及びイオン交換処理後、蒸留)+日本ミリポア製Milli-Q Gradient(精製水カートリッジ処理後、UV照射)にて調製した。

河川水：木曽川の水で2003年2月17日に採取、ポリ瓶に満水密栓後冷蔵庫保存したもの。保存実験直前に0.45 μmメンブランフィルターによりろ過した。

地下水：温泉水(泉質は単純温泉、井深1251m)で2001年10月16日に採取、ポリ瓶に満水密栓後冷蔵庫保存したもの。保存実験直前に0.45 μmメンブランフィルターによりろ過した。(標準無添加試料)

井戸水：家庭用雑用水で2003年6月27日採取。採取直後に0.45 μmメンブランフィルターによりろ過し、5種混合ヒ素標準液は加えず、同様な処理をして保存条件下に置いた。

結果

1. 精製水の場合

いずれの保存状態についても、0、1、2、4、6、8週間目に測定を実施し、その結果をFig.3-1~6に示した。室温放置では、Fig.3-1、2に示したように、有機ヒ素濃度はEDTA添加の有無にかかわらず保存実験中の濃度の変動係数が10%以内であり殆ど変化がなかった。一方、無機ヒ素濃度については、EDTA無添加ではFig.3-1に示したように保存実験の初期濃度が各々10 μg/Lであったのに対して、少なくとも2週間目までは殆ど濃度変化がなかったが、4週間目以降にはヒ素()が検出されず、一方ヒ素()濃度が約20 μg/Lとなり、2週間目の測定以降から4週間目の測定前までの保存期間中に無機ヒ素の価から価への酸化(以下、その割合は同一試料中の[[ヒ素()濃度とヒ素()濃度の平均値] - [ヒ素()濃度]] / [[ヒ素()濃度とヒ素()濃度の平均値]の百分率で表す)が100%進行したことが判明した。EDTA添加ではFig.3-2に示したように無機ヒ素の価から価への酸化は6週間目までは殆ど見られなかったが、保存実験最終週の8週間

目の測定ではヒ素()が7.5 μg/L、ヒ素()が12.4 μg/Lとなり、価から価への酸化が25%見られた。

冷蔵保存では、Fig.3-3、4に示したように、いずれの化学形態のヒ素濃度もEDTA添加の有無にかかわらず保存実験中の濃度の変動係数が8%以内であり殆ど変化がなかった。

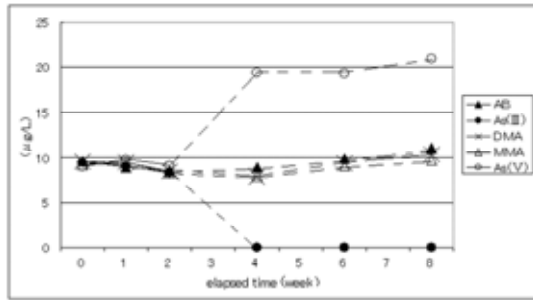
冷凍保存では、Fig.3-5、6に示したように、有機ヒ素濃度はEDTA添加の有無にかかわらず保存実験中の濃度の変動係数が7%以内であり殆ど変化がなかった。一方、無機ヒ素濃度はEDTA添加では、Fig.3-6に示したように保存実験中の濃度の変動係数が7%以内であり殆ど変化がなかったが、EDTA無添加ではFig.3-5に示したように無機ヒ素の価から価への酸化が1週間目で12%、2週間目で17%、そして4週間目以降は保存実験最終週の8週間目に至るまで約25%でほぼ一定の酸化割合であった。

冷凍保存試料はLC-ICP-MS測定にかける前に必ず解凍操作が必要である。冷蔵保存、EDTA無添加で見られた無機ヒ素の酸化傾向が冷蔵保存では殆ど見られなかったことは、LCオートサンプラーバイアルに入れた保存試料の冷凍(氷結)時から室温放置による解凍時までには何らかの酸化を促進する化学作用の発現を推測させた。

2. 河川水の場合

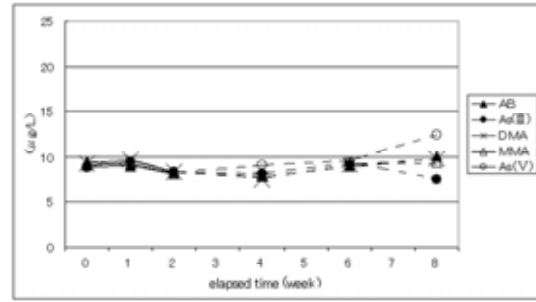
いずれの保存状態についても、0、1、2、4、6、8週間目に測定を実施し、その結果をFig.4-1~6に示した。

室温放置では、Fig.4-1、2に示したように、有機ヒ素濃度は測定値のバラツキも若干見られたが、EDTA添加の有無にかかわらず殆ど変化がなく、保存実験中の濃度の変動係数は平均8.6%であった。一方、無機ヒ素については、EDTA添加の有無にかかわらず1週間目から無機ヒ素の価から価への酸化が進行していることが判明したが、その進行割合はEDTA無添加の場合は1週間目は16%であったが、2週間目では100%まで進行した。一方、EDTA添加の場合は1週間目で60%まで進行したが、2週間目で73%、4週間目で86%、6週間目以降は92%でほぼ一定であった。したがって、進行速度は、EDTA添加の方がEDTA無添加よりも若干遅いことが推測された。



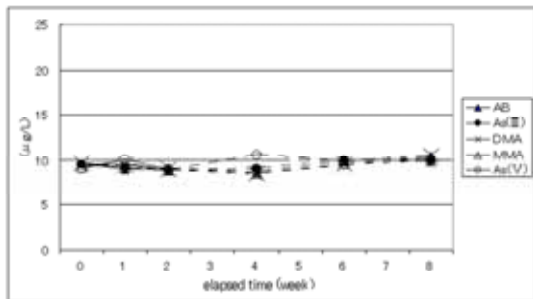
(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.6	9.5	9.6	9.2	9.0	46.9
1	8.9	9.1	9.5	9.5	9.9	46.9
2	8.5	8.3	8.5	8.3	9.2	42.8
4	8.9	<0.1	7.8	7.9	19.4	44.0
6	9.9	<0.1	9.4	9.1	19.3	47.7
8	11.1	<0.1	10.4	9.8	21.0	52.3
average	9.5	4.5	9.2	9.0	14.6	46.8
sigma	0.9	4.9	0.9	0.7	5.8	3.3
ce(%)	10.0	109.9	9.9	8.0	39.6	7.1

3-1) Standing in room temperature



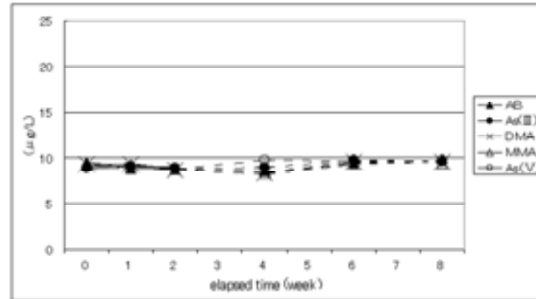
(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.5	8.9	9.3	9.1	8.8	45.6
1	9.0	9.5	9.7	9.2	9.1	46.5
2	8.3	8.3	8.4	8.1	8.1	41.2
4	7.8	8.2	7.5	8.0	9.1	40.6
6	9.0	9.3	9.2	9.5	9.5	46.5
8	10.0	7.5	9.8	9.5	12.4	49.2
average	9.0	8.6	9.0	8.9	9.5	44.9
sigma	0.8	0.7	0.9	0.7	1.5	3.3
ce(%)	8.9	8.7	9.7	7.5	15.8	7.4

3-2) Standing in room temperature on addition of EDTA



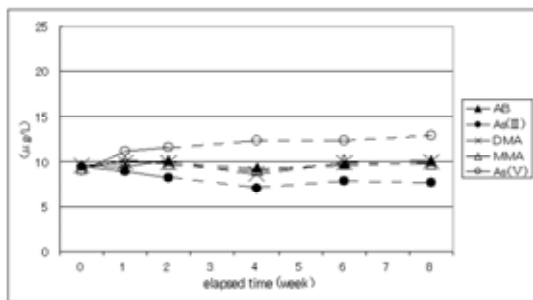
(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.6	9.5	9.6	9.2	9.0	46.9
1	9.0	9.2	9.4	9.6	10.1	47.3
2	9.1	8.8	8.9	8.9	9.0	44.7
4	8.6	9.1	8.5	8.5	10.7	45.4
6	9.8	10.0	9.5	9.6	9.4	48.3
8	10.6	9.9	10.5	9.9	10.2	51.1
average	9.5	9.4	9.4	9.3	9.7	47.3
sigma	0.7	0.4	0.7	0.5	0.7	2.2
ce(%)	7.3	4.8	7.0	5.5	7.0	4.7

3-3) Standing in the refrigerator



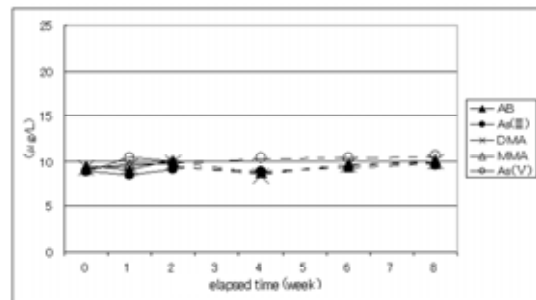
(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.5	8.9	9.3	9.1	8.8	45.6
1	8.9	9.2	9.3	9.4	9.1	45.9
2	8.8	8.8	8.7	8.8	9.0	44.1
4	8.6	9.0	8.3	8.3	9.8	44.0
6	9.4	9.9	9.6	10.0	9.8	48.7
8	9.9	9.5	9.5	9.4	9.9	48.2
average	9.2	9.2	9.1	9.2	9.4	46.1
sigma	0.5	0.4	0.5	0.6	0.5	2.0
ce(%)	5.7	4.4	5.6	6.4	5.1	4.3

3-4) Standing in the refrigerator on addition of EDTA



(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.6	9.5	9.6	9.2	9.0	46.9
1	9.3	8.9	9.9	10.2	11.2	49.5
2	10.2	8.2	9.9	9.8	11.6	49.7
4	9.4	7.0	8.7	9.0	12.4	46.5
6	9.7	7.8	9.9	10.3	12.4	50.1
8	10.2	7.7	10.0	9.7	12.9	50.5
average	9.7	8.2	9.7	9.7	11.6	48.9
sigma	0.4	0.9	0.5	0.5	1.4	1.7
ce(%)	3.8	11.1	5.3	5.4	12.0	3.5

3-5) Standing in the freezer

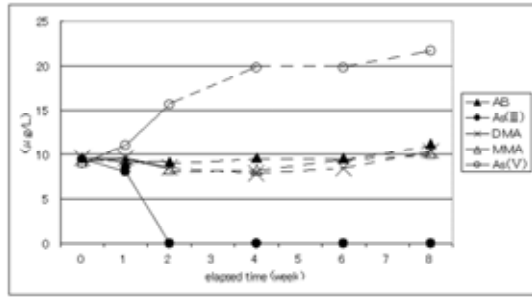


(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.5	8.9	9.3	9.1	8.8	45.6
1	9.0	8.4	9.4	9.7	10.5	47.0
2	10.1	9.0	9.9	9.7	10.0	48.7
4	8.7	8.9	8.4	8.7	10.4	45.1
6	9.8	9.3	9.6	9.4	10.4	48.5
8	10.2	9.5	9.9	9.7	10.7	50.0
average	9.6	9.0	9.4	9.4	10.1	47.5
sigma	0.6	0.4	0.6	0.4	0.7	1.9
ce(%)	6.4	4.1	6.2	4.4	6.7	4.0

3-6) Standing in the freezer on addition of EDTA

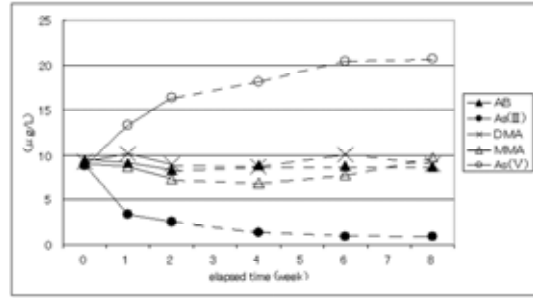
Fig.3 Preservation of purified water

(A consecutive plot on the graph was connected by the solid line, and a discontinuous plot was connected in the broken line)



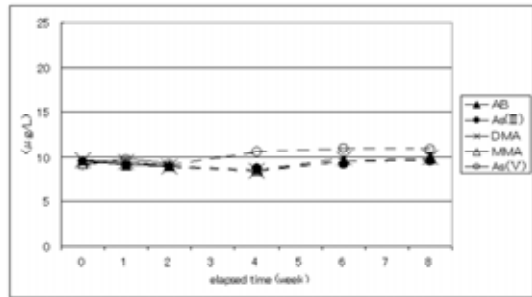
elapsed time(w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.6	9.5	9.6	9.2	9.0	46.9
1	9.1	8.1	9.5	9.5	11.1	47.3
2	9.2	<0.1	8.5	8.3	15.6	41.6
4	9.7	<0.1	7.9	8.3	19.7	45.6
6	9.7	<0.1	8.4	9.6	19.8	47.5
8	11.3	<0.1	10.4	10.2	21.6	53.5
average	9.8	2.9	9.1	9.2	16.2	47.1
sigma	0.8	4.6	0.9	0.8	5.1	3.8
ce(%)	8.1	155.7	10.3	8.2	31.9	8.1

4-1) Standing in room temperature



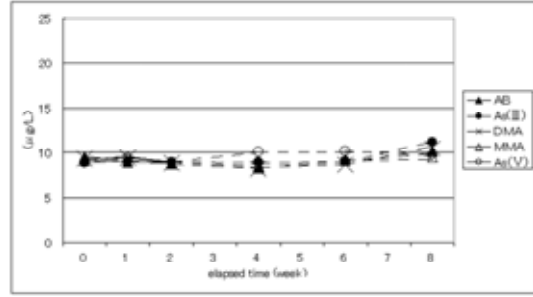
elapsed time(w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.5	8.9	9.3	9.1	8.8	45.6
1	9.1	3.4	10.1	8.7	13.4	44.7
2	8.3	2.6	9.0	7.3	16.4	43.6
4	8.9	1.4	8.7	6.8	18.1	43.9
6	8.8	0.9	10.1	7.8	20.4	48.0
8	8.7	0.9	9.0	9.8	20.7	49.1
average	8.9	3.0	9.4	8.3	16.3	45.8
sigma	0.4	3.0	0.6	1.1	4.6	2.2
ce(%)	4.6	101.0	6.6	13.6	28.0	4.9

4-2) Standing in room temperature on addition of EDTA



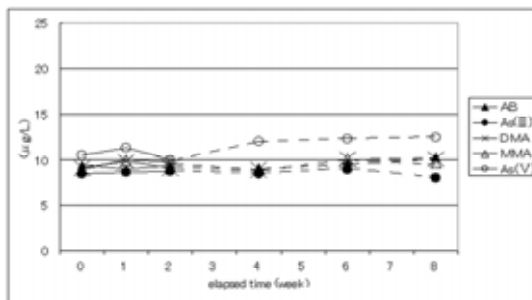
elapsed time(w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.6	9.5	9.6	9.2	9.0	46.9
1	9.0	9.2	9.4	9.4	9.8	46.8
2	9.0	8.8	8.9	8.9	9.2	44.8
4	8.6	8.6	8.4	8.4	10.6	44.6
6	9.7	9.2	9.8	9.7	11.0	49.4
8	10.1	9.5	10.0	9.8	10.9	50.3
average	9.3	9.1	9.4	9.2	10.1	47.1
sigma	0.5	0.4	0.6	0.5	0.9	2.3
ce(%)	5.8	3.8	6.3	5.5	8.5	4.8

4-3) Standing in the refrigerator



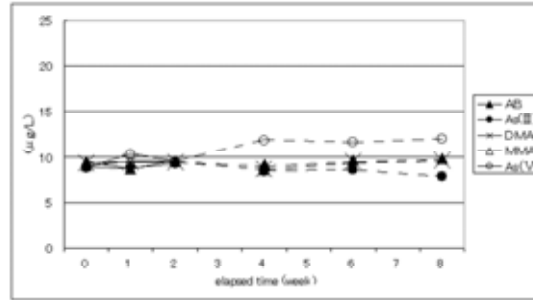
elapsed time(w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.5	8.9	9.3	9.1	8.8	45.6
1	9.0	9.0	9.4	9.6	9.5	46.5
2	8.8	8.8	8.9	8.7	8.9	44.1
4	8.3	8.9	8.2	8.4	10.1	43.9
6	9.1	9.1	8.6	9.3	10.2	46.3
8	10.2	11.2	10.5	9.5	9.7	51.1
average	9.1	9.3	9.1	9.1	9.5	46.2
sigma	0.7	0.9	0.8	0.5	0.6	2.6
ce(%)	7.2	9.9	8.7	5.0	6.2	5.7

4-4) Standing in the refrigerator on addition of EDTA



elapsed time(w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.4	8.4	9.1	8.9	10.5	46.3
1	8.8	8.6	9.8	10.0	11.3	48.5
2	9.4	8.7	9.1	9.7	9.9	46.8
4	9.1	8.4	8.9	9.0	12.0	47.4
6	9.7	8.8	10.1	10.1	12.3	51.0
8	10.4	8.0	10.0	9.6	12.5	50.5
average	9.5	8.5	9.5	9.5	11.4	48.4
sigma	0.5	0.3	0.5	0.5	1.0	2.0
ce(%)	5.5	3.5	5.5	5.2	9.1	4.1

