

茨城県衛生研究所年報

第 45 号

Annual Report of Ibaraki Prefectural
Institute of Public Health

2 0 0 7

茨城県衛生研究所

はじめに

近年、東南アジアをはじめ、世界各国で高病原性トリインフルエンザ（H5N1）の発生と人への感染が報告されております。又、環境の著しい変化と地球温暖化の影響が本来生息できないであろう動物等が各地域へ拡散し、生態系の乱れによる動物由来の感染症の発生、拡大による健康危機管理も危惧されているところです。

国、県でも各種の対策や行動計画を立て、地域では保健所等が中心となって様々な対策、及び様々な試みがなされ始めております。しかしながら世界的大流行の際には、もはや封じ込めは不可能に近く、いかにして拡散を防止するか、罹患者や死亡者を最小限に止める対応が求められます。

このため、何時でもこの様な状況が起こり得ると言う現実を認識しながら、今後は法律やシステムの整備をはじめ、多くの住民の方々に過度の不安を与えることなく、正確な情報の提供と「防災」啓発を行うことが重要と考えられます。

当衛生研究所におきましても、普段から試験、検査、調査、研究はもとより情報の収集、解析を通じて「健康危機管理における技術的中核」としての役割を念頭に置いて、職員一丸となり高い意識を持って、不断の努力を重ねております。

関係者の方々におかれましては、今後ともなお一層のご指導、ご助言、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

平成19年12月28日

茨城県衛生研究所長 藤 枝 隆

目 次

第1章 総 説

1 沿 革	3
2 組織と業務内容	4
3 職員の配置	5
4 平成18年度歳入歳出決算書	6
5 重要な機械及び器具	7
6 庁舎平面図	11

第2章 業務の概要

1 企画情報部	15
2 微生物部	19
3 理化学部	23
4 遺伝子科学部	27

第3章 調査及び研究報告

1 ダイズ加工食品からの遺伝子組換え体 (GMO) 検知法の検討	33
ー大豆加工食品における抽出効率の検討ー 中村美樹、山本浩嗣、白田忠雄、柳岡知子、村上りつ子	
2 イオンクロマトグラフポストカラム法を用いた食品中臭素酸分析	39
白田忠雄、久保田京子、山本浩嗣、中村美樹、柳岡知子、村上りつ子	
3 農作物中の残留農薬一斉分析法の検討	46
ーGC/MS、GC/MS/MS によるスクリーニング法の検討ー 柳岡知子、中村美樹、久保田京子、山本浩嗣、白田忠雄、村上りつ子	
4 茨城県におけるブタインフルエンザウイルスの分子進化学的調査 (第一報)	54
山崎良直	
5 腸管ウイルス感染症の免疫応答、及び免疫変容に関する調査 - I -	58
白井 睦	
6 農産物の機能性簡易スクリーニング法の開発とその応用	62
上野清一	

第4章 学会発表抄録

1 肝細胞癌 (McA-RH777) 移植ラットにおける高コレステロール血症の	71
発症メカニズムについて 本多 彰、土井幹雄、平山 剛、池上 正、松崎靖司	
2 Hypercholesterolemia in rats with hepatomas :	72
increased oxysterols accelerate cholesterol efflux but do not inhibit cholesterol biosynthesis nor stimulate bile acid production Akira Honda, Takeshi Hirayama, Yasushi Matsuzaki, Teruo Miyazaki, Tadashi Ikegami, Mikio Doy, Guorong Xu, Michael Lea and Gerald Salen	
3 LC-MS/MSによる血中胆汁酸合成マーカーの高感度分析	73
本多 彰、土井幹雄、山下幸和、沼澤光輝、池上 正、松崎靖司、宮崎 浩	

4	PROTEOMIC PROFILING OF FORMALIN-FIXED PATHOLOGICAL TISSUES BY MASS SPECTROMETRY (I) Akira Honda, Mikio Doy, Tomoyo Nakano, Yasuhiko Bando, Yasushi Matsuzaki and Hiroshi Miyazaki	74
5	鳥インフルエンザ血清抗体検査の手法について 山崎良直	75
6	Chromosome polymorphism found in wild-caught Japanese sika deer, <i>Cervus nippon</i> Cumulative data in Japan M.SHIRAI, H.MIYAZAKI, M.DOY and S.MURAMATSU	76
7	BrdUによるSCEsの発生にたいするアントシアニンの効果 白井 睦、土井幹雄	77
8	マイトマイシンCによりウマのリンパ球に誘発された姉妹染色分体交換の頻度 村松 晋、白井 睦	78
9	有害物質を含有する家庭用品の検査について 石井崇司、福田 聡、大曾根圭子、小山田則孝	79
 第5章 他誌掲載・論文要旨		
1	Hypercholesterolemia in rats with hepatomas : increased oxysterols accelerate efflux but do not inhibit biosynthesis of cholesterol Takeshi Hirayama, Akira Honda, Yasushi Matsuzaki, Teruo Miyazaki, Tadashi Ikegami, Mikio Doy, Guorong Xu, Michael Lea and Gerald Salen	83
2	Dehydroepiandrosterone and its derivatives : potentially novel anti-proliferative and chemopreventive agents Yasushi Matsuzaki and Akira Honda	84
3	胃炎・胃癌の実験モデル② 白井 睦、松井裕史	85
4	紫甘藷抽出アントシアニンによる細胞増殖影響 白井 睦、宮崎浩子、田中正男、松井裕史	86
5	バイオケミカルエンジニアリングの基礎から有用物質生産・環境調和技術まで 白井 睦	87
6	Robertsonian translocations in the wild population of Japanese Sika deer (<i>Cervus nippon</i>) M. Shirai, and S. Muramatsu	88
7	Highly sensitive quantification of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in human serum by LC-ESI-MS/MS Akira Honda, Kouwa Yamashita, Mitsuteru Numazawa, Tadashi Ikegami, Mikio Doy, Yasushi Matsuzaki and Hiroshi Miyazaki	89
8	Highly sensitive assay of HMG-CoA reductase activity by LC-ESI-MS/MS Akira Honda, Yuji Mizokami, Yasushi Matsuzaki, Tadashi Ikegami, Mikio Doy and Hiroshi Miyazaki	90
 第6章 研究報告書要旨		
1	茨城県における薬剤耐性HIV-1調査体制確立のための研究 —首都圏近県地域における薬剤耐性変異株の発生動向— 原 孝、増子京子、大石 毅、千野根純子、片岡俊輔、山上隆也、畦上由佳	93

第1章 総説

1. 沿革

- 昭和 30 年 12 月 厚生省通達に基づき、それまで衛生部に設置されていた細菌検査所及び衛生試験所（昭和 6 年頃警察部衛生課所属設置）の 2 機関が統合されて、茨城県衛生研究所として設置された。（所在地 水戸市三の丸県庁構内、建物鉄筋コンクリート 2 階建）
- 昭和 34 年 4 月 庶務部、細菌部、化学部及び食品衛生部の 4 部制が敷かれる。
- 昭和 38 年 4 月 庶務部、微生物部、化学部、食品衛生部及び放射能部の 5 部制となる。
- 昭和 40 年 10 月 水戸市愛宕町 4 番 1 号庁舎竣工、移転
- 昭和 47 年 6 月 放射能部が環境局公害技術センターに移管され、4 部制となる。
- 昭和 53 年 6 月 組織改正により、庶務部、微生物部、環境保健部、食品薬品部及び生活環境部の 5 部制となる。
- 平成 3 年 5 月 水戸市笠原町 993-2 新庁舎竣工、移転
- 平成 13 年 4 月 組織改正により、庶務部、企画情報部、微生物部、理化学部及び遺伝子科学部と組織が改編される。

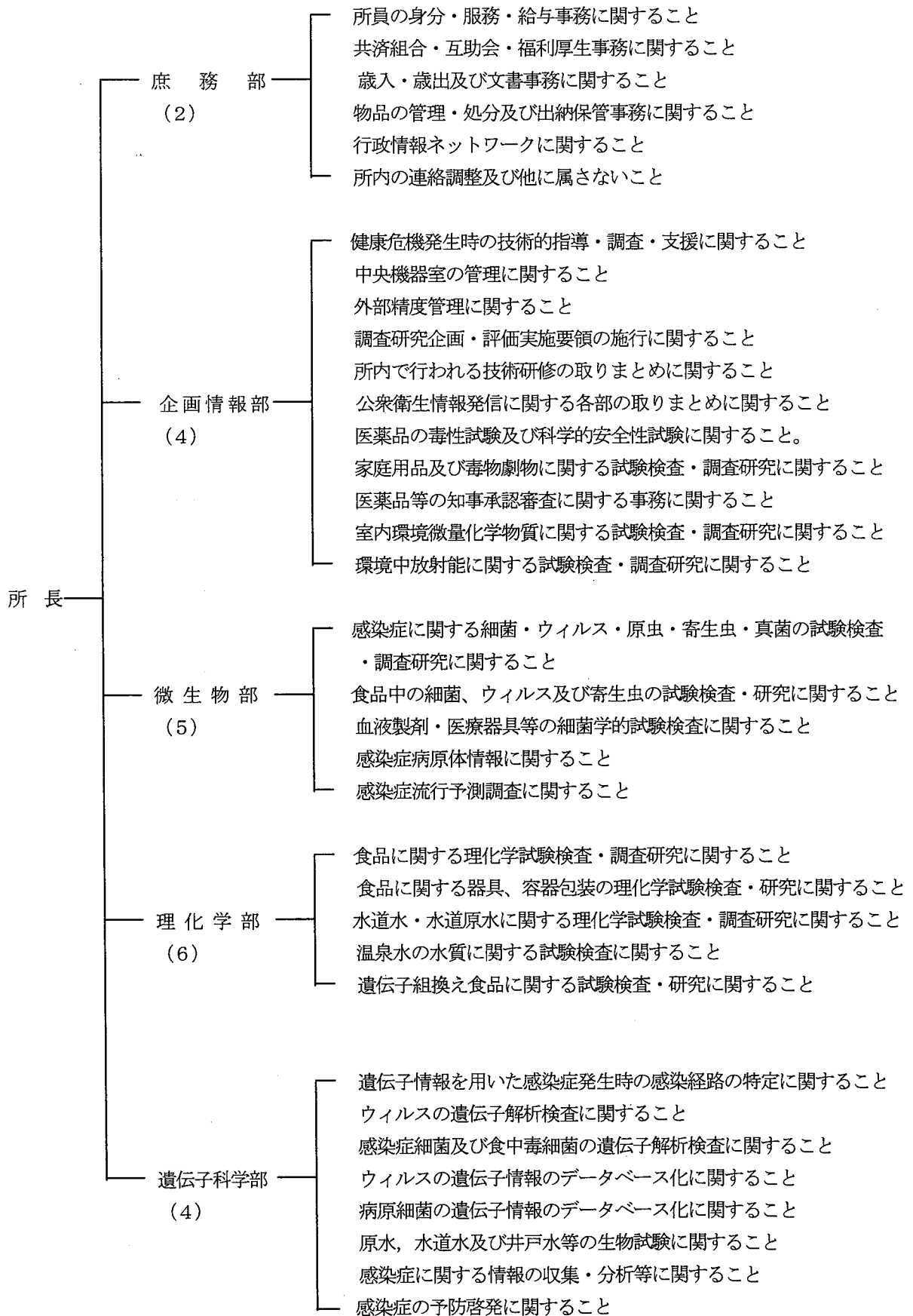
[施設の概要]

- 所在地 水戸市笠原町 993-2
- 敷 地 「いばらき予防医学プラザ」 22,418 m²内
- 建 設 平成元年 10 月 26 日着工
平成 3 年 3 月 31 日竣工
- 建 物 庁舎 鉄筋コンクリート 3 階建
2,916.73 m²

[歴代所長]

- 根 津 尚 光 (昭 30. 11 ~ 昭 37. 6)
- 斎 藤 功 (昭 37. 7 ~ 昭 47. 5)
- 野 田 正 男 (昭 47. 6 ~ 昭 52. 5)
- 藤 崎 米 蔵 (昭 52. 6 ~ 昭 56. 9)
- 野 田 正 男 (昭 56. 10 ~ 昭 60. 8)
- 美譽志 康 (昭 60. 9 ~ 平 10. 3)
- 村 田 明 (平 10. 4 ~ 平 11. 3) 水戸保健所長 (衛生研究所長兼務)
- 土 井 幹 雄 (平 11. 4 ~ 平 18. 3) 平 17. 4 ~ ひたちなか保健所長兼務
- 藤 枝 隆 (平 19. 4 ~) 水戸保健所長 (衛生研究所長兼務)

2. 組織と業務内容



3. 職員の配置

(1) 部別職員数 (平成19. 5. 1現在)

	事務 吏員	技 術 吏 員					任期付 研究員	技能 労務	計	嘱託及 び臨時 職員	合 計
		医 師	獣医師	薬剤師	臨床検 査技師	化学及 農 芸 化 学					
所 長		1						1		1	
庶 務 部	2							2	1	3	
企画情報部				3		1		4		4	
微生物部			2		3			5	1	6	
理化学部				1	1	3		6	1	7	
遺伝子科学部			1		1		1	3		3	
計	2	1	3	4	5	4	1	1	21	3	24

(2) 職員一覧

所 属	職 名	氏 名	分 担 事 務	職 種
	所 長	藤 枝 隆	所総括、GLP部門責任	医 師
	研究調整監(兼)	方 波 見 通 康	研究調整、試験研究の評価等についての企画・調整	薬 剤 師
庶 務 部	主査兼部長	玉 造 博	庶務部総括、人事・服務、給与・賃金及び福利厚生事務	事 務
	係 長	中 山 弘 子	歳入・歳出・旅費、物品の管理・処分及び出納保管	事 務
企画情報部	研究調整監兼部長	方 波 見 通 康	企画情報部総括	薬 剤 師
	主任研究員	大 曾 根 圭 子	部業務精度管理、健康危機発生時の技術的指導	薬 剤 師
	技 師	福 田 聡	医薬品の化学的安全性試験、地研全国協議会の事務	化 学
	技 師	石 井 崇 司	家庭用品の安全性試験、健康食品の試験検査	薬 剤 師
微 生 物 部	首席研究員兼部長	掛 札 し げ 子	微生物部総括、GLP検査区分責任	獣 医 師
	主任研究員	増 子 京 子	ウイルスの血清学的試験、食中毒ウイルスの試験検査	臨床検査技師
	主任研究員	笠 井 潔	食中毒検査、寄生虫検査、血液製剤の細菌検査	獣 医 師
	主任研究員	深 谷 節 子	ウイルスの分離同定、感染症流行予想調査	臨床検査技師
	技 師	土 井 育 子	感染症細菌の分離同定、病原体情報	臨床検査技師
理 化 学 部	首席研究員兼部長	村 上 り つ 子	理化学部総括、GLP検査区分責任	化 学
	主任研究員	山 本 和 則	食中毒・苦情食品の理化学検査、遺伝子組み換え食品検査	農 芸 化 学
	主任研究員	柳 岡 知 子	輸入野菜中残留農薬検査、国産野菜の残留農薬の検査	薬 剤 師
	主 任	白 田 忠 雄	食品中アレルギー物質検査、畜水産食品残留農薬検査	臨床検査技師
	技 師	山 本 浩 嗣	食品中の食品添加物検査、水質化学検査	化 学
	技 師	久 保 田 京 子	検査業務の補助	技 能 労 務
遺 伝 子 科 学 部	部 長	原 孝	遺伝子科学部総括	臨床検査技師
	技 師	山 崎 良 直	ウイルスの遺伝子解析検査、原水・水道水・井戸水等の遺伝子解析検査	獣 医 師
	技 師	白 井 睦	県内における健康維持・増進に係る技術の整備・開発	化 学 (任 期)

(3) 人事異動

発令日	職 名	氏 名	転出入先及び職名
H19. 3. 31	研究調整監兼企画情報部長	小山田 則 孝	退職
〃	遺伝子科学部長	上 野 清 一	〃
〃	技師	中 村 美 樹	〃
H19. 4. 1	所長	土 井 幹 雄	保健予防課長へ転出
〃	主任研究員	矢 萩 かをる	県立中央病院へ転出
H19. 4. 1	所長(衛生研究所長兼務)	藤 枝 隆	水戸保健所長から
〃	研究調整監兼企画情報部長	方波見 通 康	つくば保健所から
〃	首席研究員兼微生物部長	掛 札 しげ子	県北食肉衛生検査所から
〃	主任研究員	山 本 和 則	水戸保健所から
H19. 5. 1	技師	土 井 育 子	平成19年5月1日付採用職員

4. 平成18年度歳入歳出決算書

(1) 歳入

(単位：円)

科 目	決 算 額	備 考
使用料及び手数料		
手数料	736,510	試験検査手数料
諸収入		
雑入	66,602	臨時職員雇用保険料
一般会計	803,112	

(2) 歳出

(単位：円)

科 目	決 算 額	備 考
一般管理費	192,161	赴任旅費
厚生総務費	2,378,948	
保健所管理費	2,044,086	
保健所施設整備費	995,400	
衛生研究所費	75,491,757	
結核対策費	585,601	
予 防 費		
感染症予防費	10,244,045	
保健検査費	513,181	
健康増進費	9,142,350	
薬事費	2,626,894	
水道施設指導費	4,150,188	
食品衛生指導費		
食品衛生費	13,817,315	
乳肉衛生費	739,313	
家畜保健衛生費	4,375,572	
家畜伝染病 予防費		
一般会計 現年計	127,296,811	
合 計	127,296,811	

5. 重要な機械及び器具 (平成18年度末現在)

100万円以上

種別	機械器具名	構造の内容	取得年度	用途
情報機器	情報処理システム一式	パソコン3台,ファイルレコーダ1台	平11	情報処理
	フィンガープリンティング解析ソフト	BIONUMERIC-VERSION	14	同上
	ネットワーク機器一式	パソコン1台, モニター10台外	16	情報収集処理
	バイオインフォマティクスソフト	日立ソフト	17	情報処理
	所内LANシステム一式	セキュリティ対策用サーバ外	17	同上
電気機械	低温恒温恒湿槽	平山製作所 FH-60LA	51	低温細菌の分離測定保存
	超低温槽	エバラ ESL-300	54	検査材料の保存
	超低温槽	日本フリーザーCL-3500	63	細胞・ウイルスの保存
	低温恒温槽	タイテック M-210	平3	低温微生物の保存
	電気低温度恒温器	ヒラサワ HL-IS	3	微生物の培養
	プログラムフリーザー	日本フリーザーTNP-87S	3	微生物の保存・前処理
	冷凍冷蔵庫	日本フリーザーFR-120W	3	検査材料, 分別保存
	冷凍庫 (3台)	日本フリーザーCL-50U	3	検査材料, 菌株及び試薬の保存
	超低温槽システム	レプコ ULT-2090	5	検体保存
	超低温槽	レプコ ULT-1490	8	O157 関連の菌株及び血清保存
	超低温槽	レプコ ULT1386-NO	12	正常細胞及び標準血清等の保管
	超低温槽	テイオン TDF-87304	13	検査材料等の保存
	超低温保存庫	日本フリーザーCL-322U	13	検査材料等の保存
	超低温槽	サーモンエレクトロン社 ULT1186-3	17	同上
	超低温槽	レプコ ULT-1186-3SI	17	同上
	試験及び測定器	自記分光光度計システム	日立 200-0100	54
落射蛍光顕微鏡		オリンパス BHS-RFK-AI	59	リケッチア, クラミジア検査
ガスクロマトグラフ		日立 263-80	60	有機物質の分離定量
倒立型システム顕微鏡		オリンパス IMT-2-21	61	細胞培養検査
水銀測定専用装置		マーキュリー-SP-3	63	水・食品・土中の水銀定量
透過型電子顕微鏡		日立 H-7100	2	微生物検査, 理化学検査
走査型電子顕微鏡		日立 S-2500CX	2	同上
蛍光分光光度計		日立 F-4010	2	蛍光物質の定量測定
原子吸光光度計		日立 Z-6100	2	金属元素の測定
炭素灯原子吸光分光光度計		セイコーSAS7500	2	微量元素の測定
分光光度計		日立 U-3410	2	化学物質の定量
微分干渉顕微鏡		オリンパス BHB353-N	2	病理組織の無染色標本の観察
顕微鏡		オリンパス AHBS3-514	3	嫌気性細菌等の観察
顕微鏡システム		オリンパス AHBT3-513	3	細菌等の観察
写真付顕微鏡		オリンパス BHS-324	3	病理標本等の写真撮影
倒立顕微鏡		オリンパス IMT-2-21	3	細胞培養検査
高速液体クロマトグラフ		島津 LC-10AD	3	有機物質の分離定量
ガスクロマトグラフ		島津 GC-14A	3	同上
ハンドフットクロスモニター		アロカ MBR-51	3	放射能測定
オートウェルガンマシステム		アロカ ARC-301B	3	同上
ラジオクロマナイザー		アロカ JTC-601	3	同上
液体シンチレーションシステム		アロカ LSC-3500	3	放射能測定
微量水分測定装置		平沼 AQ-6	3	薬品中微量水分測定
システム顕微鏡		オリンパス AHBS3-514	3	細菌及び組織検査
微量全窒素分析装置		三菱化成 TN-05	5	窒素化合物含有水素飼料の分析
ガスクロマトグラフ質量分析計		HP5890 II プラス	6	化学物質の定性定量
顕微鏡		オリンパス BX50-54	6	病原微生物の検査同定
ガスクロマトグラフ質量分析計		島津 QP-5000	7	化学物質の定性定量
ガスクロマトグラフ	HPG1800	7	有機物質の定量	
イオンクロマトグラフ	日本ダイオネクス DX-500	8	有機無機イオン化合物分離定量	
液体クロマトグラフ	日本分光 PU-980	9	有機物質の分離定量	

