

愛知県衛生研究所報

第 58 号 平成 20 年 3 月

目 次

調査研究

Human parechovirus の検出ならびに同定方法の検討 1

伊藤 雅、山下照夫、都築秀明、椋島由佳、藤浦 明、長谷川晶子、長谷聡子、
榮 賢司、皆川洋子

愛知県住民の尿中金属量 () - カドミウムの常在値及び生活習慣との関連 - 9

小島美千代、林留美子、遠山明人

マイクロ電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィーによる

食品中の多成分残留農薬分析法の検討 19

上野英二、椋島由佳、大島晴美、大野 勉

ダイエット用健康食品 (美秀堂、加强型) に添加された医薬品成分の検索 29

三上栄一、池田清栄、大野 勉

他誌掲載論文抄録 37

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

Volume58, March 2008

Contents

Original Papers

Detection of Human parechovirus and examination of the identification method	1
Miyabi Ito, Teruo Yamashita, Hideaki Tsuzuki, Yuka Kabashima, Akira Fujiura, Akiko Hasegawa, Satoko Nagaya, Kenji Sakae, Hiroko Minagawa	
Study on Urinary Concentrations of Cadmium in Residents of Aichi Prefecture	9
Michiyo Kojima, Rumiko Hayashi, Akito Toyama	
Multi-residue analysis of pesticides in foods by gas chromatography with micro-electron capture detector	19
Eiji Ueno, Yuka Kabashima, Harumi Oshima, Tsutomu Ohno	
Detection of sibutramine, phenolphthalein, and thyroid hormone as adulterants in a slimming supplement	29
Eiichi Mikami, Seiei Ikeda, Tsutomu Ohno	
Summeries of papers accepted in other journals	37

調 査 研 究

Human parechovirus の検出ならびに同定方法の検討

伊藤 雅、山下照夫、都築秀明、椋島由佳、藤浦 明、
長谷川晶子、長谷聡子、榮 賢司、皆川洋子

【要旨】

ピコルナウイルス科エンテロウイルス属から独立したヒトパレコウイルス (Human parechovirus:HPeV)には 2007 年現在、6 種類の血清型/遺伝子型が報告されているが、その病原性について明らかでない。平成 11~18 (1999~2006) 年度の愛知県感染症発生動向調査事業の一環として収集された患者糞便検体から細胞培養法及び RT-PCR 法を併用した HPeV の検出を試みたところ、4309 検体のうち細胞培養法により HPeV が検出されたのは 68 件(1.6%)、5' UTR の一部を特異的に増幅する RT-PCR 法によると 104 件(2.4%)が陽性であった。検出された HPeV104 件の血清型/遺伝子型の内訳は HPeV-1(58), HPeV-3(44), HPeV-4(1), HPeV-6(1)であった。HPeV-1 は毎年度検出されており、HPeV-3 は 2000, 2005 年を除き各年度検出された。疾患別では HPeV-1 の 31 件(53%)及び HPeV-3 の 12 件(27%)が感染性胃腸炎患者検体から、一方呼吸器感染症検体由来は HPeV-1 の 11 件(19%)、HPeV-3 の 14 件(32%)を占め、両疾患との関連が示唆された。

キーワード：ヒトパレコウイルス、系統樹解析、血清型/遺伝子型、胃腸炎、呼吸器感染症

はじめに

ピコルナウイルス科エンテロウイルス属には、小児麻痺の原因として重要なポリオウイルスをはじめコクサッキー、エコー、エンテロウイルス 71 型などが知られている。このうちエコーウイルス 22 型及び 23 型は、1956 年に小児夏季下痢症の病原体として分離されたウイルス¹⁾であるが、他のエンテロウイルス属とは生物学的及び遺伝子学的相違に基づき 1999 年にパレコウイルス属 (*Parechovirus*: para「傍」+echo)として独立した²⁾。Human parechovirus 1 (HPeV-1; 旧エコーウイルス 22 型)は、小児の多様な疾患と関連した分離報告がなされている³⁾。

1999 年に愛知県内医療機関において一過性麻

痺症状を示した 1 歳小児の糞便検体より、当所において分離されたウイルスはパレコウイルス属の新しい型である HPeV-3⁴⁾として国際ウイルス命名委員会 (ICTV) に登録された。2007 年現在、ヒトパレコウイルスには 6 種類の血清型/遺伝子型が報告されている。HPeV は培養細胞を用いた分離が可能であるが、新たな血清型/遺伝子型は、既存の抗血清を用いた中和抗体法では同定型別が困難であり、現状では遺伝子断片の核酸配列から遺伝子型決定を試みる方が実際的である。そこで、逆転写 - ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription - polymerase chain reaction: RT-PCR) 法を用いた迅速かつ高感度の同定法を確立するために特異的プライマーの有用性を検

討した。

HPeV が、近年わが国の感染症発生動向調査において検出が報告されるウイルス全体に占める割合は1%以下と、エンテロウイルス属が例年30～50%程度であるのに比較して低く、疾患との関連についても不明な点が多く残されている。そこで、過去の本県における HPeV の侵淫状況を調査し、さらに血清型/遺伝子型と疾病との関わりを解析した。

材料と方法

本県において1999年～2006年に感染症発生動向調査検体として集められ凍結保存されていた患者糞便検体(約4,300件)を用い、HeLa, Vero細胞を用いた細胞培養法及び Joki-Korpelaら⁵⁾が設計したHPeV-1の非構造領域(5' UTR)の一部を増幅するプライマー-ev22+, ev22-を用いたRT-PCR法を用いて検出し、両者を比較・検討した。

また血清型/遺伝子型の同定に有用なPCRプライマーを設計するため、上記糞便検体から抽出したRNAを用い、VP1遺伝子領域を増幅するプライマー-HPeV-VP1-S(+':5' -GGD ARR MTK GGD VAW GAY GC -3')とHPeV-VP1-AS2(-':5' -TCY ARY TGR TAY ACA YKS TCT CC-3')及び nested-PCR 用 HPeV-VP1-AS(-':5' -CCA TAR TGY TTR TAR AAA CC-3')を併用したOne-step PCR法(RT反応50・30分 95・1分 94・1分+42・1分+72・90秒を35サイクル 72・10分)を行った。1.5%アガロースゲル電気泳動後、ethidium bromide染色下に検出したPCR産物をpGEM-Tベクターに組み込みクローニング後、塩基配列を決定した。検出されたHPeVについては、データベース上に登録されている HPeV1～6型各標準株 HPeV-1:Harris(L02971)⁶⁾, HPeV-2:Williamsos(AJ005695)⁷⁾, HPeV-3:A308-99(AB084913)⁴⁾, HPeV-4:K251176-02(DQ315670)⁸⁾, T75-4077(AM235750)⁹⁾, HPeV-5:86-6760 Connecticut/86 (AF055846)¹⁰⁾, T92-15(AM235749)⁹⁾, HPeV-6:NI I561-2000(AB252582)¹¹⁾及びVP1領域の登録されている分離株の遺伝子配

列を基に塩基配列及び推定アミノ酸配列についてNJ (Neighbor-Joining) 法を用いた分子系統樹解析を行い、血清型/遺伝子型を同定した。また、患者情報に基づき性別、年齢、流行の状況や臨床症状等と血清型/遺伝子型の関連性を解析した。

結果

スクリーニング検査では、調査した4309検体のうち細胞培養法による HPeV の検出は68件(1.6%)であったのに対して、5' UTRの一部を特異的に増幅する RT-PCR 法による検出は、細胞培養法陽性検体全てを含む104件(2.4%)であった。(表1)

表1 細胞培養法及びRT-PCR法を用いた糞便検体からの HPeV 検出数

年	検体数	陽性数(陽性率)	
		細胞培養法	RT-PCR法
1999	1006	17(1.7%)	31(3.1%)
2000	574	4(0.7%)	6(1.0%)
2001	215	4(1.9%)	6(2.8%)
2002	275	8(2.9%)	10(3.6%)
2003	373	1(0.3%)	10(2.7%)
2004	506	10(2.0%)	13(2.6%)
2005	559	8(1.4%)	12(2.1%)
2006	801	16(2.0%)	16(2.0%)
全体	4309	68(1.6%)	104(2.4%)

スクリーニング検査に使用した による RT-PCR 産物の塩基配列の分子系統樹解析では新たに登録された3～6型の HPeV 標準株を含め血清型/遺伝子型の同定が困難であることが判明した(図1)。そこで構造蛋白質(VP1)領域の RT-PCR を行い、増幅産物が得られた66件について PCR 産物の塩基配列を決定し、HPeV 標準株と比較する分子系統樹解析に供したところ、分離ウイルスの中和試験から決定した血清型と一致する遺伝子型別が可能であった(図2)。

以上の方法で検出された HPeV104 件の血清型/遺伝子型の内訳は HPeV-1(58),

HPeV-3(44), HPeV-4(1), HPeV-6(1)であった。

HPeV-1 の 11 件(19%)、HPeV-3 の 14 件(32%)を占

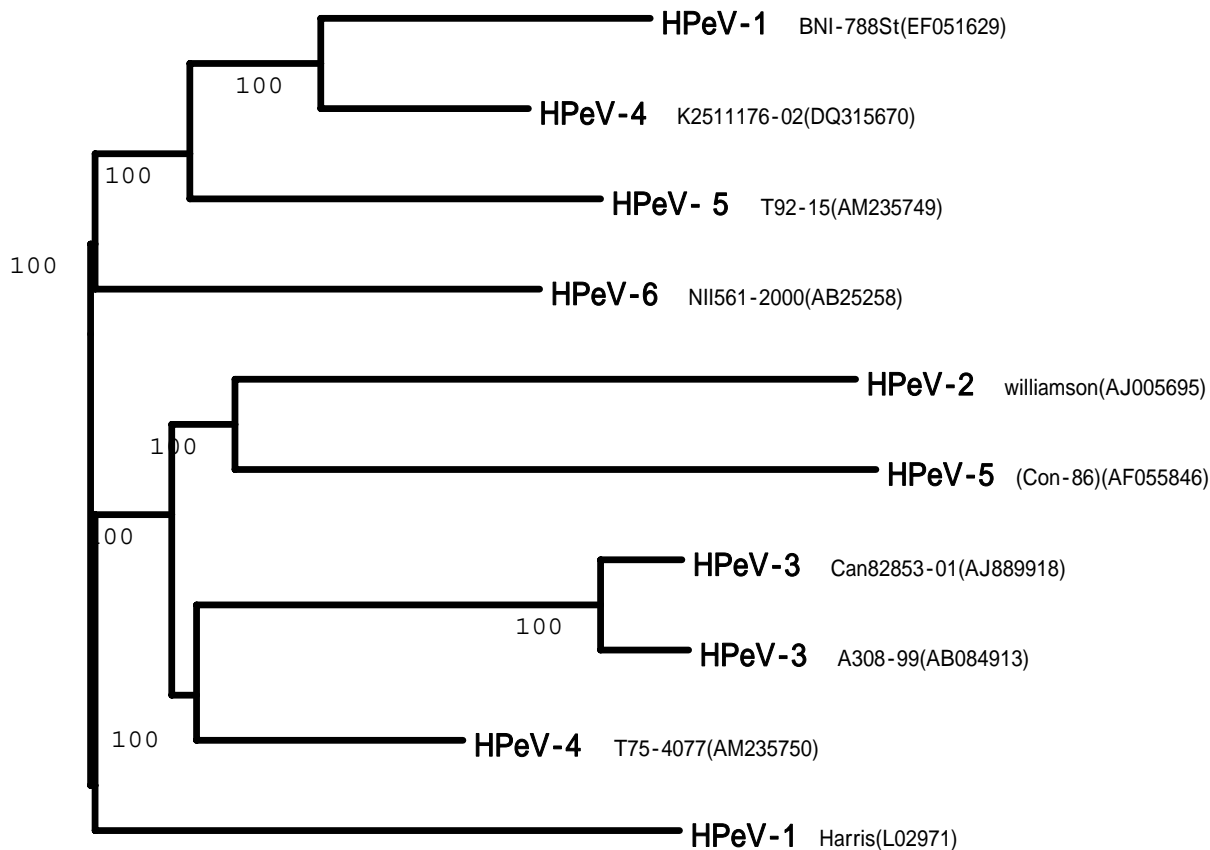


図1 5 UTRの一部を増幅するプライマーを用いた標準株の分子系統樹解析(NJ法)

HPeV-1(), HPeV-4(), HPeV-5()は同一血清型でもクラスターを形成しない

HPeV-1 は毎年度検出されており、HPeV-3 は 2000, 2005 年を除き各年度で、HPeV-4 は 2006 年度に、HPeV-6 は 2001 年度に各 1 件検出された。(表 2)

HPeV-1 及び HPeV-3 は、いずれも 1 歳以下の乳幼児由来が約 9 割を占め、発症月は 3 月、4 月を除き年間を通じて検出されていた。(表 3、4)

HPeV-4 は 8 月に 2 歳の感染性胃腸炎患者から検出された。また、HPeV-6 は 6 月に 11 ヶ月齢のヘルパンギーナ患者から検出されたが同患者検体からは同時にコクサッキーウイルス A8 遺伝子も検出された。(表 4、5)

HPeV 陽性検体が得られた患者の疾病は、感染性胃腸炎(44)、呼吸器感染症(25)、不明熱(14)、発疹症(9)、手足口病(7)、無菌性髄膜炎(4)、ヘルパンギーナ(1)であった。疾患別では HPeV-1 の 31 件(53%)及び HPeV-3 の 12 件(27%)が感染性胃腸炎患者検体から、一方呼吸器感染症検体由来は

めた。(表 5)

考 察

検出法の比較においては細胞培養法より 5 UTRの一部を増幅する RT-PCR法の方が感度の高いことが確認された。しかし、この HPeV-1 を元に設計されたプライマー⁵⁾による 5 UTR領域増幅産物の分子系統樹解析では 2004 年以降に登録された 3~6 型標準株についての血清型/遺伝子型別同定が不可能であることが判明した。一方今回検討した VP1 領域のプライマーは検出感度が 66/104(63.5%)と上記 5 UTR領域より低く、HPeV を迅速に検出同定するためには、感度と特異性を兼ね備えた新たな PCR プライマーの開発および反応条件の検討が必要である。

HPeV 陽性検体の患者情報解析からは以下の傾向が認められた。

性別発症頻度: HPeV-1 において男女比が 2.6 対

1 と男児に多い
傾向がみられた。

発症年齢：

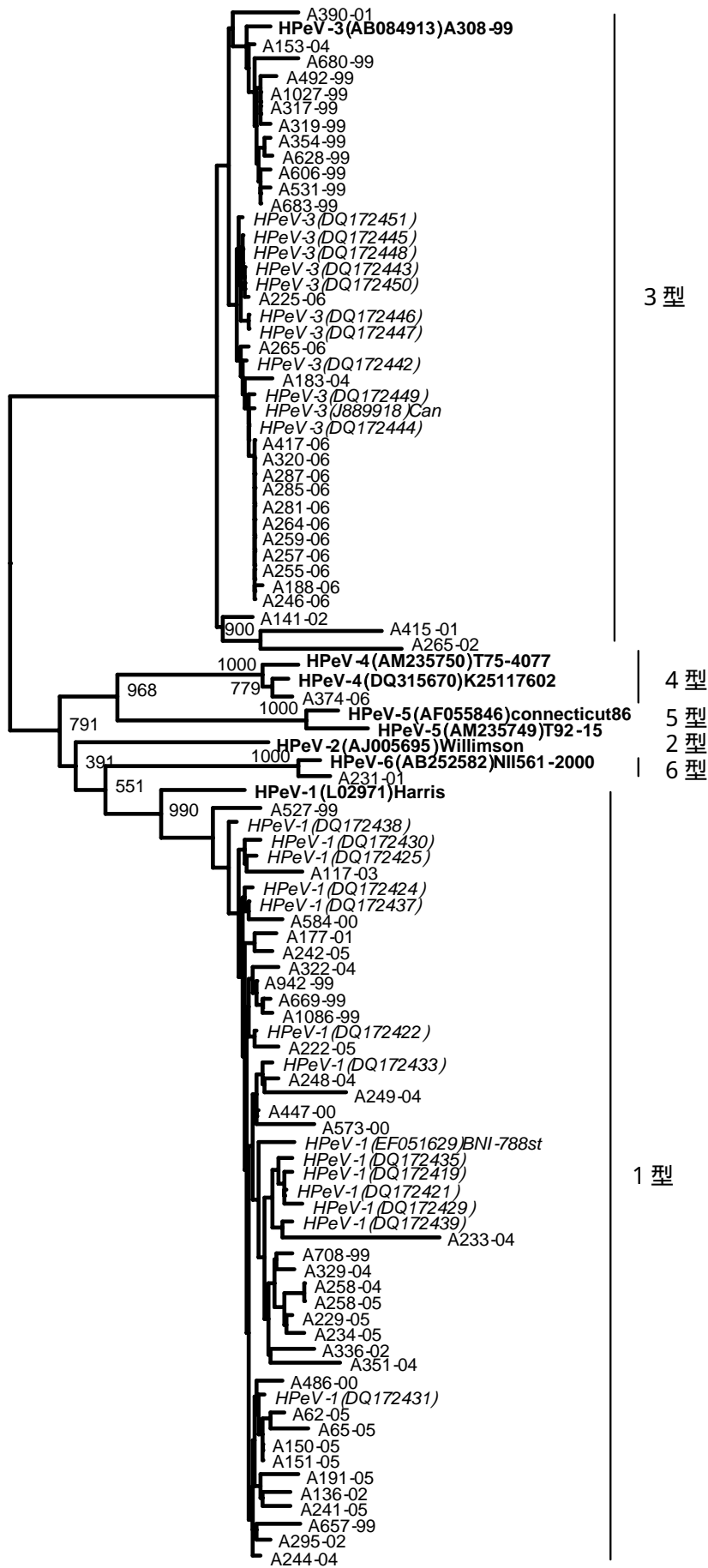


図2 VP1領域の分子系統樹解析(NJ法)
太字は標準株、斜体は海外分離株、当所の検出検体は A000-00(検体番号-発症年)で示す

表2 検出されたヒトパレコウイルス
血清型/遺伝子型内訳

年	HPeV 全 陽性数	内 訳			
		HPeV-1	HPeV-3	HPeV-4	HPeV-6
1999	31	15	16	0	0
2000	6	6	0	0	0
2001	6	3	2	0	1
2002	10	5	5	0	0
2003	10	6	4	0	0
2004	13	10	3	0	0
2005	12	12	0	0	0
2006	16	1	14	1	0
計	104	58	44	1	1

表3 パレコウイルス1及び3型の
性別、年齢別検出状況

	HPeV-1(58件)		HPeV-3(44件)	
	男	42	25	
性別	女	16	19	
	男女比	2.6対1	1.32対1	
発症年齢	0ヶ月~4歳		0ヶ月~6歳	
	<1	51	38	
年齢階層	2~3	5	4	
	4<	1	2	
	不明	1	0	
1歳以下の検出割合 (不明1名をのぞく)		87.9%	86.4%	
発症患者の平均月齢	12.9ヶ月		12.1ヶ月	

HPeV-1あるいはHPeV-3陽性者101名の平均月齢
: 12.6ヶ月
3歳以下の占める割合: 97%

表4 HPeV 血清型/遺伝子型別・発症月別検出状況

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
HPeV-1	7	1	0	0	2	3	3	8	9	5	12	8	58
HPeV-3	2	1	0	0	2	4	15	8	3	3	5	1	44
HPeV-4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HPeV-6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

表5 HPeV 血清型/遺伝子型別・疾患別検出状況

臨床症状	HPeV 全 陽性数	内 訳				総検体 数
		HPeV-1	HPeV-3	HPeV-4	HPeV-6	
感染性胃腸炎	44	31	12	1	0	1790
呼吸器感染症	25	11	14	0	0	659
不明熱	14	8	6	0	0	167
発疹症	9	5	4	0	0	93
手足口病	7	2	5	0	0	239
無菌性髄膜炎	4	1	3	0	0	225
ヘルパンギーナ	1	0	0	0	1	152
その他	0	0	0	0	0	984
計	104	58	44	1	1	4309

HPeV-1 およびHPeV-3 は 1 歳以下の乳児からの検出が多く、特にHPeV-3 については、我々の調査した抗体保有状況⁴⁾の傾向と一致する結果であった。

