

第3章 調査研究・報告

第1節 原 著

LC-MS/MSによるスイセンのリコリン・ガラントミン定量法 および調理等による影響調査

仲井菜都希・中田千恵子・西山隆之・安藤尚子・南浦茉奈・米田正樹・立本行江

Quantitative Method of Lycorine and Galanthamine and Investigation of the Effects of Cooking

Natsuki NAKAI・Chieko NAKATA・Takayuki NISHIYAMA・Naoko ANDO
Mana MINAMIURA・Masaki YONEDA and Yukie TATSUMOTO

LC-MS/MSによるスイセン類のリコリン，ガラントミン定量法を構築した．前処理法として超音波抽出法を採用し，迅速かつ簡便な方法とした．植物試料，調理品試料での添加回収試験を行い，平均回収率は79.6～101.5%，RSDは3.16～8.84%であった．さらに，調理及び消化により植物中のリコリン含有量が減少したことで，汁や胃液にリコリンが溶出する可能性があることが示唆された．スイセン類による健康危機事象への体制強化に寄与した．

緒言

スイセンはヒガンバナ科に属し観賞用として広く栽培されている園芸用植物だが，葉はニラやノビル，鱗茎はタマネギと似ており，家庭でスイセンとニラを同時に栽培し，間違えて喫食する食中毒が多数発生している．スイセンの有毒成分はリコリン，ガラントミンなどがあり，摂取すると悪心，嘔吐，下痢等の症状を引き起こす．本県では過去にスイセン類による食中毒事件は発生していないが，前述のように身近にある植物であることや，近年全国的にスイセン類による食中毒が増加傾向にあることから，早急な検査体制の確立が必要である．

そこで，LC-MS/MSによるスイセンのリコリン，ガラントミン定量法を開発するとともに，実際の食中毒事件を想定した調理等によるリコリン，ガラントミンの含有量変化を調査したので報告する．

方法

1. 試料

スイセンは，当センターおよび職員の自宅で栽培したニホンスイセンを使用した．ニラおよびタマネギ，その他の調味料は市販のものを用いた．

2. 試薬等

1) 標準品

リコリン標準品はSigma-Aldrich社製リコリン塩酸塩，ガラントミン標準品は東京化成工業(株)製ガラントミン臭化水素酸塩を使用した．各標準品をメタノールで1,000 µg/mLとして標準原液とした．

ールで1,000 µg/mLとして標準原液とした．

2) その他の試薬

メタノールは富士フィルム和光純薬(株)及び関東化学(株)製LC-MS用，超純水は富士フィルム和光純薬(株)製のLC/MS用，1 mol/L酢酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬(株)製のHPLC用を使用した．

ペプシンは富士フィルム和光純薬(株)製のブタ胃粘膜由来の1:10,000を使用し，0.1%ペプシン含有溶出試験第1液¹⁾を人工胃液として調製した．

3) 固相カートリッジカラム

精製の固相カートリッジカラムはWaters社製Oasis HLB (60 mg, 3 mL)，Sigma-Aldrich社製Supelclean ENVI-Carb (250 mg, 3 mL)，ジーエルサイエンス社製InertSep PLS-2 (270 mg, 6 mL)を使用した．固相カートリッジカラムはすべて使用前にメタノールおよび10%メタノール各10 mLでコンデューティングした．

3. 器具および装置

50 mLポリプロピレン製遠沈管はLabcon社およびWaters社，AGCテクノグラス(株)製を，高速ホモジナイザーはKINEMATICA社製Polytron PT-2100を，振とう機は(株)イワキ製KM Shaker V-DXを，超音波洗浄機はシャープ(株)製UT-206を，遠心分離機は日立工機(株)製himac CR 22Gおよびエペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ(株)製himac

表 1 LC-MS/MS 条件

	装置1	装置2
装置	Agilent 1200シリーズLC, 6430トリプル四重極LC/MSシステム	Waters ACQUITY UPLC H-CLASS, Xevo TQ-S micro
カラム	Inertsil ODS-3 (2.1×100 mm, 粒径 3 μm)	ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1×100 mm, 粒径 1.7 μm)
カラム温度	40℃	50℃
注入量	5 μL	2 μL
流速	0.3 mL/min	0.4 mL/min
移動相	(A) 5 mM酢酸アンモニウム溶液 (B) 5 mM酢酸アンモニウムメタノール溶液	(A) 5 mM酢酸アンモニウム溶液 (B) 5 mM酢酸アンモニウムメタノール溶液
グラジエント(B%)	5→5(1 min)→95(15 min)	5→5(1 min)→95(5 min)
イオン化法	ESI(+)	ESI(+)
Capillary 電圧	2,500 V	3,000 V
Source温度	300℃	150℃
プリカーサーイオン	Lycorine : m/z 288.08	Galanthamine : m/z 288.12
プロダクトイオン	定量 Lycorine : m/z 147.09 確認 Lycorine : m/z 119.03	Galanthamine : m/z 213.12 Galanthamine : m/z 198.09

CR21N を使用した。

LC-MS/MS は当センターで保有する 2 種類の機器を使用した。装置 1 として Agilent 社製液体クロマトグラフ Agilent 1200 シリーズ LC, 6430 トリプル四重極 LC/MS システム, 装置 2 として Waters 社製液体クロマトグラフ ACQUITY UPLC H-Class システム, 質量分析計 Xevo TQ-S micro を使用した。

4. 試験溶液の調製

1) 植物試料

試料 1 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に採り, メタノール 20 mL を加えて 15 分間超音波照射後, 3,000 rpm で 10 分間遠心分離しガラス繊維ろ紙 (GFP) を用いて吸引ろ過した。これを 2 回繰り返す, ろ液を合わせて 50 mL に定容して抽出液とした。抽出液をメタノールで 100 倍に希釈し, 0.20 μm メンブレンフィルターでろ過して試験溶液とした。

2) 調理品等試料

(1) 抽出

植物試料と同様に抽出し, 抽出液とした。

(2) 精製

抽出液を水で 10 倍に希釈し, 予めコンディショニングした Oasis HLB に 1 mL 負荷した。カラムを 10%メタノール溶液および 15%メタノール溶液各 5 mL で順に洗浄し, 80%メタノール溶液 5 mL で溶出した。溶出液を 0.20 μm メンブレンフィルターでろ過し, 試験溶液とした。

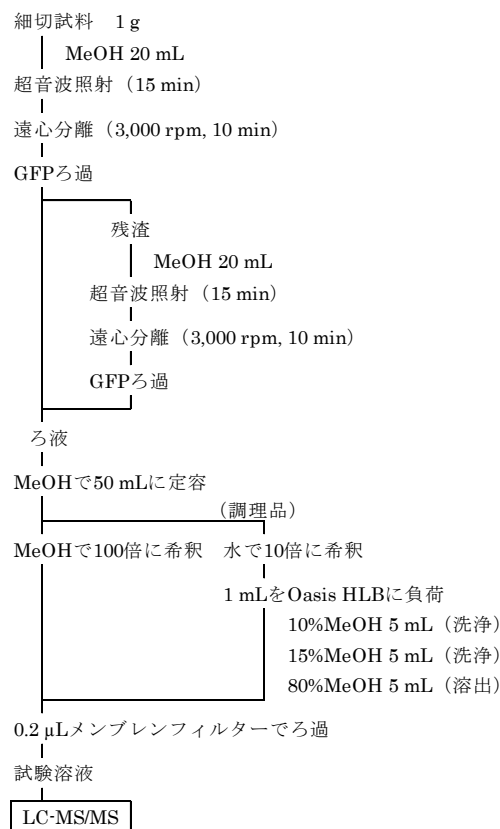


図 1 前処理フロー

5. 定量

1) 測定条件

装置 1, 装置 2 の測定条件を表 1 に示した。移動相, プリカーサーイオン, プロダクトイオンは各装置で共通とした。

2) 検量線

リコリン, ガランタミン各標準原液を混合し, メタノールで希釈して 0.5~100 ng/mL とし, 検量線を作成した.

6. 調理品等試料の調製

1) 調理品試料

植物試料を用いて油炒め, 味噌汁, 煮物, ボイルを以下のとおり調理した.

(1) 油炒め

ビーカーにスイセンの葉またはニラ 10 g を採り, 油 2 g を加えて約 200°C で 1 分間加熱した.

(2) 味噌汁

水 100 mL に対し顆粒だし 0.5 g を加えて加熱溶解し, だし汁とした. ビーカーにスイセンの葉またはニラ 10 g を採り, だし汁 100 mL, 味噌 5 g を加え, 時計皿で蓋をして約 100°C で 3 分間加熱した.

(3) 煮物

ビーカーにスイセンの葉またはニラ 10 g を採り, だし汁 10 mL, 醤油 1 g を加え, 時計皿で蓋をして約 100°C で 10 分間加熱した.

(4) ボイル

ビーカーにスイセンの葉 10 g を採り, 熱湯 100 mL を加えて約 100°C で加熱した. 1 分, 3 分, 5 分, 10 分, 30 分後に試料を採取した.

2) 消化試料

スイセンの葉を試料とし, 未調理の試料および上記 3 種の調理品に人工胃液 100 mL を加え, 37°C で攪拌しながらインキュベートし, 30 分, 2 時間, 4 時間後に試料を採取した.

7. 添加回収試験

1) 植物試料の添加回収試験

スイセンの葉の対照品としてニラを, 鱗茎の対照品としてタマネギを使用し, 試料中の濃度が 100 µg/g となるようにリコリン, ガランタミン各標準原液を添加した.

2) 調理品試料の添加回収試験

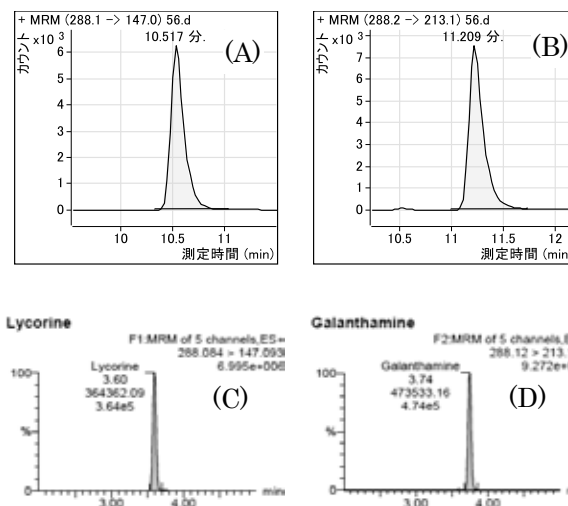
スイセンの葉の対照品としてニラを使用し, 試料中の濃度が 100 µg/g となるようにリコリン, ガランタミン各標準原液を添加した.

結果および考察

1. 分析条件の検討

当センターでは 2 台の LC-MS/MS を保有しており, うち 1 台 (装置 2) は残留農薬検査に使用して

いる. このため, 装置 2 ではカラム, カラム温度等の LC 条件を残留農薬検査と同条件に設定した. 各装置で MS パラメーターの最適化を行い, 分析条件を決定した (表 1). リコリン, ガランタミンの MRM クロマトグラムを図 2 に示す.



(A) 装置 1 (Lycorine) (B) 装置 1 (Galanthamine)
(C) 装置 2 (Lycorine) (D) 装置 2 (Galanthamine)

図 2 MRM クロマトグラム

リコリン, ガランタミン混合標準溶液を用いて 0.5 ~ 100 ng/mL の範囲で検量線を作製したところ, 各装置, 各成分で $R^2=0.999$ 以上の高い直線性を得た.

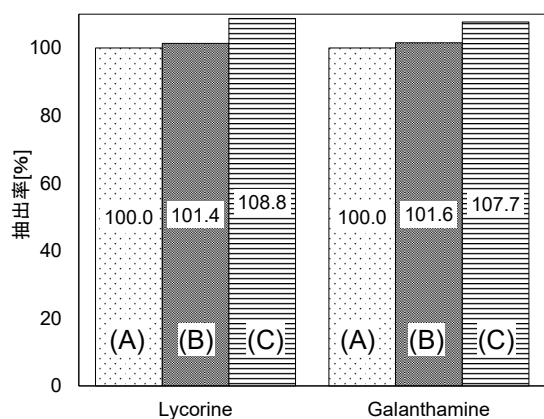
2 台の装置で分析方法を確立することにより, 健康危機管理事象発生時にも柔軟に対応可能となった. また, 残留農薬検査と同条件で検査できるようになり, 緊急時にも他の検査を妨げることなく迅速に対応できると考えられる.

2. 前処理条件の検討

1) 抽出方法の検討

公定法²⁾では試料をメタノールでホモジナイズして抽出するとされているが, この方法では 1 検体ずつしか処理できず, また, 検体ごとに刃の洗浄を行うなどの手間がかかり非効率である. このため, 他の簡便な抽出方法として振とうおよび超音波照射による抽出を検討した. 超音波照射の時間は久野ら³⁾の方法を参考に 15 分間とした.

スイセンの鱗茎を各方法で前処理し, リコリン, ガランタミン含有量を測定した. ホモジナイズ抽出を 100% としたときの抽出率を図 3 に示す. 振とう抽出ではリコリン 101.4%, ガランタミン 101.6%, 超音波抽出ではリコリン 108.8%, ガランタミン 107.7% となり, 超音波抽出法の抽出率が他より高い



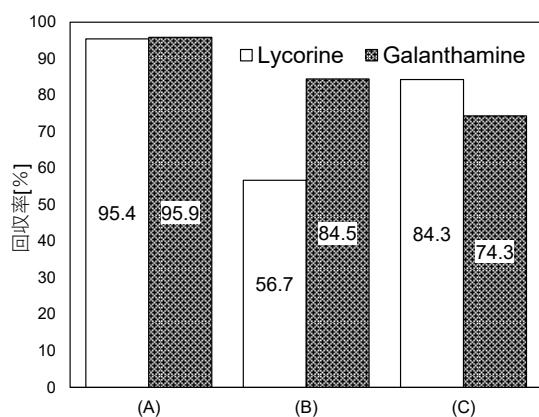
(A) ホモジナイズ (B) 振とう (C) 超音波照射

図3 抽出方法の比較

結果となった。ホモジナイズでは刃に残る検体があるなどロスが発生している可能性があり、振とうでは抽出が不十分である可能性が示唆された。このため、簡便で抽出効率の良い超音波抽出法を採用することとした。

2) 精製方法の検討

夾雑物による機器の汚染の恐れがあるため、固相カートリッジカラムによる精製を試みた。既報⁴⁻⁶⁾等を参考に逆相系の固相カートリッジカラムである Oasis HLB, Supelclean ENVI-Carb, InertSep PLS-2 の3種類を比較検討した。リコリン、ガラタミン混合標準溶液を上記3種の固相カートリッジカラムに通過させ、10%メタノール溶液、15%メタノール溶液で洗浄した後、80%メタノール溶液で溶出し、溶出液に含まれるリコリン、ガラタミン濃度を測定した。その結果、Oasis HLBの回収率が高く、精製に使用するカラムとして最適であった(図4)。



(A) Oasis HLB (B) Supelclean ENVI-Carb (C) InertSep PLS-2

図4 固相カートリッジカラムの回収率

次に、実試料を用いて精製効果の検証を行った。スイセンの葉を未調理、油炒め、味噌汁、煮物の状態で抽出操作を行い、精製を行わず100倍に希釈した試験溶液と Oasis HLB で精製した試験溶液を UPLC-MS/MS で SCAN 測定し、夾雑物量を比較した。その結果、未調理の葉では精製の有無にクロマトグラムの違いは確認されなかったが、調理品では一部の検体で夾雑ピークの除去が確認できた(図5)。このため、植物試料では精製工程を省略し希釈のみを行うこととし、調理品では Oasis HLB を用いた精製を行うこととした。

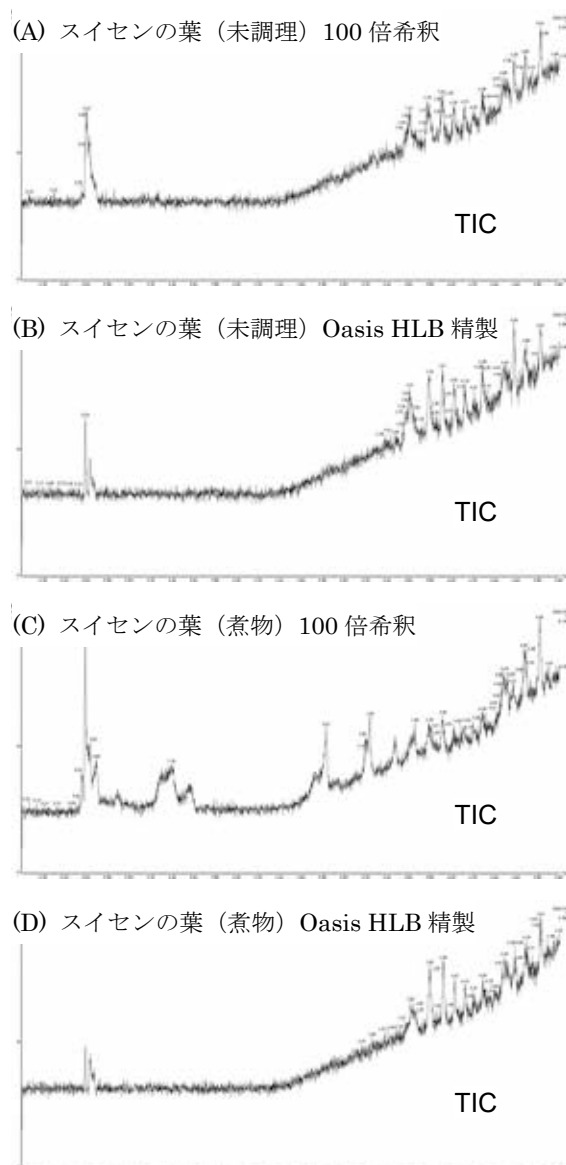


図5 精製効果の検証

3. 添加回収試験

1) 植物試料

各装置，試料，成分ごとの平均回収率と RSD を表 2 に示す。平均回収率は 83.2~101.5%，RSD は 5.49~8.46% となり，良好な結果であった。

表 2 添加回収試験結果 (植物試料)

	Lycorine		Galanthamine	
	ニラ	タマネギ	ニラ	タマネギ
装置1				
平均回収率 (%)	92.0	101.5	92.4	97.4
RSD(%)	5.59	8.46	5.54	6.25
装置2				
平均回収率 (%)	84.8	98.5	83.2	92.6
RSD(%)	5.49	7.76	6.10	8.02

※n=5

2) 調理品試料

各試料，成分ごとの平均回収率と RSD を表 3 に示す。平均回収率は 79.6~90.4%，RSD は 3.16~8.84% となり，良好な結果であった。

表 3 添加回収試験結果 (調理品試料)

	Lycorine		Galanthamine	
	油炒め			
平均回収率 (%)	90.4		89.7	
RSD(%)	6.33		7.60	
味噌汁				
平均回収率 (%)	81.4		79.6	
RSD(%)	3.16		6.11	
煮物				
平均回収率 (%)	83.2		83.0	
RSD(%)	8.84		7.02	

※n=5

4. 調理等による影響

1) 調理による影響

調理品の前処理方法の検討を行う中で，調理前後でリコリン・ガランタミン含有量が変化したことから，調理等による影響を調べた。なお，使用したスイセンはガランタミン含有量が少なかったため，リコリンのみ測定対象とした。

調理によるリコリンの減少量を調べるため，スイセンの葉を用いて油炒め，味噌汁，煮物を調理し，未調理の生の葉と調理後の葉でリコリンの含有量をそれぞれ測定した。未調理の葉のリコリン含有量を 100% としたときの調理後の葉のリコリン残存量を図 6 に示す。油炒めではほとんど減少しなかったが，味噌汁では 33.3%，煮物では 35.0% となり，調理方法によってはリコリン含有量が大きく減少すること

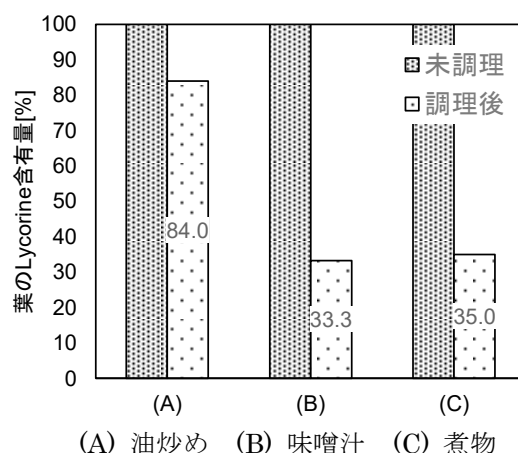


図 6 調理による Lycorine 含有量の変化

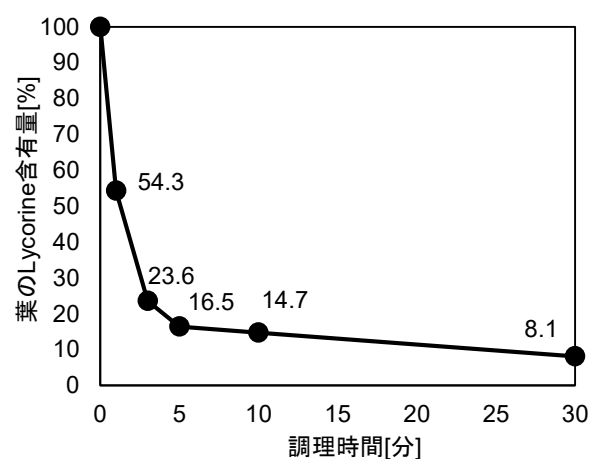


図 7 調理時間による Lycorine 含有量の変化

が分かった。

次に，調理時間とリコリンの減少量の関係を調べた。スイセンの葉をボイルし，時間ごとの葉のリコリン含有量を測定した。生の葉 (0 分) のリコリン含有量を 100% としたときの調理時間ごとの葉のリコリン残存量を図 7 に示す。ゆで始めから 1 分後に残存量は 54.3% となり，時間経過とともに減少していた。また，調理時間 30 分の葉とゆで汁のリコリン濃度はほぼ同じとなっており，葉に含まれていたリコリンが加熱調理によってゆで汁へ流出したことが示唆された。リコリンは水溶性で熱に安定であることから，分解はせずゆで汁に移行したものと考えられる。

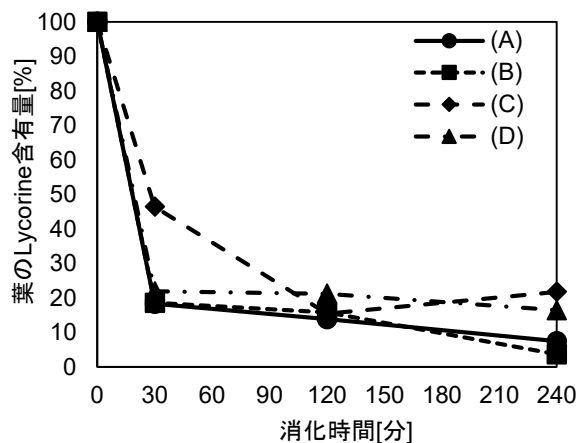
食中毒事件の際に調理品を検査する際は，調理方法や調理時間等も考慮する必要があると考えられる。

2) 消化による影響

胃液による消化の影響を調査した。人工胃液により処理した消化試料のリコリンの含有量を測定し，

0 分のリコリン含有量を 100%としたときの各時間の残存量を図 8 に示す。消化開始後 30 分でリコリンは 20~50%程度まで減少していた。

スイセン類による食中毒では食後 30 分以内の短い潜伏期間で発症するとされているが、嘔吐物が試料となる場合、発症する頃には葉の有毒成分は大きく減少していると考えられる。



(A) 未調理 (B) 油炒め (C) 味噌汁 (D) 煮物

図 8 消化による Lycorine 含有量の変化

まとめ

LC-MS/MS によるスイセン類のリコリン、ガラントミンの定量法を開発した。2 台の装置を用いて分析条件を検討し、残留農薬検査と並行して検査でき、緊急時にも柔軟な対応が可能となった。前処理方法には簡便、迅速な超音波抽出法を採用した。

また、調理や消化による影響を検討し、調理等によって植物中の有毒成分が流出する可能性が示唆された。このことから、食中毒事件発生時に原因食品の特定だけでなく調理の内容や喫食した量などにも注目して検査を進めることが重要であると考えられる。

文献

- 1) “第十七改正日本薬局方”，328 (2016)，告示第 64 号
- 2) “食品衛生検査指針理化学編”，928-931 (2015)，(公社) 日本食品衛生協会
- 3) 久野恵子，高井靖智，上田幸右，他：和歌山県環境衛生研究センター年報，59，52-58 (2013)
- 4) 笠原翔悟，笠原義正：山形県衛生研究所報，48，1-4 (2015)
- 5) 山本明美，柴田めぐみ：青森県環境保健センター年報，30，32-42 (2019)
- 6) 後藤智美，尾関史晃，青山文生，他：愛知県衛生研究所報，65，31-38 (2015)
- 7) “衛生試験法・注解 2015”，285-287 (2015)，(公社) 日本薬学会

自然毒食中毒原因究明のための遺伝子解析による高等植物の種鑑別

中田千恵子・仲井菜都希・西山隆之・安藤尚子・立本行江

Discrimination of Higher Plants Causing Food-Poisoning Incidents by Using DNA Sequence Analysis

Chieko NAKATA・Natsuki NAKAI・Takayuki NISHIYAMA・Naoko ANDO
and Yukie TATSUMOTO

高等植物による自然毒食中毒発生時に対応可能な遺伝子解析による種鑑別法を確立した。簡易な前処理で効率的に DNA を抽出し、葉緑体 DNA の *matK* 領域、*rbcL* 領域及び *trnH-psbA* 領域、核リボソーム DNA の ITS 領域の塩基配列による鑑別法を検討した。また、調理や消化による影響を確認し 4 領域を組み合わせることで鑑別可能であると示唆された。キノコ¹⁾・フグ²⁾の種鑑別と合わせることで、自然毒食中毒時の検査体制が強化された。

緒言

毎年、食用植物と誤認し有毒植物を喫食したことによる食中毒が発生している。有毒植物の食中毒で死亡する場合もあり、厚生労働省の食中毒統計調査によると、平成 22 年から令和元年の 10 年間に有毒植物による食中毒で 14 人死亡している。

植物性自然毒による食中毒が発生した際に、種類や毒成分の解明が必要となる。しかし、食中毒の際に持ち込まれる検体は、食品残品や嘔吐物など形態学的鑑別が困難な場合がある。近年 DNA バーコーディング法の遺伝子領域の塩基配列による種鑑別により原因植物を同定する方法が進んでいる。当センターにおいても、キノコ及びフグの種鑑別を確立しているところである。本検討では、全国的に食中毒事例が多い高等植物のうち奈良県でも発生の可能性がある植物を試料とし、ワンステップ法³⁾による DNA 抽出法で安定した DNA 増幅を試みた。その際、CBOL Plant Working Group⁴⁾により陸上植物の標準的バーコードと決定された葉緑体 DNA の *matK* 領域及び *rbcL* 領域をメイン領域とし、進化速度の速い葉緑体 DNA の *trnH-psbA* 領域及び核 ITS 領域を組み合わせた 4 領域で増幅した。シーケンサーにより、塩基配列を解析し国際塩基配列データベースに登録されている塩基配列と BLAST 検索によって比較した⁵⁾。

方法

1. 試料

条件検討には、スイセンの葉を想定したニラ、チョウセンアサガオの根を想定したゴボウ、イヌサフランの球根を想定したエシャロット及びヒョウタンの実を

想定した白瓜を用いた。調理による影響の検討にスイセンを追加し、人工胃液による検討はスイセン及びニラを用いた。実際の高等植物種鑑別には、ニラ、ニホンスイセン、キブサスイセン、クワズイモ、ヒョウタン、トリカブトを用いた。トリカブトは奈良県薬事研究センターより提供を受け、その他は市販品を用いた。

2. 試薬等

DNeasy® Plant Mini Kits (キアゲン社製)、TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (タカラバイオ(株)製)、Ampdirect® Plus ((株)島津製作所製)、アガロース(低電気浸透、高ゲル強度)(ナカライテスク(株)製)、GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000 × in Water (Biotium 社製)、100 bp DNA Ladder (東洋紡(株)製)、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス(株)製)、BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific 製)、BigDye® XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific 製)を用い、PCR プライマーは合成して用いた。試薬は特級を用いた。

抽出溶液は、100 mM Tris-HCl (pH9.5)、1 M KCl、10 mM EDTA を用いた。

2%アガロースは、アガロース 2 g に TEA 緩衝液 100 mL を加え加熱溶解後、GelRed 10 µL を加えて混合した。

ペプシンはブタ胃粘膜由来の 1:10000 (富士フィルム和光純薬(株)製)を用いた。

人工胃液は、0.1%ペプシン含有溶出試験第 1 液を用いた。

3. 装置

ディスポーザブルホモジナイザーはバイオマッシャー® II と専用電動攪拌機パワーマッシャー II ((株) ニッピ製), 分光光度計は SmartSpec™ Plus (BIO-RAD 製), サーマルサイクラーは LifeECO (日本ジェネテイクス (株) 製), 電気泳動装置は Mupid®-ex ((株) ミューピッド製), トランスイルミネーターは LED505-TR60W ((株) 美館イメージング製), シーケンサーは ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific 製) を用いた。

4. 遺伝子解析及び相同性検索⁶⁾

葉緑体 DNA の *matK* 領域, *rbcL* 領域及び *trnH-psbA* 領域, 核リボソーム DNA の ITS 領域を組み合わせた 4 領域で遺伝子増幅を実施した。得られた増幅産物は 2%アガロースゲルで 100 V, 25 分間電気泳動し, 目的サイズバンドを切り出した。Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit でアガロースゲルから DNA を抽出した。BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用い, DNA の断片化及び末端の蛍光標準化を行った。反応条件は 96°C で 1 分間保った後, 96°C10 秒, 50°C10 秒, 60°C4 秒を 1 サイクルとして 25 サイクルで行った。

反応後の増幅産物を BigDye XTerminator™ Purification Kit を用いて精製し, DNA シーケンサーで塩基配列を解析し DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の BLAST 検索により国際塩基配列データベースの登録配列との相同性の検索を行った。

5. 種鑑別の条件検討

検討結果の確認は, 目的サイズの DNA 増幅の有無によって行った。

1) DNA 抽出

ワンステップ法³⁾ で DNA の抽出を行った。

試料を採取し, 抽出溶液を加えてディスポーザブルホモジナイザーでホモジナイズし抽出溶液で洗い込みを行った。試料採取量 (100, 200, 300, 400, 500 及び 600 mg) 及び抽出溶液量を変更して検討した。

2) PCR 条件

(1) PCR 反応組成液

プライマー濃度 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 及び 1.0 μ M)

表 1 プライマー

Target region	Primer name	Primer sequence (5' → 3')	F/R	Reference
<i>matK</i>	matK 472F	CCRTYCATCTGGAAATCTTGGTTC	F	7)
	matK 1248R	GCTRTRATAATGAGAAAGATTTCTGC	R	7)
<i>rbcL</i>	rbcLa_F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	F	5)
	rbcLa_R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	R	5)
<i>trnH-psbA</i>	psbA3_f	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	F	5)
	trnHf_05	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	R	5)
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	F	8)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	R	8)

を検討した (表 1)。

DNA 抽出液は操作時間短縮のため濃度調整を行わず, 希釈倍率 (10, 50, 100 及び 200 倍希釈) を検討した。

(2) PCR 反応条件

熱変性は 98°C, 10 秒, 伸長反応は 72°C, 60 秒とした。さらにサイクル数は 35 とした。アニーリング温度を 46°C から 2°C 刻みに 56°C まで変更して検討した。また, 最終伸長ステップ時間を 0, 5 及び 10 分間に変更して検討した。

6. 調理及び人工胃液による DNA 増幅への影響

1) 調理による DNA 増幅への影響

調理品はボイル (5 分, 10 分), 味噌汁, 煮物, 油炒め, 電子レンジ (3 分) とし, 4 領域で DNA 抽出と増幅への影響を確認した。

2) 人工胃液による DNA 増幅への影響

調理品で安定して DNA 増幅の確認ができたニラ及びスイセンを試料とし, 未調理, 油炒め, 味噌汁, 煮物で検討した。細切りにした試料 5 g に 0.1% ペプシン含有人工胃液 (溶出試験第 1 液) 100 mL を加え, 攪拌しながら 37°C でインキュベートし, 一定時間 (15 分, 30 分, 1 時間, 2 時間及び 3 時間) 毎に試料を採取し, DNA 抽出と増幅への影響を確認した。

7. 実際の高等植物による種鑑別

確立した鑑別方法で葉緑体 DNA の *matK* 領域, *rbcL* 領域, *trnH-psbA* 領域 及び ITS 領域による高等植物の種鑑別を行った。

結果

1. 遺伝子を用いた鑑別方法の検討結果

1) DNA 抽出方法

試料 400 mg に抽出溶液を 300 μ L 添加し, バイオマッシャー® II で組織をすり潰し, 抽出溶液を 200 μ L で洗い込みを行い, 95°C で 10 分間加熱後, 14,000 rpm, 4°C, 5 分間遠心分離し, 上清 500 μ L を採取した (図 1)。

試料 400 mg
| + 100 mM Tris-HCl(pH9.5), 1 M KCl, 10 mM EDTA 300 μ L
ホモジナイズ (パワーマッシャー II)
| + 100 mM Tris-HCl(pH9.5), 1 M KCl, 10 mM EDTA 200 μ L
95°C, 10 分間インキュベート
|
遠心 (14,000 rpm, 4°C, 5 min)
|
上清を 500 μ L 採取 = DNA 抽出液

図 1 DNA 抽出方法

2) PCR 方法

(1) PCR 反応組成液

4 種類の試料で目的サイズの増幅が最も明確に確認できたことからプライマー濃度を 1.0 μM とする (図 2).