種別	機械器具名	構造の内容	取得年度	用途
試験及び測定器	微分干渉顕微鏡	オリンパス BX-50-34DIC	9	病原微生物, 原虫の検査, 同定
	積分球式濁度計	フローセル型 SEP-PT-7060	9	上水の濃度測定
	自動蛍光免疫測定装置	ミニバイダス 1 式	10	O157 の測定
	浸透圧計	オズモメーター OM-802-D	10	医薬品等の浸透圧測定
	落射顕微鏡セット	オリンパス BX60-34FLB-SP	10	クリプトスポリジウム原虫の測定
	ガスクロマトグラフ	日立-3000D-SL-F	10	有機物質の分離定量
	高速液体クロマトグラフ	島津 LC-10AS	10	有機物質の分離定量
	クロマトグラフィシステム	BIOLOGIC-HR-BASIC システム	11	食品中の有機物質の分離精製
	GPC クリーンアップシステム	日本分光 HPLC システム	11	残留農薬前処理
	BOD 計測器	BF-1000	12	河川水及び下水処理水の BOD 測定
	ICP 質量分析装置	日立 P-5000	12	ウランの定性定量
	γ線測定装置	セイコー EG&G	12	γ線放出核種の定性定量
	食品放射能計測計 (γ線) 2 台	Berthold LB200	12	放射能の測定
	コンピューター制御生物顕微鏡	顕微鏡本体 DML A	13	病原微生物検査
	ガスクロマトグラフ	横河 Agilent6890N	13	有機微量汚染物質も測定
	キャピラリー電気泳動システム	横河 AgilentG1600	13	健康被害時の原因物質特定
	高速自動濃縮装置	ユニフレックスターボバップ LV	14	有機溶媒の自動濃縮
	高速液体クロマトグラフ	島津 LC-VP シリーズ	14	有機物質の分離定量
	溶出試験器	日本分光・自動溶出試験器	14	医薬品の品質管理
	実体顕微鏡	オリンパス SZX 12-4131	14	病原微生物の検査同定
	ガスクロマトグラフ装置	島津 GC-20101 式	15	汚染物質の測定
	イオンクロマトグラフポストカラム	日本ダイオネクト社製	15	臭素酸、シアニオン測定
	DNA マイクロアレイ分析システム	アフイメトリス社製	15	遺伝子分析及び遺伝発現解析
	高速液体クロマトグラフ	日立ハイテクノロジー L-2000	16	有機物質の分離定量
	水銀測定装置	日本インスツルメンツ マネリ RA-3000	16	水銀の定量測定
	倒立方りサーチ顕微鏡	オリンパス 1X71N-11PH	16	病原微生物の検査
	検体管理システム一式	冷凍庫、温度管理記録計、検体管理用	16	検査材料等の保存
	組織内蛋白発現解析システム一式	共焦点レーザーキャノン顕微鏡外	16	病理標本の作成と観察
	ICP 発光分光分析装置	島津 ICPS-8100	17	重金属の測定
	高分解能質量分析システム	サーモンエレクトロン(株)TSQ	17	化学物質の定性定量
	自動体温測定装置	テクノセブン製 K731-4	17	発熱性物質試験
	食品中のアレルギー物質検査システム	プレートリーダー BIO-RAD 社	18	食品中のアレルギー物質検査
	全有機炭素計	島津製作所 TOC-V CPH	18	水中有機炭素測定
マイクロプレートリーダー	日本ハ イラットラボラトリーズ	18	血液中の各種抗体価測定	
高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ(株) 2695	18	有機物質の分離定量	
高感度過酸化水素計	スーパーオリテクターモデル 5	18	食品添加物 (過酸化水素) の検査	
高速液体クロマトグラフ	島津製作所 LC-10AS	18	有機物質の分離定量	
高速液体クロマトグラフ	島津製作所 LC-10AS	18	同上	
ガスクロマトグラフ	島津製作所 GC2010AF/AOC	18	同上	
液体クロマトグラフタンデム四重極型質量分	日本ウォーターズ(株) プレジ XE	18	同上	
医療機械	アナエロボックス	平沢 ANB-1	55	嫌気性細菌の分離同定
	サーミスター式体温自動集録装置	タカラ K-923	57	動物の発熱試験集録装置
	クロマトスキャナ	島津 CS-930	59	薄層クロマト定量
	クリーンアイソレーター	岡崎産業 F-215	59	感染動物の飼育
	安全キャビネット	日立 SCV-1300EC II B	60	微生物検査
	クリーンベンチ	日立 SCV-1903C II B	62	微生物検査
	全自動高圧蒸気滅菌装置	平山 HSM-722E	63	器具、培地の滅菌
	微炭酸ガス細胞培養器	平沢 CP02-171M(a)	平元	ウイルスの培養
	アイソレーター	ICT-10	2	感染動物の飼育
	グローブボックス	GRI-90	2	有害物質等の取扱い
	安全キャビネット	日立 SCV-1903EC II A	2	微生物検査
	安全キャビネット	日立 SCV-1303EC II B	2	同上
	真空凍結乾燥機	ラブコンコ LL-12SF	2	微生物検査
	安全キャビネット	日立 SCV-1300EC II W	2	同上
	安全キャビネット	日立 SCV-1300EC II L	2	同上
	高圧蒸気滅菌装置	日立 CCV-1311	2	病原微生物の滅菌

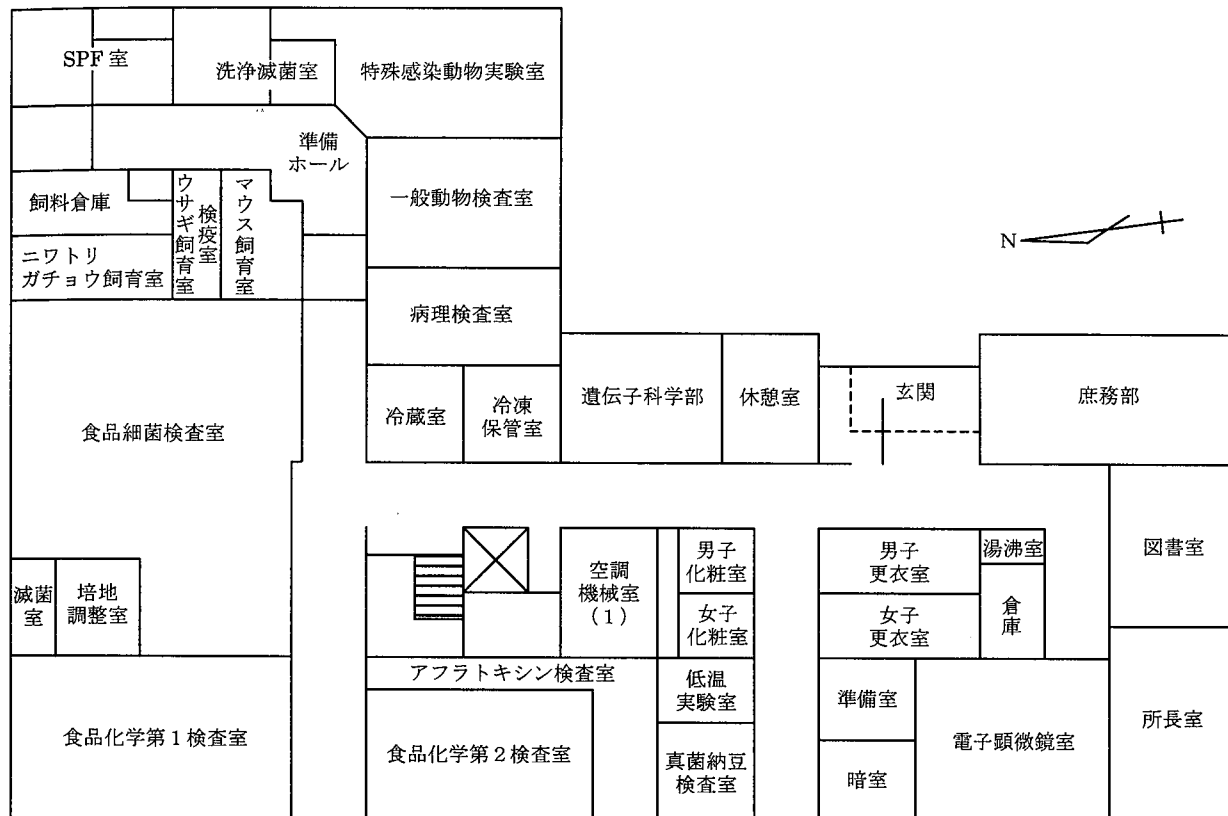
高圧蒸気滅菌装置	日立 SCV-1303EC II B	2	同上
クリーンベンチ	日立 SCV-1302EC II C	2	微生物検査
安全キャビネット	日立 SCV-1303EC II	2	同上
安全キャビネット	日立 CCV-1301EC	2	同上
安全キャビネット	サクラ EPT-120BV	2	同上
クリーンベンチ	サクラ DRS-601A	2	無菌操作
凍結切片作製装置	サクラ CM-501	3	病理組織標本の凍結切片の作製
オートクレーブ	平山 HSM-722E	3	器具、培地の滅菌
オートクレーブ付流し台	日立 VS-500	3	感染防止流し台
CO2 インキュベーター (2台)	日立 CH-161	3	微生物培養検査
乾燥機 (2台)	平山 SW-100	3	器具の乾燥
低温恒温槽付万能振とう培養器	高崎化学 TXY-16RRS	3	微生物の培養

種別	機械器具名	構造の内容	取得年度	用途
医療機械	テーパー式CO2培養器	ヒラサワ CPD-W(a)	3	同上
	エイズ抗体検査装置	三光純薬 SGR400	5	エイズ抗体検査
	クリーンベンチ	日立 CCV-1900E	7	細胞継代の無菌操作
	ジーンアンプ	PCR9600-R	7	核酸断片の増幅
	ノバパスプレートウォシャー	96穴マイクロプレート用	7	抗原抗体反应用プレートの洗浄
	恒温振とう培養器	タイテック BR-3000LF	7	細菌の急速増殖
	超音波洗浄装置	シャープ MU-624A	8	試験器具洗浄
	画像解析装置	FLOUR-S MULTIMAGER	9	PCR等の画像解析
	パルスフィールド電気泳動システム	CHEF-DRIIIチラーシステム	9	遺伝子分離
	遺伝子増幅装置	GENEAMP PCR9700	11	核酸断片の増幅
	遺伝子増幅装置	GENEAMP PCR9700	12	核酸断片の増幅
	精密恒温槽	LX-2300F	12	微生物の培養
	ジェネティックアナライザー	ABI PRISM TM3100-2 1式	13	DNA塩基配列等の配列
	O2-CO2培養器	ヒラサワ CP02-1802 記録計	14	ウィルスの培養検査
	自動核酸抽出リアルタイム定量PCR装置	ロッシュ LCワークシステム	14	核酸の自動抽出、定量PCR反応
	パルスフィールド電気泳動システム	CHEF-DR-BASIC システム 170-3695	15	遺伝子学的解析検査
	PCR増幅装置	Gold96-well GeneAmp PCR System 9700	15	核酸断片の増幅
	CO2インキュベーター	ヒラサワ CPD-1701	16	微生物培養検査
安全キャビネット	日立 SCV-1305EC II AB	17	微生物検査	
CO2インキュベーター	ヒラサワ製 CPD-2701	18	インフルエンザウィルスの分離培養	
蛋白分離・精製・解析装置	サイファージェン・バイオシステムズ㈱	18	腫瘍マーカー・腫瘍予知マーカーをスクリーニング的に探索	
産業機械	高速冷却遠心器	日立 20PR-52	54	試料の分離分取
	大容量冷却遠心器	久保田 KR-50FA	56	検査材料の前処理
	自動混合希釈装置	三光純薬 SPR-2	57	血清反応の希釈
	スイングローター	日立 RPS-40T	59	ウィルスの分離
	アングルローター	日立 RP-70T	59	同上
	パーティカルローター	日立 RPV50T-321	60	同上
	アングルローター	日立 RP-65T	60	同上
	シュリーレン装置	日立 ASD 型	60	ウィルスの観察
	多本架冷却遠心器	日立 CR5DL	平元	試料の分離
	ソークスレー抽出装置	FE-AT6A	2	食品中の脂質の抽出量装置
	ドラフトチャンバー	オリエンタル GPA-1800HC	2	有毒ガス排気
	ドラフトチャンバー	オリエンタル GPA-1800HC	2	同上
	ドラフトチャンバー	オリエンタル GAV-2500HC	2	同上
	ドラフトチャンバー (2台)	オリエンタル GAV-2500HC	2	同上
	ドラフトチャンバー	オリエンタル GAV-2100HC	2	同上
	ドラフトチャンバー	FW-120S	2	同上
	ドラフトチャンバー	FHP-180PA	2	同上
	ドラフトチャンバー	FW180S	2	同上
	ドラフトチャンバー	FS-180S	2	同上
	ドラフトチャンバー	ヤマト FHM-180L	3	有機ガス排気
	ドラフトチャンバー	ヤマト FHL-180L	3	同上
	分離用超遠心器	日立 CS-120	3	微生物の分離分取
ゼットクラッシャー	NA-111C	3	小動物粉砕器	

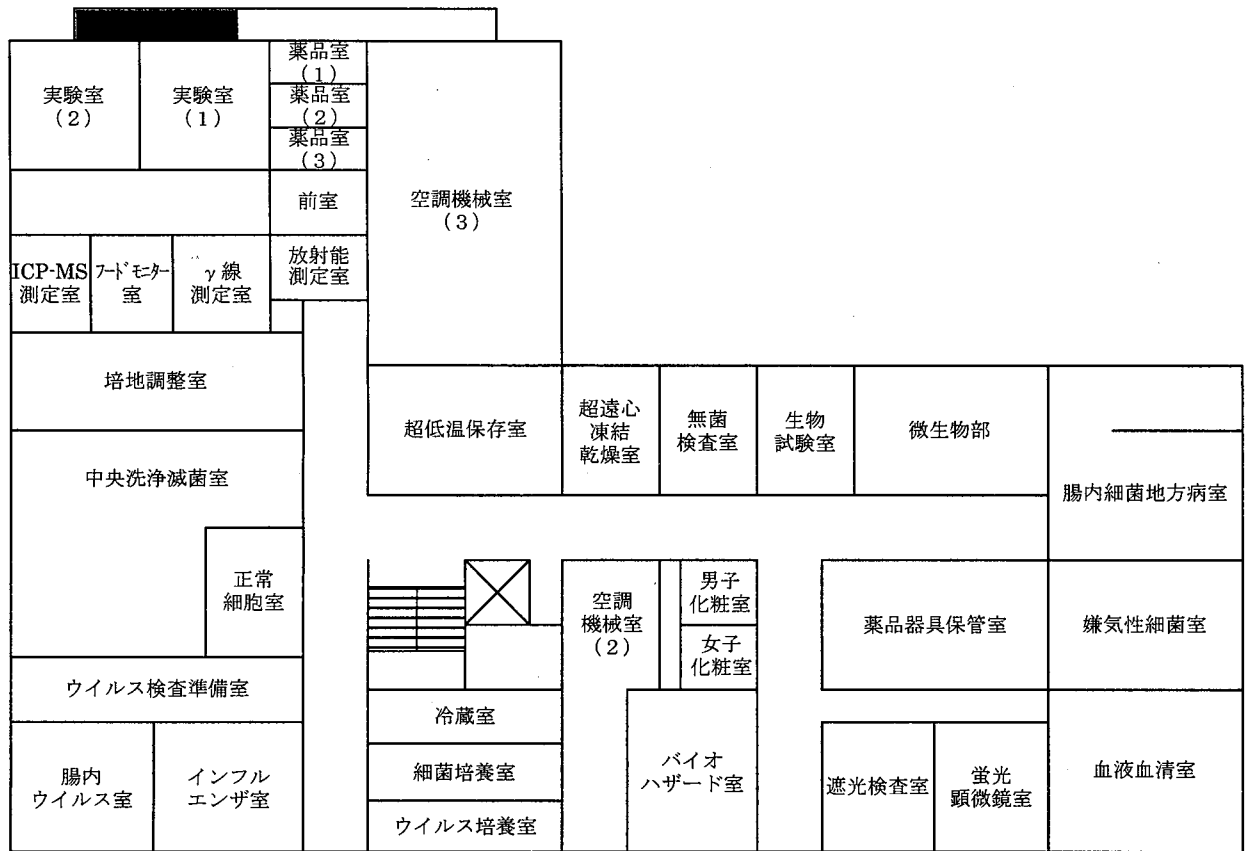
	サンプル前処理装置	ダニエスカーマイクロウェブ MDS-2000	3	有機物質の灰化
	デハイドベーター	N-2	3	小動物乾燥
	放射性有機廃液燃焼装置	トリスタン	3	有機溶媒の焼却
	高速冷却遠心器	トミーRS-20BH	4	試料の分離分取
	パーティトラップ試料濃縮装置	ピークマスターEV	5	検査用前処理装置
	ポリトロンホモジナイザー	PT20TSMKR	6	検査物の粉碎
	超純水製造装置	ミリ QSPTOC	7	超純水の製造
	電気炉	FMKST-325	12	有機物の灰化
	全自動洗浄機	ヤマト科学 AW83	12	ガラス器具類の自動洗浄
	超純水製造装置	ミポア ZMQA000KT-EQA-3S	12	超純水の製造
	蒸留水製造装置	アトバンテック東洋アクリアス RFD332RA	15	蒸留水の製造
	ロータリーエバポレーターシステム	柴田科学	15	有機溶媒の濃縮
	冷却遠心機	日立工機 himac CF9RX	16	試料の分離分取
	リアルタイム濁度測定装置	栄研化学 LA-320C	16	ランプ法による遺伝子の検査
	バイオハザード遠心機	日立 himac CF16RX ローター付	16	試料の分離分取
	超遠心機	日立工機機 CP80WX	17	同上
	蒸留水製造装置	ADVANTEC RFD 3 4 3 RA	17	蒸留水の製造
	蒸留水製造装置	ADVANTEC RFD 3 4 3 RA	18	蒸留水の製造
雑機械 及び器具	ラボ保管システム	モーベイ A	平 2	実験器具の保管

6. 庁舎平面図

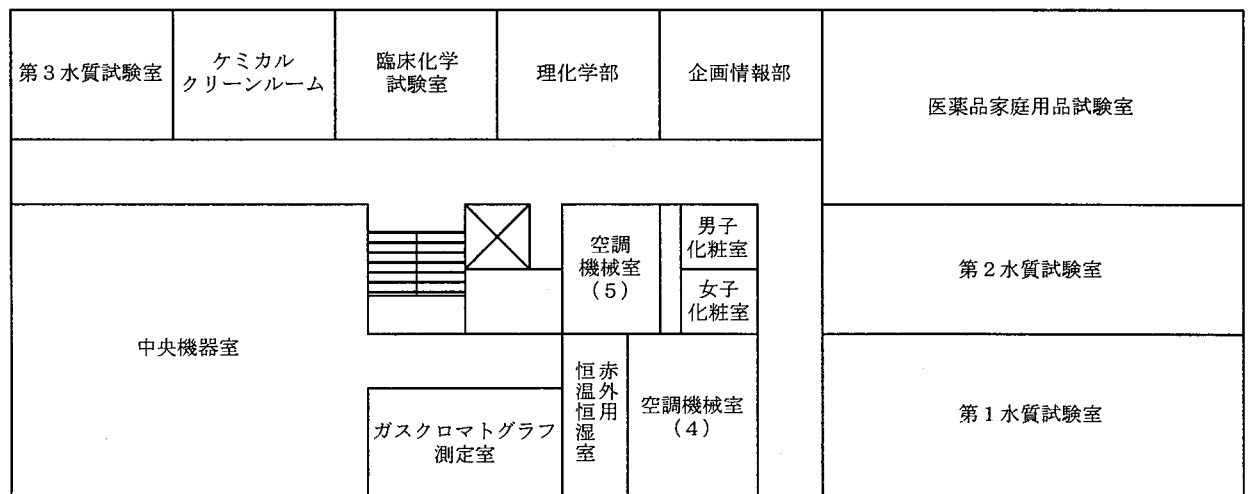
1階 1,044.79m²



2階 1,047.31m²

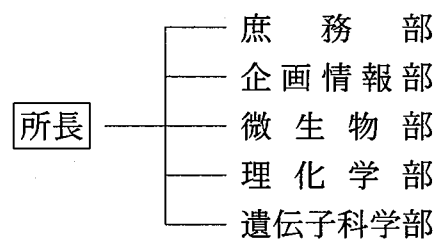


3階 824.63m²



第2章 業務の概要

(平成19年4月1日現在の組織体制)



1. 企画情報部

1 試験検査の概況

平成 18 年度試験検査実施状況は次表のとおりである。

項目	品目数	行政検査 (件)	有料検査 (件)	合計(件)
医薬品等化学検査 県内流通医薬品	7	規格試験 63		63
家庭用品検査 家庭用品（家庭用エアゾール 製品、繊維製品等）	150	メタノール 12 テトラクロルエチレン 12 トリクロロエチレン 12 トリフェニル錫化合物 24 トリブチル錫化合物 24 有機水銀化合物 24 D.T.T.B* 12 デイルトリン 12 ホルムアルデヒド 102		234
無承認無許可医薬品検査 ダイエット食品(1) ダイエット食品(2) 強壮食品	78 (20) (29) (29)	甲状腺ホルモン等 140 脱 N-ジメチル シブトラミン等 232 シルテナフィル等 116		488
外部精度管理	1	溶出試験 1		1
計	236	786		786

* 4,6-ジクロロ-7-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンゾイミダゾール

上記表の行政検査は、薬務課及び保健所から送付されたものについて実施した。内容は下記のとおりである。

(1) 県内流通医薬品試験検査（7品目）

県内流通医薬品の有効性及び安全性を確保することを目的として、試験検査を実施した。

6品目については、規格基準を満たしていたが、1品目については、定量試験の基準を満たさなかった。

(2) 家庭用品試買試験検査 (150 品目)

県内における家庭用品の試買試験検査を実施することにより、人の健康に被害を及ぼすおそれのある物質を含有する家庭用品を発見、排除し、県民の健康に係る被害の発生又は拡大防止を図ることを目的として実施した。

メタノール、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、トリフェニル錫化合物、トリブチル錫化合物、有機水銀化合物、D.T.T.B*、ディルドリン、ホルムアルデヒドについて検査を行ったが、いずれも、有害物質は検出されなかった。

(3) 無承認無許可医薬品検査 (78 品目)

県内における健康食品の試買試験検査を実施することにより、無承認無許可の医薬品の流通防止とそれらが原因となる健康被害を未然に防止することを目的として実施した。

県内で販売されているダイエット目的と推察される製品 49 品目のうち 20 品目については 7 項目 (甲状腺ホルモン、フェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、センノシド、エフェドリン、ノルエフェドリン、シブトラミン)、29 品目については脱 N-ジメチルシブトラミンを加えた 8 項目の検査を行った。4 品目からセンノシドが検出されたが、規制の対象となるセンナ葉等は確認されなかった。

また、強壮目的と推察される製品 29 品目については 4 項目 (シルディナフィル、バルディナフィル、タダラフィル、ホンデナフィル) の検査を行い、うち 1 品目でホンデナフィルを検出した。

2 県内試験検査機関外部精度管理 (水質検査外部精度管理事業)

水道水測定分析に従事する諸機関が、均一に調整された試料を分析することによって得られる結果と前処理条件、測定機器の使用条件等の関係その他分析実施上の具体的な問題点の調査を行うことにより、分析の精度及び正確さの向上を図り、データの信頼性の確保に資することを目的として実施した。

12 検査機関を対象に水道法の基準項目の鉛、マンガン、亜鉛を用いて外部精度管理調査を実施した。

各機関の変動係数は、各項目とも 10%以下と小さく、精度は概ね良好であった。また回収率は、鉛では全機関、マンガン及び亜鉛では 12 機関中 9 機関の結果が良好と判断された。