発症月:HPeV-1 は秋から冬(9~2月)に発症した患者 42/57(73.7%)から、一方HPeV-3 は夏(6~8月)に発症した患者 27/43(62.8%)から検出される傾向がみられ、血清型/遺伝子型により流行の季節性が異なっていた。疾患別検出状況:HPeV-1 は主に感染性胃腸炎患者から、HPeV-3 は呼吸器疾患及び胃腸炎患者から同程度に検出されていた。HPeV-3 は、1999 年に当所で一過性麻痺症状を示した 1 歳小児の糞便検体より最初に分離同定されたものであるが⁴⁾、今回の調査では脳炎や脳症など中枢神経症状を呈した患者からの検出はなかった。胃腸炎、呼吸器症状以外の臨床症状を示す患者 18/44(40.9%) からも検出されておりHPeV-3 と病原性の関係については更に検出例を増やして統計的に流行の状況を調査していく必要があると考えられた。

本研究において 2006 年に新たに登録された HPeV-4~6 のうち HPeV-4 及び HPeV-6 が各 1 件ずつ検出された。HPeV-4 は古くは 1973 年に分離報告された株を含めオランダ⁸⁾、イギリス^{9,12)}、日本^{11,13)} から少数例の報告があるのみで、病原性を含め詳細は不明である。HPeV-6 は 2006 年以降日本¹¹⁾、オランダ¹⁴⁾、ドイツ¹⁵⁾ から報告されている。我々が HPeV-6 を検出した検体はヘルパンギーナ患者由来であったが、この検体はコクサッキーウイルス A8 型も陽性であった。HPeV-4 及び HPeV-6 の病原性や疫学的特徴の解明には、今後も検出報告等のさらなる集積が必要である。

ヒトパレコウイルス感染症は、同じくピコルナウイルス科に属するエンテロウイルスによる感染症と同様に不顕性感染の割合が高いと推測されるが、乳幼児から検出されることが多く、中枢神経症状ははじめ重篤な疾患の病原体となりうる可能性を含め注意が必要な感染症であると考えられる。

参考文献

- 1) Wigand R, Sabin AB: Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses, Arch Ges Virusforsch, 11:224-247, 1961
- 2) King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypia T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G: Picornaviridae In Virus taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p.657-673, Edited by Regenmortel C, Fauquet MDH, Bishop CH, Calisher EB, Carsten MK, Estes SM, Lemon J, Maniloff MA, Mayo DJ, McGeoch CR, Pringle RBW Academic Press, New York, NY 1999
- 3) David MK, Peter MH: Fields Virology, Fifth edition, 1, p.839-894, 2007
- 4) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K: Isolation and identification of a novel human parechovirus, J Gen Virol, 85, 391-398, 2004
- 5) Joki-Korpela P, Hyypia T: Diagnosis and Epidemiology of echovirus 22 infections, Clin Infect Dis, 26, 129-136, 1998
- 6) Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, Kinnunen L, Stanway G: A distinct picornavirus group identified by sequence analysis, PNAS, 89, 8847-8851, 1992
- 7) Ghazi F, Hughes P J, Hyypia T, Stanway G: Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23), J Gen Virol, 79, 2641-2650, 1998
- 8) Benschop KS, Schinkel J, Luken ME, Broek PJM, Beersma MF, Menelik N, Eijk HW, Zaaijer HL, VandenBroucke-Grauls CM, Beld MG, Wolthers KC: Fourth human parechovirus serotype, Emerg Infect Dis, 12, 1572-1575, 2006
- 9) Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, Schnurr DP, Stanway G: Analysis of a new

- human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the Identification of RNA structural domains, *J Virol*, 81, 1013-1021, 2007
- 10) Oberste MS, Maher K, Pallansch MA: Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enterovirus, *Virus Res*, 56, 217-223, 1998
 - 11) Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M: Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples, *Emerg Infect Dis*, 13,889-895, 2007
 - 12) Schnurr D, Dondero M, Holland M, Connor J: Characterization of echovirus 22 variants, *Arch Virol*, 141, 1749-1758, 1996
 - 13) 若月紀代子、渡邊香奈子、吉田弘: 福岡市における Human parechovirus 4 の分離事例第 48 回日本臨床ウイルス学会 抄録、p.79,2007
 - 14) de Vries M, Pyrc K, Berkhout R, Vermeulen-Oost W, Dijkman R, Jebbink MF, Bruisten S, Berkhout B, van der Hoek L: Human parechovirus type 1,3,4,5 and 6 detection in picornavirus cultures, *J Clin Microbiol* (in process) 2008
 - 15) Baumgarte S, de Souza Luna LK, Grywna K, Panning M, Drexler JF, Karsten C, Huppertz HI, Drosten C: Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis, *J Clin Microbiol*, 46, 242-248, 2008

Detection of Human parechovirus and examination of the identification method

Miyabi Ito, Teruo Yamashita, Hideaki Tsuzuki, Yuka Kabashima, Akira Fujiura,
Akiko Hasegawa, Satoko Nagaya, Kenji Sakae, Hiroko Minagawa

Human parechovirus(HPeV) is a species of the genus *Parechovirus*, separated from the genus *Enterovirus* of the family *Picornaviridae*. By 2007, 6 HPeV serotype/genotypes were reported, but the pathogenicity of each virus type to the infected individuals has not been elucidated.

We detected HPeV by the methods of cell culture isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from the stool specimens collected through the infectious agent surveillance in Aichi Prefecture between 1999 and 2006. Of 4,309 specimens, 68(1.6%) were positive for HPeV by cell culture, and 104(2.4%) by RT-PCR amplification of the 5' untranslated (UTR) region. Of 104 HPeVs detected, 58 were typed as HPeV-1, 44 HPeV-3, one HPeV-4, and one HPeV-6. HPeV-1 was detected every year and HPeV-3 in each year except 2000 and 2005. Thirty-one (53%) of HPeV-1 and 12 (27%) of HPeV-3 were detected from the specimens related with gastroenteritis, while 11(19%) HPeV-1 and 14(32%) HPeV-3 were from those with respiratory illness.

Key word: human parechovirus, infectious agent surveillance, phylogenetic tree analysis, serotype/genotypes, gastroenteritis, respiratory illness

調 査 研 究

愛知県住民の尿中金属量 ()

- カドミウムの常在値及び生活習慣との関連 -

小島美千代、林留美子、遠山明人

要 約

環境中の重金属による健康影響を評価するため 1976 年度から実施している「尿中重金属蓄積状況調査」において、2003～2007 年度に調査を行ったカドミウムについて、その常在値及び食生活を含む生活習慣との関連等について検討した。

1. 年度別の尿中カドミウム濃度は、全期間を通して変動は小さく一定の傾向も認められなかった。
2. 全検体における尿中カドミウム濃度の平均値±標準偏差は、 $0.87 \pm 0.58 \mu\text{g/L}$ ($n=170$) であり、男では $0.82 \pm 0.51 \mu\text{g/L}$ ($n=85$)、女では $0.93 \pm 0.65 \mu\text{g/L}$ ($n=85$) と性差は認められなかった。また、年齢階層別尿中カドミウム濃度は、50 歳代までは加齢に従って高くなる傾向がみられ、20 歳代に比べて 40 歳代、50 歳代及び 60 歳以上では有意に高い値を示した。
3. 尿中カドミウム濃度と食生活等との関連については、使用米の種類や飲料水、米飯の摂取回数や喫煙などいずれの要因とも相関性は認められなかった。

キーワード：カドミウム、尿、成人、常在値

序 文

二十世紀後半からの近代産業の急激かつ高度な発達に伴い、環境中にさまざまな金属や化学物質が放出され、人の健康を脅かす事件が発生した。イタイタイ病をひきおこしたカドミウムはその著名な例である。食品、水、大気等の環境に含まれるカドミウムは主に消化管と呼吸器を経由して生体内に吸収され、標的臓器である腎臓でメタロチオネインと結合して蓄積されるが、過剰になると腎障害を発症する。初期には近位尿細管障害による多尿や低分子タンパク尿が特徴的にみられ、さらに進行すると遠位尿細管機能低下、

糸球体機能低下等の腎不全によって死に至る場合もある。

わが国では古くから鉱山資源を利用しており、その開発や精錬などの営みが河川や水田の汚染を招いた。日本の米のカドミウム含有量は世界的にみても高いことが指摘されているが、鉱山等からの排出規制や土壌の入れ替え等の国の対策が進められ、現在では 0.4 ppm 以上のカドミウムを含有する米は流通していない。しかし、米飯を主食とする国民へのカドミウムによる健康影響は今も懸念されるところである。

本県では、県内に居住する成人の尿中金属排泄

量の常在値を把握し、将来的な環境汚染による生体影響の指標とすることをねらいとして、1976年度から「尿中重金属蓄積状況調査」を実施している。カドミウムについては1976～1981、1986～1991年度の過去2回調査してきたが、その後10年以上が経過したことから2003年度より3回目の調査を実施した。本報では2003～2007年度(平成15～19年度)の最新の調査結果に基づいて、県民の尿中カドミウム濃度の常在値及び食生活を含む生活習慣との関連等について検討した。

方 法

1. 調査対象者

各年度とも県内(名古屋市及び中核市を除く)に居住する成人について、保健所単位で性別及び年代別(20、30、40、50歳代及び60歳以上)に各1名、1保健所当り10名を選定した。2003及び2004年度は4保健所で、2005年度以降は3保健所で調査を実施した。各年度における調査対象者数を以下に示した。

2003年度：40名(男20名、女20名)

2004年度：40名(男20名、女20名)

2005年度：30名(男15名、女15名)

2006年度：30名(男15名、女15名)

2007年度：30名(男15名、女15名)

2. 尿の採取

採尿は、早朝のスポット尿(起床直後の尿150 mL以上)をポリ容器に採取し、氷冷状態で衛生研究所に搬入した。

3. 調査時期

毎年5～6月に実施した。

4. 調査対象金属

カドミウム(Cd)について調査した。また、あわせて尿比重及び尿クレアチンを測定した。

5. 測定方法

尿中Cd濃度の測定は、尿10～20 mLをテフロン製遠心管に取り、尿10 mLに対して硝酸2.5 mL(Ultrapur、関東化学)を加え70～80℃の水浴中で尿中の有機物を加温酸分解後、超純水で10 mLとし、誘導結合プラズマ質量分析装置：ICP-MS(Agilent7500i、横河アナリティカルシステムズ)で行った。

尿比重は尿比重計(UR-S、ATAGO)を用い、尿クレアチンはJaffe法¹⁾によって測定し、尿中Cd濃度の補正に用いた。比重補正值は、従来から当所で用いている尿比重1.020を基準とした補正式： $Cd(\mu g/L) \div \{(尿比重 - 1) \times 1000/20\}$ で、クレアチニン補正值は、 $Cd(\mu g/L) \div 尿クレアチニン(g/L)$ で算出した。

6. 聞き取り調査

表1に示したアンケート調査項目により、使用米・飲料水の種類、居住環境、食生活、喫煙等を

表1 アンケート調査項目

[使用米・飲料水・居住環境]

使用米	(1) 自主流通米	(2) 自家保有米	(3) (1) + (2)	(4) その他()
飲料水	(1) 水道水	(2) 井戸水	(3) (1) + (2)	(4) その他()
居住環境	(1) 工業地域	(2) 商業地域	(3) 住宅地域	(4) 農山村地域 (5) その他()

[食生活]

米飯は、概ね1日に何回食べますか	(1) 0～1回/日	(2) 2回/日	(3) 3回/日
魚介類は、週に何日食べますか	(1) 2日以下/週	(2) 3～5日/週	(3) 6日以上/週
肉類は、週に何日食べますか	(1) 2日以下/週	(2) 3～5日/週	(3) 6日以上/週
野菜・果物は、週に何日食べますか	日/週		
海藻(ワカ・ヒジキ等)は、週に何日食べますか	(1) 2日以下/週	(2) 3～5日/週	(3) 6日以上/週
缶ジュース・缶詰摂取量	(1) 2缶以下/週	(2) 3～6缶/週	(3) 7缶以上/週

[喫煙]

(1) 吸わない	(2) 以前は吸っていた()年前まで	(3) 吸っている	1日	本()年前から
----------	---------------------	-----------	----	----------

[飲酒]

(1) 飲まない	(2) 以前は飲んでいて()年前まで	(3) 飲んでいる	1日	合()年前から
ただし、ビール1本は1合に換算				

調査した。

7. 測定結果の解析

測定結果の解析は、統計ソフトウェア SPSS 11.5 for Windows を用い、各項目について例数が 10 未満の場合は解析を行わなかった。有意差検定については、データの分布について Shapiro-Wilks の方法により正規性を検定し、いずれも正規性が認められなかったことからノンパラメトリック検定 (Mann-Whitney の U、Kruskal-Wallis の H) によって行った。

結果及び考察

1. 年度別、尿中 Cd 濃度・尿比重・尿クレアチニン

尿中 Cd 濃度、尿比重及び尿クレアチニンの年度別平均値を図 1 に示した。尿中 Cd 濃度は 0.79

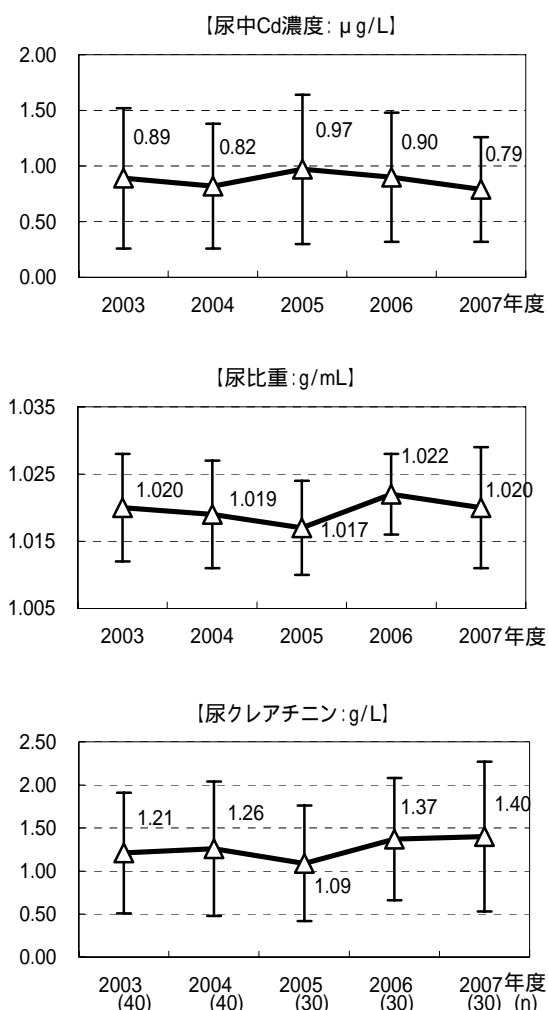


図1 年度別、尿中Cd濃度・尿比重・尿クレアチニン平均値

~0.97 μg/L、尿比重は 1.017~1.022 g/mL、尿クレアチニンは 1.09~1.40 g/L で推移しており、いずれの値も他の年度との有意な差を認めなかった。そこで5年間の全データをまとめて以後の解析を行うこととした。

2. 性別、尿比重・尿クレアチニン・尿中 Cd 濃度

尿比重、尿クレアチニン、尿中 Cd 濃度の男女別平均値を表 2 に示した。

なお、以下の数値はすべて平均値 ± 標準偏差で表した。

(1) 比重及び尿クレアチニン

尿比重 (g/mL) は、男 1.021 ± 0.008 (n=85)、女 1.018 ± 0.008 (n=85)、全体 1.019 ± 0.008 (n=170) と、男女ともに愛知県における過去の調査結果²⁾³⁾と同様の値で、男が有意に高かった (P<0.05)。また、健康者の 24 時間尿における比重は男女ともに 1.015 g/mL 内外¹⁾であることとされていることから、今回用いた早朝スポット尿では、男女ともに 24 時間尿の平均的な値に比べ高値であった。

尿クレアチニン (g/L) は、男 1.48 ± 0.77 (n=85)、女 1.04 ± 0.66 (n=85)、全体 1.26 ± 0.75 (n=170) と、男が女より有意に高い (P<0.001) 値であった。成人の尿中クレアチニン排泄量は 1 日に 0.5~1.5 g であり、その増減は食物には関係なく、筋肉の発育と運動に比例するため、男が女より多い¹⁾ことが知られている。また、クレアチニンは、尿量に関係なくほぼ一定量が尿中に排泄されることから、スポット尿中の化学成分量の補正に用いられる。

(2) 尿中 Cd 濃度

尿中 Cd 濃度の実測値 (μg/L) は、男 0.82 ± 0.51 (n=85)、女 0.93 ± 0.65 (n=85)、全体 0.87 ± 0.58 (n=170) であり、性差は認められず、またこれらの結果は我が国における文献値⁴⁾や愛知県における過去の調査結果²⁾と比べてやや低い値であったが、これは本調査で採用した ICP-MS 法と文献等における測定法 (フレームレス原子吸光法) との違いによることが大きいと考えられる。一方

表2 性別、尿比重・尿クレアチニン・尿中Cd濃度

平均値±標準偏差(最小値~最大値)

項目	検体数	尿比重 (g/mL)	尿クレアチニン (g/L)	尿中Cd濃度		
				実測値 (μg/L)	比重補正值 (μg/L)	クレアチン補正值 (μg/g・Cre)
男	85	1.021±0.008 (1.004~1.037) *	1.48±0.77 (0.28~3.28) ***	0.82±0.51 (0.13~2.72)	0.82±0.41 (0.24~2.24) **	0.63±0.38 (0.16~2.43) ***
女	85	1.018±0.008 (1.006~1.035)	1.04±0.66 (0.28~3.28)	0.93±0.65 (0.16~3.64)	1.08±0.63 (0.21~3.15)	1.04±0.64 (0.19~3.41)
全体	170	1.019±0.008 (1.004~1.037)	1.26±0.75 (0.28~3.28)	0.87±0.58 (0.13~3.64)	0.95±0.55 (0.21~3.15)	0.83±0.56 (0.16~3.41)

*:p<0.05

** :p<0.01

***:p<0.001

ICP-MS法を用いたスウェーデンの文献⁵⁾⁶⁾では本調査結果のおよそ5分の1の尿中Cd濃度が報告されており、食品の中でも比較的Cd含有量が高い米を主食にする食習慣の違いによるものではないかと考えられる。

尿中Cd濃度の比重補正值(μg/L)は、男0.82±0.41(n=85)、女1.08±0.63(n=85)と女が有意に高い(P<0.01)値を示し、クレアチニン補正值(μg/g・Cre)も、男0.63±0.38(n=85)、女1.04±0.64(n=85)と女が有意に高かった(P<0.001)。しかし、これらは補正に用いた尿比重及び尿クレアチニンに性差があることによる見かけ上の差ではないかと考えられる。

また、多くの研究結果から2.5 μg/g・Creを超える尿中Cd濃度と腎尿細管障害との関係が指摘されており⁷⁾、今回の調査結果でこれを超過するものは170例中2例(2.63, 3.41 μg/g・Cre)であった。

3. 性・年齢階層別、尿比重・尿クレアチニン・尿中Cd濃度

性・年齢階層別、尿比重、尿クレアチニン・尿中Cd濃度の平均値を図2に示した。

(1) 尿比重及び尿クレアチニン

尿比重(g/mL)は、男女共に加齢に従って減少し、男では、50歳代(1.018±0.009,n=17)及び60歳以上(1.016±0.006,n=17)は20歳代(1.023±0.007,n=17)及び30歳代(1.024±0.007,n=17)に比べて、また60歳以上は40歳代(1.022±0.007,n=17)に比べて有意に低い(P<0.05~0.01)

値であり、女では、60歳以上(1.013±0.004,n=17)が20歳代(1.020±0.007,n=17)及び30歳代(1.020±0.009,n=17)に比べて有意に低い(P<0.05~0.01)値であった。尿比重は、水分摂取量や排尿頻度、発汗等によって変動するが、加齢による減少は尿濃縮機能の低下によることが考えられる。

尿クレアチニン(g/L)も尿比重と同様に、男女とも加齢に従って減少し、男では、50歳代(1.10±0.56,n=17)及び60歳以上(0.91±0.37,n=17)は20歳代(1.86±0.78,n=17)及び30歳代(1.98±0.80,n=17)に比べて、また60歳以上は40歳代(1.55±0.67,n=17)に比べて有意に低い(P<0.01~0.001)値であり、女では、60歳以上(0.60±0.22,n=17)が20歳代(1.32±0.65,n=17)、30歳代(1.22±0.81,n=17)、40歳代(1.17±0.76,n=17)及び50歳代(0.90±0.45,n=17)に比べて有意に低い(P<0.05~0.001)値であった。尿クレアチニンの加齢による減少は、筋量の減少によるものと考えられる。