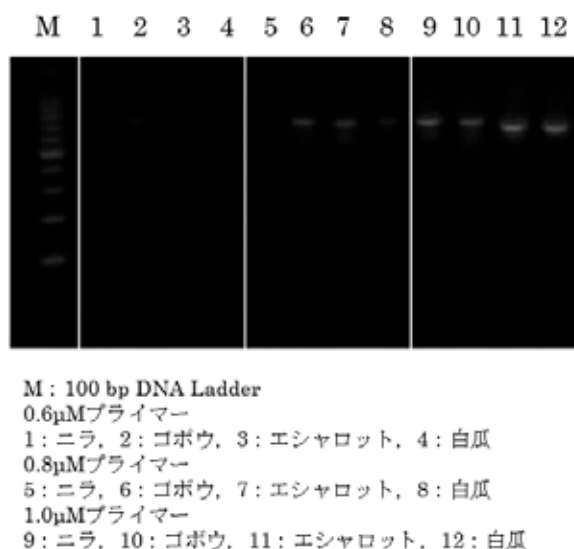


図 2 *rbcL* 領域プライマー濃度検討

DNA 試料液は DNA 抽出液の 100 倍及び 200 倍希釈でバンドが安定して出現したため、毎回 2 種類の試料液を作成することとした (表 2).

表 2 PCR 反応組成液

TaKaRa Ex Taq HS	(5 units/ μL)	0.05 μL
2 \times Ampdirect Plus	(3 mM MgCl_2 , 各 400 μM dNTPs)	5.0 μL
F-プライマー	(10 μM)	1.0 μL
R-プライマー	(10 μM)	1.0 μL
DNA 試料液	(DNA 抽出液を 100 倍及び 200 倍希釈)	1.0 μL
滅菌水		1.95 μL
全量		10 μL

(2) PCR 反応条件

アニーリング温度は 50 $^{\circ}\text{C}$ 、最終伸長ステップは 10 分間で行う。

PCR は、表 1 の葉緑体 DNA の 3 領域及び核リボソーム DNA の 1 領域の増幅用プライマーを用いて表 2 の PCR 反応組成液を表 3 の PCR 反応条件で DNA を増幅した (表 3).

表 3 PCR 反応条件

98 $^{\circ}\text{C}$	10 秒	} 35 サイクル
50 $^{\circ}\text{C}$	30 秒	
72 $^{\circ}\text{C}$	60 秒	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 分	

2. 調理及び人工胃液による DNA 増幅影響

1) 調理による DNA 増幅への影響

ボイル (5 分, 10 分), 味噌汁, 煮物, 油炒め, 電子レンジ (3 分) を行い, ニラ及びエシャロットにおいて 4 領域全てで DNA 増幅が確認でき, 調理による影響は見られなかった. 白瓜及びスイセンではいずれかの領域で目的サイズの DNA 増幅が確認できたが, ゴボウでは, 全ての領域で確認しにくかった. ゴボウの味噌汁, 煮物, 油炒めを DNeasy[®] Plant Mini Kits で精製を行うと, 全ての領域において DNA 増幅が確認できた.

2) 人工胃液による DNA への増幅影響

ニラでは, 3 時間後まで 4 領域全てで DNA 増幅が確認でき, 人工胃液による影響は見られなかった (図 3). スイセンは *rbcL* 領域及び *trnH-psbA* 領域で全て, *matK* 領域及び ITS 領域では一部の DNA 増幅が確認できた. また, 3 時間後の全試料の葉の色は変化していたが, 形状は維持していた.

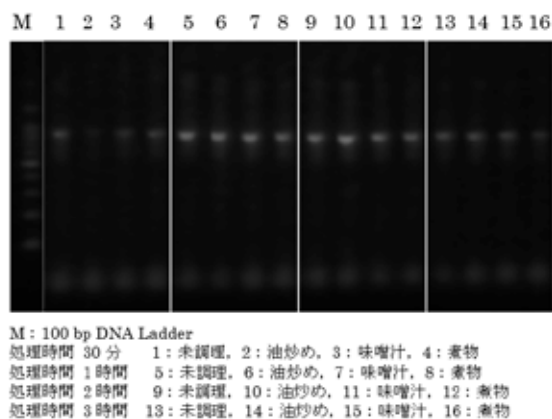


図 3 ニラの *matK* 領域 DNA 増幅

3. 高等植物の種鑑別結果

確立した鑑別方法で得られた解析結果を表 4 に示す。

ニラ, ニホンスイセン, キブサスイセン, トリカブト, クワズイモ, ヒョウタンいずれにおいても, 判定可能な領域では各試料 98% 以上と相同性が高く, 植物分類上の属の鑑別を行えた。

考 察

検査時間の短縮化を考慮し, 迅速で簡易な前処理法を検討し条件を確立し, DNA の増幅が確認できた. しかし, 夾雑物による妨害の影響で部位や植物によって DNA 増幅の安定性に差が出た. 白瓜は外皮より内皮の方が目的長のバンドが確認でき, 種鑑別に適していた. 調理したゴボウは, DNA 増幅がしにくかったが, DNeasy[®] Plant Mini Kits で精製を行うと DNA 増幅が確認できた. ゴボウ等の夾雑の妨害による影響が大

表 4 高等植物による種鑑別

番号	形態鑑別		遺伝子を用いた鑑別				
	和名 学名	Accession No.	学名	相同性			
				matK 領域	rbcL 領域	trnH-psbA 領域	ITS 領域
1	ニラ <i>Allium tuberosum</i>	MH714181	<i>Allium sp.</i>	432/434 (99%)			
		MH713985	<i>Allium sp.</i>	546/549 (99%)			
		KC704234	<i>Allium tuberosum</i>	656/658 (99%)			
		MH711432	<i>Allium ramosum</i>	711/711 (100%)			
2	ニホンスイセン <i>Narcissus tazetta var. chinensis</i>	MN432153	<i>Narcissus tazetta subsp. Chinensis</i>	753/753 (100%)	535/536 (99%)		
		KC704254	<i>Narcissus tazetta var. chinensis</i>	626/627 (99%)		増幅無し	
3	キブサスイセン <i>Narcissus tazetta cv. Odoru</i>	MN432153	<i>Narcissus tazetta subsp. chinensis</i>	751/757 (99%)	548/548 (100%)		
		KC704254	<i>Narcissus tazetta var. chinensis</i>	635/635 (100%)		増幅無し	
4	クワズイモ <i>Alocasia odora</i>	MK982638	<i>Alocasia cucullata</i>	732/744 (98%)			
		LC461939	<i>Alocasia macrorrhizos</i>	414/416 (99%)			
		AB429338	<i>Alocasia cucullata</i>	761/764 (99%)			
5	ヒョウタン <i>Lagenaria siceraria var. gourda</i>	MT773628	<i>Lagenaria siceraria var. microcarpa</i>	543/546 (99%)	264/265 (99%)		
		LC579655	<i>Lagenaria siceraria</i>	543/545 (99%)			
6	トリカブト <i>Aconitum chinense</i>	LC228507	<i>Aconitum japonicum subsp. ibukiense</i>	392/392 (100%)			
		MT571464	<i>Aconitum flavum</i>	408/409 (99%)			
		KY407560	<i>Aconitum carmichaelii</i>	342/342 (100%)			
		LC382372	<i>Aconitum kiyomiense</i>	433/437 (99%)			

きい場合は精製を行う必要が示唆された。

また人工胃液による検討では未調理及び調理品のいずれも *rbcL* 領域及び *trnH-psbA* 領域で 3 時間後まで消化による影響は見られず、鑑別可能であった。遺伝子解析による種鑑別では調理及び消化の影響が少ない *rbcL* 領域をメイン領域、*matK* 領域、*trnH-psbA* 領域、ITS 領域を補助的な領域として 4 領域を組み合わせ使用することでより正確な判定ができると考えられた。

食中毒事例の中で発生件数が最も多いスイセンとニラの判別は確立した検査法により鑑別可能であった。形態鑑別でニホンスイセン、キブサスイセンと判別した試料はデータベース上にキブサスイセンの登録がないため同種であると鑑別され、スイセンの種類までの鑑別はデータベースの登録の有無によることが示唆された。その他の自然毒食中毒による高等植物の鑑別で各々高い相同性を示していることから、様々な高等植物で応用が可能であると考えられた。

文 献

- 1) 安藤尚子, 仲井菜都希, 村上友規, 他: 奈良県保健研究センター年報, 51, 37-40 (2016)
- 2) 安藤尚子, 村上友規, 立本行江, 他: 奈良県保健研究センター年報, 53, 48-51 (2018)
- 3) Thomson D, Henry R: *Biotechniques*, 19, 394-397 (1995)
- 4) CBOL Plant Working Group: *PNAS* 106, 12794-12797 (2009)
- 5) Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP: *PLoS ONE*, 6, e19254 (2011)
- 6) 牛山温子, 赤星千絵, 大澤伸彦, 他: 食衛誌, 58, 86-95 (2016)
- 7) Jing YU, Jian-Hua XUE, Shi-Liang ZHOU: *J. of Syst. Evo*, 49, 176-181 (2011)
- 8) White TJ, Bruns T, Lee S, et al.: PCR protocols: A guide to methods and applications, 315-322 (1990), Academic Press

奈良県内に流通する農産物中の残留農薬調査（1998-2019）

竹田依加・米田正樹・南浦茉奈・上床知佐奈・立本行江

Investigation of Pesticide Residues in Agricultural Products in Nara Prefecture (1998-2019)

Erika TAKEDA・Masaki YONEDA・Mana MINAMIURA・Chisana UWATOKO
and Yukie TATSUMOTO

1998年度から2019年度までに奈良県内で収去された農産物2,838検体、検査対象農薬のべ266項目について残留農薬検査結果を集計した。22年間の総検出数は556、検出率は19.6%であった。特にポジティブリスト制度施行後では国産野菜類、国産果実類および輸入果実類の検出率が上昇した。一方、基準値超過事例の顕著な増加はなかった。これよりポジティブリスト制度の事前周知が十分に行われ、適正に農薬が使用されていることが示唆された。

緒言

食品衛生法改正による残留農薬等のポジティブリスト制度（以下、制度とする）が2006年5月より施行された。これに伴い、従来は基準値がなく、食品衛生法による規制が設定されていなかった農薬と農産物の

組み合わせに対して、一律基準値または暫定基準値が設定された。

この制度に対応し、食の安全・安心を推進するためには効率的な検査業務を行い、食品中の残留農薬の実態を把握するためには、より効果的に検査対象農産物

表1 検査対象農薬

用途	農薬名	項目数
殺虫剤	BHC, DDT, EPN, XMC, アクナトリン, イサゾホス, イソキサチオン, イソフェンホス, イミダクロプリド, エチオン, エディフェンホス, エトキサゾール, エトフェンプロックス, エトプロホス, エトリムホス, エンドリン, オキサミル, カズサホス, カルバリル, キナルホス, クロチアニジン, クロマフェノジド, クロルピリホス, クロルピリホスメチル, クロルフェナビル, クロルフェンピホス(a, B), クロルフルアズロン, クロルベンジレート, サリチオン, シアノフェンホス, シアノホス, ジクロロフェンチオン, ジクロルホス, ジコホール, シハロトリン, シフルトリン, ジフルベンズロン, シヘキサチン, シペルメトリン, ジメチルピホス, ジメトエート, スルプロホス, ダイアジノン, テアクロプリド, テアメトキサム, テオメトン, テトラクロルピホス, テトラジホン, テブフェノジド, テブフェンピラド, テフルトリン, テルタメトリン, テルブホス, デイルドリン (7849), トラロメトリン, トリアゾホス, トリクロルホス, トリフルムロン, トルフェンピラド, ハルフェンプロックス, パミドチオン, パラチオン, パラチオンメチル, ビフェントリン, ビペロニルブトキシド, ビラクロホス, ビリダフェンチオン, ビリダベン, ビリプロキシフェン, ビリミカブ, ビリミホスメチル, フェナミホス, フェニトロチオン, フェノキシカルブ, フェノチオカルブ, フェノトリン, フェノブカルブ, フェンクロルホス, フェンシルホチオン, フェンチオン, フェントエート, フェンバレーテート, フェンプロバトリン, プロフェジン, フルアクリリウム, フルシトリネート, フルバリネート, プロチオホス, プロバホス, プロバルギット, プロフェノホス, プロボキスル, プロモプロピレート, プロモホス, プロモホスエチル, ペルメトリン, ペンダイオカルブ, ペンディメタリン, ホキシム, ホサロン, ホスチアゼート, ホスファミド, ホスメット, ホルモチオン, ホレート, マラチオン, メチダチオン, メトキシクロール, メトキシフェノジド, メトプレン, モノクロホス	111
殺菌剤	TCMTB, アザコナゾール, アゾキシストロビン, イソプロチオラン, イプロバリカルブ, イプロベンホス, イミベンコナゾール, オキサジキシル, カブタホール, カルホキシム, キノキシフェン, キントゼン, クレソキシムメチル, ジエトフェンカルブ, ジクロシメット, ジクロラン, ジニコナゾール, ジフェノコナゾール, シフルフェナミド, シプロジニル, シプロコナゾール, シメコナゾール, テルサミド, テクサゼン, テトラコナゾール, テブコナゾール, トリアジメノール, トリアジメホン, トリシクラゾール, トリフロキシストロビン, トルクロホスメチル, ニトロタールイソプロピル, ビテルタノール, ビラクロストロビン, ビラゾホス, ビリフェノックス(E, Z), ビリメタニル, ビロキロン, ビンクロゾリン, フェナリモル, フェンアミド, フェンプロコナゾール, フェンプロピモル, フサライド, プビリメート, フラメトビル, フルキンコナゾール, フルシラゾール, フルトラニル, フルトリアホール, プロシミド, プロピコナゾール, ヘキサコナゾール, ペナラキシル, ペンコナゾール, ペンシクロン, 酢スカリド, ミクロプロタニル, メプロニル	59
除草剤	2,4,5-T, EPTC, アザコナゾール, アセトクロール, アトラジン, アニホホス, アミトロール, アメトリン, アラクロール, インダノファン, エスプロカルブ, エタルフルラリン, エトフメセート, オキサジアゾン, オキサジクロメホン, オキシフルオルフェン, カフェンストロール, カルフェントラジンエチル, キノクラミン, ミルロン, クロマゾン, クロリダゾン, クロルタールジメチル, クロルプロファミ, クロロクソン, シアナジン, ジウロン, ジクロホップメチル, ジチオピル, シニドニエチル, シハロホップメチル, ジフェナミド, シマジン, ジメタメトリン, ジメチピル, ジメチナミド, シメトリン, ジメピレート, ターバシル, ダイムロン, テオベンカルブ, テブチウロン, テニクロー, テルブトリン, トリアレート, トリフルラリン, ナプロバミド, ノルフルラジン, ビコリナフェン, ビフェノックス, ビペロホス, ビラゾキシフェン, ビラフルフェンエチル, ビリフタリド, ビリブチカルブ, ビリミノバックメチル, プタクロール, プタフェナシル, プタニホス, フラムプロップメチル, フルフェナセット, フルミオキサジン, フルミクロラックベンチル, フルリド, プレチラクロール, プロバクロー, プロバジン, プロバニル, プロビサミド, プロマシル, プロメトリン, プロモプロド, ヘキサジノン, ペンゾフェナップ, ペンディメタリン, ペントキサジン, ペンフルラリン, ペンフレセート, メタベンズチアズロン, メトラクロール, メフェナセット, モノリニエロン, リニエロン, レナシル	84
その他	イソプロカルブ, ウニコナゾール P, クロキントセットメキシル, クロルプロファミ, ダミノジット, トリブホス, パクロトラゾール, ビペロニルブトキシド, フルシトリネート, ペノキサロール, メフェンビルジエチル, メピホス	12
計		266

や対象農薬を選択することが必要となる。奈良県では本制度に対応するため、1998年度以降の残留農薬の検査結果を集計し、県内流通農産物の残留農薬の実態把握に努めてきた¹⁻⁴⁾。また、各都道府県においても制度施行前後にかかわらず複数年間の残留農薬の検査結果をまとめることで各地域における残留農薬の実態の把握に努めている⁵⁻¹⁰⁾。

今回、1998年度から2019年度までの22年間の調査結果を制度施行前後で集計し、特に制度施行後に高頻度で検出される農薬や農産物を集計、把握することで、今後の残留農薬検査の検査項目選定のための基礎資料とすることを目的とした。また、制度施行前後の県内流通農産物における農薬の検出状況等について若干の知見を得たので報告する。

方法

1. 使用データ

1998年4月から2020年3月までの22年間に奈良県内で収去された農産物2,838検体（国産品2,630検体 輸入品208検体）の残留農薬検査結果を集計した。

2. 検査対象農薬

1998年度および1999年度は52項目、2000年度は68項目、2001年度は70項目、2002年度と2003年度は72項目、2004年度と2005年度は91項目および2006年度から2019年度までの間は116項目について検査を実施したが、年度毎に一部項目を入れ替え検査を実施した。この間検査を実施したのべ266項目の検査対象農薬の内訳を表1に示した。

結果

表2 検体数と検出検体数および検出率

年度	1998～2005			2006～2019			1998～2019		
	検査数	検出数	検出率(%)	検査数	検出数	検出率(%)	検査数	検出数	検出率(%)
総数	484	79	16.3	2354	477	20.3	2838	556	19.6
国産	395	66	16.7	2235	447	20.0	2630	513	19.5
野菜類	284	26	9.2	1643	210	12.8	1927	236	12.2
果実類	111	40	36.0	592	237	40.0	703	277	39.4
輸入	89	13	14.6	119	30	25.2	208	43	20.7
野菜類	57	8	14.0	66	9	13.6	123	17	13.8
果実類	32	5	15.6	53	21	39.6	85	26	30.6

表3 検査項目数と検出項目数および検出率

年度	1998～2005			2006～2019			1998～2019		
	検査項目数	検出数	検出率(%)	検査項目数	検出数	検出率(%)	検査項目数	検出数	検出率(%)
総数	32,072	103	0.32	267,741	671	0.25	299,813	774	0.26
国産	28,123	87	0.31	255,161	625	0.24	283,284	712	0.25
野菜類	19,930	29	0.15	188,572	259	0.14	208,502	288	0.14
果実類	8,193	58	0.71	66,589	366	0.55	74,782	424	0.57
輸入	3,949	16	0.41	12,580	46	0.37	16,529	62	0.38
野菜類	1,769	10	0.57	6,720	14	0.21	8,489	24	0.28
果実類	2,180	6	0.28	5,860	32	0.55	8,040	38	0.47

1. 残留農薬の検出率

1) 検出検体数と検出率

1998年度から2019年度までの22年間に搬入された農産物2,838検体について農薬の検出率を表2に示した。22年間の総検出数は556で検出率は19.6%であった。制度施行前の7年間では検体数484検体に対して検出数79、検出率16.3%であり、制度施行後の14年間では検体数2,354検体に対して検出数477、検出率20.3%であった。22年間に搬入された農産物を国産品および輸入品別にみると、国産品は検体数2,630検体に対して検出数513、検出率は19.5%、輸入品は検体数208検体に対して検出数43、検出率は20.7%であった。さらに、国産品について農産種別にみると、野菜類は検体数1,927検体に対して検出数236、検出率は12.2%、一方、果実類は検体数703検体に対し検出数277、検出率は39.4%であった。

2) 検出項目数と検出率

表3に検査項目数に対する検出率を示した。22年間の検査項目数299,813項目に対して検出項目数は774であり、検出率0.26%であった。制度施行前は、検査項目数32,072項目に対して検出項目数は103、検出率0.32%であり、施行後では検査項目数267,741項目に対し検出数671、検出率0.25%であった。農産物を国産品および輸入品別にみると、国産品は検査項目数283,284項目に対し検出数712、検出率は0.25%、輸入品は検査項目数16,529に対し検出数62、検出率は0.38%であった。さらに、国産品について種別にみると、野菜類は検査項目数208,502項目に対して検出数288、検出率は0.14%、一方、果実類は検査項目数74,782項目に対し検出数424、検出率は0.57%であっ

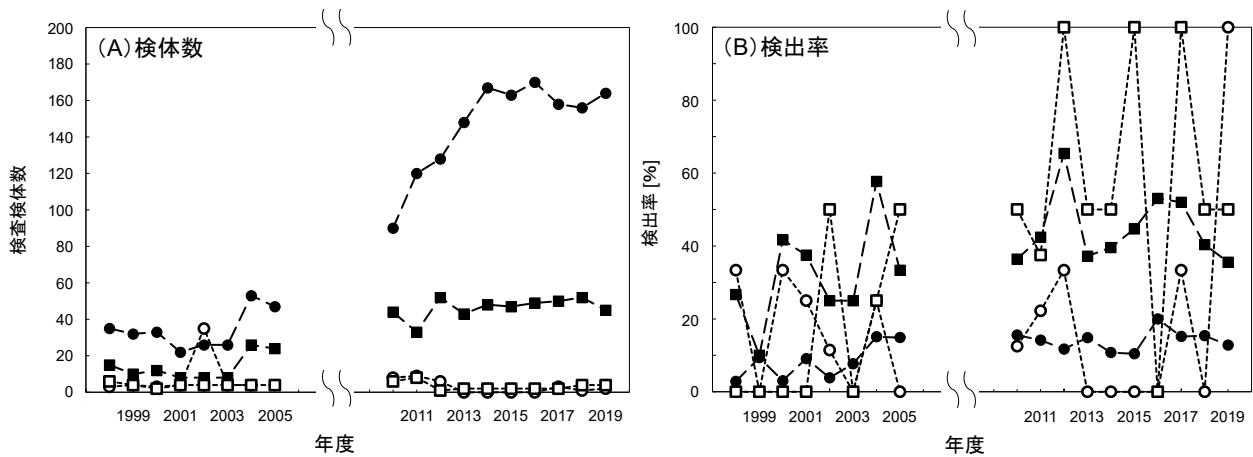


図1 検体数と検出率の経年変化

(●) : 国産野菜類 ■ : 国産果実類 ○ : 輸入野菜類 □ : 輸入果実類

た。

3) 検体数と農薬検出率の推移

国産品および輸入品の検体数と検出率の推移を図1に示した。制度施行後については検体数が増加した2010年度から2019年度の直近10年間分を調査対象とした。検体数は2004年度から国産品が増加した。一方、輸入野菜類は2002年度に検体数が一時増加した。農薬検出率は国産野菜類と国産果実類が2003年度以降上昇し、制度施行後はそれぞれ10%から20%程度、35%から65%程度で推移した。一方、輸入野菜類には検体数および検出率とも特徴的な傾向はなかった。輸入果実類は2003年度以降検出率が上昇し、制度施行後検出率が40%から100%程度と他よりも高い水準で推移した。

2. 検出農薬

1) 制度施行前後の検出農薬の内訳

制度施行後の特に検体数が増加した2010年度から2019年度の直近10年分の検出農薬を調査し、内訳を表4に示した。制度施行後の調査期間の結果と伊吹らの報告¹⁾による施行前の調査結果と合わせると、検出農薬は61項目で、検査項目のべ266項目のうち22.9%を占めた。制度施行前および制度施行後の調査期間における検出数上位11農薬はプロシミドン(78検体)が最も多く、以下、クレソキシムメチル(74検体)、ジフェノコナゾール(62検体)、アゾキシストロビン(50検体)、ミクロブタニル(47検体)、クロルフェナピル(44検体)、ピテルタノール(27検体)、クロルピリホス(23検体)、トルフェンピラド(22検体)、エトフェンプロックス(13検体)およびメチダチオン(13検体)と続いた。このうち、クロルフェナピル、クロルピリホス、トルフェンピラド、エトフェンプロックスおよびメチダチオンは殺虫剤で他は全て殺菌剤

であった。

2) 制度施行後の検出農薬の内訳

制度施行後(2010年度~2019年度)にのみ検出した農薬は34項目であり、検出農薬61項目の55.7%に相当した。制度施行後で10検体以上から検出した農薬は15項目あり、これらの成分が検出された検体は443検体で、調査期間内に農薬が検出された検体の75.5%を占めた。このうち、トルフェンピラド、エトフェンプロックス、メチダチオン、アゾキシストロビンおよびシメコナゾールは制度施行後に検査項目として追加された農薬である。検出農薬の内訳をみると、10検体以上から検出した7種の殺菌剤で殺菌剤の検出数の86.0%を占めた。

3. 検出農産物

1) 制度施行後の検出農産物内訳

表5に制度施行後の検出農産物の内訳を示した。2. 検出農薬と同様に2010年度から2019年度を調査対象とした。制度施行前と制度施行後(2010年度~2019年度)で農薬が検出された農産物は63種であった。このうち制度施行後にのみ検出された農産物は32種であり、全63種の50.8%を占めた。検出した農薬の項目数が多い国産野菜類は、制度施行前はトマト¹⁾で顕著であったが、制度施行後はなす(検出率25.4%)、トマト(検出率24.7%)、ねぎ(検出率30.0%)、きゅうり(検出率23.9%)および白菜(検出率12.7%)であった。一方、国産果実類は制度施行前後とも苺(検出率57.9%)、かき(検出率32.6%)、うめ(検出率60.4%)およびなし(検出率73.7%)であった。

2) 検出数上位3品目の検出項目内訳

さらに、制度施行後(2010年度~2019年度)について奈良県の主要品目であり(奈良県:奈良県の農産・園芸・水産, <http://www.pref.nara.jp/secure/122577/>)

表4 制度施行後の検出農薬の内訳（2010年度～2019年度）

用途	農薬名	総検出数	野菜		作物	果実		作物
			国産	輸入		国産	輸入	
殺菌剤	クロルフェナビル	40	29	1	なす(13)、チンゲン菜(3)、トマト(3)、キャベツ(2)、きゅうり(2)、オクラ(1)、かぼちゃ(1)、空心菜(1)、白菜(1)、ふき(1)、パプリカ(1)、みずな(1)	10		いちじく(5)、かき(2)、ぶどう(2)、なし(1)
	トルフェンピラド	22	19		なす(9)、ねぎ(4)、白菜(2)、空心菜(1)、スナップえんどう(1)、トマト(1)、レタス(1)	3		清見(1)、セミノーブル(1)、はっさく(1)
	エトフェンブロックス	13	13		きゅうり(2)、黒枝豆(2)、三度豆(2)、だいこん(2)、いんげん豆(1)、オクラ(1)、なす(1)、白菜(1)、やまとまな(1)			
	メチダチオン	13				11	2	うめ(4)、清見(2)、はっさく(2)、いよかん(1)、オレンジ(1)、キウイフルーツ(1)、グレープフルーツ(1)、セミノーブル(1) 苺(1)
	ホスチアゼート	12	11		だいこん(6)、人参(2)、小松菜(1)、とうがん(1)、ピーマン(1)	1		
	クロルピリホス	11	2	1	オクラ(1)、さつまいも(1)、だいこん(1)		8	バナナ(4)、オレンジ(3)、レモン(1)
	シベルメトリン	10	5	1	ねぎ(2)、ほうれんそう(2)、にんにくの芽(1)、みずな(1)	4		かき(3)、なし(1)
	フェンプロバトリン	10	2		なす(2)	7	1	かき(5)、オレンジ(1)、清見(1)、セミノーブル(1)
	ブプロフェジン	8	3		トマト(3)	5		かき(5)
	バルメトリン	8	7		オクラ(3)、小松菜(1)、なす(1)、ねぎ(1)、ほうれんそう(1)	1		ぶどう(1)
	ダイアジノン	7	4		ごぼう(2)、小松菜(1)、だいこんの葉(1)	3		なし(2)、ぶどう(1)
	テブフェンピラド	7	2	1	なす(2)、パプリカ(1)	4		苺(2)、いよかん(1)、かき(1)
	ピリダベン	7	7		トマト(3)、きゅうり(1)、とうがん(1)、ふき(1)、ピーマン(1)			
	フェンバレレート	7	6		白菜(3)、キャベツ(1)、なす(1)、レタス(1)	1		かき(1)
	プロチオホス	6				6		かき(5)、うめ(1)
	クロチアニジン	5	1		白菜(1)	2	2	オレンジ(2)、かき(1)、ぶどう(1)
	ピフェントリン	5				5		なし(5)
	フェニトロチオン	5	3		キャベツ(1)、黒枝豆(1)、モロヘイヤ(1)	2		うめ(1)、なし(1)
	EPN	4	4		ねぎ(3)、きく菜(1)			
	エトキサゾール	4	1		なす(1)	3		苺(3)
	イミダクロプリド	3	3		なす(2)、白菜(1)			
チアクロプリド	3				3		苺(3)	
ピリプロキシフェン	3					3	オレンジ(3)	
チアメトキサム	2	1	1	かぼちゃ(1)、白菜(1)				
マラチオン	2	2		黒枝豆(1)、ねぎ(1)				
クロマフェノジド	1	1		なす(1)				
シハロトリン	1				1		かき(1)	
テトラジホン	1				1		苺(1)	
ピリミホスメチル	1		1	パプリカ(1)				
フェントエート	1	1		ねぎ(1)				
小計	30	222	127	6		73	16	
殺菌剤	プロシミドン	70	32	1	きゅうり(9)、トマト(8)、ピーマン(5)、キャベツ(4)、なす(3)、三度豆(1)、にんにくの芽(1)、ばれいしょ(1)、パプリカ(1)	37		苺(35)、メロン(2)
	クレソキシムメチル	66	12		なす(6)、ねぎ(2)、甘とうがらし(1)、スナップえんどう(1)、とうがん(1)、ニラ(1)	54		苺(26)、うめ(15)、なし(9)、かき(2)、ぶどう(2)
	ジフェノコナゾール	62	1		トマト(1)	61		かき(50)、うめ(10)、なし(1)
	アゾキシストロビン	50	32	1	トマト(7)、ねぎ(6)、きゅうり(4)、なす(4)、いんげん豆(3)、ピーマン(3)、小松菜(2)、モロヘイヤ(2)、オクラ(1)、白菜(1)	16	1	苺(9)、いちじく(3)、ぶどう(3)、なし(1)、レモン(1)
	マイクロブタニル	37	13		なす(5)、ねぎ(2)、ピーマン(2)、ししとう(1)、ひもとうがらし(1)、ふき(1)、みずな(1)	24		苺(24)
	ビテルタノール	17				17		うめ(15)、苺(2)
	シメコナゾール	10				10		苺(10)
	シフルフェナミド	9	3		なす(3)	6		苺(6)
	テブコナゾール	8				8		かき(3)、ぶどう(3)、うめ(2)
	フェナリモル	8	1		なす(1)	7		苺(7)
	ジエトフェンカルブ	7	7		トマト(4)、きゅうり(3)			
	ボスカリド	7	4	1	白菜(2)、トマト(1)、ほうれんそう(1)、ラディキオ(1)	2		苺(2)
	オキサジキシル	3	3		きく菜(1)、しろな(1)、チンゲン菜(1)			
	テトラコナゾール	2	1		かぼちゃ(1)	1		苺(1)
	シプロジニル	1				1		なし(1)
	トリアジメノール	1	1		いんげん豆(1)			
	トリフロキシストロビン	1	1		きゅうり(1)			
	トルクロホスメチル	1	1		キャベツ(1)			
	ピリメタニル	1					1	オレンジ(1)
	フェンプロコナゾール	1				1		グレープフルーツ(1)
	フルトラニル	1	1		海老芋(1)			
小計	21	363	113	3		245	2	
除草剤	トリフルラリン	1	1		小松菜(1)			
	ペンディメタリン	1	1		ねぎ(1)			
小計	2	2	2	0		0	0	
総計	53	587	242	9		318	18	

表5 制度施行後の検出農産物の内訳(2010年度～2019年度)