3 調査研究企画・評価委員会実施

当所が行う調査研究事業について、公正かつ適切な企画・評価を行うことにより、効率的・効果的な調査研究を実施し、もって本県における健康危機管理能力の向上と保健衛生の推進に資することを目的として 8 月 24 日(木)に実施した。

新規課題 4 題、継続課題 8 題、完了課題 1 題の計 13 課題について評価委員の審査を受けた。いずれも、研究課題として妥当なものとして評価された。

<新規課題>

- 1 健康食品中に含まれる重金属に関する調査
- 2 健康効果をうたうサプリメントおよび清涼飲料水中のミネラル濃度
- 3 若年者の子宮頸がんと HIV 感染実態の把握
- 4 子宮頸がんの新しい診断法の開発

<継続課題>

- 1 茨城県におけるエイズウイルス(HIV-1)の薬剤耐性変異の動向
- 2 ブタインフルエンザウイルスの分子進化学的調査
- 3 コレステロール代謝からみた肝発癌及び肝癌増殖の制御に関する基礎研究
- 4 有機ヒ素化合物の酸化ストレスが脂質過酸化に及ぼす影響
- 5 農作物中の残留農薬一斉分析法の検討
- 6 鶏卵中残留動物用医薬品の簡易前処理法及び分析法の検討
- 7 ダイズ加工食品からの遺伝子組換え体(GMO)検知法の検討
- 8 腸管ウイルス感染症の免疫応答に関する研究および免疫変容に関する研究～ノロウイルス細胞培養系の確立

<完了課題>

- 1 抗変異原活性を有する県内産農産物の機能性成分に関する研究

<評価委員>

委員長 日本薬科大学教授 下條 信弘
委員 筑波大学教授 大久保 一郎
国立感染症研究所副所長 渡辺 治雄
(財)食品薬品安全センター秦野研究所研究顧問 小野 宏
茨城県立医療大学教授 小池 和子
保健福祉部医監兼次長 泉 陽子
保健福祉部参事兼厚生総務課長 橋浦 政幸
保健福祉部保健予防課長 緒方 剛
保健福祉部薬務課長 真家 則夫
保健福祉部生活衛生課長 細谷 佳史
保健福祉部食の安全対策室長 村山 正利
水戸保健所長 藤枝 隆
土浦保健所長 大和 慎一

2. 微生物部

1 試験検査の概況

平成18年度試験検査状況を別表に示した。その内容は次のとおりである。

(1) 行政検査

ア 細菌の分離同定検査

保健所からの依頼検査による19検体について、赤痢菌、腸管病原性大腸菌、コレラ菌、結核菌(非結核性抗酸菌含む)等の分離同定をおこなった。

イ ウイルス、リケッチア及びクラミジア等の検出検査

感染症発生動向調査及び集団発生関連で検査依頼のあった317検体について病原体の検出を実施した。

インフルエンザ(様疾患)は感染症発生動向調査病原体定点医療機関から提出された咽頭または鼻腔ぬぐい液64検体および集団事例10事例からうがい液70検体計134検体について検査を実施し、AH1亜型インフルエンザウイルス11株、AH3亜型インフルエンザウイルス39株、B型インフルエンザウイルス32株計82株を分離した。そのうち集団事例については、2事例からAH1亜型、5事例からAH3亜型、3事例からB型が分離された。

麻疹は竜ヶ崎保健所管内の流行を受けて103検体の検査依頼があった。RT-PCR法で検査し、麻疹ウイルス遺伝子D5型16件、A型1件を検出した。

無菌性髄膜炎は67検体を検査し、エコーウイルス18型2株、エコーウイルス30型50株、コクサッキーウイルスB4型1株、エンテロウイルス属型別不明株2株を分離した。

流行性角結膜炎2検体からはアデノウイルス3型が1株分離された。

肺炎1検体からはアデノウイルス3型が分離された。

トリインフルエンザは東南アジア渡航後インフルエンザ様症状を呈した患者から採取された7検体について実施し、AH1亜型インフルエンザウイルス5件、AH3亜型インフルエンザウイルス1件を検出した。

ノロウイルスは、152事例の1,124検体(糞便1,122、カキ2)について、RT-PCR法により検査を行った。その結果、事例の86.2%にあたる131事例735検体からNVが検出された。また、カキからは検出されなかった。その他、カキ10検体を収去しNV汚染状況調査を実施したが、いずれも不検出であった。

ウ ウイルス、リケッチア、クラミジアおよび細菌の血清反応

感染症発生動向調査関連で47検体の血清について麻疹ウイルスIgM抗体および麻疹ウイルスPA抗体検査を実施した。

また、「保健所及び衛生研究所に勤務する職員のB型肝炎検査及びワクチン接種実施要領」に基づき、111名についてHBs抗原及びHBs抗体検査を実施した。

エ 食中毒

食中毒及びその疑いの症例で当所が受け付けたのは139検体であり、分離された菌株の血清型別、毒素産生能等について検査を行った。

内訳は、ウエルシュ菌6検体、大腸菌62検体、黄色ブドウ球菌15検体、サルモネラ属菌29検体、腸炎ビブリオ1検体、カンピロバクター9検体、セレウス2検体であった。

オ 食鳥肉等の衛生状況調査

県内の認定小規模食鳥処理場16施設を対象として6月～7月の夏期と、1月及び2月の冬期に食鳥肉を拭き取り、分離されたサルモネラ属菌、カンピロ

バクターの検査を実施した。サルモネラ属菌は、夏期 8 検体、冬期 7 検体、カンピロバクターは、夏期 14 検体、冬期 23 検体から分離された。

カ 鶏肉及び鶏肉加工品の試験検査

7 月及び 8 月にカンピロバクター及びサルモネラ属菌の検査を実施した。カンピロバクターは 17 検体、サルモネラ属菌は 16 検体から分離された。

(2) 感染症流行予測調査

平成 18 年度感染症流行予測調査については、保健予防課長の依頼によって、日本脳炎感染源調査・インフルエンザ感受性調査・麻疹感受性調査を実施した。

ア 日本脳炎感染源調査

ブタ血清中の日本脳炎ウイルスに対する抗体を測定し、日本脳炎ウイルスの侵淫度を追跡し、流行を把握するために行った。

平成 18 年 8 月から 10 月に (株)茨城県中央食肉公社(茨城町)に集荷された生後 6 ヶ月の県内産の豚について 8 回、毎回 10 頭づつ採血し、血清中の日本脳炎赤血球凝集抑制抗体(H I 抗体)及び 2 M E 感受性抗体の検査を実施した。

H I 抗体が検出されたのは第 2 回採血時(8 月 21 日)、第 7 回採血時(9 月 27 日)であり、新鮮感染を示す 2 M E 感受性抗体は第 7 回採血(9 月 27 日)に検出され、茨城県において日本脳炎ウイルスの侵淫があったことが推測された。

イ インフルエンザ感受性調査

インフルエンザウイルスに対する血清中の抗体を測定することでヒトの免疫状況を把握し、次シーズンの流行予測に役立てるために実施した。

平成 18 年 9 月～10 月の期間に年齢群ごとに採血した 226 名の血清を用い 4 種類の抗原を使用してインフルエンザに対する赤血球凝集抑制抗体(H I 抗体)検査を実施した。A/ニューカレドニア/20/1999(H1N1)に対する抗体の保有率は 37.2%と全体的によく保有されていた。A/広島/52/2005(H3N2)に対する抗体の保有率は 26.5%であった。B/上海/361/2002(ヤマガタ系統)に対する抗体の保有率は 33.2%であった。また、B/マレーシア/2056/2004(ビクトリア系統)に対する抗体の保有率は 4.9%であり、4 抗原中一番低い結果となった。

なお、この調査は、水戸市内の 7 医療機関の協力を得て実施した。

ウ 麻疹感受性調査

麻疹ウイルスに対する血清中の抗体保有状況を調査し、麻疹ワクチン接種効果を追跡するとともに今後の流行の予測を行うことを目的として実施した。

平成 18 年 9 月～10 月の期間に年齢群ごとに採血した 226 名の血清を用いた。富士レビオ「セロディア-麻疹」を用い、麻疹 P A 抗体価を測定した。麻疹 P A 抗体陽性者の幾何平均は 1 : 477.7 であり、麻疹 P A 抗体陰性者は 10 名で全体の 4.4%であった。発症防御ができないことが示唆されている 1 : 128 未満であった者は抗体陰性者も含めて 26 名で 11.5%であった。

なお、この調査は、水戸市内の 7 医療機関の協力を得て実施した。

(3) 有料依頼検査

ア 細菌の分離同定検査

総合健診協会等の民間検査センターから 14 件のサルモネラ菌の同定検査依頼があった。

イ その他の感染症検査

総合健診協会等民間検査センターから依頼のあった腸管病原性大腸菌の血清

型別検査・腸管出血性大腸菌O157関連のペロ毒素等について4件の検査を行った。

ウ 納豆検査

昭和46年環第973号の部長通知により県内納豆製造業者(茨城県納豆商工業協同組合員)が年3回自主検査を行った(154検体)。いずれも大腸菌群陰性であった。

エ 医薬品等細菌検査

血液製剤等の無菌検査を行った(6検体)。

2 研修指導

- (1) 検査課検査業務に係る試験検査技術研修(平成19年2月8日)
(平成19年2月15日)

3 学会・研修会出席

学 会 の 名 称	開 催 地	年 月 日	人 員
第16回感染研シンポジウム	東 京 都	18・5・15	2
第75回日本寄生虫学会	青 森 県	18・5・19～20	1
衛生微生物技術協議会第27回研究会	札 幌 市	18・6・29～30	2
第10回腸管出血性大腸菌シンポジウム	東 京 都	18・8・31～9・1	1
第27回日本食品微生物学会	大 阪 府	18・9・21～22	2
第66回日本寄生虫学会東日本支部大会	東 京 都	18・10・21	1
第18回ウイルス性下痢症研究会	名古屋市	18・11・18	1
第54回日本ウイルス学会学術集会	名古屋市	18・11・19	1
平成18年度地域保健総合推進事業 地域ブロック研修会(微生物部門)	さいたま市	19・1・25～26	1
第19回地研関東甲信静支部研究部会	さいたま市	19・2・22～23	1

微生物部18年度年報(表)

項目	検査件数			
	行政検査	有料検査	計	
細菌の分離同定	サルモネラ菌	0	14	14
	赤痢菌	1		1
	コレラ菌	1		1
	腸管病原性大腸菌	15		15
	結核菌(非結核性含む)	2		2
	小計	19	14	33
ウイルス・リケッチア及びクラミジア等検出	インフルエンザ様疾患	134		134
	麻疹	103		103
	ロタウイルス	24		24
	ウイルス感染症(インフル,麻疹等を除く)	80		80
	ノロウイルス	2,248		2,248
	つつが虫等	9		9
	小計	2,598		2,598
ウイルス・リケッチア及びクラミジア等血清反応	HBs抗原	104		104
	HBs抗体	111		111
	日本脳炎(ブタ)	80		80
	インフルエンザ	904		904
	麻疹	320		320
	つつが虫等	9		9
	小計	1,528		1,528
細菌血清反応・毒素検査	腸管病原性大腸菌血清型	15	2	17
	ペロ毒素	15	2	17
	コレラ毒素	1	0	1
	レプトスピラ抗体価	2		2
	小計	33	4	37
疫学解析	結核菌(RFLP)	21		21
	腸管出血性大腸菌(PFGE)	34		34
	その他	6		6
	小計	61	0	61
食品微生物等	食品細菌	33	154	187
	ノロウイルス(カキ)	20		20
	食中毒等	124		124
	食鳥処理場関連	56		56
	医薬品等無菌検査		6	6
	真菌	3		3
	寄生虫	0		0
	小計	236	160	396
合計	4,475	178	4,653	

3. 理化学部

1 試験検査の概況

(1) 平成18年度試験検査実施状況は次表のとおりである。

平成18年度試験検査実施状況

項目	品目数	項目数	検体数
食中毒・苦情・違反食品等検査	13	53	23
県外産農産物残留農薬検査	6	100	20
輸入野菜残留農薬検査	5	100	40
加工食品残留農薬検査	7	100	9
輸入食品残留農薬検査	3	12	25
輸入食品中食品添加物検査	5種類	1	70
輸入香料検査	20	2	20
遺伝子組換え食品検査	2	2	15
食品中のアレルギー物質検査	18	4	24
外部精度管理	3	6	3
小計			249
	採水地点	項目数	検体数
水道原水検査（未規制物質）	10	3	20
水道水検査（未規制物質）	5	3	10
苦情・事故等検査		11	60
上記に含まれないもの		12	1
精度管理		3	1
小計			92
合計			341

(2) 業務内容

○ 食品検査について

ア 食中毒・苦情食品・違反食品等検査

・ 食中毒

茨城県内で初めての事例となったシガテラ魚による食中毒および管内で発生したフグ

による食中毒について、原因物質に関する検査を実施した。

- ・ 苦情食品等検査

ダイエット法としてテレビ放送されたため、全国的に健康被害がでた白インゲン豆について、管内保健所から依頼のあったものについてレクチン活性を調べた。

また、有症苦情のあった、フグ干物、メロン、アンコウ肝について原因究明のための検査を行った。

その他、苦情のあった牛乳、油菓子の油脂変敗、のり佃煮に使われた着色料に関する検査を行った。

- ・ 違反食品

他県または検疫所の検査で、残留農薬基準違反となった輸入ショウガおよび漂白剤使用基準違反となったかんぴょうについて検査を行った。

ほかに生うどん中の「異物」について検査したところ、「異物」はソバが混入したものであることを確認した。

- イ 残留農薬検査（県外産農産物）

平成 18 年度は県外で生産された 6 品目（ダイコン、キュウリ、キャベツ、レタス、トマト、ニンジン）の野菜 20 検体について農薬 100 項目の検査を行った。その結果、レタス 1 検体からチアメトキサム 0.01 ppm、トマト 4 検体からチアクロプリド 0.02～0.04 ppm、同じくトマト 2 検体からトルクロホスメチル 0.01 ppm 検出されたが、いずれも基準値以下で、食品衛生法上問題がなかった。

- ウ 残留農薬検査（輸入野菜）

輸入野菜 5 品目（カボチャ、ブロッコリー、アスパラガス、未成熟インゲン、パプリカ）40 検体について農薬 100 項目の検査を行った。その結果、カボチャ 1 検体からイミダクロプリドが 0.01 ppm、ブロッコリー 1 検体からフェンバレレート 0.05ppm およびインドキサカルブ 0.10ppm が検出された。また、パプリカについては、9 検体から農薬が検出された。検出農薬は、6 検体でフィプロニル 0.007～0.027ppm、4 検体でイミダクロプリド 0.01～0.13ppm、3 検体でインドキサカルブ 0.02～0.10ppm、4 検体でクロチアニジンが 0.01～0.09ppm、1 検体でチアメトキサムが 0.03～0.07ppm であったが、基準値を超えるものはなかった。

- エ 残留農薬検査（加工食品）

ジュースおよびその原料、緑茶飲料などの加工食品 7 品目、9 検体について農薬 100 項目の検査を行った。その結果、みかんジュース原料 2 検体からメチダチオンが 0.03～0.07ppm、濃縮オレンジジュース 1 検体から 0.01ppm、それぞれ検出されたが、食品衛生法上、問題のあるものはなかった。

- オ 輸入食品検査（残留農薬）

柑橘類 25 検体（グレープフルーツ 10、オレンジ 8、レモン 7）について有機リン系農薬 12 種類の検査を行ったところ、オレンジ 4 検体からクロルピリホスが 0.02～

0.04ppm 検出されたが、いずれも基準値以下であった。また定量限界値以下であったが、オレンジ 2 検体、グレープフルーツ 1 検体、レモン 1 検体からクロルピリホス、グレープフルーツ 1 検体からマラチオンが検出された。

カ 輸入食品検査（食品添加物検査）

輸入食品 70 検体（乾燥果実 2、かんぴょう 3、シロップ漬け 3、ワイン 20、冷凍魚介類加工品 25）について残存二酸化硫黄（亜硫酸）の検査を行ったが、基準値を超えるものはなかった。

キ 輸入香料検査

輸入香料 20 検体について N-エチル-4-メンタン-3-カルボキサミドおよび 2,3-ジメチルピラジンの検査を行ったが、いずれの検体からも検出されなかった。

ク 遺伝子組換え食品検査

大豆製品 10 検体についてラウンドアップレディ大豆およびトウモロコシおよびその製品 5 検体について CBH351 トウモロコシの検査を行ったが、食品衛生法上、問題のあるものはなかった。

ケ 食品中のアレルギー物質検査

加工食品 24 検体について、食品衛生法上表示義務のある特定原材料（卵、乳、そば、小麦）の検査を行ったところ、材料として「そば」の表示がされていないうどん 1 検体から「そば」が検出された。この検体について、さらに PCR 法による確認検査を実施したが、その結果も「そば陽性」であった。

○ 水質検査について

コ 未規制物質（内分泌攪乱作用の疑いがある物質）実態調査

内分泌攪乱作用の疑いのある化学物質 3 成分（ビスフェノール A、ノニルフェノール、4-tert-オクチルフェノール）について、県内 5 ケ所の水道原水、凝集沈殿水及び水道水中における存在状況や浄水処理過程における挙動について調査した。その結果、これらの物質はいずれからも検出されなかった。

サ 苦情・事故等検査

テトラクロロエチレン等揮発性有機化学物質（VOC）による地下水汚染調査について、井戸水の分析依頼が 6 回あり、計 60 検体を検査した。うち、6 検体から水質基準値を超えるテトラクロロエチレンが検出された。

シ その他

水質基準項目の臭気物質ジェオスミンの除去法について検討した。

2 研修指導・講演

食品衛生講習会講演 6 月 18 日「ポジティブリスト制度」（常総保健所主催）

6 月 30 日「ポジティブリスト制度」（常総保健所主催）

3 学会発表・論文・著書等

- 1) イオンクロマトグラフポストカラム法を用いた食品中臭素酸塩分析
第43回全国衛生化学技術協議会年会、平成18年11月1～2日、米子市.
- 2) 農作物中の残留農薬一斉分析法の検討
第17回茨城県薬剤師学術大会、平成18年11月12日、つくば市.
- 3) 「図解食品衛生学」第3版(分担執筆)、講談社、2006.

4 学会・研修会出席

学 会 の 名 称	開 催 地	年 月 日	人 員
ICP 操作講習会	神奈川県	18.5.16～17	1
第91回日本食品衛生学会	東京都	18.5.11～12	3
H18年度食品安全行政講習会	東京都	18.5.26	1
アレルギー食品検査研修	神奈川県	18.6.1～2	2
食品中残留農薬分析セミナー	東京都	18.8.3	2
全国食監協第46回関東ブロック研修会	千葉市	18.8.31	1
第29回農薬残留分析研究会	大阪市	18.11.21～22	2
第92回日本食品衛生学会	愛知県	18.10.26～27	3
第43回全国衛生化学技術協議会年会	米子市	18.11～2	2
全国食品衛生監視員研修会	東京都	18.11.9～10	1
遺伝子組換え体検知技術研修	つくば市	18.11.27～29	1
全国自然毒研修会	姫路市	18.11.30～12.1	1
第11回LC(液体クロマトグラフ)テクノプラザ	千葉県	19.2.1～2	1
H18年度地研関東甲信静支部理化学部会研究会	千葉市	19.2.23	2
H18年度地域保健総合推進事業地域ブロック研修会	東京都	19.3.22～24	1
第77回日本衛生学会	大阪市	19.3.25～27	1
日本薬学会第127年会	富山市	19.3.27～29	1
日本水産学会	東京都	19.3.27,29	1

4. 遺伝子科学部

1 試験検査の概況

(1) 平成 18 年度における試験検査の実施状況は下表のとおりである。

試験項目	件数		計
	水道原水	浄水	
pH	5	5	10
濁度	5	5	10
残留塩素濃度	-	5	5
大腸菌	5	-	5
嫌気性芽胞菌	5	-	5
クリプトスポリジウム	5	5	10
ジアルジア	5	5	10
合計	30	25	55

(2) 業務内容

ア 病原性微生物等実態調査

病原性微生物等実態調査実施要領に基づき、水道原及び浄水中のクリプトスポリジウム等の汚染状況の実態を把握し、水道施設の適正な水質管理対策に資した。

平成 18 年度は 5 つの水源(5 施設)について調査したが、クリプトスポリジウム、ジアルジアは検出されなかった。その他の検査項目として pH 及び濁度を測定した。さらに水道水については残留塩素濃度、原水については大腸菌及び嫌気性芽胞菌の検査を行った。

2 感染症情報センター業務

当センターでは、感染症発生動向調査実施要綱（平成 11 年 3 月 19 日健医発第 458 号厚生省保健医療局長通知）に基づいて定められた茨城県感染症発生動向調査事業要領に基づき、保健所を経由し県内の指定医療機関から各種感染症の発生報告を受けて感染症の流行や集団感染予兆の把握に努めている。

平成 18 年度においては、毎週・毎月ごとに県内 12 保健所からの情報提供を取りまとめ、厚生労働省へオンラインで報告を行った。また、還元された情報を茨城県保健福祉部ホームページ（URL: <http://www.pref.ibaraki.jp/bukyoku/hoken/eiseik/>）にて公開し、各種啓蒙を図っている。

本年度は感染性胃腸炎の集団発生が多くみられたこと、また県南部において麻疹の発生がみられたほかは、例年通りの発生動向を示した。

3 地域保健推進特別事業の実施 —医療機関との連携による肝がん撲滅推進事業—
肝がん対策の一環として、肝がんの死亡率の高い県南地域において平成 14 年度から本モデル事業を実施している。本年度は、肝疾患診療ネットワーク（かかりつけ医—肝臓専門医—行政）の構築を図ることを中心にして事業を展開した。

(1) 検討委員会の開催

構成員：肝臓専門医，地元医師会代表者，行政機関代表者，住民代表者
開催回数：2 回

(2) 肝炎に関する正しい知識の普及啓発

リーフレットの配布
肝臓病教室の開催

開催回数：2 回

参加者数：71 名

(3) 慢性肝炎診療研修会の開催（C 型肝炎）

稲敷医師会員を中心に画像検査（実技）やインターフェロン療法等について研修会（2 日コース）を開催し、かかりつけ医と肝臓専門医の情報の共有化と連携システムの構築を図った。参加者は、診療後の遅い時間にもかかわらず長時間にわたり熱心に受講し、活発な質疑応答がみられた。

講師：東京医科大学霞ヶ浦病院消化器内科松崎靖司教授以下 3 名

参加者数：延 28 名（実人員 15 名）

(4) 発見された肝炎ウイルスキャリア（持続感染者）のフォローアップ

当該市町村と主治医の連携により、発見 1 年後のキャリアの 87.7%，発見 2 年後のキャリアの 88.9%，発見 3 年後のキャリアの 83.3%は継続して受診していることがわかった。