(2) 尿中Cd濃度

尿中Cd濃度の実測値(μg/L)は、50歳代までは加齢に従って高くなる傾向がみられ、20歳代(0.56±0.30,n=34)に比べて40歳代(0.96±0.41,n=34)、50歳代(1.08±0.83,n=34)及び60歳以上(0.92±0.52,n=34)で有意に高い(P<0.05~0.001)値を示した。Cdのヒトにおける生物学的半減期は10~30年とされ、加齢とともに体内蓄積量が増加する⁸⁾⁹⁾ことが知られており、体

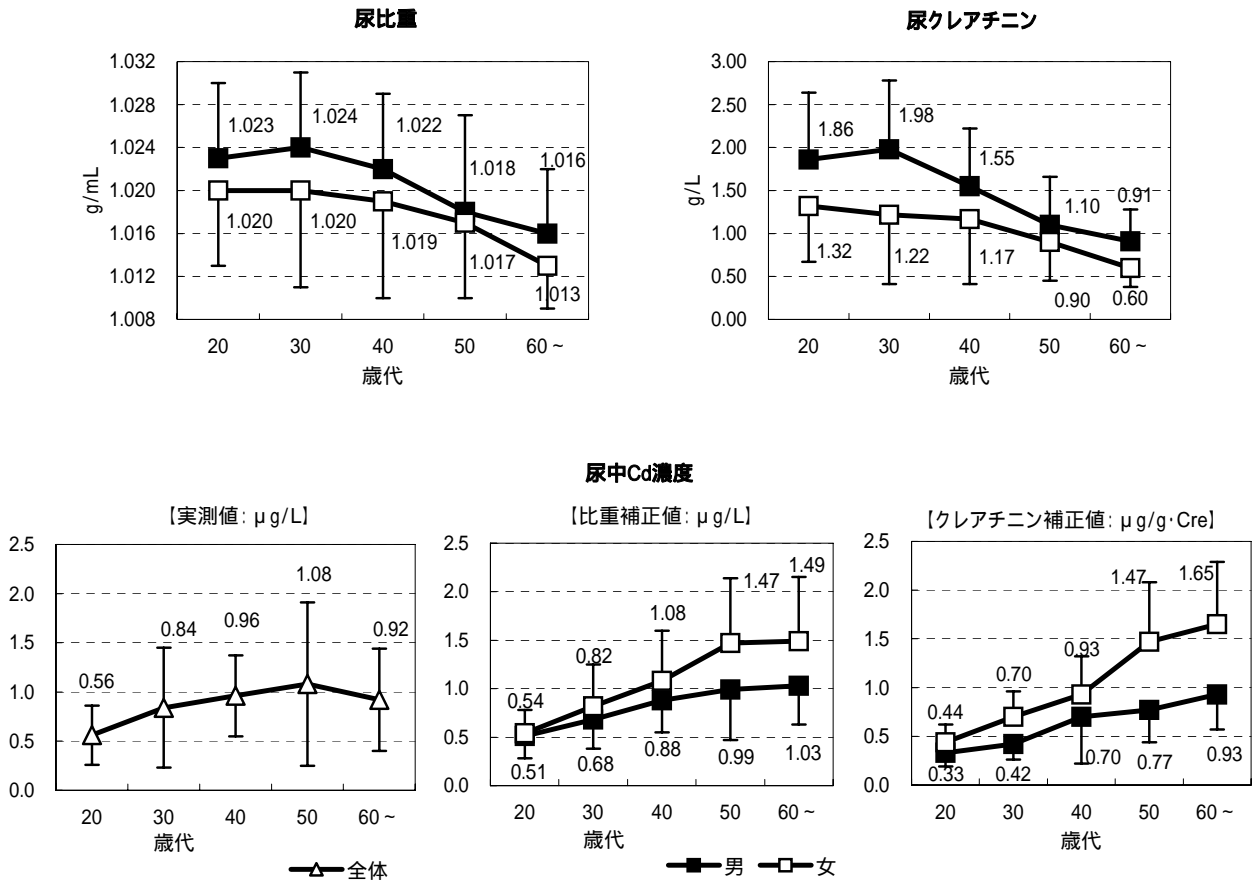


図2 性・年齢階層別、尿比重・尿クレアチニン・尿中Cd濃度平均値

内蓄積量の増加に伴って尿中Cd濃度が増加することが考えられる。

また、比重補正值 ($\mu\text{g/L}$) は、男女とも加齢に従って増加し、男では 20 歳代 ($0.51 \pm 0.23, n=17$) に比べ 40 歳代 ($0.88 \pm 0.33, n=17$)、50 歳代 ($0.99 \pm 0.52, n=17$) 及び 60 歳以上 ($1.03 \pm 0.40, n=17$) が、30 歳代 ($0.68 \pm 0.30, n=17$) に比べ 60 歳以上が有意に高い ($P < 0.01 \sim 0.001$) 値を示し、女では 20 歳代 ($0.54 \pm 0.24, n=17$) に比べ、30 歳代 ($0.82 \pm 0.43, n=17$)、40 歳代 ($1.08 \pm 0.52, n=17$)、50 歳代 ($1.47 \pm 0.67, n=17$) 及び 60 歳以上 ($1.49 \pm 0.69, n=17$) が、30 歳代に比べ 50 歳代及び 60 歳以上が、40 歳代に比べ 60 歳以上が有意に高い ($P < 0.05 \sim 0.001$) 値であった。クレアチニン補正值 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{Cre}$) も、男女とも加齢に従って増加し、男では 20 歳代 ($0.33 \pm 0.14, n=17$) 及び 30 歳代 ($0.42 \pm 0.16, n=17$) に比べ 40 歳代 ($0.70 \pm 0.48, n=17$)、50 歳代 ($0.77 \pm 0.33, n=17$) 及び 60 歳以上 ($0.93 \pm 0.36, n=17$) が、40 歳代に比べ 60 歳以上が有意に高い ($P < 0.01$

~ 0.001) 値を示し、女では 20 歳代 ($0.44 \pm 0.18, n=17$) に比べ、30 歳代 ($0.70 \pm 0.26, n=17$) 代、40 歳代 ($0.93 \pm 0.39, n=17$)、50 歳代 ($1.47 \pm 0.61, n=17$) 及び 60 歳以上 ($1.65 \pm 0.64, n=17$) が、30 歳代及び 40 歳代に比べ 50 歳代及び 60 歳以上が有意に高い ($P < 0.01 \sim 0.001$) 値であった。しかし、比重補正值及びクレアチニン補正值のみ見た加齢による増加傾向は、補正に用いた尿比重及び尿クレアチニンが加齢に従って減少することによる見かけ上の増加ではないかと考えられた。

スポット尿中の化学成分量の比較には比重補正值やクレアチニン補正值を用いることが多いが、対象の年齢階層が広い本調査においてはこれらの補正值は尿中指標の上昇を過大評価するおそれがあり、性差もまた無視できない。よって以後の調査各項目の解析は、尿中 Cd 濃度の実測値を用いて行った。

4. 使用米・飲料水・居住環境と尿中 Cd 濃度 (表 3)

ヒトが体内に摂取するCdの量的な主経路は食品であり、国立医薬品食品衛生研究所の2004年度の調査結果¹⁰⁾によれば、日本人の日常食からの1日摂取量は21.4 µgで、そのうちの4割を米から摂取している。また大気中のCd濃度は田園地帯、

都市部、工業地区で差があり⁹⁾、飲料水はその地域の表層水や地下水を利用しているため、当該地域の地殻や土壌の汚染レベルに左右される。こうしたことから表1に示したアンケート調査項目の回答の分類に従って、使用米、飲料水及び居住環境についてCd濃度の平均値を比較した。

表3 使用米・飲料水・居住環境別尿中Cd濃度

項目	項目の種類	検体数	実測値 (µg/L) 平均値±標準偏差
使用米	自主流通米	128	0.88±0.59
	自家保有米	25	0.85±0.49
	+	10	0.80±0.75
	その他	5	1.08±0.66
飲料水	水道水	158	0.88±0.58
	井戸水	4	0.85±0.41
	水道水+井戸水	5	0.58±0.32
	その他	3	1.17±1.11
居住環境	工業地域	6	0.79±0.34
	商業地域	8	0.89±0.74
	住宅地域	136	0.88±0.59
	農山村地域	14	0.68±0.44
	その他	5	1.08±0.92

表4 食生活と尿中Cd濃度

項目	項目の種類	検体数	実測値 (µg/L) 平均値±標準偏差
米飯回数	1日1回以下	15	0.80±0.43
	1日2回	93	0.91±0.59
	1日3回	60	0.82±0.61
魚介摂取回数	0~2日/週	55	0.85±0.44
	3~5日/週	102	0.88±0.66
	6~7日/週	13	0.88±0.55
肉類摂取回数	0~2日/週	40	0.87±0.51
	3~5日/週	112	0.88±0.62
	6~7日/週	18	0.79±0.53
海藻摂取回数	0~2日/週	70	0.89±0.60
	3~5日/週	70	0.81±0.49
	6~7日/週	30	0.97±0.72
缶詰類摂取量	0~2缶/週	123	0.90±0.62
	3~6缶/週	45	0.80±0.47
	7缶以上/週	2	0.74

表5 喫煙・飲酒習慣別尿中Cd濃度

項目	項目の種類	検体数	実測値 (µg/L) 平均値±標準偏差
喫煙	吸わない	122	0.88±0.58
	過去に吸っていた	23	0.85±0.57
	吸っている	25	0.84±0.65
飲酒	飲まない	105	0.88±0.58
	過去に飲んでいて 飲んでいる	2 63	1.83±1.27 0.83±0.55

米では7割以上が自主流通米を使っており、自主流通米と自家保有米に有意な差は認められなかった。飲料水については9割以上が水道水を使っており解析できなかった。居住環境についても8割が住宅地域に住み、農山村地域に住む人の尿中Cd濃度はそれよりやや低い値であったが有意差は認められなかった。

5. 食生活と尿中Cd濃度 (表4)

食品から摂取するCdのうち、米に次いで多いものは野菜・海藻類と魚介類¹¹⁾である。表1に示したアンケート調査項目の回答の分類に従って、米飯は1日の回数別に、魚介、肉類、海藻及び缶ジュース・缶詰(缶詰類)については1週間に摂取する日数もしくは缶数別に尿中Cd濃度の平均値を比較した。

米飯の摂取回数については2回以上が9割を占め、米飯を主食とする食習慣であることを確認できたが、摂取回数と尿中Cd濃度の関係は認められなかった。1997~1998年に国が行った全国実態調査結果によると、日本国内で生産された玄米中に含まれるCd濃度平均値は0.06 ppmであり¹¹⁾、食糧庁長官通達¹²⁾¹³⁾に示された0.4 ppmより1桁低く、摂取回数の違いによるCd摂取量の差が尿中Cd濃度における差とならなかったものと考えられる。また、魚介、肉類、海藻及び缶詰類についても摂取頻度と尿中Cd濃度の間に一定の傾向は認められなかった。

なお、野菜・果物については、平成18年度までの調査票の設問は『週に何日食べますか』であったものを、平成19年度は『どれくらい食べますか。(1)ほとんど食べない (2)できるだけ食べる (3)たっぷり食べる』と変更した。このため、平成19年度分を除く140名のデータを用いて摂取日数と尿中Cd濃度の関係を検討したが、回答

が『7日』の一箇所に集中したため解析できなかった。

6. 喫煙・飲酒習慣と尿中 Cd 濃度 (表 5)

現在までの喫煙習慣について、吸わない、過去に吸っていた、吸っているの3群に分け、飲酒習慣についても、飲まない、過去に飲んでいて、飲んでいるの3群に分けて尿中 Cd 濃度の平均値を比較した結果、喫煙習慣、飲酒習慣のいずれにおいても有意差や一定の傾向は認められなかった。タバコ1本には1~2 µgのCdが含まれ曝露源として重要なことが知られている。また、「1日の喫煙本数×喫煙経験年数」で示されるブリックマン指数(喫煙指数)が400以上であったものについて、吸わない群と比較したところ、該当する10例の尿中 Cd 濃度は 0.99 ± 0.77 µg/Lで、今回の調査では吸わない群との比較で有意な差は認められなかった。

まとめ

2003~2007年度の5年間、愛知県内に居住する20歳から76歳までの特別な病気を持たない成人170名(男85、女85)について、尿中 Cd 濃度の調査を行った。その結果、年度別尿中 Cd 濃度平均値の変動は小さく、環境や食品中等におけるCdの動態に特に変化が無かったことを示唆するものと考えられた。

全検体における尿中 Cd 濃度(平均値±標準偏差)は、 0.87 ± 0.58 µg/L (n=170)で文献的な値に比べてやや低い値であった。また、尿中 Cd 濃度の実測値では性差は認められず、年齢階層別では20歳代に比べて40歳代、50歳代及び60歳以上が有意に高い値を示した。

食生活や喫煙習慣等との関連では、米飯、魚介、海藻等の食品の摂食頻度及び喫煙・飲酒習慣と尿中 Cd 濃度の間に一定の傾向は認められなかった。

最後に、本調査結果は、県内住民の尿中 Cd 濃度の常在値を示す数値と考えられた。また、重金属と環境・食品汚染の問題は、土鍋や玩具、アクセサリーから高濃度の鉛や Cd が溶出するなど今もなお身近に存在している。従って、今後もこの

ような調査を継続しデータを蓄積していくことは県内住民の保健管理の観点のみならず、重金属による健康被害事例が発生した場合には、迅速かつ的確な対応をするためにも重要なことと考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本調査は愛知県健康福祉部生活衛生課及び保健所の方々の多大な協力のもとに実施されたことを付記し、関係された皆様に深謝致します。

文献

- 1) 金井正光編:臨床検査提要:改訂32版、p.167、200、500-501、金原出版、2005
- 2) 林留美子、荒川正一、早川清子、伊藤正夫、清水國樹:愛知県下住民の尿中金属量 - その常在値と経年推移 -、愛知県衛生研究所報、38、5-10、1988
- 3) 林留美子、近藤文雄 恩田祐行:愛知県住民の尿中金属量() - クロム、セレンの常在値及び生活習慣との関連 -、愛知県衛生研究所報、54、9-17、2004
- 4) 和田攻:金属とヒト - エコロジーと臨床 - :初版、p.246-258、朝倉書店、1985
- 5) Rodushkin I, Odman F: Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for elemental analysis of urine, J Trace Elem Med Biol, 14(4), 241-247, 2001
- 6) Rodushkin I, et al: Multi-element analysis of body fluids by double-focusing ICP-MS, Transworld Res Network Recent Res Devel Pure&Applied Chem, 5, 51-66, 2001
- 7) Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M: Health effects of cadmium exposure, Scand J Work Environ Health, 24 Suppl 1, 1-51, 1998
- 8) 後藤稔、池田正之、原一郎:産業中毒便覧:増補版、p.219-220、医歯薬出版、1986

- 9) 糸川嘉則：ミネラルの事典：初版、p.381-388、朝倉書店、2003
(<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/12/h1209-1c.html>)
- 10) 米谷民雄：食品安全確保のための理化学的な規格基準設定と摂取量調査、国立医薬品食品衛生研究所報告、123、1-11、2005
- 11) 厚生労働省：「食品に含まれるカドミウム」に関する Q&A
- 12) 食糧庁長官通達、45 食糧業第 1500 号（需給）昭和 45 年 7 月 25 日
- 13) 食糧庁長官通達、58 食糧業第 223 号（需給）昭和 58 年 7 月 18 日

Study on Urinary Concentrations of Cadmium in Residents of Aichi Prefecture

Michiyo Kojima, Rumiko Hayashi, Akito Toyama

Urinary concentrations of cadmium (Cd) in general adult population in Aichi Prefecture were examined during a period of 2003-2007. This was a third five-year study since 1976, aiming to determine the average Cd concentrations in the urine, and to examine the effects of lifestyle-related factors such as dietary and smoking habits on Cd concentrations.

Results and conclusions:

- 1) Yearly variations of the Cd concentrations were relatively small throughout the study period of 5 years.
- 2) The urinary Cd concentrations were 0.87 ± 0.58 $\mu\text{g/L}$ (mean \pm SD, $n = 170$) in total, 0.82 ± 0.51 for males ($n = 85$), and 0.93 ± 0.65 for females ($n = 85$), showing no significant sex differences. The Cd concentrations were found to increase with age up until 50s, and were significantly higher in the age groups of 40s, 50s, and over 60 years old when compared to 20s.
- 3) No significant correlation was observed between lifestyle-related factors, including rice-intake frequency and cigarettes smoking, and the urinary Cd concentrations.

Key words: cadmium, urine, adult, normal value

調 査 研 究

マイクロ電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー による食品中の多成分残留農薬分析法の検討

上野英二、椋島由佳、大島晴美、大野 勉

要 旨

シングルインジェクション、デュアルカラム、およびデュアルマイクロ電子捕獲型検出器方式ガスクロマトグラフィー（デュアルカラムGC- μ ECD）による食品中の多成分残留農薬分析法を作成して、日常の残留分析への適用性について検討した。試料からアセトニトリルで抽出し、塩析により水層を分離後、GPC/グラファイトカーボンSPEおよびシリカゲル/PSAカートリッジ連結SPEにより精製、次いでフロリジルカートリッジSPEにより精製/分画してデュアルカラムGC- μ ECDで測定した。71種類の農薬成分を対象として、10回繰り返し測定における保持時間とピーク面積の相対標準偏差は、それぞれ0.002~0.007%（平均0.004%）、0.4~4.9%（平均1.4%）、検量線の直線範囲は4オーダー以上（ $r^2 > 0.994$ ）、検出限界は0.003~0.3 ng/gと良好であった。また、ハウレンソウからの添加回収率も、分解しやすいクロロタロニルなど一部の農薬成分を除いて70.3~118.9%（相対標準偏差<8.4%）と良好であった。

キーワード：残留農薬、食品、デュアルカラム、ガスクロマトグラフィー、マイクロ電子捕獲型検出器

序 文

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度が2006年5月29日から導入され、GC/MSによる食品中残留農薬の多成分分析法が普及してきている¹⁾。しかし、一般的な電子イオン化(electron ionization, EI)モードGC/MSは塩素系やピレスロイド系の農薬成分に対して感度が低い場合が多い。また、このような電子親和性の高い農薬成分を感度良く選択的に検出可能な負化学イオン化(negative chemical ionization, NCI)モードGC/MSは検量線の直線範囲が2オーダー程度であるなど定量性の点で問題がある²⁾。このため比較的安価で装置のメン

テナンスやデータ解析の容易さもあって、選択性の点では劣るが、電子親和性の高い農薬成分を感度良く検出可能な従来の電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー(GC-ECD)の利用価値は、試料調製法およびGCシステムの構築次第では今後も高いと考えられた。

そこで今回、GC/MSによる多成分分析法を補完するために、シングルインジェクション、デュアルカラム、およびデュアルマイクロ電子捕獲型検出器方式ガスクロマトグラフィー(デュアルカラムGC- μ ECD)による多成分分析法を作成して、日常の食品中残留農薬分析への適用性について検討したので、その結果について報告する。

方法

1. 試料

試料は愛知県内の小売店で購入した。

2. 試薬および標準品

試薬は和光純薬工業または関東化学の残留農薬試験用、水は脱イオン水を蒸留したものをを用いた。

標準品は和光純薬工業および林純薬工業の残留農薬試験用を用い、原則としてトルエンに溶解して1 mg/mL 標準原液とした。標準原液を2グループに分けてアセトンで希釈し、添加回収試験用の混合標準溶液とした (Table 2)。また、アセトン - ヘキサン (5 : 95) で適宜希釈して検量線作成用の混合標準溶液とした。

グラファイトカーボンカラムは、ガラスリザーバー (Varian社製、8.5 mL) に、グラファイトカーボン (Supelco社製Supelclean ENVI-Carb) ・微結晶セルロース (Merck社製Avicel X 1:3) 1 g、次いで無水硫酸ナトリウム0.5 gを充てんし、流量調整チューブ (Supelco社製Valve Liner) を付けたものをGPC装置のコレクター部に装着して用いた³⁾。シリカゲル/PSAカートリッジカラムは、Varian社製Bond Elut Jr-PSA (500 mg) の手前にWaters社製Sep-Pak Plus Silica (690mg) を連結して用いた⁴⁾。フロリジルカートリッジカラムは、和光純薬工業のPresep-C Florisil (750mg) を用いた。