分類	検体名	総検体数	検出検体数	総検出項目数	殺虫剤		殺菌剤		除草剤		農薬名
					国産	輸入	国産	輸入	国産	輸入	
野菜	なす	169	43	55	33		22				アゾキシストロビン、イミダクロプリド、エトキサゾール、エトフェンプロックス、クレソキシムメチル、クロルフェナシル、クロマフェノジド、シフルフェナミド、テブフェンピラド、トルフェンピラド、フェナリモル、フェンバレレート、フェンプロバトリン、プロシミドン、ベルメトリン、ミクロブタニル
	トマト	97	24	31	11		20				アゾキシストロビン、クロルフェナシル、ジエトフェンカルブ、ジフェノコナゾール、トルフェンピラド、ピリダベン、プロプロフェジン、プロシミドン、ホスカリド
	ねぎ	60	18	23	12		10		1		EPN、アゾキシストロビン、クレソキシムメチル、シベルメトリン、トルフェンピラド、フェントエート、ベルメトリン、ペンディメタリン、マラチオン、ミクロブタニル
	きゅうり	67	16	22	5		17				アゾキシストロビン、エトフェンプロックス、クロルフェナシル、ジエトフェンカルブ、トリフロキシストロビン、ピリダベン、プロシミドン
	白菜	79	10	13	10		3				アゾキシストロビン、イミダクロプリド、エトフェンプロックス、クロチアニジン、クロルフェナシル、チアメトキサム、トルフェンピラド、フェンバレレート、ホスカリド
	ピーマン	18	6	12	2		10				アゾキシストロビン、ピリダベン、プロシミドン、ホスチアゼート、ミクロブタニル
	キャベツ	84	9	9	4		5				クロルフェナシル、トルクロホスメチル、フェニトロチオン、フェンバレレート、プロシミドン
	オクラ	35	7	7	5	1	1				アゾキシストロビン、エトフェンプロックス、クロルピリホス、クロルフェナシル、ベルメトリン
	いんげんまめ	9	5	5	1		3		1		アゾキシストロビン、エトフェンプロックス、トリアジメノール
	小松菜	36	6	6	3		2			1	アゾキシストロビン、ダイアジノン、トリフルラリン、ベルメトリン、ホスチアゼート
	だいこん	98	9	9	9						エトフェンプロックス、クロルピリホス、ホスチアゼート
	パプリカ	6	3	4	4		3			1	クロルフェナシル、テブフェンピラド、ピリミホスメチル、プロシミド
	ほうれんそう	65	4	4	3		1				シベルメトリン、ベルメトリン、ホスカリド
	黒枝豆	9	3	4	4		4				エトフェンプロックス、フェニトロチオン、マラチオン
	三度豆	2	2	3	2		1				エトフェンプロックス、プロシミドン
	チンゲン菜	26	4	4	3		1				クロルフェナシル、オキサジキシル
	とうがん	10	1	3	2		1				クレソキシムメチル、ピリダベン、ホスチアゼート
	ふき	2	1	3	2		1				クロルフェナシル、ピリダベン、ミクロブタニル
	みずな	18	3	3	2		1				クロルフェナシル、シベルメトリン、ミクロブタニル
	モロヘイヤ	9	2	3	1		2				アゾキシストロビン、フェニトロチオン
	かぼちゃ	56	3	3	1	1	1				クロルフェナシル、チアメトキサム、テトラコナゾール
	きく菜	4	2	2	1		1				EPN、オキサジキシル
	空心菜	6	2	2	2		2				クロルフェナシル、トルフェンピラド
	ごぼう	10	2	2	2		2				ダイアジノン
	スナップえんどう	1	1	2	1		1				クレソキシムメチル、トルフェンピラド
	にんにくの芽	2	2	2	2		1				シベルメトリン、プロシミドン
	レタス	22	2	2	2		2				トルフェンピラド、フェンバレレート
	甘とうがらし	1	1	1	1		1				クレソキシムメチル
	海老芋	2	1	1	1		1				フルトラニル
	さつま芋	59	1	1	1		1				クロルピリホス
	ししとう	2	1	1	1		1				ミクロブタニル
	しろな	9	1	1	1		1				オキサジキシル
	だいこんの葉	8	1	1	1		1				ダイアジノン
	ニラ	2	1	1	1		1				クレソキシムメチル
	人参	27	2	2	2		2				ホスチアゼート
	はれいしょ	48	1	1	1		1				プロシミドン
	びもとうがらし	9	1	1	1		1				ミクロブタニル
	やまとまな	28	1	1	1		1				エトフェンプロックス
	ラディキオ	1	1	1	1					1	ホスカリド
小計	39	1196	203	251	127	6	113	3	2	0	
果実	苺	133	77	132	10		122				アゾキシストロビン、エトキサゾール、クレソキシムメチル、シフルフェナミド、シメコナゾール、チアクロプリド、テトラコナゾール、テトラジホネ、テブフェンピラド、ピテルタノール、フェナリモル、プロシミドン、ホスチアゼート、ホスカリド、ミクロブタニル
	かき	181	59	79	24		55				クレソキシムメチル、クロチアニジン、クロルフェナシル、シハロトリン、ジフェノコナゾール、シベルメトリン、テブコナゾール、テブフェンピラド、フェンバレレート、フェンプロバトリン、プロプロフェジン、プロクレソキシムメチル、ジフェノコナゾール、テブコナゾール、ピテルタノール、フェニトロチオン、プロチオホス、メチダチオン
	うめ	53	32	48	6		42				アゾキシストロビン、クレソキシムメチル、クロルフェナシル、ジフェノコナゾール、シプロジニル、シベルメトリン、ピフェントリン、フェニトロチオン、ダイアジノン
	なし	19	14	22	10		12				アゾキシストロビン、クレソキシムメチル、クロルフェナシル、ジフェノコナゾール、シプロジニル、シベルメトリン、ピフェントリン、フェニトロチオン、ダイアジノン
	オレンジ	15	10	11	10		1			1	クロチアニジン、クロルピリホス、ピリプロキシフェン、ピリメタニル、フェンプロバトリン、メチダチオン
	ぶどう	14	7	13	5		8				アゾキシストロビン、クレソキシムメチル、クロチアニジン、クロルフェナシル、ダイアジノン、テブコナゾール、ベルメトリン
	いちじく	8	6	8	5		3				アゾキシストロビン、クロルフェナシル
	清見	2	2	4	4		4				トルフェンピラド、フェンプロバトリン、メチダチオン
	バナナ	10	4	4	4		4				クロルピリホス
	セミノール	1	1	3	3		3				トルフェンピラド、フェンプロバトリン、メチダチオン
	はっさく	2	2	3	3		3				トルフェンピラド、メチダチオン
	いよかん	2	2	2	2		2				メチダチオン、テブフェンピラド
	グレープフルーツ	6	2	2	1		1				フェンプロコナゾール、メチダチオン
	メロン	5	2	2	2		2				プロシミドン
	レモン	8	2	2	1		1			1	アゾキシストロビン、クロルピリホス
	キウイフルーツ	11	1	1	1						メチダチオン
	小計	16	470	223	336	73	16	245	2	0	0
総計	55	1666	426	587	200	22	358	5	2	0	

lnaraken-nosanengeisuisan.pdf), 検出検体数が多い野菜類および果実類の各上位3品目の検出項目の内訳を表6に示した。野菜類はなす、トマトおよびねぎ、果実類は苺、かきおよびうめについて示した。

4. 複数農薬を検出した農産物

同一検体から複数農薬を検出した農産物を表7に示した。複数の農薬を検出した検体は制度施行前16検体で、検出検体数の20.3%であった。一方、制度施行後は141検体で、制度施行後の検出検体数の29.0%であった。また10検体以上検出した農産物は苺54検体、

うめ18検体、かき18検体およびなす13検体で、これらの検体で65.6%を占めた。

同一検体から検出された農薬の項目数の分布を制度施行前後で比較したものを図2に示した。3種類の農薬が同一検体から検出された検体は、制度施行前は苺4検体、かき1検体およびパプリカ1検体の全6検体で、制度施行後は苺8検体、かき4検体、なし3検体、ぶどう2検体、うめ1検体、清見1検体、セミノール1検体、とうがん1検体、トマト1検体およびぶき1検体の全23検体であった。4種類以上の農薬が同

表6 野菜類および果実類の検出数上位3品目の検出項目（2010年度～2019年度）

なす（総検体数169）			トマト（総検体数97）			ねぎ（総検体数60）		
用途	農薬名	検出数	用途	農薬名	検出数	用途	農薬名	検出数
殺虫剤	クロルフェナピル	13	殺菌剤	プロシミドン	8	殺菌剤	アゾキシストロビン	6
殺虫剤	トルフェンピラド	9	殺菌剤	アゾキシストロビン	7	殺虫剤	トルフェンピラド	4
殺菌剤	クレソキシムメチル	6	殺菌剤	ジエトフェンカルブ	4	殺虫剤	EPN	3
殺菌剤	ミクロブタニル	5	殺虫剤	クロルフェナピル	3	殺菌剤	クレソキシムメチル	2
殺菌剤	アゾキシストロビン	4	殺虫剤	ピリダベン	3	殺虫剤	シベルメトリン	2
殺菌剤	シフルフェナミド	3	殺虫剤	ブプロフェジン	3	殺菌剤	ミクロブタニル	2
殺菌剤	プロシミドン	3	殺菌剤	ジフェノコナゾール	1	殺虫剤	フェントエート	1
殺虫剤	イミダクロプリド	2	殺虫剤	トルフェンピラド	1	殺虫剤	ペルメトリン	1
殺虫剤	テブフェンピラド	2	殺菌剤	ボスカリド	1	除草剤	ペンディメタリン	1
殺虫剤	フェンプロパトリン	2				殺虫剤	マラチオン	1
殺虫剤	エトキサゾール	1						
殺虫剤	エトフェンプロックス	1						
殺虫剤	クロマフェノジド	1						
殺虫剤	フェンバレレート	1						
殺菌剤	フェナリモル	1						
殺虫剤	ペルメトリン	1						

苺（総検体数133）			かき（総検体数181）			うめ（総検体数53）		
用途	農薬名	検出数	用途	農薬名	検出数	用途	農薬名	検出数
殺菌剤	プロシミドン	35	殺菌剤	ジフェノコナゾール	50	殺菌剤	クレソキシムメチル	15
殺菌剤	クレソキシムメチル	26	殺虫剤	フェンプロパトリン	5	殺菌剤	ビテルタノール	15
殺菌剤	ミクロブタニル	24	殺虫剤	ブプロフェジン	5	殺菌剤	ジフェノコナゾール	10
殺菌剤	シメコナゾール	10	殺虫剤	プロチオホス	5	殺虫剤	メチダチオン	4
殺菌剤	アゾキシストロビン	9	殺虫剤	シベルメトリン	3	殺菌剤	テブコナゾール	2
殺菌剤	フェナリモル	7	殺菌剤	テブコナゾール	3	殺虫剤	フェニトロチオン	1
殺菌剤	シフルフェナミド	6	殺菌剤	クレソキシムメチル	2	殺虫剤	プロチオホス	1
殺虫剤	エトキサゾール	3	殺虫剤	クロルフェナピル	2			
殺虫剤	チアクロプリド	3	殺虫剤	シハロトリン	1			
殺虫剤	テブフェンピラド	2	殺虫剤	テブフェンピラド	1			
殺菌剤	ボスカリド	2	殺虫剤	フェンバレレート	1			
殺菌剤	ビテルタノール	2	殺虫剤	クロチアニジン	1			
殺菌剤	テトラコナゾール	1						
殺虫剤	テトラジホン	1						
殺虫剤	ホスチアゼート	1						

一検体から検出された検体は、制度施行前は苺1検体のみであったが、制度施行後は苺6検体、うめ1検体およびなす1検体であった。

5. 基準値を超過した事例

調査期間22年間に残留基準値を超過した事例を表8に示した。制度施行前は2004年度のなす1検体のみであった。一方、制度施行後は8検体、のべ9項目の超過事例があり、このうち一律基準0.01ppmを超えていたものは6検体のべ6項目であった。検査検体数に対する違反率は制度施行前0.21%、制度施行後0.34%、検査項目数に対する違反率は制度施行前0.0031%、制度施行後0.0034%で、いずれも制度施行前後で違反率の極端な増加はなかった。

考 察

2005年度および2018年度の厚生労働省の全国調査（厚生労働省：平成17年度残留農薬検査結果、https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/zanryu/121029-1.html、厚生労働省：平成30年度残留農薬検査結果、https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_13044.html）によると、農薬検出率は0.20%から0.46%に上昇してお

り、その内訳を確認すると、国産品の検出率は0.35%から0.28%に低下している一方で、輸入品の検出率は0.18%から0.70%に上昇している。今回の22年間の集計結果を制度施行前後で比較すると、国産野菜類は9.2%から12.8%、国産果実類は36.0%から40.0%とそれぞれ3%から4%程度検出率が上昇した。一方、輸入野菜類は14.0%から13.6%と検出率が低下したが、輸入果実類は15.6%から39.6%と検出率が2倍以上に上昇した。また、制度施行前後の検出率を野菜類と果実類合算すると、国産品では16.7%から20.0%、輸入品では14.6%から25.2%と上昇しており、輸入品の検出率の上昇が顕著であった。制度施行前より施行後の方が検査項目数の多いことも要因と考えられるが、本県の結果はこれらの全国の集計結果と同様の傾向にあることが明らかとなった。

検査項目数で検出率を調査した結果、輸入果実類を除き検出率は制度施行後いずれも低下した。追加で検査項目として選択した農薬の使用量が少なく残留していない、または分解性が高く残留性が低いものを選択した可能性が考えられた。

検体数および検出率の経年変化を調査した結果、2002年度の輸入野菜類の検査検体数が他の年度と比

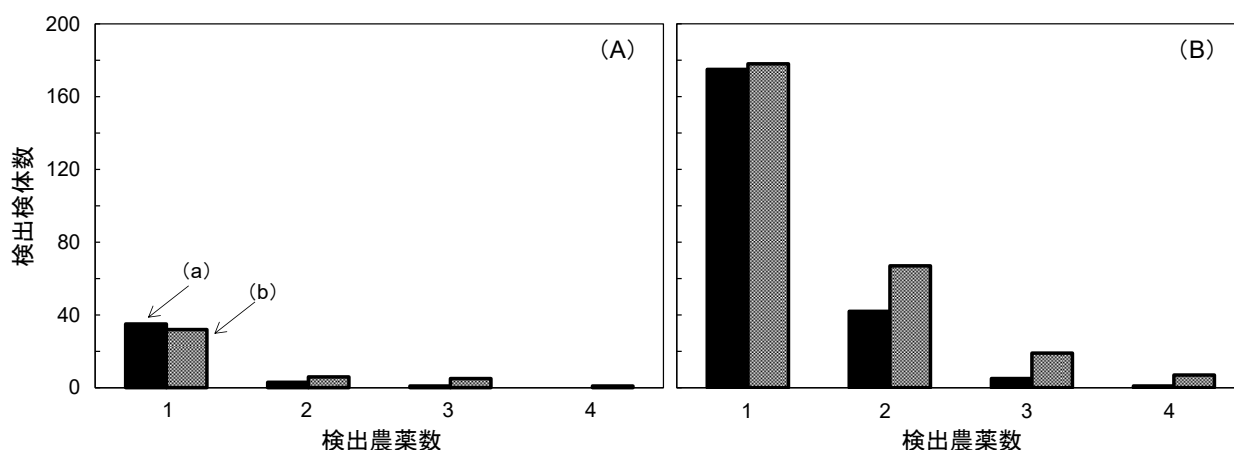


図2 同一検体からの農薬検出項目数
 (A) 制度施行前（1998年度～2005年度）
 (B) 制度施行後（2006年度～2019年度）
 (a) 野菜類 (b) 果実類

表8 基準値超過事例

年度	品名	産地	農薬	検出濃度 [ppm]	基準値 [ppm]
2004	なす	国産	EPN	0.45	0.01
2007	しろな	国産	イソキサチオン	0.2	0.1
			EPN	0.08	0.01
2008	フダン草	国産	EPN	0.17	0.01
2009	かぶの葉	国産	ダイアジノン	1.4	0.1
2010	ねぎ	国産	EPN	1.3	0.1
2010	しゅんぎく	国産	EPN	1.5	0.01
2013	さといも	国産	フルトラニル	0.06	0.01
2016	うめ	国産	プロチオホス	0.03	0.01
2017	えんさい	国産	トルフェンピラド	0.1	0.01

うち14項目（5.3%）の農薬を検出した。複数検体で検出した5農薬の検出数は18検体であり、輸入品の検出数27検体の66.7%を占めた。特にクロルピリホス（9検体）は他の検出農薬に比べ極めて検出数が多かった。輸入品についてはクロルピリホスの検出数が多いことが過去に報告されており¹³⁾、今回の調査も同様の傾向であることを確認した。

検出農産物の内訳より、苺およびうめでは50%以上の検体から農薬が検出されていることを確認した。また、苺、かきおよびうめは使用される農薬種も多ことから複数の農薬が検出される検体も多かった。これらの農産物は奈良県の主要農産物であり、地域性を反映したこともあり検体数も多いが、果実類による基準値違反は後述するうめによる一事例にのみ収まっており、制度施行後は生産現場での制度の趣旨の理解が深まっており農薬の適正使用が図られていることが示唆された。

制度施行後の野菜類と果実類の検出数上位3品目の検出率が20%以上である農薬をそれぞれ確認した。野菜類は、なすではクロルフェナピル23.6%、トマトではプロシミドン25.8%、アズキシストロビン22.6%およびねぎではアズキシストロビン26.1%であった。一

方、果実類は、苺ではプロシミドン26.5%、かきではジフェノコナゾール63.3%、うめではクレソキシムメチル31.3%、ビテルタノール31.3%およびジフェノコナゾール20.8%であった。クロルフェナピル、プロシミドン、アズキシストロビン、ジフェノコナゾール、クレソキシムメチルおよびビテルタノールは表4に示したように、他の農産物を含めた検出数でも上位であり、検体搬入時に添付される農薬使用履歴等からも使用された記録があることを確認することが多く、そのことが上記の結果に反映されていると考えられた。当センターでは食品分類により検査項目を個別に設定せず、いずれの農産物も一律の検査項目を設定し検査を実施してきた。しかし、将来的に農産物を複数群に分類し検査項目を設定し、検査体制の充実をはかることが可能となった場合に、このような農薬検出頻度の高い農産物と検出農薬の組み合わせを明確にしておくことは、群毎に検査項目を設定する上で必要となると考える。

同一検体から複数の農薬を精査した結果、例年複数項目の検出される検体はあるものの、制度施行後にこのような検体が増加傾向にあるのは徐々にではあるが検査項目数を拡大してきたことが反映されたと考えられる。

基準値超過事例は制度施行前施行後とも、年度当たり0から2事例で留まっていることから、制度施行後の一律基準値や暫定基準値の適用によって基準値超過事例が急激に増加することはなかった。制度の施行による違反率は当時の測定結果から伊吹らが1.0%¹⁾、日本生活協同組合連合会が2.5%¹⁴⁾、兵庫県が1.9%¹⁵⁾と試算していたが、生産現場に対する事前の制度周知

が十分図られていたことも影響してか試算を大きく下回った。制度の施行により規制対象農薬が増大し、食品県内流通品の安全性を確認するために、より多くの農薬の検査を実施できる体制づくりが求められる。日常の検査結果に対して詳細に解析を継続して行い、今後の残留農薬検査のための一助となる資料の充実に努めていきたい。

まとめ

1998年度から2019年度までの22年分の奈良県内で流通する農産物中の残留農薬の検査結果を集計したところ、以下のことが明らかとなった。

- ・制度施行後、輸入果実類の農薬検出率が検体数および検査項目数ともに上昇したが、これは全国的な傾向と同様であった。
- ・農薬検出率は国産品に対しては一定の傾向を把握可能であったが、輸入品については傾向を正確に把握するには検体数が不足していると考えられた。
- ・本県で主に検出される農薬は近隣の自治体の調査結果で報告されている農薬と同じ傾向にあった。輸入品については国の報告と同じ傾向にあった。
- ・本県の主要農産物からの農薬検出率は他の農産物より高かったが、基準値違反はほぼなく、生産現場で農薬が適正に使用されていることが示唆された。
- ・県内流通品で検出される農産物と農薬の組合せについて一定の情報が蓄積できた。
- ・検査項目数の拡大は検出率の上昇に大きく貢献するため今後の検査体制のさらなる充実に努めることの重要性を再度認識した。
- ・制度の導入による基準値超過事例の顕著な増加は見られなかった。事前に本制度の周知が十分はかられていたと考えられた。

引用文献

- 1) 伊吹幸代, 植田直隆, 宇野正清: 奈良県保健環境研究センター年報, 40, 77-81 (2005)
- 2) 山下浩一: 奈良県保健環境研究センター年報, 46, 58-61 (2011)
- 3) 山下浩一, 西山隆之, 北岡洋平, 他: 奈良県保健研究センター年報, 49, 35-37 (2013)
- 4) 米田正樹, 南浦茉奈, 北岡洋平, 他: 奈良県保健研究センター年報, 53, 53-56 (2018)
- 5) 花岡良信, 石原祐治, 清水修二, 他: 長野県環境保全研究所研究報告, 3, 41-40 (2007)
- 6) 大垣有紀, 川合啓之, 林克弘, 他: 三重県保健環境研究所年報, 12, 35-42 (2010)

- 7) 垣田雅史, 日比和美, 林孝子, 他: 神奈川県衛生研究所研究報告, 46, 53-56 (2016)
- 8) 萬年美穂子, 佐田厚史: 山形県衛生研究所報, 50, 6-9 (2017)
- 9) 中山隆, 小山和志, 丸山起人, 他: 長野県環境保全研究所研究報告, 14, 43-48 (2018)
- 10) 立原幹子, 海老根佐智子, 山形明広, 他: 茨城県衛生研究所年報, 57, 52-56 (2019)
- 11) 奈良県保健研究センター年報, 37, 25 (2002)
- 12) 福井直樹, 高取聡, 北川陽子, 他: 大阪府立公衆衛生研究所報, 48, 14-21 (2010)
- 13) “平成20年度 輸出国における農薬等の使用状況に関する調査”, 国立医薬品食品衛生研究所, 1-46 (2008)
- 14) “日本生協連残留農薬データ集Ⅱ”, 日本生活協同組合連合会商品検査センター編, 73-81 (2005)
- 15) 秋山由美, 吉岡直樹, 市橋啓子: 食品衛生学雑誌, 46, 305-318 (2005)

キハダの成熟果実および葉の残留農薬分析法の妥当性評価 および残留農薬実態調査（2020年度）

南浦茉奈・米田正樹・上床知佐奈・竹田依加・立本行江

Analytical Method for Pesticide Validation and Pesticide Residue Survey of *Phellodendron* Fruits and Leaves (2020)

Mana MINAMIURA・Masaki YONEDA・Chisana UWATOKO・Erika TAKEDA
and Yukie TATSUMOTO

奈良県内で食材利用が進んでいるキハダの成熟果実および葉について、通知法に改良を加えた前処理方法で妥当性評価を行い、2020年に奈良県内で採取したキハダの果実10検体およびキハダの葉32検体の残留農薬の実態調査を行った。実態調査の結果から、キハダの果実では農薬が検出されず、キハダの葉では基準値内であったが、3検体からシラフルオフェンが検出された。

緒言

キハダはミカン科キハダ属の落葉高木で、*Phellodendron amurense* Ruprecht 又は *Phellodendron chinese* Schneider の周皮を除いた樹皮を生薬オウバクとして利用し、奈良県では古くから「陀羅尼助」等の健胃・整腸剤として人の健康の保持・増進に寄与してきた。良質な薬用作物の産地である奈良県の素地を生かし、2018年より県の公設研究機関で構成される奈良県研究分野統合本部において、キハダによる産業拡大及び森林地域の振興を目的に、キハダの果実や葉等の未利用部分も含めた有効活用に関する研究が進められている¹⁻⁴⁾。しかし、県内の現存しているキハダは田畑の隣接地等で生育しており、キハダの果実及び葉の食材利用が進めば、農薬残留による健康被害へ繋がる可能性が危惧される。

我々は、2019年に県内各地で採取したキハダの果実および葉の残留農薬の実態調査を行い、「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」および「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」（以下、通知法⁵⁾に準じた前処理方法を用いた調査結果を報告した⁶⁾。しかし、この前処理方法では夾雑物質の残留により、多検体の試験溶液の連続測定の際に装置への負荷が懸念された。また、GC-MS/MSの機器を更新したことで、試験法の妥当性の再確認の必要が生じたこともあり、2020年度のキハダの残留農薬の実態調査では、より夾雑物を除去し精製効率を高めた前処理方法を再検討のうえ、食材として県内で使用されている成熟果実と葉を用いた分析法について「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（以下、ガイ

ドライン⁷⁾に従い妥当性評価を行った。さらに、2020年の県内採取のキハダの果実及び葉について残留農薬実態調査を行ったので結果を報告する。

方法

1. 試料

2020年6月から8月にかけて、奈良県内各地（奈良市、桜井市、御所市、下市町、山添村および曾爾村）で採取したキハダの果実10検体および葉32検体を用いた（表1）。また、成熟果実の妥当性評価では2019年10月16日に山添村で採取し、成熟させたものを用いた。図1にキハダの未成熟果実、図2にキハダの成熟果実、図3にキハダの葉を示す。各試料はミキシングカッターで粉砕して均一化した後、ただちに使用しない場合はポリプロピレン製袋に入れ、冷蔵もしくは小分け冷凍保存した。冷凍試料は使用前に水浴中で解凍させ用いた。

2. 対象農薬

GC-MS/MSによる測定は林純薬工業(株)製GC/MS用農薬混合標準溶液7グループ（PL2005農薬GC/MS MixⅠ，PL2005農薬GC/MS MixⅡ，PL2005農薬GC/MS MixⅢ，PL2005農薬GC/MS MixⅣ，PL2005農薬GC/MS MixⅤ，PL2005農薬GC/MS MixⅥおよびPL2005農薬GC/MS MixⅦ）のうち、混合標準溶液の定量下限値（S/N比 ≥ 10 ）が0.01 $\mu\text{g/mL}$ 以下であった332化合物を対象とした。感度不良およびピーク形状が悪いことが事前にあきらかになったため、妥当性評価を実施しなかった農薬はアザメチホス、

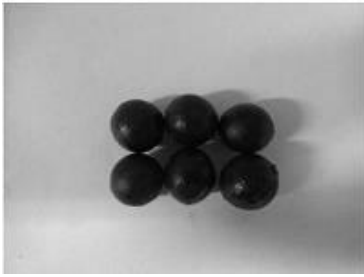


図1 キハダの未成熟果実



図2 キハダの成熟果実



図3 キハダの葉

アジンホスメチル, アセタミプリド, アレスリン I~IV, イソプロカルブ, オリザリン, カプタホール, キシリカルブ, クロリダゾン, クロロタロニル, クロルプロピレート, クロロベンジレート, スピロキサミン II, スピロジクロフェン, ゾキサミド, デスメディフアム, ナレド, ピラゾキシフェン, プロヒドロジャスモン II, ホルペット, メトプレン I および メトプレン II である。

LC-MS/MS による測定は富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用農薬混合標準溶液 4 グループ (PL-7-2, PL-14-2, PL-15-1 および PL-17-2) および富士フィルム和光純薬(株)製の残留農薬試験用農薬標準品 8 種 (イソチアニル, カルタップ, クロラントラニプロール, ジノテフラン, ピリフルキナゾン, フェノブカルブ, フルアジナム, フロニカミド) のうち, 混合標

準溶液の定量下限値 (S/N 比 \geq 10) が 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 以下であった 115 化合物を対象とした。なお, これらのうち 35 化合物は GC-MS/MS による測定化合物と重複している。感度不良およびピーク形状が悪いことが事前にあきらかになったため, 妥当性評価を実施しなかった農薬はイソチアニル, オキサベトリニル, カルタップ, クロロクスロン, シクロプロトリン, シメコナゾール, ジメトモルフ, トリフルミゾール代謝物およびバーバンである。

3. 試薬等

前処理に用いる有機溶媒および試薬は富士フィルム和光純薬(株)または関東化学(株)の残留農薬試験用試薬を用いた。LC-MS/MS の移動相溶媒は富士フィルム和光純薬(株)製の LC/MS 用超純水およびメタ

表 1 キハダの果実および葉の試料の概要

試料番号		採取日	天候	市町村	周辺環境	樹齢 (年生)	手入れ
果実	葉						
—	2020-01L	2020年6月21日	晴のち曇	山添村室津	山林 人家に隣接 畑地周辺	30	有
—	2020-02L					29	
—	2020-03L					30	
2020-04F	2020-04L	2020年7月10日	雨のち晴	曾爾村塩井	山林	22	無
—	2020-05L					23	
—	2020-06L	2020年7月18日	晴	桜井市池之内	田畑周辺	56	無
2020-07F	2020-07L					54	
—	2020-08L	2020年7月19日	晴	御所市今住	杉林	41	無
—	2020-09L					40	
2020-10F	2020-10L					42	
2020-11F	2020-11L	2020年7月23日	曇時々雨	桜井市池之内	田畑周辺	39	無
—	2020-12L					39	
2020-13F	2020-13L					55	
2020-14F	2020-14L	2020年8月1日	晴	下市町下市	竹林	56	無
2020-15F	2020-15L					62	
2020-16F	2020-16L					61	
2020-17F	2020-17L	2020年8月5日	晴	奈良市田原春日野町	ヒノキ林 水田周辺 茶畑周辺	61	無
—	2020-18L					28	
—	2020-19L					27	
—	2020-20L	2020年8月7日	晴	奈良市矢田原町	水田に隣接 茶畑に隣接	26	無
—	2020-21L					27	
—	2020-22L					26	
—	2020-23L	2020年8月20日	晴	曾爾村塩井	人家に隣接 小川に隣接	27	無
—	2020-24L					26	
2020-25F	2020-25L					27	
—	2020-26L	2020年8月20日	晴	曾爾村塩井	人家に隣接 小川に隣接	30	無
—	2020-27L					30	
—	2020-28L					18	
—	2020-29L	2020年8月20日	晴	曾爾村塩井	人家に隣接 小川に隣接	17	無
—	2020-30L					18	
—	2020-31L					18	
—	2020-32L					18	

ノールを使用した。リン酸緩衝液 (0.5 mol/L, pH7.0) はリン酸水素二カリウム (K₂HPO₄) 52.7 g およびリン酸二水素カリウム (KH₂PO₄) 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウムまたは 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 にした後、水を加えて 1 L とした。GC-MS/MS による測定に用いた農薬混合標準液 7 グループは 2 µg/mL の濃度になるようアセトンで希釈混合し、これを GC-MS/MS 用標準溶液として、添加試料の調製および検量線の作成に適宜希釈して用いた。LC-MS/MS による測定に用いた農薬混合標準液 4 グループおよび 8 種の農薬標準品は、2 µg/mL の濃度になるようメタノールで希釈混合し、これを LC-MS/MS 用標準溶液として、添加試料の調製および検量線の作成に適宜希釈して用いた。ODS (オクタデシルシリル化シリカゲル) ミニカラムは Agilent 社製 Mega Bond Elut C18 (充填量 1,000 mg ; カラムサイズ 6 mL) を、グラファイトカーボン/NH₂ (アミノプロピルシリル化シリカゲル) 積層ミニカラムは SUPELCO 社製 ENVI-Carb/NH₂ (充填量 500 mg/500 mg ; カラムサイズ 6 mL) を用いた。

4. 装置

GC-MS/MS は Agilent 社製ガスクロマトグラフ GC7890B および同社製質量分析計 7000D を使用した。LC-MS/MS は Waters 社製液体クロマトグラフ ACQUITY UPLC H-Class および同社製質量分析計 Xevo TQ-S micro を使用した。

ミキシングカッターはコンエアー・ジャパン合同会社製 DLC-NXJ2PS を、高速ホモジナイザーは KINEMATICA 製 Polytron PT 10-35 GT を、ロータリーエバポレーターはヤマト科学 (株) 製 RE801 を使用した。

5. GC-MS/MS 測定条件

1) GC 条件

カラム : Agilent 社製 VF-5ms (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 µm), カラム温度 : 70°C (2 min) → 25°C/min → 150°C → 3°C/min → 200°C (0 min) → 8°C/min → 310°C (5 min), 注入口温度 : 250°C, トランスファーライン温度 : 315°C, 注入量 : 2 µL (スプリットレス), キャリアガス : He

2) MS 条件

MS イオン源温度 : 280°C, 四重極温度 : 150°C, イオン化法 : EI, イオン化電圧 : 70 eV, 各農薬の測定イオン (m/z) : 表 2 に示した。

6. LC-MS/MS 測定条件

1) LC 条件

カラム : Waters 社製 ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 1.7 µm), カラム温度 : 50°C, 注入量 : 2 µL, 移動相 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (A 液) および 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (B 液), グラジエント条件 : 0 min (A : B=95 : 5) → 1 min (A : B=95 : 5) → 15 min (A : B=5 : 95) → 20 min (A : B=5 : 95) → 20.1 min (A : B=95 : 5) → 25 min (A : B=95 : 5)

2) MS 条件

イオン化法 : ESI(+) および ESI(-), キャピラリー電圧 : 3 kV, ソース温度 : 150°C, コーンガス流量 : 50 L/h(N₂), 脱溶媒温度 : 400°C, 脱溶媒ガス流量 : 800 L/h(N₂), 各農薬の測定イオン (m/z) : 表 3 に示した。

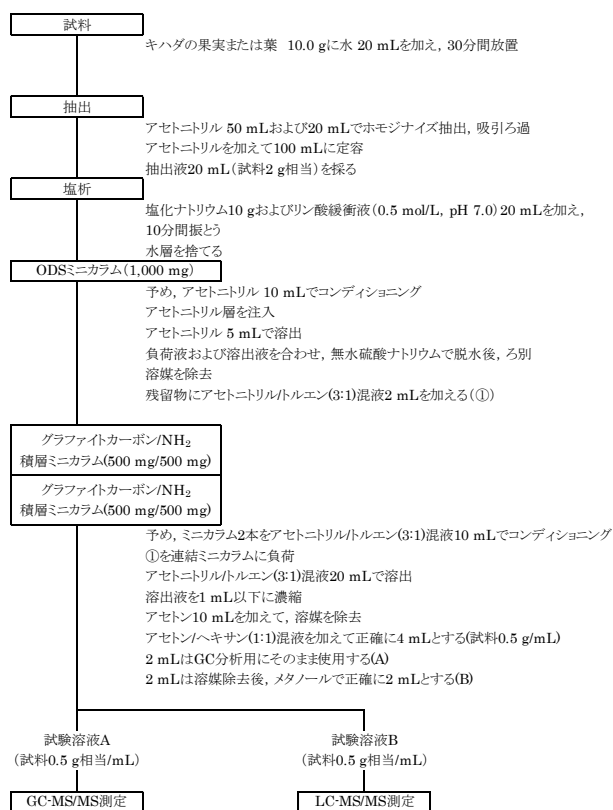


図 4 試験溶液調製方法の概要

7. 試験溶液の調製法

試験溶液の調製は既報⁶⁾の精製工程に改良を加えて行った。試料溶液の調製方法の概要を図 4 に示した。

1) 抽出

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズした後、ろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ紙上