本年度は、精密検査受診者の中から初めて肝がん患者が 1 名発見された。

4 学会・論文等発表

(1) 学会発表

ア 肝細胞癌 (McA-RH7777) 移植ラットにおける高コレステロール血症の発症メカニズムについて. 第 4 回東日本胆汁酸研究会 千代田区

イ Hypercholesterolemia in rats with hepatomas: increased oxysterols accelerate cholesterol efflux but do not inhibit cholesterol biosynthesis nor stimulate bile acid production. 第 19 回 International Bile Acid Meeting フライブルグ, ドイツ

ウ LC-MS/MS による血中胆汁酸合成マーカーの高感度分析. 第 28 回胆汁酸研究会 米子市

エ PROTEOMIC PROFILING OF FORMALIN-FIXED PATHOLOGICAL TISSUES BY MASS SPECTROMETRY (I). 第 21 回日本薬物動態学会年会 東京

オ 鳥インフルエンザ血清抗体検査の手法について. 地方衛生研究所全国協議会

22 回関東甲信静支部ウイルス研究部会 宇都宮市

- カ Chromosome polymorphism found in wild-caught Japanese Sika deer, *Cervus nippon* -Cumulative data in Japan, 17th European Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping, Portugal
- キ BrdU による SCEs の発生にたいする Anthocyanin の効果. 第 57 回染色体学会 千葉市
- ク MitomycinC によるウマのリンパ球に誘発された姉妹染色分体交換 (SCEs) の頻度. 第 57 回染色体学会 千葉市

(2) 論文発表

- ア Hypercholesterolemia in rats with hepatomas: increased oxysterols accelerate efflux but do not inhibit biosynthesis of cholesterol. *Hepatology* Vol. 44, 602-611(2006)
- イ Dehydroepiandrosterone and its derivatives: potentially novel anti-proliferative and chemopreventive agents. *Current Pharmaceutical Design* Vol. 12, 3411-3421(2006)
- ウ 胃炎・胃癌モデル②, *G. I. Research Journal of Gastrointestinal research* Vol. 14 no. 2 (2006)
- エ 紫甘藷抽出アントシアニンによる細胞増殖影響 *Journal of Japan Health Medicin*, (Vol. 14(1), 2006)
- オ バイオプロセスハンドブックーバイオケミカルエンジニアリングの基礎から有用物質生産・環境調和技術まで, p. 211-223 株式会社エヌ・ティー・エス, 2006
- カ Robertsonian translocation in the wild population of Japanese Sika deer (*Cervus nippon*). *Chromosome Science* (9: 89-93, 2006)
- キ Highly sensitive quantification of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in human serum by LC-ESI-MS/MS *Journal of Lipid Research*. Vol. 48, 458-464 (2007)
- ク Highly sensitive assay of HMG-CoA reductase activity by LC-ESI-MS/MS *Journal of Lipid Research*. Vol. 48, 1212-1220 (2007)

(3) 研究報告書

茨城県における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究ー首都圏近県地域における薬剤耐性変異株の発生動向ー. 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「薬剤耐性 HIV の発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」(主任研究者 杉浦 互 国立感染症研究所エイズ研究センター第二研究グループ長) 平成 18 年度総括・分担研究報告書 128-131(2007)

5 学会・研修会等出席状況

学 会 等 の 名 称	開 催 地	年 月 日	人 員
第58回日本産科婦人科学会学術講演会	横浜市	18. 4. 23～25	1
放射線障害防止法に基づく定期講習会	東京都	18. 9. 21	1
地方衛生研究所全国協議会 第21回関東甲信静 支部ウイルス研究部会	宇都宮市	18. 9. 28～29	2
第65回日本公衆衛生学会総会	富山市	18. 10. 25～27	1
アレイデータ解析フォーラム	東京都	18. 10. 31	1
第16回日本健康医学会学術集会	東京都	18. 11. 11	1
第54回日本ウイルス学会学術集会	名古屋市	18. 11. 20～21	1
第57回染色体学会学術集会	千葉市	18. 11. 23～25	1
第28回胆汁酸研究会	米子市	18. 11. 24～25	1
第20回日本エイズ学会学術集会	東京都	18. 11. 30～12. 2	1
第6回つくばテクノロジー・ショーケース	つくば市	19. 1. 30	2
肝炎等克服緊急対策研究6班合同班会議	東京都	19. 2. 1～2	2
第20回公衆衛生情報研究協議会研究会	高松市	19. 2. 14～15	1
国際シンポジウム「食の安全を担う科学研究の 新たな展開」	東京都	19. 2. 21～22	1
肝炎等克服緊急対策研究報告会	東京都	19. 3. 3	1

第3章 調査及び研究報告

ダイズ加工食品からの遺伝子組換え体（GMO）検知法の検討

—大豆加工食品における抽出効率の検討—

中村美樹、山本浩嗣、白田忠雄、柳岡知子、村上りつ子

茨城県衛生研究所

はじめに

平成13年4月より、遺伝子組換え食品の輸入及び国内での販売に際して、その遺伝子組換え食品の安全性審査を行うことが食品衛生法により義務化されるとともに、使用に関する表示が食品衛生法及びJAS法により義務化された。そのため、現在、遺伝子組換え食品を使用した場合、または遺伝子組換え食品と非遺伝子組換え食品との分別生産流通管理がされていない場合には、その旨を表示する義務がある。また、これら表示の信頼性を得るため、大豆、トウモロコシ、ジャガイモ等の農産物及び一部の加工品については、遺伝子組換え食品の検査法が厚生労働省の通知¹⁾によって明確に定められている。

一方、上記厚生労働省の通知に記載されていない種々の加工食品に関する試験方法については、その品目に応じた適切な抽出法が「JAS分析試験ハンドブック」に例示されている。しかし、同ハンドブックにおいて、良い方法を常に模索することが必要である点や、ここに示された方法で必ずしも適切なDNAが抽出できるとは限らないといった点についても記載されており、未だ改善すべき点が多く存在する。

そこで、品目に応じた適切な抽出法を選択するための一助となることを目的として、抽出法の比較を行ったので報告する。

対象及び方法

1. 対象

実験に用いた大豆加工品11品目（煮豆、豆腐、油揚げ、生揚げ、高野豆腐、おから、ゆば、豆乳、みそ、きな粉、納豆）は、茨城県内の小売店にて平成18年5月～8月にかけて購入した。

2. 試薬等

プライマーは、厚生労働省の通知¹⁾に記載のプライマー（ダイズ内在性のレクチン遺伝子検知用のプライマー Lel-n02、組換え遺伝子検知用のプライマー

RRS-01）を用いた。これらプライマー、及び陽性プラスミドは、ニッポンジーン(株)社製を用いた。

DNAの抽出キットは、キアゲン社製シリカゲル膜タイプキット（DNeasy Plant Maxi Kit）、イオン交換樹脂タイプのキット（QIAGEN Genomic-tip 20/G）を用いた。これらのキットに使用する緩衝液はキットに付属のもの、またはキアゲン社製のものを購入し使用した。

滅菌水は、MilliQ水をオートクレーブ滅菌（121℃、15分）して用いた。

DNAポリメラーゼは、アプライドバイオシステムズ社製AmpliTaq®Goldを用いた。

アガロースは、ニッポンジーン(株)社製アガロースXを用いた。

DNAマーカーは、Cambrex社製50-1000bp DNA Markerを用いた。

3. 装置

装置は、以下のものを使用した。

試料粉碎機：岩谷産業(株)製ミルサー IFM-700G

試験管ミキサー：(株)トミー精工製 PMC-060

卓上遠心機：日本ミリポア製 CHIBITAN-R

微量遠心機：(株)トミー精工製 MRX-152

高速遠心機：(株)日立製作所 himac 9RX

分光光度計：ファルマシア製 GeneQuant

恒温槽：(株)タイテック製サーモミンダー SM-05

サーマルサイクラー：Applied Biosystems 製 GeneAmp® PCR System 9700

4. DNA抽出

4.1 試料の粉碎

煮豆、豆腐、油揚げ、ゆば、みそは、試料重量と等量の滅菌水を加えて均質にした。生揚げは、内部の豆腐部分を探り、試料重量と等量の滅菌水を加えて均質にした。おからは、試料重量の2倍量の滅菌水を加えて均質にした。高野豆腐は、試料重量の10倍量の滅菌水を加えて10分放置後、均質にした。納豆は、流水で15分間洗浄、

滅菌水で洗浄、水切り後、試料重量と等量の滅菌水を加えて均質にした。豆乳は、試料をそのまま抽出に供した。

4.2 DNeasy Plant Maxi Kit(以下Maxiキットと略す)を用いた抽出

4.1で調製した均質化試料2.0gを用いて、JAS分析ハンドブックに示された方法にて抽出を行った。

4.3 QIAGEN Genomic-tip 20/G(以下G-tipキットと略す)を用いた抽出

4.1で調製した均質化試料2.0gを用いて、JAS分析ハンドブックに示された方法にて抽出を行った。

5. PCR

5.1 DNA抽出液の希釈

0. D. 260nmよりDNA濃度を算出した結果を元に10 μ g/mlとなるよう滅菌水で希釈してPCRに用いる鋳型DNAを調製した。なお、抽出したDNAの濃度が10 μ g/ml以下の場合、そのまま鋳型DNAとした。

5.2 定性PCR

PCR反応液は、10 μ g/mlに希釈調製した上記DNA溶液を2.5 μ L加えて全量を25 μ Lになるようにした。同反応液には、1 \times PCR緩衝液、0.20mmol/L dNTP、3mmol/L塩化マグネシウム、0.20 μ mol/Lプライマー及び0.625units DNAポリメラーゼを含有するように調製した。

PCR反応は、95 $^{\circ}$ Cに10分間保持後、95 $^{\circ}$ C 30秒間、60 $^{\circ}$ C 30秒間、72 $^{\circ}$ C 30秒間を1サイクルとして40サイクルの増幅反応をサーマルサイクラーで行った。

反応後、PCR反応液5 μ Lとローディング緩衝液1 μ Lとを混合した混合液を3.0%アガロースゲルに供し、TAE緩衝液中100Vの定電圧にて電気泳動を行った。

泳動後、UV照射下で断片の有無を確認した。

結果

1. 抽出結果

Maxiキットを用いた抽出結果を表1に、G-tipキットを用いた抽出結果を表2に示した。

1.1 抽出DNAの回収量

Maxiキットを用いた抽出よりも、G-tipキットを用いた抽出の方がいずれも回収量が多かった。しかし、油揚

げ及びおからに関しては、抽出過程においてG-tipキットのカラムで目詰まりを起こしたため、DNA抽出ができなかった。

1.2 抽出DNAの純度

260nm/280nm吸光度比が1.7~2.0となった場合に、タンパク質等の不純物は除去された、すなわちPCRに適したDNAが抽出精製されたと推定される。表1、表2によると、1食品で2.1となったが、その他の食品で1.8~2.0の範囲に属していた。

また、260nm/230nm吸光度比は、2.0以上が理想値とされている。この吸光度比は、糖類やフェノール類などの低分子化合物の混入があると低くなるためである⁴⁾。表1、表2によると、Maxiキットを用いた抽出では、G-tipキットを用いた抽出より、260nm/230nmの値が低くなる傾向があった。これより、G-tipキットの方が低分子化合物の夾雑物を除去する効果が高いことが示された。

表1 Maxiキットを用いたDNA抽出結果(n=3)

	回収量(μ g/g)		260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
	範囲	平均	(平均)	(平均)
煮豆	2.4-2.9	2.4	2.1	0.5
豆腐	5.9-7.6	6.9	2.0	2.0
油揚げ	1.8-6.8	4.0	2.0	1.6
生揚げ	8.7-9.6	9.2	1.9	1.9
高野豆腐	20.8-21.1 ^{*)}	21.0	1.9	2.0
おから	6.4-9.5	7.9	2.0	1.0
ゆば	12.6-17.5	15.7	1.9	2.0
豆乳	3.7-5.3	4.5	1.9	2.0
みそ	0.2-0.4	0.3	2.0	0.6

*) 1検体抽出不可

表2 G-tipキットを用いたDNA抽出結果(n=3)

	回収量(μ g/g)		260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
	範囲	平均	(平均)	(平均)
煮豆	10.5-25.3	19.9	1.8	1.9
豆腐	20.7-21.4	21.0	1.8	2.6
油揚げ	— ^{**)}	— ^{**)}	— ^{**)}	— ^{**)}
生揚げ	47.3-69.0	59.0	1.8	2.3
高野豆腐	110.0-135.2	121.6	1.8	2.5
おから	— ^{**)}	— ^{**)}	— ^{**)}	— ^{**)}
ゆば	37.5-48.7	43.1	1.9	2.2
豆乳	15.7-18.9	17.2	1.8	2.3
みそ	5.0-9.8	8.0	2.0	2.0
納豆	2.6-2.8	2.7	1.8	0.5

***) 抽出不可

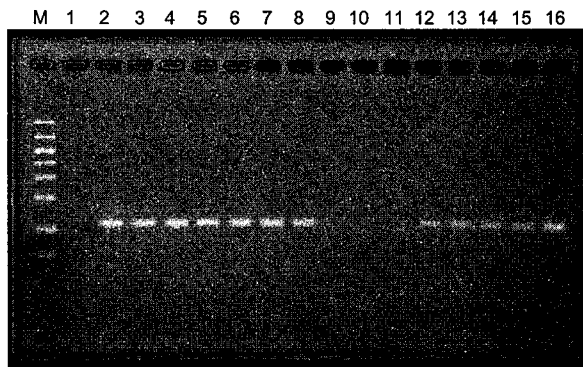
1.2 定性PCR結果

得られた抽出DNAを用いた定性PCRの結果を表3に、電気泳動結果を図1、図2に示した。

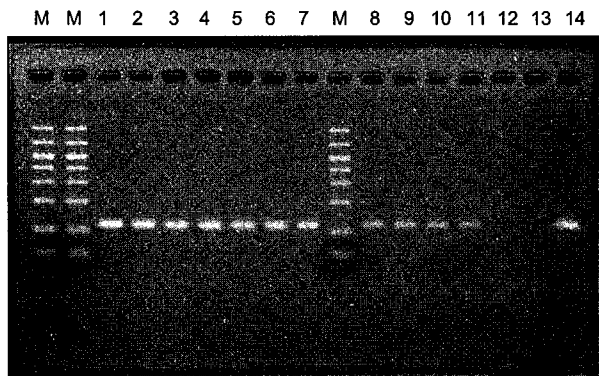
表3 定性 PCR の結果

品目	Maxi キット		G-tip キット		判定
	内在性遺伝子	組換え遺伝子	内在性遺伝子	組換え遺伝子	
煮豆	++	-	++	-	陰性
豆腐	++	++	++	++	陽性
油揚げ	++	++	NA	NA	陽性
生揚げ	++	++	++	++	陽性
高野豆腐	++	++	++	++	陽性
おから	++	-	NA	NA	陰性
ゆば	++	-	+	-	陰性
豆乳	++	-	+	-	陰性
みそ	+	-	+	-	陰性
納豆	NA	NA	-	-	検査不能

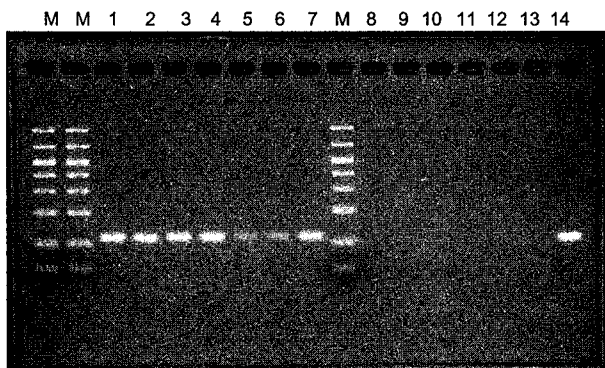
+: 増幅断片あり (+の数は断片の強度を示す) - : 増幅断片なし NA: 未検査



- M : マーカー
- 1 : ネガティブコントロール(内在性遺伝子)
- 2, 3 : 煮豆(内在性遺伝子)
- 4, 5 : 豆腐(内在性遺伝子)
- 6, 7 : 油揚げ(内在性遺伝子)
- 8 : ポジティブコントロール(内在性遺伝子)
- 9 : ネガティブコントロール(組換え遺伝子)
- 10, 11 : 煮豆(組換え遺伝子)
- 12, 13 : 豆腐(組換え遺伝子)
- 14, 15 : 油揚げ(組換え遺伝子)
- 16 : ポジティブコントロール(組換え遺伝子)



- M : マーカー
- 1, 2 : 生揚げ(内在性遺伝子)
- 3, 4 : 高野豆腐(内在性遺伝子)
- 5, 6 : おから(内在性遺伝子)
- 7 : ポジティブコントロール(内在性遺伝子)
- 8, 9 : 生揚げ(組換え遺伝子)
- 10, 11 : 高野豆腐(組換え遺伝子)
- 12, 13 : おから(組換え遺伝子)
- 14 : ポジティブコントロール(組換え遺伝子)



- M : マーカー
- 1, 2 : ゆば(内在性遺伝子)
- 3, 4 : 豆乳(内在性遺伝子)
- 5, 6 : みそ(内在性遺伝子)
- 7 : ポジティブコントロール(内在性遺伝子)
- 8, 9 : ゆば(組換え遺伝子)
- 10, 11 : 豆乳(組換え遺伝子)
- 12, 13 : みそ(組換え遺伝子)
- 14 : ポジティブコントロール(組換え遺伝子)

図1 Maxi キットによる抽出 DNA を使用した定性 PCR

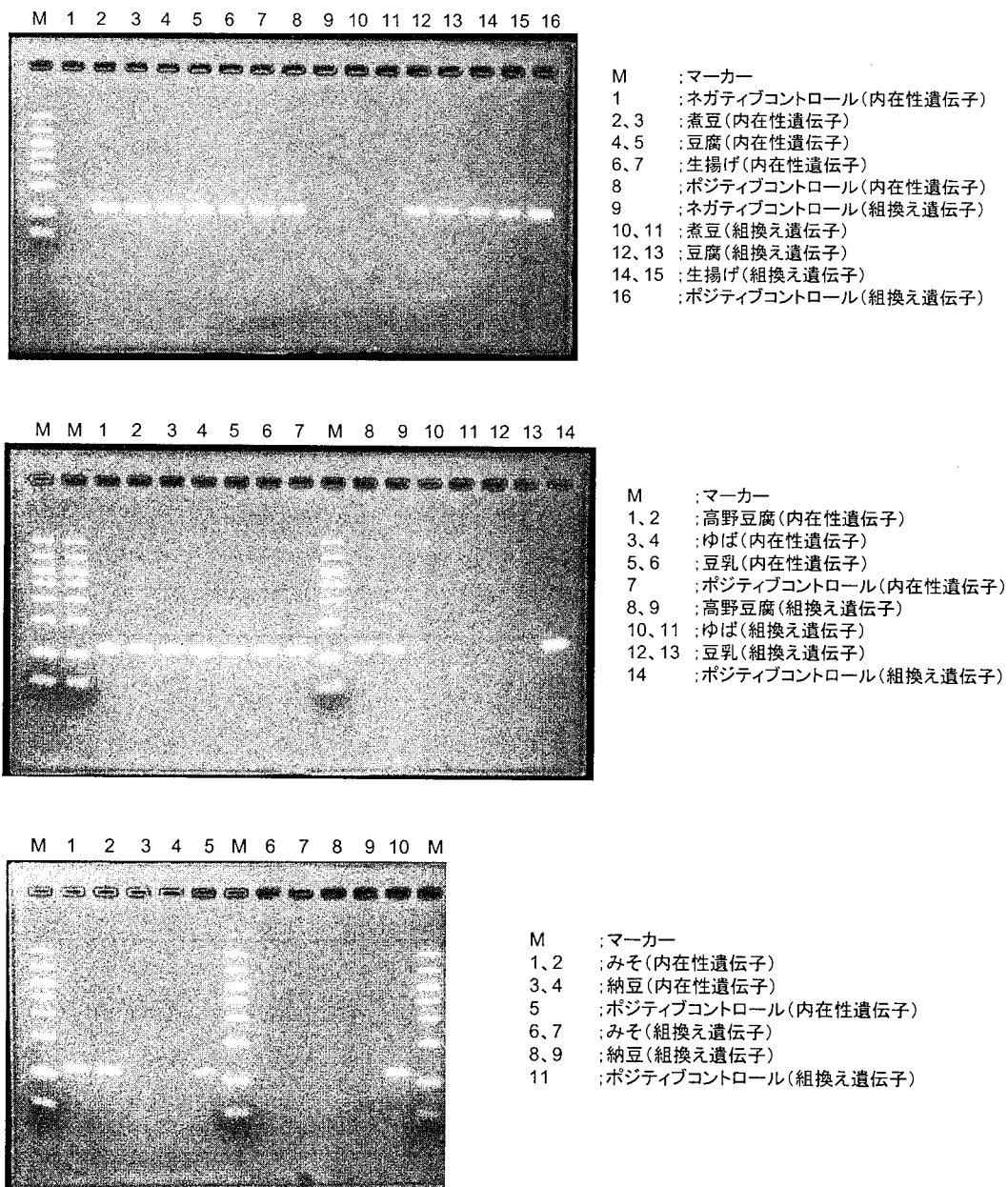


図2 G-tip キットによる抽出 DNA を使用した定性 PCR

2. 納豆についての再検討

2.1 抽出効率の比較

納豆について検査不能であったため(表3)、さらに3種の納豆製品を用いてDNA抽出を行った結果を表4、表5に示した。すべての結果で、260nm/230nm比の値が低く、夾雑物の除去が不十分であることが示唆された。

表4 Maxi キットを用いた DNA 抽出結果 (n=2)

	回収量 (μg/g)		260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
	範囲	平均	(平均)	(平均)
納豆-1	16.5-17.6	17.1	1.9	0.6
納豆-2	—**)	2.7	2.1	0.3
納豆-3	2.8-4.1	3.5	2.0	0.3

***) n=2のうち1サンプル抽出不可能

表5 G-tip キットを用いた DNA 抽出結果 (n=2)

	回収量 (μg/g)		260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
	範囲	平均	(平均)	(平均)
納豆-1	—	—	—	—
納豆-2	14.5-18.5	16.5	1.6	0.2
納豆-3	13.1-27.3	20.2	1.7	0.2

2.2 納豆の定性 PCR

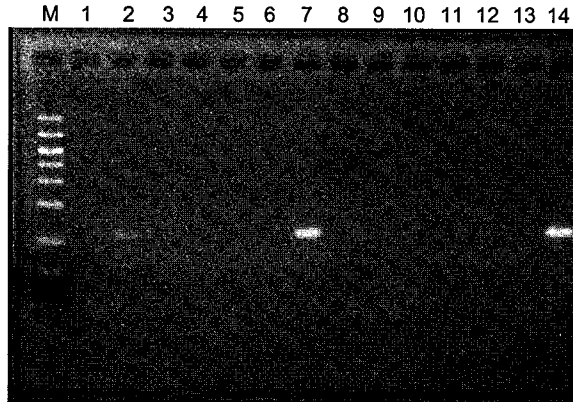
納豆から抽出した DNA を用いた定性 PCR の結果を表 6 に示した。図 3、図 4 は、電気泳動の結果である。