4-5) Standing in the freezer



elapsed time(w)	AB	As()	DMA	MMA	As()	total As
0	9.5	8.9	9.3	9.1	8.8	45.6
1	8.7	8.8	9.4	9.5	10.3	46.7
2	9.6	9.2	9.4	9.5	9.5	47.2
4	9.2	8.5	8.7	8.6	11.8	46.8
6	9.7	8.6	9.5	9.7	11.7	49.2
8	9.9	7.9	9.6	9.7	12.0	49.1
average	9.4	8.6	9.3	9.4	10.7	47.4
sigma	0.4	0.5	0.3	0.4	1.4	1.4
ce(%)	4.5	5.4	3.6	4.5	12.7	2.9

4-6) Standing in the freezer on addition of EDTA

Fig.4 Preservation of river water

(A consecutive plot on the graph was connected by the solid line, and a discontinuous plot was connected in the broken line)

冷蔵保存では、Fig.4-3、4に示したように、いずれの形態のヒ素濃度も EDTA 添加の有無にかかわらず保存実験中の濃度の変動係数は 10%以内であったが、4 週間目以降は無機ヒ素の 価から 価への酸化が 6~10%程度見られた。なお、その酸化割合は EDTA 添加の有無にかかわらず殆ど差がなかった。

冷凍保存についても、Fig.4-5、6に示したように、冷蔵保存と同様なことが言えた。しかし、4 週間目以降は無機ヒ素の 価から 価への酸化傾向は、冷蔵保存の 6~10%に対して冷凍保存は 15~22%とより顕著であった。このことは精製水の場合にも述べたが、LC オートサンプラーバイアルに入れた保存試料の冷凍（氷結）時から室温放置による解凍時までには何らかの酸化を促進する化学作用の発現を推測させた。

3. 地下水の場合

いずれの保存状態についても、0、1、2、4、6、8 週間目に測定を実施し、その結果を Fig.5-1~6 に示した。

Fig.5-1~4 に示したように、室温放置、冷蔵保存は EDTA 添加の有無にかかわらず同様な経時変化を示した。すなわち、有機ヒ素濃度は測定値のバラツキも若干見られたが、保存実験中の濃度の変動係数はおよそ 10%以内で殆ど変化がなかった。しかし、無機ヒ素は、5 種混合ヒ素標準液添加直後に 価から 価への酸化が 30%程度見られ、1 週間目以降にはヒ素()は検出されず全てヒ素()として検出された。

冷凍保存では、Fig.5-5、6に示したように、有機ヒ素濃度は EDTA 添加の有無にかかわらず保存実験中の濃度の変動係数が 5%以内で殆ど変化がなかった。無機ヒ素は、室温放置や冷蔵保存試料と同様に 5 種混合ヒ素標準液添加直後に 価から 価への酸化が 30%程度見られた状態から保存実験を開始したが、2 週間目まではその状態を維持し、4 週間目以降にはヒ素()は検出されず全てヒ素()として検出された。

対象とした地下水は、採取後約 2 年間冷蔵庫（冷暗所）でポリ瓶に満水密封保存されていた温泉水である。精製水や河川水と比べると還元的な状態にあったと考えられ、保存実験の試料調製時において開栓と同時に空気と接触して急速に酸化的な

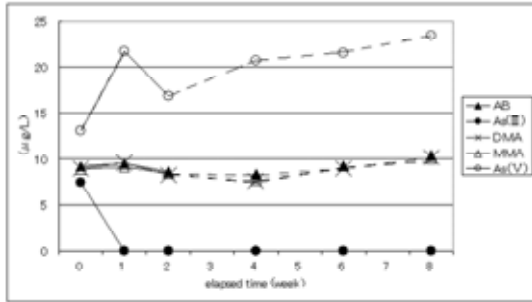
状態に変化し、添加されたヒ素()のヒ素()への酸化を 30%程度進行したものと推測された。一方、有機ヒ素はこのような無機ヒ素の酸化進行条件下であっても初期添加量は測定誤差の範囲内で安定的に存在した。

4. 井戸水（標準無添加）の場合

いずれの保存状態についても、0、1、2、3、4、6、8 週間目に測定を実施することを原則としたが、保存中の試料の破損もあり、実際の測定数は Fig.6-1~6 の測定値及びプロットで示した。ヒ素標準液無添加で実験に供した井戸水は採取直後の家庭用雑用水で、深さ情報はない。この井戸水のヒ素含有量は、Fig.6-1~6 に示された 0 週間目のプロット位置で明らかのように、ヒ素()が 15.7 $\mu\text{g/L}$ 、ヒ素()が 4.4 $\mu\text{g/L}$ 、有機ヒ素は検出されず、合計のヒ素含有量は 20.2 $\mu\text{g/L}$ で、水道水質基準の 10 $\mu\text{g/L}$ を超えていた。

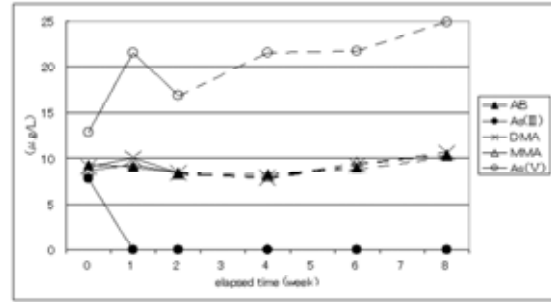
Fig.6-1~4 に示したように、室温放置と冷蔵保存の経時変化は、EDTA 添加の有無毎に似かよったパターンを示した。ヒ素()からヒ素()への酸化現象は、EDTA 無添加の場合は室温保存の 3 週間目で 100%であったのに対して冷蔵保存では 6 週間目で 100%が観測され 2~3 週間程遅く進行していた。EDTA 添加の場合は室温放置も冷蔵保存も経時的にヒ素()からヒ素()への酸化現象が進行し、室温放置では 4 週間目で 33%、8 週間目で 71%、冷蔵保存では 4 週間目で 21%、8 週間目で 53%であった。すなわち、どちらの保存方法であっても保存実験最終週の 8 週間目にもヒ素()が検出されたが、ヒ素()の初期濃度に対する残存率は室温保存で 29%であったのに対して冷蔵保存では 47%と高かった。したがって、井戸水中のヒ素()は、EDTA 無添加の場合室温放置では 3 週間目には検出されず、冷蔵保存では 6 週間目には検出されなかったが、一方、EDTA 添加では室温放置、冷蔵保存のどちらの保存方法であっても 8 週間目でも検出され、前者は 4.6 $\mu\text{g/L}$ （残存率 29%）後者は 7.4 $\mu\text{g/L}$ （同 47%）であった。

冷凍保存（Fig.6-5、6）では、解凍時に LC オートサンプラーバイアルが破損したため、欠測値が多く、明確な議論は出来なかった。しかし、少なくとも、EDTA 添加の有無の影響は室温放置や冷蔵



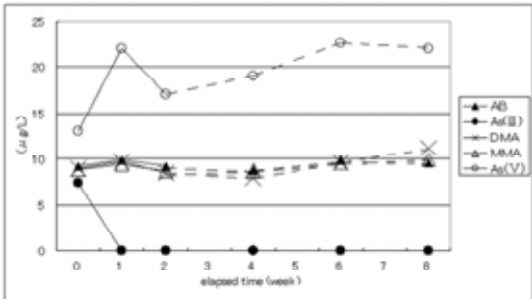
(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	total As
0	9.2	7.4	8.9	8.8	13.1	47.4
1	9.4	<0.1	9.6	9.1	21.7	49.8
2	8.6	<0.1	8.2	8.4	16.9	42.1
4	8.3	<0.1	7.5	7.6	20.8	44.2
6	9.2	<0.1	9.0	9.3	21.6	49.1
8	10.5	<0.1	10.2	10.0	23.5	54.2
average	9.2	1.2	8.9	8.9	19.6	47.8
sigma	0.8	3.0	0.9	0.8	3.9	4.3
ce(%)	8.4	244.9	10.6	9.1	19.7	8.9

5-1) Standing in room temperature



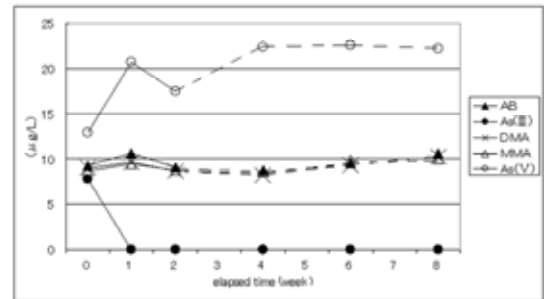
(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	total As
0	9.3	7.7	9.0	8.7	12.9	47.6
1	9.0	<0.1	10.0	9.3	21.6	49.9
2	8.3	<0.1	8.4	8.4	16.8	41.9
4	8.2	<0.1	7.8	8.1	21.5	45.6
6	8.9	<0.1	9.2	9.7	21.8	49.6
8	10.4	<0.1	10.7	10.4	24.9	56.4
average	9.0	1.3	9.2	9.1	19.9	48.5
sigma	0.8	3.2	1.0	0.9	4.3	4.9
ce(%)	8.9	244.9	11.3	9.8	21.6	10.0

5-2) Standing in room temperature on addition of EDTA



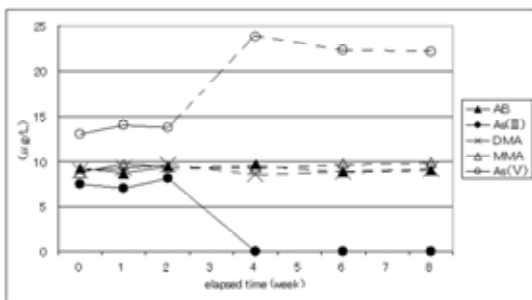
(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	total As
0	9.2	7.4	8.9	8.8	13.1	47.4
1	9.9	<0.1	9.7	9.4	22.0	51.0
2	9.2	<0.1	8.5	8.7	17.1	43.5
4	8.8	<0.1	7.9	8.7	19.0	44.4
6	9.9	<0.1	9.5	9.6	22.6	51.6
8	9.6	<0.1	11.2	9.9	22.0	52.7
average	9.4	1.2	9.3	9.2	19.3	48.4
sigma	0.4	3.0	1.1	0.5	3.7	3.9
ce(%)	4.7	244.9	12.3	5.8	19.3	8.1

5-3) Standing in the refrigerator



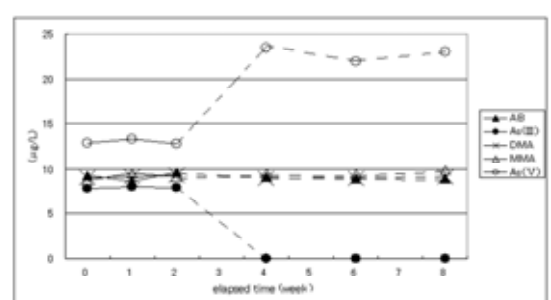
(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	total As
0	9.3	7.7	9.0	8.7	12.9	47.6
1	10.6	<0.1	9.7	9.4	20.8	50.5
2	9.1	<0.1	8.6	8.7	17.6	44.0
4	8.7	<0.1	8.2	8.5	22.4	47.8
6	9.6	<0.1	9.3	9.9	22.6	51.4
8	10.7	<0.1	10.3	10.0	22.2	53.2
average	9.7	1.3	9.2	9.2	19.8	49.1
sigma	0.8	3.2	0.8	0.7	3.8	3.3
ce(%)	8.5	244.9	8.3	7.2	19.5	6.7

5-4) Standing in the refrigerator on addition of EDTA



(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	total As
0	9.2	7.4	8.9	8.8	13.1	47.4
1	8.7	7.0	9.2	9.7	14.1	48.7
2	9.4	8.1	9.6	9.4	13.8	50.3
4	9.7	<0.1	8.6	9.3	23.8	51.4
6	8.9	<0.1	8.9	9.8	22.3	49.9
8	9.0	<0.1	9.1	9.9	22.1	50.1
average	9.2	3.8	9.0	9.5	18.2	49.7
sigma	0.4	4.1	0.3	0.4	5.0	1.4
ce(%)	4.1	109.9	3.7	4.2	27.6	2.8

5-5) Standing in the freezer

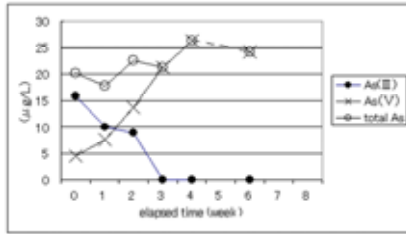


(µg/L)						
elapsed time (w)	AB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	total As
0	9.3	7.7	9.0	8.7	12.9	47.6
1	8.6	7.9	9.1	9.5	13.3	48.4
2	9.6	7.8	9.3	9.0	12.8	48.5
4	9.1	<0.1	8.9	9.5	23.5	51.0
6	8.9	<0.1	8.9	9.4	22.0	49.2
8	8.9	<0.1	9.1	9.9	23.0	50.9
average	9.1	3.9	9.0	9.3	17.9	49.3
sigma	0.4	4.3	0.1	0.4	5.4	1.4
ce(%)	3.9	109.6	1.5	4.6	30.1	2.8

5-6) Standing in the freezer on addition of EDTA

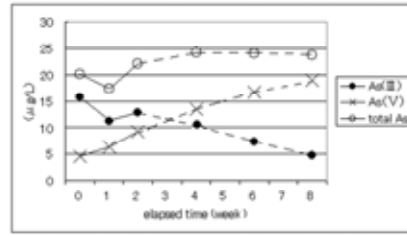
Fig. 5 Preservation of ground water

(A consecutive plot on the graph was connected by the solid line, and a discontinuous plot was connected in the broken line)



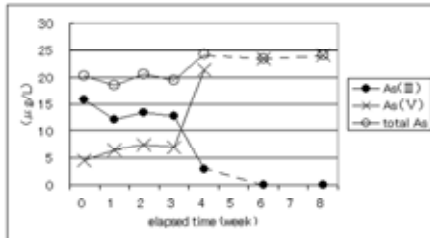
(μg/L)			
elapsed time (w)	As(III)	As(V)	total As
0	15.7	4.4	20.1
1	10.1	7.7	17.8
2	8.8	13.8	22.6
3	<0.1	21.3	21.3
4	<0.1	26.2	26.2
6	<0.1	24.2	24.2
8			
average	5.8	16.3	22.0
sigma	6.7	9.0	3.0
ce(%)	116.8	55.5	13.7

6-1) Standing in room temperature



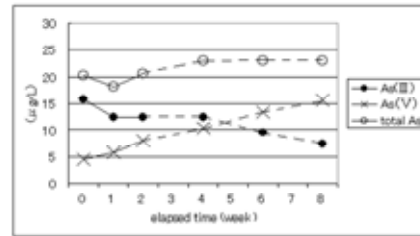
(μg/L)			
elapsed time (w)	As(III)	As(V)	total As
0	15.7	4.4	20.1
1	11.2	6.3	17.5
2	12.9	9.2	22.1
3			
4	10.5	13.6	24.1
6	7.3	16.8	24.1
8	4.6	19.0	23.6
average	10.4	11.6	21.9
sigma	4.0	5.9	2.7
ce(%)	38.1	50.7	12.1

6-2) Standing in room temperature on addition of EDTA



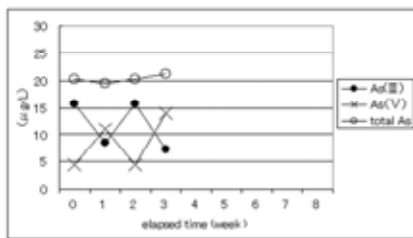
(μg/L)			
elapsed time (w)	As(III)	As(V)	total As
0	15.7	4.4	20.1
1	12.2	6.3	18.5
2	13.4	7.3	20.7
3	12.7	6.8	19.5
4	2.9	21.4	24.3
6	<0.1	23.5	23.5
8	<0.1	24.2	24.2
average	11.4	13.4	21.5
sigma	4.9	9.1	2.4
ce(%)	43.4	67.6	11.1

6-3) Standing in the refrigerator



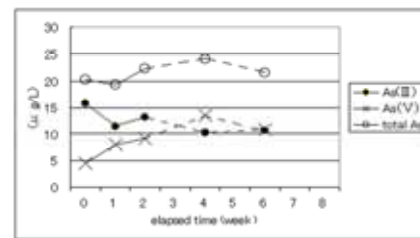
(μg/L)			
elapsed time (w)	As(III)	As(V)	total As
0	15.7	4.4	20.1
1	12.5	5.7	18.2
2	12.5	8.0	20.5
3			
4	12.5	10.4	22.9
6	9.6	13.3	22.9
8	7.4	15.6	23.0
average	11.7	9.6	21.3
sigma	2.9	4.3	2.0
ce(%)	24.6	45.3	9.2

6-4) Standing in the refrigerator on addition of EDTA



(μg/L)			
elapsed time (w)	As(III)	As(V)	total As
0	15.7	4.4	20.1
1	8.4	11.0	19.4
2	15.7	4.4	20.1
3	7.2	13.9	21.1
4			
6			
8			
average	11.8	8.5	20.2
sigma	4.6	4.8	0.7
ce(%)	39.2	56.6	3.5

6-5) Standing in the freezer



(μg/L)			
elapsed time (w)	As(III)	As(V)	total As
0	15.7	4.4	20.1
1	11.5	7.9	19.4
2	13.3	9.1	22.4
3			
4	10.5	13.6	24.1
6	10.6	10.9	21.5
8			
average	12.3	9.2	21.5
sigma	2.2	3.4	1.8
ce(%)	18.0	37.1	8.6

6-6) Standing in the freezer on addition of EDTA

Fig.6 Preservation of well water

(Blank in the table showed that there was no data.)

(A consecutive plot on the graph was connected by the solid line, and a discontinuous plot was connected in the broken line.)