の残留物を採り、アセトニトリル 20 mL を加え、上記と同様にホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて 100 mL に定容し、抽出液とした。

抽出液 20 mL (試料 2 g 相当) を分液ロートに採り、塩化ナトリウム 10 g およびリン酸緩衝液 (0.5 mol/L, pH 7.0) 20 mL を加えて 10 分間振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。

2) 精製

あらかじめアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした ODS ミニカラムに 1) で得られたアセトニトリル層を注入し、さらに、アセトニトリル 5 mL を注入して、全溶出液を採り、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水、ろ別した後、ろ液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル/トルエン (3:1) 混液 2 mL を加えて溶かした。グラファイトカーボン/NH₂ 積層ミニカラムに、アセトニトリル/トルエン (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングしたミ

ニカラムを上下に 2 本連結させたものの上記で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/トルエン (3:1) 混液 20 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮した。これにアセトン 10 mL を加えて 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトン/n-ヘキサン (1:1) 混液に溶かして正確に 4 mL としたものを 2 mL ずつに分けた後、2 mL はそのまま GC-MS/MS の試験溶液 (試料 0.5 g 相当/mL) とした。残りの 2 mL は窒素気流下で乾固した後、メタノールで正確に 2 mL としたものを 0.2 μm メンブレンフィルターを用いてろ過し、LC-MS/MS の試験溶液 (試料 0.5 g 相当/mL) とした。

8. 妥当性評価

既報⁶⁾でキハダの果実および葉を対象とした残留農薬試験法の妥当性評価を実施した。今回、葉は前回と同様であるが、果実は今後の食材利用を考慮しつつ、また、夾雑物の影響がより懸念される成熟果実を用い

表 2 GC-MS/MS 測定条件および対象化合物の妥当性評価結果

化合物	保持時間 (分)	フリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果		化合物	保持時間 (分)	フリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果	
				添加濃度(μg/g)						添加濃度(μg/g)	
				0.01 and 0.05						0.01 and 0.05	
				キハダの黒色果実	キハダの葉					キハダの黒色果実	キハダの葉
2,6-ジクロロベンザミド	12.31	173	109	A	A	インダノファン	29.34	159	103	D	A
BHC (α)	13.06	217	181	A	A	インドキサカルブ	34.49	203	134	A	A
BHC (β)	14.25	217	181	A	A	ウニコナゾール p	24.81	234	165	A	A
BHC (γ)	14.54	217	181	A	A	エスプロカルブ	19.40	222	91	A	A
BHC (δ)	15.98	217	181	A	B	エタルフルラリン	11.77	276	202	A	A
DCIP	4.66	121	45	C	D	エチオン	26.31	231	129	A	A
EPN	28.95	169	77	A	A	エチクロゼート	22.43	238	165	A	B
EPTC	7.26	128	43	D	D	エディフェンホス	27.24	310	109	D	A
MCPB	16.70	142	77	A	A	エトキサゾール	29.16	300	270	A	A
MCPBエチル	16.69	115	87	A	A	エトキサゾール代謝物	29.46	246	84	D	D
TCMTB	24.28	180	136	A	A	エトフェンブロックス	33.01	163	107	A	A
XMC	10.20	122	107	A	A	エトフメセート	19.18	207	161	A	A
アクリナトリン	30.58	289	93	A	A	エトプロホス	11.57	158	97	A	A
アザコナゾール	25.23	217	173	A	A	エトベンザニド	32.06	179	149	D	D
アジンホスエチル	30.81	160	77	A	A	エトリジアゾール	8.47	211	183	A	C
アセトクロール	17.27	223	132	A	A	エトリムホス	15.84	292	181	A	A
アゾキシストロビン	34.92	344	329	A	A	エボキシコナゾール	28.35	192	138	A	A
アトラジン	14.17	215	58	A	A	エンドスルファン (α)	23.72	205	170	A	A
アニロホス	29.38	226	157	A	A	エンドスルファン (β)	26.05	205	170	A	A
アミトラズ	30.33	293	162	D	D	エンドスルファンサルフェート	27.32	272	237	B	B
アメリン	18.34	227	185	A	A	オキサジアゾン	24.88	175	112	A	A
アラクロール	17.72	188	160	A	A	オキサジキシル	26.28	163	132	A	A
アリドクロール	6.57	132	56	A	B	オキサベトリニル	16.36	73	45	A	A
イサゾホス	15.62	257	162	A	A	オキシフルオルフェン	25.15	300	223	A	A
イソカルボホス	20.54	289	136	A	A	オキシボコナゾール	31.74	294	197	A	A
イソキサジフェンエチル	27.11	294	204	A	A	オキシボコナゾール代謝物I (ホルミル体)	17.45	114	60	A	A
イソキサチオン	25.55	177	130	A	A	オメトエート	10.76	156	110	C	B
イソフェンホス	22.16	213	121	A	A	オルトフェニルフェノール	9.58	170	169	A	A
イソフェンホスオキソン	20.44	229	201	A	A	カズサホス	12.62	159	97	A	A
イソプロチオラン	24.59	290	118	A	A	カフエンストロール	32.07	188	82	A	A
イブロジオン	28.75	314	245	A	D	カルフェントラゾンエチル	27.12	340	312	A	A
イブロジオン代謝物	29.69	329	142	A	D	カルベタミド	20.82	119	91	D	D
イプロベンホス	16.25	204	91	A	A	カルボキシ	25.16	235	143	D	D
イマザメタベンズメチルエステル	25.60	245	144	D	A	カルボフェノチオン	27.15	342	157	A	A
イミベンコナゾール	35.80	253	82	B	D	カルボフラン	13.89	164	103	D	A
イミベンコナゾール脱ベンジル体	25.23	235	166	A	A	キナルホス	22.55	146	118	A	A

表 2 (続き)

化合物	保持時間 (分)	フリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果		化合物	保持時間 (分)	フリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果	
				添加濃度(μg/g)						添加濃度(μg/g)	
				0.01 and 0.05						0.01 and 0.05	
		キハダの 黒色果実	キハダの 葉			キハダの 黒色果実	キハダの 葉				
キノキシフェン	27.32	307	237	B	D	ジメチルピルヒンホス (E)	19.27	295	109	A	A
キノクラミン	19.59	207	172	B	A	ジメチルピルヒンホス (Z)	19.98	295	109	A	A
キノメチオネート	23.26	206	148	D	D	ジメテナミド	17.04	230	154	A	A
キャプタン	22.58	149	70	A	D	ジメエート	13.62	125	47	A	A
キントゼン	14.26	249	214	A	A	ジメモルフ (E)	35.45	301	165	A	A
クミジン	9.37	171	142	A	A	ジメモルフ (Z)	35.08	301	165	A	A
クソキシムメチル	25.23	206	116	A	A	シメトリン	18.12	213	170	A	A
クロゾリネート	22.18	259	188	A	A	ジメピペレート	22.68	145	112	A	A
クロフェンテジン	5.66	137	102	A	A	シラフルオフェン	33.18	179	151	B	A
クロマゾン	14.26	125	89	A	A	シンメチリン	18.23	216	105	D	A
クロメキシニル	28.68	313	266	A	A	スウエップ	14.21	187	124	A	A
クロメプロップ	29.55	288	169	D	D	スピロキサミン	17.96	100	58	A	A
クロルエトキシホス	11.16	153	97	A	B	スルプロホス	26.84	322	156	A	B
クロルタールジメチル	20.06	301	223	A	A	スルホテップ	12.31	322	146	A	A
クロルチオホス	26.30	325	269	A	A	ゾキサミド	22.83	242	214	A	B
クロルニトロフェン	27.11	317	287	A	A	ターバシル	15.70	161	88	A	A
クロルピリホス	19.83	314	258	A	A	ダイアジノン	15.04	304	179	A	A
クロルピリホスメチル	17.33	286	93	A	A	ダイアレート	12.78	234	150	A	A
クロルフェナビル	25.46	247	227	A	A	チアベンダゾール	22.63	201	174	D	D
クロルフェンゾン	24.36	302	175	A	A	チアトキサム	21.47	247	212	A	A
クロルフェンピルヒンホス (a) (E)	21.74	267	159	A	A	チオシクラム	9.41	135	71	C	D
クロルフェンピルヒンホス (b) (Z)	22.29	267	159	A	A	チオベンカルブ	19.91	257	100	A	A
クロルプロファム	14.24	223	171	A	A	チオモン	13.34	88	60	A	C
クロルプロファム	12.08	213	127	A	A	チフルザミド	24.93	194	166	D	A
クロルベンシド	23.22	268	125	A	A	テクナゼン	10.80	261	203	A	B
クロルメホス	8.29	234	121	A	C	テトラクロルピルヒンホス	23.56	331	109	D	A
クロロネブ	9.29	208	193	A	B	テトラコナゾール	20.58	336	218	A	A
シアナジン	20.31	225	189	A	A	テトラジホリン	29.72	354	159	A	A
シアノフェンホス	27.24	303	141	A	A	テトラメトリン	29.06	164	77	D	A
シアノホス	14.77	243	109	A	A	テニルクロール	27.77	288	141	A	A
ジアリホス	30.89	208	89	A	A	テブコナゾール	27.92	250	125	A	A
ジエトフェンカルブ	20.16	267	225	A	A	テブピリミホス	16.15	261	137	A	A
ジオキサチオン	14.48	270	197	A	A	テブフェンピラド	29.35	276	171	A	A
ジオキサベンゾホス	12.38	216	137	A	A	テフルトリン	15.74	177	127	A	A
ジクロシメット	23.34	277	221	A	A	デモン-S-メチル	11.33	142	79	A	C
ジクロトホス	12.17	127	109	A	D	デルタメトリン	34.69	255	174	A	A
ジクロフェンチオン	17.02	279	223	A	A	テルブカルブ	17.17	220	205	A	A
ジクロプロラゾール	25.09	270	159	A	A	テルプトリン	19.16	241	185	A	A
ジクロフルアニド	19.32	226	123	A	A	テルブホス	14.67	231	129	A	A
ジクロフルアニド代謝物	12.13	200	45	A	A	トリアジメノール	23.15	168	70	D	A
ジクロベニル	7.21	171	100	A	C	トリアジメホリン	20.45	208	181	A	A
ジクロホップメチル	28.01	253	162	A	A	トリアゾホス	26.88	257	162	A	A
ジクロラン	13.66	206	176	A	A	トリアレート	15.87	268	184	A	A
ジクロルボス	6.16	185	93	B	C	トリクラミド	23.57	148	121	A	A
ジスルホトン	15.51	186	97	A	C	トリシクラゾール	24.56	189	162	A	B
ジスルホトンスルホリン	23.72	213	97	A	A	トリブホス	24.90	202	113	A	A
ジタリムホス	23.95	243	130	D	D	トリフルラリン	12.11	306	264	A	A
ジチオビル	18.43	354	306	A	A	トリプロキシストロピン	27.33	186	145	D	A
ジニコナゾール	26.13	268	232	A	A	トリルフルアニド	22.14	238	137	A	A
シニドニエチル	35.92	330	302	C	D	トリルフルアニド代謝物	14.51	214	45	A	A
シハロトリン	30.30	197	161	A	A	トルクロホスメチル	17.70	265	250	A	A
シハロホップブチル	30.19	256	120	A	A	トルフェンピラド	35.23	383	171	D	A
ジフェナミド	21.10	167	165	A	A	ナフタレンアセタミド	18.88	185	142	A	A
ジフェニルアミン	11.50	168	167	A	B	ナプロバミド	24.17	271	72	A	A
ジフェノコナゾール	34.50	323	265	A	A	ニトラリン	28.27	316	274	A	A
シフルトリン	32.31	163	127	A	A	ニトロタールイソプロピル	20.83	236	194	A	A
シフルフェナミド	25.53	223	203	A	A	ニトロフェン	25.70	283	253	A	A
ジフルフェニカン	28.07	266	218	B	D	ネライストキシシン	6.67	149	71	D	D
シプロコナゾール	25.57	222	125	A	A	ノルフルラジン	27.29	303	145	D	A
シプロジニル	21.78	225	224	D	D	バクプロトラゾール	23.54	236	125	A	A
シバルメトリン	32.60	163	127	A	A	バラチオン	20.29	291	109	A	A
シマジン	13.98	201	173	A	A	バラチオンメチル	17.70	263	109	A	A
シメコナゾール	17.70	195	75	A	A	ハルフェンブロックス	32.66	265	117	A	A
ジメタメトリン	22.25	212	94	A	A	ピオレスメトリン	28.29	171	128	D	D
ジメチピン	14.27	124	76	A	A	ピコリナフェン	29.03	376	238	A	A

表 2 (続き)

化合物	保持時間 (分)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果		化合物	保持時間 (分)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果	
				添加濃度(μg/g)						添加濃度(μg/g)	
				0.01 and 0.05	0.01 and 0.05					0.01 and 0.05	0.01 and 0.05
		キハダの黒色果実	キハダの葉			キハダの黒色果実	キハダの葉				
ピテルタノール	31.37	170	115	A	A	フルトリアホール	24.07	123	95	A	D
ピフェナゼート	29.14	300	258	B	C	フルバリネート	33.86	250	55	A	A
ピフェニル	7.70	154	153	B	D	フルフェンビルエチル	26.08	408	345	A	A
ピフェノックス	29.45	341	310	A	A	フルミオキサジン	33.78	287	259	A	D
ピフェントリン	28.92	181	165	D	A	フルミクロラックベンチル	34.87	423	318	A	A
ピペロニルプトキシド	28.19	176	103	A	A	フルリドン	33.36	329	328	A	A
ピペロホス	29.00	320	122	A	A	ブレチラクロール	24.53	262	202	A	A
ピラクロストロピン	33.92	164	132	A	A	プロシミドン	22.71	283	96	A	A
ピラクロホス	31.02	360	97	A	A	プロチオホス	24.43	267	239	A	A
ピラゾホス	30.61	221	193	B	D	プロバクロール	11.07	196	120	A	A
ピラフルフェンエチル	27.58	412	349	A	A	プロバジン	14.33	214	172	A	A
ピリダフェンチオン	28.68	340	199	A	A	プロバニル	17.28	161	99	A	A
ピリダベン	31.66	147	117	A	A	プロバホス	23.49	304	220	A	B
ピリフェノックス (E)	23.47	262	91	A	B	プロバルギット	28.03	173	135	A	A
ピリフェノックス (Z)	22.21	262	91	A	B	プロビコナゾール	27.49	259	69	A	A
ピリプチカルブ	28.51	165	108	A	A	プロビザミド	14.93	173	145	A	A
ピリプロキシフェン	30.13	136	96	A	A	プロヒドロジヤモン I	15.59	153	83	A	B
ピリミジフェン	33.51	184	169	D	D	プロフェノホス	24.64	339	269	A	A
ピリミノバックメチル (E)	27.44	302	256	A	A	プロボキスル	11.05	110	64	A	A
ピリミノバックメチル (Z)	26.04	302	256	A	A	プロマシル	19.32	205	188	A	A
ピリミホスメチル	18.91	290	125	A	A	プロムコナゾール	28.81	293	173	A	A
ピリメタニル	15.32	199	198	B	B	プロメリン	18.51	241	184	A	A
ピロキロン	15.05	173	130	A	A	プロモブチド	17.26	296	120	A	A
ピンクロゾリン	17.58	285	212	A	A	プロモプロピレート	28.97	341	183	A	A
フィモキサドン	35.17	329	193	A	A	プロモホス	20.98	331	316	B	A
フィプロニル	22.07	367	213	D	A	プロモホスエチル	23.19	359	303	A	A
フェナミホス	24.25	303	195	A	B	ヘキサコナゾール	24.36	214	172	A	A
フェナリモル	30.64	219	107	A	A	ヘキサジン	27.71	171	71	A	A
フェニトロチオン	19.04	277	260	A	A	ベナラキシル	27.04	266	148	A	A
フェノキサニル	25.67	293	155	A	A	ベノキサコール	16.46	259	120	A	A
フェノキサプロップエチル	31.12	361	288	A	A	ベルタン	25.75	223	167	A	A
フェノキシカルブ	29.10	255	186	D	A	ベルメリン	31.63	163	127	A	A
フェノチオール	16.01	155	125	A	B	ベンコナゾール	22.02	248	157	A	A
フェノチオカルブ	23.80	160	72	A	A	ベンディメタリン	21.68	252	162	A	A
フェノトリン	29.76	183	153	D	D	ペントキサゾン	29.86	285	70	A	A
フェリムゾン	23.27	254	137	A	A	ベンフルラリン	12.23	292	264	A	A
フェンアミドン	29.28	238	237	A	A	ベンプレセート	17.01	256	163	A	A
フェンクロルホス	18.21	285	270	A	A	ホサロン	29.86	367	182	A	A
フェンスルホチオン	26.10	293	97	A	A	ホスチアゼート	21.28	195	103	A	A
フェンチオン	20.12	278	109	A	A	ホスファミン I	15.07	264	127	A	A
フェントエート	22.52	274	121	A	A	ホスファミン II	16.94	264	127	A	A
フェンバレレート	34.01	167	125	A	A	ホスメット	28.88	160	77	D	A
フェンプロナゾール	32.18	198	129	A	A	ホノホス	14.88	246	109	A	A
フェンプロバトリン	29.21	265	210	A	A	ホルモチオン	16.64	170	93	B	B
フェンプロピモルフ	20.27	128	70	B	D	ホレート	12.81	260	75	A	B
フェンメディファム	11.95	167	135	A	A	マラチオン	19.58	173	99	A	A
フサライド	20.74	243	215	D	D	マイクロブタニル	25.01	179	125	A	A
ブタクロール	23.69	237	160	A	A	メカルバム	22.46	329	131	A	A
ブタフェナシル	31.88	331	180	A	A	メタクリホス	9.07	208	180	A	A
ブタミホス	23.99	286	202	A	A	メタラキシル	18.14	234	146	A	A
ブチレート	8.09	156	57	A	C	メチダチオン	23.20	145	85	A	A
ブピリメート	25.15	273	193	A	A	メキシクロール	29.15	227	169	A	A
ブプロフェジン	25.08	172	57	A	A	メミノストロピン (E)	24.50	196	77	A	A
フラムプロップメチル	24.95	276	105	A	A	メミノストロピン (Z)	25.25	196	77	A	A
フラメビル	29.57	291	157	A	A	メトラクロール	19.68	238	162	A	A
フラメビル代謝物	30.27	296	278	B	D	メトリブジン	17.45	198	82	A	A
フリラゾール	13.84	262	220	B	B	メビンホス	8.05	192	127	B	B
フルアクリピリム	26.69	320	183	A	A	メフェナセート	30.22	192	136	A	A
フルキンコナゾール	31.67	340	108	A	A	メフェンビルジエチル	28.44	253	189	A	A
フルジオキサニル	24.66	248	127	D	A	メプロニル	26.84	269	119	A	A
フルシトリネート	32.80	199	107	A	A	モノクロトホス	12.58	192	127	D	A
フルシラゾール	25.08	233	165	A	A	モリネート	9.94	187	126	A	B
フルシラゾール代謝物	12.16	235	95	A	A	レスメリン	28.29	171	143	D	D
フルチアセツメチル	36.25	403	56	A	A	レナシル	27.46	153	136	D	A
フルトラニル	24.40	281	173	A	A	レプトホス	29.87	377	362	C	D

た. 一部測定機器の更新に際して, 妥当性の再確認と併せて, 夾雑成分をより効果的に除去するため既報の方法に改良を加え, ガイドライン⁷⁾に基づく妥当性評価を再度実施した. 今回の調査では既報と同様に添加

濃度は一律基準 (0.01 µg/g) および 0.05 µg/g を採用し, キハダの成熟果実および葉の農薬の残留していないブランク試料に対し, 各農薬標準品を添加した. 添加後, 30 分経過してから抽出操作を開始した. 添加回

表 3 LC-MS/MS 測定条件および対象化合物の妥当性評価結果

化合物	イオン化モード	保持時間(分)	プリカーサーイオン(m/z)	妥当性評価結果			化合物	イオン化モード	保持時間(分)	プリカーサーイオン(m/z)	妥当性評価結果		
				プロダクトイオン(m/z)	添加濃度(µg/g)						プロダクトイオン(m/z)	添加濃度(µg/g)	
					0.01 and 0.05	キハダの黒色果実						キハダの葉	0.01 and 0.05
3-ヒドロキシカルボフラン	ESI(+)	6.36	238	181	A	A	テブチウロン	ESI(+)	8.90	229	172	A	A
アザメチホス	ESI(+)	8.44	325	139	A	B	テブフェノジド	ESI(+)	12.46	353	297	A	A
アシベンゾラルSメチル	ESI(+)	10.62	211	136	D	A	テフルベンズロン	ESI(+)	14.04	381	158	D	D
アジンホスメチル	ESI(+)	10.46	318	160	A	A	トリチコナゾール	ESI(+)	12.04	318	125	D	A
アゾキシストロビン	ESI(+)	11.10	404	372	A	A	トリフルミゾール	ESI(+)	13.66	346	278	D	B
アニコホス	ESI(+)	12.75	368	199	A	A	トリフルムロン	ESI(+)	13.02	359	156	A	A
アバメクチンB1a	ESI(+)	15.41	891	305	A	B	トリフロキシストロビン	ESI(+)	13.56	409	186	D	A
アミトラズ	ESI(+)	14.97	294	163	D	D	ナプロアニリド	ESI(+)	12.30	292	171	A	A
アトリン	ESI(+)	10.93	228	186	A	A	ノバルロン	ESI(+)	13.73	493	158	A	A
アルジカルブ	ESI(+)	7.42	208	116	B	D	ピメロジン	ESI(+)	4.76	218	105	D	D
アルドキシカルブ	ESI(+)	3.85	240	86	A	A	ピラクロストロビン	ESI(+)	12.99	388	194	A	A
イソキサフルトール	ESI(+)	10.18	360	251	A	A	ピラゾホス	ESI(+)	12.99	374	222	D	C
イプロバリカルブ	ESI(+)	11.82	321	203	A	A	ピラゾリネート	ESI(+)	13.19	439	173	D	B
イマザリル	ESI(+)	12.70	297	159	A	D	ピリフタリド	ESI(+)	10.68	319	179	A	A
イミダクロプリド	ESI(+)	5.64	256	209	A	A	ピリフルキナゾン	ESI(+)	12.09	465	330	D	D
インダノファン	ESI(+)	12.05	341	187	D	A	ピリミカープ	ESI(+)	9.79	239	182	A	A
インドキサカルブ	ESI(+)	13.54	528	203	D	A	ピリメタニル	ESI(+)	10.87	200	107	B	A
エトキサゾール	ESI(+)	14.60	360	141	A	A	フェノキサプロップエチル	ESI(+)	13.76	362	288	D	A
エポキシコナゾール	ESI(+)	12.06	330	121	D	A	フェノキシカルブ	ESI(+)	12.43	302	116	D	A
オキサジクロメホン	ESI(+)	13.83	376	190	B	A	フェノブカルブ	ESI(+)	10.88	208	152	D	D
オキサミル	ESI(+)	4.22	237	90	B	A	フェリムゾン(E)	ESI(+)	11.10	255	132	A	A
オキシカルボキシ	ESI(+)	6.72	268	175	B	A	フェリムゾン(Z)	ESI(+)	11.22	255	132	B	D
オリザリン	ESI(-)	12.12	345	281	D	D	フェンアミジン	ESI(+)	11.27	312	236	A	A
カルバリル	ESI(+)	9.07	202	145	B	A	フェンプロキシメート(E)	ESI(+)	14.75	422	366	A	A
カルフェントラゾンエチル	ESI(+)	12.54	412	366	D	A	フェンプロキシメート(Z)	ESI(+)	14.17	422	366	A	A
カルプロバミド	ESI(+)	12.67	334	139	D	A	フェンプロビモルフ	ESI(+)	15.58	304	147	A	D
カルベタミド	ESI(+)	7.97	237	192	B	A	ブタフェナシル	ESI(+)	12.00	492	331	A	A
カルボスルファン	ESI(+)	15.55	381	118	D	D	ブラチオカルブ	ESI(+)	13.89	383	252	A	A
カルボフラン	ESI(+)	8.75	222	165	B	A	ブラムプロップメチル	ESI(+)	11.78	336	105	A	A
キサロホップエチル	ESI(+)	13.72	373	299	D	A	ブラメトピル	ESI(+)	10.09	334	290	A	A
クミルロン	ESI(+)	11.70	303	185	A	A	フルアジナム	ESI(+)	13.68	463	416	D	A
クロキンゼットメキシル	ESI(+)	14.12	336	238	A	A	フルフェナゼット	ESI(+)	12.06	364	194	A	A
クロジナホッププロバルギル	ESI(+)	12.55	350	266	A	A	フルフェノクスロン	ESI(+)	14.65	489	158	A	A
クロチアニジン	ESI(+)	5.52	250	169	B	A	フルリドン	ESI(+)	10.71	330	310	A	A
クロフェンテジン	ESI(+)	13.00	303	138	D	A	フロニカミド	ESI(+)	4.28	230	203	A	A
クロマフェノジド	ESI(+)	11.93	395	175	A	A	プロバキサホップ	ESI(+)	13.96	444	299	D	B
クラントラニリプロール	ESI(+)	10.65	482	451	D	C	プロマシル	ESI(+)	8.42	261	205	B	A
クロリダゾン	ESI(+)	6.10	222	92	A	A	プロメトリン	ESI(+)	11.89	242	200	A	A
クロルプファム	ESI(+)	10.92	224	172	D	D	ヘキサフルムロン	ESI(-)	13.61	459	276	D	D
クロルフルアズロン	ESI(+)	14.98	540	383	D	D	ヘキシチアゾックス	ESI(+)	14.32	353	228	D	A
シアゾファミド	ESI(+)	12.12	325	261	D	A	ベナラキシル	ESI(+)	12.81	326	148	A	A
ジウロン	ESI(+)	9.96	233	72	B	A	ベンジオカルブ	ESI(+)	8.67	224	167	A	A
シクロエート	ESI(+)	13.25	216	154	D	D	ベンシクロン	ESI(+)	13.23	329	125	D	A
ジノテフラン	ESI(+)	3.29	203	129	B	B	ベンゾフェナップ	ESI(+)	13.68	431	119	D	A
シフルフェナミド	ESI(+)	13.18	413	295	D	A	ベントキサゾン	ESI(+)	13.79	354	286	D	A
ジフルベンズロン	ESI(+)	12.22	311	158	D	A	ベンブラカルブ	ESI(+)	13.79	411	195	D	D
シプロジニル	ESI(+)	12.56	226	108	D	D	ホキシム	ESI(+)	12.95	299	153	A	A
ジメチリモール	ESI(+)	9.70	210	140	D	D	ボスカリド	ESI(+)	11.33	343	307	D	A
シモキサニル	ESI(+)	6.56	199	128	A	A	メソル	ESI(+)	4.34	163	106	A	A
シラフルオフェン	ESI(+)	16.42	426	287	D	B	メタベンズチアズロン	ESI(+)	9.71	222	165	B	A
スピノシンA	ESI(+)	15.42	733	142	D	B	メチオカルブ	ESI(+)	11.04	226	169	A	A
スピノシンD	ESI(+)	15.72	747	142	D	B	メキシフェノジド	ESI(+)	11.60	369	313	D	A
ダイムロン	ESI(+)	11.50	269	151	A	A	メバニピリム	ESI(+)	11.73	224	106	D	D
チアクロプリド	ESI(+)	6.91	253	126	A	A	メフェンビルジエチル	ESI(+)	12.97	373	327	A	A
チアベンダゾール	ESI(+)	7.47	202	175	D	D	モノリニロン	ESI(+)	9.09	215	126	A	A
チアメキサム	ESI(+)	4.63	292	211	A	A	リニロン	ESI(+)	10.78	249	182	A	A
チオジカルブ	ESI(+)	9.56	355	108	A	A	ルフエヌロン	ESI(-)	14.23	509	326	A	D
テトラクロルピホス	ESI(+)	12.50	365	204	A	A							

収試験は、成熟果実は分析者 1 名が併行数 2 で 5 日間、葉は分析者 2 名が併行数 2 で 3 日間の枝分かかれ試験で実施した。得られた結果から真度、併行精度および室内精度を算出した。各化合物の評価結果の分類は既報と同様に、各試料・化合物ごとに得られた真度、精度に応じて A（真度 70～120%、精度および選択性とも目標値を満たす）、B（精度、選択性とも目標値を満たすが真度が A の範囲以外で 50～150%）、C（精度、選択性とも目標値を満たすが、真度が 30%～50%もしくは 150%～）、D（真度 30%未満もしくは、精度、選択性のいずれかの目標値を満たさない）の 4 つのグループに分類した。妥当性評価の結果、真度、併行精度、室内精度および選択性のいずれもがガイドラインの目標値を達成し、グループ A に分類された化合物を各試料の実態調査の対象として選定した。今回調査した果実は全て昨年同様、未成熟の緑色の果実であるが、実態調査は夾雑物質がより多いと考えられる成熟果実でグループ A に分類された化合物を対象とした。

検量線は GC-MS/MS、LC-MS/MS ともに 2.5, 5, 15, 25 および 37.5 ng/mL になるように、標準溶液をブランク試料から操作して得られた試験溶液で希釈し、マトリックス添加標準溶液を調製し、各装置に注入して、ピーク面積法で作成した。マトリックス検量線から絶対検量線法により濃度を求めた。

結 果

1. 妥当性評価

妥当性評価の結果、キハダの成熟果実は GC-MS/MS では 332 化合物中 274 化合物、LC-MS/MS では 115 化合物中 55 化合物がガイドラインの目標値に適合し、GC-MS/MS、LC-MS/MS の両方またはいずれかで目標値に適合した 315 化合物を実態調査の対象として選定した（表 2, 3）。また、キハダの葉は GC-MS/MS では 332 化合物中 265 化合物、LC-MS/MS では 115 化合物中 83 化合物がガイドラインの目標値に適合し、GC-MS/MS、LC-MS/MS の両方またはいずれかでガイドラインの目標値に適合した 322 化合物を実態調査の対象として選定した（表 2, 3）。

2. 実態調査

選定した化合物の残留農薬実態調査を行った結果、シラフルオフェンが同一地点で採取された葉の試料 2020-25L, 2020-26L, 2020-27L の 3 検体からそれぞれ 0.01 µg/g, 0.01 µg/g, 0.03 µg/g 検出された。一方、果実の試料からは選定した化合物は検出されなかった。

考 察

今回、既報^⑥での検討事項 2 点について取り組んだ。キハダの果実および葉の残留農薬は隣接地で生産される農産物の防除による影響が考えられる。そこで、キハダの隣接地で生産がある水稻および茶について奈良県農業振興事務所等が指導している害虫防除暦より、混合標準溶液に含まれていないが LC-MS/MS で測定可能な農薬標準品 8 種イソシアニル、カルタップ、クロラントラニリプロール、ジノテフラン、ピリフルキナゾン、フェノブカルブ、フルアジナム、フロニカミドを選定し、妥当性評価の対象化合物として追加した。妥当性評価の結果、キハダの成熟果実ではフロニカミド、葉ではフルアジナム、フロニカミドがガイドラインの目標値に適合したが、実態調査ではいずれの農薬も検出されなかった。今回、混合標準溶液に含まれない農薬の一部について対象範囲の拡充ができたため、より奈良県の実態に即した調査が可能となった。しかし、今回検討した方法では妥当性が適合せず追加した一部の化合物については実態調査を行う事ができなかったため、今後はさらなる前処理方法の改良や別の方法を検討することでより充実した検査体制を整えることが重要であると考えられる。

試験溶液の調製時、既報^⑥で用いた通知法の「穀類、豆類および種実類の方法」に準拠した方法で、成熟果実について同様に試験溶液を調製した結果、グラファイトカーボン/NH₂ 積層ミニカラム精製後の試験溶液に黄色い着色が見られ、夾雑物質の精製が不十分であると考えられた。そこで、齋藤^⑧らが緑茶中の残留農薬分析でより高い色素の除去効果を得るためカラムを連結して精製を行っていることを参考に、グラファイトカーボン/NH₂ 積層ミニカラムを 2 本連結させて精製をした結果、ミニカラム精製後の試験溶液の着色は軽減され、ほぼ無色となった。また、葉についても適用したところ、同様の効果が得られた。以上より、2020 年度の検査ではキハダの成熟果実および葉のいずれも試料を水で膨潤した後、アセトニトリル抽出および塩析による水層分離を行い、ODS ミニカラムおよびグラファイトカーボン/NH₂ 積層ミニカラム 2 本の連結カラムで精製し、試験溶液を調製する方法を採用した。既報^⑥では果実は 232 化合物、葉は 298 化合物が適合していたが、本法で妥当性評価を実施した結果、LC-MS/MS で一部適合化合物数は減少したものの、GC-MS/MS では適合化合物数を大幅に増加することができたことから、成熟果実は 315 化合物、葉は 322 化合物が適合し、それぞれ 83 化合物、24 化合物増加した。その結果、2020 年は昨年よりより多くの化合物を調査