3. 装置および条件

吸引ろ過装置：125 mL容の円筒形分液ロートに減圧用連結管、次いで桐山ロート (60 mm、No.5Aろ紙) を装着し、これを12連装できる木製の専用スタンドで固定して用いた³⁾。

GPC装置：島津製作所製GPCクリーンアップシステムに、昭和電工製CLNpak EV-2000 カラム (内径 20 mm、長さ 30 cm) およびCLNpak EV-Gガードカラム (内径 20 mm、長さ 10 cm) を装着して用

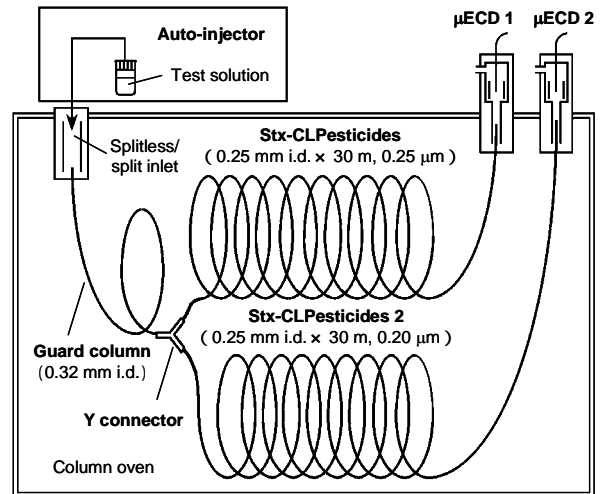


Fig. 1 Single-injection, dual-column GC- μ ECD

いた⁴⁾。GPC条件は、カラム温度 40、移動相アセトン・シクロヘキサン(1:4)、流速 5 mL/min、モニター波長 254 nmに設定した。

デュアルカラム GC- μ ECD 装置：Agilent Technologies社製 6890GC (オートサンプラー7673、GCケミステーション付) に、シングルインジェクション - デュアルカラム Restek 社製 Stx-CLPesticides (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m) Restek社製 Stx-CLPesticides2 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.20 μ m) Restek社製 Siltekガードカラム (内径 0.32 mm、長さ 2 m) Yコネクターおよびインサート (内径 4 mm、テーパー型) を装着して用いた。測定条件は、注入口温度 250、カラム温度プログラム 80 (1 min) 20 /min 180 4 /min 280 (12 min)、検出器温度 300、キャリアガス He、キャリアガス圧力プログラム 300 kPa(1 min) 108 kPa 8 kPa/min 148 kPa 1.6 kPa/min 188 kPa(12 min)、メイクアップガス N_2 、メイクアップガス流量 30 mL/min、注入量 2 μ L、注入モード スプリットレス (1 min) に設定した。

NCI モード GC/MS 装置：島津製作所製 GCMS-QP2010 (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

GCMSsolution 付)に、カラム Restek 社製 Stx-CLPesticides2 w/Integra Guard (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.20 μ m、5 m ガードカラム付) Restek 社製 Siltek インサート(内径 3.5 mm、テーパ型)を装着して用いた。測定条件は、注入口温度 250、カラム温度プログラム 80 (1 min) 20 /min 180 4 /min 300 (7 min)、インターフェース温度 300、イオン源温度 200、イオン化法 NCI、イオン化電圧 70eV、試薬ガス メタン、キャリアガス He、キャリアガス線速度 40 cm/sec、注入量 2 μ L、注入モード スプリットレス(1 min)、測定モード SIM に設定した。

4. 分析操作

(1) 抽出

試料はフードカッターで粉碎して細切試料とした。細切試料 20 g にアセトニトリル 60 mL を加えて 2 分間ホモジナイズしたのち、吸引ろ過装置を用いて、あらかじめ塩化ナトリウム 5 g と 2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 mL を加えておいた 125 mL 容の円筒形分液ロート中にろ過した。ろ紙上の残渣をアセトニトリル 20 mL で洗い込んだのち、円筒形分液ロートに栓をして 3 分間振とう器にかけ、静置後に分離したアセトニトリル層を分取して減圧濃縮した。これに酢酸エチル 50 mL と無水硫酸ナトリウム 20 g を加えて 1 分間超音波洗浄器にかけ、無水硫酸ナトリウム 10 g/グラスウール充填ロートを通過させて不溶物をろ過後、無水硫酸ナトリウムを酢酸エチル 20 mL で 2 回洗浄し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、アセトン・シクロヘキサン (1:4) で 8 mL に定容して試料原液とした。

(2) 精製

試料原液を 3000 回転/分で 10 分間遠心分離後、上清 4 mL を GPC 装置に注入し、次のとおり操作

させた。GPC カラムからの 57~75 mL の画分はグラファイトカーボンカラムを通過させて 40 mL 容のコレクターバイアルに分取し、次いで 75~135 mL の画分は 90 mL 容のコレクターバイアルに直接分取した。その後、コレクターヘッドを戻し、135~145 mL の画分でグラファイトカーボンカラムから溶出した。試料溶液を合わせてシリカゲル/PSA カートリッジカラムに負荷したのち、アセトン・ヘキサン (1:1) 15 mL で溶出し、減圧濃縮後にアセトン・ヘキサン (1:95) で 2 mL に定容して試験原液とした。試験原液 1 mL をフロリジルカートリッジカラムに負荷し、ジエチルエーテル・ヘキサン (15:85) 20 mL、次いでアセトン・ヘキサン (30:70) 20 mL で溶出した。溶出液はそれぞれ減圧濃縮後、アセトン・ヘキサン (5:95) で 1 mL に定容してデュアルカラム GC- μ ECD 用の試験溶液 (試料濃度 5 g/mL) とした。

(3) 定性および定量

GCケミステーションのデータ解析画面上で、両カラムにより得られた混合標準溶液と試験溶液 (第 1 画分、第 2 画分) のクロマトグラムをそれぞれ並列させ、目視により保持時間、溶出画分およびピーク形状を確認することにより行い²⁾、原則として、Stx-CLPesticides2 カラムにより得られたクロマトグラムにより、必要により手動で波形処理を行ったのち絶対検量線法を用いて定量した。

結果および考察

1. デュアルカラム GC- μ ECD による測定

Fig. 1 に示したように、1 回の注入による測定で 2 種類のクロマトグラムが得られ、より確実な定性および定量を可能とするシングルインジェクション・デュアルカラム方式 GC²⁾ に、従来の ECD と比較してより高感度でダイナミックレンジ

Table 1. Retention time, repeatability, linearity, and detection limit of compounds by dual-column GC- μ ECD

Compound	RT, min		Repeatability (n=10)		Linearity (0.0005-5 μ g/g)			Detection limit ^a (ng/g)
	Stx-CLP (μ ECD1)	Stx-CLP2 (μ ECD2)	RT, min RSD(%)	Area RSD(%)	Slope ($\times 10^4$)	Intercept ($\times 10^2$)	r^2	
-HCH	9.30	10.98	0.005	0.4	119	5	1.000	0.003
-HCH	10.06	12.07	0.005	0.5	105	7	1.000	0.003
Diazinon	10.22	11.99	0.005	0.4	4	1	1.000	0.05
-HCH	10.31	12.35	0.005	1.0	42	9	1.000	0.006
-HCH	10.76	13.30	0.005	0.9	103	-6	1.000	0.006
Dimethoate	10.96	12.51	0.006	0.5	16	-33	0.999	0.04
Cyanophos	11.70	13.00	0.005	0.4	73	-1	1.000	0.006
Chlorpyrifos-methyl	11.73	14.03	0.005	1.5	40	-10	1.000	0.01
Tolclofos-methyl	12.06	14.41	0.004	0.4	24	2	1.000	0.01
Chlorothalonil (TPN)	12.38	13.92	0.005	2.0	81	-16	1.000	0.01
Chlorpyrifos	13.05	15.53	0.006	0.8	36	-1	1.000	0.01
Vinclozolin	13.23	14.23	0.004	0.4	42	2	1.000	0.008
<i>p,p'</i> -Dichlorobenzophenone ^b	13.36	15.86	-	-	-	-	-	-
Malathion	13.86	15.81	0.002	1.6	7	-143	0.995	0.08
Fenitrothion (MEP)	14.01	15.76	0.005	1.2	29	28	1.000	0.02
Triadimefon	14.50	16.03	0.004	1.3	38	-4	1.000	0.02
Phenthoate	14.82	17.83	0.004	0.8	15	-25	0.999	0.04
Fthalide	14.82	17.39	0.005	0.6	85	14	1.000	0.005
Bromophos-ethyl	14.96	17.62	0.004	0.5	52	6	1.000	0.008
<i>p,p'</i> -DDE	15.26	18.63	0.007	0.7	89	12	1.000	0.005
-Endosulfan	15.27	18.04	0.004	0.4	81	9	1.000	0.005
Captan	15.35	18.47	0.005	4.3	51	-144	0.999	0.03
Prothiophos	15.67	18.64	0.005	0.4	49	-4	1.000	0.01
Kresoxim-methyl	16.00	20.13	0.004	1.0	18	4	1.000	0.02
Dieldrin	16.09	19.08	0.005	0.6	79	10	1.000	0.006
Hexaconazole	16.39	18.93	0.004	0.9	43	-18	1.000	0.04
Buprofezin	16.40	19.43	0.004	0.8	2	4	1.000	0.3
Isoprothiolane	16.60	20.31	0.004	0.5	23	-4	1.000	0.02
Endrin	16.86	20.23	0.005	0.5	48	5	1.000	0.01
Procymidone	16.90	18.28	0.003	1.4	13	8	1.000	0.02
Triflumizole	16.95	17.94	0.005	1.2	34	-22	1.000	0.05
<i>p,p'</i> -DDD	17.34	20.87	0.004	0.6	71	10	1.000	0.008
Flutolanil	17.60	19.58	0.005	0.5	2	-19	0.998	0.2
-Endosulfan	17.67	21.08	0.004	0.4	73	6	1.000	0.006
Isoxathion	18.08	20.76	0.003	1.0	16	-23	1.000	0.04
Ethion	18.24	21.49	0.003	0.5	25	-26	1.000	0.03
<i>p,p'</i> -DDT	18.35	22.10	0.005	0.5	73	4	1.000	0.008
Myclobutanil	18.80	20.86	0.004	0.9	8	-29	0.998	0.1
Endrin aldehyde ^c	19.25	22.44	-	-	-	-	-	-
Iprodion metabolite	19.48	22.93	0.004	0.7	7	-27	0.999	0.2
Chlorfenapyr	19.83	21.14	0.005	1.4	63	17	1.000	0.008
Dicofol	20.22	24.71	0.005	0.6	10	11	1.000	0.02
Bifenthrin	20.75	24.05	0.003	0.5	18	1	1.000	0.03
Endosulfan sulfate	20.88	23.55	0.004	0.4	59	-31	1.000	0.01
Bromopropylate	21.06	24.44	0.006	1.1	38	1	1.000	0.02
Endrin ketone ^c	21.87	25.64	-	-	-	-	-	-
Iprodion	22.25	24.85	0.004	1.9	6	-39	0.998	0.1
Fenpropathrin	22.37	25.29	0.004	0.8	17	-27	1.000	0.04
Tetradifon	23.46	26.68	0.004	0.7	60	13	1.000	0.008
Fenarimol	23.77	27.92	0.002	0.5	67	-18	1.000	0.02
Permethrin 1	24.01	28.45	0.004	1.7	2	4	1.000	0.3
Permethrin 2	24.58	28.87	0.005	1.9	10	21	1.000	0.06
Cyhalothrin 1	24.76	26.90	0.004	2.7	11	-17	1.000	0.07
Pyridaben	25.14	29.23	0.005	0.5	8	-2	1.000	0.07
Cyhalothrin 2	25.37	27.42	0.003	0.9	40	-281	0.998	0.04

Table 1. Continued

Compound	RT, min		Repeatability (n=10)		Linearity (0.0005-5 µg/g)			Detection limit ^a (ng/g)
	Stx-CLP (µECD1)	Stx-CLP2 (µECD2)	RT, min RSD(%)	Area RSD(%)	Slope (× 10 ⁴)	Intercept (× 10 ²)	r ²	
Acrinathrin 1	25.59	26.92	0.003	2.7	6	-65	0.999	0.2
Acrinathrin 2	26.18	27.46	0.003	3.6	19	-400	0.996	0.1
Cyfluthrin 1	27.74	30.65	0.003	0.8	14	-191	0.999	0.1
Cypermethrin 1	27.82	31.31	0.003	3.1	10	-121	0.999	0.1
Cyfluthrin 2	28.19	30.95	0.003	1.1	16	-276	0.997	0.1
Cypermethrin 2	28.29	31.65	0.002	4.3	10	-156	0.998	0.2
Cyfluthrin 3	28.30	31.11	0.004	1.3	15	-251	0.997	0.1
Cypermethrin 3	28.38	31.80	0.002	2.9	9	-108	0.999	0.2
Cyfluthrin 4	28.62	31.25	0.003	1.0	11	-142	0.999	0.1
Cypermethrin 4	28.70	31.96	0.004	3.9	8	-107	0.999	0.2
Flucythrinate 1	29.09	32.13	0.002	1.1	22	-147	0.999	0.07
Flucythrinate 2	29.59	32.69	0.003	1.2	19	-138	0.998	0.09
Fenvalerate 1	29.72	33.94	0.004	4.3	28	-200	0.998	0.07
Fenvalerate 2	30.28	34.66	0.004	3.0	16	-95	0.999	0.1
Deltamethrin 1	30.69	35.90	0.003	1.7	8	-12	1.000	0.1
Deltamethrin 2	31.32	36.79	0.004	4.9	22	-172	0.998	0.1
Fluvalinate 1	31.37	34.34	0.003	2.2	17	-198	0.994	0.2
Fluvalinate 2	31.47	34.58	0.003	2.2	15	-182	0.994	0.2
Azoxystrobin	32.37	41.13	0.004	1.7	27	-229	0.997	0.06

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

^b Degradation product of dicofol.

^c Degradation product of endrin.

が広く、かつ測定値の再現性に優れているとされる µECD を装着したデュアルカラム GC-µECD を作製した。なお、分離カラムには、汎用される DB-1701P などと比較してより不活性で対象成分を明確に分離する能力を確認した内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm の Stx-CLPesticides、および分離パターンの大きく異なる内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.20 µm の CLPesticides2 を組み合わせた。

試験溶液 2 µL をスプリットレスで注入し、Yコネクターで内径 0.25 mm の 2 種類のカラムに分岐させたときの分配率、および保持時間の再現性などを検証するために、0.05 ~ 1 µg/mL 混合標準溶液を 10 回連続して測定するデュアルカラム GC-µECD の性能評価試験を実施し、その結果を Table 1 に示した。保持時間とピーク面積の相対標準偏差(変動係数)は、それぞれ 0.002 ~ 0.007% (平均 0.004%)、0.4 ~ 4.9% (平均 1.4%) と再

現性は非常に良好であった。検量線については、0.0005 ~ 5 µg/g の範囲で寄与率 (r^2) 0.994 ~ 1.000 と 4 オーダー以上の優れた直線性が確認された。また、検出限界値は 0.003 ~ 0.3 ng/g と従来の GC-ECD⁵⁾ に比較して 10 倍以上も高感度であった。

2. 試験溶液の調製

デュアルカラム GC-µECD を日常の残留農薬分析に応用して検証したところ、GPC/グラファイトカーボン SPE およびシリカゲル/PSA カートリッジ連結 SPE による精製^{3, 4)} のみでは、食品によっては妨害ピークが出現し、定性および定量が困難となる場合も見受けられた。そこで、フロリジルカートリッジカラムを用い、ジエチルエーテル - ヘキササン (15 : 85) 20 mL、次いでアセトン - ヘキササン (30 : 70) 20 mL で溶出して 2 画分とすることで妨害成分を除去あるいは分散する SPE 精製法⁵⁾ を追加した。Table 2 にフロリジルカート

Table 2. Elution of compounds from Florisil SPE column, and recovery of spiked pesticides from spinach

Compound	Elution rate (%) from Florisil SPE column		Spiking level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery ^a (%)				
	Frac. 1	Frac. 2		Dual-column GC- μECD			NCl mode GC/MS	
				Group	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
-HCH	101		0.01	1	91.1	3.2	85.7	8.6
-HCH	97		0.01	1	94.2	2.3	125.2	10.1
Diazinon	95		0.1	2	94.7	2.0	64.4	6.9
-HCH	97		0.01	1	95.7	2.7	73.6	7.4
-HCH	96		0.01	1	79.3	3.3	76.7	13.8
Dimethoate		94	0.05	2	82.1	4.2	72.7	6.8
Cyanophos		98	0.01	2	87.5	5.1	74.3	9.2
Chlorpyrifos-methyl	98		0.02	1	91.0	4.0	70.7	6.2
Tolclofos-methyl	101		0.02	2	94.7	1.8	59.1	9.3
Chlorothalonil (TPN)		103	0.02	1	34.5	4.1	5.8	10.7
Chlorpyrifos	102		0.02	1	102.1	1.1	75.8	10.5
Vinclozolin	99		0.02	2	101.0	2.2	78.2	8.0
Malathion	28	70	0.2	2	89.2	2.6	133.8	7.4
Fenitrothion (MEP)	71	26	0.02	1	93.6	5.9	160.6	14.3
Triadimefon		105	0.02	2	95.6	4.8	101.7	12.6
Phenthoate	94	6	0.05	2	96.0	4.1	136.7	10.4
Fthalide		95	0.01	1	87.2	1.5	68.7	8.1
Bromophos-ethyl	102		0.02	1,2	97.2	1.8	79.9	10.8
<i>p,p'</i> -DDE	101		0.01	1	103.4	2.0	88.9	16.2
-Endosulfan	96		0.01	2	100.2	4.1	49.7	7.2
Captan		97	0.05	1	55.8	4.3	3.6	5.0
Prothiophos	105		0.02	1	97.9	3.1	62.6	12.5
Kresoxim-methyl		94	0.02	2	90.1	5.5	133.6	5.1
Dieldrin	97		0.01	1	104.5	3.2	65.3	15.6
Hexaconazole		93	0.02	2	112.5	4.9	240.2	10.5
Buprofezin	89	12	0.2	1	100.1	3.4	67.2	6.5
Isoprothiolane		96	0.05	2	91.7	7.6	88.2	23.4
Endrin	102		0.02	1	103.9	2.4	65.8	6.2
Procymidone	91	11	0.05	2	103.3	3.2	72.8	12.0
Triflumizole		96	0.05	1	114.0	8.4	66.3	26.4
<i>p,p'</i> -DDD	99		0.01	1	103.8	2.8	65.6	8.0
Flutolanil		97	0.2	1	93.3	4.8	51.3	7.7
-Endosulfan	39	61	0.01	2	92.5	3.7	43.7	12.0
Isoxathion	103		0.05	1	104.7	2.9	145.3	7.4
Ethion	104		0.05	2	102.0	2.7	58.1	10.1
<i>p,p'</i> -DDT	98		0.01	1	105.7	3.3	135.2	11.3
Myclobutanil		91	0.10	2	114.4	7.8	67.5	12.5
Iprodion metabolite		105	-	2	108.3	5.1	135.4	12.9
Chlorfenapyr	100		0.02	1	97.8	2.1	73.4	8.3
Dicofol	91		0.1	1	118.9	7.6	28.6	14.4
Bifenthrin	97		0.05	1	103.0	2.7	70.8	9.5
Endosulfan sulfate		96	0.02	2	89.9	3.7	138.6	8.6
Bromopropylate		100	0.02	1	108.5	6.3	140.2	7.8
Iprodion		93	0.1	2	70.3	7.6	105.4	13.1
Fenpropathrin	98		0.1	1	102.3	1.6	67.5	11.9
Tetradifon	97		0.02	1	102.2	2.0	53.7	7.3
Fenarimol		100	0.02	2	86.7	5.5	155.0	14.9
Permethrin	95		0.1	1	101.9	1.1	54.3	11.9
Cyhalothrin	95		0.1	2	107.1	7.1	181.9	12.5
Pyridaben	71	27	0.1	1	105.8	7.2	49.1	12.0
Acrinathrin	94		0.2	1	53.1	4.6	84.9	10.2
Cyfluthrin	95	5	0.2	2	97.4	5.4	171.7	14.7
Cypermethrin	93		0.2	1	101.6	4.6	104.0	11.4
Flucythrinate	89	8	0.1	2	107.2	7.6	165.8	11.9
Fenvalerate	97		0.1	1	94.4	3.7	173.6	10.2

Table 2. Continued

Compound	Elution rate (%) from Florisil SPE column		Spiking level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery ^a (%)				
	Frac. 1	Frac. 2		Dual-column GC- μECD			NCI mode GC/MS	
				Group	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
Deltamethrin	95	4	0.1	1	106.0	5.3	53.3	28.3
Fluvalinate	94	4	0.1	2	109.0	4.0	123.6	13.7
Azoxystrobin		83	0.1	1	93.6	3.6	54.4	14.3

^a Average of 5 experiments.