保存とほぼ同じような傾向にあり、ヒ素()からヒ素()への酸化現象はそれらより緩やかに進行していることが推測された。

考 察

5 種混合ヒ素標準液を添加した試料について、添加した3種類の有機ヒ素のMMAA、DMAA、ABは、いずれの試料(精製水、河川水、地下水の3種類)及びいずれの保存方法(室温放置、冷蔵保存、冷凍保存にEDTA添加の有無による6通り)においても測定のパラツキを除けば保存実験中の濃度変化がなく、安定であった。

保存による顕著な変化は、添加した2種類の無機ヒ素のヒ素()とヒ素()に見られ、主にヒ素()がヒ素()に酸化される現象であった。この現象が顕著だったのは室温放置の場合で、精製水のEDTA添加以外は、いずれの保存試料もヒ素()からヒ素()への酸化が顕著に進行した。室温放置でもEDTA添加の精製水の場合は、保存実験の最終週になって初めてヒ素()からヒ素()への酸化が見られたものの、殆ど変化がなかった。これは、キレート作用による酸化防止剤として一般的なEDTAがヒ素()に対しても何らかの酸化防止効果を発現したと考えられた。すなわち、河川水や地下水ではEDTAと反応する鉄等他の溶存成分の存在が推測されるため、河川水や地下水に比べて精製水の保存試料ではEDTAによる酸化防止効果がより効率よく作用してヒ素()からヒ素()への酸化を抑制したと考えられた。冷蔵保存では、精製水及び河川水におけるヒ素()、ヒ素()濃度はEDTA添加の有無に関係なく共に殆ど変化がなく、ヒ素()からヒ素()への酸化は殆ど進行しなかった。精製水及び河川水における酸化反応が、低温(4)によって明らかに抑制されたものと考えられた。したがって、このことによって、調製5種混合ヒ素標準液も同様な冷蔵保存によって2か月は安定に保存できることが本研究からも強く示唆された。なお、冷凍保存の有効性も相対的には示唆されたが、冷凍(氷結)時から室温放置による解凍時まで主に酸化を促進する何らかの化学作用が発現し、精製水や河川水では冷蔵保存より不安定な結果であった。これらの精製水や河川水に比べて、今回用いた地下水はヒ素標準液

添加直後にヒ素()のヒ素()への酸化が進行し、保存におけるEDTA添加の有無に関係なく、室温放置や冷蔵保存では保存1週間目にはヒ素()がヒ素()に完全に酸化されたが、冷凍保存の場合には保存2週間目までAs()、As()共に初期濃度が保持されて安定であった。したがって、還元的な地下水の冷凍保存は、EDTA添加の有無に関係なく室温放置や冷蔵保存より、ヒ素()からヒ素()への若干の酸化抑制傾向が観察された。

この他に、有機ヒ素は含まれずヒ素()を15.7 µg/L、ヒ素()を4.4 µg/L含有する井戸水の採取直後からの保存実験では、いずれの保存方法でも酸化反応の進行が認められたが、EDTA添加の場合は無添加よりその進行が遅かった。

以上のことから、検討した6通りの保存方法では、河川水のように比較的空氣に接触して存在する酸化的な試料では冷蔵保存が有効であることが明らかとなった。また、EDTA添加による保存は、精製水の室温保存では顕著に有効であり、実試料でも特に井戸水(ヒ素の 価と 価が3:1の濃度比で混在)の室温保存や冷蔵保存でEDTA無添加に比べて相対的な有効性が認められた。なお、冷凍保存の有効性も示唆されたが、今回の実験では凍結(氷結)時から解凍時まで主に酸化を促進する何らかの化学作用の発現や保存容器破損のトラブル発生もあり、詳細なメカニズムの考察はできなかった。

まとめ

自然界に存在する5種類のヒ素化合物〔MMAA、DMAA、AB、ヒ素()、ヒ素()〕の添加保存実験によって、水の化学形態別分析用ヒ素試料は保存することなく速やかに測定することが原則であることを確認した。すなわち、MMAA、DMAA、ABの有機ヒ素は比較的安定であったが、無機ヒ素のヒ素()は酸化されてヒ素()に変化しやすかった。しかし、河川水のように比較的空氣に接触して酸化的な状態で存在する試料については、最大2ヶ月近くまでは冷蔵庫による冷暗所保存も可能であることが示唆された。また、実際にヒ素()を含有する還元的な地下水は短期間ならば凍結保存が冷蔵保存よりも有効であると示唆されたが、保

存期間については地下水の還元状態によって異なるため言及は困難であると考えられた。また、今回の保存実験における EDTA 添加濃度は 0.2 mM のみの設定であったが、EDTA の添加は保存試料によっては有効であることが認められたため、EDTA の添加が望ましいと考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省告示第 261 号:官報(号外 166 号)
平成 15 年 7 月 22 日
- 2) WHO : United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water, Chapter 2
Environmental health and human exposure
assessment, 2.5 Sample types and sampling,
2.5.1 Water samples, 2.5.1.5 Sample
preservation,http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenicun2.pdf, 2001
- 3) 相澤貴子、沢田恵枝、浅見真理、野嶋義教：水中に存在するヒ素の化学形態別分離定量法と金属塩の影響、環境科学、9(4)、pp.899-907、1999
- 4) 井上嘉則、酒井徹志、沢田恵枝、野嶋義教、浅見真理、相澤貴子、眞柄泰基：LC-ICP-MS 法による環境水中ヒ素の形態別定量及び既存定量法との比較研究、水道協会雑誌、69(3)(786号) 24-30、2000.3

Preservation of Water Samples in Analysis of Arsenic According to Chemical Form

Shoko Ohnuma, Yasuko Koike , Akito Thoyama

abstract

We observed the change of concentrations of arsenic compounds [monomethylarsonic acid (MMAA), dimethylarsinic acid (DMAA), arsenobetaine (AB), arsenic (), and arsenic ()] that existed in the nature about the water samples during two months under six prevention conditions (there were or not the presence of the EDTA addition to the room temperature preservation, the refrigeration preservation, and the freezer preservation) using LC-ICP-MS. The water samples were purified water, river water, and ground water, added five kinds of arsenic, and well water, concluded actually inorganic arsenic [(): ()=3:1].

We confirmed it was a principle that the arsenic sample for the analysis of water according to chemical form was promptly measured without preserving. But, in this experiments, it was remarkable that arsenic () was oxidized and had been changed into arsenic () though it was comparatively steady with MMAA, DMAA, and AB. Moreover, the EDTA addition was remarkably effective in the room temperature preservation of the purified water, and relative effectiveness with the EDTA addition was admitted in the room temperature preservation and the refrigeration preservation of the well water, compared with the EDTA nothing. Though the effectiveness of the freezer preservation was suggested, the appearance of some chemical actions that would chiefly promote the oxidation from the freezing to the decompression and the trouble of the preservation container damage also occurred in these experiments, and so it was not possible to confirm it.

調 査 研 究

逆相 TLC / スキャニングデンシトメトリ - による生薬分析
- オウゴン、シャクヤク、カンゾウ、アロエ、ボタンピ、
センブリ、オウレン、センナの確認試験 -

大野 勉、池田清栄、三上栄一

要 約

逆相 TLC を用いて、展開溶媒として水、アセトニトリル、*n*-ヘキサン、2 - ブタノンの溶媒系を用い、生薬のオウゴン、シャクヤク、カンゾウ、アロエ、ボタンピ、センブリ、オウレン、センナについて、それらの主成分（バイカリン、ペオニフロリン、グリチルリチン酸、バルバロイン、ペオノール、スウェルチアマリン、塩化ベルベリン、センノシド A）の確認を検討したところ、他の共存成分と分離された単一なスポット（*Rf*値 0.32 から 0.56）を得ることができた。また、同時にスキャニングデンシトメトリ - により、スペクトルの情報も得られ、生薬の主成分を、簡易、迅速、確実に同定することが可能であった。

キ - ワ - ド：逆相 TLC、スキャニングデンシトメトリ -、オウゴン、シャクヤク、カンゾウ

目 的

薄層プレートにシリカゲルを用いた順相薄層クロマトグラフィ - (TLC) の展開溶媒として、従来からクロロホルム、ジクロロメタン等のハロゲン系溶媒が汎用されてきたが、第 15 改正日本薬局方 (局方) においてはこれら有害試薬使用の低減化の方針が示されている¹⁾。一方、化学修飾型シリカゲルプレートを用いた逆相 TLC は固定相の極性が小さいため、展開溶媒として水、アセトニトリル等を主とした極性の大きい溶媒系を選択できるため、低極性ハロゲン系溶媒等の有害試薬使用を避けることができる。最近では、われわれは逆相 TLC を食品・化粧品中のタ - ル

色素のル - チン検査に用い、逆相 TLC は順相 TLC に比べて *Rf* 値の再現性に優れていることを報告した²⁻⁶⁾。そのため、逆相 TLC は多成分が含まれた生薬成分の分析に有用であると思われた。これらのことから、生薬のオウゴン、シャクヤク、カンゾウ、アロエ、ボタンピ、センブリ、オウレン、センナについて逆相 TLC を用いた確認試験法を検討した。また、展開溶媒としてハロゲン系溶媒の有害試薬を含有しない溶媒系を検討した。さらにプレート上に展開したスポットの紫外外部吸収スペクトルをスキャニングデンシトメ - タで直接測定することにより、生薬成分の確認を試みたので報告する。

実験の部

1. 試料

A) オウゴン (Lot No. WH2901C) B) シャクヤク (Lot No. 2G04) C) カンゾウ (Lot No. B718) D) アロエ (Lot No. A726) E) ボタンピ (Lot No. 952084) F) センブリ (Lot No. A918) G) オウレン (Lot No. J422) H) センナ (Lot No. B717): すべて局方生薬品。

A) は日本粉末薬品製 (大阪、日本) B) は大晃生薬製 (名古屋、日本) C)、D)、E)、F)、G)、H) は松浦薬業製 (名古屋、日本)。

2. 試料溶液の調製

試料 A) から H) のそれぞれについて、局方収載の確認試験の項における方法に従い、試料溶液を調製した⁷⁾。

3. 標準溶液の調製

A) から H) の主成分を標準品とした。すなわち、A) はバイカリン、B) はペオニフロリン、C) はグリチルリチン酸、D) はバルバロイン、E) はペオノール、F) はスウェルチアマリン、G) は塩化ベルベリン、H) はセンノシド A を標準品とした。標準溶液は局方の確認試験の項に従い、調製した⁷⁾。

4. 測定条件

1) TLC 条件 プレート:メルク社製 RP-18 F₂₅₄S, Art.15389、展開溶媒: A) 水/アセトニトリル混液 (7:2) B)・C)・D) 水/アセトニトリル混液 (3:2) E) n-ヘキサン/2-ブタノン混液 (10:1) F) 水/アセトニトリル混液 (4:1) G) 2-ブタノン/水混液 (2:1) H) 水/アセトニトリル混液 (7:3) スポット量: 2~10 μ L、検出: 暗所で紫外線照射 (254 nm、365 nm)。

2) スキャニングデンシトメトリ - 条件 スキャニングデンシトメータ: 島津製の2波長フライングスポットスキャニングデンシトメータ CS-9000、波長走査範囲: 200 - 370 nm、スリットサイズ: 0.4 \times 0.4 mm、測光系: 反射吸光法。

実験結果及び考察

上記逆相 TLC プレートを用いて、A) から

H) の標準溶液及び試料溶液をスポットし、良好な分離を得るため展開溶媒を種々検討した。その結果、A) は水/アセトニトリル混液 (7:2) B)・C)・D) は水/アセトニトリル混液 (3:2) E) は n-ヘキサン/2-ブタノン混液 (10:1) F) は 水/アセトニトリル混液 (4:1) G) は 2-ブタノン/水混液 (2:1) H) は 水/アセトニトリル混液 (7:3) が展開溶媒として最適であった。分離した標準溶液スポットの *R_f* 値は A) 0.32、B) 0.56、C) 0.45、D) 0.35、E) 0.55、F) 0.49、G) 0.43、H) 0.56 であった (図 1)。これに対し、それぞれの試料溶液から分離されたスポットも同じ *R_f* 値に単一なスポットがあることが確認された (図 1)。

展開した標準溶液スポットと *R_f* 値が一致した試料溶液スポットにスキャニングデンシトメータを用いて紫外吸収スペクトルを測定した。その結果、それらの極大吸収波長は A): 278、313 nm、B): 231、274 nm、C): 254 nm、D): 269、296、358 nm、E): 274、315 nm、F): 238 nm、G): 275、346 nm、H): 270、334 nm であった。また、試料溶液スポットのスペクトルは、それぞれの標準溶液スポットのスペクトルと極大吸収波長及びスペクトルパターンが一致していた (図 2)。

これらのことから、逆相 TLC/スキャニングデンシトメトリ - を用いることにより、試料に供した生薬 A) オウゴン、B) シャクヤク、C) カンゾウ、D) アロエ、E) ボタンピ、F) センブリ、G) オウレン、H) センナは、それぞれその主成分として、A) はバイカリン、B) はペオニフロリン、C) はグリチルリチン酸、D) はバルバロイン、E) はペオノール、F) はスウェルチアマリン、G) は塩化ベルベリン、H) はセンノシド A を含有していることが確認・同定された。

まとめ

逆相 TLC は生薬成分の確認試験に有用であった。特に、展開溶媒に水、アセトニトリル等の高極性の溶媒系を選択することができるため、クロロホルム、ジクロロメタ

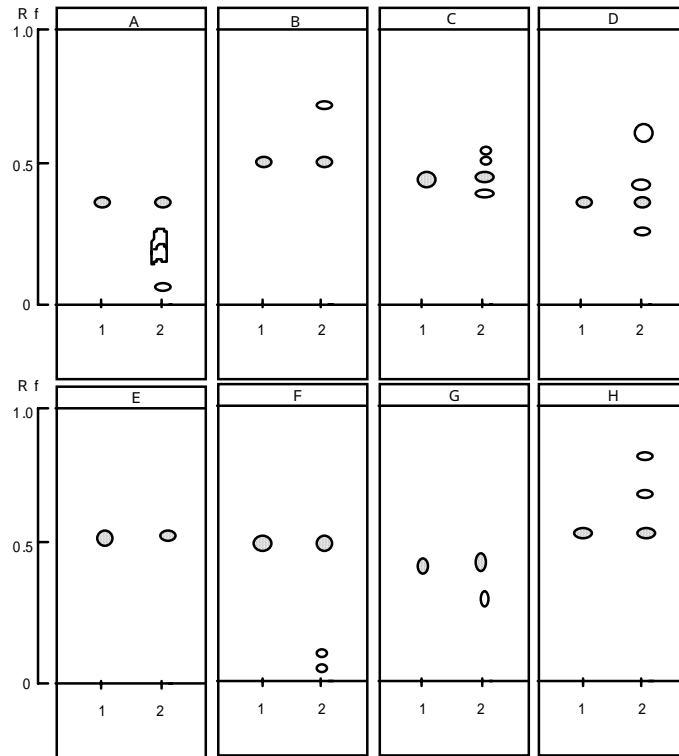


図1逆相TLCにおける1標準溶液と2試料抽出液のクロマトグラム
 A) 1) オウゴン 2) アロエ B) 1) シャクヤク 2) センブリ C) 1) グリチルリチン酸 2) オウレン D) 1) アロエ 2) センブリ
 E) 1) ボタンピ 2) センブリ F) 1) センブリ 2) オウレン G) 1) センブリ 2) オウレン H) 1) センブリ 2) センブリ

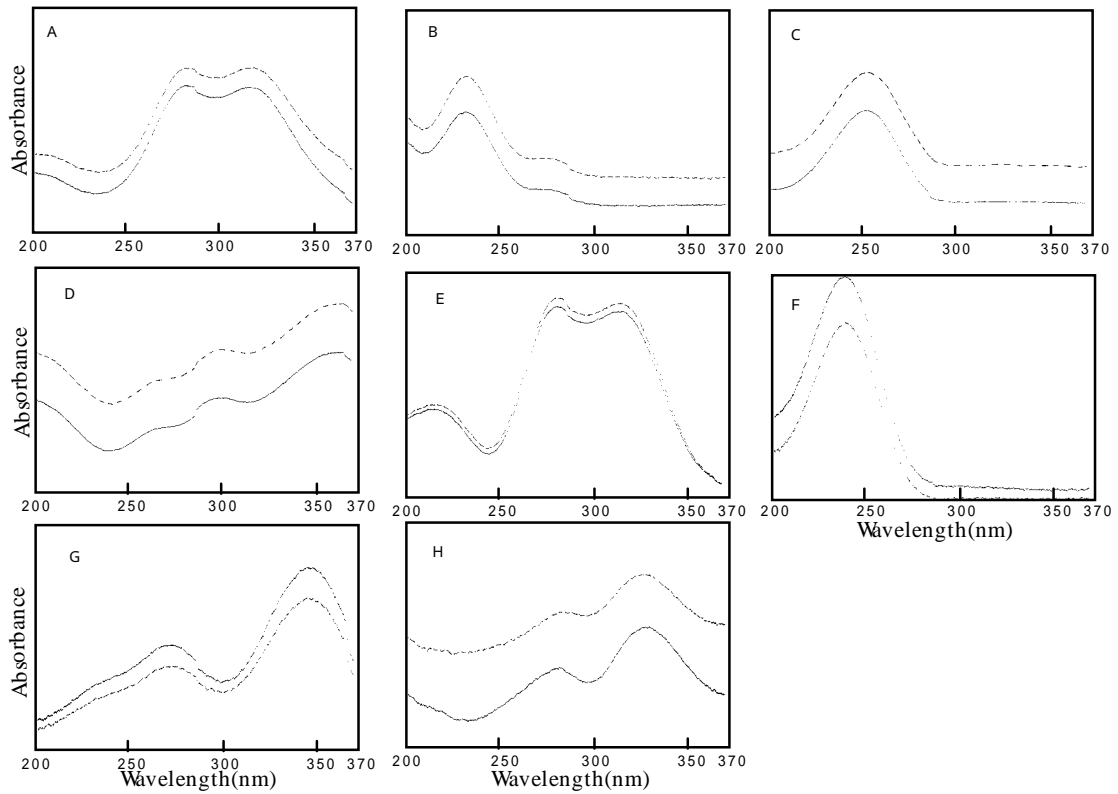


図2 スキャニングデンシトメトリーによる紫外部吸収スペクトル
 標準溶液, ... 試料溶液
 A) オウゴン B) シャクヤク C) グリチルリチン酸 D) アロエ
 E) ボタンピ F) センブリ G) オウレン H) センナ

ン等の人体及び環境に有害な試薬を排除できた。また、同時にスキャニングデンシトメトリ - により、スペクトルの情報も得られ、本法により、局方生薬の主成分を、簡易、迅速、確実に同定することが可能であった。

文 献

- 1) 日本公定書協会編：“日本薬局方 技術情報 2006”東京，じほう，p.39-41，2006.
- 2) Oka H., Ikai Y., Kawamura N., Yamada M., Inoue H., Ohno T., Inagaki K., Kuno A., Yamamoto N.: Simple method for the analysis of food dyes on reversed-phase thin-layer plates. *J.Chromatogr.* 411, 437-444, 1987.
- 3) Ozeki N., Oka H., Ikai Y., Ohno T., Hayakawa J., Hayashi T., Aoyama T., Kushibiki Y., Sato T., Ito M., Suzuki R. :Applicability of reversed-phase TLC to the analysis of coal tar dyes in food . *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 34,542-545,1993.
- 4) Ohno T., Ito Y., Mikami E., Ikai Y., Oka H., Hayakawa J., Nakagawa T: Identification of coal tar dyes in cosmetics and foods using reversed-phase TLC/scanning densitometry. *Jpn.J.Toxicol.Environ.Health* 42, 53-59, 1996.
- 5) Ueno E., Ohno T., Oshima H., Saito I., Ito Y., Oka H., Kagami T., Kijima H., Okazaki K.: Identification of small amounts of coal tar dyes in foods by reversed-phase TLC/scanning densitometry with sample concentration techniques. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*39,286-291,1998.
- 6) Ohno T., Mikami E., Matsumoto H. : Identification of oil-soluble coal tar dyes in cosmetics using reversed-phase TLC/scanning densitometry. *J. Health Sci.*49, 401-404, 2003.
- 7) 第十五改正日本薬局方解説書，東京，廣川書店，p.22，72，95，142，324，387，397，611，2006.