対象とすることが可能となった。カラムを連結して使用する事によって、LC-MS/MSの一部の化合物ではカラム内に残存することによる回収不足が生じたと考えられたが、夾雑物質がより多く除去されたことで、連続測定による装置への負荷を軽減することが可能となり、また、選択性の改善等の効果が得られた。

今回、同一地点で採取したキハダの葉3検体から検出されたシラフルオフエンはピレスロイド系の殺虫剤で、キハダの葉および果実は農産物等の食品分類表でそれぞれその他の野菜、その他の果実として分類されており、その他の野菜の残留基準値は0.1 ppmである。一方、キハダの果実では一律基準である0.01 ppmが適用されるが、基準値の超過は確認されなかった。農薬を検出した葉は、特に斑点が多く一部褐色に枯れている部分もあったため、後日、採取地近隣の水田や茶畑で検出された農薬使用について調査した。2020年は水田でトビイロウンカが大発生し、7月31日に奈良県内で病害虫発生予察注意報が発令されていたこともあり、水田管理者がドローンによる広範囲の農薬散布を行っていたことを確認した。ドローンによる農薬散布は広範囲の散布には利便性が高い方法である一方、散布時の風速や風向によっては近隣の農作物へ飛散することでドリフトする恐れがある。シラフルオフエンは蒸気圧が低く、加水分解や光分解性の高い農薬ではないため、防除直後は環境中に残存する可能性が高いと考えられている⁹⁾。前年度の同一地点での調査ではシラフルオフエンの残留は確認できなかったことから、隣接地で生産される農産物の農薬散布の時期が影響するため、今後は隣接地で生産されている農産物の防除の時期を把握し、影響のない時期にキハダの伐採を行う必要があることを改めて認識することができた。また、今回の調査で使用したキハダの採取は昨年同様、生薬原料となる内皮の剥離が容易である梅雨時に行われたため、今後、食材利用のため通年で果実および葉の採取を行うことを考慮すると、春や秋のキハダの果実および葉の実態調査を行うことで、農薬残留状況の季節的变化の把握を行う必要があると考えられる。

本調査は昨年から継続して奈良県内のキハダの果実および葉の残留農薬の実態調査を行ったものであり、今回、前処理方法の改良を試みたところ、一部調査対象化合物を拡大して実施することができた。それでも、周辺で使用されている農薬成分のすべてを対象とした調査ではないため、奈良県内各地および近郊に生育するキハダの果実および葉の農薬残留状況のすべてを議論できるものではないが、本調査結果はキハダの果実および葉の食材利用にむけての今後の安全・安心確保

のための一助となるものとする。

謝 辞

本研究は奈良県研究分野統合本部事業の一環として実施し、検体採取への協力と材料の提供をいただいた農業生産法人ポニーの里ファーム、山添村オウバク生産組合、曾爾村地域建設課、株式会社前忠、株式会社三光丸の関係各位および福田浩三氏に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 立本行江, 西原正和, 林田平馬: 生薬学雑誌, 74, 98-105 (2020)
- 2) 西原正和, 大住優子, 田中尚: 薬学雑誌, 140, 113-116 (2020)
- 3) 首藤明子, 清水浩美: 奈良県産業振興総合センター研究報告, 46, 33-36 (2020)
- 4) 成瀬達哉, 酒井温子: 奈良県森林技術センター研究報告, 49, 51-55 (2020)
- 5) 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」, 食安発第1129002号, (平成17年11月29日) (平成18年10月3日一部改正, 食安発第1003001号)
- 6) 米田正樹, 樋上絢, 立本行江: 日本食品化学学会誌, 27, 1-9 (2020)
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」, 食安発第1115001号, (平成19年11月15日) (平成22年12月24日一部改正, 食安発1224第1号)
- 8) 齋藤静香, 根本了, 松田りえ子: 日本食品化学学会誌, 19, 104-110 (2012)
- 9) 食品安全委員会「農薬評価書 シラフルオフエン」(2008年1月)

第3章 調査研究・報告

第2節 報 告

毒物劇物迅速検査キット研修教材の作成 ～集合を要しない食品衛生監視員研修事例～

立本行江・安藤尚子・西山隆之・中田千恵子・仲井菜都希・
上床知佐奈・南浦茉奈・竹田依加・米田正樹

Creation of Training Materials for Rapid Inspection Kits for Poisonous and Deleterious Substances Example of Training for Food Sanitation Inspectors

Yukie TATSUMOTO・Naoko ANDO・Takayuki NISHIYAMA・Chieko NAKATA・
Natsuki NAKAI・Chisana UWATOKO・Mana MINAMIURA・Erika TAKEDA
and Masaki YONEDA

緒言

県民の生命及び健康保護のため、食品の安全確保は非常に重要な事項であり、この業務に携わる食品衛生監視員は食品衛生法等、法令に基づき食の安全、安心確保の面から監視指導業務に携わっている。本業務は専門的な知識や能力が不可欠なため、奈良県では食品衛生監視業務に必要な技術のスキルアップのための研修を行い知識の習得、向上を進めている。

健康危害につながる毒物劇物等原因の食中毒が疑われる場合、調査初動段階で毒物劇物の混入の有無を判定する「毒物劇物迅速検査キット」(以下、検査キットという)を用いる場合がある。食品衛生監視員が、この検査キットの使用意義を理解し、事象発生時に現場で簡便かつ迅速に使用できるよう、ヒ素、シアン化合物、アジ化ナトリウム、有機リン系農薬及びカーバメート系農薬の検査キットを当センターで事前検証を行い、使用手順等を動画撮影した教材を作成して研修を実施した。

研修時期の令和3年2月は、新型コロナウイルス感染症が拡大し、大阪府等が緊急事態宣言の中、各保健所は感染症への対応に逼迫状況であった。そのような中で、参加、理解しやすい動画配信研修は、新たな手法として食品衛生監視員や検査員への意識向上に繋がる内容となった。これら検査キットの事前検証と研修の取り組み内容を取りまとめたので報告する。

方法

1. 試薬等

1) ヒ素化合物

メルコクアント®ヒ素テスト(MERCK社製)(以下、ヒ素テスト)
ヒ素標準液(富士フィルム和光純薬(株)製)

1%塩酸(富士フィルム和光純薬(株)製)

2) シアン化合物

メルコクアント®シアン化物テスト(MERCK社製)
(以下、シアン化物テスト)

シアン化物イオン標準液(関東化学(株)製)
0.05 mol/L 硫酸, 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液
(富士フィルム和光純薬(株)製)

3) アジ化ナトリウム

アジ化ナトリウム簡易検出キット(関東化学(株)製)
アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株)製)
0.05 mol/L 硫酸, 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液
(富士フィルム和光純薬(株)製)

4) 有機リン系農薬及びカーバメート系農薬

Agri-Screen Ticket Pesticide Detection kit(Neogen社製)
マラチオン, メソミル(ジーエルサイエンス(株)製)

2. 試料

過去の毒物劇物中毒事例を参考に、液状試料はオレンジジュース、乳飲料コーヒー、ブラックコーヒー、栄養ドリンク、固形試料はカレー、ごはんを用いた。

3. 条件検討方法 試料溶液の調整

試料の夾雑物による影響を軽減し判定が可能になるよう希釈等による事前検証を行った。

1) ヒ素化合物

ヒ素濃度は着色(黄茶色)を目視確認できる0.1 mg/Lに設定した。標準指標はヒ素標準液を1%塩酸で希釈し0.1 mg/Lとした。

液状試料は各原液に1%塩酸で3段階に希釈(希釈なし100%, 希釈率50%, 25%)したものに、ヒ素標準液を0.1 mg/Lとなるよう添加した。固形試料のカ

レーは 0.5%, 1%, 2%, ごはんは 5%, 10%, 20% になるよう採取し、標準指標 60 mL で溶解のうえ 15 分放置後の溶解液を使用した。

2) シアン化合物

シアン化物濃度は着色（桃紫色）を目視確認できる 10 mg/L に設定した。標準指標はシアン化物標準液を蒸留水で希釈し 10 mg/L としたものを 0.05 mol/L 硫酸で pH 6~7 に調整した。

液状試料は各原液に蒸留水で 3 段階に希釈（希釈なし 100%, 希釈率 50%, 25%）したものに、シアン化物標準液を 10 mg/L となるよう添加し、pH 6~7 に調整した。固形試料のカレーは 0.5%, 1%, 2%, ごはんは 5%, 10%, 20% になるよう採取し、標準指標 20 mL で溶解のうえ 15 分放置後の溶解液を使用した。

3) アジ化ナトリウム

特許第 3341046 号¹⁾を参照し、アジ化ナトリウム濃度は発泡を目視確認できる 1 g/L に設定した。標準指標はアジ化ナトリウムを蒸留水で希釈し 1 g/L とした。

液状試料は各原液にアジ化ナトリウムを添加し 1 g/L とした。固形試料は 2 g (10%) を採取し標準指標 20 mL で溶解のうえ 15 分放置後の溶解液を使用した。

4) 有機リン系農薬及びカーバメート系農薬

設定濃度はキット取扱説明書より、各農薬の最低感度濃度とした。農薬中毒事故の多い有機リン系農薬マラチオンとカーバメート系農薬メソミルを選び、各 1,000 ppm をアセトン及び蒸留水で希釈し、濃度をマラチオンは 2 ppm, メソミルは 1 ppm とした。

4. 研修資料作成と実施方法

1) 研修資料等

各検査キットについて、①検査キットの内容②検査に必要なもの③サンプル前処理④測定方法⑤測定上の注意事項について、標準指標を用いて一連の測定を行い、受講者が検査を行う視点で動画撮影した(図 1)。

検査対象ごとに①中毒内容②検査キットの説明③検査動画④事前検証結果⑤測定上の注意事項⑥廃液取扱を取りまとめ、動画入りパワーポイント資料を作成した。さらに、説明を音声で入力し内容を視聴できるようにした。

研修資料は県の職場間の共有フォルダでデータ共有し、視聴期間(5 週間)を決めて自主学习とした。



図 1 測定方法動画

2) アンケート

受講者へ以下の項目についてアンケートを行い、報告を取りまとめた。

- ・説明音声、動画を使った資料での理解度
- ・研修時間について
- ・受講しやすさ
- ・食品監視員の知識向上、教育訓練として役立つか
- ・今後希望する研修内容
- ・その他感想、意見

結果

1. 事前検証

1) ヒ素化合物

検証結果を表 1 に示す。液体試料は全て原液で呈色が確認出来なかった。特に乳飲料コーヒーは試薬によるゲル化のため判定できず、コーヒーはブラックコーヒーのみ検証した。希釈による結果は、液体試料は 50%以上希釈することで反応発泡が明瞭になり(図 2)標準指標濃度 0.1 mg/L の 1/2~1/4 の濃度の呈色の目視確認が可能であった。

固形試料のカレーは脂溶性が高く香辛料を多く含む加工食品であるため、出口ら²⁾の報告を参考に希釈率を決定のうえ、ルーのみを採取し検体採取時なるべく夾雑物を減らした。また、検査試薬の過マンガン酸カリウムは夾雑物の影響で消色することから、必要に応じ着色が明瞭になるよう滴下量を増加した。希釈による結果は 2%までの試料採取量で標準指標濃度 0.1 mg/L の 1/2~1/10 の濃度の呈色を目視確認できた。ごはんは 20%までの試料採取量で標準指標濃度 0.1 mg/L の 1/2~1/4 の濃度の呈色を目視確認できた。

表 1 ヒ素テスト検証結果

	試料		1%HCL	結果
	* mL, mg	割合(%)	mL	mg/L
オレンジジュース	60	100	—	N.D.
	30	50	30	0.025
	15	25	45	0.05
コーヒー	60	100	—	0.005
	30	50	30	0.025
	15	25	45	0.025
栄養ドリンク	60	100	—	N.D.
	30	50	30	0.05
	15	25	45	0.05
カレー	300	0.5	** 60	0.05
	600	1	** 60	0.025
	1,200	2	** 60	0.01
ごはん	3,000	5	** 60	0.05
	6,000	10	** 60	0.025
	12,000	20	** 60	0.025

* 液体試料は mL, 固形試料は mg
** 標準指標 (ヒ素濃度 0.1 mg/L)

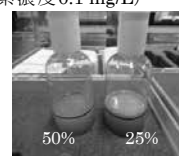


図 2 ヒ素テストの検証状況 (オレンジジュース)

2) シアン化合物

検証結果を表 2 に示す. 液体試料はオレンジジュース以外原液では試験紙に各原液色が着色し, 呈色が確認出来なかった. 特に乳飲料コーヒーはヒ素テストと同様にゲル化したため, コーヒーはブラックコーヒーのみ検証した. オレンジジュース, 栄養ドリンクは酸性, ブラックコーヒーはアルカリ性のため前処理の pH 調整に時間を要し, 液量増加に伴い濃度が希釈された.

希釈による結果は, 蒸留水で 50%以上に希釈することで標準指標濃度 10 mg/L の 1/3~1/10 の濃度の呈色を目視確認できた(図 3).

固体試料のカレーとごはんは, ヒ素化合物と同様の希釈倍率で検証した. 結果よりカレーは 2%まで, ごはんは 20%までの試料採取量で標準指標濃度 10 mg/L の 1/3~1/10 の濃度の呈色を目視確認できた.

注意点として前処理の pH 調整に時間を要することを動画撮影時に説明を加えた.

表 2 シアン化物テスト検証結果

	試料			蒸留水 mL	結果 mg/L
	* mL, mg	** * pH	割合(%)		
オレンジジュース	20	4	100	—	3
	10	4	50	10	3
	5	4	25	15	1~3
コーヒー	20	5	100	—	N.D.
	10	10	50	10	1~3
	5	12	25	15	10
栄養ドリンク	20	2	100	—	N.D.
	10	4	50	10	1
	5	4	25	15	3
カレー	100	6~7	0.5	** 20	3
	200	6~7	1	** 20	1
	400	6~7	2	** 20	1
ごはん	1,000	6~7	5	** 20	3
	2,000	6~7	10	** 20	1
	4,000	6~7	20	** 20	1

* 液体試料は mL, 固形試料は mg

** 標準指標 (シアン化物濃度 10 mg/L)

*** 液体試料で希釈したときの pH

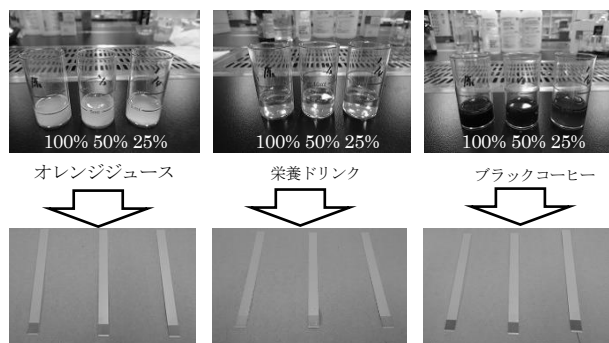


図 3 シアン化物テストの検証状況

3) アジ化ナトリウム

試料溶液をアルカリ性にする必要があるため, 酸性であるオレンジジュースと栄養ドリンクは pH 調整にアルカリ試薬を多量に使用した. そのため液量が増加

しアジ化ナトリウムの濃度が希釈された. また, カレーは夾雑物の影響で, ヨウ素試薬の着色が分解消色するため, 追加滴下した.

一部検体は希釈されているが, アジ化ナトリウム 1 g/L の濃度であれば, 液体試料は全て原液で発泡反応を確認できた. さらに, 固形試料も 1/10 希釈で発泡反応を確認できた (図 4).

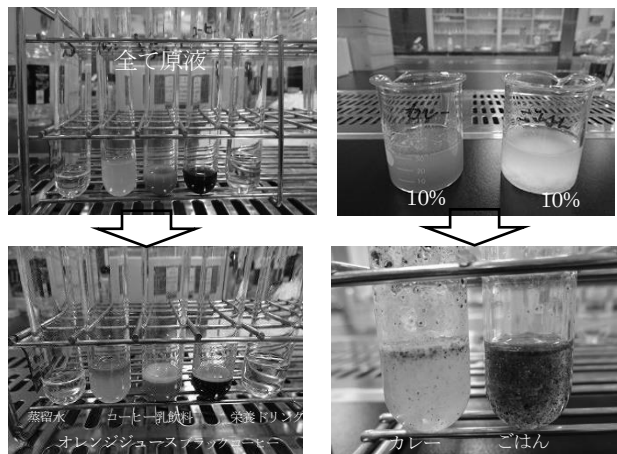


図 4 アジ化ナトリウム簡易検出キットの検証状況

4) 有機リン系農薬及びカーバメート系農薬

マラチオンとメソミル及び, 陰性検体として蒸留水で検証した. コリンエステラーゼの酵素活性阻害反応を利用するため, 有機リン系農薬とカーバメート系農薬が含まれると反応ディスクは青に変色せず白のままである. 結果ではマラチオンは白 (陽性), メソミルは水色 (擬陽性), 蒸留水は青 (陰性) となった(図 5).

メソミルは擬陽性となり濃度が薄いことが想定された. また擬陽性の色の例示を示すことが出来た. この結果から取扱説明書を参考に, 現場では液体試料での検査を行うよう研修資料で説明を行った.

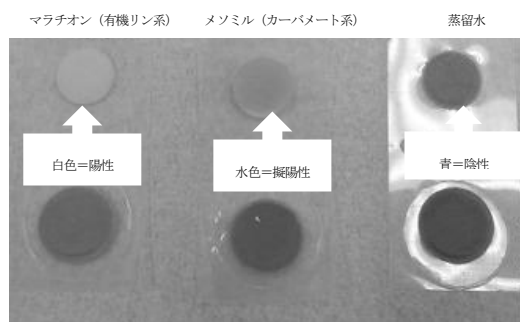


図 5 有機リン系農薬, カーバメート系農薬検査キット検証状況

2. 研修結果

研修は県庁主管課, 各保健所, 食品衛生検査所の食品衛生監視員及び保健研究センター検査員の合計 50 名が受講した. 受講後のアンケート 25 名の回答より,

以下報告を取りまとめた。

「理解度」は全員がわかりやすい(100%)と回答。「研修時間」は普通 24 名(96%), 長い 1 名(4%)。「受講しやすさ」は受講しやすい 21 名(84%), 普通 4 名(16%)。

「食品監視員の知識向上, 教育訓練」として役立つ 20 名(80%), 普通 5 名(20%)となり, 動画の教育訓練手法が受け入れられた内容であることが分かった。

今後希望する研修として, 食品衛生の業務理解を目的とした「他部署の業務の見学, 意見交換」が最も多く, 「取査検査の目的と法的根拠」「食中毒疑い事例に対するシミュレーション研修」などが上がった。検査機関に対して, 「残留農薬検査」「異物検査」「他の検査キット」「サンプリング及び試験検査における精度管理の重要性」等が上げられた。

「研修の感想」では, 動画を見ることは文字だけの資料より理解しやすい。検査キット毎の内容を随時各自のペースで視聴することが可能であった。検査キットの存在をあらためて認識した。他の内容も動画で研修に応用してほしいなどが上げられた。

また, 実際見て触れての研修の必要性や, 知識として検査キットの理解は必要と考える反面, 実際の現場での活用の困難さや刑事事件として警察が介入する場合の食品衛生監視員の対応の必要性がどこまであるかななどの意見が出た。

考 察

平成 10 年に全国各地で多くの毒物劇物事件が連鎖的に発生し, それを受け毒物劇物検査キットの配布に係る厚生労働省通知が発出された³⁾。さらに地域健康危機管理ガイドライン⁴⁾で健康危機管理における保健所と地方衛生研究所の役割が示され, 平成 12 年 3 月改正の地域保健対策の推進に関する基本的方針⁵⁾で, 地方衛生研究所において毒物劇物の迅速な検査機能の強化を図るよう求めている。

この毒物劇物検査キットの使用は, 奈良県食品衛生監視指導計画 (<http://www.pref.nara.jp/4072.htm>) において, 毒物劇物を病因物質とする食中毒(疑いを含む)の発生に際しては, 調査初期段階において有効に活用する規程が定められている。

このような背景があるが, 食品衛生監視員は順次異動のため, 検査キットの認知度は年々低くなっている。さらに検査機関側も検査キットの研修会を実施しつつも, 使用方法を認識している検査員が少なく, 取扱手順の理解を進めることをかねて, 今回事前検証を実施した。

食品衛生監視員が現場でスムーズに検査を進めるこ

とが出来よう, 試料を希釈することで食品の色素等, 夾雑物の影響を軽減し, 前処理で注意すべきポイントを説明した。検査方法を目の前で実際に行っている動画で具体的に示すことにより, 受講者への深い理解に繋がった。また食品衛生監視員が現場で検査を行うために, 検査機関は, 検査キット以外に必要なものの提供や廃液回収の受け入れ等が必要であることを認識できた。

研修後のアンケート結果から, 研修資料の理解度や受講しやすさ, 食品衛生監視員の知識向上, 教育訓練として役立つと高い評価を得た。いずれの意見もこの研修により, 毒物劇物検査キットの認識が高まり意識向上に繋がっていることがうかがえた。また, 新型コロナウイルスのため参集による研修方法の中止変更を余儀なくされる中で, 継続して研修を進められる有効な一つの方法であることが示された。

通常の研修参加者は新しく配属された食品衛生監視員が多く, 10~20 名程度で実施される。今回の動画研修により, 多数の熟練の食品監視員も受講し, 検査キットの認識と問題点等の意見交換を行うことが出来たのは大きな成果であった。警察が関与する場合があるが, 現場で原因物質が早急に判明すれば, 検査や中毒患者への初期対応等の治療方針の一助になることを医療現場からも求められている⁶⁾。

今回の研修は新型コロナウイルス感染症下において, 目的である健康危機管理業務に従事する職員を対象とした危機管理意識を推進する機会となったと考える。

文 献

- 1) 服部恵三, 大下敏隆, 志々田恵子, 他: 検体中のアジ化ナトリウムの有無を判定する方法及びそれに用いられるテストキット, 特許第 3341046 号
- 2) 出口夫美子, 伴埜行則, 筒井達也, 他: 京都市衛生公害研究所年報, 71, 105-108 (2004)
- 3) 生活衛生局食品衛生課長通知「毒劇物迅速検査キット緊急的配備について」, 衛食第 52 号, (平成 11 年 3 月 15 日)
- 4) 地域における健康危機管理について~地域健康危機管理ガイドライン~, 厚生労働省(平成 13 年 3 月)
- 5) 地域保健法第四条第一項の規程に基づく地域保健対策の推進に関する基本的な指針, 厚生労働省告示第 374 号(平成 6 年 12 月 1 日)
- 6) 奈女良昭, 西田まなみ, 屋敷幹雄, 他: 薬学雑誌, 126, 1271-1277 (2006)

鶏の筋肉および鶏卵中のテトラサイクリン系抗生物質の一斉分析法の検討

上床知佐奈・米田正樹・南浦茉奈・竹田依加・立本行江

Simultaneous Analysis of Tetracyclines in Chicken Muscle and Egg

Chisana UWATOKO・Masaki YONEDA・Mana MINAMIURA・Erika TAKEDA and
Yukie TATSUMOTO

緒言

動物用医薬品は畜水産物の安定供給を目的に、畜水産物の疾病予防および治療に広く使用される。特にテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) は、安価で広範な抗菌スペクトルを有するため使用頻度が高く、食肉中への残留がしばしば認められるため、TCs は食肉中の残留試験の重要な分析対象化合物となっている。

そこで、TCs のテトラサイクリン (TC)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロルテトラサイクリン (CTC) およびドキシサイクリン (DOXY) について、厚生労働省の通知試験法 (厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, 平成 17 年 11 月 29 日, 食安発第 1129002 号) で示されている個別試験法「OTC, CTC 及び TC 試験法 (畜水産物)」 (以下, 通知法) に改良を加え、4 剤一斉分析法を検討した。検討した試験法について、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」¹⁾ (以下, ガイドライン) に基づき、試験法の性能評価を実施したので報告する。

方法

1. 試料

市販の鶏の筋肉および鶏卵を用いた。鶏の筋肉はメスで脂肪を除去した後、また鶏卵は殻を除いた後に、フードプロセッサーで均一化した。すぐに使用しない場合は小分けにして冷凍保存し、使用時に解凍して用いた。

2. 試薬等

標準品は TC (SIGMA-ALDRICH 社製), CTC 塩酸塩 (CALBIOCHEM 社製), OTC 塩酸塩 (Riedel-de Haen 社製) および DOXY 塩酸塩 (MP Biomedicals 社製) を用いた。ギ酸は富士フィルム和光純薬 (株) 製高速液体クロマトグラフ用, 超純水は富士フィルム和光純薬 (株) 製 LC/MS 用, メタノールは関東科学 (株) 製 LC/MS 用及び富士フィルム和光純薬 (株) 製残留農薬試験用, n-ヘキサンは富士フィルム和光純薬 (株) 製残留農薬試験用, クエン酸・一水和物および

リン酸二ナトリウム・十二水和物は富士フィルム和光純薬 (株) 製特級, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物は (株) 同仁化学研究所製試験研究用を用いた。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムはジーエルサイエンス (株) 製の InertSep PLS-2 265 mg/20 mL を用いた。

3. 装置

LC-MS/MS は Waters 社製の液体クロマトグラフ ACQUITY UPLC H-Class および同社製質量分析計 Xevo TQ-S micro を使用した。

高速ホモジナイザーは KINEMATICA 社製の Polytron PT 10-35 GT, 高速冷却遠心機はエッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ (株) 製の himac CR21N, ロータリーエバポレーターはヤマト科学 (株) 製の RE801 を使用した。

4. 測定条件

LC-MS/MS 測定条件を表 1 に, 測定イオン (m/z) を表 2 に示した。

表 1 測定条件

カラム	ACQUITY UPLC®BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)
移動相	A液 : 0.1% ギ酸 B液 : 0.1% ギ酸メタノール溶液
グラジエント条件	B%濃度: 5%(0 min)→5%(1 min)→95%(10.5 min) →95%(12 min)→5%(13 min)→5%(16 min)
流速	0.3 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	5 μL
イオン化方法	ESI(+)
キャピラリー電圧	3.5 kV
ソース温度	150°C
脱溶媒温度	350°C
脱溶媒ガス流量	650 L/Hr

表 2 測定イオン (m/z)

化合物名	定量			定性		
	MRM Transition (m/z)	Cone Voltage(V)	Collision Energy(V)	MRM Transition (m/z)	Cone Voltage(V)	Collision Energy(V)
TC	445→410	18	18	445→427	36	12
OTC	461→426	18	18	461→443	4	12
CTC	479→444	20	20	479→461	2	16
DOXY	445→428	16	16	445→410	4	24

5. 試料溶液の調製

1) 抽出

(1) 鶏の筋肉

試料 5.00 g に EDTA 含有クエン酸緩衝液²⁾ (以下、EDTA 緩衝液) 25 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、毎分 8,000 回転で 10 分間遠心分離した。上澄液を分取した後、残渣に EDTA 緩衝液 25 mL を加え 1 分間振とうした。振とう後、同様の条件で再度遠心分離し、上澄液を合わせた。得られた上澄液に n-ヘキサン 20 mL を加え 5 分間振とうした後、毎分 7,200 回転で 10 分間遠心分離し、水層を分取した。n-ヘキサン層および残渣に EDTA 緩衝液 10 mL を加え、5 分間振とうした後、同様の条件で再度遠心分離し、水層を先の水層と合わせ抽出液とした。

(2) 鶏卵

試料 5.00 g に EDTA 緩衝液 30 mL および n-ヘキサン 100 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、毎分 7,200 回転で 10 分間遠心分離した。水層を分取した後、n-ヘキサン層および残渣に EDTA 緩衝液 20 mL を加え 1 分間振とうした。振とう後、同様の条件で再度遠心分離し、水層を合わせた。得られた水層に n-ヘキサン 20 mL を加え 5 分間振とうした後、毎分 7,200 回転で 10 分間遠心分離し、水層を分取した。n-ヘキサン層および残渣に EDTA 緩衝液 10 mL を加え、5 分間振とうした後、同様の条件で再度遠心分離し、水層を先の水層と合わせ抽出液とした。

2) 精製

あらかじめメタノール 10 mL、水 10 mL および飽和 EDTA 溶液 5 mL を順次ミニカラムに注入しコンデューションをした後、1) で得られた抽出液全量および水 20 mL を順次注入し、流出液は捨てた。カラムにメタノール 10 mL を注入し流出液を 100 mL ナス型フラスコに採り、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で濃縮し、窒素気流下で溶媒を完全に除去した後、0.1%ギ酸含有 5%メタノール溶液を正確に 10 mL 加えて溶解した。溶解した液の一部を 0.1%ギ酸含有 5%メタノール溶液で 2.5 倍希釈したものを 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過し、試験溶液 (試料 0.2 g 相当/mL) とした。

6. 標準溶液の調製

各標準品を 1,000 μg/mL となるようにメタノールに溶解し標準原液とした。検量線用溶媒標準溶液は、これらを混合して 0.1%ギ酸含有 5%メタノール溶液で希釈して調製した。

7. 妥当性評価

選択性は各試料のブランク試料を調製し、定量を妨

害するピークがないかあらかじめ確認した。また、各試料のブランク試料から調製した試験溶液に標準溶液を添加しマトリックス添加標準溶液を調製し、マトリックス効果(マトリックス添加標準溶液の面積値/溶媒標準溶液の面積値)を求めた。選択性、真度、併行精度および室内精度の評価は、実験者 1 名、2 併行、5 日間の枝分かかれ試験により実施した。添加濃度は残留基準値から、鶏の筋肉は TC, OTC, CTC は各 0.06 μg/g, DOXY は 0.05 μg/g, 鶏卵は TC, OTC, CTC は各 0.13 μg/g, DOXY は 0.01 μg/g とした。定量は溶媒標準溶液のピーク面積を用いた絶対検量線法で行った。併行精度は、添加濃度が 0.01 μg/g の場合は 25%以下, 0.05, 0.06 μg/g の場合は 15%以下, 0.13 μg/g の場合は 10%以下, 室内精度は、添加濃度が 0.01 μg/g の場合は 30%以下, 0.05, 0.06 μg/g の場合は 20%以下, 0.13 μg/g の場合は 15%以下であることを確認した。

結果

ブランク試料の測定結果から、鶏の筋肉、鶏卵ともに選択性に問題がないことを確認した。

鶏の筋肉のマトリックス効果算出結果を表 3 に示した。鶏の筋肉の試料中のマトリックス濃度が 0.2 g 相当/mL のとき、4 剤のマトリックス効果は 102~107% であった。

表 3 マトリックス効果算出結果 (鶏の筋肉)

マトリックス濃度(g/mL)	化合物名	マトリックス効果(%)
1.0	TC	61
	OTC	58
	CTC	65
	DOXY	58
0.2	TC	107
	OTC	102
	CTC	107
	DOXY	103

妥当性評価の結果を表 4 に示した。TC, OTC および CTC は鶏の筋肉および鶏卵ともに真度、併行精度および室内精度のすべてでガイドラインの目標値を達成した。DOXY は鶏の筋肉ではガイドラインの目標値をすべて達成したが、鶏卵は併行精度および室内精度は目標値を達成したものの、真度は達成しなかった。

表 4 妥当性評価結果

試料	化合物名	真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
鶏の筋肉	TC	81	2	3
	OTC	83	2	4
	CTC	76	2	8
	DOXY	72	2	3
鶏卵	TC	83	6	9
	OTC	86	6	11
	CTC	75	7	10
	DOXY	64	7	7

考 察

TCs 4 剤について、通知法をもとに前処理工程で、いくつかの改善を試みた。通知法の遠心条件では、各層の分離が不十分と考えられたため、遠心分離の全工程で遠心条件を使用する容器の最大許容回転数まで引き上げたことで各層の分離が容易となり、回収率の改善に繋がったと考えられた。また n-ヘキサンを加え脱脂を行うが、振とう後に形成されるエマルジョンにより水層の回収が困難な場合があった。そこで、脱脂後の n-ヘキサン層および残渣に EDTA 緩衝液を再度加え脱脂の工程を 2 回にしたことで、水層の回収不足を解消することができ、回収率が上昇したと考えられた。鶏の筋肉の試料でマトリックス効果を検討した。通知法の試験溶液中のマトリックス濃度は 5.0 g 相当/mL と高く、マトリックスにより負のマトリックス効果が懸念された。そこで試験溶液中のマトリックス濃度を 1.0 g 相当/mL と低くなるように調製し、マトリックス効果を求めたが、それでもマトリックス添加標準溶液中の 4 剤の面積値が溶媒標準溶液と比較すると 58%~65%に低下したため、負のマトリックス効果が残った。そこで、さらに試験溶液中のマトリックス濃度が 0.2 g 相当/mL となるように調製したところ、マトリックス添加標準溶液中の 4 剤の面積値が標準溶液の 102~107%の範囲となりマトリックス効果の影響がなくなり、溶媒標準液による検量線で定量することが可能と判断した。

以上の改良を行ったことで、TC, OTC および CTC の 3 剤はガイドラインのすべての項目を達成した。しかし、鶏卵では DOXY の真度が達成できなかったため、この問題を解決するとともに、鶏以外の畜産試料についても今後検討し、さらに他の動物用医薬品とあわせて一斉試験法を検討することで、当センターの残留動物用医薬品の検査体制の拡充をはかっていきたい。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」、食安発第 1115001 号、(平成 19 年 11 月 15 日) (平成 22 年 12 月 24 日一部改正, 食安発 1224 第 1 号)
- 2) “食品衛生検査指針動物用医薬品・飼料添加物編” 厚生労働省監修, 68-77 (2003), (社) 日本食品衛生協会