内在性遺伝子の増幅断片が得られた場合であっても、非常に増幅効率が悪く、検査精度としては不適切であった。

表 6 定性 PCR の結果 (納豆)

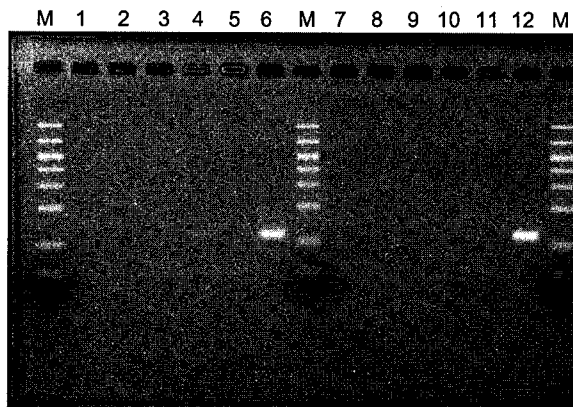
品目	Maxi キット		G-tip キット		判定
	内在性遺伝子	組換え遺伝子	内在性遺伝子	組換え遺伝子	
納豆-1	+	-	NA	NA	検査不可
納豆-2	-	-	-	-	検査不可
納豆-3	-	-	+	-	検査不可

+: 増幅断片あり (+の数は断片の強度を示す) - : 増幅断片なし NA : 未検査



- M ; マーカー
- 1 ; ネガティブコントロール(内在性遺伝子)
- 2, 3 ; 検体1 (内在性遺伝子)
- 4 ; 検体2 (内在性遺伝子)
- 5, 6 ; 検体3 (内在性遺伝子)
- 7 ; ポジティブコントロール(内在性遺伝子)
- 8 ; ネガティブコントロール(組換え遺伝子)
- 9, 10 ; 検体1 (組換え遺伝子)
- 11 ; 検体2 (組換え遺伝子)
- 12, 13 ; 検体3 (組換え遺伝子)
- 14 ; ポジティブコントロール(組換え遺伝子)

図 3 Maxi キットによる抽出 DNA を使用した定性 PCR (納豆)



- M ; マーカー
- 1 ; ネガティブコントロール(内在性遺伝子)
- 2, 3 ; 検体2 (内在性遺伝子)
- 4, 5 ; 検体3 (内在性遺伝子)
- 6 ; ポジティブコントロール(内在性遺伝子)
- 7 ; ネガティブコントロール(組換え遺伝子)
- 8, 9 ; 検体2 (組換え遺伝子)
- 10, 11 ; 検体3 (組換え遺伝子)
- 12 ; ポジティブコントロール(組換え遺伝子)

図 4 G-tip キットによる抽出 DNA を使用した定性 PCR (納豆)

考察

各種大豆加工食品から Maxi キット、及び G-tip キットを用いて DNA 抽出を行い、抽出された DNA の純度、回収率を調べた結果、両者とも DNA 抽出が可能であった場合には、G-tip キットの方が純度、回収率のともに優れているとの結果が得られた。しかし、今回実験に供した大豆加工食品のうち納豆を除いた 9 種については、いずれの抽出でも定性 PCR 反応には十分適用可能な抽出 DNA を得ることができた。

しかし、G-tip キットでは、製品の種類によって、抽

出途中でカラムに目詰まりを起こすために DNA 抽出を完了することが不可能であるものがあつた。これは、製品を溶解させる初めの段階において浮遊物が残存してしまうことが原因であつた。

したがって、大豆加工製品の性質によって、適切な抽出キットを選択することが望ましいと考えられた。

納豆については、すべての結果で、260nm/230nm 比の値が低く、夾雑物の除去が不十分であることが示唆された。また、定性 PCR に適する抽出 DNA が得られなかったことから、さらに検討が必要であると考えられた。

まとめ

今回の結果から、種々の大豆加工食品から DNA を抽出する方法について、その食品の物性に応じた方法を選ぶための示唆が得られた。また、納豆について、不純物を除去した純度の高い DNA を抽出する方法を得ることが今後の課題である。

参考文献

- 1) 平成 12 年 3 月 31 日付農林水産省告示第 517 号「遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第 7 条第 1 項及び生鮮食品品質表示基準第 7 条第 1 項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準」
- 2) (独) 農林水産消費技術センター「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル (改正第 2 版)」平成 14 年 6 月 20 日 (2002)
- 3) 平成 13 年 3 月 27 日付厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第 110 号「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(2001)
- 4) (社) 日本食品衛生協会「食品衛生検査指針 (理化学編) 2005」

イオンクロマトグラフポストカラム法を用いた食品中臭素酸分析
 ○白田忠雄 久保田京子 山本浩嗣 中村美樹 柳岡知子 村上りつ子
 (茨城県衛生研究所)

食品中臭素酸について通知法¹⁾(以下通知法)により調製した試験溶液を、水質基準項目の臭素酸告示法であるイオンクロマトグラフポストカラム吸光光度法²⁾(以下IC-PC法)に用いた場合、保持時間が標準液より大幅に遅れ、ピークの同定が困難であったので、その原因および対策について検討を行った。その結果、試験溶液の硝酸ナトリウム濃度が0.5%と高いためにピークがブロード化すること、陰イオン交換カートリッジの洗浄に用いる20%(v/v)酢酸の水洗いが不十分なために保持時間が遅れること、銀イオン交換カラム中の残存硝酸イオン濃度が高い場合に陰イオン交換カートリッジにおける臭素酸イオンの回収率が低下することなどにより同定が困難になることがわかった。このため、対処法について検討した結果、陰イオン交換カートリッジの固相量は60mgを30mg、硝酸ナトリウム溶出液は0.5%を0.2%、水洗浄および銀カラムの洗浄法については回数、方法について変更した結果、小麦粉については、保持時間は安定し回収率も向上した。さらに他の陰イオン性夾雑物のうち、リン酸イオン、硫酸イオンを除去することを試みた結果、安定して70%以上の回収率が得られた。

キークード 臭素酸 イオンクロマトグラフ-ポストカラム法 保持時間延長

1 はじめに

小麦粉品質改良剤の臭素酸カリウムは、小麦粉を原料として使用するパンにのみ使用が認められているが、発がん性があるとの報告があるため、最終製品中には残存しないことが条件とされている。したがって、パン中臭素酸の残存量を測定するためには、高感度な分析法が必要とされる。現行の通知法であるポストカラムHPLC法¹⁾では、定量下限2ng/gで測定が可能とされるが、反応試薬として用いる強酸に耐える装置が必要であり、また、移動相などに有機溶媒を使用する。一方、平成15年の水道法の改正に伴い、水質基準項目に臭素酸が追加され、IC-PC法による試験法も告示された²⁾。この方法は、臭素酸を三臭化イオンとして268nmの吸光度により定量する方法で定量下限値が0.001mg/Lの高感度な方法である。また、亜塩素酸イオンについても応用できるため、カズノコ中亜塩素酸イオン測定において良好な結果が得られている³⁾。そこで、IC-PC法による食品中臭素酸の分析を試みたところ、通知法(図1:太字斜体を除く)によって調製した試験溶液をIC-PC法に用いた場合、保持時間が標準液より大幅に遅れ(図2)、ピークの同定が困難であったので、その原因および対策について検討を行った。

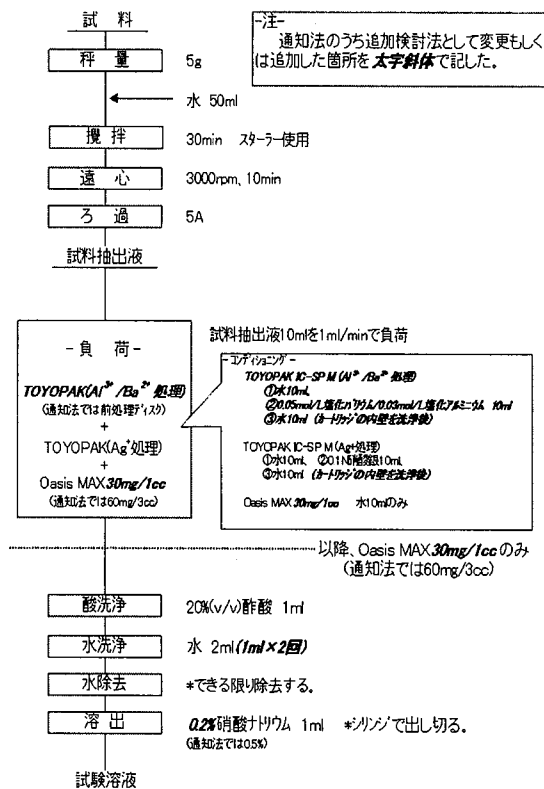


図1 臭素酸試験溶液調製法(通知法及び追加検計法)

2 方法

2.1 試料

市販されている小麦粉を用いた。

2.2 試薬類

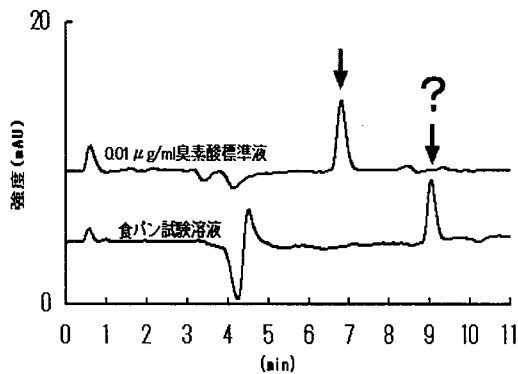


図2 通知法に準じて調製した標準添加食パン試験溶液と臭素酸標準液をIC-PC法により測定したクロマトグラム

2. 2. 1 標準液

臭素酸標準原液：関東化学株式会社製 1000 μg/ml 臭素酸イオンクロマト用

リン酸イオン標準原液：和光純薬工業株式会社製 1000 μg/ml リン酸イオン標準液

硫酸イオン標準原液：和光純薬工業株式会社製 1000 μg/ml 硫酸イオン標準液

陰イオン混合標準液：関東化学株式会社製陰イオン混合標準液 I イオンクロマトグラフィ用

以上の標準液は、適宜水で希釈して調製した。

20 μg/ml 酢酸イオン標準液：特級酢酸 20mg を水で 1L にした。

2. 2. 2 その他

臭化カリウム、亜硝酸ナトリウム、塩化アルミニウム、硝酸：関東化学株式会社製特級

炭酸ナトリウム(無水)、酢酸、硝酸ナトリウム、硝酸銀、塩化バリウム：和光純薬工業株式会社製特級

水：日本ミリポア株式会社製 MILLI-Q-SPTOC により作成

硫酸：和光純薬工業株式会社製精密分析用

臭化カリウム-硫酸溶液、亜硝酸ナトリウム溶液は IC-PC 法に、20v/v%酢酸、0.1mol/L 硝酸銀溶液は通知法に準じて調製した。

900mmol/L 炭酸ナトリウム溶液(100 倍濃縮溶離液)：炭酸ナトリウム(無水) 19.08g を水で溶かして 200ml にした。

9mmol/L 炭酸ナトリウム溶液：900mmol/L 炭酸ナトリウム溶液 20ml に水を加えて 2l にした。

9mmol/L 炭酸ナトリウム/25mmol/L 酢酸：900mmol/L

表1 測定条件

装置名	DIONEX 製 ICS-1500、PCM-510
カラム	Ionpac AS9-HC(4×250mm)
ガードカラム	Ionpac AG9-HC(4×50mm)
溶離液	9mmol/L Na ₂ CO ₃ 溶液
溶離液流量	1.0ml/min
カラム温度	35°C
ポストカラム反応液 A	1.2mmol/L NaNO ₂ 溶液
ポストカラム反応液 B	1.5mol/L KBr/1.0mol/L H ₂ SO ₄ 溶液
反応液流量 A	200 μl/min
反応液流量 B	400 μl/min
反応コイル	2.0×0.51mm
反応コイル温度	40°C
試料量	250 μl
検出器	UV:268nm/電気伝導度*
サプレッサー*	AMMS-III
再生液*	15mmol/l 硫酸
再生液流量*	1ml/min

*陰イオン測定用

炭酸ナトリウム溶液 10ml に約 900ml の水を加え、酢酸 1.5ml を加えて混合した後、水を加えて 1l にした。

0.05mol/L 塩化バリウム/0.03mol/L 塩化アルミニウム混合溶液：塩化バリウム 1.2g 及び塩化アルミニウム 0.8g に水を加えて溶かし 100ml にした。

陰イオン交換カートリッジ：Waters 社製 OasisMAX30mg/1cc (MAX30mg)へ使用前に水 1ml を通過させて調整した。

脱塩素イオン用銀交換カラム：東ソー株式会社製 TOYOPAK IC-SP M へ使用前に 0.1mol/L 硝酸銀溶液 10ml を通過させた後、水 10ml で洗浄して調整した。

脱硫酸イオン/リン酸イオン用カラム：東ソー株式会社製 TOYOPAK IC-SP M へ使用前に 0.05mol/L 塩化バリウム/0.03mol/L 塩化アルミニウム混合溶液 10ml を通過させた後、水 10ml で洗浄して調整した。

前処理ディスク：東ソー株式会社製マイシヨリディスク W-25-A

ろ紙：ADVANTEC 社製 5A

2. 3 装置及び測定条件

表 1 に示した。なお、IC-PC 法による測定時、陰イオン測定用の電気伝導度検出器、サプレッサーも同時に使用した。

2. 4 試験方法

2. 4. 1 試料抽出液の調製

通知法に準じて試料抽出液を調製した。すなわち、小麦 5g を量りとり、水 50ml を加えて 30 分間攪拌し、3000rpm、10 分間遠心分離後、上清をろ過して抽出液を調製した(図 1)。

2. 4. 2 原因探索

2. 4. 2. 1 陰イオン交換カートリッジ酸洗浄

に用いる酢酸の臭素酸保持時間に及ぼす影響確認
 試験溶液中酢酸濃度と臭素酸保持時間の関係
 臭素酸は $0.02 \mu\text{g/ml}$ 、酢酸は $0 \sim 0.2 \text{mol/L}$ となるようにそれぞれ調製後測定した。なお、対照として硝酸と硫酸についても同様に調製後臭素酸の保持時間を比較した。ただし、硫酸濃度は $0 \sim 0.1 \text{mol/L}$ とした。

2. 4. 2. 2 炭酸ナトリウム/酢酸溶離液による臭素酸保持時間の確認

9mmol/L 炭酸ナトリウム溶離液及び 9mmol/L 炭酸ナトリウム/ 25mmol/L 酢酸溶離液それぞれで $0.1 \mu\text{g/ml}$ 臭素酸標準液を測定し保持時間を比較した。また、 25mmol/L 酢酸中 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 臭素酸標準溶液についても同様に測定し保持時間を比較した。

2. 4. 2. 3 化学量論に基づいた酢酸イオン溶離による臭素酸保持指数の算出

$20 \mu\text{g/ml}$ 酢酸イオン標準液を電気伝導度検出器で測定し、併せて無駄時間も測定後、保持指数を計算した。次に酢酸イオンに対する臭素酸の選択係数について、臭素酸と酢酸イオンの保持指数比から求め、 9mmol/L 炭酸ナトリウム/ 25mmol/L 酢酸溶離液における臭素酸の保持指数を概算した⁴⁾。また、対照として硝酸イオン硫酸イオンについて、陰イオン混合標準液を用いて同様に処理した。

2. 4. 2. 4 陰イオン交換カラム溶出液に用いる硝酸ナトリウム濃度と臭素酸ピーク形状の関係

臭素酸は $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、硝酸ナトリウムは $0 \sim 0.5\%$ になるようにそれぞれ調製後測定し、ピーク形状を比較した。

2. 4. 3 対処法

2. 4. 3. 1 陰イオン交換カートリッジの固相量、水洗浄及び溶出液濃度の検討

固相量 30mg の MAX30mg $\sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ 臭素酸標準溶液を 1ml 負荷、 $20\%(\text{v/v})$ 酢酸 1ml 処理後、水 1ml を直接 MAX30mg \sim 注入する洗浄を 2 回実施し、水除去後 $0.05 \sim 0.2\%$ の硝酸ナトリウム溶液それぞれで溶出測定後、回収率を求めた。

2. 4. 3. 2 MAX30mg 負荷時における硝酸イオンの影響

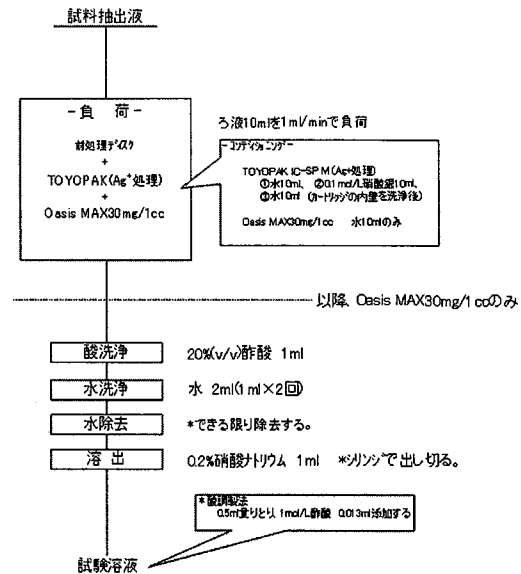


図3 対照調製法及び酸調製法

臭素酸は $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、硝酸銀は $0.05 \sim 0.5 \text{mmol/L}$ になるようにそれぞれ調製後、各溶液を MAX30mg $\sim 1 \text{ml}$ 負荷した。つづいて $20\%(\text{v/v})$ 酢酸 1ml 処理後、水 1ml を直接 MAX30mg \sim 注入する洗浄を 2 回実施し、水除去後 0.2% 硝酸ナトリウム溶液で溶出し、測定して回収率を求めた。

2. 4. 3. 3 酢酸による 0.2% 硝酸ナトリウム中臭素酸ピーク形状の確認

臭素酸は $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、硝酸ナトリウムは 0.2% 、酢酸は $0 \sim 0.1 \text{mol/L}$ になるようにそれぞれ調製後測定してピーク形状を比較した。

2. 4. 3. 4 酢酸による試験溶液中臭素酸感度改善効果

小麦に臭素酸を濃度が $0.01 \mu\text{g/g}$ になるように添加し、2.4.1の方法で小麦抽出液を調製した。つぎに、前処理ディスク、予め 2.2.2の方法で調整した脱塩素イオン用銀交換カラム(内壁洗浄済み)、MAX30mgをこの順番で接続し、先の小麦抽出液を負荷した。つぎに、MAX30mgのみを $20\%(\text{v/v})$ 酢酸 1ml で処理し、水 1ml を直接 MAX30mg \sim 注入する洗浄を 2 回実施し、水除去後 0.2% 硝酸ナトリウム溶液で溶出した試験溶液を測定した(対照調製法)。さらに、この試験溶液 0.5ml に最も良好なピーク形状を示した酢酸濃度になるように、 1mol/L 酢酸を加えて調製(酸調製法)後測定し、対照調製法と酸調製法の臭素酸ピーク形状及び面積を比較した。概要を図3に示した。

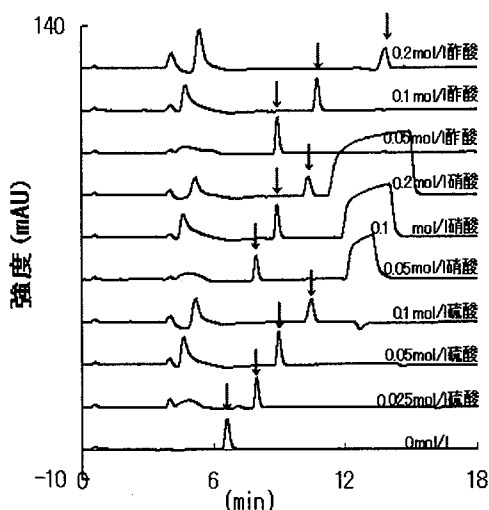


図4 酢酸(硝酸、硫酸)中0.02 μg/ml 臭素酸の酸濃度別クロマトグラム

2. 4. 3. 5 小麦抽出液中の陰イオンの確認

小麦抽出液を水で10倍に希釈して電気伝導度法で測定し、クロマトグラムから臭素酸イオン以外の陰イオンを確認した。

2. 4. 3. 6 イオン性夾雑物の除去

小麦へ臭素酸を濃度が0、0.002、0.005、0.01 μg/gになるように添加し、2.4.1の方法で試料抽出液を調製した。予め2.2.2の方法で調整した脱硫酸イオン/リン酸イオン用カラム、脱塩素イオン用銀交換カラム、MAX30mgをこの順番で接続した連結カラムを用いて小麦抽出液を負荷した。つぎに、MAX30mgのみを20%(v/v)酢酸1mlで処理し、水1mlを直接MAX30mgへ注入する洗浄を2回実施し、水除去後0.2%硝酸ナトリウム溶液で溶出した(追加検討法)。概要を図1(太字斜体)に示した。比較対照法として同じ抽出液を用いて、2.4.3.4の対照調製法により試験溶液を調製し、測定後回収率を求めて比較した。

3 結果および考察

3. 1 原因探索

臭素酸同定が困難であった原因を探索するため、2.4.3.1を実施した結果、酢酸の濃度が高くなるにつれ保持時間が長くなり、ピーク形状は0mol/Lの濃度より0.05~0.1mol/L濃度の間でよりシャープなピークが得られた(図4)。対照として測定した硝酸、硫酸も同様の結果であったが、

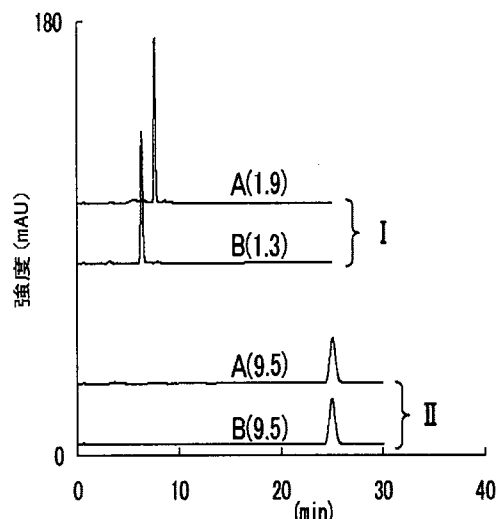


図5 9mmol/L炭酸ナトリウム溶液及び酢酸含有9mmol/L炭酸ナトリウム溶液別臭素酸と酢酸中臭素酸のクロマトグラム

I: 溶液液-9mmol/L炭酸ナトリウム
II: 溶液液-9mmol/L炭酸ナトリウム/25mmol/L酢酸
A: 0.025mol/L酢酸中0.1 μg/ml臭素酸標準液
B: 0.1 μg/ml臭素酸標準液
*()内は保持指数