Analysis of Crude Drugs Using Reversed-Phase TLC/Scanning Densitometry Identification of Scutellaria Root, Peony Root, Glycyrrhiza, Aloe, Moutan Bark, Swertia Herb, Coptis Rhizome and Senna Leaf

Tsutomu Ohno, Seiei Ikeda, Eiichi Mikami

We performed identification tests of the main components (baicalin, paeoniflorin, glycyrrhizic acid, barbaloin, paeonol, swertiamarin, berberine chloride and sennoside A) of crude drugs in the Japanese Pharmacopoeia fifteenth Edition (JP15) (scutellaria root, peony root, glycyrrhiza, aloe, moutan bark, swertia herb, coptis rhizome and senna leaf) by reversed-phase TLC using water, acetonitrile, methanol, 2-butanone, and n-hexane as developing solvents and could obtain a single spot separated from other coexisting components (*R_f* value: 0.32-0.56). In addition, spectral information could be simultaneously obtained by scanning densitometry. Thus, the main components of crude drugs in the JP15 could be identified by this method simply, rapidly, and accurately.

Key words: reversed-phase TLC, scanning densitometry, scutellaria root, peony root, glycyrrhiza

調 査 研 究

畜水産食品中のPCBs、クロルデン類および有機塩素系農薬の 一斉分析におけるゲル浸透クロマトグラフィーおよび シリカゲルカラムクロマトグラフィーの応用

椋島由佳、上野英二、大島晴美、大野 勉

要 約

畜水産食品中の PCBs、クロルデン類および有機塩素系農薬の一斉分析法を検討した。魚および食肉からは、石油エーテル-アセトン (2:1) で、牛乳および卵からはアセトニトリルで抽出した後、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により、対象成分の溶出画分を分取して、脱脂精製を行った。次に 4% 含水シリカゲルクロマトグラフィーにより、石油エーテル画分、次いで石油エーテル-酢酸エチル (19:1) 画分に分画する追加精製を行い、デュアルカラム GC-ECD により測定した。魚、牛肉、牛乳、卵からの添加回収率は、61%~118%、検出限界は 0.5~5 ng/g と良好であった。魚、食肉および牛乳の実試料の分析を行ったところ、対象とした化合物を妨害なく高感度に分析することができた。本法は平成 18 年 5 月に導入された食品衛生法による残留農薬等規制のポジティブリスト制度にも対応可能な有効な分析法であることが示唆された。

はじめに

有機塩素系汚染物であるポリ塩化ビフェニル類 (Polychlorinated biphenyls、以下 PCBs) は、近年、暫定的規制値¹⁾以下の横ばいではあるが、その高い残留性のため、畜水産食品中から依然検出されている。平成 13 年に制定された PCB 特別措置法²⁾により、保管されていた使用済み PCBs の化学処理が開始された。乳がん発生との関連性³⁾や低濃度での内分泌攪乱作用の報告⁴⁾など、PCBs の環境・食品汚染への関心が再び高まってきている。農薬等については、平成 18 年 5 月 29 日に施行された食品衛生法による残留規制のポジティブリスト制度^{5),6)}により、対象食品は大幅に拡大し、対象外物質を除く原則全ての農薬等に基準値 (一律基準を含む) が設定された^{7),8),9)}。このような状況の中、愛知

県では食品の安全対策の一環として、畜水産食品中の PCBs、クロルデン類および有機塩素系農薬の調査を実施している。

有機塩素系化合物は脂溶性が高いため、動物の体内、特に脂肪組織中に濃縮される。従って、畜水産食品中のこれらの汚染物を分析する場合、目的成分を有機溶媒により抽出した後、何らかの脱脂操作により常在脂質成分と分離する必要がある。今回、PCBs、クロルデン類および有機塩素系農薬一斉分析における脱脂・精製操作の簡易・迅速化を目的として、ゲル浸透クロマトグラフィー (Gel Permeation Chromatography、以下 GPC) およびシリカゲルクロマトグラフィーを用いた分析法について検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

方 法

1．試料

県内で購入した魚、食肉、牛乳、卵を用いた。

2．試薬

(1) 有機溶媒、無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウムは和光純薬工業の残留農薬・PCB試験用、水は脱イオン水を蒸留したものを用いた。

(2) PCBs、クロルデン類および有機塩素系農薬標準品は、和光純薬工業、Riedel-de-Haën、GL science 製を用いた。

(3) 標準混合溶液のうち PCBs については、カネクロール(以下 KC)-500 および KC-600 の各 5 μ g/mL 標準溶液を作成し、これを KC500:KC600=9:1 の割合で混合したのち、*n*-ヘキサンで希釈し 0.5 μ g/mL 標準混合溶液とした。クロルデン類、有機塩素系農薬については、各標準品を原則として 20mg を量り採り、トルエンに溶解し、正確に 20mL として標準原液とした。これを *n*-ヘキサンで希釈し、クロルデン類は各化合物が 0.025 μ g/mL、有機塩素系農薬は各農薬が 0.05 μ g/mL の標準混合溶液とした。

(4) シリカゲルは関東化学のシリカゲル 60N (球状、中性、粒子径 100-210 μ m) を用いた。130 で 15 時間乾燥させ、共栓付き三角フラスコに入れて室温まで冷却したのち、攪拌しながらシリカゲル重量に対して 4% 重量の水を滴下し、密栓して 30 分間激しく振とうし、12 時間以上放置してから使用した。

3．分析対象化合物 (20 種)

PCBs

クロルデン類 : ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキサイド, オキシクロルデン, *trans*-クロルデン, *cis*-クロルデン, *trans*-ノナクロル, *cis*-ノナクロル

有機塩素系農薬 : α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, アルドリン, ディルドリン, エンドリン, *pp*²DDE, *op*²DDD, *pp*²DDD, *op*²DDT, *pp*²DDT

4．装置および測定条件

試料粉碎器 : ナショナル製のフードプロセッサーを用いた。

ホモジナイザー : IKA Labortechnik 社製の T25 ベーシックウルトラタラックスを用いた。

振とう器 : ミヤモト・リケン製のタイマー付シェーカーを用いた。

遠心分離機 : クボタ製の KS-8000 を用いた。

GPC 装置 : 島津製の全自動 GPC クリーンアップシステムに昭和電工製の分離カラム CLNpak EV-2000 (20mm i.d. \times 300mm) およびガードカラム CLNpak EV-G (20mm i.d. \times 100mm) を装着し、溶出液としてシクロヘキサン-アセトン(4:1)混液(流速 5mL/min)を用いた。

GC-ECD 装置 : 島津 GC-17A (オートインジェクター AOC-20i, オートサンプラー AOC-20s, ワークステーション Class-GC10 付) シングルインジェクション - デュアルカラム Restec 社製 Stx-CLPesticides (0.32mm i.d. \times 30m, 膜厚 0.50 μ m)

Restec 社製 Stx-CLPesticides2 (0.32mm i.d. \times 30m, 膜厚 0.25 μ m), Restec 社製の Siltec ガードカラム (0.53mm i.d. \times 2m), Siltec Y コネクターおよび Siltec インサート (3.5mm i.d. \times 94mm, シングルテーパー型), 注入口温度 240、カラム温度プログラム 60 (1min) \rightarrow 20 /min \rightarrow 180 \rightarrow 2 /min \rightarrow 220 \rightarrow 10 /min \rightarrow 300 (2min), 検出器温度 300、キャリアガス ヘリウム、キャリアガス圧力プログラム 130kPa(1min) \rightarrow 2kPa/min \rightarrow 182kPa \rightarrow 10kPa/min \rightarrow 262kPa(2min), メイクアップガス圧力 25KPa, 注入量 2 μ L, 注入モード スプリットレス(1min)

5．分析操作

(1) 抽出

魚および食肉

粉碎した試料 30g を遠心管に採り、水 50mL、および石油エーテル-アセトン(2:1) 150mL を加えて 10,000 回転/分で 1 分間ホモ

ジナイズし、3,000 回転/分で 10 分間遠心分離した後、有機層（石油エーテル層）をコニカルピーカーに分取した。遠心管内の残留物に石油エーテル 100mL を加え、再度ホモジナイズ、遠心分離により得られた有機層を上記のコニカルピーカーに合わせた。内径 22mm のガラス製クロマト管に無水硫酸ナトリウム 25g を乾式充填したカラムに、コニカルピーカー中の有機層を通過させて、あらかじめ重量を測定したナスフラスコ中に入れた。次いで石油エーテル 20mL を用いてコニカルピーカーを洗い、その洗液をカラムに通過、洗浄する操作を 2 回繰り返した。洗液を含むナスフラスコ中のろ液を 40 以下で減圧濃縮後、残留物の重量を測定し、これを脂肪重量とした。脂肪重量が 3.0g 以下の場合、シクロヘキサン-アセトン(4:1)で 6mL に定容し、GPC カラムへの脂肪の最大負荷量を 1000mg(500mg/mL×2mL)以下とした。脂肪重量が 3.0g を超える場合は、ヘキサン-アセトニトリル分配法による脱脂をさらに行った。すなわち残留物を n-ヘキサン 15mL および n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30mL を用いて分液ロートに洗いこみ 5 分間激しく振とうし、約 30 分間静置したのち、アセトニトリル層をナスフラスコに分取した。n-ヘキサン層に n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30mL を加え、上記と同様の操作を 2 回繰り返した。分取したアセトニトリル層を 40 以下で減圧濃縮後、残留物の重量を測定して 3.0g 以下としたのち、シクロヘキサン-アセトン(4:1)で 6mL に定容し、これを試料原液(試料濃度:5.0g/mL)とした。

牛乳および卵

試料 20g にアセトニトリル 100mL を加え、10,000 回転/分で 1 分間ホモジナイズし、3,000 回転/分で 10 分間遠心分離した後、有機層（アセトニトリル層）をコニカルピーカーに分取した。遠心管内の残留物にアセトニトリル 100mL を加え、再度ホモジナイズ、遠心分離により得られた有機層を上記のコニカルピーカーに合わせた。塩化ナトリウム 15g を加えた分液ロートにコニカルピーカー

中の有機層を加え 5 分間激しく振とうし、約 30 分間静置したのち、分離した水層を除去した。アセトニトリル層をナスフラスコに移し 40 以下で減圧濃縮し、溶媒を除去した。これに酢酸エチル 50mL を加えて振り混ぜた後、無水硫酸ナトリウム 20g を加えて 1 分間超音波洗浄機にかけて脱水溶解させたのち、無水硫酸ナトリウム/グラスウール充填ロートを用いて、別のナスフラスコ中に入れた。次いで酢酸エチル 20mL を用いて無水硫酸ナトリウムの入ったナスフラスコを洗い、その洗液を上記のナスフラスコ中に入れた操作を 2 回繰り返した。ろ液は 40 以下で減圧濃縮し、約 1mL 残した溶液に窒素ガスを吹き付けて乾固させたのち、速やかにシクロヘキサン-アセトン(4:1)で 4mL に定容し、試料原液(試料濃度:5.0g/mL)とした。

(2) 精製および定量

抽出法で得られた試料原液を 3,000 回転/分で 10 分間遠心分離し、その上澄液 2mL(試料 10g 相当)を GPC カラムに注入し、分析対象化合物を含む溶出画分(60~105mL)を分取した。40 以下で減圧濃縮し、約 1mL 残した溶液に窒素ガスで吹き付けて乾固させたのち、n-ヘキサン 2mL に溶解した。これを、内径 15mm のガラス製クロマト管に 4% 含水シリカゲル 4g、次いで無水硫酸ナトリウム 5g を乾式充填したカラムに負荷し、石油エーテル 25mL、次いで石油エーテル-酢酸エチル(19:1)35mL で溶出して、それぞれ第 1、第 2 画分とした。溶出液を 40 以下で減圧濃縮し、約 1mL 残した溶液に窒素ガスを吹き付けて乾固させたのち、n-ヘキサンで 1mL に定容し、GC-ECD 用の試験溶液(試料濃度:10g/mL)とした。ピークの同定は保持時間法、定量は絶対検量線法により行った。

結果

1. 精製法の検討

(1) GPC カラムからの溶出画分

Table 1 に対象化合物および食品由来の油脂成分の溶出画分を示した。クロルデン類が最も早く 65mL から溶出し、

最も遅い有機塩素系農薬の γ -BHC、ディルドリン、エンドリンまで、95 mL ですべての対象化合物が溶出した。食品由来の油脂成分は 40 mL から 60 mL 画分までに溶出し、対象化合物とは明確に分離された。これより脱脂精製効果と、対象化合物すべてを分析可能な条件として 60 mL から 105 mL (12~21 分) の画分を分取することとした。

(2) 4%含水シリカゲルカラムにおける溶出画分および回収率

Table 2 に対象化合物の溶出画分および回収率を示した。

第 1 画分に PCBs(回収率: 100%)、ヘプタクロル(109%)、アルドリン(103%)、*pp'*-DDE(95%)、*op'*-DDD(103%) が溶出した。これらは石油エーテル 25 mL で第 1 画分に完全に溶出した。

続く第 2 画分に残りの成分が溶出した。石油エーテル-酢酸エチル(19:1)溶媒量は 35 mL で、ヘプタクロルエポキシサイド(96%)、オキシクロルデン(104%)、*trans*-クロルデン(95%)、*cis*-クロルデン(82%)、*cis*-ノナクロル(105%)、 α -BHC(84%)、 β -BHC

(106%)、 γ -BHC(90%)、 δ -BHC(78%)、ディルドリン(96%)、エンドリン(90%)、*op'*-DDD(103%)、*pp'*-DDD(104%) が完全に溶出した。

trans-ノナクロル(89%) および *pp'*-DDT(94%) は第 1 画分、第 2 画分の両領域にまたがって溶出した。

2. 添加回収試験

魚、牛肉、牛乳、卵の畜水産食品に最終濃度が、PCBs は 50 ng/g、クロルデン類は 2.5 ng/g、有機塩素系農薬は 5 ng/g となるように各標準混合溶液を添加し、本法により回収率を求めた (Table 3)。

3 回の試行による回収率の平均値は 61% から 118%、相対標準偏差は 12% 未満と良好であった。

3. 実試料の分析 (残留実態調査)

本法を用いて、魚 24 種 64 検体、食肉 (牛および豚、国内産および外国産を含む) 15 検体、牛乳 21 検体について PCBs、クロルデン類、有機塩素系農薬の分析を行った (Table 4)。

Table 2. Elution profile of 4% hydrated silica-gel column chromatography

Compounds	fr-1 [petroleum ether]					r-2 [petroleum ether-ethyl acetate (19:1)]							total (%)	
	(mL)	0-10	10-15	15-20	20-25 total (%)	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35 total (%)		
PCBs	7	67	25	1	100							0	100	
heptachlor		27	74	8	109							0	109	
oxychlorane						4	23	64	13			104	104	
heptachlor epoxide							10	76	10			96	96	
<i>trans</i> -chlordane							9	31	45	10		95	95	
<i>cis</i> -chlordane						6	22	31	19	4		82	82	
<i>trans</i> -nonachlor			2	16	18	44	21	4	2			71	89	
<i>cis</i> -nonachlor									84	21		105	105	
-BHC								11	67	5	1	84	84	
-BHC									50	34	6	90	90	
-BHC								12	80	11	3	106	106	
-BHC									18	34	20	6	78	78
aldrin	6	92	5		103							0	103	
<i>pp'</i> -DDE			35	57	3	95						0	95	
<i>op'</i> -DDD								19	75	9		103	103	
dieldrin								1	58	31	6	96	96	
<i>op'</i> -DDT				39	64	103						0	103	
endrin								4	72	14		90	90	
<i>pp'</i> -DDD								17	78	7	2	104	104	
<i>pp'</i> -DDT				26	26	58	10					68	94	