リッジカラムからの農薬成分の溶出率を示した。

3. 添加回収試験

ホウレンソウに混合標準溶液 1 mL を添加後、1 時間放置したものについて試験溶液を調製し、デュアルカラム GC- μECD により測定して回収率を求めた。その結果を Table 2 に示したように、食品成分の共存下で分解しやすいクロロタロニル、キャプタン⁶⁾、および GPC での溶出が早いアクリナトリン⁵⁾ を除く農薬成分で 70.3 ~ 118.9% の回収率 (相対標準偏差 1.1 ~ 8.4%) が得られ、本分析法の優れた定量性が確認された。

なお、同じ試験溶液を NCI モード GC/MS により測定して回収率を求めたところ、Table 2 に示したように、回収率は 28.6 ~ 240.2% (相対標準偏差 5.1 ~ 28.3%) と定量性の点ではデュアルカラム GC- μECD に大きく劣ることが判明した。その原因としては、注入部の活性部位で生じるマトリックス効果によるピーク強度の上昇⁷⁾ やイオン化部で生じるマトリックスの共存下におけるイオン化効率の変動⁴⁾ などが考えられた。NCI モード GC/MS は、試薬ガスが MS 部に導入され、真空度が低下することから、試料導入時の高圧注入には限界がある。これに対して、デュアルカラム GC- μECD では 300 kPa の高圧注入を採用した。これによりシングルインジェクション・デュアルカラム方式と相まって、カラム流量が 15 mL/分と非常に多くなり、気化した試料が瞬時にカラムに導入されることから、高度に不活性化処理されたインサートなどの採用と、それを汚さない試料調

製法との相乗効果もあって、注入部の活性部位で生じるマトリックス効果が大幅に抑制されるものと考えられた。

まとめ

より確実な定性および定量を可能とするシングルインジェクション・デュアルカラム方式、高い分離能力を有し、分離パターンの大きく異なる内径 0.25 mm の 2 種類のキャピラリカラム、高感度で再現性に優れる μECD を採用したデュアルカラム GC- μECD は、妨害成分を効果的に除去する試料調製法と組み合わせることによって、日常の食品中残留農薬分析に適用可能と判断される検討結果が得られた。

本検討の概要は、第 11 回 IUPAC 農薬化学国際会議 (2006 年 8 月、神戸) において発表した。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について、平成 17 年 1 月 24 日、食安発第 0124001 号、2005
- 2) 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、J-299-J-304、2006
- 3) Ueno E., et al: 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. J. AOAC Int., 89, 1641-1649, 2006
- 4) Ueno E., et al: Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography/mass spectrometry after gel permeation chromatography and graphitized carbon column cleanup. J. AOAC Int., 87, 1003-1015, 2004
- 5) 上野英二 他: 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
- 6) 農薬残留分析法研究班編: 最新農薬の残留分析法、中央法規出版、p.142-144、189-191、2006
- 7) Erney D. R., et al: Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. J. Chromatogr., 638, 57-63, 1993

Multi-residue analysis of pesticides in foods by gas chromatography with micro-electron capture detector

Eiji Ueno, Yuka Kabashima, Harumi Oshima, Tsutomu Ohno

We evaluated a multi-residue method of pesticides in foods by single injection, dual column, and dual micro-electron capture detection gas chromatography (dual-column GC- μ ECD). The sample was extracted with acetonitrile, and the extract was cleaned up by a salting-out step. Co-extractives were removed by gel permeation chromatography (GPC) /graphitized carbon column solid-phase extraction (SPE) and tandem silica gel/PSA cartridge column SPE. After fractionation by Florisil cartridge column SPE, each fraction was determined by dual-column GC- μ ECD. In all cases, the repeatability studies (n=10) of retention time and peak area yielded RSD values lower than 0.007% (average of 0.004%) and lower than 4.9% (average of 1.4%), respectively, and calibration curves (0.0005-5 μ g/g) were linear with correlation coefficients higher than 0.994. Good sensitivity of the method was obtained with limits of detection ranging from 0.003 to 0.3 ng/g. Average recoveries of pesticides, except for degradable chlorothalonil etc., from fortified spinach sample ranged from 70.3 to 118.9% with RSD values of <8.4%.

Key words: pesticide residue, food, dual-column, GC, μ ECD

調 査 研 究

ダイエット用健康食品（美秀堂、加強型）に添加された 医薬品成分の検索

三上栄一、池田清栄、大野 勉

要 旨

2007年8月に、薬事衛生上問題となった中国製ダイエット用健康食品を対象とし、添加が疑われた医薬品成分の含有の有無について検索、試験を行った。試料は、茶褐色の粉末を内容物とする青色カプセルであり、原材料として蜂花粉、茶叶抽出物、さんざし、蓮子、枸杞、まんねんたけなど14成分が表示されていた。ガスクロマトグラフィー/質量分析法、液体クロマトグラフィー/フォトダイオードアレー法、液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いて検討したところ、シブトラミン（国内未承認食欲抑制成分、9.2mg/カプセル）、フェノールフタレイン（使用中止下剤成分、10.9mg/カプセル）、甲状腺末（甲状腺ホルモンを含み生体の代謝を高める成分）が検出、確認されたので、今回はその分析手法について報告する。

キーワード：ダイエット用健康食品、シブトラミン、フェノールフタレイン、甲状腺末

はじめに

近年の代替医療指向を受けていわゆる健康食品が、栄養補給や健康増進を目的として店頭販売だけでなく新聞・雑誌、インターネット広告による通信販売で流通している。製品の多くは民間療法として伝承されているものであるが、なかには効果を増強させるため医薬品成分の添加された事例がある。2002年には、中国で製造されたいわゆるダイエット用食品を購入、摂取した800名を超える消費者が、肝障害など健康被害を引き起こ

し、このうち女性3名が死亡した。後の調査から、多くの中国製ダイエット食品に甲状腺末、フェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミンなど医薬品成分が作為的に添加されていることが明らかになった。この時の愛知県内健康被害者は、118人と全国で最多であった。さらに2005年にもダイエット食品摂取者の死亡が報告され、同様な消費者の健康被害事例はあとを絶たない。インターネットの普及により、国内のみならず海外からも個人が簡単に製品を購入できるようになったため、今後も消費者自らが気付かないうちに健康被

害の危険に晒される同様な被害事例の発生が、懸念される。

医薬品成分の混入された製品は、本来医薬品に該当し薬事法違反（無承認無許可医薬品）¹⁾であるにもかかわらず、食品と称して製造、輸入又は販売されている^{2, 3)}。著者らは、このような違法な製品が社会に流通することによって惹起される健康被害を未然に防ぐため、効能などを暗示あるいは標ぼうしている製品に関し、その内容から添加を疑われる医薬品成分の含有について調査を行ってきた⁴⁻⁷⁾。今回は、2007年8月に、薬事衛生上問題となった中国製ダイエット用健康食品を対象とし、添加が疑われた医薬品成分の含有の有無について検索、試験を行った。ガスクロマトグラフィー/質量分析法（GC/MS）、液体クロマトグラフィー/フォトダイオードアレー法（HPLC/PDA）、液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）を用いて検討したところ、シブトラミン（国内未承認食欲抑制成分、9.2mg/カプセル）、フェノールフタレイン（使用中止下剤成分、10.9mg/カプセル）、甲状腺末（甲状腺ホルモンを含み生体の代謝を高める成分）が検出、確認されたので、その分析手法について報告する。

実験方法

1. 試料

製品名は美秀堂（加强型）、製造元は康仕源国集团有限公司と記載されていた。蜂花粉、茶叶抽出物、さんざし、蓮子、枸杞、大蘇、アロエ、真珠粉、まんねんたけ、ビタミン B6、ビタミン C、ビタミン E、カルシウム、亜鉛など 14 成分が原材料として表示されており、医薬品成分の添加について記載はなかった。目安摂取量は 1 日あたり 2 個と記載され、青色カプセルの内容物（約 200mg / カプセル）は茶褐色の粉末であった。

2. 試薬、装置及び測定条件

1) 試薬 標準物質とした塩酸シブトラミン（SIB）は LKT Laboratories 製、フェノールフタ

レイン（PHP）は和光純薬製、また日本薬局方（日局）乾燥甲状腺は帝国臓器製薬製のものを用了。タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）は和光純薬製、固相抽出（ボンドエリート SAX、カラムサイズ 500mg/3mL）カートリッジは Varian 製を用了。

2) 装置 GC/MS は、Hewlett Packard 製 5973 型、また HPLC/PDA は、島津製作所製 Class-VP シリーズを用了。LC/MS は、Agilent 製 HP1100LC システムを Micromass 製 Quattro II 質量分析計に接続して用了。

3) GC/MS 測定条件 カラム：Restek-5Si1 MS（0.25mm×30m、Uniflex 製）、カラム温度：60（1分）-10 /min -200 -5 /min -280（5分）、注入口温度：240、ヘリウムガス：1.2mL/min、注入量：1μL、保持時間：SIB 16.4 分、PHP 35.1 分

4) HPLC/PDA 測定条件 カラム：Cosmosil 5C18 MS-II（4.6×150 mm、5μm、ナカライテスク製）、移動相：水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸混液（650：350：1）、測定波長：確認、200-350nm、定量、225nm、カラム温度：40、流速：0.8mL/min、注入量：5μL、保持時間：PHP 9.8 分、SIB 15.8 分

5) LC/MS 測定条件 カラム：TSK-gel ODS-80T₄（4.6×150mm、5μm、東ソー製）、移動相：水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸混液（600：400：4.5）、流速：1.0mL/min、スプリット比：1：8、コーン電圧：30V、イオン源温度：100、デソルベーション温度：250、コリジョンエネルギー：25eV（T3）、30eV（T4）、イオン化：正イオン、注入量：50μL、保持時間：リオチロニン（T3）6.5 分、レボチロキシン（T4）12.5 分

3. 試料溶液の調製

カプセルから内容物を取り出し、その約 50mg を精密に量り、抽出溶媒としてメタノールを加えて 30 分間超音波処理し、さらにメタノールを加えて 50mL とした。この液を 0.45μm のメンブランフィルターでろ過し、GC/MS、HPLC/PDA 用の試料溶液とした。また、甲状腺ホルモン（T3、T4）を

測定するため、試料約 200mgをタンパク質分解酵素で処理⁸⁾した後、SAXカートリッジで精製し⁹⁾、LC/MS用の試料溶液とした。

4. 標準溶液の調製

SIB と PHP の標準溶液は、50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度となるようにメタノールに溶解し調製した。また、日局乾燥甲状腺 10mg、20mg をそれぞれ量り、試料溶液の調製と同様に操作し、甲状腺ホルモン測定用標準溶液とした。

結果及び考察

1. GC/MS による確認試験

MSは物質の質量に関する情報が得られ、食品など複雑な成分の混合物中の物質同定に有効な手段となる。添加されたダイエット成分をGC/MSにより検索するため、分離キャピラリーカラムに溶解シリカを材質とし、Silarylene化学結合型 5%ジフェニル - 95%ジメチルポリシロキサンを液相とするRestek-5Si1 MSを用いて、検討した。ダイエット食品検体をメタノールで抽出し、試料溶液を調製し分析したところ、全イオン検出により、保持時間 16.4 分と 35.1 分にピークが現れた。保持時間 16.4 分のマススペクトル測定では m/z 114 に基準ピークが観察され、 m/z 72、128 にフラグメントイオンが観察された (Fig.1A)。このマススペクトルは、SIB標準溶液から得られたマススペクトルと同様であった。また、保持時間 35.1 分のマススペクトル測定では m/z 274 に基準ピークが観察され、 m/z 207、225、257 にフラグメントイオンが観察された (Fig.1B)。これらのマススペクトルは、PHP標準溶液から得られたマススペクトルと同様であった。一方、その他の医薬品成分検出に関しては、GC/MS付属の化合物検索システムにより、情報が得られなかった。半揮発性化合物、PCB 同族体の分析に応用され、高不活性、低ブリード、高再現性として報告^{10, 11)}された Restek-5Si1 MSカラムは、比較的沸点が高くカラム保持が強い薬物の検出や共存成分由来の高沸点化合物のカラムからの焼き出しが可能となり、

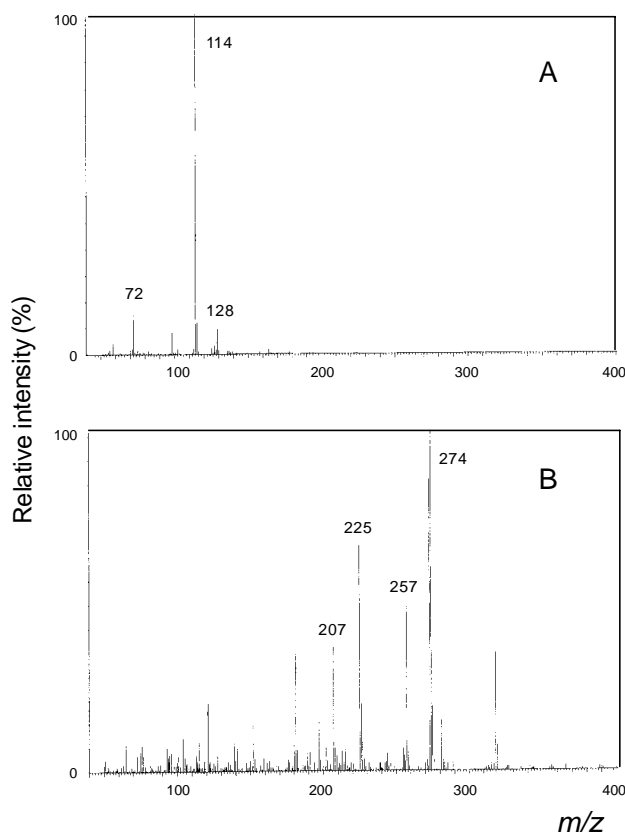


Fig. 1 Mass spectra of (A) SIB and (B) PHP in a slimming supplement with GC/MS

薬物スクリーニングに有効と考えられた。

2. HPLC/PDA による確認試験

PDA を併用した HPLC は、クロマトグラム上に現れたピークの吸収スペクトルを測定し、ピーク成分をより正確に確認できることから、成分の同定に有用となる。試料を分析するため、移動相のアセトニトリル濃度を 5 ~ 85vol% の範囲で検討したが、SIB と PHP のほかに医薬品成分らしきピークは観察されなかった。また、アセトニトリル濃度 35vol% で、保持時間 9.8 分と 15.8 分にピークが検出された。保持時間 15.8 分のピークを PDA でモニターすると 201 及び 224nm 付近に極大吸収が現れた (Fig.2A)。これは、SIB の保持時間及びスペクトルと一致した。一方、保持時間 9.8 分に検出されたピークは、229 及び 274 付近に極大吸収が現れ (Fig.2B) PHP の保持時間及びスペクトルと一致した。この結果、SIB と PHP の同時分析が 18 分以内で可能となった。定量は、SIB と PHP の極大吸収波長に近い 225nm を検出波長としたが、定量を妨害するピークは検出されな

かった。HPLC で得られたクロマトグラムを Fig.3 に示した。

3. LC/MS による確認試験

試料中に甲状腺素が添加されていないかを確認するため、その生理活性の本質である甲状腺ホルモンT3、T4 をLC/MSにより分析した。HPLCにおいてODSカラムを用い、水/アセトニトリル系の移動相溶媒を使用し検討した結果、T3 とT4 のピークは観察されなかった。このため、質量分析に汎用される高揮発性のトリフルオロ酢酸¹²⁾を電解質として移動相へ添加したところ、ピークが現れた。標準として用いた日局乾燥甲状腺のT3 測定では、ピークは保持時間 6.5 分に検出され、正イオン測定によりm/z 651.9 ([M+H]⁺) に分子イオンピーク、m/z 605.9 ([M+H-HCOOH]⁺) にフラグメントイオンピークが観察された。またT4 測定では、ピークは保持時間 12.5 分に検出され、m/z 777.6 ([M+H]⁺) に分子イオンピーク、m/z 731.6

観察された。一方、同様の条件で試料を分析した際、保持時間約 6.7 分と 12.7 分にピークが検出された。保持時間 6.7 分に検出されピークは、m/z 651.7 ([M+H]⁺) に分子イオン、m/z 605.9 ([M+H-HCOOH]⁺) にフラグメントイオンが観察された。また保持時間 12.7 分に検出されたピークは、m/z 777.5 ([M+H]⁺) に分子イオン、m/z 731.5 ([M+H-HCOOH]⁺) にフラグメントイオンが観察された。この結果、試料中にT3 と T4 の添加が確認された。その際のマススペクトルをFig.4 とFig.5 に示したが、若干の余裕をもたせたT4 の検出限界は、試験溶液中 0.5 µg/mLであった。

4. 試料の定量結果

GC/MS 及び HPLC/ PDA により SIB 及び PHP の含有が確認されたため、HPLC を用いて定量試験を行った。SIB と PHP は、15~100 µg/mL の濃度範囲で 5 段階に希釈調製し、得られたピーク面積から検量線を作成した。その結果、SIB の回帰直線

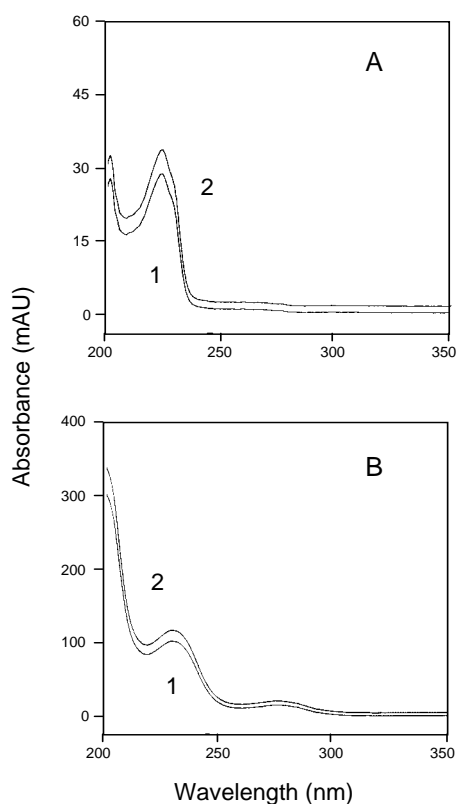


Fig. 2 UV spectra of (A) SIB and (B) PHP in a slimming supplement with HPLC/PDA
1: standard solution, 2: sample.

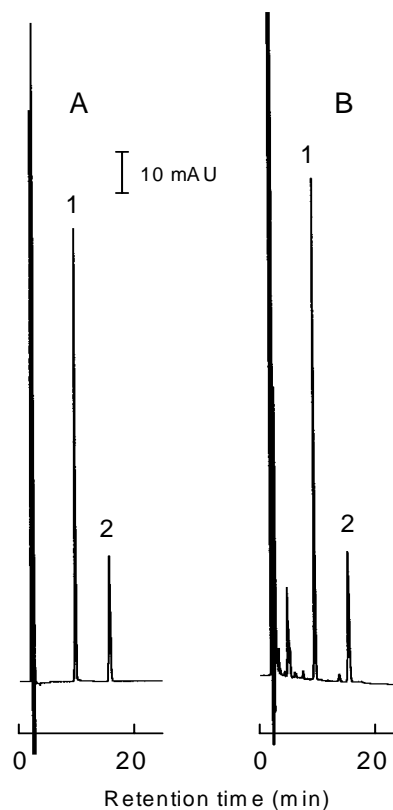


Fig. 3 HPLC chromatogram of (1) SIB and (2) PHP in a slimming supplement
A: standard solution, B: sample.