奈良県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の遺伝子検出状況（2020年）

井上健太郎・井ノ上美紅・松井恵梨子・佐伯美由紀・森村実加・吉田孝子・内田美枝

Detection of the Antimicrobial-Resistant Genes in Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated in Nara Prefecture (2020)

Kentaro INOUE・Miku INOUE・Eriko MATSUI・Miyuki SAEKI・Mika MORIMURA・Takako YOSHIDA and Yoshie UCHIDA

緒言

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: CRE）はメロペネムなどのカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対して耐性を示す腸内細菌科細菌の総称である。カルバペネム系薬剤は、グラム陰性菌による重篤な感染症の治療において、最も重要な抗菌薬であり、耐性菌の出現は医療上の大きな問題となっている。

CRE感染症は、感染症法の五類全数把握対象疾患に指定されており、2017年3月、厚生労働省通知により、CRE感染症として届出のあった菌株は地方衛生研究所で試験検査を実施するように明記された。そのため、患者から分離された菌株は保健所等の協力により、当センターに搬入され、β-ラクタマーゼ産生性及びβ-ラクタマーゼ遺伝子の検査を実施している。

今回、2020年1月から2020年12月に、奈良県で届出され搬入されたCRE感染症の菌株について、検査を実施したので結果をまとめて報告する。

方法

1. 材料

2020年1月から2020年12月までの間に、奈良県内の医療機関においてCRE感染症として届出され、当センターに搬入された30株について、検査を実施した。なお、患者情報、菌種等は発生届に基づく。

2. ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

メタロ-β-ラクタマーゼ産生性確認試験として、ミューラーヒントン寒天培地上に、メロペネム（MEPM）とセフトジジム（CAZ）のセンシディスク（日本BD）と、メタロ-β-ラクタマーゼ活性阻害剤であるメルカプト酢酸ナトリウム（SMA）ディスク（栄研化学）を配置した。ディスク拡散法（double disk synergy test（DDST））により、いずれかの薬剤ディスクにおいて、阻止円径の拡張を確認した場合を陽性と判定した²⁾。

また、KPC型カルバペネマーゼ産生性確認試験として、MEPMとイミペネム（IPM）のセンシディスク及びKPC型カルバペネマーゼ活性阻害剤である3-アミノフェニルボロン酸（APB）500 μgを添加したMEPMとIPMディスクを使用した。いずれかの薬剤ディスクにおいて、阻止円径の拡張が5 mm以上ある場合を陽性と判定した²⁾。

3. β-ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

PCR法によりカルバペネマーゼ遺伝子²⁾（IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型）、ESBL遺伝子^{3,4)}（TEM型、SHV型、CTX-M-1 group(G)、CTX-M-2 group(G)、CTX-M-9 group(G)）、AmpC遺伝子⁵⁾（MOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型）の保有の有無を確認した。

4. 薬剤耐性遺伝子の同定

カルバペネマーゼ遺伝子を検出した菌株については、IMP-1型シーケンス用プライマー²⁾を用い、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、National Center for Biotechnology Information（NCBI）のBasic Local Alignment Search Tool（BLAST）解析により薬剤耐性遺伝子を同定した。

結果

1. 菌株の由来

供試した30株の由来は、性別では、男性20株、女性10株と男性が多かった。年齢は、80～89歳が最も

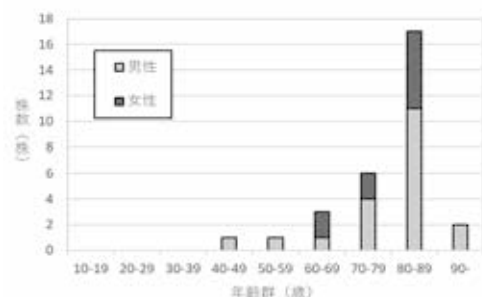


図1 菌株の由来（性別年齢分布）

多く、70歳以上の高齢者が約80%を占めた(図1)。

検出部位は、尿が11株(37%)と多かった。次いで、血液6株(20%)で、その他は喀痰、腹水などであった。菌種は、*Klebsiella pneumoniae*が10株(33%)で最も多く、次いで*Klebsiella aerogenes*が7株(23%)、*Escherichia coli*、*Enterobacter cloacae* complex、*Serratia marcescens*が3株(10%)などであった(表1)。

2. ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

メタロ-β-ラクタマーゼ産生性確認試験では、阻止円径の拡張が確認できたのは、14株(47%)で、その菌種は*K. pneumoniae*が8株、*E. coli*が3株、*K. aerogenes*、*E. cloacae* complex、*E. cloacae*が1株であった。KPC型カルバペネマーゼ産生性の確認試験では、*K. aerogenes*が1株陽性であった。

3. β-ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

PCR法の結果、全30株のうち、カルバペネマーゼ

遺伝子では、IMP型遺伝子を14株(47%)検出した。菌種は*K. pneumoniae*が8株、*E. coli*が3株、*K. aerogenes*、*E. cloacae* complex、*E. cloacae*が1株であった。

ESBL遺伝子では、CTX-M-2Gを検出した菌株が12株、SHV型を検出した菌株が8株、TEM型およびCTX-M-9Gを検出した菌株が各2株あった。なお、ESBL遺伝子を重複して保有する菌株が9株あった。

AmpC遺伝子では、EBC型を検出した菌株が3株あった。今回確認したいずれの薬剤耐性遺伝子も検出しなかった菌株が12株あった。

4. 薬剤耐性遺伝子の同定

PCR法でIMP型遺伝子を検出した14株について、塩基配列を決定し、BLASTによる相同性解析を実施した。その結果、すべての株が*bla*_{IMP-6}と一致した。

考 察

カルバペネム系薬剤耐性メカニズムは、2つに大別

表1 検査結果

番号	菌種	阻害剤による確認試験			PCR法による検出遺伝子			シーケンス結果
		SMA	APB	カルバペネマーゼ	ESBL	AmpC		
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	SHV型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	SHV型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	SHV型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	SHV型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	SHV型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	SHV型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	SHV型,CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	SHV型	-		
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-		
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
11	<i>Klebsiella aerogenes</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
12	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-		
13	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-		
14	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-		
15	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-		
16	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	+	-	-	-		
17	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	-	-		
18	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
19	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	TEM型,CTX-M-9G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
20	<i>Escherichia coli</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G,CTX-M-9G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
21	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	+	-	IMP型	-	EBC型	<i>bla</i> _{IMP-6}	
22	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-	-	-	-	EBC型		
23	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-	-	-	-	EBC型		
24	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-		
25	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-		
26	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-		
27	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	IMP型	CTX-M-2G	-	<i>bla</i> _{IMP-6}	
28	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-		
29	<i>Serratia.sp</i>	-	-	-	-	-		
30	<i>Serratia.sp</i>	-	-	-	TEM型	-		

される。1 つは、カルバペネム系薬剤分解酵素であるカルバペネマーゼを産生するカルバペネマーゼ産生菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : CPE) であり、もう 1 つはカルバペネマーゼを産生せず、AmpC 産生菌や、ESBL 産生菌の外膜蛋白ポーリンが欠損または欠失したことによる薬剤の膜透過性低下である。CPE については、カルバペネマーゼ産生遺伝子がプラスミドの水平伝達により、菌種を超えて拡散する可能性や、他系統の薬剤にも耐性になることが多いため、臨床重要視されている。

今回の調査では、医療機関で CRE と判定され、発生届出がされた 30 株のうち、カルバペネマーゼ遺伝子である IMP 型を検出したのは 14 株であり、いずれの株も *bla*_{IMP-6} であった。これは、西日本で多く検出⁵⁾されているカルバペネマーゼ遺伝子であり、当センターにおいても過去に検出報告⁶⁻⁸⁾がある。この *bla*_{IMP-6} は、IPM に対しては、耐性を示さない⁹⁾ことがあるため、初期のスクリーニングで見逃される恐れがあることが、大きな問題として指摘されている。

カルバペネマーゼ遺伝子を保有していない菌株は、16 株あった。これらの菌株のうち、ESBL 遺伝子である SHV 型、TEM 型をそれぞれ 1 株ずつ、AmpC 遺伝子である EBC 型を 2 株検出した。検出した ESBL 遺伝子、及び AmpC 遺伝子はプラスミドを介し様々な菌種に伝播していく可能性がある¹⁰⁾と報告されているため、これらについても今後も動向を注視する必要がある。

1 株は KPC 型カルバペネマーゼ産生性の確認試験で陽性となったが、PCR 法では KPC 型は検出しなかった。このように、KPC 型においては、ディスク拡散法で確認試験が陽性であっても、遺伝子を保有しない菌株があることが報告¹¹⁾されている。しかし、カルバペネム系薬剤に対して APB による阻害効果が確認できたことから、今回確認している以外の薬剤耐性機序を保持している可能性がある。

CRE の増加は、临床上、さらに院内感染対策上、重大な問題であるが、現在の届出基準では、カルバペネマーゼ遺伝子を保有していない菌株も届出対象になる。カルバペネマーゼ遺伝子を含む β -ラクタマーゼ遺伝子保有の有無を確認する上で、地方衛生研究所の果たす役割は大きいと考えられる。

今後も継続して調査を実施し、医療機関等への情報還元を行っていく必要がある。

謝 辞

今回の調査を実施するにあたり、菌株を提供して頂

きました医療機関、並びに保健所の皆様に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症等に係る試験検査の実施について」、健感発 0328 第 4 号、(平成 29 年 3 月 28 日)
- 2) 国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌」(2016 年 12 月)
- 3) Xu L, Ensor V, Gossain S, *et al.* : *J. Medical Microbiology*, **54**, 1183-1187 (2005)
- 4) Monstein H, Ostholm-Balkhed A, Nilsson M, *et al.* : *APMIS*, **115**, 1400-1408 (2007)
- 5) 国立感染症研究所細菌第二部第一室「薬剤耐性菌研修会資料」(2016 年 9 月)
- 6) 吉田孝子, 河口友理, 佐伯美由紀, 他 : 奈良県保健研究センター年報 , **51**, 48-50 (2016)
- 7) 吉田孝子, 田邊純子, 橋田みさを, 他 : 奈良県保健研究センター年報 , **52**, 49-52 (2017)
- 8) 吉田孝子, 松井恵梨子, 佐伯美由紀, 森村実加, 他 : 奈良県保健研究センター年報 , **54**, 74-77 (2019)
- 9) Shigemoto N, Kuwahara R, Kayama S, *et al.* : *Diagn Microbiol Infect Dis.* , **72**, 109-112 (2012)
- 10) 中村竜也 : 臨床と微生物, **42**, 541-552 (2015)
- 11) 原田崇浩, 外山雅美, 長野由紀子, 他 : 日本臨床微生物学雑誌 , **25**, 56-64 (2015)

奈良県におけるRSウイルスの検出状況：2016～2019

尾西美咲・松浦侑輝・千葉翔子・中永絵理・美並衣織・山崎聖子

An Epidemic of RS Virus in Nara Prefecture : 2016 to 2019

Misaki ONISHI・Yuki MATSUURA・Shoko CHIBA・Eri NAKAE・Iori MINAMI
and Seiko YAMAZAKI

緒言

RSウイルス感染症は生後2歳頃までに初感染する乳幼児の代表的な呼吸器感染症で、我が国では冬季に流行する。RSウイルスは血清型によりA型とB型のサブグループに大別され、さらに数種の遺伝子型に細分される¹⁾。わが国で検出されるA型の遺伝子型の多くは、以前はGA2, NA1であった。一方、検出されるB型の遺伝子型の多くはBAである。

2011年にEshaghiらがカナダのオンタリオ州で2010年から2011年の間に収集した検体からGA2のGタンパク領域のC末端高度可変領域に72塩基の反復配列が挿入された変異株(ON1)を検出した²⁾。その後、ON1類似株は中華人民共和国、イタリア、ケニアなどから相次いで検出され³⁾、わが国でも2012年頃から横浜市、千葉市、沖縄県などで確認された⁴⁾。

本県では、既報で2011年1月から2013年12月の間に感染症発生动向調査として医療機関から提供された患者咽頭拭い液から検出したRSウイルスについて詳細な遺伝子型を調査した結果、2013年9月に喘息性気管支炎患者からON1類似株を検出したことを報告した⁵⁾。その後もRSウイルスの詳細な遺伝子型について継続的に調査を実施している^{6,7)}。

今回、2016年1月から2019年12月の4年間に医療機関から提供された患者臨床検体から検出したRSウイルスの遺伝子解析およびRSウイルス陽性患者の疫学調査を実施したので報告する。

材料と方法

1. 調査対象

2016年1月から2019年12月の間に県内の病原体定点医療機関から提供されインフルエンザウイルス等他の呼吸器系疾患ウイルスが検出された分を除く患者咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液および鼻汁のうち232検体を対象とした。検体採取日や患者年齢等の患者情報は検査依頼票の記載内容を用いた。

2. RSウイルスの検出およびサブグループ分類

咽頭ぬぐい液等からQIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を用い添付のプロトコールに従ってウイルスRNAを抽出した。RSウイルスの検出はO'Donnellらの22K1, 22K2, 22K3および22K4プライマーを用いたnested PCRで実施した⁸⁾。

3. 遺伝子型解析と分子系統樹の作成

遺伝子型解析は既報と同様の方法で実施した⁵⁾。即ち、遺伝子型解析用のプライマーはParveenらのABG490およびF164を用い、さらにA型はAG655およびF164、B型はBG517およびF164を用いたSemi-nested PCRで遺伝子型を識別した⁹⁾。さらに、A型に分類されたウイルスについてはアガロースゲル電気泳動の遺伝子増幅産物よりBigDye Terminator Ver1.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い添付のプロトコールに従いPCRを実施、精製した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で塩基配列を判読した。得られた塩基配列よりMEGA7ソフトウェアを用いて近接接合法(NJ法)による分子系統樹解析を実施し各ウイルスのサブグループを決定した。

結果

1. 疫学調査

1) 月別検出数

2016年は48検体中12検体(25.0%)からRSウイルスを検出した。検体採取月別の検出数は1月1例、5月2例、8月2例、9月2例、11月2例および12月3例と夏季から冬季にかけ長期にわたり検出した。2017年は59検体中20検体(33.9%)からRSウイルスを検出した。月別では8月から検出が増加し、9月は9例を検出し本調査期間で月別での最大の検出数となった。11月に検出した3例のうち2例は、無菌性髄膜炎で多くみられるエコーウイルス6型も同時に検出した重複感染例であることを確認した。これら2例

の診断名はそれぞれ RS ウイルス感染症と気管支肺炎であった。2018 年は 65 検体中 14 検体 (21.5%) から RS ウイルスを検出し、8 月から 10 月で計 9 例検出した。2019 年は 60 検体中 11 検体 (18.3%) から RS ウイルスを検出した。月別の検出数は 4 月 1 例、8 月 3 例、9 月 1 例、10 月 4 例、11 月 1 例および 12 月 1 例であった。

2016 年から 2019 年の 4 年間の検体採取月別の RS ウイルス検出数は 1 月 6 例 (10.5%)、3 月 1 例 (0.02%)、4 月 1 例 (0.02%)、5 月 2 例 (0.04%)、7 月 1 例 (0.02%)、8 月 10 例 (17.5%)、9 月 16 例 (28.0%)、10 月 7 例 (12.2%)、11 月 7 例 (12.2%) および 12 月 6 例 (10.5%) の計 57 例であった。

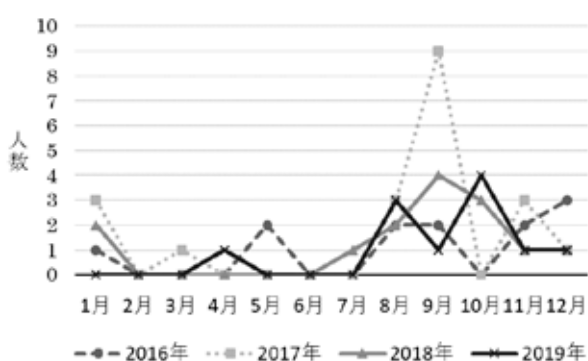


図1 RS ウイルスの月別検出数

2) 患者年齢

2016 年から 2019 年の 4 年間の調査期間で RS ウイルスを検出した陽性患者 57 例の年齢は 0 歳児 22 例 (38.6%)、1 歳児 22 例 (38.6%)、2 歳児 7 例 (12.2%)、および 3 歳児以上が 6 例 (10.5%) であった。

3) 臨床症状

RS ウイルス陽性患者 57 例の臨床症状は、主に気管支炎であり、またほとんどの患者に発熱があった。陽性患者の中には 40℃ 以上の発熱も 8 例 (14.0%) あり、そのうち、入院となった重症例は 5 例であった。4 年間での RS ウイルス陽性患者の入院例は 12 名 (21.1%) であった。また、肺炎と診断された患者は 13 名 (22.8%) であった。

2. 遺伝子解析

1) サブグループ解析

A 型および B 型のサブグループ分類結果を表に示した。2016 年は A 型 6 例 (50.0%)、B 型 6 例 (50.0%) であった。2017 年は A 型が 16 例 (80.0%)、B 型が 4 例 (20.0%) で、A 型が優占的であった。2018 年はサブグループ解析時の PCR で判定不明であった検体の 2 例 (14.2%) を除くと、A 型が 2 例 (14.2%)、B

型が 10 例 (71.4%) で今回の調査期間で唯一 B 型の検出数が A 型の検出数を上回った年となった。2019 年は A 型が 6 例 (54.5%)、B 型が 5 例 (45.5%) であった。なお、B 型は 2011 年以降と同様、すべて BA に分類された。

2016 年から 2019 年の 4 年間でのサブグループ解析が可能であった 55 例の内訳は A 型が 30 例 (54.5%)、B 型が 24 例 (43.6%) であった。

表 RS ウイルスのサブグループ解析結果

	検体数	A型		B型		N.T.*
		ON1	BA	BA	N.T.*	
2016年	12	6	6			
2017年	20	16	4			
2018年	14	2	10			2
2019年	11	6	4		1	
計	57	30	24		1	2

※Not Typed

2) 系統樹解析

A 型に分類した株について分子系統樹解析を実施した結果、30 例全てが 72 塩基の反復配列が挿入された ON1 であることが明らかとなり、NA1 は確認できなかった (図 2)。

考 察

RS ウイルスはインフルエンザウイルスと同様に、飛沫および接触感染により伝播する。主な症状は下気道炎や細気管支炎で、乳幼児の肺炎の 50% 程度が RS ウイルス感染症と言われており、ときには重篤な症状に至ることが知られていることから乳幼児にとっては重要な疾患である。RS ウイルス感染症は 2003 年の感染症法の改正により感染症発生動向調査の対象疾患に加わったこと、また 2011 年 10 月に始まった外来患者への迅速検査の保険適用もあり注目される疾患となったことから全国の定点医療機関から適時患者報告数が寄せられ本疾患の流行状況や患者情報が徐々に明らかとなってきた。

本県では感染症発生動向調査において、呼吸器系疾患患者の検体からインフルエンザウイルス、RS ウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルスおよびエンテロウイルス D68 等多様な呼吸器系のウイルスを検出してきた。本県では 2011 年から RS ウイルスの遺伝子解析等を実施しているが、インフルエンザウイルスやアデノウイルス等と比較すると本県での詳細な疫学調査や遺伝子解析の実績が短く、県内での流行状況に関する情報が他の呼吸器系ウ

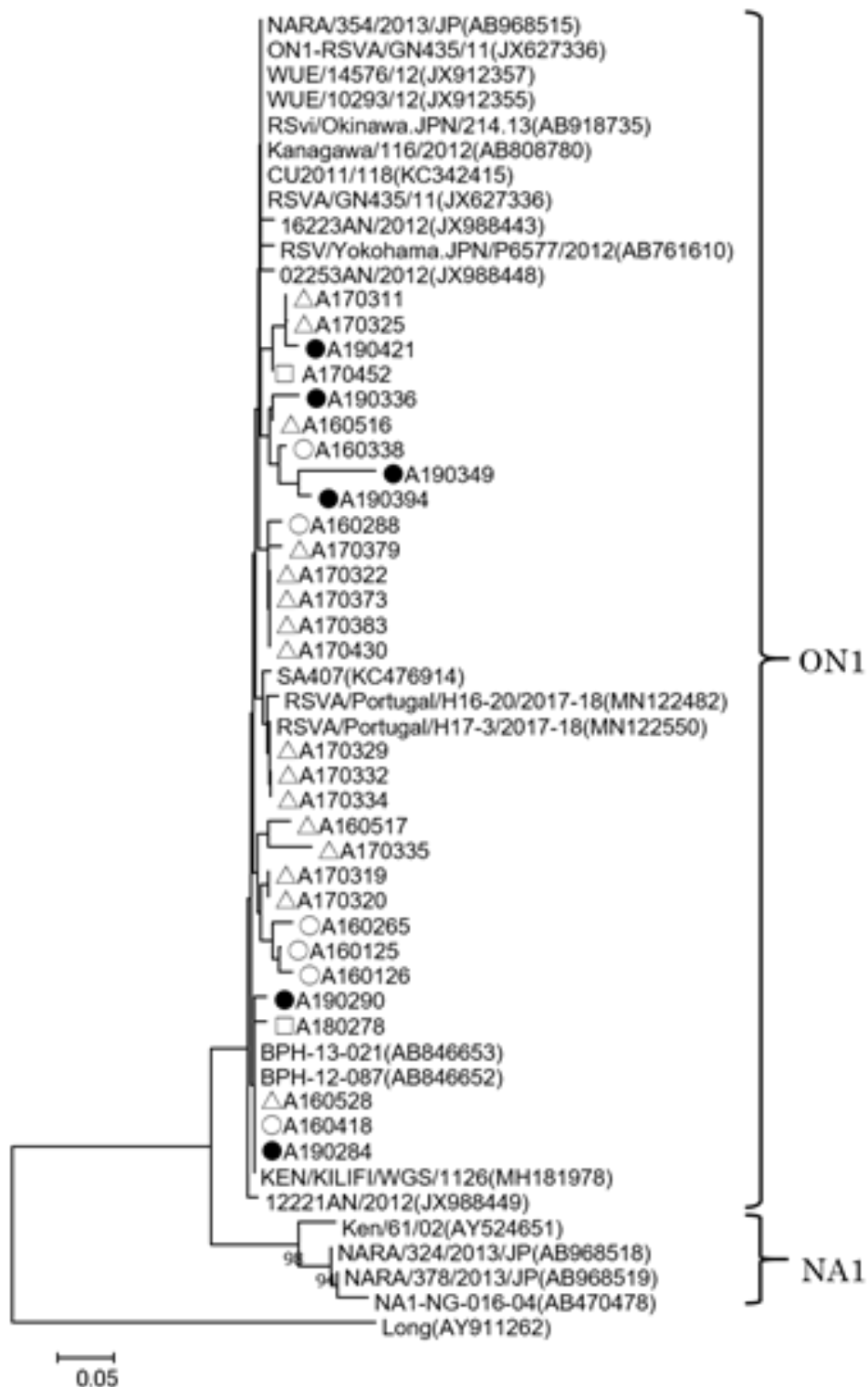


図2 GタンパクのC末端高度可変領域に基づくRSウイルス(A型)の分子系統樹(258 bp)
 ○: 2016年, △: 2017年, □: 2018年, ●: 2019年分離株

ウイルスと比較すると乏しく情報発信に苦慮している。

今回の調査では 232 検体中 57 検体から RS ウイルスを検出し検出率は 24.6% となった。これは既報⁵⁾で報告した 2013 年の 29.0% とほぼ同等の検出率となった。今回の調査は事前に実施したインフルエンザウイルス等の検索で他のウイルスを検出した検体は除く等、呼吸器系疾患と診断された全ての患者検体について検査を実施したわけではない。そのため、より正確な陽性率を議論するには慎重な判断が必要ではあるが、2011 年 10 月に始まった外来患者への迅速検査の保険適用により臨床現場で RS ウイルスの検査が実施され、陽性であることが事前に判明した検体の搬入も一部あったこともあり、従来我々が実施してきたインフルエンザウイルスの検査で得られていたような高い検出率が得られたと考えられた。

全国的に RS ウイルス感染症は 2015 年までは夏季より流行が始まり秋季に入ると報告数が急増し、年末をピークに春季まで流行が続いていたが、2016 年以降は報告数の増加が早まり秋季に報告数のピークを迎える傾向にある。本県でも RS ウイルス感染症患者の報告数は全国とほぼ同様の傾向を示したが、2017 年の報告数は 9 月と 12 月にピークがある 2 峰性の様相となり全国の患者発生状況と異なる時期もあった (図 3)。当センターにおける RS ウイルスの検出数は、例数は少ないものの陽性検体を採取月別でみると、2016 年はこれまでの傾向と同様に 12 月から翌 2017 年 1 月にかけて冬季での検出が最多であった。しかし、2017 年以降については 2017 年と 2018 年が 9 月、2019 年は 10 月と秋季での検出数が最多となっており、また

2017 年以降は 2 月から夏季までは RS ウイルスはほとんど検出されなかったことから、全国の RS ウイルス感染症の流行状況が冬季から秋季に好発季が早まる傾向にあわせて RS ウイルスが検出されたと考えられた。しかし、過去の本県の調査を確認したところ例数は少ないものの同様の傾向が既に 2011 年、2013 年および 2014 年にもみられた^{5,6)}。今後、好発季をいかに速やかにとらえ、情報発信していくかが課題と考えられた。

国立感染症研究所感染症疫学センターの感染症発生動向調査週報 (IDWR) (2018 年第 32 号) では、2018 年は RS ウイルス感染症患者の報告数が毎週増加傾向にあった第 23 週から第 32 週までの間に報告された患者を年齢別にみると、0 歳が 36%、1 歳が 39%、2 歳が 14%、3 歳が 7% であり、3 歳以下で全体の 96% を占め、それまでのシーズンと比較して好発年齢に変化がないことを確認した。今回の調査期間である 4 年間の RS ウイルス陽性患者の年齢分布は、0 歳が 22 名 (38.6%)、1 歳が 22 名 (38.6%)、2 歳が 7 名 (12.3%)、3 歳が 5 名 (8.8%) および 4 歳が 1 名 (0.02%) と、全国の報告とほぼ同様に 3 歳以下の患者からの検出でほぼ占めた。また、本県の過去の調査から RS ウイルス陽性患者が 3 歳以下で占める割合を再度確認したところ、2011 年から 2013 年までの調査では 84.7% (61/72)⁵⁾、2014 年は 100% (14/14)⁶⁾ と同様の傾向であった。好発年齢に変化がないことから、特に 3 歳以下の乳幼児はこれまでに引き続き、インフルエンザ等の他の呼吸器疾患だけでなく RS ウイルス感染症にも注意を払う必要があると考えられた。

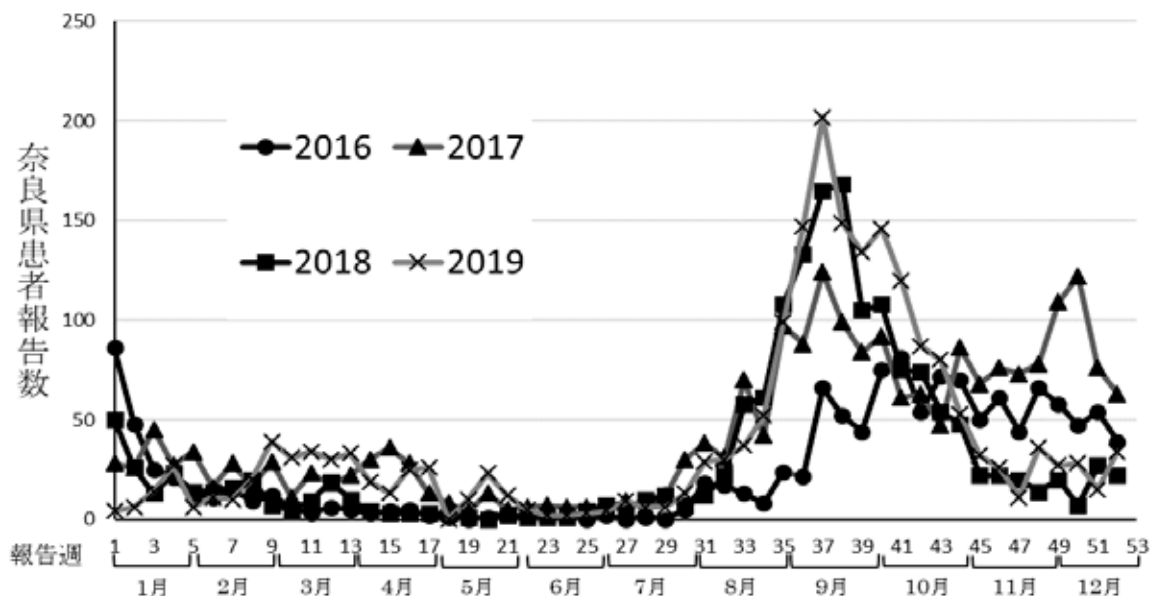


図 3 2016 年から 2019 年の RS ウイルス感染症患者の週別定点当たり報告数

患者臨床情報からはこれまでの本県の調査⁵⁾と同様、今回の4年間においても気管支炎や肺炎の患者が占める割合が多く、炎症が遷延化した可能性のある患者からの検出頻度が高かった。今後もさらなる変異ウイルスの発生は否定できないことから、RSウイルス陽性患者と臨床像に変化がないか注視していくことが必要と考えられる。

A型の比較的新しい遺伝子型であるON1は、本県では2011年に採取されたの患者検体から調査を開始し2013年に採取された患者検体から始めてON1類似株を検出した⁵⁾。その後の調査で2014年、2015年もON1類似株を検出した^{6,7)}。今回の系統樹解析の結果から2016年から2019年の4年間に検出したA型のウイルスは全てON1類似株となった。本県では一部ウイルス検索が終了していない期間が過去に存在するが、2014年に検出した1例を最後にNA1型は確認していないため、これまでの国内の報告^{11,12)}とほぼ同じ時期にA型ウイルスはON1型へ変遷したと考えられた。Gタンパク領域は細胞吸着に関係していることから¹⁰⁾、従来のNA1に分類されるウイルスとは異なる感染性を有していることが考えられる。また、RSウイルスはA型とB型が混合流行を繰り返すことが知られており、今回の4年間の調査期間も強弱はあれA型とB型の混合流行であったことから、ON1類似株はNA1株より感染性が高いものの、B型ウイルスを全て駆逐するほどの感染力がON1型には無いことが示唆された。

一方、B型は今回の調査結果も含めて2011年からの調査以降、検出したウイルスは全てBA型であった。現在国内で検出されているB型ウイルスはB9型であるとの報告^{11,12)}がある。今回、本県の調査ではB型のウイルスについては詳細なサブグループの解析には至っていない。本県で検出したB型ウイルスも他の地域と同様B9型である可能性が高いと考えられるが、詳細なサブグループの解析を実施し、B型ウイルスのサブグループの変遷を確認することは今後の課題と考えている。

最後に、Gタンパク領域のアミノ酸の挿入変異は、過去にB型でも起こっており世界に拡大した経緯がある。今回のON1類似株もすでに様々な国や、国内各地で数多く報告されている³⁾。また、ON1は免疫反応に関与することによってNA1と比較して細気管支肺炎の重症度が低いという報告^{13,14)}もあるが詳細は明らかになっていない。本県におけるRSウイルス感染症患者の臨床的特徴について今後も継続して詳細な発生動向を把握することがRSウイルスの流行様式の

解明の一助となると考える。

謝 辞

感染症発生動向調査にご協力いただいた、奈良県医師会の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 堤裕幸：感染症誌，79，857-863 (2005)
- 2) Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, *et al.* : *PLoS One* 7, e32807 (2012)
- 3) Agoti CN, Otieno JR, Gitahi CW, *et al.* : *Emerg. Infect. Dis.* , 20, 950-959 (2014)
- 4) Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, *et al.* : *Microbiol.Immunol.*, 57, 655-659 (2013)
- 5) 川辺千明, 米田正樹, 稲田眞知, 他：臨床とウイルス，42，247-253 (2014)
- 6) 北堀吉映, 川辺千明, 米田正樹, 他：奈良県保健研究センター年報，49，71-72 (2014)
- 7) 米田正樹, 藤谷美沙子, 杉本大地, 他：奈良県保健研究センター年報，50，75-76 (2015)
- 8) O'Donnell DR, McGarvey MJ, Tully JM, *et al.* : *J. Pediatr.*, 133, 272-274 (1998)
- 9) Parveen S, Sullender WM, Fowler K, *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 44, 3055-3064 (2006)
- 10) Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR : *J. Gen. Virol.*, 68, 2521-2524 (1987)
- 11) 小川泰卓, 富岡恭子, 鈴木典子, 他：埼玉県衛生研究所報，52，36-43 (2018)
- 12) 池田周平, 谷澤由枝, 鈴藤 和, 他：広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告，27，7-11(2019)
- 13) Pierangeli A, Viscido A, Bitossi C : *Medical Microbiol.Immunol.*, 209, 23-28(2020)
- 14) Midulla F, Nenna R, Scagnolari C : *J. Infect. Dis.*, 219, 526-534 (2019)