(1) PCBs

カマス、コノシロ、サバ、サンマ、ボラ、マアジ等の魚 19 種 42 検体 (66%)、食肉 6 検体 (40%)、牛乳 12 検体 (57%) から PCBs が検出された (検出限界 5 ng/g)、いずれも規制値¹⁾を大きく下回っており、松本らの報告¹⁰⁾とも一致していた。

(2) クロルデン類

ポジティブリスト制度導入により、畜水産食品においては *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデンおよび代謝物のオキシクロルデンの和をクロルデンの暫定基準値として設定している。魚についてはクロルデンが、コノシロ、ボラ、マアジの 3 種 7 検体 (11%) から検出された。また *trans*-ノナクロールはコノシロ、セイゴ、サンマ、ボラ、マアジの 5 種 11 検

体 (17%) から、*cis*-ノナクロールはコノシロ、ボラの 2 種 3 検体 (5%) から検出された。成分別の残留割合は、*trans*-ノナクロール、*cis*-クロルデンが多かった。いずれも暫定基準値、一律基準値以内であった。食肉および牛乳からはクロルデン類は検出されなかった (検出限界 0.5 ng/g)

(3) 有機塩素系農薬

魚については BHC (α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC および δ -BHC の総和) が、イサキ、サンマ、ハタハタの 3 種 8 検体 (13%) から検出された。なお個別に基準値が設定されている γ -BHC はいずれも検出されなかった。DDT (*pp'*-DDD、*pp'*-DDE、*pp'*-DDT、*op'*-DDT の総和) は、コノシロ、サゴシ、サバ、ハタハタ、ボラ、マアジ等 13 種 30 検体 (47%)

Table 3. Recoveries of PCBs, chlordanes and organochlorine pesticides from fish, meat, milk and egg

Compounds	Recovery (%) ^{a)}								Detection limit ^{b)} (ng/g)
	Fish		Meat		Milk		Egg		
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	
PCBs	87.4	1.5	92.1	3.0	91.8	2.4	81.7	6.2	5
heptachlor	100.1	5.4	107.3	4.6	105.2	3.5	117.7	0.5	0.5
oxychlordane	80.1	7.2	93.9	4.5	93.0	3.9	104.2	0.4	0.5
heptachlor epoxide	91.1	1.8	103.1	1.2	97.8	5.3	103.1	0.1	0.5
<i>trans</i> -chlordane	85.0	11.4	106.5	1.4	91.2	5.1	90.5	0.4	0.5
<i>cis</i> -chlordane	71.8	9.5	89.6	8.3	93.4	4.9	82.2	0.2	0.5
<i>trans</i> -nonachlor	78.2	8.7	95.5	7.5	93.9	4.1	80.3	0.9	0.5
<i>cis</i> -nonachlor									
-BHC	84.8	3.0	97.7	1.4	80.5	5.3	90.4	1.7	1
-BHC	83.4	2.6	102.4	0.0	98.7	6.4	95.4	1.0	1
-BHC	83.1	1.8	104.0	3.0	99.0	2.8	100.7	1.1	1
-BHC	83.0	4.5	90.5	0.1	92.8	6.3	61.1	3.3	1
aldrin	91.9	2.6	71.4	1.7	105.3	6.8	85.4	2.2	1
<i>pp'</i> -DDE	86.6	3.4	112.9	2.0	96.4	6.6	114.8	3.0	1
<i>op'</i> -DDD	84.3	2.4	99.3	1.7	97.8	4.3	104.0	0.0	1
dieldrin	94.8	1.8	115.7	1.2	98.4	3.8	103.1	1.6	1
<i>op'</i> -DDT	104.5	3.9	94.5	0.2	84.2	6.2	77.6	1.0	1
endrin	91.9	4.3	98.5	2.2	109.1	5.8	103.1	0.1	1
<i>pp'</i> -DDD	80.8	2.6	103.5	1.3	98.8	4.4	112.9	1.0	1
<i>pp'</i> -DDT	81.6	4.7	89.6	7.1	95.1	8.2	106.5	4.4	1

cis-chlordane + *trans*-nonachlor

a) Each value is the mean of 3 determinations

b) Detection limits calculated for a signal-to-noise ratio of 3 for standard solution (S/N=3)

Table 4. Concentrations of PCBs, chlordanes and organochlorine pesticides in samples of fish, meat and milk

Compounds		Fish	Meat	Milk
PCBs	<i>n</i>	64(42)	15(6)	21(12)
	Mean ± SD (ng/g)	10 ± 10	nd	nd
	Range (ng/g)	nd-55	nd-14	nd-6
Chlordane ^{a)}	<i>n</i>	64(7)	15(0)	21(0)
	Mean ± SD (ng/g)	nd	nd	nd
	Range (ng/g)	nd-3.1	nd	nd
<i>trans</i> -nonachlor	<i>n</i>	64(11)	15(0)	21(0)
	Mean ± SD (ng/g)	nd	nd	nd
	Range (ng/g)	nd-2.4	nd	nd
<i>cis</i> -nonachlor	<i>n</i>	64(3)	15(0)	21(0)
	Mean ± SD (ng/g)	nd	nd	nd
	Range (ng/g)	nd-1.2	nd	nd
BHC ^{b)}	<i>n</i>	64(8)	15(1)	21(3)
	Mean ± SD (ng/g)	nd	nd	nd
	Range (ng/g)	nd-6	nd-1	nd-1
DDT ^{c)}	<i>n</i>	64(30)	15(0)	21(3)
	Mean ± SD (ng/g)	1.9 ± 2.4	nd	nd
	Range (ng/g)	nd-13	nd	nd-3
dieldrin	<i>n</i>	64(6)	15(0)	21(0)
	Mean ± SD (ng/g)	nd	nd	nd
	Range (ng/g)	nd-2	nd	nd

The concentration of each compound is shown as the mean ± standard deviation (SD)
n: number of samples, those in which compounds were detected are shown in parentheses
 nd: not detected (PCBs:<5 ng/g, chlordanes:<0.5 ng/g, organochlorine pesticides:<1 ng/g)

a) Total amounts of *cis*-chlordane, *trans*-chlordane and oxychlordane

b) Total amounts of α -BHC, β -BHC, γ -BHC and δ -BHC

c) Total amounts of *pp'*-DDD, *pp'*-DDE, *pp'*-DDT and *op'*-DDT

から検出された。ディルドリンは、コノシロ、サンマの 2 種 6 検体 (9%) から検出された。Fig. 1 に PCBs および *pp'*-DDE が検出されたボラの試料溶液 (第 1 画分) のクロマトグラムを示した。食肉については 1 検体 (7%) から BHC が検出された。牛乳については 3 検体 (14%) から β -BHC および DDT が検出された (検出限界 1 ng/g)。いずれも暫定基準値、一律基準値以内であった。今回分析した試料において、妨害となるピークはクロマトグラム上には観察されず、また分析に要する日数は 10 検体で 3 日以内であ

った。以上より、本分析法が実試料においても高い頑健性を有し、簡便で迅速な定量の手法であることが確認された。

考 察

畜水産物および穀類、豆類等の農産物のような油脂成分を含む食品中の化合物を分析する際の脱脂精製法として、シリカゲルドライカラム法¹¹⁾、Extrelut カラム法¹²⁾、ODS カラム法¹³⁾も用いられるが、脂質含量の高い食品によっては、カラムの過負荷により脱脂効果が十分に発揮されず、対象化合物の溶出率

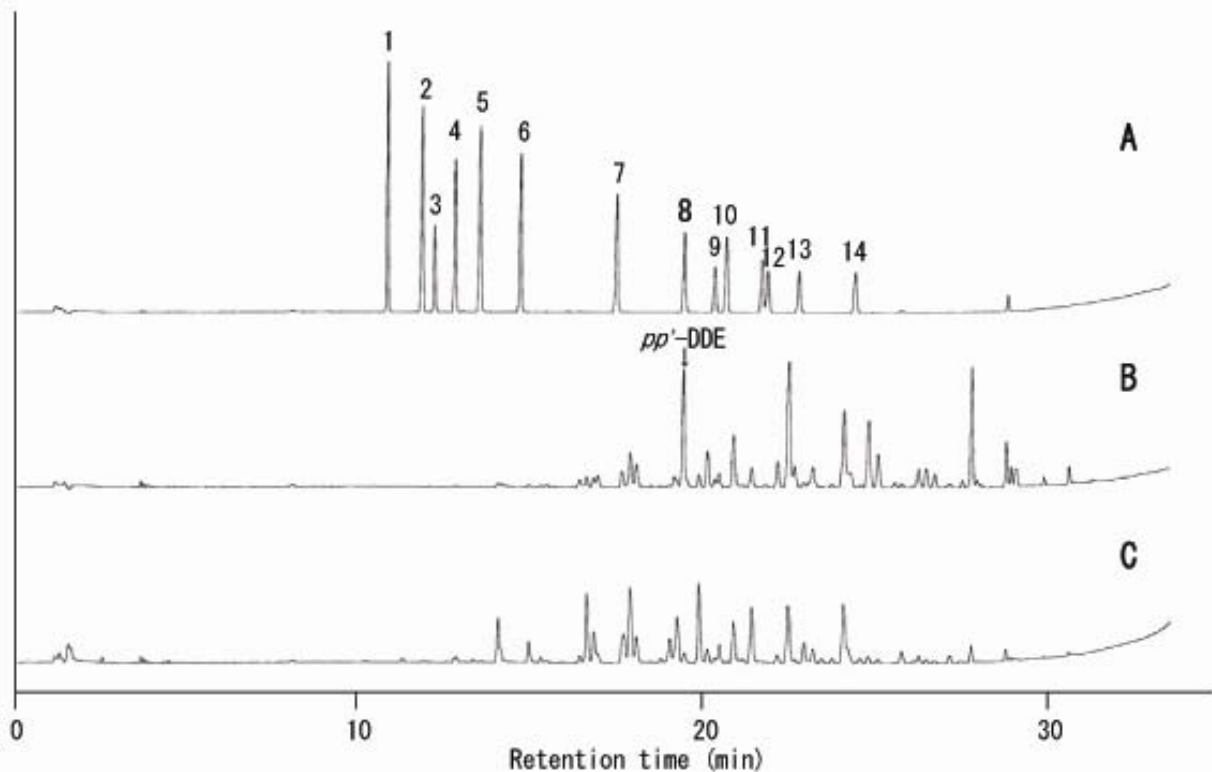


Fig. 1. Gas Chromatograms of standard mixtures and mullet sample

- A: Chlordanes (5, 7) and organochlorine pesticides (1-4, 6, 8-14)
 1: α -BHC, 2: γ -BHC, 3: β -BHC, 4: δ -BHC, 5: heptachlor, 6: aldrin, 7: heptachlor epoxide,
 8: pp' -DDE, 9: op' -DDD, 10: dieldrin, 11: op' -DDT, 12: endrin, 13: pp' -DDD, 14: pp' -DDT
 B: Petroleum ether fraction of mullet sample (10g sample/mL)
 C: PCBs (KC500:KC600=9:1)

がばらつくなど再現性に問題がある場合がある¹²⁾。一方、本法で用いた GPC 法^{14),15),16)}は、高分子量の脂質を良好に分離して目的成分のみを高い回収率で得ることができ、再現性も非常に良好である。1 検体の処理に約 25 分の時間を要する欠点はあるが、自動化されており夜間処理が可能なので、ルーチン分析には十分対応できる。

有機塩素系化合物は GC-ECD により比較的高感度に一斉分析が可能である。しかし各々十分に化合物を定量するためには、ピークが重複しないように精製、分画する必要がある。特に理論上 209 種類の異性体および同属体が存在する PCBs はクロマトグラム上に多数のピークが出現するため PCBs を 1 画分に完全に溶出させ、その他の化合物とできる限り分ける必要がある。そこで 4% 含水シリ

カゲルカラムを用いて上記条件を満たす石油エーテル溶媒量を求めたところ、25mL を要した。第 1 画分には PCBs 以外にもヘプタクロル、アルドリン、 pp' -DDE、 op' -DDT、また *trans*-ノナクロルおよび pp' -DDT の一部が溶出するが、GC 条件として分離パターンの異なる 2 種のカラムを用いるデュアルカラム方式を採用することで¹⁷⁾、相対保持時間の違いから PCBs とは容易に判別可能である。またシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、PCBs を第 1 画分に完全に溶出させ、続く第 2 画分で、残りの成分を溶出させることで、両画分への溶出位置という定性情報を得て、対象とした 20 種類成分の分析を可能とした。なお、従来法¹¹⁾ではメルク製の破碎状シリカゲルを用いていたが、破碎状と比較し、通過速度が一定で活性のばらつきが少な

い関東化学製の球状、中性シリカゲル(粒子径 100-210 μ m)に替えたことで、均一な充填床となり、溶出画分の再現性が向上した。また、脱脂、精製操作ともに、環境保全上好ましくないジクロロメタンを用いない分析法を確立した。本法により添加回収試験を行ったところ、検討した畜水産食品において対象化合物は回収率 61%~118%、相対標準偏差 12%未満と良好であった。また、GC-ECD は有機塩素系化合物を電子親和性物質として包括的に測定し、PCBs などが1つのクロマトグラムで総量を定量できる点において非常に優れている。GC/MS と比較し、個々の化合物および異性体を同定するには不向きであるが¹⁸⁾十分な感度がありデータ解析が簡易であることから、モニタリングレベルとしては有効な分析法であると考えられる。本法は、食品衛生法による残留規制のポジティブリスト制度にも対応可能な手法として、今後分析対象化合物を拡大して検討する予定である。

文 献

- 1)昭和 47 年 8 月 24 日付環食第 442 号, 食品中に残留する PCB の規制について
- 2)平成 13 年 6 月 22 日, 法律第 65 号(2001)
- 3)Charlier C.J., Albert A.I., Zhang L., Dubois N.G., Plometeux G.J.: Polychlorinated biphenyls contamination in women with breast cancer, *Clinica Chimica Acta* 347,177-181.2004
- 4)Pliskova M, Vondracek J, Canton RF, Nera J, Kocan A, Petric J, Trnovec T, Sanderson T, van den Berg M, Machala M.: Impact of polychlorinated biphenyls contamination on estrogenic activity in human male serum, *Environ Health Perspect* 113,1277-1284.2005
- 5)平成 15 年 5 月 30 日, 法律第 55 号(2003)
- 6)平成 17 年 11 月 29 日, 政令第 345 号(2005)
- 7)平成 17 年 11 月 29 日, 厚生労働省告示第 497 号(2005)
- 8)平成 17 年 11 月 29 日, 厚生労働省告示第 498 号(2005)
- 9)平成 17 年 11 月 29 日, 厚生労働省告示第 499 号(2005)
- 10)松本比佐志, 桑原克義, 村上保行, 村田弘: 大阪府下の市販食肉および食肉加工食品中の PCB および有機塩素系農薬の残留実態, *食品衛生学雑誌* 47,127-135.2006
- 11)山田貞二, 大島晴美, 斎藤勲, 早川順子: 魚介類および食肉中の PCBs, クロルデン類および有機塩素系農薬分析におけるシリカゲルカラムクロマトグラフィーの応用, *愛知県所報* 46,13-21.1995
- 12)吉井公彦, 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田 正: 超臨海流体抽出および HPLC による穀類中 15 種農薬の一斉分析法の検討, *食品衛生学雑誌* 39,184-191.1998
- 13)厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号[食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法]
- 14)上野英二, 椋島由佳, 大島晴美, 岡尚男: GPC およびシリカゲルカラム精製を用いた GC-ECD による穀類中デオキシニバレノールおよびニバレノールの分析, *愛知県所報* 55,31-36.2005
- 15)上野英二, 大島晴美, 斎藤 勲, 松本 浩: アセトニトリル抽出, GPC およびミニカラム精製, デュアルカラム GC-ECD による食品中の多成分残留農薬分析, *食品衛生学雑誌* 41,178-187.2000
- 16)Ueno E, Oshima H, Matsumoto H, Saito I, Tamura H.: Determination of spinosad in vegetables and fruits by HPLC-UV/MS after GPC and SPE cleanup on a 2-layered column, *J.AOAC Int.* 89, 1641-1649.2006
- 17)上野英二: デュアルカラム GC の食品中残留農薬分析への利用について, *食品衛生学雑誌* 47,299-304.2006
- 18)堀 伸二郎: 食品中の PCB 分析法, *食品衛生研究* 55(7),33-40.2005

Application of Gel Permeation Chromatography and Silica Gel Column Chromatography for Analysis of PCBs, Chlordanes, and Organochlorine Pesticides in Stock Farm and Marine Products

Yuka Kabashima, Eiji Ueno, Harumi Oshima, Tsutomu Ono

We investigated simultaneous analytical methods for PCBs, chlordanes, and organochlorine pesticides in stock farm and marine products. These compounds were extracted from fish and meat with petroleum ether-acetone (2:1), from milk and egg with acetonitrile. The extract was cleaned up by gel permeation chromatography (GPC), and then by 4 % hydrated silica-gel column chromatography, divided into 2 fractions of petroleum ether and petroleum ether-ethyl acetate (19:1). The test solution was subjected to dual-column GC equipped with ECD. Recoveries of these compounds from fish, meat, milk and egg ranged from 61 to 118 %. Detection limits were 0.5-5 ng/g. These compounds in actual samples of fish, meat and milk could be analyzed sensitively without any interfering peaks. The present method would be useful for monitoring of the Japanese positive list system such as restriction of pesticide residue by Food Sanitation Law that had been enforced on May 29, 2006

Key words : PCBs, chlordanes, organochlorine pesticides, GPC, silica gel column chromatography, GC-ECD

他誌掲載論文抄録

Coffee consumption and the risk of endometrial cancer: evidence from a case-control study of female hormone related cancers in Japan

Kaoru Hirose, Yoshimitsu Niwa¹, Kenji Wakai², Keitaro Matsuo³, Toru Nakanishi¹ and Kazuo Tajima³

¹Department of Gynecology, Aichi Cancer Center Hospital

²Department of Preventive Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making, Nagoya University Graduate School of Medicine

³Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute
Cancer Science, 98:411-415, 2007

Coffee has become a popular beverage worldwide. Caffeine, a major ingredient of coffee, has been proposed to affect favorably on modulate circulating estrogen levels and therefore may be of importance for developments of hormone related cancers. However, epidemiologic evidence is limited and inconsistent. We examined the relationship between intake of coffee and hormone related cancer risk among Japanese women using data from the hospital-based epidemiologic research program at Aichi Cancer Center (HERPACC). In total, 2,122 breast, 229 endometrial and 166 ovarian cancer cases were included, and 12,425 women, confirmed as free of cancer, were recruited as the control group. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI) were determined by multiple logistic regression analysis.