([M+H-HCOOH]⁺) にフラグメントイオンピークが

は、 $y = 52.1x - 98.9$ (相関係数 0.999) また PHP

の回帰直線は、 $y = 111x - 208$ (相関係数 0.999) となり、いずれも良好な直線性を示し、かつ特定の残差の傾向が認められなかった。これらの HPLC 測定条件により分析したところ、1 カプセル中 9.2mg の SIB と 10.9mg の PHP が含まれていた。また、SIB と PHP の検出限界はそれぞれ $4.5 \mu\text{g/mL}$ と $1.5 \mu\text{g/mL}$ であったが、海外で流通する SIB 製剤の用量を考えると十分な感度であった。

5. まとめ

今回の事例では、SIB、PHP及び甲状腺末が製品に同時添加されており、SIBとPHPの含有量は、それぞれの処方量程度であり、十分な薬効を持つと考えられた。添加された成分のうちSIBは、海外での承認例はあるが、国内では未承認な医薬品である。中枢性食欲抑制作用があり、肥満症の治療薬として使用されるが、血圧上昇、

心拍数増加、頭痛、口渇などの副作用も報告され¹³⁾、フランスでは投薬が禁じられている。緩下剤フェノバリンの構成成分であるPHPは、1996年米国で発がん性が指摘された¹⁴⁾。このためフェノバリンは、日局 13 第二追補では品目削除となり¹⁵⁾、以後使用中止の医薬品となった。また甲状腺末は、甲状腺ホルモンの作用である新陳代謝の亢進により、体内の脂肪を消費させて減量させる効果を狙って添加されたものと考えられた。しかし、心悸亢進、発汗などの発現と連用による甲状腺機能障害が報告され¹⁶⁾、医師の指示の下でのみ使用が認められている。このような製品が市場に流通することによって、消費者自らが気付かないうちに健康被害の危険に晒され、重篤な副作用を引き起こしかねない。このため、引き続き市場流通品について監視していく必要があり、

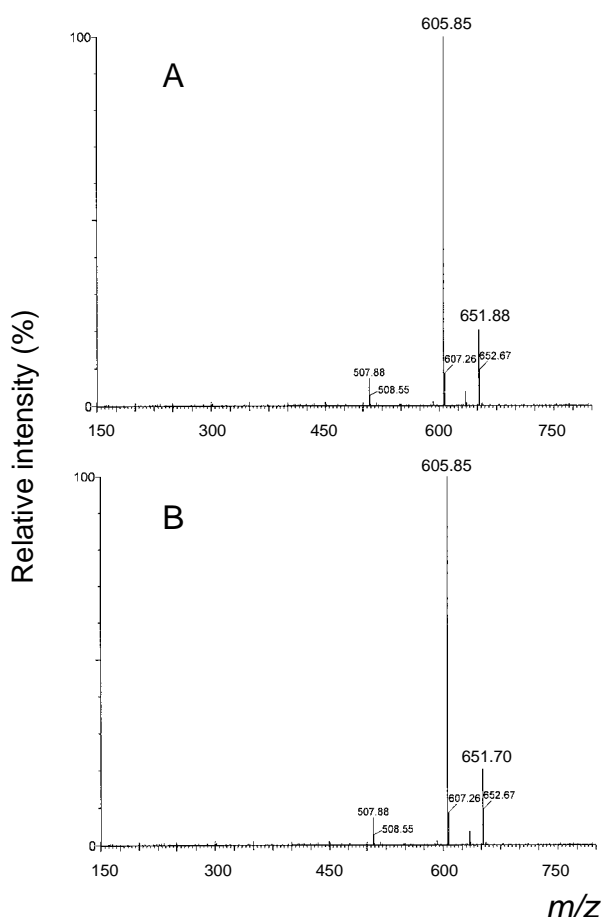


Fig. 4 Mass spectra of (A) T3 in dried thyroid and (B) T3 in a sample with LC/MS in positive ion mode

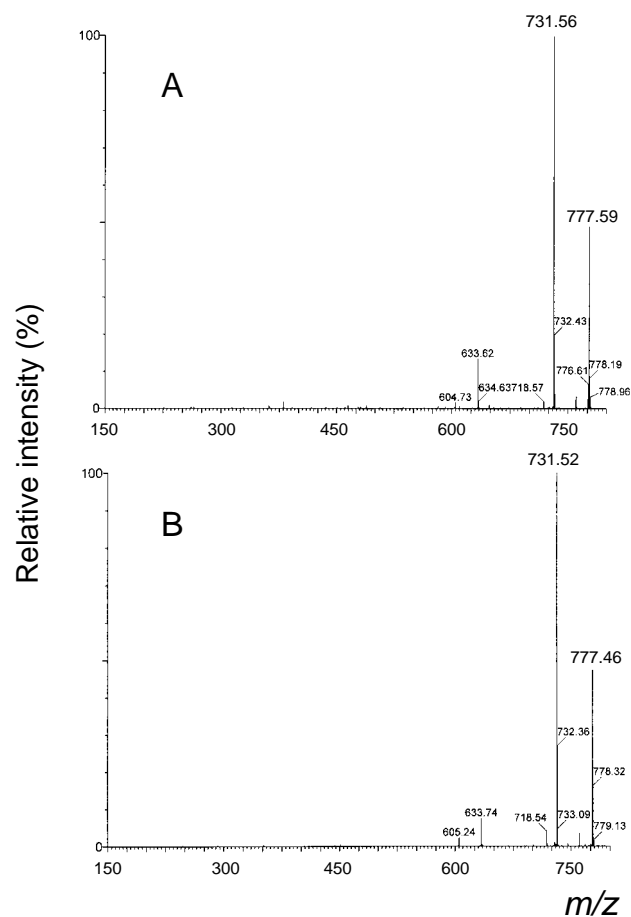


Fig. 5 Mass spectra of (A) T4 in dried thyroid and (B) T4 in a sample with LC/MS in positive ion mode

その確認、定量法として本法は有用と考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局長通知，薬食発第 0331009 号，医薬品の範囲に関する基準の一部改正について，平成 16 年 3 月 31 日。
- 2) 守安貴子，重岡捨身，岸本清子，石川ふさ子，中嶋順一，上村 尚，安田一郎：健康食品中に含有するシルデナフィルの確認試験 薬学雑誌 121, 765-769, 2001。
- 3) 熊坂謙一，小島 尚，土井佳代，佐藤修二：健康食品に添加されていた経口血糖降下薬グリベンクラミドの検出事例，薬学雑誌 123, 1049-1054, 2003。
- 4) 三上栄一，後藤智美，大野 勉，早川順子，加賀美忠明：中国産減肥茶に添加された食欲抑制薬（フェンフルラミン）の分析，愛知県衛生研究所報 48, 9-13, 1998。
- 5) Mikami E., Ohno T., Matsumoto H. : Simultaneous identification/determination system for phentolamine and sildenafil as adulterants in soft drinks advertising roborant nutrition, Forensic Sci. Int. 130, 140-146, 2002。
- 6) 三上栄一，大野 勉，岡 尚男，石原廣男：個人輸入したダイエット食品に検出された医薬品成分に関する検討，医療薬学 31, 52-57, 2005。
- 7) Mikami E., Goto T., Ohno T., Oka H., Kanamori H.: Simultaneous analysis of seven benzodiazepines in dietary supplements as adulterants using high performance liquid chromatography and its application to an identification system for diazepam, J. Health Sci. 51, 278-283, 2005。
- 8) Mikami E., Ohno T., Matsumoto H., Sekita S.: Detection of thyroxine in dietary supplements using an enzyme-linked immunosorbent assay, J. Health Sci. 49, 547-550, 2003。
- 9) 宮本文夫，石井俊靖，長谷川貴志，矢崎廣久：HPLC による健康食品中の乾燥甲状腺由来の甲状腺ホルモン定量のための前処理方法の改良，医薬品研究 36, 377-387, 2005。
- 10) Berntssen M. H.G., Lundebye A.-K., Torstensen B. E.: Reducing the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in farmed Atlantic salmon by substitution of fish oil with vegetable oil in the feed, Aquacult. Nutr. 11, 219-231, 2005。
- 11) Oterhals A., Solvang M., Nortvedt R., Berntssen M. H. G.: Optimization of activated carbon-based decontamination of fish oil by response surface methodology, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109, 691-705, 2007。
- 12) Sorenson W. R., Sullivan D.: Determination of aristolochic acid I in botanicals and dietary supplements potentially contaminated with aristolochic acid I using LC-UV with confirmation by LC/MS. Collaborative study, J. AOAC Int. 90, 925-933, 2007。
- 13) Wolfe S.M., Sasich L.D., Barbehenn E.: Petition to FDA to ban the diet drug sibutramine (MERIDIA), HRG publication #1613, Mach 19, 2002。
- 14) Dunnick J.K., Hailey J.R.: Phenolphthalein exposure causes multiple carcinogenic effects in experimental model systems, Cancer Res. 56, 4922-4926, 1996。
- 15) 厚生省医薬安全局長通知，医薬発第 1420 号，第一三改正日本薬局方第二追補の制定等について，平成 11 年 12 月 21 日。
- 16) 日本医薬品集フォーラム監修：日本医薬品集 医療薬 2007，じほう，2006，pp.882-883。

Detection of sibutramine, phenolphthalein, and thyroid hormone as adulterants in a slimming supplement

Eiichi Mikami, Seiei Ikeda, Tsutomu Ohno

In August 2007, we investigated a slimming supplement to screen for pharmaceutical adulterants using a combination of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS), and high performance liquid chromatography/photodiode array systems (HPLC/PDA). Adulterants detected for weight loss were sibutramine, phenolphthalein, and thyroid hormone. Sibutramine was identified using GC/MS and HPLC/PDA and was present at 9.2 mg/capsule. Phenolphthalein was identified using GC/MS and HPLC/PDA and was present at 10.3 mg/capsule. Thyroid hormone was identified using an LC/MS method. Although such supplements are potentially hazardous to health, people are unaware of the risks since they generally do not know that drugs have been added. The identification/determination system combined with high selectivity described here provided ease of analysis to yield reliable results in a regulatory laboratory environment. It is suitable for the analysis of medicinal slimming ingredients in dietary supplements.

 他誌掲載論文抄録

A survey on the referral of tuberculosis patients at the National Tuberculosis Institute, Yemen

 Al-Hammady A¹, Ohkado A², Masui T, Al-Absi A¹
¹National Tuberculosis Control Programme, Ministry of Public Health & Population, Sana'a City, Yemen, ²Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association
 International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 11(8), 928-930, 2007

The study aims to determine whether the tuberculosis (TB) patients referred from the National Tuberculosis Institute (NTI), Sana'a City, actually present themselves, are registered and initiate treatment at the health facilities to which they are referred. In 2004, 591 smear-positive TB cases were diagnosed, 481 cases were referred back to

health centres, 75 cases were registered at the NTI and 35 cases could not be retrieved. Among the 481 referred cases, 427 cases actually presented themselves and were registered at the health centres (88.8%). The average number of days between the day of referral and that of registration was 2.5 days (median 1 day).

Nationwide survey on the prevalence of anti-tuberculosis drug resistance in the Republic of Yemen, 2004

 Al-Akhali A¹, Ohkado A², Fujiki A², Mitarai S³, Yamada N⁴, Masui T, Otomo K³, Yamada H³, Seita A⁵, Mori T⁶, Al-Absi AN⁷
¹National Tuberculosis Reference Laboratory, National Tuberculosis Institute, Ministry of Public Health and Population, Sana'a, Yemen, ²Department of Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), ³Mycobacterium Reference Centre, Research Institute of Tuberculosis, JATA, ⁴Department of International Cooperation, Research Institute of Tuberculosis, JATA, ⁵TB Control, Eastern Mediterranean Regional Office, Cairo, Egypt, ⁶National Institute of Infectious Diseases, Leprosy Research Centre, ⁷National Tuberculosis Control Programme, Ministry of Public Health and Population, Sana'a, Yemen

International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 11(12), 1328-1333, 2007

OBJECTIVES: To determine the prevalence of resistance to the four major anti-tuberculosis drugs, isoniazid, rifampicin, streptomycin and ethambutol, in Yemen.

METHODS: Cluster sampling with probability proportionate to size was applied. Susceptibility to four major anti-tuberculosis drugs was examined. The proportion method using Löwenstein-Jensen medium or Ogawa medium was carried out.

RESULTS: A total of 790 primary culture isolates from tuberculosis (TB) cases enrolled at the National Tuberculosis Institute, Yemen, were examined. In the confirmation culture at the supranational reference laboratory, 227 of them failed to grow on the secondary culture or were proved to be mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* and were excluded from further analysis. Among 563

cultures, 510 were obtained from new cases and 53 from previously treated cases. The prevalence of resistance to any four drugs was 9.8% (95%CI 7.0-12.5) among new cases and 17.4% (95%CI 12.0-33.5) among previously treated cases. The prevalence of multidrug-resistant TB was 3.0% (95%CI 1.5-4.5) among new cases and 9.4% (95%CI 0.2-18.7) among previously treated cases.

CONCLUSION: The first nationwide prevalence survey on resistance to the four major anti-tuberculosis drugs in Yemen showed a relatively low prevalence of drug-resistant cases, but a high prevalence of multidrug resistance among new cases.

Dietary patterns and the risk of breast cancer in Japanese women

Hi rose K, Matsuo K¹, Iwata H², Tajima K¹

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

²Department of Breast Oncology, Aichi Cancer Center Hospital
Cancer Science, 98(9), 1431-1438, 2007

Components of the Japanese diet which might contribute to the relatively low breast cancer incidence rates in Japanese women have not been clarified in detail. To evaluate associations between broad dietary patterns and breast cancer risk in a Japanese population, we conducted a case-control study using data from the hospital-based epidemiologic research program at Aichi Cancer Center (HERPACC). Factor analysis (principal components) was used to derive food patterns based on the 31 food variables and

allowed designation of four major dietary patterns: *prudent*, *fatty*, *Japanese* and *salty*. In total, 1,885 breast cancer cases were included and 22,333 female non-cancer patients were recruited as the control group. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI) were determined by multiple logistic regression analysis.

After adjusting for potential confounders, there were no clear associations between the *fatty*, *Japanese* or *salty* dietary patterns and overall breast cancer risk. In contrast, an inverse association was evident for the

prudent dietary. Women in the highest quartile of the *prudent* dietary pattern scores, had a 27% decreased risk of breast cancer compared with those in the lowest (95%CI:0.63-0.84, *p* for trend <0.0001). In addition, for women with a BMI ≥ 25 , the highest quartile of the *fatty* factor score was associated with a 58% increment in breast

cancer risk compared to the lowest quartile, with a significant linear trend (*P*=0.027).

We found *prudent* dietary pattern to be negatively associated with breast cancer risk. In addition, *fatty* and *Japanese* patterns may increase breast cancer risk among obese women.

One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer: a case-control study in Japan

Suzuki T¹, Matsuo K¹, Hirose K, Hiraki A¹, Kawase T¹, Watanabe M¹, Yamashita T², Yatabe Y³, Iwata H², Tajima K¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, ²Department of Breast Oncology, Aichi Cancer Center Hospital, ³Department of Pathology and Molecular Diagnostics, Aichi Cancer Center Hospital
Carcinogenesis, 29(2), 356-362, 2008

Folate plays an essential role in DNA methylation and synthesis, and has been involved in breast cancer carcinogenesis. Functional polymorphisms in genes encoding one-carbon metabolism enzymes, methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR* C677T), methionine synthase (*MTR* A2756G), methionine synthase reductase (*MTRR* A66G) and thymidylate synthase (*TS*), influence folate metabolism and thus might be suspected of impact on breast cancer risk.

We conducted a case-control study with 456 breast cancer cases newly and histologically diagnosed and 912 age and menopausal status matched non-cancer controls to clarify associations with these

polymorphisms in Japan. Gene-environment interactions between polymorphisms and folate consumption were also evaluated.

None of the polymorphisms showed any significant impact on breast cancer overall risk, but on menopausal status-based analysis, we observed the association with increased risk of postmenopausal breast cancer in *MTHFR* 677TT genotype (odds ratio (OR) =1.83, 95% confidence interval (CI): 1.08–3.11, trend *P*=0.048). In combination analysis, a higher significant OR was found among postmenopausal women with *MTHFR* 677TT genotype and lower intake of dietary folate compared with those with 677CC genotype and adequate folate consumption (OR=2.80, 95%CI:

1.11-7.07). In addition, interaction between the *MTRR* A66G polymorphism and folate intake for risk of postmenopausal breast cancer was observed (interaction $P=0.008$).

Our findings indicate that the *MTHFR* C677T polymorphism is associated with individual susceptibility to breast cancer among postmenopausal women.

Risk factors for first acute myocardial infarction attack assessed by cardiovascular disease registry data in Aichi Prefecture

Kondo Y¹, Toyoshima H², Yatsuya H², Hirose K, Morikawa Y, Ikedo N¹, Masui T¹, Tamakoshi K²
¹Health Promotion Division, Department of Health and Welfare, Aichi Prefectural Government, ²Department of Public Health/Health Information Dynamics, Nagoya University Graduate School of Medicine
 Nagoya Journal of Medical Science, 69, 139-147, 2007

Recently, in Western countries, metabolic syndrome as well as such classical risk factors as hypertension and smoking has been considered to be closely associated with the occurrence of acute myocardial infarction (AMI). Therefore, we conducted a case-control study to investigate how the co-morbidity of obesity or thinness with hypertension, hyperlipidemia and diabetes mellitus would affect AMI occurrence among Japanese aged 30 to 69. Cases were comprised of 788 patients (590 men and 198 women) registered in the "Aichi Prefecture Cardiovascular Disease Registry Program" during hospitalization due to their first AMI attack. Controls were 2,300 randomly sampled inhabitants (1,142 men and 1,158 women) who responded to the questionnaire survey on lifestyle. We decided BMI<18.5 as thin, 18.5 BMI<25.0 as normal, and BMI 25.0 as obese, then divided subjects

into six groups according to the presence or absence of histories of the above-mentioned three disease in connection with their physique. In both sexes, multivariately adjusted odds ratios of first AMI attacks were much higher in groups with such histories (men, 4.14-5.07; women, 5.62-15.24) than in those without them (men, 0.90-1.13; women, 1.54-3.03) regardless of physique. Only in women, obesity uncombined with histories was significantly associated with AMI occurrence and not obesity but thinness intensified the association between histories and AMI. Among the six groups, population attributable risk percent was highest in the normal physique group with histories. It was suggested that persons with disease histories should be carefully treated irrespective of the presence or absence of obesity.

Breast cancer risk and erythrocyte compositions of n-3 highly unsaturated fatty acids in Japanese

Kuriki K¹, Hirose K, Wakai K², Matsuo K¹, Ito H¹, Suzuki T¹, Hiraki A¹, Saito T¹, Iwata H³, Tatematsu M⁴, Tajima K¹

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, ³Department of Breast Oncology, Aichi Cancer Center Hospital, ⁴Division of Oncological Pathology, Aichi Cancer Center Research Institute
International Journal of Cancer, 121, 377-385, 2007

Dietary intake of fish rich in n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFAs), such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), has been proposed to decrease cancer risk. In contrast to results from laboratory studies, however, protective effects for breast cancer have proved equivocal in epidemiologic studies. In the present case-control study, we examined associations between breast cancer risk and fatty acid compositions in erythrocyte membranes as biomarkers for those intakes. Dietary information and blood samples were collected from 103 incident breast cancer cases and 309 non-cancer controls (matched by age and season) and erythrocyte fatty acids were measured using accelerated solvent extraction and gas-liquid chromatography. Dietary intake of n-3 HUFAs demonstrated a negative association with risk (the highest to

the lowest tertile, odds ratio (OR), 0.51; 95% confidence interval(CI), 0.27-0.98; p for trend <0.05), but there was no association with those of saturated fatty acids (SFAs) and meat. Moreover, risk was inversely associated with erythrocyte compositions of EPA (OR, 0.27; 95% CI, 0.14-0.53; p for trend <0.0001), DHA(OR, 0.06, 95%CI, 0.02-0.16; p for trend < 0.0001) and n-3 HUFAs (OR, 0.11; 95%CI, 0.05-0.24; p for trend <0.0001), and positively with that of SFAs (OR, 12.29; 95%CI, 4.94-30.57; p for trend <0.0001) and the ratio of SFAs/n-3 HUFAs (OR, 14.65; 95%CI, 5.67-37.82; p for trend <0.0001). In conclusion, we showed that erythrocyte compositions of specific fatty acids derived from fish intake, as biomarkers, are associated with lower risk of breast cancer, but further studies are needed to investigate mechanisms linked to the etiology.