酢酸に比べて変化は小さかった。通常、保持時間が遅くなるとピークはブロードになるが、酢酸濃度が0.05~0.1mol/L間では逆の結果になった。このため、保持時間の遅れとピークのシャープ化が酢酸の影響なのか更に考察するため、2.4.2.2及び2.4.2.3を実施した。その結果、9mmol/L炭酸ナトリウム/25mmol/L酢酸溶離液の臭素酸保持指数は9.5であり、9mmol/L炭酸ナトリウム溶離液の結果1.3の約7倍であった(図5)。一般に炭酸ナトリウムと酸を混合すると炭酸イオンは水と二酸化炭素に分解され消費される。したがって、この結果は溶離液として用いた炭酸ナトリウムと酢酸を混合後に残された酢酸イオンにより溶出されたことが推測された。また、化学量論に基づいて保持指数を算出した結果、9mmol/L炭酸ナトリウム/25mmol/L酢酸混合溶離液を用いたときの臭素酸の保持指数は、解離定数を考慮して11.5となり、先の実測値9.5より大きくなった。概算値と実測値との誤差については、選択係数や固相液相体積比を定数と仮定して算出していることなどに由来していると思われ、注意を要するところではあるが⁹⁾、9mmol/L炭酸ナトリウム溶離液の結果1.3に比べ明らかに伸びており、炭酸イオンによる溶出ではなく、酢酸イオンによる溶

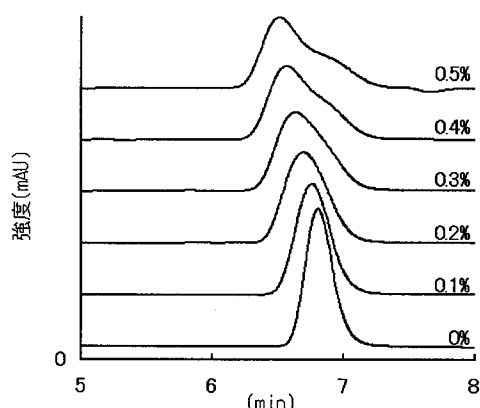


図6 硝酸ナトリウム濃度別臭素酸(0.1 μg/ml)クロマトグラム

出が強く示唆された。更に、酢酸に対する臭素酸の選択係数は 2.07、硝酸に対しては 0.36、硫酸では 0.44 であった。この結果は、酢酸の臭素酸溶出作用は硝酸、硫酸より弱いことを意味し、酢酸による臭素酸保持時間延長への影響が大きいこともわかった。これらの結果から、酢酸が試験溶液に入ると、注入時にカラム先端で中和反応が起き、イオン交換基に結合していた炭酸イオンが分解される。このため臭素酸が非競合的にイオン交換基に結合できるようになり、酢酸がない場合よりも局所的に結合する。そして、溶離剤の炭酸イオンにより一気に溶出され、酢酸がない場合より感度が上昇したと思われた。また、臭素酸の保持は酢酸イオンよりも強いため、酢酸のカラム内での中和効果が酢酸濃度に比例して影響を及ぼし保持時間も遅れたものと推測した。さらに、大量注入法による濃縮効果⁶⁾により感度を上げているため、大量に試験溶液がカラムに流入することも感度増強及び保持延長を強めているものと思われた。

また、臭素酸ピーク形状と MAX30mg の溶出液として用いかつ最終試験溶液の硝酸ナトリウム濃度の関係について 2.4.2.4 により確認したところ、濃度が高まるにつれ、ピークはブロード化して 0.3%以上で右ショルダーが現れた(図 6)。

これらのことから、IC-PC 法に通知法の試験溶液調製を用いると、①陰イオン交換カートリッジ洗浄に用いる 20%(v/v)酢酸の水洗いが十分でも、硝酸ナトリウム濃度が 0.5%と高いためにピークがブロード化して検出できない場合、②

表2 陰イオンカートリッジ OasisMAX30mg 溶出試験結果

硝酸ナトリウム濃度 (%)	n	回収率		備考
		平均 (%)	RSD (%)	
0.05	3	4	51.6	
0.1	3	90	6.1	
0.2	3	95	2.9	
0.5	1	96	—	

20%(v/v)酢酸の水洗いが不十分な結果、試験溶液中に酢酸が混入し、ピークがシャープになったものの保持時間が遅れて検出できない場合、③後述する脱塩素イオン用銀交換カラムの洗浄が不十分なために、残存した硝酸イオンによる陰イオン交換カートリッジへの臭素酸保持妨害などにより同定が困難になったと考えられた。

3. 2 対処法

3. 2. 1 陰イオン交換カートリッジの固相量、水洗浄及び溶出液濃度の検討

川崎ら⁷⁾による固相量 60mg の OasisMAX カラムの溶出液の検討では、硝酸ナトリウム溶出液濃度 0.5%を用いて 85.6%と良好な回収率が得られている。しかし、この濃度は、IC-PC 法で測定した場合、3.1 の結果からピーク形状に右ショルダーが現れるため、濃度を下げなければならない。このため、固相量が 30mg と少ない MAX30mg による検討を 2.4.3.1 により実施した。その結果、0.1%以上の硝酸ナトリウム濃度で溶出した場合、安定して 90%以上の回収率が得られた(表 2)。また、20%(v/v)酢酸洗浄後の MAX30mg の水洗いについて酢酸の保持時間延長効果の有無を確認したところ、0.2%硝酸ナトリウム溶液を用いた場合 6.66~6.68 分で安定していた。0.1 μg/ml 臭素酸標準液の保持時間は 6.70~6.72 分であり、酢酸の水洗いが十分であることがわかった。したがって、ピーク形状(図 6)と安定した回収率(表 2)が得られることを考慮して、固相量は 30mg の MAX30mg、溶出液は 0.2%硝酸ナトリウム溶液を選択し、MAX30mg 水洗浄は 1ml を 2 回実施する方法を用いることにした。

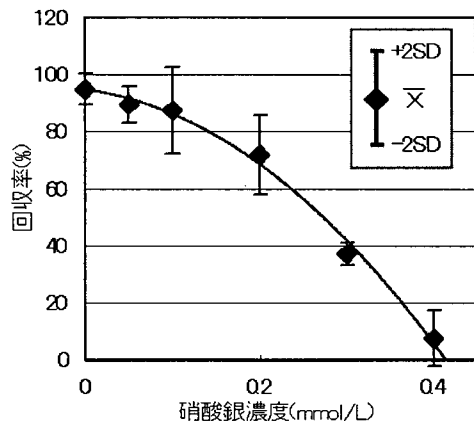


図7 MAX30mgの硝酸銀共存下臭素酸(0.1 μg) 添加回収試験率(n=3)

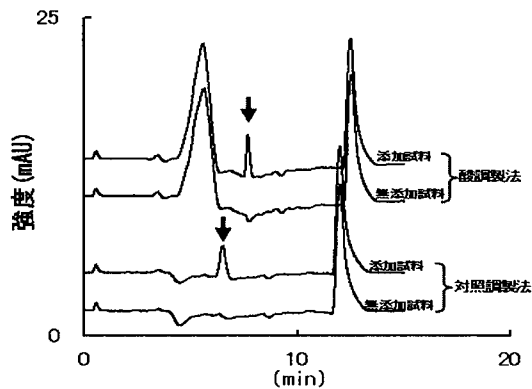


図9 臭素酸(0.01 μg/g)添加小麦試料と無添加試料の試験溶液調製方法別クロマトグラム

3. 2. 2 MAX30mg 負荷時における硝酸イオンの影響

実験当初、小麦抽出液を 3. 2. 1 の結果を踏まえた方法(図 3 TOYOPAK IC-SP M のコンディショニングのうち内壁洗浄のみ実施しない方法)で処理し添加回収試験を実施したところ、回収率が低くバラツキも大きかった。銀イオン交換カラムからの硝酸イオンの影響も考えられたため、2. 4. 3. 2 を実施した。その結果 0. 1 mmol/L 以上にすると急激に回収率が下り、90%以上の回収率を得るためには、硝酸イオンを 0. 05 mmol/L 以下にする必要性がわかった(図 7)。0. 05 mmol/L 硝酸銀濃度は、TOYOPAK-Ag 調整用の 0. 1mol/L 硝酸銀溶液の 2000 倍希釈に相当するため、MAX30mg へ接続する前の TOYOPAK-Ag カラムの調整時に内壁洗浄など十分に実施する必要性も確認できた。

3. 2. 3 酢酸による 0. 2%硝酸ナトリウム中

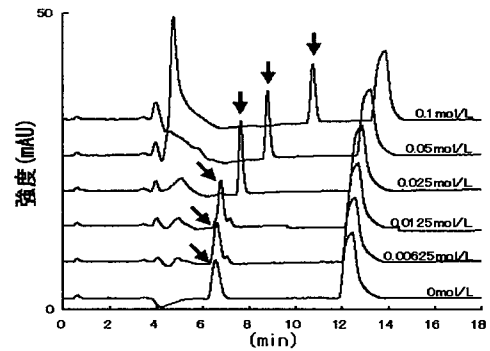


図8 0.2%硝酸ナトリウム中酢酸濃度別臭素酸(0.02 μg/ml)クロマトグラム

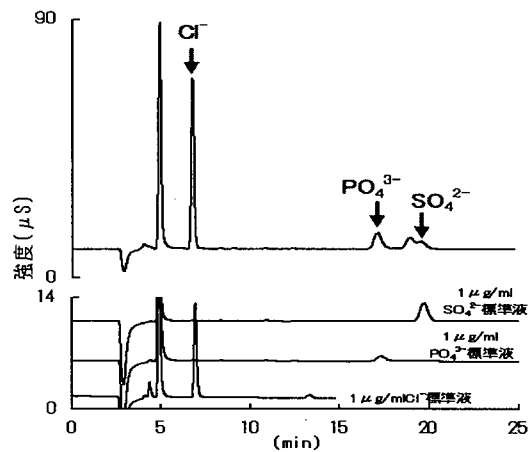


図10 小麦粉抽出液10倍希釈液及び標準液の電気伝導度検出によるクロマトグラム

臭素酸イオンピーク形状及び試験溶液中感度改善効果

3. 1 の結果から酢酸による感度増強が見込まれたため 2. 4. 2. 3 を実施した。その結果 0. 025mol/L のとき最もピークがシャープであり、酢酸を入れていない場合に比べピークの高さが約 2 倍になった(図 8)。このため、試験溶液の酢酸濃度を 0. 025 mol/L に調製した酸調製法と酢酸を用いない対照調製法(図 3)を 2. 4. 3. 4 により実施し、ピーク形状及び面積を比較した。その結果、ピーク形状は酸調製法は対照調製法よりシャープだが対照調製法に対する酸調製法の面積比は 84~89%と低かった。これは、酸調製法の臭素酸無添加試験溶液の臭素酸のピーク位置でマイナスに落ち込んでいることとベースライン変動が大きくなったことが原因と思われた(図 9)。このため、今回用いた IC-PC 法による測定条件では小麦試験溶液中臭素酸の酢酸による感度改善効果は得られ

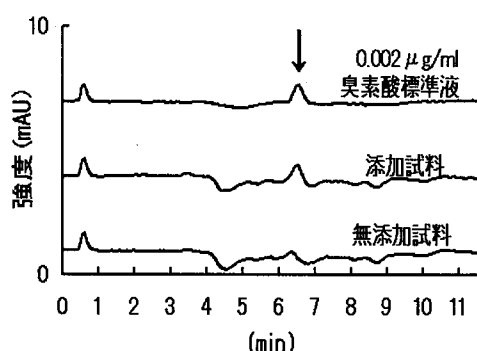


図11 通知法追加検討法により調製した0.002 $\mu\text{g/g}$ 臭素酸添加小麦試験溶液、無添加小麦試験溶液及び0.002 $\mu\text{g/ml}$ 臭素酸標準液のクロマトグラム

なかった。

3. 2. 4 夾雑物の除去

一般に、試料中に分離目的物質と同じ電荷を持つイオン種が存在すると固相に対し、競合的に結合するので試料中のイオン強度は低い方が効率よく保持できるとされている⁸⁾。そこで、小麦抽出溶液の陰イオン性の夾雑物を把握するため、小麦抽出10倍希釈液を2.4.3.5により測定した。その結果、5つのピークが観測された(図10)。そのうち2つのピークは未知であったが、残りの3つのピークは溶出の速い順に塩化物イオン、リン酸イオン、硫酸イオンの保持時間のものではあった。濃度はそれぞれ51 $\mu\text{g/ml}$ 、73 $\mu\text{g/ml}$ 、28 $\mu\text{g/ml}$ であった。このため、塩化物イオン以外で除去可能なリン酸イオン、硫酸イオンを取り除く通知法追加検討法を2.4.3.6により実施し、対照調製法と比較した。その結果、対照調製法に比べ、回収率は安定して国の精度管理の管理基準⁹⁾である70%以上の回収率が得られた(図11、表3)。

4 参考文献

- 1) 平成15年3月4日食基発第0304001号「食品中の臭素酸カリウム分析法について」
- 2) 平成15年7月22日厚生労働省告示第261号
- 3) 濟田清隆、田中礼子、宮沢啓喜、櫻井有里子、池野恵美、桐ヶ谷忠司、渡辺健二郎、神田宏：第44回全国衛生化学技術協議会年会講演集、92-93(2005)

表3 試験溶液調製方法別小麦中臭素酸添加回収試験(n=3)

添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	試験溶液調製方法			
	対照調製法		通知法追加検討法	
	平均 (%)	RSD (%)	平均 (%)	RSD (%)
0.002	65	6.6	72	8.9
0.005	68	15.4	72	6.5
0.01	69	12.9	75	2.7

- 4) 岡田哲男編：“クロマトグラフィーによるイオン性化学種の分離分析”、45-48(2002)
- 5) 岡田哲男：分析化学44、579-601(1995)
- 6) 岡田哲男編：“クロマトグラフィーによるイオン性化学種の分離分析”、155(2002)
- 7) 川崎洋子、久保田浩樹、四方田千佳子、米谷民雄：食衛誌43、221-224(2002)
- 8) 加藤 肇訳：“固相抽出法ハンドブック”、100(1986)、ユニフレックス；P. Harris, M. Burku, T. Good, D. Blevins, KC Van Horne, L. Yago：“Handbook of Solid Phase Extraction”, Edited by KC Van Horne, (1985), (Analytichem International, Harbor City)
- 9) 平成9年4月1日衛食発第117号「食品衛生検査施設等の業務の管理の実施について」別添「精度管理の一般ガイドライン」

農作物中の残留農薬一斉分析法の検討

—GC/MS、GC/MS/MSによるスクリーニング法の検討—

柳岡知子、中村美樹、久保田京子、山本浩嗣、白田忠雄、村上りつ子

茨城県衛生研究所

はじめに

近年、輸入食品の残留農薬問題や未登録農薬使用などにより、食品中の残留農薬等に関する不安と関心が高まる中、平成18年5月29日より農薬等のポジティブリスト制度が導入され、原則的に、全ての食品を対象に、全ての農薬等の残留が規制されることとなった。これに伴い、より多くの農薬を、広範囲にかつ迅速に分析することが一層求められている。

このような状況から、多成分を迅速に分析する前処理法や測定法の検討が広く行われている。この中で、M.Anastassiadesらが開発したQuEChERS法¹⁾を用いた分析例や、これを活用した迅速分析法の検討結果が報告されている²⁾。QuEChERS法は、PP製遠沈管中で抽出と塩析、分離を行い、移し替え操作や濃縮操作を省き、時間と労力と費用を削減する前処理法と報告されている。

当所においても、迅速に多成分を分析できるスクリーニング法が必要と考え、QuEChERS改良法³⁾を応用し、コンディショニング不要の精製カラムを用いた簡易前処理法を検討した。また、さらに、対象農薬の拡大と分析時間の短縮を図り、GC/MS/MSによる一斉分析を試みたので報告する。

方法

1. 試料

市販のナシ、メロン、スイカ、ダイコン、キャベツ、レタス、ニンジン、ホウレンソウを使用

した。

2. 試薬等

農薬混合標準液：林純薬工業(株)製、PL2005 農薬 GCMS Mix I (51成分)、II (49成分)、III (52成分)

試薬：アセトニトリル、アセトン、ヘキサン、トルエン、塩化ナトリウムは関東化学(株)製 残留農薬試験用、その他の試薬は特級試薬を用いた。

簡易前処理用精製ミニカラム等：昭和電工(株)製 MycoSep[®] PR、バリアン社製ボンデシル PSA 通知法用精製ミニカラム：GLサイエンス(株)製 GL-PakGC/NH2 500mg/500mg/20ml

3. 分析装置

(1) GC/MS：(株)島津製作所製 QP-2010

カラム：DB-5MS (J&W社製、30 m×0.25mmID, 0.25 μm) カラム温度：①50℃ (1min)-25℃/min-125℃ (5min)-10℃/min-300℃ ②70℃ (1min)-20℃/min-150℃-3℃/min-200℃-8℃/min-300℃、注入口温度：240℃、インターフェース温度：260℃、イオン化方式：EI (70eV) イオン源温度：220℃、注入量：2 μl

(2) GC/MS/MS：Varian社製 1200

カラム：VF-5ms (Varian社製 30 m×0.25mmID, 0.25 μm) カラム温度：60℃ (1min)-20℃/min-140℃ (5min)-8℃/min-300℃、注入口温度：250℃、トランスファーライン温度：300℃、イオン化方式：EI (70eV)、コリジョンガス：アルゴン、イオン源温度：280℃、注入量：2 μl

注1) http://www.quechers.com/docs/quechers_en_oct2005.pdf

4. 試験溶液の調製

(1) 簡易前処理法

粉碎均一化した試料 10g を 50ml の PP 製遠沈管にとり、アセトニトリル 10ml を加えホモジナイザーで 1 分攪拌し、塩化ナトリウム 1g、硫酸マグネシウム(無水)4g、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1g を加え、手で振とうしたのち遠心分離した。アセトニトリル層 8ml を 15ml 遠沈管にとり、硫酸マグネシウム(無水)1.2g、PSA 0.2g を加え、振とうし、再び遠心分離した。上清を MycoSep PR に通液し、その溶出液 2ml を濃縮してアセトン/ヘキサン(1:1)1ml で溶解した。図 1 に、そのフローを示した。

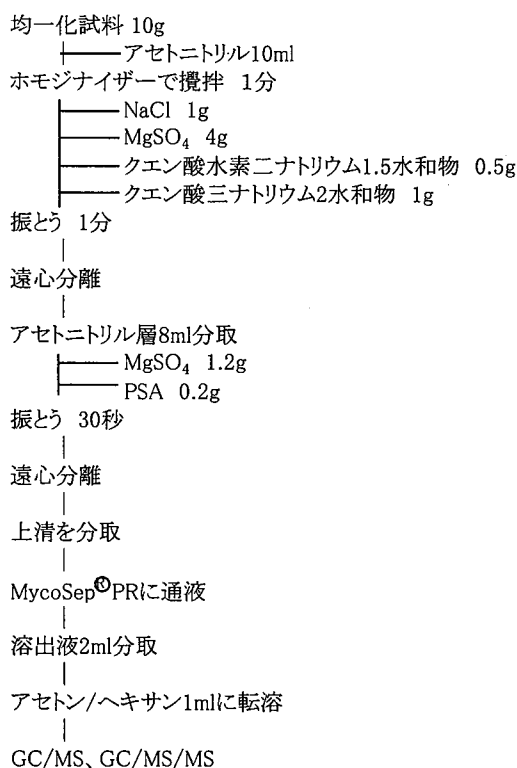


図 1 簡易前処理法のフロー

(2) 通知法

粉碎均一化した試料 20g を使用し、厚生労働省から示されている「GC/MS による一斉分析法」³⁾ (以下、通知法) に準じた方法で試験溶液を調製した。

5. 添加回収試験

粉碎均一化した試料に、各農薬が 0.1mg/kg と なるように添加し、30 分間放置したのち試験溶液を調製した。これを GC/MS または GC/MS/MS で分析し回収率を求めた。

GC/MS 分析の場合は、混合標準液ごとに試験した。GC/MS/MS 分析の場合は、3 つの混合標準液を同時に添加して試験した。

結果および考察

1. 農薬 51 成分、GC/MS 分析での検討

比較的夾雑成分が少ないと思われる、メロン、スイカ、ナシについて、農薬 51 成分 (49 項目) を添加したのち、簡易前処理法および通知法で試験溶液を調製し、GC/MS 分析により回収率を求めた。その結果を表 1 および図 2 に示した。

簡易前処理法では、9 割以上の農薬が回収率 70%以上、C.V.20%以下となり、メロン、ナシでは通知法との大きな差は認められなかった。スイカでは、通知法より高い回収率が得られ、良好な結果であった。前処理に要した時間は、通知法の 1/3 程度であった。

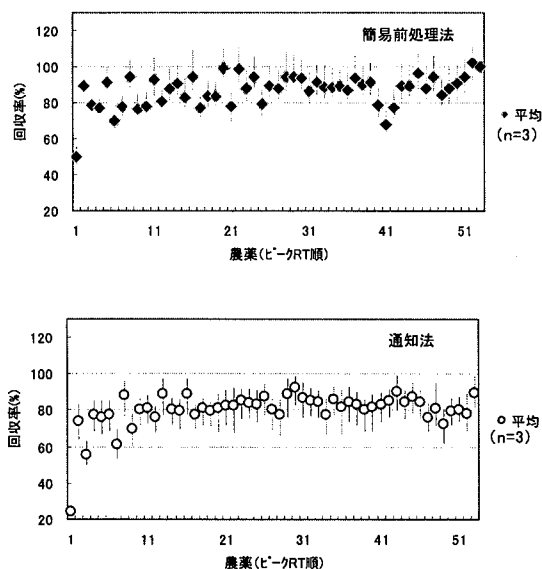


図 2 メロンの添加回収試験結果(GC/MS)

2. 農薬 152 成分、GC/MS/MS による一斉分析の検討

試験対象農薬を 152 成分(148 項目)に増やし、ダイコン、キャベツ、レタス、ニンジン、ホウレンソウの 5 農作物について、添加回収試験を行った。通知法では GC/MS による分析を行い、簡易前処理法では、GC/MS/MS を用いて 152 成分一斉分析を行った(以下、簡易前処理-GC/MS/MS 法)。その結果を、表 2 および図 3 に示した。平均回収率が 70~120%、C.V.20%以下の範囲に入ったのは、通知法では 120~133 項目、簡易前処理-GC/MS/MS 法では 126~133 項目であった。5 農作物ともにこの範囲に入った農薬は、通知法の 102 項目に対し、簡易前処理-GC/MS/MS 法では、116 項目と 1 割程度多い結果となった。