A statistically significant inverse

association between risk of endometrial cancer and coffee consumption was noted in Japanese women, with no clear association evident for breast and ovarian cancer risk. Compared to non-drinker, the ORs of daily drinking of 1-2 cups and 3 or more cups per day for endometrial cancer were 0.64(95%CI:0.43-0.94) and 0.41 (95%CI:0.20-0.88), respectively, and the linear trend was also statistically significant ($p<0.01$). However, there was no statistically significant association between caffeine intake and endometrial cancer. In summary, the results of the present study suggested that coffee consumption reduces the risk of endometrial cancer in Japanese. Given the scarcity of studies of coffee intake and endometrial cancer and other hormone-dependent cancer risk, additional investigations are warranted.

Dietary risk factors for colon and rectal cancers: A comparative case-control study

Kenji Wakai¹, Kaoru Hirose, Keitaro Matsuo², Hidemi Ito², Kiyonori Kuriki², Takeshi Suzuki², Tomoyuki Kato³, Takashi Hirai³, Yukihide Kanemitsu³, Kazuo Tajima²

¹Department of Preventive Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making, Nagoya University Graduate School of Medicine

²Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

³Department of Gastroenterological Surgery, Aichi Cancer Center Hospital

J Epidemiol, 16:125-135, 2006

In Japan, the incidence rate of colon cancer has more rapidly increased than that of rectal cancer. The differential secular trends may be due to different dietary factors in the development of colon and rectal cancers. To compare dietary risk factors between colon and rectal cancers, we undertook a case-control study at Aichi Cancer Center Hospital, Japan. Subjects were 507 patients with newly diagnosed colon (n=265) and rectal (n=242) cancers, and 2,535 cancer-free outpatients (controls). Intake of nutrients and food groups were assessed with a food frequency questionnaire, and multivariate-adjusted odds ratios (ORs) were estimated using unconditional logistic models.

We found a decreasing risk of colon cancer with increasing intakes of calcium and insoluble dietary fiber; the

multivariate ORs across quartiles of intake were 1.00, 0.90, 0.80 and 0.67 (trend p=0.040), and 1.00, 0.69, 0.64 and 0.65 (trend p=0.027), respectively. For rectal cancer, a higher consumption of carotene and meat was associated with a reduced risk; the corresponding ORs were 1.00, 1.10, 0.71 and 0.70 for carotene (trend p=0.028), and 1.00, 0.99, 0.68, and 0.72 for meat (trend p=0.036). Carbohydrate intake was positively correlated with the risk of rectal cancer (ORs over quartiles: 1.00, 1.14, 1.42 and 1.54; trend p=0.048). This association was stronger in women, while fat consumption was inversely correlated with the risk of female colon and rectal cancers. Dietary risk factors appear to considerably differ between colon and rectal cancers.

Smoking increases the treatment failure for Helicobacter pylori eradication

Takeshi Suzuki¹, Keitaro Matsuo¹, Hidemi Ito¹, Akira Sawaki², Kaoru Hirose, Kenji Wakai³, Shigeki Sato⁴, Tsuneya Nakamura², Kenji Yamao², Ryuzo Ueda⁴, Kazuo Tajima¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

²Aichi Cancer Center Hospital

³Nagoya University Graduate School of Medicine

⁴Nagoya City University Graduate School of Medical Science

Am J Med., 119:217-224, 2006

Treatment failure for *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eradication is encountered in approximately 10-20% of patients, and many studies have pointed to a link with smoking. To investigate the effects of smoking on eradication outcome, we performed a meta-analysis. A PubMed search was performed to retrieve articles published up to August 2005. Pooled odds ratio (OR) and differences rate for *H. pylori* eradication failure in smokers compared with nonsmokers were used as summary statistics. Meta-regression was used for examining the source of heterogeneity.

Twenty-two published studies (5538 patients), which provided information on eradication failure according to smoking

status, were included in the analysis. The summary OR for eradication failure among smokers relative to nonsmokers were 1.95 (95% confidence interval [CI]:1.55-2.45; $p<.01$). It corresponds with the differences in eradication rates between smokers and nonsmokers (8.4% [95% CI:3.3-13.5%, $p<.01$]. Meta-regression analysis demonstrated that a high proportion of nonulcer dyspepsia patients in studies revealed a higher failure rate among smokers, compared with a low proportion of nonulcer dyspepsia. Our meta-analysis demonstrated that smoking increases the treatment failure rate for *H. pylori* eradication

Alcohol dehydrogenase 2 His⁴⁷Arg polymorphism influences drinking habit independently of aldehyde dehydrogenase 2 Glu⁴⁸⁷Lys polymorphism: Analysis of 2,299 Japanese subjects

Keitaro Matsuo¹, Kenji Wakai², Kaoru Hirose, Hidemi Ito¹, Toshiko Saito¹, Kazuo Tajima¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

²Department of Preventive Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making, Nagoya University Graduate School of Medicine

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 15:1009-13, 2006

Although the functional effect of alcohol dehydrogenase 2 (ADH2) His⁴⁷Arg polymorphism has been elucidated, its effect on habitual drinking remains unknown. Here, we conducted a cross-sectional study in 2,299 nonalcoholic Japanese subjects (989 men and 1,310 women). Drinking status, ethanol consumption, and physical reaction to one glass of beer were examined with regard to ADH2 and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) polymorphism. Strength of associations were assessed by age-, sex-, smoking status-, and genotype-adjusted

odds ratios and their 95% confidence intervals. ADH2 His/Arg and Arg/Arg genotypes showed higher risk for habitual drinking. Among men, ALDH2 genotype- and confounder-adjusted odds ratios (95% confidence intervals) were 1.30 (0.89-1.89) and 3.16 (1.03-9.70), and this trend was significant ($P=0.024$). A similar trend was observed among women. The combination genotypes of two polymorphisms revealed the clear effect of the ADH2 Arg allele among those with ALDH2 Glu/Lys in both sexes ($P_{\text{trend}}=0.007$ for men and 0.024 for women). Physical reactions, such as flushing

and palpitation, were significantly less common in those with Arg/Arg compared with other ADH2 genotypes, and this was marked when combined with ALDH2 Glu/Lys. Heavy drinker status was also

strongly associated with ADH2 Arg alleles. In conclusion, this study showed the strong effect of ADH2 His⁴⁷Arg polymorphism on habitual drinking regardless of ALDH2 genotype.

Effect of dietary antioxidants and risk of oral, pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma according to smoking and drinking habits

Takeshi Suzuki¹, Kenji Wakai², Keitaro Matsuo¹, Kaoru Hirose, Hidemi Ito¹, Kiyonori Kuriki¹, Shigeki Sato³, Ryuzo Ueda⁴, Yasuhisa Hasegawa³, Kazuo Tajima¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

²Nagoya University Graduate School of Medicine

³Aichi Cancer Center Hospital

⁴Nagoya City University Graduate School of Medical Science

Cancer Science 97:760-767, 2006

Several intervention trials and prospective studies have reported that β -carotene supplementation is not associated with a decreased risk of several cancers among smokers and drinkers, and that it may even have adverse effects in these groups. The relationship between dietary antioxidant intake and the risk of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) has been examined intensively, but little is known about the effects of antioxidants on HNSCC with respect to smoking and drinking habits. Here, we conducted a case-control study of 385 histologically confirmed cases of HNSCC (193 oral, 132 pharyngeal and 60 laryngeal), excluding nasal and paranasal cancer, and 1925 age-matched and sex-matched cancer-free outpatient controls using data from the

Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center, Japan. The intake of nutrients and food groups was assessed with a food frequency questionnaire, and multivariate-adjusted odds ratios for cancer were estimated for smoking and drinking habits using logistic models. The results showed an overall inverse association between the intake of dietary antioxidants, including carotene, and vitamin C and E, and risk of HNSCC. The protective effect of these antioxidants was seen in both men and women. High consumption of antioxidants was associated with a decreased risk of HNSCC among smokers, drinkers and those with both smoking and drinking habits. These findings suggest that dietary antioxidant intake prevents HNSCC in smokers and drinkers.

Meat, milk, saturated fatty acids, the Pro12Ala and C161T polymorphisms of the PPAR γ gene and colorectal cancer risk in Japanese

Kiyonori Kuriki¹, Kaoru Hirose, Keitaro Matsuo¹, Kenji Wakai², Hidemi Ito¹, Yukihide Kanemitsu³, Takashi Hirai³, Tomoyuki Kato³, Nobuyuki Hamajima², Toshiro Takezaki⁴, Takeshi Suzuki¹, Toshiko Saito¹, Rie Tanaka³, Kazuo Tajima¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

²Nagoya University Graduate School of Medicine

³Aichi Cancer Center Hospital

⁴Kagoshima University

Cancer Science 97:1226-1235, 2006

The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) gene plays important roles in energy homeostasis. To examine interactions between consumption of foods and fatty acids and the Pro12Ala and C161T (His447His) polymorphisms for colorectal cancer, we performed two case-control studies in Japanese. In study1, there were 128 colorectal cancer cases and 238 non-cancer controls, and in study2 there were 257 cases and 771 (age- and sex-matched) non-cancer controls. Assessment of food and nutrients consumption in study 1 was via a nine-item questionnaire, while in study2 assessment of consumption was according to a more detailed semiquantitative food frequency questionnaire. Consumption of food and fatty acids was divided into low, moderate and high groups. The overall frequency of the Ala allele was <4%, and the frequencies of the Pro/Pro + C/C and Pro/Pro + (C/T+T/T) genotypes were 70-73% and 20-26%, respectively. Compared with

subjects with low meat intake and the Pro/Pro + C/C genotype, those with high meat consumption and the same genotype had a stronger increased risk in study 1 [OR, 2.88; 95% CI, 1.14-7.30; p for trend =0.02], but a positive association with processed meat consumption was greatest in those with the Pro/Pro + (C/T+T/T) genotype (p for trend=0.05) in study2. Likewise, high consumption of saturated fatty acids and milk appeared to confer marginal increased risk and stronger decreased risk, respectively, in those with the Pro/Pro and Pro/Pro + C/C genotypes (OR, 1.35 and 0.65; 95%CI, 0.93-1.96 and 0.43-1.00: p for trend = 0.10 and 0.06). Further large-scale studies are needed to determine colorectal cancer risk according to relationships between the PPAR γ gene polymorphisms and dietary intake of meat, processed meat, milk and saturated fatty acids in Japanese with very low frequency of the Ala allele.

Risk of colorectal cancer is linked to erythrocyte composition of fatty acids as biomarkers for dietary intakes of fish, fat, and fatty acids

Kiyonori Kuriki¹, Kenji Wakai², Kaoru Hirose, Keitaro Matsuo¹, Hidemi Ito¹, Takeshi Suzuki¹, Toshiko Saito¹, Yukihide Kanemitsu³, Takashi Hirai³, Tomoyuki Kato³, Masae Tatematsu¹, Kazuo Tajima¹

¹Aichi Cancer Center Research Institute

²Nagoya University Graduate School of Medicine

³Aichi Cancer Center Hospital

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15:1791-1798, 2006

Consumption of fish rich in n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as docosahexaenoic acid, is suggested to reduce colorectal cancer risk through inhibition of the arachidonic acid (AA) cascade related to tumorigenesis and cell proliferation. High intake of saturated fatty acids (SFAs) may increase the risk. To examine associations between colorectal cancer risk and fatty acid compositions in erythrocyte membranes, as biomarkers for dietary intakes of fish, fat, and fatty acids, we conducted a case-control (matched by age, sex, and season of sample collection). Erythrocyte fatty acids were measured using an accelerated solvent extraction and a gas-liquid chromatography. Colorectal cancer had no association with dietary intakes of meat, fish, fat, and fatty acids. However, the risk was inversely associated

with erythrocyte compositions of docosahexanoic acid, AA, and PUFAs [the highest to the lowest tertile, odds ratios, 0.36, 0.42, and 0.15; 95% confidence intervals, 0.14-0.93, 0.18-0.95, and 0.05-0.46; $P_{\text{trend}} < 0.05$, respectively] and positively with those of palmitic acid, SFAs, and the ratio of SFAs/PUFAs (odds ratios, 6.46, 8.20 and 9.45; 95% confidence intervals, 2.41-17.26, 2.86-23.52, and 2.84-31.43; $P_{\text{trend}} < 0.005$, respectively). In conclusion, we could clearly show decreased and increased risks for colorectal cancer related to PUFAs and SFAs compositions in erythrocyte membranes, respectively, but further research is needed to investigate the discrepancy between our finding and the generally accepted role of the AA cascade.

Risk factors differ for non-small-cell lung cancers with and without EGFR mutation: assessment of smoking and sex by a case-control study in Japanese

Keitaro Matsuo¹, Hidemi Ito¹, Yasushi Yatabe², Akio Hiraki¹, Kaoru Hirose, Kenji Wakai³, Takayuki Kosaka², Takeshi Suzuki¹, Kazuo Tajima¹, Tetsuya Mitsudomi²

¹Aichi Cancer Center Research Institute

²Aichi Cancer Center Hospital

³Nagoya University Graduate School of Medicine

Cancer Sci 98:96-101, 2007

The present study aimed to assess the impact of smoking and sex for the risk of non-small-cell lung cancer (NSCLC) with or without epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation. We conducted a case-control study using 152 patients with EGFR-mutated (EGFR^{mut}) NSCLC, 283 with EGFR-wild-type (EGFR^{wt}) NSCLC and 2175 age-and sex-frequency-matched controls. Smoking was a significant risk factor for EGFR^{wt} NSCLC (odds ratio [OR] for ever-smokers, 4.05;95% confidence interval [CI], 2.79-5.88) but not for EGFR^{mut} NSCLC (OR, 0.73; CI, 0.46-1.14). Sex did not affect this association. The association was observed consistently with other smoking-related parameters including pack-years. Sex was the sole risk factor for EGFR^{mut} NSCLC (OR for women relative to men,

2.19; CI, 1.41-3.39) and there was no significant interaction between women and smoking. In contrast, sex, smoking and their interaction were significant in EGFR^{wt} NSCLC. The impact of sex on EGFR mutation status was assessed by several indicators of reproductive history among women. Total fertile years showed a significant positive association with EGFR^{mut} NSCLC but not with EGFR^{wt} NSCLC. Other indicators showed similar trends and this result may partly explain the sexual difference in the acquisition of EGFR mutation. In conclusion, our case-control study clearly demonstrated that the impacts of smoking and sex on the risk of EGFR^{mut} NSCLC are different from those for EGFR^{wt} NSCLC. Further epidemiological evaluation is warranted.

愛知県における2005年スギ・ヒノキ科花粉飛散結果および2006年飛散予測について

山口通代、櫻井博貴、清水通彦、森川保二、宮崎 豊

東海花粉症研究会誌、17巻・32回,7-12,2006

2005年のスギ・ヒノキ科花粉の本格的飛散数〔本格的飛散開始日(県内6観測定点の平均飛散数が初めて10個/cm²を超えた日)から本格的飛散終了日(最後に10個/cm²未満となった日)までの飛散数〕は県全体で88,476個/cm²と前年の約30倍の大量飛散であった。ほぼ半年前に我々が予測した104,000個の約85%で、過去17年間で5番目であった。また、17年間の幾何平均(26,849個/cm²)と比較しても例年の約3倍であった。予想飛散数より実測値飛散数が減少した

要因としては、花粉の本格的飛散開始日が平年に比べ約9日遅かったこと、および飛散がピークを迎える頃(3月下旬)の降水量が平年値に比べ約25%多かったことが考えられた。2006年飛散数予測については、県全体の総飛散数は2005年の5観測定点における総飛散数の約1/2に減少し、観測を始めてから過去17年の平均的な飛散数(本格的飛散数の算術平均47,439個/cm²、幾何平均26,849個/cm²)の約3/4に減少すると予測された。

愛知県における 2007 年スギ・ヒノキ科花粉飛散予測について

続木雅子、櫻井博貴、広瀬かおる、森川保二、宮崎 豊

東海花粉症研究会誌、18 巻・33 回、7-14,2007

愛知県花粉情報システムにおいて 2006 年シーズンからは名古屋、一宮、刈谷、豊川、設楽の 5 か所の観測定点でスギ・ヒノキ科花粉飛散数の測定を実施したところ、愛知県全体の総飛散数は 17,953 個/cm² と前シーズンの約 1/4 で、過去 18 年間で 7 番目に少なかった。これは、前年に推定した予測飛散数 36,000 個/cm² の約 50% であった。尾張部（名古屋、一宮）、西三河平野部（刈谷）および三河山間部（設楽）において実測飛散数が予測を下回った要因として、スギ花粉の飛散がピークを迎えた 3 月上旬の降水量が平年に比べ多かったこと、3 月中旬から下旬にかけて気温があまり上昇しなかったことなどが考えられる。一方、東三河平野部（豊川）にお

いて実測値が予測値を上回った要因として、3 月上旬の降水量が平年に比べやや少なかったこと、3 月中旬から下旬にかけての最高気温が平年よりやや高かったことが考えられる。

2007 年シーズンの予測飛散数は愛知県全体で 18,100 個/cm² と過去 18 年間の実測飛散数の幾何平均 26,814 個/cm² の約 2/3 であると予測された。ブロック別に見ると、三河山間部では 2006 年の 2.4 倍と前シーズンより増加すると予測された。一方、尾張部および西三河平野部では前シーズンより減少、東三河平野部では前シーズン並みの飛散と予測された。