One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: Case-control study

Suzuki T¹, Matsuo K¹, Hasegawa Y², Hiraki A¹, Wakai K³, Hirose K, Saito T¹, Sato S⁴, Ueda R⁴,

Tajima K¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, ²Division of Head and Neck Surgery, Aichi Cancer Center Hospital, ³Preventive Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making and Epidemiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, ⁴Department of Internal Medicine and Molecular Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Science
Cancer Science, 98(9), 1439-1446, 2007

Low consumption of vegetables and fruits, which leads to insufficient folate intake, is associated with increased risk of several types of cancer, including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Functional polymorphisms in gene encoding one-carbon metabolism enzymes, such as methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR* C677T and A1298C), methionine synthase (*MTR* A2756G), methionine synthase reductase (*MTRR* A66G) and thymidylate synthase (*TS*), influence folate metabolism and thus might impact on HNSCC risk. We conducted a case-control study with 237 HNSCC cases newly and histologically diagnosed and 711 age- and sex-matched non-cancer controls to clarify

association with these five polymorphisms. Gene-environment interactions between polymorphisms and smoking and drinking habit and folate consumption were also evaluated by logistic regression analysis. Dietary folate intake was inversely associated with HNSCC risk. None of the polymorphisms showed any significant impact on HNSCC risk by genotype alone, but we found interactions between drinking habit and *MTHFR* C667T (P=0.04), *MTR* A2756G (P=0.04) and *MTRR* A66G (P=0.03) polymorphisms. The results suggest that there may be interactions between one-carbon metabolism-related polymorphisms and alcohol drinking for HNSCC risk.

Reproducibility of a short food frequency questionnaire for Japanese general population

Imaeda N¹, Goto C², Tokudome Y², Hirose K, Tajima K³, Tokudome S⁴

¹Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Human Life and Environmental Sciences, Nagoya Women's University, ²Department of Health and Nutrition, School of Health and Human Life, Nagoya-bunri University, ³Aichi Cancer Center Research Institute, ⁴Department of Health Promotion and Preventive Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
Journal of Epidemiology, 17(3), 100-107, 2007

In epidemiologic field studies, a food frequency questionnaire (FFQ) is one of the most feasible tools to assess usual dietary habits. The purpose of this study is to evaluate the reproducibility of consumption of foods and nutrients assessed with a self-administered short FFQ in a Japanese general population.

We have investigated 1-year interval reproducibility of a self-administered short FFQ, comprising 47 food items, and 8 frequency categories, among 1,918 subjects (844 males and 1,074 females) who participated in health check-up programs in Central Japan.

Intakes of energy and 24 nutrients along with 15 food groups estimated using the first questionnaire (FFQ1) were approximately equal to those using the second (FFQ2). Spearman's rank correlation coefficients (CCs) between intakes of nutrients

quantified with FFQ1 and FFQ2 in males were distributed as 0.74 – 0.66 – 0.55 (maximum – median – minimum), and intraclass CCs (ICCs) as 0.85 – 0.78 – 0.67. Among females, Spearman's rank CCs were distributed as 0.73 – 0.62 – 0.54, and ICCs as 0.84-0.77-0.69. Percentages of exact agreement, exact agreement plus agreement with adjacent categories and disagreement according to quintile categorization were 43%, 80%, and 1%, for males, and 42%, 79%, and 1% for females. Reproducibility figures were higher for the elderly than for young people in both sexes.

Our FFQ yielded substantially high reproducibility and it may be applicable for assessing consumption of foods/food groups and energy and selected nutrients for the middle-aged and elderly population in Japan.

Impact of the Alcohol-Dehydrogenase (ADH) 1C and ADH1B polymorphisms on drinking behavior in nonalcoholic Japanese

Matsuo K¹, Hiraki A¹, Hirose K, Ito H¹, Suzuki T¹, Wakai K², Tajima K¹

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

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

Human Mutation, 28(5), 506-510, 2007

A linkage disequilibrium (LD) between the alcohol-dehydrogenase 1B (ADH1B) and alcohol-dehydrogenase 1C (ADH1C) polymorphisms adds complexity to

differentiating the significance of these two genetic polymorphisms on drinking behavior and alcoholism. We have recently shown the importance of the ADH1B

polymorphisms on habitual drinking in the Japanese population; however, the issue regarding the LD between the ADH1B and ADH1C polymorphisms remains to be clarified. Here, we conducted a cross-sectional study in 2,299 nonalcoholic Japanese individuals. Drinking behavior was examined with regard to haplotypes of the ADH1B and ADH1C polymorphisms. Strength of association was assessed by sex and aldehyde-dehydrogenase 2 (ALDH2) adjusted odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CIs) for the haplotype of the ADH1B and ADH1C polymorphisms. The ORs for habitual drinking were significant

for ADH1B*2(rapid)-ADH1C*2(slow) (OR=1.03; 95%CI: 1.01-1.05), ADH1B*1(slow)-ADH1C*2(rapid) (OR=1.15; 95%CI: 1.14-1.16), and ADH1B*1(slow)-ADH1C*2(slow) (OR=1.31; 95%CI:1.29-1.32) compared with ADH1B*2(rapid)-ADH1C*(rapid). This trend was evident among males. Similarly, a significantly increased risk of heavy drinking was observed for each haplotype compared with ADH1B*2(rapid)-ADH1C*(rapid). In conclusion, this study showed a significant impact of the ADH1C polymorphism on habitual drinking, regardless of the ADH1B/ALDH2 polymorphisms.

High frequency of amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses in the 2005-2006 season and rapid detection of amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses by MAMA-PCR

Hata M, Tsuzuki M, Goto Y¹, Kumagai N², Harada M², Hashimoto M², Tanaka S, Sakae K, Kimura T, Minagawa H, Miyazaki Y

¹Kamiiida Daiichi General Hospital, ²Chubu International Airport Quarantine Branch Office
Japanese Journal of Infectious Diseases, 60(4), 202-204, 2007

Using the newly designed mismatch mutation amplification assay (MAMA) PCR, we demonstrated the high frequency of amantadine resistant influenza A (H3N2) viruses isolated during the 2005-2006 season by detecting the mutation at the amino acid position 31 of M2 protein (S31N). Further, the phylogenetic analyses of the HA1 sequences of the S31N viruses revealed that

they comprised a clonal lineage that would result in the common characteristic amino acid changes at positions 193 (Ser to Phe) and 225 (Asp to Asn) of the HA protein. We also demonstrated that the S31N/S193F/D225N viruses had already emerged in Aichi Prefecture by the end of the previous 2004-2005 season.

A fatal case of encephalopathy possibly associated with human metapneumovirus infection

Hata M, Ito M, Kiyosawa S¹, Kimpara Y¹, Tanaka S, Yamashita T, Hasegawa A, Kobayashi S, Koyama N¹, Minagawa H

¹Toyohashi Municipal Hospital

Japanese Journal of Infectious Diseases, 60(5), 328-329, 2007

The case is a 6-month-old girl who died from an acute encephalopathy. The F gene of HMPV was detected in her throat swab and urine specimens by RT-PCR. This case adds another example of possible involvement of HMPV in fatal neurological disease. Further, nucleotide substitutions were observed

among the F gene fragments detected from the urine and the throat swab. It suggests that HMPV may have mutated and generate quasispecies in vivo, although high viral diversity observed only in the urine-derived clones.

Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in Japan

Fujisaki S¹, Fujisaki S¹, Ibe S¹, Asagi T², Itoh T², Yoshida S³, Koike T³, Oie M⁴, Kondo M⁵, Sadamasu K⁵, Nagashima M⁵, Gatanaga H⁶, Matsuda M⁷, Ueda M⁸, Masakane M⁹, Hata M, Mizogami Y¹⁰, Mori H¹¹, Minami R¹², Okada K¹³, Watanabe K¹⁴, Shirasaka T¹⁰, Oka S⁵, Sugiura W⁶, Kaneda T¹

¹National Hospital Organization Nagoya Medical Center, ²Sendai Medical Center, ³Hokkaido University School of Medicine, ⁴Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, ⁵Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, ⁶International Medical Center of Japan, ⁷National Institute of Infectious Diseases, ⁸Ishikawa Prefectural Central Hospital, ⁹Ishikawa Prefectural Central Hospital, ¹⁰National Hospital Organization Osaka National Hospital, ¹¹Osaka Prefectural Institute of Public Health, ¹²Kyushu Medical Center, ¹³KITASATO-OTSUKA Biomedical Assay Laboratories Co., Ltd., ¹⁴Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences.

Japanese Journal of Infectious Diseases, 60 (2-3), 113-117, 2007

Highly active antiretroviral therapy (HAART) can suppress human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and plasma HIV-1 to below

detectable levels. However, HAART becomes ineffective when drug-resistant viruses emerge during HAART. Monitoring drug-resistance mutations in viruses is

necessary for selecting new drugs or therapies effective at inhibiting such HIV-1 variants. Most laboratories in Japan perform the tests using in-house protocols. However, the quality of these tests has never been assessed. Our study assessing the accuracy and reliability of HIV-1 genotypic drug-resistance testing in 15 laboratories in

Japan revealed that the quality was very high (97.3% accurate). The errors, though rare, were caused by human errors, poor electropherograms, and the use of inadequate primers. Here, we propose troubleshooting procedures to improve testing accuracy and reliability in Japan.

Presence of a surface-exposed loop facilitates trypsinization of particles of Sinsiro virus, a genogroup II.3 norovirus

Kumar S¹, Ochoa W¹, Kobayashi S, Reddy VS¹

¹The Scripps Research Institute

Journal of Virology, 81(3), 1119-1128, 2007

Noroviruses (NoVs) are the causative agents of nonbacterial acute gastroenteritis in humans. NoVs that belong to genogroup II (GI) are quite prevalent and prone to undergo recombination, and their three-dimensional structure is not yet known. Protein homology modeling of Sinsiro virus (SV), a member of the GI.3 NoVs, revealed the presence of a surface-exposed 20-amino-acid (aa) insertion in the P2 domain of the capsid protein (CP) relative to the Norwalk virus (NV) CP, which is a well known hot spot for mutations to counter the host immunological response. To further characterize the role of the long insertion in SV, the capsid protein gene was expressed using the recombinant baculovirus system. Trypsinization of the resultant virus-like particles yielded two predominant bands (31.7 and 26.1 kDa) in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis and Western blot analysis. N-terminal sequencing and analysis of the mass spectroscopic data indicated that these fragments correspond to residues 1 to 292 (26.1 kDa) and 307 to 544 (31.7 kDa). In addition, the above data taken together with the comparative modeling studies indicated that the trypsin cleavage sites of the Sinsiro virus CP, Arg292 and Arg307, are located at the beginning of and within the 20-aa insertion in the P2 domain, respectively. This study demonstrates that the presence of the surface-exposed loop in the GI.3 NoVs facilitates the trypsinization of the capsid protein in the assembled form. The SV particles remain intact even after trypsin digestion and retain the suggested receptor binding linear epitope of residues 325 to 334. The above results are distinct from those obtained from the trypsinization studies performed earlier on the NV (GI) and VA387

(GII) viruses, both of which lack the large surface insertion and associated basic residues. These new observations may have

implications for host receptor binding, cell entry, and norovirus infection in general.

The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways

Ishikawa F^{1,2}, Niino H³, Iino T^{3,4}, Yoshida S^{1,2}, Saito N², Onohara S², Miyamoto T³, Minagawa H, Fujii S⁵, Shultz LD⁶, Harada M², Akashi K^{3,4}

¹Research Unit for Human Disease Model, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, ²Department of Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, ³Center for Cellular and Molecular Medicine, Kyushu University Hospital, ⁴Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana-Farber Cancer Institute, ⁵Research Unit for Cellular Immunotherapy, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, ⁶The Jackson Laboratory
Blood 110(10), 3591-660, 2007

Two distinct dendritic cell (DC) subsets, conventional DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs), have been shown to develop via either the myeloid or the lymphoid pathway in murine hematopoiesis. Lineage-specific phenotypes or functions of "myeloid" and "lymphoid" DCs, however, still remain elusive. Furthermore, such analysis has been particularly difficult in humans, due to lack of an assay system appropriate for the analysis of human stem and progenitor cell differentiation. Here, using a highly efficient xenotransplantation model, we extensively analyze the origin and the molecular signature of human DCs. Purified human common myeloid progenitors (CMPs) and common lymphoid progenitors (CLPs) were intravenously transplanted into nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency

(NOD-scid)/IL2rgamma(null) newborn mice. CMPs and CLPs displayed significant expansion in the xenogeneic host, and human cDC and pDC progeny were isolatable. Strikingly, each human DC subset possessed indistinguishable expression patterns of surface phenotype and gene transcripts regardless of their CMP or CLP origin, even at the genome-wide level. Thus, cDC and pDC normally develop after cells have committed to the myeloid or the lymphoid lineage in human hematopoiesis, while their transcriptional signatures are well preserved irrespective of their lineage origin. We propose that human DCs use unique and flexible developmental programs that cannot be categorized into the conventional myeloid or lymphoid pathway.

感染症発生動向調査におけるコクサッキーウイルス検出と臨床診断 1990年～2006年の総括（愛知県）

山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子

臨床とウイルス、35(3)、160-169、2007

遺伝子塩基配列の解析を基にヒトのエンテロウイルスはA、B、C、Dの4グループに再分類された。ヒトエンテロウイルスAグループには、コクサッキーA群ウイルスの2～8型、10型、12型、14型、16型の11種類が属し、ヒトエンテロウイルスBグループにはコクサッキーA9型、およびコクサッキーB1～6型の7種類が属している。コクサッキーウイルスによって引き起こされる疾患には、ヘルパンギーナ、手足口病、無菌性髄膜炎が良く知られている。ヘルパンギーナの原因ウイルスはコクサッキーウイルスA2型～A6型、A8型、A10型であり、2000年～2006年の感染症発生動向調査ではA4型、A6型、A10型の順に検出頻度が高かった。手足口病の原因ウイルスとしてはコクサッキーウイルスA16型とエンテロウイルス71型が重要である。全国的にコクサッキーウイルスA16型は毎年分離されており、常在化が指摘さ

れている。エンテロウイルス71型は手足口病以外にも、脳症、肺炎、無菌性髄膜炎を併発する事が知られる重要なウイルスである。コクサッキーウイルスA16型と比較して多様な株が流行しており、海外からの侵入が指摘されている。無菌性髄膜炎からも多くのコクサッキーウイルスが検出されているが、主としてB1型～B6型、A9型、及びA7型が関連する。愛知県では、1990年～2006年の17年間に882件のウイルスが分離され、うち271件(30.7%)がコクサッキーウイルスであった。エコーウイルスの様に1年に全県的に多くの患者から同じ型を分離した経験はないが、小規模な地域流行を度々くりかえしている。上記以外にもコクサッキーウイルスは多様な疾患の原因となっているが、血清型をこえた遺伝子型クラスターと病原性には関連が認められる。

アイチウイルス感染症

山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子

公衆衛生、71(12)、1001-1002、2007

アイチウイルスは、1989年、山下らが、牡蠣が原因と推定された胃腸炎の集団発生において、患者の糞便から分離した。その遺伝子構造からピコルナウイルス科に属する新型ウイルスであると考えられ、コブウイルス属とされた。コブは日本語の瘤に由来し、アイチウイルスが同じピコルナウイルス科のエンテロウイ

ルスと比べて粒子の表面が瘤のようにゴツゴツしていることから名づけられた。アイチウイルスは種名であり、コブウイルス属には他にウシ由来のウシコブウイルス種が存在する。1987年から98年の12年間に愛知県内で発生した食中毒37事例中12事例(32.4%)からアイチウイルスが検出されている。12事例中11事例は

生カキが関連した事例であり、その内の 10 事例はノロウイルスとの混合感染であった。冬季の食中毒とノロウイルスとの関連が明らかとなり、生食用カキの浄化が行われるようになってからは、生カキ関連の食中毒であってもアイ

チウイルスは検出されなくなり、1997 年以降愛知県において、アイチウイルスが検出された食中毒 3 事例はいずれも加熱用のカキが関与していた。

ヒトパレコウイルス(Human Parechovirus: HPeV) 感染症 Human Parechovirus infection

伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子
モダンメディア 53(12)、329-336、2007

ヒトパレコウイルス(Human parechovirus: HPeV)は主に小児の胃腸炎や呼吸器疾患患者から分離されるウイルスである。ピコルナウイルス科パレコウイルス属に分類される。同科エンテロウイルス属に分類されていたエコーウイルス 22 型及びエコーウイルス 23 型がウイルス学的特徴から 1999 年にパレコウイルス属とし

て独立し、ヒトパレコウイルス 1 型 (HPeV-1) 及び 2 型 (HPeV-2) と改名された。現在のところ 6 種類の血清型/遺伝子型が報告されるが、わが国では HPeV-1 と HPeV-3 の感染例が多い。エンテロウイルスに比較して低年齢からの検出が目立ち、夏から冬に流行するが、血清型/遺伝子型による違いもある。

アイチウイルス

山下照夫
食中毒予防必携 第 2 版、p.237-238、日本食品衛生協会、2007

アイチウイルスは、その遺伝子構造からピコルナウイルス科に属する新型ウイルスであると考えられ、コブウイルス属とされた。コブは日本語の瘤に由来し、アイチウイルスがピコルナウイルス科のエンテロウイルス属と比べて粒子の表面が瘤のようにゴツゴツしていることから名付けられた。種名がアイチウイルスで他にウシ由来のウシコブウイルス種が存在する。粒子の直径は約 30nm で若干の表面構造が認められる。エンベロープは持たない、一本鎖の RNA ウイルスであり、酸(pH3)耐性、熱(50

30 分)耐性である。56 度、30 分で不活化する。カキ由来の食中毒患者から検出され、海外では胃腸炎の小児からも分離されていることから胃腸炎の原因ウイルスとされているが、他の胃腸炎ウイルスと比較して検出頻度が非常に低いため、病原性を疑問視する声も聞かれる。人への感染実験は試みられておらず、必要な感染量や感染部位などは不明である。7 事例の食中毒における 56 名の患者の内、抗体応答のあった 24 名の症状は、吐き気が 91.7%、腹痛が 83.3%、嘔吐が 70.8%、下痢および発熱が各々

58.3%であった。回復期血清中の IgM 陽性で初感染と考えられた 7 名は全員が腹痛・吐き気・発熱を訴え、6 名が嘔吐をしていた。予防対策

としてはカキを生で食べないこと。海外では生水や生野菜にも注意したほうがよい。

図説：発症様式からみた遅発性ウイルス感染症の特徴

皆川洋子

日本臨床 65(8), 1356-1359, 2007

遅発性ウイルス感染症 (slow virus infection) の発症様式別特徴について、プリ

オン病、進行性多巣性白質脳症(PML)、亜急性硬化性全脳炎(SSPE)をとりあげ、概説した。

愛知県内の下水処理場流入水からの腸管感染ウイルスの検出状況

小林慎一、長谷川晶子、長谷聡子、伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子

厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」(主任研究者武田直和) 平成 18 年度総括・分担研究報告書 47-53、2007

下水中の腸管感染ウイルスの消長を把握する目的で、愛知県内の下水処理場の流入下水から腸管感染ウイルスの検出を試みた。平成 18 年 6 月から同年 12 月までの毎週 1 回の計 27 回採水された流入下水について、RT-PCR 法でノロウイルス(NV)とアイチウイルス(AiV)の検出検査を実施した結果、GI 型 NV と AiV は下水検体から調査期間を通じて高頻度に検出されたが、両ウイルスともに患者からの検出頻度は低

いウイルスであった。一方、GII 型 NV は下水検体からヒトでの流行時期と一致して検出された。また、培養細胞法で、レオウイルス 2 型が調査期間を通じて最も高頻度に下水検体から分離されたが、同期の感染症発生動向調査で分離実績のないウイルスであり、下水検体からのウイルス分離状況は患者からの分離状況との相関性を認めない結果であった。

愛知県における HIV 検査結果の解析

皆川洋子、秦 眞美、田中正大

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV 検査相談機会の拡大と質的充実に関する研究」(主任研究者 今井光信) 平成 18 年度研究報告書 208-211、2007

2006 年に愛知県の公的検査機関における HIV 抗体検査件数は 8000 件に迫り、2005 年よ

り 23%増加した。さらに当所における Western Blot 法による確認検査陽性の検体数は平成 17 年度 15 件から、平成 18 年度 37 件と 2.5 倍の増加が認められた。陽性検体のサブタイプを調べた結果、昨年度はすべて B であったのに対し、平成 18 年度は B の他、CRF01_AE 1 件、

CRF12_BF 2 件、CRF03_AB 1 件が検出された。愛知県における AE の検出は、2003 年以来 3 年ぶりである。さらに CRF12_BF 及び CRF03_AB は愛知県で初めて検出された型である。以上から、愛知県においては感染者の増加とサブタイプの多様化が進んでいると考えられた。

Intimin Types Determined by Heteroduplex Mobility Assay of Intimin Gene (*eae*)-Positive *Escherichia coli* Strains

Kenitiro Ito¹, Mariko Iida¹, Mitsugu Yamazaki, Kazuo Moriya², Sanae Moroishi², Jun Yatsuyanagi³, Takayuki Kurazono⁴, Noriaki Hiruta⁵, Orn-Anong Ratchtrachenchai⁶

¹Infectious Diseases Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, ²Saga Prefectural Center of Public Health and Sanitary Pharmaceutical Research, ³Akita Prefectural Institute of Public Health, ⁴Saitama Institute of Public Health, ⁵Yokosuka Institute of Public Health, ⁶Department of Medical Sciences, National Institute of Health, Nonthaburi, Thailand

Journal of Clinical Microbiology, 45 (3), 1038-1041, 2007

We developed a quick genetic approach to screen variants of the intimin gene (*eae*) by using a heteroduplex mobility assay (HMA)

that targets the 5' conserved region of *eae*. The *eae* variants were categorized into 4 major HMA types and 10 minor subtypes.