奈良県におけるつつが虫病および日本紅斑熱の 検査状況について：2019～2020

千葉翔子・稲田眞知*・松浦侑輝・尾西美咲・阪本孝幸・美並衣織・山崎聖子

An Epidemic of *Orientia tsutsugamushi* and *Rickettsia japonica* in Nara Prefecture : 2019~2020

Shoko CHIBA・Machi INADA・Yuki MATSUURA・Misaki ONISHI
Takayuki SAKAMOTO・Iori MINAMI and Seiko YAMAZAKI

緒言

つつが虫病および日本紅斑熱は、ともにリケッチアを保有するダニ類の刺咬により感染し、感染症法に基づく全数把握の4類感染症である。つつが虫病では *Orientia tsutsugamushi* (Ot), 日本紅斑熱では *Rickettsia japonica* (Rj) が原因微生物であり、ともに発熱、発疹、刺し口を3主徴とするため、両疾患の臨床的鑑別は困難であり、届出には実験室診断が必要である^{1,2)}。

つつが虫病は、民間検査機関において保険適用である標準3血清型 (Kato, Karp, Gilliam) の抗体検査が行われている。しかしながら、この検査では、近年増加しているその他の血清型 (Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi) について、ある程度の交差反応性はあるものの、反応性が弱く抗体検出がないなど時に確定診断に至らないこともある³⁾。また、日本紅斑熱は保険適用にあたる検査法がなく、民間検査機関では抗体検査は行われていない。つつが虫病の6血清型すべての抗体検査および日本紅斑熱の抗体検査については、当センターから国立感染症研究所に急性期と回復期のペア血清を送付し、行政検査依頼を行っている。

これらの血清学的診断の他、2014年には当センターで、PCR法によるリケッチア遺伝子検査が可能となったが、疑い患者数自体が少なかったことに加えて、痂皮検体や抗菌薬投薬開始前の血液検体が得られなかったことから、2018年まで遺伝子検出事例はなかった。今回、2019年にOt、2020年にはRjの遺伝子を当センターのPCR法において初めて検出したため報告する。

方法

1. 検査対象

2019年から2020年に、つつが虫病および日本紅斑熱が疑われた患者のうち、痂皮検体の提出があった7

例 (つつが虫病1例、日本紅斑熱5例、つつが虫病および日本紅斑熱1例) について遺伝子検査を実施した。

2. 検査方法

痂皮検体にPBS(-)を加え、ディスポーザブルのホモジナイザーで粉碎後、その上清からQIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコールに従って、リケッチアDNAを抽出した。その後、つつが虫病では56 kDa領域、日本紅斑熱では17 kDa領域を標的としたPCRを実施した⁴⁾。得られた遺伝子増幅産物についてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列決定後、近隣結合 (NJ) 法により標準株を用いた系統樹解析を実施した。

結果

確保できた痂皮検体7例のうち、1例からつつが虫病の原因であるOt、3例から日本紅斑熱の原因であるRjを検出した。4例の患者概要を表1に示す。

患者の発病月は、Ot検出例では11月、Rj検出例では6月～10月であった。年齢は、Rjを検出した3例全て60代であったが、Otを検出した1例では30代であった。臨床症状は、4例とも、つつが虫病および日本紅斑熱の3主徴とされる発熱、発疹、刺し口のような痂皮が見られ、Rj検出例では3例全てに肝機能障害も認められた。また、そのうち1例では、播種性血管内凝固症候群 (DIC) を呈していた。刺し口の部位は、足が3例で、1例は腹部であった。

推定感染地域は、Ot検出例が県中部で、Rj検出2例が県北部、1例が県中部であった。また、4例とも県外への移動や入山歴はなく、ダニ等に刺咬された自覚症状はなかった。患者No.3は、同居家族が頻りに山間に出かけているとのことであった。

その他、患者No.1は、当初刺し口が見つからず、山手に行ったエピソードもなかったことから、麻疹が

*現、薬事研究センター

表1 つつが虫病および日本紅斑熱陽性患者の概要

患者 No.	検出病原体	診断名	発病年月	性別	年齢	症状等	採取地域
1	Ot	つつが虫病	2019.11	女	31	発熱・発疹・刺し口核傷(下肢)・倦怠感・結膜炎・気管支炎	中部
2	Rj	日本紅斑熱	2020.6	女	65	発熱・発疹・刺し口(腹部)・肝機能異常・上気道炎	北部
3	Rj	日本紅斑熱	2020.9	女	69	発熱・刺し口(大腿)・発疹・DIC・倦怠感・浮腫(足背)・肝機能異常・上気道炎	北部
4	Rj	日本紅斑熱	2020.10	男	62	発熱・頭痛・倦怠感・発疹・刺し口(鼠径部)・肝機能異常・低ナトリウム血症	中部

疑われたが、当センターで麻疹のリアルタイム PCR 検査を実施したところ陰性であった。その後、医療機関において除外診断として実施されていたつつが虫の標準 3 血清型の抗体検査の結果、IgM 抗体の検出報告があり、また痂皮も見つかったため、当センターへ検体搬入があった。なお、この患者は痂皮検体からの遺伝子検出以外にも後日、国立感染症研究所に、ペア血清による 6 血清型の抗体検査を依頼した結果、抗体価の上昇が確認できた。

また、Rj 検出例は全て、民間検査機関での抗体検査の結果、つつが虫の抗体検出は認められず、つつが虫は除外されたのち、当センターへ検体搬入があったものである。患者 No.3 では、痂皮検体からの遺伝子検出以外にも後日、国立感染症研究所にペア血清による抗体検査を依頼した結果、Rj (YH 株) 抗体価の上昇が確認できた。

遺伝子検査で陽性となった検体は、増幅産物のダイレクトシーケンスから得られた塩基配列より系統樹解析を行った。その結果、Ot は Kawasaki 株であった。Rj は 3 例とも YH 株であり、いずれも標準株と塩基配列が 100%一致していた (図 1, 2)。

なお、当センターで検査した 7 例中、遺伝子検査で陰性と判定した 1 例は、後に国立感染症研究所に依頼した抗体検査にて日本紅斑熱に対する IgM および IgG 抗体価の上昇が認められた。

考 察

2011 年以降の本県における患者発生状況は、つつが虫病では 2012 年に 2 例報告があった後は、年に 0~1 例の報告で推移している。日本紅斑熱では 2014 年と 2019 年に 1 例ずつ報告があったが、この 2 例はともに推定感染地域が県外であった。2020 年は 3 例の報告があり、この 3 例は、本県で感染したと推測される初めての事例であった。全国の患者発生状況を確認したところ、つつが虫病は年間 400 例~500 例の患者が報告されており^{1,4)}、一方、日本紅斑熱は 2006 年まで年間 30 例~60 例で推移していたが、2007 年以降報告

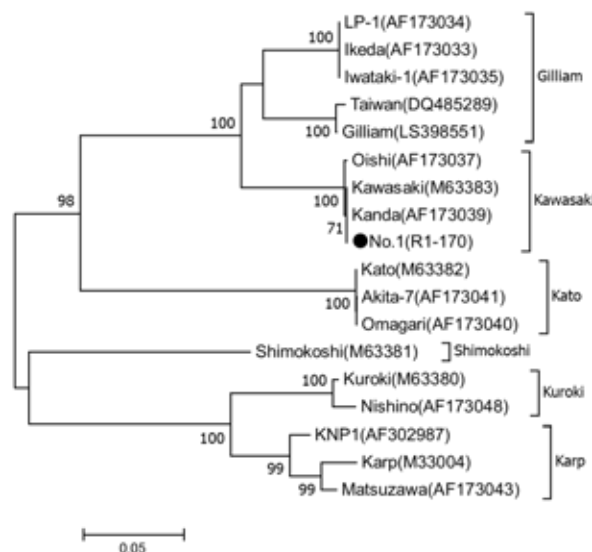


図1 Ot 系統樹解析 (56kDa)

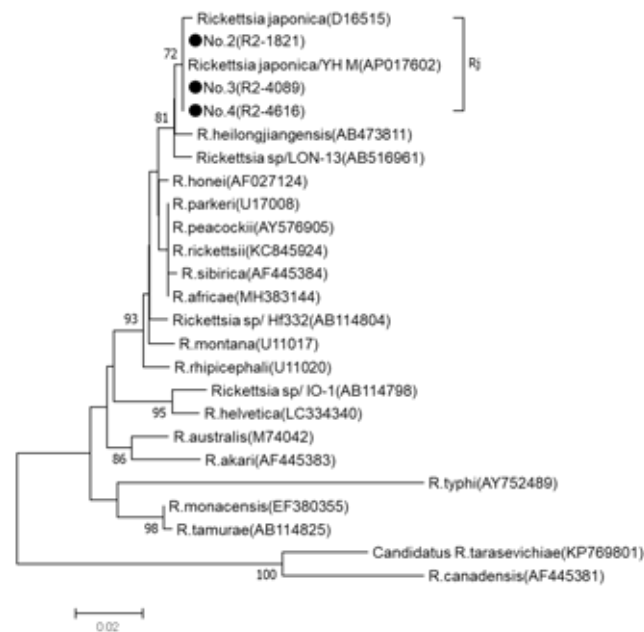


図2 Rj 系統樹解析 (17kDa)

数が増加傾向にあり、年間 300 例を超えている状況であった²⁾。日本紅斑熱は、本県においても県内での感染が推定される事例が確認されたことから、今後も患者が発生する可能性があるため動向には注意が必要である。

患者の発生地域と時期は、リケッチアを媒介するダニ等の種類や地理的分布、幼虫の活動時期によって異なる。つつが虫病を媒介する節足動物のうち、タテツツガムシは、東西南部から九州に分布し、秋～初冬に幼虫の活動が活発になり、Kawasaki 株と Kuroki 株を媒介することが知られている¹⁾。Ot を検出した 1 例では、11 月に発症し、さらに Kawasaki 株を検出したため、タテツツガムシによる感染であると推測される。また、日本紅斑熱を媒介するマダニは、5 月～10 月に活動が活発になる²⁾。Rj を検出した 3 例では、6 月～10 月に発症しており、マダニの活動時期に一致した。

患者年齢については、30 代からの検出もあったが、60 代以上からの検出が多く、全国の状況^{1,2)}と同様であった。

臨床症状では、最終的には 4 例とも 3 主徴揃っており刺し口があったため痂皮検体が採取できた。しかし、患者発生当初、刺し口が見つからなかったため他の疾患を疑われ、臨床的な鑑別が困難であったと考えられる事例があった。また、本事例以外のリケッチア感染症疑い事例でも、刺し口が見つからない事例が複数あり、リケッチア感染症が疑われたとしても刺し口が見つからない場合は、遺伝子検査を実施出来ず、抗体検査のみとなるため、迅速かつ正確な診断につなげるためには刺し口の確認が重要であると考えられた。

また、本報告の 4 例では、患者宅は山間部の多い県南部ではなく、県外への移動や入山歴もなかった。本報告の 4 例は、いずれも患者が気付かないうちにダニに刺咬されていたため、正確な感染原因は不明であるが、本県は住宅地の周辺に自然が多いため生活圏内でダニ等に刺咬され感染した可能性や、同居家族によりダニ等が自宅へ持ち込まれて刺咬され感染した可能性があると考えられる。

患者 No.1 は、急性期血清での標準 3 血清型の抗体検査の結果、3 血清型ともに抗体の検出が見られ、中でも Gilliam の抗体価が最も高かったが、遺伝子検査の結果は Kawasaki であった。その後、国立感染症研究所が実施した 6 血清型での抗体検査では、Shimokoshi を除く 5 血清型の IgM 抗体価はいずれも上昇し、また IgG 抗体価は Kawasaki が最も高かったが、その他の 5 血清型においても抗体価の上昇は見ら

れた。これらのことから、抗体検査において交差反応性が強い場合には、正確な型別に遺伝子解析が重要であると感じた。

当センターで実施した痂皮検体の遺伝子検査で陰性となったが、国立感染症研究所で実施した抗体検査で陽性となった 1 例については、採取された痂皮が小さかったことから、検体に含まれる Rj 遺伝子量が少量であった可能性が考えられた。本事例ではないが、過去には痂皮がホルマリン固定された検体もあったので、今後は適切な検体採取方法を働きかけたい。

つつが虫病や日本紅斑熱は、全国で多くの報告がされており、本県でもわずかながら増加傾向にある。治療には有効な抗菌薬もあるため、今後も遺伝子検査により迅速な治療につながるよう貢献したい。また、その他のダニ媒介感染症である重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は未だ本県では報告がないが、日本紅斑熱と媒介するダニの一部は共通しており、西日本を中心とし少しずつ報告数が増加しているため、今後も動向に注視し、さらにダニ等の刺咬による感染症防止の情報提供も行っていきたいと考えている。

謝 辞

リケッチア遺伝子の検出に関する助言および抗体検査を実施いただいた国立感染症研究所ウイルス第一部第五室室長 安藤秀二先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，38，109-112 (2017)
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，41，133-135 (2020)
- 3) 岩崎博道，伊藤和広，重見博子：日本内科学会雑誌，108，1866-1872 (2019)
- 4) 国立感染症研究所「リケッチア感染症診断マニュアル」(令和元年 6 月版)

感染症発生動向調査による患者発生状況：令和2年（2020年）

美並衣織・松浦侑輝・尾西美咲・千葉翔子・中永絵理・阪本孝幸・山崎聖子

Status of Infection Diseases in Nara Prefecture, 2020

Iori MINAMI・Yuki MATSUURA・Misaki ONISHI・Shoko CHIBA・Eri NAKAE・
Takayuki SAKAMOTO and Seiko YAMAZAKI

緒言

感染症発生動向調査は、平成11年4月から施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症法）の大きな柱に位置づけられている。感染症患者発生に関する情報について、正確に把握・分析し、その結果を国民や医療関係者へ的確に提供・公開することにより、感染症発生の予防や蔓延を防止することを目的に、医師等の医療関係者の協力をうけ、全国的に実施されている。奈良県でも、感染症発生動向調査の結果を迅速かつ的確に活用し、事前対応型の感染症予防対策とするため、奈良県感染症発生動向調査事業実施要綱、同要領に基づき調査を実施している。

今回、本県の令和2年の患者発生状況についてとりまとめたので報告する。

方法

全数把握対象疾患は、診断した全ての医師が保健所に届出を行い、発生状況を把握している。また、定点把握対象疾患は、知事が指定した定点医療機関（のべ117医療機関）を受診した患者数を把握することで流行状況を調査している。

令和2年には、エボラ出血熱等の発生届における記載項目の追加等による届出様式の改正、また、流行性角結膜炎の届出基準の改正が実施された。

令和2年に届出された全数把握対象疾患及び報告された定点把握対象疾患について、感染症サーベイランスシステム（NESID）より情報を収集・解析した。

結果

1. 全数把握対象疾患の発生状況

令和2年の全数把握対象疾患の患者届出は延べ434件であった（表1）。なお、現時点（2021年5月時点）では速報値であり、後日変更されることがある。

1) 一類感染症

届出はなかった。

表1 令和2年 全数把握対象疾患 届出数

類別	疾患名	届出数
二類	結核	202
三類	腸管出血性大腸菌感染症	52
四類	E型肝炎	1
	A型肝炎	1
	日本紅斑熱	3
	ライム病	1
	レジオネラ症	25
五類	アメーバ赤痢	7
	カルバペネム耐性腸内細菌感染症	33
	急性脳炎	2
	クロイツフェルト・ヤコブ病	3
	劇症型溶血性レンサ球菌感染症	9
	後天性免疫不全症候群	1
	侵襲性インフルエンザ菌感染症	5
	侵襲性肺炎球菌感染症	16
	水痘（入院例）	8
	梅毒	41
	播種性クリプトコックス症	3
	破傷風	2
	バンコマイシン耐性腸球菌感染症	9
	百日咳	9
	風しん	1

診断日による集計

2) 二類感染症

結核は202例の届出があり、2019年の281例から減少した。類型は、患者136例、疑似症患者3例、無症状病原体保有者62例、感染者死亡者の死体1例であった。患者の病型は、肺結核が91例、その他の結核（結核性胸膜炎、結核性髄膜炎、リンパ節結核、粟粒結核等）が40例、肺結核及びその他の結核が6例であった。全届出の年齢階層は、0歳5例、1～10歳未満0例、10代1例、20代16例、30代9例、40代21例、50代10例、60代23例、70代39例、80代58例、90代20例で、80代の届出が最も多く、70歳以上が全体の57.9%を占めていた。

3) 三類感染症

腸管出血性大腸菌感染症は 52 例の届出があり、2019 年の 23 例から大幅に増加し、過去 10 年で最多であった。類型は、患者 31 例、無症状病原体保有者が 21 例で、その年齢階層は、1～10 歳未満 26 例、10 代 5 例、20 代 6 例、30 代 10 例、40 代 2 例、50 代 2 例、60 代 1 例であった。なお、HUS は 1 例であった。血清型・検出病原体は、O157 が 43 例 (VT1 が 2 例、VT1&VT2 が 35 例、VT2 が 6 例)、O26 が 2 例 (VT1 が 2 例)、O103 が 1 例 (VT1 が 1 例)、O165 が 1 例 (VT1&VT2 が 1 例)、O8 が 1 例 (VT2 が 1 例)、O 型判別不能が 3 例 (VT1 が 2 例、VT1&VT2 が 1 例)、血清での O 抗原凝集抗体又は抗ベロ毒素抗体の検出 (HUS 発症例に限る) が 1 例であった。推定感染経路は、経口感染が 20 例、接触感染が 11 例 (1 例経口感染と重複)、家族内患者が 2 例、不明が 20 例であった。経口感染が推定されている事例には、焼き肉における加熱不十分な肉類を喫食した記載のある事例が 4 例、生卵の喫食が 1 例、ほたての喫食 1 例等が含まれていた。接触感染が推定されるものは、保育園内や家族内感染が疑われる事例であった。

4) 四類感染症

E 型肝炎 1 例、A 型肝炎 1 例、日本紅斑熱 3 例、ライム病 1 例、レジオネラ症 25 例の届出があった。

E 型肝炎は、11 月に 70 代男性から 1 例の届出があり、イノシシ肉の喫食による経口感染が推定感染経路とされている。

A 型肝炎は、1 月に 60 代女性の届出があり、推定感染経路は経口感染とされていたが、感染原因は不詳であった。

日本紅斑熱は、6 月、9 月、及び 11 月に 3 例の届出があり、2019 年の 1 例より増加した。いずれも 60 代男女で、女性 2 名は感染原因が不明であったが、男性は、マダニ刺症による発熱、頭痛、発しん、肝機能異常を呈しており、推定感染地域は、県内とされている。

ライム病は、8 月に 40 代男性から 1 例の届出があり、マダニ刺症による遊走性紅斑、発熱を呈しており、感染地域は上北山村とされている。県内感染が推定される初めての症例であった。

レジオネラ症 25 例の届出があり、2019 年の 20 例から増加し、過去 10 年で最多であった。病型は肺炎型 24 例、ポンティアック熱型 1 例であり、男性 19 例 (50 代 4 例、60 代 6 例、70 代 4 例、80 代 5 例)、女性 6 例 (50 代 1 例、70 代 1 例、80 代 3 例、90 代 1 例) であった。推定感染経路は水系感染が 6 例、塵埃感染が 3 例、不明が 16 例であった。

5) 五類感染症

アメーバ赤痢 7 例、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 33 例、急性脳炎 2 例、クロイツフェルト・ヤコブ病 3 例、劇症型溶血性レンサ球菌感染症 9 例、後天性免疫不全症候群 1 例、侵襲性インフルエンザ菌感染症 5 例、侵襲性肺炎球菌感染症 16 例、水痘 (入院例) 8 例、梅毒 41 例、播種性クリプトコックス症 3 例、破傷風 2 例、バンコマイシン耐性腸球菌感染症 9 例、百日咳 9 例、風しん 1 例の届出があった。

アメーバ赤痢の病型は、腸管アメーバ症 6 例、腸管外アメーバ症 1 例であった。患者は男性 7 例 (40 代 1 例、50 代 3 例、60 代 2 例、80 代 1 例) で、推定感染経路は経口感染 1 例、性的接触 (異性間) 3 例、不明が 3 例であった。推定感染地域は、奈良県 1 例、県外 1 例、不明 5 例であった。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症は、男性 22 例 (40 代 1 例、50 代 1 例、60 代 1 例、70 代 5 例、80 代 11 例、90 代 3 例)、女性 11 例 (60 代 2 例、70 代 3 例、80 代 6 例) であった。また、全国での状況と同様に 60 歳以上が多く、全体の 9 割以上を占めた。病原体検出部位・菌種としては、血液 7 例 (*Serratia marcescens* 2 例、*Klebsiella pneumoniae* 3 例、*E. coli* 1 例、不明 1 例)、腹水 3 例 (*Klebsiella pneumoniae* 2 例、不明 1 例)、腹水及び胆汁 1 例 (*Enterobacter cloacae*)、喀痰 5 例 (*Klebsiella pneumoniae* 2 例、*Enterobacter cloacae* 1 例、*Klebsiella aerogenes* 2 例)、人工血管 1 例 (*Klebsiella pneumoniae*)、嚢胞穿刺液 1 例 (*Enterobacter cloacae* complex)、腹腔ドレーン 1 例 (*Serratia marcescens*)、尿 10 例 (*Enterobacter aerogenes* 3 例、*Klebsiella pneumoniae* 2 例、*E. coli* 2 例、*Serratia marcescens* 1 例、*Enterobacter aerogenes* 1 例、*Enterobacter cloacae* complex 1 例)、創部 1 例 (*Enterobacter cloacae* complex)、膿 2 例 (*Enterobacter aerogenes*、*Escherichia coli*)、検出部位不明 1 例 (*Klebsiella pneumoniae*) であった。推定感染経路は以前からの保菌が 17 例、中心静脈カテーテル 2 例、尿路カテーテル 1 例、吸入器具及び口腔ケア用品から 1 例、手術部位 (手術手技) が 6 例、肺炎に起因 1 例、不明 5 例であった。

急性脳炎の届出は、令和 2 年は 2019 年より減少し、1 月に 4 歳男児、2 月に 3 歳男児の 2 例であった。原因病原体は 2 例ともインフルエンザで、1 例が A 型で、もう 1 例は不明であった。

クロイツフェルト・ヤコブ病は、60 代女性 1 例、80 代女性 2 例の計 3 例の届出があった。3 例とも病型は、古典的クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) であった。

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、男性 5 例（40 代 1 例、50 代 1 例、60 代 1 例、80 代 1 例、90 代 1 例）、女性 4 例（0 歳 1 例、70 代 1 例、80 代 2 例）であり、このうち 60 代男性 1 例及び 70 代女性 1 例については、発病した 2 日後に死亡している。血清群は、A 群 3 例、B 群 5 例、G 群 1 例であり、推定感染経路は、0 歳女性 1 例が経産道感染とされており、飛沫感染 1 例、接触感染 1 例、その他創傷感染 2 例、リンパ浮腫からの蜂窩織炎による感染 1 例、腎盂腎炎による感染 1 例、不明 2 例であった。

後天性免疫不全症候群は、3 月に男性 1 例（40 代）の届出があった。病型は AIDS であり、指標疾患は、カンジダ症であった。推定感染経路は、性行為感染（同性間性的接触）であった。

侵襲性インフルエンザ菌感染症は、1 月に 70 代女性と 60 代女性、4 月に 10 代男児、6 月に 30 代女性、9 月に 90 代女性の計 5 例の届出があった。また、10 歳男児は、ヒブワクチン接種歴が 3 回と記載されていた。

侵襲性肺炎球菌感染症の届出 16 例あり、2019 年の 23 例から減少した。男性 9 例、女性 7 例で、1 歳 1 例、7 歳 1 例、40 代 1 例、50 代 1 例、60 代 6 例、70 代 3 例、80 代 2 例、90 代 1 名であった。ワクチン接種歴は、1 歳女児及び 7 歳女児では 4 回終了しており、接種歴無しは 6 例、不明 8 例であった。

水痘（入院例に限る）の病型は、臨床診断例 1 例、検査診断例 7 例であった。男性 6 例（10 代 2 例、50 代 1 例、60 代 1 例、80 代 1 例、100 歳 1 例）、女性 2 例（20 代 1 例、40 代 1 例）であり、ワクチン接種歴は無しが 3 例、不明が 5 例であった。推定感染経路は、飛沫・飛沫核感染が 3 例、接触感染 1 例、免疫抑制状態 1 例、不明 3 例であった。

梅毒は、過去 10 年で最多であった 2019 年の 74 例より減少し、41 例の届出があった。男性 32 例（20 代 5 例、30 代 5 例、40 代 9 例、50 代 7 例、60 代 5 例、80 代 1 例）、女性 9 例（20 代 5 例、30 代 3 例、40 代 1 例）であった。患者の病型は、早期顕症梅毒 31 例（Ⅰ期：男性 16 例、女性 3 例、Ⅱ期：男性 8 例、女性 4 例）、晩期顕症梅毒 1 例（男性）、無症候（無症状病原体保有者）9 例（男性 7 例、女性 2 例）であり、無症候のうち 50 代男性 1 例は、HIV 感染症の合併があった。感染経路は性的接触が 40 例（経口 4 例、同性間 2 例、異性間 33 例、不明 4 例（重複を含む））、不明 1 例であり、同性間 2 例とも男性であった。また、性風俗産業の従事歴（直近 6 か月以内）があった事例は 4 例あり、性風俗産業の利用歴（直近 6 か月以内）があった事例は 12 例であった。推定感染地域は、奈良県

が 10 例、奈良県以外（都道府県不明を含む）が 14 例、不明は 17 例であった。

播種性クリプトコックス症 3 例は、60 代男性 1 例、70 代男性 2 例であった。60 代男性では、多発性骨髄腫での抗がん剤治療による免疫不全、70 代男性 2 例では間質性肺炎での免疫抑制剤服用に伴う免疫不全によるものと記載があった。

破傷風 2 例は、10 代男性 1 例、80 代女性 1 例であった。10 代男性では、下肢の擦過傷による創傷感染と推定され、筋肉のこわばり及び開口障害の症状があり、テタノブリン投与し症状の改善を認めたことによる臨床決定であった。80 代女性は、1 輪車に挟まれ左手関節背側にけがをして絆創膏を貼付している際、田植えを手伝ったことによる傷跡への感染が推定され、入院中の経過より、開口障害、嚥下障害、反弓緊張の症状による臨床決定であったことが記載されていた。

バンコマイシン耐性腸球菌感染症は、男性 5 例（40 代 1 例、70 代 2 例、80 代 1 例、90 代 1 例）、女性 4 例（20 代 1 例、70 代 1 例、80 代 1 例、90 代 1 例）の計 9 例の届出があった。病原体検出部位（菌種）としては、血液 4 例（*Enterococcus faecium* 3 例、Vancomycin Resistant enterococci 1 例）、尿 2 例（*Enterococcus faecium*）、膿 2 例（Vancomycin Resistant enterococci、*Enterococcus faecium*）、便 1 例（*Enterococcus faecium*）であった。感染原因・経路は、不明 4 例あり、その他腸管からの逆行性感染 1 例、腹腔内膿瘍による感染 1 例、前医からの持ち込み感染 1 例、尿道バルーン・CV カテーテルより感染 1 例、保菌者の日和見感染 1 例と推定される旨の記載があった。

百日咳は、2018 年より全数把握対象に変更にされた疾患であり、男性 3 例（10 代 1 例、20 代 1 例、30 代 1 例）、女性 6 例（6 ヶ月未満 1 例、20 代 1 例、30 代 2 例、40 代 1 例、80 代 1 例）であった。届出数は昨年の 37 例より大幅に減少した。感染経路は家族内感染（不明）2 例、不明が 7 例あった。ワクチン接種歴は、10 代 1 例及び 30 代 1 例では 4 回接種、0 歳 1 ヶ月の 1 例は未接種の記載があり、他 6 例は不明であった。

風しんの届出は 8 月に 1 例の届出があり、2019 年の 14 例よりも大幅に報告数は減少した。患者は、30 代男性であり、ワクチン接種歴は無く、血清 IgM 抗体の検出により判定された。推定感染経路及び地域は不明であった。

2. 定点把握対象疾患の流行状況

県内の定点医療機関数を表2に示す。

表2 患者定点医療機関数（令和2年4月現在）

地区	北部		中部		南部		合計
	奈良市	郡山	中和(東)	中和(西)	内吉野	吉野	
インフルエンザ定点	14(5)	14(1)	11(3)	10(3)	2	4(1)	55(13)
小児科定点	9(4)	9(1)	7(2)	6(3)	1	2(1)	34(11)
眼科定点	3	3	2(1)	2	-	-	10(1)
基幹定点	1(1)	2(2)	1(1)	1(1)	-	1(1)	6(6)
性感感染症定点	3	3	2	3	-	-	11

()内は、病原体定点数

1) 週単位報告対象疾患（週報）

週報告対象の18疾患について、週別患者報告数を表3に示す。突発性発しんの定点あたり報告数及び県の出生率（人口千対：2019年）を基に小児科定点把握対象疾患に限り定点あたり報告数を修正し比較すると、全国レベルよりも多いもの、少ないもの、全国並みのものに分けられた。全国より多かった疾患は、伝染性紅斑、突発性発しん、ヘルパンギーナであり、全国並みであった疾患は、RSウイルス感染症、咽頭結膜熱、感染性胃腸炎、手足口病、全国より少なかった疾患は、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎、水痘、流行性耳下腺炎であった。令和2年の年間定点あたり報告数で、上位5疾患の①感染性胃腸炎、②インフルエンザ、③A群溶血性レンサ球菌咽頭炎、④突発性発しん、⑤咽頭結膜熱及びヘルパンギーナについて、以下に発生状況を述べる。

(1) 感染性胃腸炎

概ね、全国と同様の推移であったが、前半の第3、4週では、全国の報告数を上回り、ピークとなった第4週の定点あたり報告数は7.82であった。第46週以降は、報告数が減少した（図1）。

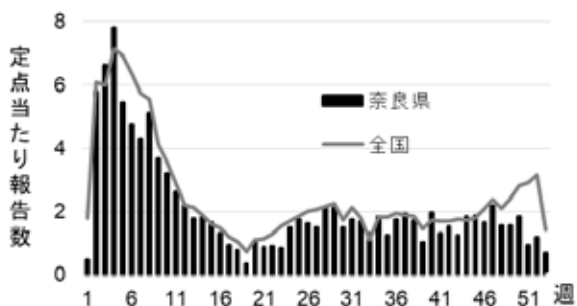


図1 感染性胃腸炎

(2) インフルエンザ

概ね、全国と同様の推移であり、例年に比べ大幅に報告数が少なかった。前半の17週まで報告が確認で

きたが、それ以後、ほぼ報告がなく、流行はなかった（図2）。

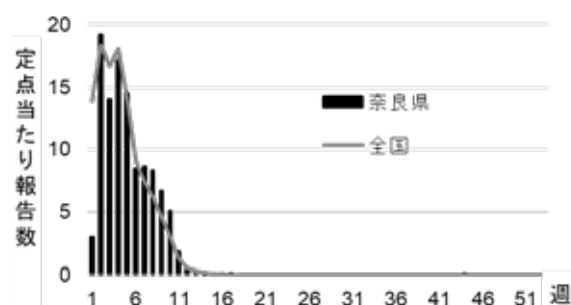


図2 インフルエンザ

(3) A群溶血性レンサ球菌咽頭炎

全国に比べ概ね少ない推移であった。ピークは、第10週の定点あたり報告数が2.38であり、第19週以降は報告が少ない状況であった（図3）。

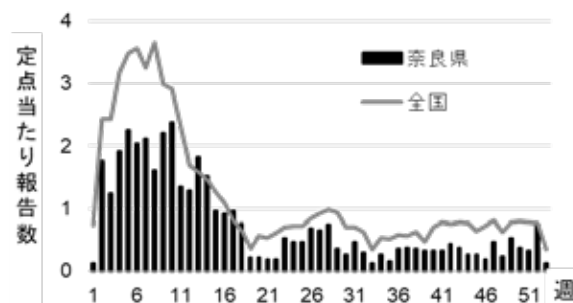


図3 A群溶血性レンサ球菌咽頭炎

(4) 突発性発しん

例年上位にない疾患であるが、全国と同程度の定点あたり報告数があり、突出して報告が多かった週が散見された。第27週では定点あたり報告数が0.79となり、最も多かった（図4）。