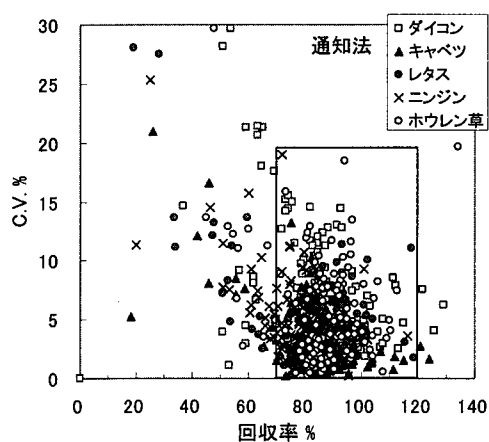
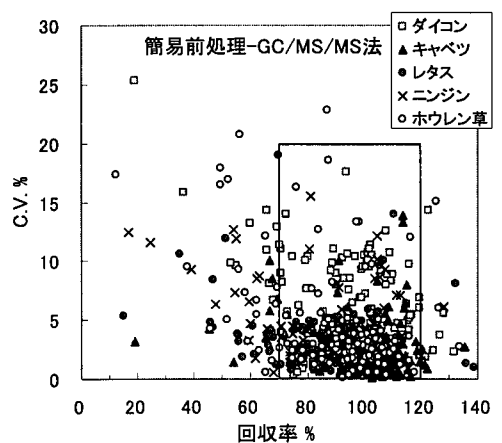


図 3 添加回収試験結果(5 農作物)

次に、2法の回収率の関係をみるため、散布図に表した(図 4)。簡易前処理-GC/MS/MS 法では、いくつかの農薬で回収率の低下も見られるが、全体的には、通知法よりやや高くなる傾向がみられ、また、通知法で 50%未満となったものの多くで、回収率の向上がみられ、50%以上となっていることがわかった。特に回収率が向上した農薬は、保持時間の早めのものが多かったが、その原因としては、簡易前処理法では、減圧濃縮過程が通知法より少ないことから、ジクロロベンジル、ジクロロボス、チオメトン、デメトン-S-メチル、ホレート、メビソホスなど揮発性の高い農薬の損失⁴⁾が少なくなったと考えられる。これらの農薬では、5 農作物の平均回収率が 28~44%上昇している。その他、通知法の精製カラムからの回収が悪い⁴⁾メタクリホスについても、簡易前処理-GC/MS/MS 法では 70%以上回収できた。

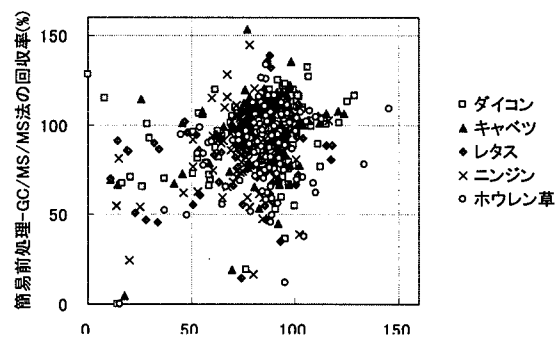


図 4 2法による回収率の関係

まとめ

コンディショニングを必要としない精製カラムと QuEChERS 法を組み合わせた簡易前処理法を用い、51 成分の農薬について GC/MS による添加回収試験を行ったところ、9 割の農薬で良好な結果となった。

さらに、分析時間の短縮を図り GC/MS/MS 一斉分析を試み、5 農作物で 152 成分(148 項目)の添加回収試験を行い、通知法と比較したところ、

通知法よりやや高い回収率が得られ、126～133項目で良好な結果が得られた。特に、通知法で低回収率となった、揮発しやすい農薬で回収率が向上した。

前処理に要する時間は、通知法の1/3程度に短縮できた。また、使用する有機溶媒や器具も大幅に削減でき、器具の洗浄や準備に要する労力も減らすことができた。さらに、GC/MSで3回に分けていた測定を、GC/MS/MSで一斉に測定することにより測定時間を短縮できたが、解析に多くの時間を要したため、単純に1/3の時間にはならなかった。今後、保持時間の変動による影響が少ない測定・解析メソッドに改善し、解析時間の短縮を図ったうえ、農作物の種類を拡大し、夾雑成分の影響について、さらに、検討を続ける必要がある。

参考文献

- 1) M.Anastassiades,S.J.Lehotay,
D.Stajnbaher and F.J.Schenck:
*JAOAC Int.*86, 412-431(2003)
- 2) M.Okihashi,Y.Kitagawa,K.Akutsu,
H.Obana and Y.Tanaka:*J.Pestic. Sci.*30,
368-377(2005)
- 3) 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方法に
ついて、平成17年1月24日付食安発第
0124001号
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全基準審査
課:農産物対象のGC/MS一斉分析法及び
LC/MS一斉分析法、並びに畜水産物対象
のGC/MS一斉分析法の検討結果、平成
17年8月25日(厚生労働省ホームページ)

表1 51成分の添加回収試験結果(GC/MS)

農薬名	定量イオン (m/z)	簡易前処理法						通知法					
		メロン		スイカ		ナシ		メロン		スイカ		ナシ	
		回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)
EPN	169	87.9	13.0	97.0	5.2	88.3	3.0	72.6	13.6	69.8	8.7	81.2	5.7
アジンホスメチル	160	102.2	10.2	108.2	2.5	96.6	2.4	78.0	14.0	78.6	5.9	86.8	5.3
アニコホス	226	90.6	10.5	96.4	3.0	84.4	0.4	79.5	9.5	80.8	4.5	85.1	3.8
イザゾホス	257	90.8	9.8	92.5	2.7	91.2	2.1	80.3	9.8	71.3	4.3	72.6	1.8
イソフェンホス	213	91.4	10.6	94.1	3.2	89.4	3.6	85.5	9.2	73.8	6.1	78.9	1.4
エチオン	384	89.3	11.6	93.2	3.7	85.8	2.3	84.3	9.9	74.0	5.6	78.9	2.2
エトイフェンホス	310	88.0	12.1	93.1	2.1	85.8	1.9	84.6	10.3	75.5	6.8	77.9	6.2
エトプロホス	158	77.4	6.1	78.4	4.5	77.2	1.3	77.2	11.2	71.1	4.6	70.7	4.6
エトリムホス	292	83.0	11.4	85.0	3.3	82.6	3.7	79.4	10.7	66.8	5.1	74.8	1.3
カスサホス	159	70.1	7.8	72.4	4.1	71.1	1.0	77.6	10.8	70.6	4.5	69.5	2.5
キナルホス	146	89.4	10.9	91.1	2.8	84.8	3.0	85.9	10.2	74.1	5.2	77.3	2.6
クロルピリホス	314	79.0	9.6	84.4	1.0	81.0	5.3	83.4	11.3	72.0	5.0	73.9	2.7
クロルピリホスメチル	286	83.7	9.8	85.7	2.5	84.5	3.6	81.0	10.6	68.9	4.9	75.5	2.0
クロルフェンピリンホス-E	323	86.7	11.2	89.8	1.7	85.6	3.1	86.8	11.1	74.0	5.0	80.5	2.3
クロルフェンピリンホス-Z	323	88.6	12.2	94.7	3.0	89.4	2.8	84.7	9.6	72.8	4.8	78.2	2.5
サリチオン	216	91.7	7.6	90.9	4.8	85.7	0.7	76.2	11.9	71.2	5.1	63.4	8.7
シアノホス	243	92.8	12.0	100.9	2.7	92.0	1.9	81.2	10.1	72.9	4.6	71.7	5.6
ジクロフェンチオン	279	76.9	7.8	80.4	3.1	77.3	2.4	77.4	9.3	68.1	3.8	72.4	2.1
ジクロホス	109	49.9	11.3	43.9	25.8	34.5	61.1	24.5	6.6	39.2	10.5	23.9	31.1
ジメチルピリンホス-E	295	87.9	10.8	91.4	1.9	87.0	3.2	85.1	10.3	75.5	5.0	80.0	2.1
ジメチルピリンホス-Z	295	89.0	10.3	94.0	1.0	88.3	3.7	87.2	10.3	74.3	4.9	77.0	2.4
ジメトエート	93	94.2	9.1	96.3	4.7	93.4	3.8	88.1	11.4	75.7	4.2	83.4	5.2
ダイアジノン	179	77.6	9.0	80.1	3.2	77.9	1.9	80.2	9.8	70.6	4.1	73.1	1.3
テトラクロルピリンホス	329	90.0	11.3	94.9	2.9	88.4	3.7	83.1	12.0	72.3	4.2	78.5	2.3
テルブホス	231	76.6	9.2	78.3	3.8	71.9	3.4	70.0	12.9	64.5	5.3	62.8	2.0
トリアゾホス	161	96.7	10.5	102.8	5.9	93.9	2.1	87.4	9.6	77.9	5.2	74.1	3.0
トルクロホスメチル	265	83.8	9.0	86.2	2.9	82.4	2.9	79.4	9.8	70.1	4.2	73.8	1.6
ハラチオン	291	94.2	13.9	92.5	4.2	85.9	7.9	77.4	13.8	67.6	8.6	72.7	1.1
ハラチオンメチル	263	99.4	9.0	96.2	3.0	90.8	5.1	81.0	13.4	69.8	8.9	71.3	4.4
ビバロホス	320	84.6	8.7	95.3	4.9	84.9	4.9	81.2	15.3	77.2	7.6	81.1	2.1
ビラクロホス	360	100.1	7.7	103.7	3.1	96.3	2.3	89.5	10.9	83.2	4.6	91.5	6.1
ビリタフェンチオン	97	94.1	11.5	100.2	2.6	92.5	1.1	76.2	10.6	70.4	6.1	86.0	6.7
ピリミホスメチル	290	78.2	13.2	87.9	2.7	82.8	4.7	82.4	11.7	63.2	19.8	76.1	2.8
フェナニホス	303	78.7	11.2	88.8	1.7	75.2	4.3	81.6	14.3	73.1	9.8	76.1	4.2
フェントロチオン	277	98.3	11.2	95.3	4.3	88.7	3.9	82.1	15.7	69.8	7.7	72.3	2.7
フェンスルホチオン	293	89.4	12.9	97.3	4.0	87.8	3.7	90.5	10.9	77.5	9.1	81.6	1.5
フェンチオン	278	87.6	9.9	91.1	3.7	79.3	4.0	80.3	13.3	70.4	6.7	70.0	3.0
フェントエート	274	88.8	10.3	90.1	3.2	82.3	1.7	77.3	13.1	66.9	4.2	75.1	2.2
プロタニホス	286	91.3	12.2	96.7	4.6	86.5	8.4	80.0	12.7	68.9	7.7	75.9	2.5
プロチオホス	309	67.9	10.2	72.0	2.8	68.2	1.8	83.1	9.8	72.7	5.1	78.9	2.7
プロハホス	304	87.2	13.0	94.2	2.5	81.2	6.9	81.4	15.8	70.6	8.3	72.9	5.7
プロフェノホス	339	77.3	12.2	84.8	2.1	74.7	3.3	85.2	9.7	73.0	5.4	81.1	4.6
ホサロン	182	94.6	10.2	100.1	2.9	91.2	1.4	80.6	8.4	73.8	2.6	81.2	5.2
ホスチアレート	195	80.4	6.0	79.8	5.5	75.6	4.7	70.7	10.8	69.4	10.4	58.3	7.3
ホスファミトリン	264	79.8	6.2	78.0	5.9	73.3	8.0	65.5	11.6	64.9	10.2	52.1	10.4
ホノホス	109	81.0	5.8	81.5	5.2	78.0	1.4	75.8	9.9	74.0	10.7	64.6	4.2
ホレート	260	77.6	7.9	74.3	6.1	67.8	7.5	61.5	13.4	55.4	9.6	51.2	6.0
マラチオン	173	94.6	10.4	95.3	3.0	90.2	3.0	83.8	9.7	73.6	5.1	74.0	2.4
メタクリホス	125	78.5	6.5	74.6	6.6	68.5	14.6	55.2	13.3	55.7	9.8	39.6	16.5
メチダチオン	145	93.5	11.9	98.7	3.4	90.9	3.6	84.4	11.8	74.9	4.7	78.1	2.5
メヒンホス	127	89.5	4.7	83.9	2.2	83.9	3.9	74.1	13.1	70.0	3.5	68.5	7.4

表2 簡易前処理-GC/MS/MS法による回収率

農薬	MRM 定量イオン(m/z)	回収率(%) n=3									
		ダイコン		キャベツ		レタス		ニンジン		ホウレンソウ	
		平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
EPN	157 > 110	106.5	2.1	106.1	1.9	97.5	2.3	103.3	1.4	101.3	2.6
アクリナトリン	289 > 93	119.5	6.0	108.5	3.3	106.9	10.0	111.3	7.1	105.2	5.0
アザコナゾール	217 > 173	80.9	2.4	82.7	0.9	75.7	2.3	73.6	1.4	72.9	3.0
アジンホスメチル	160 > 104	67.3	3.8	113.1	1.8	104.3	0.6	105.6	0.7	109.3	2.2
アゾキシストロビン	344 > 156	124.7	2.4	118.6	2.4	111.4	3.5	115.3	0.9	116.1	1.6
アトラジン	215 > 200	109.8	3.4	107.7	3.6	96.4	1.3	98.0	4.5	97.5	4.7
アニコホス	226 > 184	92.6	1.8	108.7	6.1	104.5	2.7	106.7	5.9	107.6	0.4
アラクロール	160 > 132	88.8	5.1	106.3	2.4	93.7	1.5	95.8	1.7	97.6	2.8
アレスリン	123 > 81	99.1	6.9	96.5	1.0	89.6	1.9	94.3	1.9	94.1	5.1
イザゾホス	161 > 119	106.3	3.4	112.2	1.6	97.5	3.6	99.1	1.2	102.8	2.6
イソカルボホス	136 > 108	116.1	9.7	110.0	1.4	104.9	2.2	114.0	1.9	107.4	1.2
イソキサチオン	177 > 130	101.4	10.0	112.7	2.0	100.1	2.3	104.0	2.6	104.9	2.1
イソフェンホス	213 > 121	108.4	2.6	106.9	0.8	96.9	2.2	104.2	1.7	102.6	2.0
イソプロチオラン	290 > 118	119.7	6.8	113.7	13.3	101.6	5.9	107.4	9.3	102.8	9.7
ウニコナゾールP	234 > 137	36.3	15.8	45.3	4.2	35.0	10.6	38.9	9.3	37.7	9.5
エタルフルリン	276 > 202	102.3	11.3	101.5	2.8	88.0	3.3	94.8	1.3	94.4	4.9
エチオン	231 > 175	104.8	1.3	109.6	0.9	98.9	0.6	101.7	1.7	100.8	1.8
エディフェンホス	310 > 173	92.1	3.3	103.7	2.0	95.7	1.2	100.4	4.3	100.2	2.7
エトプロホス	200 > 114	94.1	5.6	96.0	1.4	82.0	4.8	83.2	2.1	85.8	4.4
エトリンアゾール	211 > 140	65.8	10.9	66.7	10.1	46.6	8.5	54.0	12.7	49.3	17.9
エトリムホス	292 > 181	99.0	2.2	111.0	0.8	90.8	2.7	92.4	2.6	95.5	3.8
エンドスルファン	195 > 125	95.0	4.4	92.8	2.9	82.3	4.8	85.1	3.3	49.5	16.4
オキサジンアゾール	302 > 175	92.9	8.5	99.3	1.5	86.6	3.0	89.8	2.8	94.8	2.8
オキシフルオルフェン	252 > 146	109.5	8.3	106.8	1.8	93.3	3.3	96.8	2.9	102.9	2.5
オメトエート	156 > 110	81.5	4.4	101.1	1.2	75.6	4.1	76.4	2.7	83.9	7.3
カスサホス	159 > 131	81.9	1.2	85.4	1.0	76.6	1.3	79.4	4.2	75.0	1.8
カフエンストール	188 > 91	112.4	1.2	110.6	1.5	105.2	5.7	110.0	1.6	104.8	0.6
カルボフェノチオン	342 > 157	93.9	17.6	90.8	7.3	86.6	4.3	90.1	8.1	97.4	13.3
キナルホス	146 > 118	98.0	1.6	104.5	0.7	94.1	1.6	95.8	1.3	96.0	0.7
キノキシフェン	237 > 208	53.1	9.8	53.8	1.4	46.7	4.4	47.6	6.3	45.9	4.3
キノクラミン	172 > 89	113.0	1.3	104.9	3.4	97.3	3.0	99.2	2.6	101.9	2.0
キントゼン	237 > 119	74.7	10.4	74.0	1.4	66.3	2.9	65.7	4.2	68.9	6.4
クレソキシムメチル	206 > 116	113.6	3.7	109.8	2.3	98.1	1.0	101.2	2.8	100.8	3.8
クロメプロップ	288 > 169	97.3	2.9	95.7	1.7	87.1	1.7	87.6	1.8	87.8	1.3
クロルタルシメチル	301 > 223	92.6	10.2	96.7	0.8	85.6	1.3	88.1	3.0	92.6	0.1
クロルピリホス	314 > 258	91.3	1.4	96.6	0.9	88.7	3.0	90.7	1.9	89.0	4.6
クロルピリホスメチル	286 > 271	92.3	3.4	98.7	1.9	88.6	3.0	91.8	2.3	88.7	2.8
クロルフェナヒル	247 > 200	116.1	5.1	113.6	13.8	138.7	1.0	104.5	10.1	98.2	13.4
クロルフェンソル	302 > 111	101.7	2.4	105.1	2.8	92.0	3.2	93.9	4.8	99.5	3.4
クロルフェンピホス	267 > 159	99.5	1.9	102.7	0.1	92.3	2.2	99.0	1.3	82.2	1.9
クロルプロファミン	213 > 127	104.3	4.7	100.1	3.8	96.3	4.1	100.5	3.5	98.2	3.1
サリチオン	216 > 201	101.2	3.6	106.3	1.0	91.8	2.2	94.1	2.1	97.9	3.7
シアナジン	225 > 189	115.7	4.9	135.3	2.8	97.0	3.3	96.4	3.8	133.7	2.8
シアノフェンホス	169 > 141	101.8	9.5	103.4	0.6	93.7	1.7	96.4	1.0	96.3	1.8
シアノホス	243 > 109	104.6	1.5	110.1	0.9	97.7	1.8	101.6	0.7	103.2	2.6
シクロトホス	127 > 109	79.5	7.7	88.6	2.3	76.0	4.8	77.1	1.5	75.7	2.9
シクロフェンチオン	279 > 223	90.6	1.4	93.0	3.7	83.2	2.3	87.2	1.5	85.5	2.1
シクロプロトラゾール	270 > 159	66.8	8.1	77.3	1.8	67.1	4.1	68.1	0.6	61.9	5.4
シクロベンニル	171 > 100	70.5	11.0	69.3	6.8	51.0	11.9	54.9	11.9	52.2	16.9
シクロラン	206 > 176	103.9	4.0	108.0	2.5	90.9	5.2	93.3	2.1	92.6	4.9
シクロルボス	185 > 93	114.9	6.3	114.4	6.4	69.9	19.0	81.1	15.5	83.9	12.7
シスルホトン	142 > 81	101.4	10.7	96.4	2.2	85.2	3.9	92.1	2.2	90.4	3.0
シチオピル	354 > 306	116.1	4.2	111.0	1.4	98.4	1.3	102.7	2.3	103.3	1.9
シハロトリン	197 > 141	108.3	8.9	110.1	2.1	99.0	5.0	100.3	1.6	72.6	5.3
シハロホップメチル	256 > 120	113.9	4.7	112.8	2.1	103.7	1.5	106.3	1.9	104.9	1.9
シフェノコナゾール	323 > 202	76.5	0.5	77.5	2.0	71.9	3.6	74.0	2.3	70.6	4.0
シフルトリン	163 > 91	126.8	3.7	122.3	0.9	111.5	0.6	115.5	1.6	126.4	6.0
シフルフェナミト	412 > 295	121.9	1.8	107.4	5.5	110.6	13.9	128.1	6.1	100.6	9.5
シフルフェニカン	266 > 218	107.9	7.9	110.1	0.4	99.7	1.5	105.3	1.4	104.9	1.8

表2 簡易前処理-GC/MS/MS法による回収率(続き)