野生動物からの E 型肝炎ウイルス (HEV) と HEV 抗体の検出および猟師らの HEV 抗体保有状況

伊藤 雅、小林慎一、山下照夫、長谷川晶子、榮 賢司

肝臓 47(6)316-318, 2006

近年、海外渡航歴のない E 型肝炎症例の報告がなされてきている。その中には野生イノシシ、シカ肉等の生食による E 型肝炎感染が疑われる報告がある。これらの状況を踏まえ、愛知県、長野県で捕獲された野生動物の HEV および HEV 抗体保有状況について調査した。また、野生動物に直接接触する機会のある猟師やその家族の HEV 抗体保有状況を調査した。野生動物の HEV 遺伝子の検出では、カモシカ 19 頭、シカ 13 頭は全て陰性であった。

イノシシは 91 頭中 11 頭(12.1%)が陽性で遺伝子型はいずれも IV 型であった。HEV 抗体保有状況は、シカは全て陰性であったが、イノシシは 25 頭(27.5%)が陽性であった。また、猟師及びその家族の抗体保有状況は 33 名中 4 名 (12.1%) が Ig G 陽性であった。陽性者はいずれも生食の経験があるが肝炎の既往歴は無く、抗体保有率は報告される一般健康者の保有率に比較して特に高いということは無かった。

エンテロウイルス 71 型 (EV71) の検出状況—愛知県

伊藤 雅、長谷川晶子、山下照夫、小林慎一、秦 眞美、田中正大、皆川洋子
病原微生物検出情報 27(7)177-178, 2006

愛知県（名古屋市を除く）では、2006 年の手足口病患者報告数が第 12 週から増加傾向にあり、第 20 週の定点あたりの報告数は 1.24 人と前週比 1.4 倍となっている。2006 年 1 月～4 月（発症月）の手足口病患者 17 名から、EV71 が 10 株、コクサッキーウイルス A16 型（CA16）が 3 株分離されている。その他の疾患から EV71 が 3 株分離されている。EV71 分離株はすべて標準株 BrCr 抗体で中和可能であった。また、RT-PCR 法にてエンテロウイルス VP1 領域の遺伝子解析を行ない、過去の EV71 分離株と比較した。今期の EV71 分離株は独立したクラスターを形成す

るものの、前回本県内で大流行をおこした 2000 年に分離された株に最も近かった。本県においては 00,03,04,05 年と EV71 の流行が繰り返されているため、2005 年に採血された県内在住者 200 名の血清を用いて EV71 に対する抗体保有状況を調査した結果、10 歳未満の抗体保有率が低いことがわかった。今後も引き続き EV71 による手足口病、無菌性髄膜炎等の流行に注意が必要である。また、EV71 は夏季に限らず検出される傾向が続いており、1 年を通じた迅速な情報提供が必要であると思われた。

Virological, Serological, and Clinical Features of an Outbreak of Acute Gastroenteritis Due to Recombinant Genogroup II Norovirus in an Infant Home

Takeshi Tsugawa^{*1}, Kazuko Numata-Kinoshita^{*1}, Shinjiro Honma^{*1}, Shuji Nakata^{*2}, Masatoshi Tatsumi^{*1}, Yoshiyuki Sakai^{*1}, Katsuro Natori^{*3}, Naokazu Takeda^{*3}, Shinichi Kobayashi, and Hiroyuki Tsutsumi^{*1}

Journal of Clinical Microbiology 44: 177-182, 2006.

Norovirus (NV) is an important cause of acute nonbacterial gastroenteritis worldwide. Recently, several sporadic cases due to naturally occurring recombinant NVs have been reported. In January 2000, there was an outbreak of gastroenteritis in an infant home in Sapporo, Japan. Of 34 residents of the home that were less than 2 years old, 23 developed gastrointestinal symptoms and NV infection was confirmed by conventional reverse transcription-PCR to detect the RNA polymerase region of genogroup II NV. In this virus, the RNA polymerase region shared 86% nucleotide identity with Hawaii virus but only 77%

with Mexico virus; however, its capsid region shared only 70% identity with Hawaii virus but 90% with Mexico virus. On the other hand, both regions shared a higher 96% nucleotide identity with Arg320 virus, which was found in Mendoza, Argentina, in 1995 and considered to be a recombinant of Hawaii and Mexico viruses. The findings indicate that the virus involved in the outbreak was similar and may have evolved from the Arg320 virus. Clinically the cases were more severe than those of previously reported sporadic or outbreak cases of NV infection.

Genetic and antigenic diversity among noroviruses

Grant S. Hansman^{*1}, Katsuro Natori^{*1}, Haruko Shirato-Horikoshi^{*1}, Satoko Ogawa^{*1}, Tomoichiro Oka^{*1}, Kazuhiko Katayama^{*1}, Tomoyuki Tanaka^{*2}, Tatsuya Miyoshi^{*2}, Kenji Sakae, Shinichi Kobayashi, Michiyo Shinohara^{*3}, Kazue Uchida^{*3}, Nakao Sakurai^{*4}, Kuniko Shinozaki^{*5}, Mineyuki Okada^{*5}, Yoshiyuki Seto^{*6}, Kunio Kamata^{*7}, Noriyo Nagata^{*8}, Keiko Tanaka^{*8}, Tatsuo Miyamura^{*1} and Naokazu Takeda^{*1}

Journal of General Virology 87: 909-919, 2006.

Human norovirus (NoV) strains cause a considerable number of outbreaks of gastroenteritis worldwide. Based on their capsid gene (VP1) sequence, human NoV strains can be grouped into two genogroups (GI and GII) and at least 14 GI and 17 GII genotypes (GI/1–14 and GII/1–17). Human NoV strains cannot be propagated in cell-culture systems, but expression of recombinant VP1 in insect cells results in the formation of virus-like particles (VLPs). In order to understand NoV antigenic relationships better, cross-reactivity among 26 different NoV VLPs was analysed. Phylogenetic analyses grouped these NoV strains into six GI and 12 GII genotypes. An antibody ELISA using polyclonal antisera raised against these VLPs was used to determine cross-reactivity. Antisera reacted strongly with

homologous VLPs; however, a number of novel cross-reactivities among different genotypes was observed. For example, GI/11 antiserum showed a broad-range cross-reactivity, detecting two GI and 10 GII genotypes. Likewise, GII/1, GII/10 and GII/12 antisera showed a broad-range cross-reactivity, detecting several other distinct GII genotypes. Alignment of VP1 amino acid sequences suggested that these broad-range cross-reactivities were due to conserved amino acid residues located within the shell and/or P1-1 domains. However, unusual cross-reactivities among different GII/3 antisera were found, with the results indicating that both conserved amino acid residues and VP1 secondary structures influence antigenicity.

新生児室におけるエコーウイルス 18 型の感染事例

幸脇正典^{*1}, 小山典久^{*1}, 山下照夫, 伊藤 雅, 長谷川晶子, 小林慎一, 秦 眞美, 田中正大, 皆川洋子

^{*1} 豊橋市民病院小児科

病原微生物検出情報、27(9) : 231-232, 2006

エコーウイルス 18 型 (E-18) は、無菌性髄膜炎、麻痺、発疹症などの病因であり、わが国においては 1988 年、1998 年に全国的な流行を起こしている。2006 年も西日本を中

心に分離が報告がされていたが、愛知県内の特定一病院内新生児 ICU において集団感染が発生した。患者は新生児 ICU 入院中の低出生体重児 7 名で、2006 年 5 月、相次いで無

呼吸発作、哺乳力低下、発熱などの症状を呈した。ウイルス検査を行ったところ7名中5名(71.4%)からE-18が分離された。7名の患者は、髄膜炎や重篤な脳脊髄炎症状を呈することなく全員速やかに回復し、経過中皮疹や粘膜疹は認められなかった。今夏は県内

の検査定点からの検体からE-18分離が未だない状況において、新生児集団発生が起こった。2003年の愛知県の流行は前2回の全国的な流行と比べ小規模であったため、本年の患者増加が危惧される。

Sequence Characteristics of HA Gene in Influenza type A (H1N1) virus isolated during 2005–2006 Season in Aichi Prefecture, Japan

Mami Hata, Masako Tsuzuki, Kenji Sakae, Hiroko Minagawa, Takashi Kimura and Yutaka Miyazaki
Jpn. J. Infect. Dis. 59(3): 209-211, 2006.

Out of the 70 isolates of Influenza A (H1N1) virus identified in the 2005-2006 season, we determined nucleotide sequences of the HA1 gene of 14 isolates. Phylogenetic tree of the isolates revealed that the isolates formed two clusters ('a' and 'b'). The isolates in the early stage of the 2005-2006 influenza season formed the cluster 'b'. The vaccine strain of the 2005-2006 season, A/New Caledonia/20/99, also belongs to the cluster 'b'. On the contrary, the isolates after January 2006 formed the cluster 'a'. A total of 5 amino acid changes from A/New Caledonia/20/99 were detected in the HA1 protein of 'b'

viruses. In contrast, 'a' viruses contained 11 amino acid changes from A/New Caledonia 20/99 and only three of them were common with 'b' viruses. These substitutions are in different antigenic sites and could potentially alter antibody-binding properties of the viruses. About 40% of AH1 viruses isolated after January 2006 was found to show 4-fold lower HI titers than the A/New Caledonia homologous titer. Our finding emphasizes the importance of vigilance against the emergence of influenza drift variants which may make the previously recommended influenza vaccine ineffective.

2005年11月中旬から12月初旬におけるAソ連型インフルエンザウイルスの地域流行—愛知県

秦 眞美、續木雅子、伊藤 雅、山下照夫、長谷川晶子、小林慎一、榮 賢司
病原微生物検出情報 27(1): 12, 2006

2005年11月中旬(05年第46週)に、愛知県尾張西部地域において今冬初のインフルエンザ地域流行がみられた。流行地域から愛

知県衛生研究所に搬入された6名の患者の鼻汁、咽頭ぬぐい液からAソ連型インフルエンザウイルスを検出した。分離された一株につ

いて遺伝子解析を試みたところ、A/New Caledonia/20/99のHA1遺伝子と塩基配列では98%の相同性が認められた。アミノ酸配列はA/New Caledonia/20/99株とは5箇所のアミノ酸が異なっていたが、A/New Caledonia/20/99と極めて近縁であることが

判明した。なお、6株全株についてNA亜型同定用のプライマーでRT-PCRを実施したところ、すべてN1のプライマーのみ遺伝子が増幅されたことから、6株ともNAはN1亜型であり、AH1N1型と同定された。

ヒトメタニューモウイルスが検出された急性脳症死亡例

清澤秀輔*、小山典久*、秦 眞美、伊藤 雅、長谷川晶子、山下照夫、田中正大、小林慎一、皆川洋子

*豊橋市民病院

病原微生物検出情報 27(11): 318-319, 2006

豊橋市民病院にて急性脳症と診断されたが、死亡に至った6ヶ月の女兒からヒトメタニューモウイルス(HMPV)が検出された。入院時に採取された咽頭拭い液、髄液、尿、血清をVero, HeLa, RD-18Sに接種し、ウイルス分離を試みたが陰性であった。HMPV感染を疑い、咽頭拭い液よりRNAを抽出してRT-PCRを実施した結果、HMPVの存在を示すバンドが検出された。そこで咽頭拭い液をLLC-MK2細胞に接種したところ、培養7日目にCPEを認めた。培養上清について同様

にRT-PCRを実施して得られたPCR産物および咽頭拭い液から得られたPCR産物は同一の塩基配列をもつことを確認した。系統樹解析の結果、A2遺伝子型に分類された。さらに、尿由来RNAからもHMPV遺伝子配列が確認された。HMPV感染症は主に上気道及び下気道感染症を起こすとされているが、今回の症例は、発生動向調査でHMPVが検出された患者における初めての死亡例であり、HMPVが神経系に重篤な傷害をもたらす可能性を示唆している。

東海地区におけるHIV初感染者の薬剤耐性変異(ジェノタイプ)について

榮 賢司、秦 眞美、續木雅子

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV検査体制の構築に関する研究」(主任研究者今井光信) 平成17年度研究報告書 247-249, 2006

HIV感染症の治療は抗HIV薬のプロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤のコンビネーションによる多剤併用療法により劇的に改善された。しかし、治療からの離脱や中断により耐性ウイルスの出現が確認され、それら耐性ウイルスの未治療者への伝播が問題となってきている。そこで、2005年に愛知県内の保健所及び医療機関でHIV感染が疑われ、愛知県衛生研究所での確認検査によりHIV感染が確認された15名の血清を用いてプロテア

ーゼおよび逆転写酵素遺伝子の解析を行い、耐性ウイルスの浸淫状況について検討した。その結果、15名中3名からProtease阻害剤のMajor変異であるM46Iおよび1名からD30Nが、さらに、2名から核酸系RT阻害剤に対する薬剤耐性を示すY115FとF77Lがそれぞれ検出された。今回の調査より東海地区においても耐性ウイルスの伝播は着実に拡がっていると示唆された。

東海地区における HIV 初感染者の薬剤耐性変異（ジェノタイプ）について

榮 賢司、秦 眞美、續木雅子、佐藤克彦、森下高行、鈴木康元

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV検査体制の構築に関する研究」（主任研究者今井光信） 総合研究報告書（平成 15-17 年度） 263-266. 2006

HIV 感染症の治療は抗 HIV 薬のプロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤のコンビネーションによる多剤併用療法により劇的に改善された。しかし、治療からの離脱や中断により耐性ウイルスの出現が確認され、それら耐性ウイルスの未治療者への伝播が問題となってきた。そこで、2003-5 年に愛知県内の保健所及び医療機関で HIV 感染が疑われ、愛知県衛生研究所での確認検査により HIV 感染が確認された 44 名の血清を用いてプロテアーゼおよび逆転写酵素遺伝子の解析を行い、耐性ウイルスの浸淫状況について検討した。その結果、2003 年度では、解析のできた 9

名のうち 1 名から Protease 阻害剤の Major 変異である M46I が検出され、2004 年度では、16 名中 1 名から多剤の非核酸系 RT 阻害剤に対する強い薬剤耐性を示す K103N が検出された。2005 年度では、15 名中 3 名から Protease 阻害剤の Major 変異である M46I および 1 名から D30N が、さらに、2 名から核酸系 RT 阻害剤に対する薬剤耐性を示す Y115F と F77L がそれぞれ検出された。3 年間の調査より東海地区においても耐性ウイルスの伝播は着実に広がっていると示唆された。

α ヘルペスウイルスの潜伏感染と再活性化機構

皆川洋子

日本臨床 64 S3:192-197, 2006.

α ヘルペスウイルス亜科に属する単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)、同 2 型(HSV-2)、水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)及びサルモネラ B ウイルスは、ヒトに感染することが知られている。これらは固有宿主の神経節細胞に潜伏感染し、種々の誘因により再活性化した感染性ウイルスが神経節支配領域の皮膚粘膜に出

現して回帰発症病変を形成、という共通の生活環をとる。

主に HSV-1 の潜伏感染・再活性化メカニズムを説明し、T 細胞や腫瘍壊死因子(TNF)やインターフェロンなどサイトカインを介した宿主による潜伏感染制御に関する新たな知見を紹介した。

Recombinant wild-type measles virus containing a single N481Y substitution in its haemagglutinin cannot use receptor CD46 as efficiently as that having the haemagglutinin of the Edmonston laboratory strain.

Seki F, Takeda M, Minagawa H, Yanagi Y.

J. Gen. Virol. 87(6):1643-1648, 2006.

Signalling lymphocyte activation molecule (SLAM) acts as a cellular receptor for Measles virus (MV). The recombinant MV, based on a SLAM-using clinical isolate in which asparagine at position 481 of the haemagglutinin was replaced with tyrosine, was generated. Characterization of this recombinant virus revealed that the N481Y substitution in the haemagglutinin allowed it to utilize CD46 as an alternative receptor, but that its ability to use CD46 was rather low in CD46+ SLAM- cell lines compared

with that of the recombinant virus possessing the haemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. Thus, an N481Y substitution alone may not be sufficient to make SLAM-using MVs use CD46 efficiently, suggesting that further substitutions in the haemagglutinin are required for them to grow efficiently in CD46+ cells like the Edmonston strain. This may be a reason why few CD46-using MVs are detected in vivo.

教室紹介 愛知県衛生研究所 微生物部

皆川洋子

ウイルス 56(2):259-261, 2006

当所微生物部の略歴及び現在の検査研究体制、研究テーマ、今後の展開について、読者

層に配慮してウイルス担当を主体に記述した。

Development of a Rapid Strain Differentiation Method for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Japan by Detecting Phage-Derived Open Reading Frames.

Masahiro Suzuki, Yukio Tawada¹, Minoru Kato¹, Hiromi Hori¹, Naoto Mamiya¹, Yumiko Hayashi², Manabu Nakano³, Ritsuko Fukushima⁴, Atsuo Katai⁵, Tomoyuki Tanaka⁶, Mami Hata, Masakado Matsumoto, Masao Takahashi and Kenji Sakae

¹National Hospital Organization Nagoya Medical Center

²National Hospital Organization Toyohashi Medical Center

³National Hospital Organization Mie Chuo Medical Center

⁴National Hospital Organization Kanazawa Medical Center

⁵Division of Laboratory Medicine, Kinan General Hospital

⁶Sakai City Institute of Public Health

Journal of Applied Microbiology, 101:938-947, 2006.

Aims: To develop a rapid genotyping method for investigating outbreaks of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated in Japan.

Methods and Results: Isolates were genotyped by detecting the keeping pattern of 16 open reading frames (ORFs), a process we call phage ORF typing (POT).

Thirteen of the ORFs were selected from phage genomes and one from a genomic island SaGI_m in the genome of strain Mu50. The other two ORFs, one from Tn554 and one from staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type II, were used as strain markers. Three hundred sixty-eight isolates from five hospitals were classified into 133 types by POT, whereas they were classified into 139 types by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) subtyping. The discriminatory power of POT ($D=0.989$) was equal to that of PFGE subtyping ($D=0.986$).