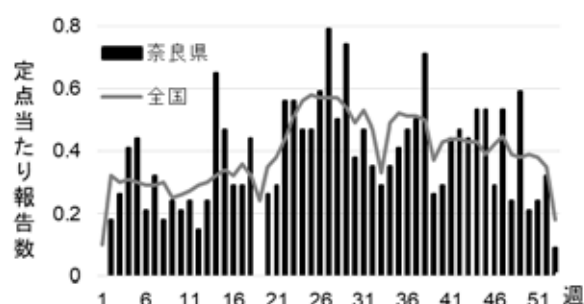


図4 突発性発しん

(5) 咽頭結膜熱及びヘルパンギーナ

咽頭結膜熱について、全国より定点あたり報告数は少ない状況であったが、第47週頃より増加し、第51及び52週に定点あたり報告数0.44とピークであった（図5）。

ヘルパンギーナについて、全国のピーク（第32週）よりも遅く、第42週にピークを迎え、定点あたり報告数0.97と全国より多い状況であった（図6）。

表3 令和2年 週単位報告対象疾患 報告数

定 点	疾患名\週	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
※	インフルエンザ	165	1052	771	945	796	467	475	458	369	278	100	25	12	10	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	RSウイルス感染症	4	20	13	17	16	12	13	18	16	9	13	8	5	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	咽頭結核熱	3	11	6	7	6	8	12	10	10	4	9	10	10	5	11	1	5	3	8	3	2	1	3	0	0	0	3	3	2	5	
	A群溶連菌咽頭炎※※	4	60	42	65	77	69	72	55	75	81	46	44	62	52	33	31	33	26	7	6	7	6	18	16	16	23	22	25	12		
	感染性胃腸炎	16	197	225	266	185	161	146	174	125	109	89	75	61	62	56	45	32	27	12	35	30	31	29	51	60	55	51	73	72		
	水痘	1	16	7	5	11	5	10	10	17	18	10	13	8	5	3	1	0	0	1	0	1	0	2	1	1	3	0	5	3	1	
	手足口病	0	6	2	6	3	10	4	4	4	5	1	1	1	6	5	6	12	4	0	0	3	1	4	4	4	5	5	2	5		
	伝染性紅斑	2	51	26	26	25	24	8	17	12	17	10	9	12	6	6	5	3	4	3	1	2	1	2	0	0	0	1	0	0	1	
	突発性発しん	0	6	9	14	15	7	11	6	8	7	8	5	8	22	16	10	10	15	0	9	10	19	19	16	16	20	27	17	25		
	ヘルパンギーナ	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3	2	4	4	0	1	0	1	0	1	0	3	2	5	0	3
	流行性耳下腺炎	0	1	0	0	1	0	0	0	2	2	0	1	0	0	2	0	0	2	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	1	2
	急性出血性結膜炎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	流行性角結膜炎	1	1	1	0	1	5	3	3	2	4	1	1	1	1	0	0	1	0	2	3	2	0	0	1	7	4	1	4	0	2	
	細菌性髄膜炎	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	無菌性髄膜炎	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	マイコプラズマ肺炎	0	2	5	2	1	1	1	1	6	2	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
クラミジア肺炎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
感染性胃腸炎(ロカウイルス)	0	0	0	1	0	1	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
定 点	疾患名\週	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	合計	(県) 定 点 当	(全国) 定 点 当	(修正・県) 定 点 当			
※	インフルエンザ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5929	107.8	114.27	—			
	RSウイルス感染症	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	174	5.12	5.74	5.96		
	咽頭結核熱	5	7	3	1	9	8	5	4	5	8	6	9	4	1	1	3	1	11	3	14	9	15	15	3	311	9.15	11.14	10.65	—		
	A群溶連菌咽頭炎※※	9	16	10	4	5	12	13	12	11	11	11	11	15	13	9	9	6	16	8	16	8	13	11	25	4	1355	39.85	63.52	46.37		
	感染性胃腸炎	51	60	57	45	63	42	60	66	58	35	67	45	52	42	63	64	56	74	53	53	53	63	32	40	23	3814	112.18	133.24	130.55		
	水痘	2	2	3	1	3	4	8	1	9	5	8	5	9	10	8	8	5	10	3	1	6	3	3	3	3	261	7.68	10.08	8.94		
	手足口病	2	8	8	2	4	3	3	5	2	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	160	4.71	5.83	5.48		
	伝染性紅斑	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	279	8.21	5.79	9.55		
	突発性発しん	13	16	12	10	12	14	16	17	24	9	10	15	16	15	18	18	10	18	8	20	7	8	11	3	675	19.85	20.79	23.10			
	ヘルパンギーナ	0	3	12	3	7	19	18	20	21	15	19	26	33	30	27	7	4	4	5	3	3	0	0	0	0	311	9.15	8.02	10.65		
	流行性耳下腺炎	0	1	0	1	0	1	0	0	2	0	3	2	1	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	1	35	1.03	2.56	1.20		
	急性出血性結膜炎	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0.3	0.27	—		
	流行性角結膜炎	0	2	6	0	3	0	2	0	1	2	0	1	3	1	3	3	3	1	1	1	2	2	2	2	0	89	8.9	13.08	—		
	細菌性髄膜炎	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	7	1.17	0.86	—		
	無菌性髄膜炎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	8	1.33	0.95	—		
	マイコプラズマ肺炎	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	30	5	7.36	—		
クラミジア肺炎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.17	0.12	—			
感染性胃腸炎(ロカウイルス)	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	1.67	0.52	—			

※インフルエンザ

※※A群溶血性レンサ球菌咽頭炎はA群溶連菌咽頭炎と表示している

※)人口千対出生数(出生率)からみた新生児数の全国との比較:全国7.0,奈良県6.3(ともに2019年値),突発性発しんからみた捕捉割合を20.79/19.85として,本県の定点点当たり報告数に,(20.79/19.85x6.3/7.0)を乗じて計上してみた。

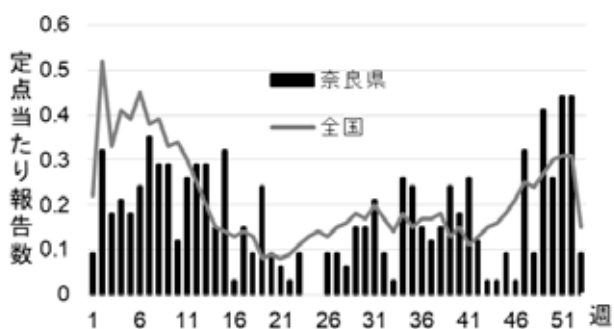


図5 咽頭結膜熱

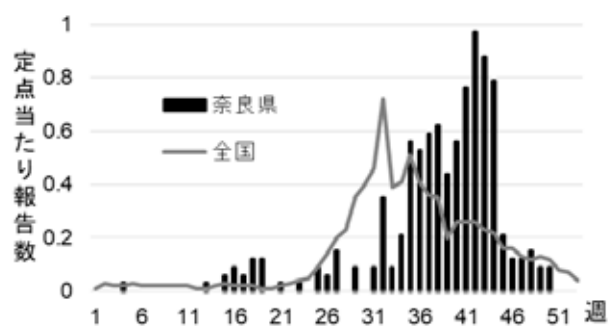


図6 ヘルパンギーナ

2) 月単位報告対象疾患（月報）

月報対象の性感染症4疾患及び薬剤耐性菌感染症3疾患について月別の報告数を表4に示す。

性感染症は、4疾患とも微増していたが、昨年からはほぼ横ばいであった。なお、4疾患とも15歳未満からの報告はなかった。薬剤耐性菌感染症は、ここ3年減少傾向にあるが、過去10年間の全国平均の定点当たり報告数より多い状況である。また、3疾患とも70歳以上が最も多かった。

考 察

令和2年は、新型コロナウイルス感染症の感染拡大による受診控えや感染防止対策の影響からか、他感染症の報告が大幅に減少したが、呼吸器症状を呈する疾患（レジオネラ症等）の届出数はやや増加する傾向が

あった。

その中で、腸管出血性大腸菌感染症は大幅に増加しており、過去10年で最多であった。保育園での集団感染や家庭内感染が目立ち、10歳以下が多かった。

また、日本紅斑熱やライム病等、例年では稀であったマダニ刺症による疾患が数例報告された。これについては、週報やホームページ等で、情報提供および注意喚起を行った。

レジオネラ症はここ数年増加傾向にあるが、過去10年で最多であった。

第50週に届出があったカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症については、病原体サーベイランスに基づき遺伝子解析結果により、奈良県内で初めて、OXA-48型のカルバペネマーゼ産生菌（CPE）であることが判明している。奈良県における薬剤耐性菌による感染症届出数は、全国と比較して大変多く、一部を除き、年次ごとに増加傾向にあり、今後、県内での広がりを監視する必要がある。

インフルエンザ等の定点把握対象疾患（五類感染症）について、例年流行があり、流行期には、週報やホームページ等で、情報提供および注意喚起を行っていたが、新型コロナウイルス感染症に対する感染予防対策等も講じた結果、令和2年では流行は確認できなかった。

今後も感染症に関する情報収集と迅速な情報提供を心がけ、感染症対策の一助となるよう努めたい。

謝 辞

奈良県感染症発生動向調査事業にご協力いただきました奈良県医師会、各医療機関の方々及び関係機関の方々に深謝いたします。

表4 令和2年 月単位報告対象疾患 報告数

		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	総数
性器クラミジア感染症	男	7	8	6	9	10	4	7	3	11	3	8	12	88
	女	8	12	9	10	9	6	7	8	4	7	11	4	95
性器ヘルペスウイルス感染症	男			3			1	1	2	1			2	10
	女	4	8	3	2	6	4	2	3	7	6	5	3	53
尖圭コンジローマ	男	1	1	1	2	3	1	1	0	2	0	2	0	14
	女	4	1	2	6	0	1	1	2	0	1	2	1	21
淋菌感染症	男	3	4	3	2	5	2	5	6	3	4	4	2	43
	女		2	2			1						1	6
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症	男	18	34	25	19	24	28	12	19	28	18	18	18	261
	女	21	11	11	11	14	16	7	14	14	14	15	9	157
ペニシリン耐性肺炎球菌感染症	男	1	1	2				1				3		8
	女	2	3		1	1					2			9
薬剤耐性緑膿菌感染症	男	1												1
	女					1								1

第3章 調査研究・報告

第3節 資 料

トップダウン方式による測定不確かさの評価の試行

米田正樹・南浦茉奈・上床知佐奈・竹田依加・立本行江

Attempt of the Top-down Approaches for the Evaluation of Measurement Uncertainty

Masaki YONEDA・Mana MINAMIURA・Chisana UWATOKO・Erika TAKEDA
and Yukie TATSUMOTO

緒言

我が国の食品衛生検査は「食品衛生検査施設における検査等の業務管理」において規定されている業務管理要領の中で、測定不確かさの評価は「検討に努めること」と努力事項として記載されている¹⁾。近年、我が国の食品衛生検査を国際的に整合させるために、厚生労働科学研究費補助金事業（食の安全確保推進研究事業）「食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究」において、業務管理要領の改定案の検討が行われ、その報告書（以下、報告書とする）で、技術上の必要事項として「測定不確かさの評価」が記述され、改定後の業務管理要領において必要事項となる可能性が生じた²⁾。

測定不確かさは、一般的な評価方法としてボトムアップ方式とトップダウン方式があるが³⁻⁵⁾、その中でもトップダウン方式は、再現精度の値等を用いる統計処理により測定不確かさを評価する方法で、対象試料が多様で前処理工程が複雑な残留農薬検査等へ適用でき、評価には妥当性評価等で得られた際のデータを用いることが可能とされている。

そこで、改定後の業務管理要領に備えるため、報告書で例示された不確かさ評価標準作業書（トップダウン方式）内で示された4つの図表を参考に測定不確かさの評価を試みた。

対象および方法

1. 対象

評価対象は、当センターで採用している検査実施標準作業書のうち残留農薬、残留動物用医薬品および総アフラトキシン等の微量汚染物質の前処理工程が複雑な検査実施標準作業書とした。

2. 方法

測定不確かさへの寄与成分を特定するために、報告書で例示された図を参考にして、「分析フロー概要および不確かさ特性要因図」を検査実施標準作業書毎に作成した(図)。また、同様に「使用試薬及び機器の記録」と「検査結果の記録」の表を検査実施標準作業書毎に作成した。

トップダウン方式による測定不確かさの評価は、食

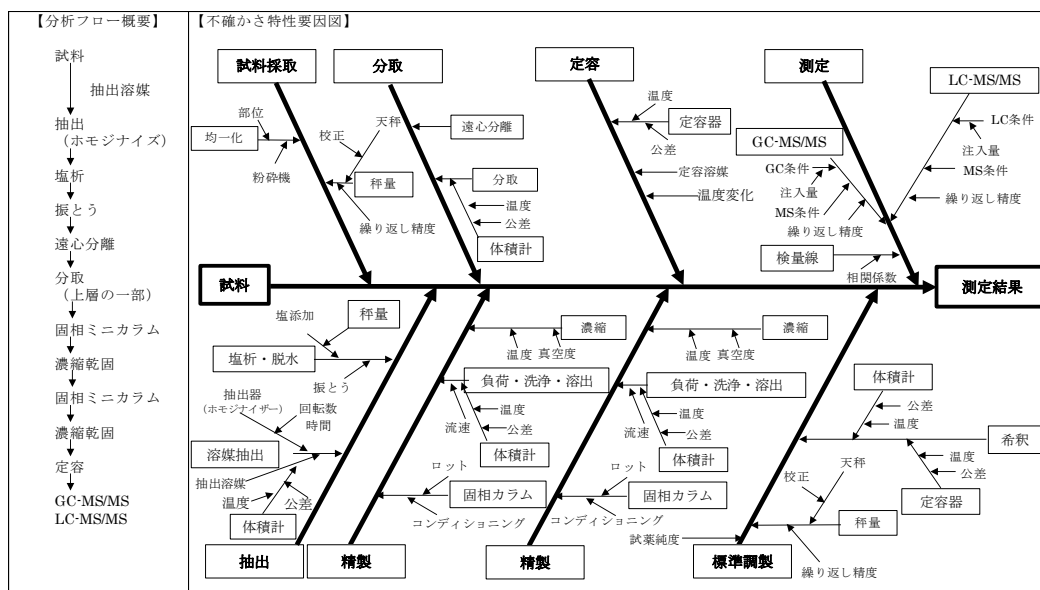


図 分析フロー概要および不確かさ特性要因図の例（残留農薬）

品中に残留する農薬等に関する妥当性評価ガイドライン⁶⁾に基づき試験法導入時に既に得ていた妥当性評価実施時の測定値を「不確かさ評価のための算出手順の記録」内の指示に従い入力することで行った。

結 果

1. 特性要因図

対象とした全ての検査実施標準作業書の各工程を振り返り、測定不確かさへの寄与成分の特定を可能な限り行い図を作成した。

2. 使用試薬及び機器の記録

例示された様式を参考にして標準品を含む使用試薬は全て既存の試薬管理台帳の記録からメーカー名、グレード、ロット番号等を精査して作成した。また、機器等の記録はメーカー名、機種名およびシリアルNo.等について既存の備品台帳の内容を精査するとともに、各機器を目視で確認し作成した。

3. 検査結果の記録

検査結果の記録は新たな記録表は作成せず、妥当性評価を実施した際に作成していた既存の表を利用することとした。

4. 不確かさ評価のための算出手順の記録

例示された不確かさ評価のための算出手順の記録は一つの化合物について評価する様式となっていたため、複数化合物について一斉に評価できるように一部改変した後、各検査実施標準作業書の測定対象化合物について既存の測定データを入力し不確かさ評価のための算出手順の記録を作成した。

考 察

不確かさの推定に関する報告は一部の地方衛生研究所からされているが⁷⁾⁸⁾、現行の業務管理要領では努力事項で留まっていることもあり、当センターではこれまで手つかずであった。今回、例示された様式等を元にして不確かさの推定を初めて試みたが、検査実施標準作業書はそれ程数多くはない当センターの場合でも、特性要因図の作成、使用試薬及び機器の記録および不確かさのための算出手順の記録の作成にはかなりの時間を要した。特に特性要因図の作成は作成しようとする検査実施標準作業書に従って検査を経験していないと要因を見落とす可能性が高くなり、正確な図を作成することが困難であると感じられた。また、妥当性評価を実施した際のデータを一定の保存場所に整理して保存していない場合は、過去に在籍していた検査員の測定データを各分析装置の記録装置等から掘り起こす必要性が生じる等、不確かさ評価のための算出

手順の記録の作成には相当の手間と時間を要する可能性が考えられた。残留農薬等については不確かさを評価できたので、今後、機器更新等の際に実施する妥当性評価時の比較のための基礎データとしたい。

今回はトップダウン方式に適した検査実施標準作業書を抽出して試行の対象とした。添加回収試験が困難な放射製物質の検査等は、ボトムアップ方式が用いられていることもありこれらの検査実施標準作業書は今回の試行の対象には含めなかった。今後、残りの検査実施標準作業書についても順次不確かさの推定を試みるとともに、一部の検査員だけでなくセンター内全ての検査員の間で不確かさの推定に関する理解を深める必要があると考えられた。

いずれにしても、センター内での不確かさの推定に関する取組は始まったばかりであるため、今後、なるべく多くの検査員間で協力しながら多くの試行錯誤を重ねることにより効果的なものにしていく必要があると考えられた。

文 献

- 1) 医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「食品衛生検査施設における検査等の業務管理について」、衛食第8号、(平成9年1月16日)
- 2) 渡辺卓穂, 石井里枝, 吉田栄充, 他:平成30年度厚生労働科学研究費補助金(食の安全確保推進研究事業)食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究 研究分担報告書 ISO/IEC 17025 認定取得に向けた試験所の検討に関する研究, 27-61 (2017)
- 3) EURACHEM/CITAC Guide CG4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement 3rd ed., EURACHEM/CITAC (2012)
- 4) CAC/GL 59-2006: Guidelines on estimation of uncertainty of results, FAO/WHO (2011)
- 5) JAB RL510: 2015, JAB NOTE 10 試験における測定の不確かさ評価実践ガイドライン, (公財)日本適合性認定協会 (2015)
- 6) 医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」、食安発第1115001号、(平成19年11月15日, 食安発1224第1号, 平成22年12月24日一部改正)
- 7) 牟田朱美, 宮崎悦子, 中牟田啓子, 他:日本食品化学学会誌, 25, 167-173 (2018)
- 8) 大坂郁恵, 山元梨津子, 吉田栄充, 他:埼玉県衛生研究所報, 54, 34-39 (2020)

奈良県における結核菌の分子疫学調査（2019.4-2020.12）

森村実加・田中慶哉・辻本真弓・佐伯美由紀・内田美枝

Molecular Epidemiological Research of *Mycobacterium tuberculosis* in Nara Prefecture (2019-2020)

Mika MORIMURA・Keiya TANAKA・Mayumi TSUJIMOTO・Miyuki SAEKI and Yoshie UCHIDA

緒言

結核は、国内患者数および罹患率（人口10万人に対する新登録結核患者数）が減少傾向にあるものの、2019年の新登録結核患者数は14,460人報告されており、我が国の主要な感染症である（厚生労働省：2019年結核登録者情報調査年報集計結果、https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/000175095_00003.html）。奈良県における2019年の新登録結核患者数は186人で前年（156人）より増加した。罹患率は14.0で、前年値（11.7）より増加し、全国値（11.5）より高い値となった。

平成28年に「結核に関する特定感染症予防指針」が改正され、菌が分離された全患者の結核菌株を確保し、その検査結果を積極的疫学調査等に活用するよう努めることと明記され、地方衛生研究所では遺伝子型別手法である Variable numbers of tandem repeats (VNTR) 型別による解析が進められている。奈良県と奈良市は2013年度から結核菌分子疫学調査事業として県内患者由来の結核菌株を収集し、当センターにおいてVNTR型別を実施している。

今回、2019年4月から2020年12月に当センターへ搬入された結核菌について、VNTR型別を実施した結果をまとめたので報告する。また、BCG株との鑑別のため搬入された菌株の解析結果についても報告する。

材料と方法

1. 材料

医療機関等で結核菌と同定され、2019年4月から2020年12月までに当センターへ搬入された95株およびBCG株との鑑別1株を用いて試験を実施した。患者情報は届出内容及び保健所調査情報に基づいた。

2. 方法

1) VNTR 型別

結核菌からのDNA抽出方法は既報¹⁾のとおり。

VNTR型別は、国内標準法として提唱されているJapan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR法²⁾を実施した。PCR条件は既報¹⁾のとおり

とし、得られたPCR産物は、マイクロチップ電気泳動装置MultiNA (MCE-202; 島津製作所) およびアガロースゲルによる電気泳動を実施し、測定値から各領域の反復数を算出した。全12領域の反復数が完全に一致した菌株群は、同一クラスターと判定した。

2) 遺伝系統の推定

VNTR型別結果のパターンから遺伝系統を推定するツール³⁾を利用した。

3) BCG株との鑑別

膀胱がんと診断され、BCG膀胱注入療法中である結核性腹膜炎患者の腹水から分離された株の解析を行った。

結果

1. 検体

結核菌95株の患者年齢階級別および性別菌株数を表1に示す。年齢階級別で見ると、70歳以上が69株(72.6%)あり、高齢者由来の菌株が多かった。さらに外国生まれ患者菌株は6株(6.3%)あり、20歳から39歳の女性であった。

表1 患者年齢階級別および性別菌株数

年齢階級	男性	女性	計
0～19	0	0	0
20～29	0	6(5)	6(5)
30～39	3	1(1)	4(1)
40～49	3	1	4
50～59	4	3	7
60～69	2	3	5
70～79	16	6	22
80～89	17	12	29
90～	10	8	18
計	55	40(6)	95(6)

()は外国生まれ患者株数

2. VNTR 型別

VNTR型別の結果、結核菌95株は75パターン(JATA(12)-VNTR型)に分かれ、30株(31.6%)が10クラスターを形成した。

3. 遺伝系統の推定

JATA(12)-VNTR 型から遺伝系統を推定した結果、北京祖先型 56 株 (58.9%), 北京新興型 17 株 (17.9%), 非北京型 22 株 (23.2%) であると推定された (図 1)。

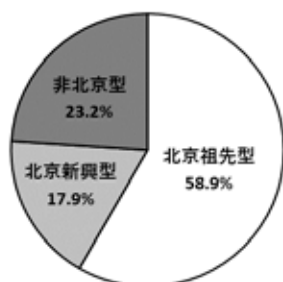


図 1 遺伝系統の推定

北京祖先型、北京新興型、非北京型の年齢群別構成割合を図 2 に示す。

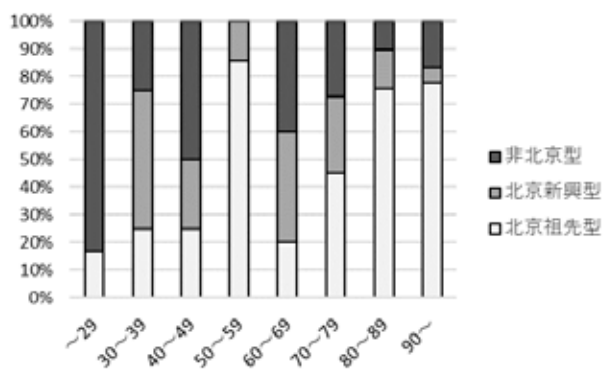


図 2 年齢群別遺伝系統の推定

4. BCG 株の解析

結核性腹膜炎の症状を呈し BCG 株からの感染が疑われた患者分離株について JATA(12)-VNTR 型別を実施したところ BCG Tokyo 株と一致した (図 3)。また、確定診断を行うため、当該病院から外部検査所に依頼した結果とも一致した。

菌株番号	JATA(12)-VNTR												患者情報
	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	
BCG Tokyo	0	2	0	3	3	1	5	5	3	10	5	1	
tb20005	0	2	0	3	3	1	5	5	3	10	5	1	77歳女性

図 3 BCG 株との比較

考 察

2019 年から 2020 年のうち JATA(12)-VNTR 型が全て一致した菌株群は 10 クラスターあった。そのうち 1 クラスターは夫婦であった。一方で疫学的関連情報がなく一致した菌株群は 9 クラスター見られた。

JATA(12)-VNTR 法は、疫学的関連性の低い菌株を含むサーベイランス分析において分離できず同一型になる菌株が多く見出されている。これらの菌株をより厳密に異同判定するため、解析領域を追加し分解能を向上していく必要があると思われる。

北京型・非北京型の分類では、北京型株が 76.0% で、全国的な傾向と一致した。年齢群別では、30 歳未満を除くどの年齢群でも北京型が半数以上を占めた。30 歳未満では、6 株中 5 株が外国生まれ患者菌株で非北京型であった。多数に感染させる可能性が高い若年層の非北京型株は外国生まれ患者による影響が大きいと思われる。奈良県においても外国人結核の感染伝播の対策が求められる。

一方、ウシ型結核菌の BCG は結核に対するワクチンとしてだけでなく、膀胱がん治療薬としても使用されている⁴⁾。今回結核性腹膜炎患者の腹水から分離された株の JATA(12)-VNTR 型の比較を行うことにより、結核菌と BCG 菌鑑別の一助となった。

2013 年度から開始した事業により、2020 年までに結核菌 403 株の JATA(12)-VNTR 型別結果が得られた。2020 年までのクラスター形成率は 45.9% (185 株 / 403 株) で、2019 年度まで (43.6%) よりやや増加した。遺伝系統の推定も含めて、県内患者由来株についてさらに解析を進めたいと考えている。

今後も科学的根拠となる分子疫学解析情報を提供するため、県内の結核菌 VNTR 型別データベースを充実させていき、奈良県の結核対策に寄与していきたい。

謝 辞

本報は、奈良県ならびに奈良市結核菌分子疫学調査事業で得られたデータを解析してまとめたものであり、関係機関の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 辻本真弓, 田邊純子, 橋田みさを, 他: 奈良県保健研究センター年報, 51, 65-66 (2016)
- 2) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 結核, 83, 673-678 (2008)
- 3) Seto J, Wada T, Iwamoto T, et al.: *Infect. Genet. Evol.*, 35, 82-88 (2015)
- 4) Morales A, Eiding D, Bruce AW, et al.: *J. Urol.*, 116, 180-183 (1976)

新型コロナウイルス遺伝子検査法の検討

浦西洋輔・松浦侑輝・山崎聖子・榮井 毅

Development of Detection Methods for Coronavirus Disease 2019 (2019-nCoV)

Yosuke URANISHI・Yuki MATSUURA・Seiko YAMAZAKI and Takeshi SAKAI

緒言

2019年12月に中国で初めて確認された新型コロナウイルス(2019-nCoV)感染症は、国内では2020年1月14日¹⁾に、奈良県では同年1月28日に初めて患者が確認された。同年3月11日、世界保健機関(WHO)は世界的な感染拡大の状況、重症度等から新型コロナウイルス感染症をパンデミック(世界的な大流行)とみなせると表明した。国内では、新型インフルエンザ等対策特別措置法(平成24年法律第31号)第32条の規定に基づき、同年4月7日～5月25日までの間新型コロナウイルス感染症緊急事態宣言がなされた(内閣官房新型コロナウイルス感染症対策推進室:新型コロナウイルス感染症緊急事態宣言の概要, https://corona.go.jp/news/news_20200421_70.html)。

新型コロナウイルス感染症対策として、PCR検査を適切に実施することは早期診断及び感染拡大防止等の観点から重要である。しかしながら、世界的な感染拡大によりPCR検査の需要が大幅に増加し、検査試薬の安定供給が厳しくなった。そのため、複数の製品を用いた検査体制を構築するよう、厚生労働省より通知が発出された²⁾。そこで、当センターにおいても複数の製品を用いて検査が可能な体制を構築するため、今回RNA抽出が不要な2種の遺伝子検査法について検討を行ったので報告する。

対象と方法

1. 検討対象

評価に用いた検体は、2020年に行政検査で搬入され、マニュアル³⁾に従いN2セットの結果を判定した鼻咽頭ぬぐい液検体から次のとおり選定した。

- ・陽性検体：Ct値 \leq 30, 5検体
- ・陰性検体：不検出かつ無症状者, 10検体
- ・弱陽性検体： $35 \leq$ Ct値 \leq 40かつ2施行のうち1施行でのみ陽性の検体, 2検体

なお今回の選定条件は、国立感染症研究所による新型コロナウイルス遺伝子検査法の性能評価条件⁴⁾と異なるが、①国立感染症研究所において既に一定の性能

評価がなされていること、②凍結融解後の臨床検体の正確な2019-nCoV RNAコピー数は不明であることから、上記の条件で検体を選定した。

2. 試薬等

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific), Primer/ProbeSet (2019-nCoV) (タカラバイオ⁵⁾、2019新型コロナウイルス検出試薬キット(株)島津製作所、以下島津キット)、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ⁶⁾、以下Takaraキット)、エタノールは試薬特級(富士フイルム和光純薬⁷⁾)を使用した。

3. 検査方法

1) 前処理(各検査法共通)

ハンクス液入滅菌スピッツ管内に採取された鼻咽頭ぬぐい液を、ボルテックスミキサーおよび激しい転倒混和により懸濁した後、3,000 rpmで10分間遠心分離し、上清を回収した。なお、各検査法評価の際は、 -80°C で凍結保存した本上清を検査当日解凍し使用した。

2) RNA抽出およびTaqManプローブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR法(従来法)

QIAamp Viral RNA Mini Kitを用い、添付のプロトコルに従い前処理液からウイルスRNAを抽出した。抽出したRNAを用い、マニュアル³⁾に従い2019-nCoVを検出した。

3) Takara法

Takaraキットを用い、添付のプロトコルB(熱反応とリアルタイムRT-PCRを別々のチューブで実施)に従い2019-nCoVを検出した。

4) 島津法

島津キットを用い検査を行った。島津法においても、Takara法と同様に熱反応とリアルタイムRT-PCRを別々のチューブで実施し、熱反応系はプロトコルの1.5倍スケールで行った。その他は添付のプロトコルに従って処理を行い2019-nCoVを検出した。

4. 性能評価方法

陽性検体 5 検体のうち陽性と判定できた検体数、及び陰性検体 10 検体のうち陰性と判定できた検体数にて評価を行い、従来法との陽性一致率及び陰性一致率がともに 90%以上であれば、従来法の代替手法として使用可能と判断することとした。これらの試験は 2 施行行い、1 施行でも増幅曲線の立ち上がりが見られた場合は陽性と判定することとした。

また、実際の検査では検出下限値 (Ct 値 40) 付近で増幅曲線の立ち上がりが見られることがあり、判定に苦慮することがある。そのため、弱陽性検体 2 検体を用い、従来法の結果を比較した。この試験は 5 施行行い、1 施行でも増幅曲線の立ち上がりが見られた場合は陽性と判定することとした。

結果と考察

1. 性能評価

従来法と各検査法との比較結果を表に示す。凍結融解後の従来法では、検体搬入時は弱陽性であった検体での増幅曲線の立ち上がりが見られなかった。「ゲノム試料の収集及びゲノムデータの取扱いに関するガイドライン」⁵⁾によると、核酸を抽出する前に検体の凍結融解を繰り返すとゲノム試料の品質に影響を及ぼし得るとある。今回の検討においても、検体搬入時の状態から凍結融解を 1 度行っているため、RNA の品質に影響を及ぼし、増幅曲線の立ち上がりが見られなかったと考えられた。

Takara 法と従来法を比較すると、陽性検体、陰性検体、弱陽性検体いずれも一致率 100%であった。このことから、Takara 法は従来法の代替手法として使用可能であると考えられた。

島津法と従来法を比較すると、陽性検体の一致率 100% (5/5)、陰性検体の一致率 90% (9/10) であり、島津法も従来法の代替手法として使用可能であると考えられた。一方、従来法では増幅曲線の立ち上がりが見られなかった弱陽性検体について、島津法では立ち上がりが見られた (5 施行のうち、2/5 及び 1/5 で陽性)。本結果から、島津法が従来法より感度が高いのか、非特異的な増幅反応を示すのか不明であるが、島津法で陰性検体及び弱陽性検体で立ち上がりが見られた検体の Ct 値は 37.7~39.7 であることから、Ct 値が 40 付近で増幅曲線の立ち上がりが見られた場合は、再検査を行う等結果の取扱いに注意が必要であると考えられた。

2. 検査所要時間の比較

各検査法における検体前処理から結果判定までの所要時間を図に示した (20 検体 2 施行想定)。なお、反

表 各検査法と従来法との一致度比較

	検体搬入時結果	凍結融解後結果 ^{**}		
	従来法	従来法	Takara法	島津法
陽性	5検体	5検体	5/5 (100%)	5/5 (100%)
陰性	10検体	10検体	10/10 (100%)	9/10 (90%)
弱陽性	2検体	0検体	0/0 (100%)	2/0 (0%)

※キット法結果/従来法結果、()内は従来法との一致率

Time	1h		2h		3h		4h		5h	
	前処理	試薬操作	RNA抽出	試薬操作	前処理	試薬操作	検体処理	試薬操作	RealTimePCR	
従来法	前処理	試薬操作	RNA抽出	試薬操作	RealTimePCR					
Takara法	前処理	試薬操作	検体処理	試薬操作	RealTimePCR					
島津法	前処理	試薬操作	検体処理	試薬操作	RealTimePCR					

図 各検査法別所要時間の比較 (20 検体 2 施行想定)

応試薬作成の時間については、前処理中に別の作業員が作成するため、所要時間には含めていない。各検査法間で PCR 開始までの時間差はさほど無く、リアルタイム RT-PCR の反応時間に差が生じた。

まとめ

RNA 抽出が不要な 2 種の遺伝子検査法について、従来法と比較を行った。結果、2 種類とも従来法の代替手法として使用可能と考えられたが、一部の検体で従来法と一致しない結果もあったことから、検出限界付近の結果が得られた場合は、再検査を実施するなど慎重な判断が必要と考えられた。

文献

- 1) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，41，82-84 (2020)
- 2) 新型コロナウイルス感染症対策推進本部医政局経済課事務連絡「新型コロナウイルス感染症に係る PCR 検査試薬等の十分な確保について (依頼)」(令和 2 年 4 月 24 日)
- 3) 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 令和 2 年 3 月 19 日：国立感染症研究所。
- 4) 新型コロナウイルス (2019-nCoV) の遺伝子検査法の性能評価について 令和 2 年 3 月 13 日：国立感染症研究所。
- 5) 医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知「ゲノム試料の収集及びゲノムデータの取扱いに関するガイドラインについて」薬生薬審発 0118 第 1 号 (平成 30 年 1 月 18 日)