MRSA の分子疫学解析法：POT 法による病院感染の迅速判定の提案

林 由美子¹、鈴木匡弘、多和田行男²、飯村明子¹、福井康代³

¹独立行政法人国立病院機構豊橋医療センター 臨床検査科、²独立行政法人国立病院機構金沢医療センター 研究検査科、³医療法人明陽会成田記念病院 検査科
医学検査、56(8)、1115-1119、2007

More than 70% isolates of *Staphylococcus aureus* isolated from inpatients are methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) in Japan. Moreover many patients have already been infected with MRSA at the first medical examination. Therefore, molecular

epidemiological analysis is essential to demonstrate nosocomial infections.

In this study, 21 MRSA isolates collected from two suspected outbreak cases were analyzed by phage-Open Reading Frame (ORF) typing (POT), which is PCR-based

rapid genotyping method for MRSA based on detection of multiple phage-derived ORFs. Six isolates exhibited the same POT type and were demonstrated as an outbreak. The same results were obtained from pulsed field

gel electrophoresis analysis (PFGE).

POT can be used to obtain same discriminatory power as PFGE with four hours. Therefore, POT is useful for infection control.

Characterization of the NAD-glycohydrolase in streptococcal strains

Ichiro Tatsuno¹, Jun Sawai², Akira Okamoto², Masakado Matsumoto, Masaaki Minami¹, Masanori Isaka¹, Michio Ohta² and Tadao Hasegawa¹

¹Department of Bacteriology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, ² Department of Molecular Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine
Microbiology 153 (12), 4253-4260, 2007

The NADase (Nga) of group A streptococci (GAS) has been implicated in the pathogenesis of diseases such as streptococcal toxic shock-like syndrome (STSS) and necrotizing fasciitis. In this study we found that the proportion of NADase-positive strains among clinical isolates in Japan has increased over time. The GAS strains studied could be divided into three groups: strains lacking NADase activity, strains with low NADase activity, and strains with high NADase activity. The older strains, isolated before 1989, belonged

to the 'no activity' group. Analysis using GST-Nga recombinants revealed that nga alleles of representative older strains encode inactive Nga. Mutational analysis of the GST-Nga recombinants suggested that residue 330 could be associated with reduced activity, based upon deduced amino acid sequences. We also investigated NADase activity of streptococcal strains other than GAS. All group G streptococcal isolates from STSS patients possessed nga genes encoding active enzymes.

東海・北陸地方9地方衛生研究所のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)の行政への還元とPCRを用いた腸管出血性大腸菌0157の型別法(IS printing system)の検討

松本昌門、鈴木匡弘、寺嶋 淳¹、児玉洋江²、白木 豊³、田中保知⁴、木全恵子⁵、奥村貴代子⁶、石畝 史⁷、岩出義人⁸、藪谷充孝⁹

¹国立感染症研究所、²石川県保健環境センター、³岐阜県保健環境研究所、⁴岐阜市衛生試験所、⁵富山県衛生研究所、⁶豊田市衛生検査所、⁷福井県衛生研究所、⁸三重県科学技術振興センター保健環

境研究部、⁹名古屋市衛生研究所

厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「広域における食品由来感染症を迅速に検知するために必要な情報に関する研究」(主任研究者寺嶋淳)

平成 18 年度総括・分担研究報告書、80 - 98、2007

平成 18 年度東海・北陸ブロック研究班活動として、ブロック内 9 地研が 0157 をはじめ各種病原菌による集団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁(市役所)に報告した事例(行政への還元)について調査を行った。ブロック内 9 地研中 5 地研(富山県、岐阜市、岐阜県、福井県、愛知県)が今年度集団発生の際に PFGE を実施し、その結果を行政に還元していた。その件数は 4 地研(岐阜市、岐阜県、福井県、愛知県)が 1 から 3 事例であった。富山県は腸管出血性大腸菌に関しては集団、散発事例全ての菌株、2 類感染症菌については集団事例全ての菌株について PFGE を実施し、その結果を行政へ還元していた。また PFGE を行った病原菌は腸管出血性大腸菌 0157、サルモネラ、赤痢菌及びカンピロバクターであった。残りの 4 地研では今年度は行政に還元した事例がなかったため各地研で検出された 0157、サルモネラ、赤痢菌について PFGE を実施した。これら 9 地研の PFGE 画像は全て疫学的資料として用いるに足る良質な画像であった。これは

過去 6 年間のパルスネット研究班活動の成果であると思われる。今後、東海・北陸ブロック各地研で疫学調査等に PFGE の利用が増大すると予想されるため、PFGE 精度管理等を実施し、東海・北陸 9 地研の PFGE 画像の質を高く保つことが重要であると思われた。今回の調査では 0157 の他にサルモネラ、赤痢菌及びカンピロバクターも PFGE の対象となったことからこれら食中毒菌も今後、精度管理の対象とすべきであろう。

東海・北陸 6 地研で行なった IS printing system の PFGE との解析力、簡便性及び迅速性の比較検討から、本法は PFGE が同じか非常に類似した集団事例由来株を同一若しくは IS パターンのひとつ異なるパターンに分類することから PFGE と解析力に関しては同程度と考えられる。また、簡便性、迅速性に関してはより優れていると思われた。今回の検討で若干の修正点が出されたが、これらを改良することで PFGE と同じように集団発生時の疫学解析の有力な手段となることが期待される。

腸管出血性大腸菌血清型の食品からの検出法に関する研究

工藤由起子¹、平松礼司、大塚佳代子²、矢野一好³、小西典子³、田中廣行⁴、土屋 禎⁴、小沼博隆⁵

¹国立医薬品食品衛生研究所、²埼玉県衛生研究所、³東京都健康安全研究センター、⁴日本食品分析センター、⁵東海大学海洋学

平成 17 年度厚生労働省食品等試験検査費「食品からの腸管出血性大腸菌 O26 および O111 の検出方法の開発事業」主任研究者：高鳥浩介

コラボレイティブ・スタディの結果報告書(平成 18 年 4 月) 2007

食品からの腸管出血性大腸菌の検出方法を開発・検証し、公定法に資する有用な方法を確定するために、血清型 0157 及び 026 について 20 試験検査機関以上によるコラボレイティブ・スタディ評価を行った。特に、近年食品からの病原微生物の検出に応用が進んでいる、特異性、検出感度、迅速性等に優れた遺伝子検出法についても、腸管出血性大腸菌の効率的分離に導くために取り入れた。その結果、血清型 0157 については接種濃度約 12cfu/25g の牛挽肉、接種濃度約 12cfu/25g 及び約 47cfu/25g のアルファルファにおいて、従来からの直接塗抹法及び免疫磁気ビーズを用いた分離方法によってほぼ完全に検出できる事が認められた。また、遺伝子検出法の一つである LAMP 法におい

ても完全に検出できる結果が得られた。血清型 026 については、接種濃度約 11cfu/25g の牛挽肉において直接法では約半分、免疫磁気ビーズ法では約 8 割の検体で検出できた。接種濃度約 11cfu/25g のアルファルファにおいて、直接法では約 7 - 8 割、免疫磁気ビーズ法では 9 割以上で検出できた。接種濃度約 43cfu/25g のアルファルファにおいて、直接法では約 8 - 9 割、免疫磁気ビーズ法では全検体で検出できた。また、いずれの検体種においても LAMP 法ではほぼ完全に検出できる結果が得られた。以上から、遺伝子検出法を利用して血清型 0157 及び 026 の公定法に資する迅速で確実な方法を確立した。

鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

山本茂貴¹、山崎 学¹、五十君静信¹、宮原美知子¹、田口真澄²、久米田裕子²、松根 涉²、山崎 涉²、勢戸和子²、塚本定三²、斉藤志保子³、小野一晃⁴、甲斐明美⁵、横山敬子⁵、藤田雅弘⁶、平松礼司、石村勝之⁷、吉野谷進⁷、下村 佳⁷、吉田喜美⁷、国井悦子⁷、萱島隆之⁷、笠間良雄⁷、松本 勝⁷、荻野武雄⁷、富田正章⁸、八尋俊輔⁹、中馬猛久¹⁰

¹国立医薬品食品衛生研究所、²大阪府立公衆衛生研究所、³秋田県衛生科学研究所、⁴埼玉県衛生研究所、⁵東京都健康安全研究センター、⁶群馬県衛生環境研究所、⁷広島市衛生研究所、⁸山口県環境保健研究センター、⁹熊本県保健環境科学研究所、¹⁰鹿児島大学

平成 16-18 年度厚生労働科学研究事業「細菌性食中毒の予防に関する研究」主任研究者：山本茂貴
平成 16-18 年度 総括研究報告書、47-57、2007

平成 16 年度から 18 年度の 3 年間で以下の検討を行った。リスクアセスメントに関しては 1 . 16 年度に鶏肉によるカンピロバクター食中毒の全体像を把握する目的でリスクプロファイルを作成した。2 . 18 年度にカナダの定量的リスクアセスメントモデルを参考に、国内データを用いて、暴露リスクに影響する管理措置について定量的リスクアセスメントにより検討した。その結果、冷却水の塩素濃度を適正に維

持することが最も暴露リスクを低減化した。3 . 17, 18 年度に農場でのカンピロバクター保菌状況について検討した。カンピロバクターは鶏が主な保菌動物であり、農場段階で高率に保菌していた。4 . 16, 17 年度に鶏肉からのカンピロバクター分離法の標準化を検討し、増菌培地として Preston 培地と Bolton 培地は同等の効力を持つこと、分離培地は CCDA 培地より Butzler 培地が検出率が良かったことが明かとなった。

気密性袋を使用した好気培養法は、定性的には大量培養および MPN 法とも微好気培養法と同等の検出率がみられることから、本菌の培養検出に使用できると考えられた。5 . 16, 17 年度にコッコイド化した菌については、好気ストレスによってコッコイド化した本菌について、その菌体成分を解析した結果、ストレスによるこ

れら構成成分の著しい減少・崩壊は認められなかった。この結果はコッコイド化した菌ではストレスによる構成成分の障害・変性は最小限に抑えられていると考えられた。このことから、この形態の菌体が再び増殖能を回復する可能性を持つことが示唆された。

メトプレン試験法（解説）

上野英二

食品衛生研究、57(7)、59-62、2007

当所において開発され、平成 18 年 12 月 27 日に厚生労働省から通知されたメトプレン試験法（農産物）について解説した。試料からの抽出法としてアセトニトリル抽出/水層分離法を採用したこと、脱脂操作としてアセトニトリル層を少量のヘキサンで洗浄する操作を追加

したこと、定性/定量機器として HPLC-UV を採用したこと、および GC/MS での確認試験の際に食品によっては妨害ピークが出現するが、この場合、中性アルミナカートリッジカラムを用いて精製すると除去できることなどについて解説した。

ゲル浸透クロマトグラフィーの食品中残留農薬分析への利用について（講座）

上野英二、斎藤 勲¹

¹東海コープ事業連合 商品安全検査センター
食品衛生学雑誌、48、J273-J277、2007

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度が、平成 18 年 5 月 29 日からスタートし、GC/MS および LC/MS による多成分一斉分析法が普及してきている。しかし、従来の選択検出器付き GC や LC による個別/グループ分析法に比べて、定量性が劣る場合も少なくない。そこで、誤認や誤定量が絶対に許されない残留分析の現場において、農薬成分を確実に定性し精度良く定量するためには、従来の特

異的な検出器に加えて、適切な試料調製が重要であることを指摘した上で、分析上問題となる油脂など大部分の高分子（高沸点）成分を効率良く除去でき、操作性や再現性などに優れたゲル浸透クロマトグラフィー（gel permeation chromatography、GPC）を基本とする精製法を紹介しながら、試料調製上のノウハウなどについて解説した。

11th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, Risk Assessment and Regulation (特集)

内田又左衛門¹、上野英二、吉田奈央子²

¹農薬工業会、²名古屋大学

日本農薬学会誌、32、S133- S135、2007

平成 18 年 8 月 6～11 日に神戸市で開催された第 11 回農薬化学国際会議のリスクアセスメントおよびレギュレーション部門における研究発表をレビューした。同部門では、平成 15 年 3 月の農薬取締法改正による無登録農薬の使用などへの規制強化、平成 18 年 5 月の食品衛

生法改正による残留農薬規制のポジティブリスト制度への移行もあって、当初の予想を超える 26 題の研究発表が行われた。特に、使用登録されている農薬が少ないいわゆるマイナー作物を対象にして公的研究機関などが実施した作物残留試験に関するものが多かった。

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 18 年度分担研究報告書、19-122、2007

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。ペースト状のかぼちゃ、にんじん及びほうれんそうに、一律基準値(0.01 ppm)付近の低濃度を含めた 12 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が、総合成績では前年度と比較して良好な結果が得られた。

畜水産食品中の残留農薬の実態

加藤保博¹、根本 了²、上野英二

¹(財)残留農薬研究所、²国立医薬品食品衛生研究所

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)「食品中に残留する農薬等におけるリスク管理手法の精密化に関する研究」加藤保博 主任研究者、根本 了 分担研究者
平成 18 年度分担研究報告書、9-21、2007

平成 18 年度に、東京(国立医薬品食品衛生研究所)及び愛知(愛知県衛生研究所)の 2 地域で、牛、豚、鶏の筋肉、脂肪、肝臓、鶏卵、牛乳、蜂蜜及び魚介類等の市販の畜水産食品中の残留農薬の実態調査を行った。東京では 275 農薬/51 検体、愛知では 208 農薬/60 検体につ

いて調査したところ、DDT 類、BHC 類、クロルデン類、ディルドリン、ヘキサクロロベンゼン、エンドスルファン、イソプロチオラン、シハロトリン、オキサジアゾンなどが検出された。DDT 類が最も高頻度に検出され、111 検体中 27 検体から痕跡量~44 ng/g 検出された。

Heme-iron Analysis in Foods by Liquid Chromatographic Determination of Heme after Extraction with Methyl Isobutyl Ketone - Hydrochloric Acid

Harumi Oshima, Yuka Kabashima, Eiji Ueno, Tsutomu Ohno
PORPHYRINS, 16, 13-18, 2007

A liquid chromatographic (LC) determination of heme was investigated for quantitative analysis of heme-iron in foods. Heme was extracted from hemoproteins in a sample with methyl isobutyl ketone (MIBK) under acidic condition. The MIBK extract was diluted with the mobile phase of LC and injected onto a reversed phase C18 column using an isocratic LC. The mobile phase consisted of methanol and acetate buffer (80:20). Absorbance was monitored at 398

nm using a UV-vis detector. The linearity range was 0.01-1.0 µg Fe/mL. The detection limit of heme was 0.003 µg Fe/mL. The recoveries of heme from the spiked samples were more than 90.7 %. The concentration of heme (as iron) in edible tissues of livestock, seafood and iron-enriched foods ranged from 0.1 to 2390 µg Fe/g. The method is considered to be useful for the routine analysis of heme-iron in foods because of its simplicity.

誘導結合プラズマ質量分析法による既存添加物・不溶性鉱物性物質中の元素分析

大島晴美、椋島由佳、上野英二、大野 勉、岡 尚男¹、伊藤誉志男²、中澤裕之³¹金城学院大学、²日本食品分析センター、³星薬科大学

食品化学学会誌、14、130-135、2007

既存添加物の安全性評価のための基礎的研究として、8種類の不溶性鉱物性物質（活性白土、酸性白土、グリーンタフ、花こう斑岩、タルク、ベントナイト、ケイソウ土、パーライト）の材質試験および溶出試験を行った。ICP-MSによる一斉分析法により28元素（Na, Mg, Al, P, K, Ca, Ti, Fe, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Sr, Mo, Ag, Cd, Sb, Ba, W, Tl, Pb, U）の含有量を測定した。材質試験では、試料を硝酸およびフッ化水素酸で加熱分解して試験溶液を調製し、耐フッ化水素酸の導入系を用いて測定した。本法による土壤標準試料

（SRM 2709 San Joaquin Soil）の分析では、28元素の保証値または参考値に対する回収率が70～107%と良好であった。溶出試験では、塩酸溶液で70～15分の条件で溶出し、塩酸を蒸発させた後、硝酸溶液に置き換えて試験溶液を調製した。多くの元素が検出されたが、有害元素のAsおよびPbは、すべての試料においてタルクの純度試験規格値以下であった。また、その他の元素の溶出濃度も低いレベルであり、人の健康に影響を与える恐れはほとんど無いと考えられる。

Application of dual counter-current chromatography for rapid sample preparation of N-methylcarbamate pesticides in vegetable oil and citrus fruit

Yuko Ito, Tomomi Goto, Sadaji Yamada, Hiroshi Matsumoto, Hisao Oka¹, Nobuyuki Takahashi², Hiroyuki Nakazawa², Hisamitsu Nagase³, Yoichiro Ito⁴¹Kinjo Gakuin University, ²Hoshi University, ³Gifu Pharmaceutical University, ⁴Center for Biochemistry and Biophysics, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health

Journal of Chromatography A, 1108, 20-25, 2006

Dual counter-current chromatography (dual CCC) has been successfully applied to rapid sample preparation for the simultaneous determination of residual carbaryl, fenobucarb and methomyl in vegetable oil and citrus fruit. The citrus fruit samples were extracted with n-hexane solution containing stable isotopically

labeled internal standards (methomyl-d3, fenobucarb-d3 and carbaryl-d9), and applied to dual CCC using a two-phase solvent system of n-hexane-acetonitrile to purify the carbamate pesticides from aliphatic sample matrix. The coiled column was rotated at 420 rpm, the lower mobile phase was introduced through the head toward the tail,

and the upper mobile phase in the opposite direction. Due to the high partition efficiency of dual CCC, the lower phase fraction collected from 2 to 5 min after injection could be subjected to flow-injection

tandem mass spectrometry directly after concentration. Repetitive sample injection can be performed at high reproducibility without a risk of contamination from the compounds retained in the column.

残留基準設定データの精密化：調理加工に関する試験

加藤保博¹、永山敏廣²、山田貞二

¹(財)残留農薬研究所、²東京都健康安全研究センター

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)「食品中に残留する農薬等におけるリスク管理手法の精密化に関する研究」加藤保博 主任研究者、永山敏廣 分担研究者
平成18年度総括・分担研究報告書、443-493、2007

農産物の加工による影響を考慮した残留農薬の曝露評価を可能にするために、ならびに残留基準が設定されていない加工農産食品の検査に役立てるため、既存の加工影響データのほか米国、EU など諸外国における加工影響評価試

験とその結果の利用法に関する指針等を収集した。また、学会誌等に報告された調理加工時の挙動に関する研究を収集し、その概要をまとめた。

編集情報運営委員会

委員長：竹内一仁

委員：續木雅子（企画情報部）

鈴木匡弘（微生物部・細菌）

山下照夫（微生物部・ウイルス）

林留美子（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 58 号

平成 20 (2008) 年 3 月 発行

愛知県衛生研究所

所長 増井 恒夫

〒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	

（この刊行物は再生紙を使用しています）