Conclusions: MRSA isolates collected in Japan can be genotyped by detecting the keeping pattern of phage-derived ORFs with a discriminatory power equal to that of PFGE subtyping.

Significance and Impact of the study: MRSA isolates can be genotyped rapidly by detecting phage-derived ORFs. Since particular pandemic clones can be found in a specific region, a typing method localized to a pandemic clone may be effective for the rapid genotyping of MRSA during outbreaks.

Epidemiology and molecular analysis of group A streptococci from patients involved in food-borne disease outbreaks in Japan between 1996 and 2003.

Tanaka D, Shima T, Isobe J, Watahiki M, Matsumoto M, Endoh M, Okuno R, Ogata K, Nagai Y. Japanese Journal of Infectious Disease, 59(3):202-3, 2006

要旨なし

Typing of *bfpA* Genes of Enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Thailand and Japan by Heteroduplex Mobility Assay

Mariko Iida^{1, 2}, Mitsugu Yamazaki, Jun Yatsuyanagi³, Orn-Anong Ratchtrachenchai⁴, Sarayoot Subpasu⁴, Noboru Okamura², and Kenitiro Ito¹

¹ Infectious Diseases Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases,

² Microbiology and Immunology, Department of Allied Health Sciences, Tokyo Medical and Dental University,

³ Akita Prefectural Institute of Public Health,

⁴ Department of Medical Sciences, National Institute of Health, Thailand.

Microbiolgy and Immunology,50(9):713-717,2006.

We developed a rapid genetic approach for screening *bfpA* variants of enteropathogenic *E.coli* (EPEC) using a heteroduplex mobility assay (HMA). A

total of 204 human EPEC strains were isolated in Thailand and Japan. Of 34 *bfpA*-positive EPEC strains, *bfpA* variants were classified into 5 HMA-types. Different

HMA-types were found in EPEC of the same serotypes. The results suggest that HMA is a simple and easy method to

analyze polymorphism of *bfpA* gene, and can be used in laboratories without large apparatus such as sequencers.

散発下痢症患者由来のフルオロキノロン耐性大腸菌における *gyrA* 遺伝子および *parC* 遺伝子の変異

石畝 史¹⁾、東方美保¹⁾、山崎 貢、松雪星子²⁾、森屋一雄³⁾、田中大祐⁴⁾ 磯部順子⁴⁾、京田芳人¹⁾、村岡道夫¹⁾

1) 福井県衛生環境研究センター 2) 佐賀県衛生薬業センター 3) 佐賀県健康増進課
4) 富山県衛生研究所
感染症学雑誌, 80(5): 507-512, 2006.

1991年～2005年の福井県など4県における散発下痢症患者由来の大腸菌 O153 107株について、市販の薬剤感受性ディスクを用いたKB法(Kirby-Bauer)法で12剤の薬剤感受性を調べた。薬剤別耐性菌出現率はampicillinが72.9%、streptomycinが48.6%、tetracyclinおよびsulfisoxazoleが46.7%、nalidixic acid (NA)が29.9%およびciprofloxacin (CPFX)が24.3%などであった。7～10剤に耐性を示す18株中16株など計26株が、NAおよびCPFXに耐性を示した。NAおよびCPFXに耐性を示した24株とNAに耐性を示した1株について、*gyrA*および*parC*遺伝子の解析を行った結果、次の4typesに分けられた。type 1 (1株) GyrA (S83L)・ParC (S80I)、type 2 (12株) GyrA

(S83L&D87N)・ParC (S80I)、type 3 (8株) GyrA (S83L&D87N)・ParC (S80I・E84G) または (S80R・E84V)、type 4 (4株) GyrA (S83L&D87N)・ParC (S80I&A108T)。アミノ酸変異とfluoroquinolone (FQ)系薬剤の最小発育阻止濃度(MIC)との関連をみると、CPFX、ofloxacinおよびnorfloxacinのMICはtype 1では、それぞれ1μg/mL、2μg/mL、および8μg/mL、type 2では8～32μg/mL、8～32μg/mLおよび16～256μg/mL、type 3, 4では32～256μg/mL、32～128μg/mLおよび128～>512μg/mLであった。患者由来のFQ系薬剤耐性大腸菌O153が多剤耐性傾向を示すとともに、*gyrA*および*parC*で各々1～2か所の変異がみられた。

Serum levels of volatile organic compounds in patients with sick building syndrome.

Fumio Kondo, Yoshitomo Ikai, Tomomi Goto, Yuko Ito, Hisao Oka, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhei Odajima, Michihiro Kamijima, Eiji Shibata, Shinpei Torii, Yutaka Miyazaki
Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 77, 331-337 (2006).

In this study we intended to examine (1) whether HS-GC/MS was applicable to the

measurement of serum VOC concentrations in SBS patients and volunteer controls, and

(2) whether the elevation of serum VOC levels correlated with SBS symptoms. Despite the successful application of our HS-GC/MS method, we found no statistical differences in the concentrations of studied VOCs between the patients and controls. We also found no relationship between serum

VOC levels and SBS symptoms in the patients studied. Therefore, we must consider that it is difficult to identify the responsible VOCs and their serum levels inducing SBS symptoms from the results of this study.

Cell Bioassay for Paralytic Shellfish Poisoning (PSP): Comparison with Post-Column Derivatization Liquid Chromatographic Analysis, and Application to the Monitoring of PSP in Shellfish

Rumiko Hayashi, Hiroshi Saito, Masanao Okumura and Fumio Kondo
Journal of Agricultural and Food chemistry, 54(2), 269-273, 2006.

We performed a neuroblastoma cell (Neuro2a) culture assay modified slightly from a method reported previously to provide a simple and sensitive evaluation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxicity in shellfish. The cell bioassay was just as sensitive for C-toxins as for gonyautoxins. The sensitivity of our cell bioassay was 4 times that of the current standard mouse bioassay. Using the cell bioassay, we evaluated PSP toxicity in 361 shellfish samples collected from Mikawa Bay and Ise Bay, Aichi Prefecture, Japan from April 1999-March 2002. The results were compared with those obtained in a postcolumn derivatization liquid chromatographic analysis. PSP toxins were detected in 236/361 samples by both

assays, and there was a fairly good correlation ($r=0.9001$, $n=236$, $p<0.001$) between the results from the two assays. We applied this cell bioassay when short-necked clams in the bay turned poisonous in 2001. The chronological changes in PSP toxicity in the short-necked clams were analyzed and compared with those of the cell density of poisonous plankton (*Alexandrium tamarense*) occurring in the bay. The PSP toxicity in shellfish peaked 2 weeks after the cell density reached a maximum. We recommend using the cell bioassay for routine monitoring of PSP toxicity in shellfish living in natural marine environments.

食用の天然および栽培キノコに含まれる発熱性物質について

奥村正直、都築秀明、富田伴一

食品衛生学雑誌 47(4) 164-166 (2006)

愛知県内で採取した天然キノコと市販の栽培キノコに含まれる発熱性物質の量を比較するために、市販の野菜を対照として、日本薬局方に定めるエンドトキシン試験と発熱性物質試験を行った。その結果、エンドトキシン試験では、今回用いた天然キノコには、栽培

キノコや市販の野菜に比べて明らかに多量のエンドトキシンが含まれていた。また、栽培キノコよりも対照の野菜の方がエンドトキシン量はやや多い結果となった。同時に、発熱性物質試験でもエンドトキシン試験にほぼ対応した結果が得られた。

Determination of spinosad in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection after gel permeation chromatography and solid-phase extraction cleanup on a 2-layered column

Eiji Ueno[†], Harumi Oshima, Hiroshi Matsumoto, Isao Saito^{*1}, Hiroto Tamura^{*2}

^{*1}Food Safety and Quality Research Center, Tokai COOP Federation

^{*2}Faculty of Agriculture, Meijo University

J. AOAC Int., 89: 1641-1649, 2006.

A simple and reliable method was developed for the determination of spinosyns A and D, the active ingredients of spinosad, in vegetables and fruits, by high-performance liquid chromatography with UV detection and confirmation by mass spectrometry; the method was selected gel permeation chromatography and a 2-layered column for solid-phase extraction system. An aliquot of the crude sample extract obtained by acetonitrile extraction is loaded into the GPC system. The fraction containing spinosyns A and D is selectively collected and loaded directly onto a 2-layered column consisting of

graphitized carbon (upper layer) and cyclohexyl-bonded silica gel (lower layer). After the column is washed with the GPC mobile phase acetone-cyclohexane (3 + 7), the column is eluted with acetonitrile containing 2% triethylamine. The eluate is used for HPLC-UV/MS analysis. Average recoveries from fortified cabbage, green perilla, fig, and strawberry at analyte concentrations of 0.05 and 0.25 mg/kg were >85%, and the relative standard deviations were <9%. The detection limits for spinosyns A and D in green perilla were 0.005 mg/kg by UV detection and 0.001 mg/kg by MS detection.

HPLCによる食品中メトプレンの分析法

斎藤 勲、上野英二、大島晴美、松本 浩、佐々木久美子*¹、米谷民雄*¹

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生学雑誌, 47: 173-177, 2006.

GC-FIDを用いるメトペン試験法を見直すための検討を行った。試料からアセトニトリル抽出し、塩析により水層分離後、アセトニトリル層を少量のヘキサンで洗浄、次いでフロリジルカラムで精製してHPLC-UVで測定した。小麦など7種類の試料からの平均回収率は74.6~82.8%と良好であった。さらに本法を6機関で評価したところ、

5種類の試料からの平均回収率は79.4~84.6%、併行再現性および室間再現性の相対標準偏差はそれぞれ2.3~8.8%、8.8~23.6%であった。1機関でらっかせいからの回収率が高かったために室間再現性が高くなったのを除いて良好な結果が得られた。検出限界は0.001~0.02 μ g/gであった。

デュアルカラムGCの食品中残留農薬分析への利用について (講座)

上野英二

食品衛生学雑誌, 47: J299-J304, 2006.

食品衛生法改正による残留農薬規制等のポジティブリスト制が、平成18年5月29日から導入された。この新たな基準に対応して効果的な監視・検査業務を行うためには、農薬の使用実態や食品中残留実態などを把握して対象農薬を的確に選択することが必要となってくる。また、必要な機器の整備、スタッフの対応能力の向上に加えて、効率的な分析法の作成を図りながら検査機能を強化していく必要がある。また、ポジティブリスト制下においてMS(MS)は、整備すべき最優先の機器

ではあるが、一つの検出器に過ぎず、データ解析などにおける操作の複雑さもあって、従来の選択検出器付きGCを加えた複数検出器の必要性が強く示唆された。そこで、シングルインジェクション方式のデュアルカラムGC-NPD/FPD、デュアルカラムGC-ECD/ECD、およびデュアルインジェクション方式のデュアルカラムGC/MSを用いた、より多くの種類の食品に対応可能な十分な頑健性を有する、信頼性の高い分析法について解説した。

農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の精度管理に関する研究

遠藤 明*¹、田中之雄*²、酒井 洋*³、上野英二、田中敏嗣*⁴、宇野正清*⁵、宇治田正則*⁶、佐々木珠生*⁷、堤 泰造*⁸、衛藤修一*⁹

*¹ (財) 食品薬品安全センター、*² 大阪府立公衆衛生研究所、*³ 新潟県保健環境科学研究所、*⁴ 神戸市環境保健研究所、*⁵ 奈良県保健環境研究センター、*⁶ 和歌山市衛生研究所、*⁷ 広島市衛生研究所、*⁸ 徳島県保健環境センター、*⁹ 北九州市環境科学研究所
厚生労働科学研究補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「検査機関の信頼性確保に関する研究」遠藤 明(主任研究者)、田中之雄(分担研究者)

平成17年度分担研究報告書: 25-80, 2006.

残留農薬規制のポジティブリスト制への移行に伴い、多くの農薬成分についての的確な検査が要求され、その検査結果の信頼性確保が重要な課題となっている。そこで、従来から重要性が指摘されている外部精度管理試験の手法について検討した。トマトジュース、野菜ジュース、およびマイクロペースト状のレッドピーマンとジャガイモに、3あるいは4種類の農薬を添加したものを9機関の地方衛生研究所に配布し、農薬の種類および5回試行の濃度を求める試験（double blind spike

test）を行った。その結果、全機関が添加された農薬をすべて正しく検出した。Xbar-R管理図による方法と検査精度の相対的な判定に有効なzスコアによる方法で評価したところ、各検査項目でXbar-R管理図およびzスコアで適正域に入っていない機関が認められた。探索的データ分析（visual data mining）による要因解析の結果、抽出回数、精製方法、検量線の濃度幅など各機関のSOPの違いが検査精度に影響していると考えられた。

The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in cereals and beans by dual countercurrent chromatography and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry

Tomomi Goto, Yuko Ito, Sadaji Yamada, Hiroshi Matsumoto, Hisao Oka^{*1}, Hisamitsu Nagase^{*2}, Yoichiro Ito^{*3}

^{*1}Faculty of Pharmacy, Kinjo Gakuin University

^{*2}Gifu Pharmaceutical University

^{*3}National Institutes of Health

Journal of Liq. Chromatogr., 29: 2651-2661, 2006.

We developed a new analysis method for N-methyl carbamate pesticides in cereals and beans using dual counter-current chromatography (dual CCC) and liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI LC/MS/MS). After pesticides were extracted from cereals and beans with ethyl acetate, each extract was cleaned up by dual CCC using a non-aqueous binary solvent system composed of n-hexane-acetonitrile and analyzed by ESI LC/MS/MS with a short

column. The average recoveries from cereals and beans fortified at the level of 0.01 ppm ranged from 73.9 to 119.6 % with the coefficients of variation from 0.7 to 6.8 %. At the fortified level of 0.5 ppm, the recoveries ranged from 72.1 to 117.1 % with the coefficients of variation from 0.4 to 9.3 %. The present analysis method of N-methyl carbamate pesticides in cereals and beans is considered to be useful for monitoring the pesticides residues in cereals and beans.

Analysis of Crude Drugs Using Reversed-Phase TLC/Scanning Densitometry (II) Identification of Ginseng, Red Ginseng, Gentian, Japanese Gentian, Pueraria Root, Gardenia Fruit, Schisandra Fruit and Ginger

Tsutomu Ohno, Eiichi Mikami, Hisao Oka
J. Nat. Med., 60: 141-145, 2006.

We performed identification tests of crude drugs (ginseng, red ginseng, gentian, Japanese gentian, pueraria root, gardenia fruit, schisandra fruit, and ginger) by reversed-phase TLC/scanning densitometry. Ginsenoside-Rg₁ could be separated from the sample solutions of ginseng and red ginseng using sodium sulfate (1 → 20)/acetonitrile/methanol mixture solution (10 : 7 : 3). Gentiopicroside could be separated from the sample solutions of gentian and Japanese gentian using water/acetonitrile mixture solution (7 : 3), and puerarin from pueraria root sample solution using sodium sulfate (1 → 20)/acetonitrile/methanol mixture solution (10 : 3 : 3). Geniposide could be separated

from gardenia fruit sample solution using sodium sulfate (1 → 20)/acetonitrile/methanol mixture solution (10 : 3 : 3). Schizandrin could be separated from schisandra fruit sample solution using n-hexane/2-butanone mixture solution (3 : 1) while [6]-gingerol could be separated from ginger sample solution using 2-butanone/methanol/water mixture solution (1 : 1 : 1). To identify these components, UV absorption spectra of the spots developed on reversed-phase TLC plates using a scanning densitometer were measured. As a result, the UV absorption spectra and the maximum wavelengths of the sample solutions of the crude drugs were consistent with those of standard solutions.

「医薬品」の試料溶液調製法

三上栄一

ぶんせき, 2006 : 260-261

医薬品は、服用する立場の患者を保護するため、高度に品質の確保された製品の供給が要請されている。この目的達成のため、定量分析、化学構造の確認試験、純度試験など各種分析による精度の高い品質評価法が必須となる。また投与された医薬品は吸収、分布、代謝、排泄といった過程を経つつ、その一部が作用点に達し薬効を示す。薬物動力的な測定結果は、処方、投与方法、投与量などのドラッグデザイン、患者の薬物濃度モニタリングに寄与する。一方近年いわゆる健康食品に、

作為的に医薬品成分が混入され、製品を購入、摂取した消費者の健康被害事例が報告されている。消費者の健康を守る上で、医薬品成分が添加されたいわゆる健康食品に対しては、薬事法により無承認無許可医薬品として監視されており、医薬品成分を検索するための分析の必要性が高まっている。このような状況のもと、本稿では原薬・製剤、生体試料、健康食品に含まれた医薬品成分の分析時に必要となる試料溶液調製法の概要について記述した。

編集情報運営委員会

委員長：森川保二

委員：續木雅子（企画情報部）

鈴木匡弘（微生物部・細菌）

小林愼一（微生物部・ウイルス）

奥村正直（毒性部）

山田貞二（化学部）

大沼章子（生活科学部）

愛知県衛生研究所報

第 57 号

平成 19（2007）年 3 月 発行

愛知県衛生研究所

所長事務取扱：吉田 京

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6 号

愛知県衛生研究所のホームページ <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>

電話：ダイヤルイン

所 長 室：052-910-5604	毒性部・毒性病理科：052-910-5654
次 長：052-910-5683	毒性部・毒性化学科：052-910-5664
研 究 監：052-910-5684	化学部・生活化学科：052-910-5638
総 務 課：052-910-5618	化学部・環境化学科：052-910-5639
企 画 情 報 部：052-910-5619	化学部・薬品化学科：052-910-5629
微生物部・細菌：052-910-5669	生活科学部・水質科：052-910-5643
微生物部・ウイルス：052-910-5674	生活科学部・環境物理科：052-910-5644
FAX：052-913-3641	e-mail： eiseiken@pref.aichi.lg.jp

（この刊行物は古紙配合率 100%の再生紙を使用しています）