農薬	MRM 定量イオン(m/z)	回収率(%) n=3									
		ダイコン		キャベツ		レタス		ニンジン		ホウレンソウ	
		平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
シペルメトリン	163 > 91	88.9	9.9	95.8	1.0	81.8	1.3	91.1	7.7	86.8	22.8
シメコゾール	211 > 121	54.8	9.6	66.6	2.7	55.2	3.8	54.3	7.3	57.9	7.3
ジメチピン	118 > 58	113.1	3.3	112.9	4.7	103.1	5.1	105.7	8.6	116.3	12.0
ジメチルピンホス	295 > 109	101.5	1.9	107.4	0.8	96.6	1.1	98.7	0.6	94.0	1.6
ジメトエート	125 > 79	128.2	5.5	153.5	2.9	132.2	8.1	112.9	7.1	125.5	15.0
スルプロホス	322 > 156	94.2	10.6	91.3	3.0	83.6	1.3	91.7	2.7	84.7	5.5
ダイアジノン	304 > 179	95.5	1.5	100.6	2.7	88.8	4.5	89.5	1.6	98.2	3.1
チオベンカルブ	125 > 89	97.1	10.4	91.0	2.4	82.2	1.5	85.8	3.5	85.1	2.7
チオメトン	125 > 79	100.0	10.4	107.4	2.6	86.1	4.2	91.0	3.4	94.8	0.4
チフルサミト	194 > 166	94.8	7.6	97.9	1.6	90.9	1.6	92.1	0.5	90.2	3.4
テクナゼン	203 > 85	72.4	13.9	72.7	5.4	60.8	4.5	62.9	8.7	65.4	12.1
テトラクロルピホス	329 > 109	79.0	1.2	107.7	1.4	97.4	3.0	97.5	0.5	102.0	3.4
テトラシホン	229 > 166	89.5	11.0	90.0	2.8	80.4	4.9	80.6	4.3	77.8	1.7
テフルトリン	177 > 127	90.0	9.0	91.6	0.7	83.5	2.0	86.1	1.6	85.1	1.6
テメトンSメチル	142 > 79	101.0	10.0	109.1	1.1	91.5	4.7	95.3	2.1	98.6	0.9
テルタメトリン	253 > 174	69.3	12.9	93.5	3.9	89.8	2.0	93.8	2.4	90.2	2.6
テルブホス	231 > 175	96.3	3.2	99.4	1.3	85.7	1.6	89.4	4.1	89.2	4.2
トリアジメノール	168 > 70	59.6	13.2	78.3	2.3	66.6	3.6	59.7	4.7	69.2	7.8
トリアジメホン	208 > 181	103.0	10.4	103.6	1.5	96.0	3.2	96.2	1.0	97.8	2.9
トリアジホス	161 > 77	109.6	3.3	115.5	0.8	104.8	0.3	114.7	1.3	110.9	3.1
トリアレート	268 > 184	78.2	0.9	80.8	2.3	70.6	1.2	73.7	2.0	70.2	2.6
トリブホス	169 > 57	77.1	6.2	66.6	5.8	57.3	1.9	59.3	6.6	51.6	5.0
トリフルラリン	306 > 264	95.3	8.5	99.0	2.8	87.3	5.2	86.9	3.2	96.0	2.6
トリプロキシストロピン	222 > 130	122.8	14.3	120.3	2.5	105.0	2.6	113.2	3.6	112.6	1.2
トルクロホスメチル	265 > 220	93.4	1.3	98.6	1.3	88.4	0.7	90.8	4.1	92.8	1.5
ナレト(ジブプロム)	145 > 109	0.0	0.0	4.8	34.9	45.7	4.8	24.7	11.5	0.0	49.3
ニトタールイソプロピル	236 > 194	98.9	6.9	98.7	0.7	87.7	1.3	102.6	1.8	96.2	2.3
パラチオン	291 > 109	115.4	0.4	114.1	6.0	103.7	0.9	108.4	0.7	112.1	3.1
パラチオンメチル	263 > 109	107.2	2.7	108.4	4.9	98.0	3.7	103.8	1.8	105.3	1.8
ハルフェンプロックス	263 > 115	75.2	0.4	75.7	2.7	66.5	2.2	70.6	4.5	65.4	0.5
ビフェノックス	341 > 281	116.4	5.3	106.6	3.6	96.5	2.9	102.0	3.4	99.3	3.7
ビフェントリン	181 > 166	85.6	5.6	84.4	0.7	135.8	1.3	144.5	2.2	116.0	3.6
ビペロホス	140 > 98	102.7	5.9	104.5	8.2	102.2	4.3	103.9	4.7	99.9	2.9
ビラクロホス	360 > 194	102.3	4.7	118.1	3.2	100.8	2.4	102.1	2.5	103.0	1.7
ビラジホス	221 > 193	111.0	4.2	107.8	2.4	98.7	1.4	100.0	0.9	101.4	3.1
ビリタフェンチオン	340 > 199	106.8	0.6	112.1	3.0	100.2	2.0	107.7	2.6	105.5	2.8
ビリタベン	147 > 119	71.3	8.1	74.4	1.2	68.7	1.2	70.7	3.5	67.4	1.6
ビリフェノックス	262 > 91	70.7	8.9	65.6	4.1	55.8	3.2	59.2	3.3	76.3	16.3
ビリブチルカルブ	165 > 108	99.6	9.5	101.7	0.5	90.2	1.4	98.8	3.8	94.5	3.1
ビリミジフェン	184 > 141	19.0	25.3	19.0	3.2	14.9	5.4	16.8	12.5	12.2	17.3
ビリミシバクメチル	302 > 256	110.1	8.9	112.4	0.5	102.3	1.3	105.9	1.2	106.3	2.7
ビリミホスメチル	290 > 125	103.9	1.2	101.8	2.3	93.0	0.3	94.6	1.4	96.8	1.8
ビソクソリン	212 > 145	102.1	11.1	107.0	2.0	95.4	3.3	96.8	4.2	107.4	2.7
フィプロニル	367 > 213	131.9	2.3	121.2	1.2	105.8	1.3	120.1	1.5	117.8	0.5
フェナミホス	303 > 260	102.8	5.4	101.7	2.2	96.0	3.3	99.2	3.7	85.9	4.7
フェナリモル	251 > 139	82.9	2.4	84.7	2.0	76.2	2.5	76.2	2.3	74.9	2.4
フェントロチオン	277 > 260	119.6	1.9	113.6	1.7	97.7	3.0	100.5	2.0	105.5	3.3
フェンクロホス	285 > 240	89.6	1.6	91.9	2.3	82.0	0.9	85.5	3.4	85.1	2.1
フェンスルホチオン	293 > 141	111.0	2.6	106.0	2.0	100.9	1.8	106.6	2.0	100.5	3.5
フェンチオン	278 > 109	104.6	1.6	104.4	0.4	94.4	2.0	100.8	1.6	96.6	3.9
フェントエート	274 > 121	96.3	4.7	110.0	1.6	98.0	0.4	99.0	0.7	104.1	3.4
フェンハレート	225 > 119	100.9	3.2	101.2	0.8	88.9	2.6	94.1	3.2	63.1	2.4
フェンプロトリン	265 > 210	104.2	4.8	114.9	8.0	105.4	9.6	104.5	12.1	87.4	18.5
フサライト	243 > 144	100.8	7.2	90.6	4.6	85.5	2.3	90.0	2.3	90.3	3.8
ブタミホス	286 > 202	111.4	2.7	116.4	1.6	102.2	2.2	112.0	2.4	110.2	2.9
ブビリメート	208 > 98	96.3	6.4	94.2	6.1	92.0	4.2	95.8	2.2	87.3	5.0
ブプロフェンソ	172 > 115	90.3	8.0	90.9	10.1	78.5	4.4	80.5	11.0	78.2	2.4
フルアクリピリム	320 > 183	109.1	10.7	113.7	3.0	100.9	1.3	111.7	2.3	106.0	4.0
フルキンコナゾール	340 > 108	102.6	2.0	101.9	1.3	94.7	0.9	95.0	1.5	96.9	1.6
フルシトリネート	199 > 107	102.2	2.3	104.0	0.8	92.6	2.1	104.1	5.0	81.6	7.6

表2 簡易前処理-GC/MS/MS法による回収率(続き)

農薬	MRM 定量イオン(m/z)	回収率(%) n=3									
		ダイコン		キャベツ		レタス		ニンジン		ホウレンソウ	
		平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
フルトラニル	173 > 145	117.0	5.4	116.4	0.3	106.1	1.4	109.4	1.6	110.6	2.5
フルハ ^o リネート	250 > 200	100.4	1.0	102.4	2.2	88.5	1.7	94.8	2.3	91.1	4.1
プロシミト ^o ン	283 > 96	99.4	9.3	105.6	4.2	93.3	4.2	94.8	1.9	98.8	0.9
プロチオホス	309 > 239	80.0	4.1	82.7	3.9	73.9	1.2	74.7	3.8	71.7	3.8
プロハ ^o ホス	304 > 220	107.2	1.8	109.4	1.7	101.6	0.8	105.5	1.0	102.7	2.4
プロヒ ^o サミト ^o	173 > 109	105.9	9.2	105.8	2.1	95.5	0.3	99.6	0.9	101.8	0.7
プロフェノホス	339 > 269	88.8	4.4	94.8	2.3	91.6	4.1	91.4	2.8	86.3	1.6
プロモブ ^o チト ^o	232 > 176	111.8	4.7	107.3	0.6	96.4	5.5	99.8	2.5	97.3	4.9
プロモブ ^o ロヒ ^o レート	341 > 155	80.2	3.9	86.6	0.9	74.2	0.7	78.4	3.2	78.2	1.7
プロモホス (プロモホスメチル)	331 > 286	87.8	2.6	91.8	1.0	79.8	2.5	85.1	2.8	82.7	1.2
ヘルメトリン	183 > 168	79.1	10.0	85.0	2.5	78.1	2.6	80.7	4.7	62.1	6.6
ペンコナゾール	248 > 157	67.8	6.6	65.3	3.5	61.2	2.1	61.7	1.8	58.9	3.1
ペンテ ^o イメタリン	252 > 162	88.4	9.2	88.8	3.8	78.3	4.0	95.4	3.5	81.8	3.0
ベンフルラリン	292 > 206	101.0	2.9	102.4	2.7	88.5	3.2	89.6	2.7	93.4	2.2
ホサロン	182 > 111	104.6	1.6	111.6	0.2	101.6	0.4	104.9	0.8	107.2	2.2
ホスチアゼート	195 > 103	113.3	3.6	110.2	2.3	102.3	2.1	102.2	2.4	103.5	4.0
ホスファミト ^o ン	264 > 127	102.3	5.6	108.9	4.9	104.1	3.7	103.5	8.5	56.3	20.7
ホスメット	160 > 77	70.2	11.3	106.4	0.7	95.8	1.0	98.8	2.7	101.5	0.5
ホノホス	246 > 109	91.8	1.5	96.4	2.9	84.7	3.5	85.9	3.2	89.3	3.0
ホルモチオン	125 > 93	65.9	14.3	78.4	2.1	68.0	3.5	74.6	4.5	77.6	5.6
ホレート	121 > 65	96.0	4.4	99.4	0.7	86.4	5.2	91.2	3.3	91.0	2.3
マラチオン	173 > 99	104.6	2.6	119.5	1.4	107.8	2.3	109.8	1.3	112.3	1.9
マイクロ ^o タニル	179 > 125	98.8	4.1	98.1	1.8	91.4	3.0	90.8	2.9	95.0	2.3
メカルバ ^o ム	131 > 86	107.7	12.6	113.1	3.5	101.0	3.5	102.7	3.6	104.9	1.3
メタクリホス	208 > 93	100.3	3.6	106.4	0.2	90.1	5.2	91.8	5.9	92.3	3.5
メチダ ^o チオン	145 > 58	87.6	2.0	114.5	2.0	103.8	1.4	103.3	2.0	108.4	2.8
メヒ ^o ンホス	192 > 127	106.5	4.5	109.6	2.8	91.5	3.3	97.4	2.4	99.5	1.4
モノクロトホス	192 > 127	80.2	10.4	97.4	3.2	80.1	3.0	84.1	2.4	88.7	8.2
モリネート	187 > 98	72.9	5.6	67.6	8.5	55.6	3.7	62.2	8.5	55.8	9.2

表3 添加回収試験結果集計

分析法	平均回収率 範囲	ダイコン		キャベツ		レタス		ニンジン		ホウレンソウ	
		項目数	%	項目数	%	項目数	%	項目数	%	項目数	%
簡易前処理-GC/MS/MS法	70%未満	12	8	11	7	19	13	15	10	19	13
	70~120%	131	89	133	90	126	85	130	88	127	86
	120%超	5	3	4	3	3	2	3	2	2	1
通知法	70%未満	25	17	14	9	20	14	25	17	13	9
	70~120%	120	81	132	89	128	86	123	83	133	90
	120%超	3	2	2	1	0	0	0	0	2	1

茨城県におけるブタインフルエンザウイルスの分子進化学的調査（第一報）

Investigation of influenza viruses in swine population in Ibaraki Prefecture (First report)

遺伝子科学部 山崎良直

1. はじめに

インフルエンザウイルスはヒトを含むほ乳類、鳥類など多種の動物を宿主としておりその宿主域は多岐にわたる（1, 2）。本ウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、一本鎖 negative strand RNA を遺伝情報として持ち、PB1, PB2, PA, NP, M, NS1, NS2, 赤血球凝集素、ノイラミニダーゼの計8種類の遺伝子をコードしている（1, 2）。この中で本ウイルスの抗原性を決定するにあたり古くから重要視されてきたのが赤血球凝集素（heamagglutinin, HA）、ノイラミニダーゼ（neuraminidase, NA）と呼ばれる二つの外部性タンパク質である。これらの抗原性について確認するための試験は最も普遍的に行われており（Heamagglutinin inhibition test, Neuraminidase inhibition test）、本ウイルスの検査においてはオーソドックスなものである（3）。因みにHAは16の亜型が、NAは9の亜型が存在しており、理論上は両者の組み合わせにより膨大な数の抗原亜型が誕生することになる。

これらの蛋白、特にHAに関しては頻繁に抗原変異が観察される（Genetic drift、いわゆる小変異）。この現象が毎年といってよいほど人間界において本ウイルスの流行が見られる原因の一つとなっている。ここでいう抗原変異とは遺伝情報の翻訳時に発生するエラー（塩基の置換・欠失・挿入等）であり、これが原因で様々な抗原性を持つウイルス粒子が作られていく。そして生体側の免疫機構に感知されない構造をもつものが次第に集団の中で病原性を発揮するようになっていくことが流行に発展していくものと考えられている。ここで観察される遺伝情報（遺伝子）の翻訳・複製時のエラーは（分子の）進化速度という物差しで表現することが出来る。一例として、インフルエンザウイルス HA 分子の進化速度は人間の構成分子のそれに比べて（人間にはHA遺伝子は存在しない、念のため。ここでの比較対象は一般的な構成分子を指している） 10^7 ほど早いことが明らかとなっている。一概には比較できないが、分かりやすく表現すると人間が一億年かかって進化するところをインフルエンザウイルスは1年でやってのけてしまうということである。また前述のように本ウイルスは遺伝情報として8種類の遺伝子を保有しているが、亜型の異なる複数のウイルスが同時に宿主へ感染すると8種類のうちいくつかが入れ替わって新たなウイルス粒子として形成される現象も観察される。これを大変異（Genetic shift）と呼ぶこともあるが、小変異の積み重ねで大きな抗原性の変化が起こることを大変異と呼ぶこともある。

本ウイルスは不顕性感染の形態をとることもあるが前述のように人間にも病原性を持ち、過去人類が体験した3回の大流行（Pandemic）はそれぞれスペイン風邪（H1N1）、アジア風邪（H2N2）、そして香港風邪（H3N2）と呼ばれている。また近年起こった事例としては、1997年に香港で発生した鳥類原発とされるH5N1型ウイルスの人間への感染（4）、また2003年から散発的な発生をみているベトナム等における同亜型ウイルスの感染が記憶に新しい所である。

人間界におけるこれら複数回にわたる流行の源となっているのは、動物の世界からもたらされたものである事が様々な研究により明らかになっている。中でもブタが果たした役割は大きいものと考えざるを得ない事象が多い。1918年のスペイン風邪はブタの疾病であったウイルスが人間の中に突然入ってきたものであるとの見解が今では一般的であり（1, 5）、1968年の香港風邪に関してはヒトに感受性のあるウイルスとトリ原発のウイルスの遺伝子が交雑した結果出来たものである（遺伝子再集合: Gene Reassortment）という考えが提唱されている（6）。また、香港風邪が流行している間にもヒトのそれと同じ抗原性を持つブタ由来のインフルエンザウイルスが分離された例も存在し（7）、この遺伝子再集合の舞台となったのがブタの体内であるとされている（いわゆる mixing vessel）。また、これに関連してブタの体内において両者由来のウイルスが再集合を起こす可能性を示唆する報告もある（8, 9）。その他、ブタの気管内細胞はヒト型およびトリ型ウイルスのいずれもが吸着可能であるという科学的な可能性が示されている（13）。また最初に本亜型ウイルスの発生が確認された中国南西部ではヒト、ブタ、そしてトリの三者が物理的に極めて近い距離を保ちつつ生活を営んでいるという事実があり、このことが新型ウイルスの出現に関わっているのでは無いかとも言われ（10）、常に本ウイルス研究者の注目を集めている地域でもある。筆者が数年前にこの地を訪れたときも、やはりこれら三者が密接な間隔で生活を営んでいる姿が観察できかなり濃厚な物理的接触が可能であると感じた。

ブタにおけるインフルエンザウイルスの検出は、アメリカにおける H1N1 型ウイルスの分離報告（11）が最初であり、これを皮切りに様々な報告がされて来た。現在日本のブタにおいては主に H1N1、H3N2、そして少数例ではあるが H1N2（12, 13）の分布が確認されている。日本における分布はこれら3亜型と考えられ、遺伝子解析の結果からは各々の構成遺伝子がヒトおよびブタ型であるとの結果が得られており、未だ日本においてはトリウイルスの遺伝子がウイルス粒子形成に関わっている証拠は得られていない。ヨーロッパ大陸でも同様に H1N1、H3N2、そして H1N2 型ウイルスが確認されている（その他の亜型も確認されているが極めて希なケースである）が日本のそれとは少々異なっており、構成遺伝子の一部がトリウイルス由来である証左が得られている事が特徴である（14, 15, 16）。また、これらの地域では現在でも活発な進化が続いているとされる（17）。これらのことからヨーロッパ大陸においてはトリ⇄ブタ間における活発な遺伝子交雑が起こっていることが示唆され、ヒト型ウイルスの関与もある。その他アメリカ大陸においても同様にトリ、ブタ、そしてヒト型のウイルスの交雑が起きており（18）、前記した三者の交雑種が確認された例も存在する（19）。これらのことから、現在インフルエンザウイルスの世界において世界各地で極めて活発な「交流」が行われていると考えて良いだろう。また大陸の中のみで Circulate するのみならず、他の大陸で感染が確認される例もあるなど、枚挙に暇がない（20）。日本においても近い将来これらの現象が起こることは十分に考えられることである。先日、日本のニワトリで発生した高度病原性トリインフルエンザウイルスの例を見ても長い間日本に存在しなかった亜型のウイルスがいつ入って来てもおかしくは無いからである。よってブタにおける本ウイルスの動向を調査することによりヒトの世界にどのようなタイプのウイルスが侵入してくるかを察知出来ることが期待でき、この観点において極めて有効であると考えられる。

2. 対象及び方法

1) 検体採取期間

調査期間は平成17年4月から18年3月とした。

2) 採取検体および採取方法

県内のと畜場にてと殺された豚の鼻腔より滅菌綿棒を用いて内腔を擦過し、これを滅菌済み Minimum essential medium (MEM) 入りの試験管に採取し、後述する細胞への接種まで4℃、もしくは-80℃に保存した。

3) 使用細胞

検体の培養については、Matin-Derby-Canine-Kidney (MDCK)細胞を用いて行った。MDCK細胞はMEMに10%牛胎児血清、2mM L-グルタミン、そして抗生物質を加えたものを培養液として使用した。

4) 検体処理方法

ウイルス培養用の培地として、MEMに2mM L-グルタミン、10mM HEPES、1% BSA、10 μg/ml トリプシン、そして抗生物質を加えたものを使用した。単層培養したMDCK細胞に検体を接種し、前述した培地を加えて5% CO₂ 下で培養すると共に、数日間顕微鏡観察を行い、細胞変性効果の有無を観察した。

3. 結果

平成17年4月から18年3月の間に、計455検体の豚鼻腔拭い液を採取し、MDCK細胞に接種し細胞変性効果を観察した。全ての検体において細胞変性効果は認められなかった。

4. 考察

インフルエンザウイルスが初めて分離されてからかなりの年数が経過し、それに伴い科学的知見が蓄積されるようになった。一方我々の生活に関連した事例では、毎年の流行から得られる血清疫学的知見を元にしてワクチン株を選定している事が挙げられる。無論これらの事だけではなく、他にも分子進化的知見や他の機能的解析もウイルスの性状を推定するのに一役買っているのは紛れも無い事実であると言える。これらの研究は通常研究機関で行われているものであるが、ブタ生体を日常的に扱うと畜場由来検体でも本ウイルスの分離・同定を行えないかと考え、今回筆者はMatin-Derby-Canine-Kidney Cell (MDCK細胞)を用い本検査所管内に搬入されるブタからのインフルエンザウイルスの分離・同定を試みた。Aと畜場より合計455検体を採取して前述の試験を行ったが、CPE陽性のものは0件となり、今回分の調査においてはブタからのインフルエンザウイルスの分離・同定は成功しなかった。原因としては検体数が少なすぎたこと等が考えられるが、継続して調査を行うことでウイルスの分離は十分可能ではないかという感触を得ている。今後は分離されるであろうウイルスと地域に生活基盤を持つ方々から得られる血清を用いた解析の結果を基にして両者の相互関係について考察し、更に本県で流行しているブタウイルスとヒトとの関係について掘り下げて調査を行ってみたいと考えている。

5. まとめ

茨城県において食用に供される豚からのウイルス分離を試みる目的で、平成17年4月から18年3月の間に、計455検体の豚鼻腔拭い液を採取し、MDCK細胞に接種し細胞変性効果を観察した。細胞変性効果を認めた検体は存在しなかったが、計測して調査を行うことで様々な知見を得るものと考ええる。

6. 参考文献

1. Horimoto, T. et.al. 2001. Clin.Microbio.Rev. 14: 129-149
2. Webster, RG. et.al. 1992. Microbiol. Rev. 56: 152-179
3. Kendal, AP. et.al. 1982. Concepts and Procedures for Laboratory - based influenza Surveillance. Atlanta, GA: US. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention,
4. Subbarao, K. et.al. 1998. Science. 279: 393-395
5. Reid, AH. et.al. 1999. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 1651-1656
6. Kawaoka, Y. et.al. 1989. J.Virol. 63: 4603-4608
7. Kundin, WD. 1970. Nature. 228: 857
8. Nerome, K. et al. 1995. J.Gen.Virol. 76: 613-624
9. Kida, H. et.al. 1994. J.Gen.Virol. 75: 2183-2188
10. Shortridge, KF. Et.al. 1982. Lancet ii : 812-813
11. Shope, RE. 1931. J.Exp.med. 54: 373-385
12. Ouchi, A. et.al. 1996. J.Gen.Virol. 77: 1751-1759
13. Ito, T. et.al. 1998. Arch. Virol. 143: 1773-1782
14. Shu, LL. et.al. 1994. Viorogy. 202: 825-833
15. Castrucci, MR. et.al. 1993. Virology. 193: 503-506
16. Campitelli, L. et.al. 1997. Virology. 232: 310-318
17. Marozin, S. et.al. 2002. J.Gen.Virol. 83: 735-745
18. Zhou, NN. Et. al. 1999. J. Virol. 73: 8851-8856
19. Webby, RJ. et.al. 2000. J.Virol. 74: 8243-8251
20. Gregory, V, et.al. 2001. J.Gen. Virol. 82: 1397-1406

1. はじめに

食中毒など感染症（特にウイルスなど）の集団発生(特にノロウイルス：*Norovirus*、以下 NV)が茨城県では国内でも多く発生している。近年では、ノロウイルスの発生件数も全国的にも増加傾向にあり、高齢化社会、少子化をむかえた今日、抵抗力のなお高齢者、子供における死亡者が増加している。予防対策としてワクチンもなく、早期診断法も未だ存在していない。今後、健康危機管理の面から考えても NV 等感染症の感染機序等の解明が必要とされる。

NV は、RNA ウィルスで、genogroup において、GI ~GV に分けられる。主に GII がヒトに感染する。このように遺伝子型までは解析されているが、未だ単離培養ができておらず、このため *in vitro* での NV の培養増殖も不可能であり、迅速的な検査法も確立していない。以上のことより、NV の単離培養を目的の一つとして、宿主細胞となる細胞株の樹立、ウィルスの免疫応答、免疫変容などの感染メカニズム（ウィルス感受性）の点から調査をすることにした。第一に、ウィルス感染時の細胞障害を測定する方法を検討した。

細胞障害の測定法を確立することにより、*in vitro* におけるウィルス感染の指標とすることが可能であり、簡易的な測定法への応用が可能である。測定法の選定に関しては、細胞障害が発生するときに発生する現象を考慮にいった(1)(2)。細胞障害発生時に関係する事象として、アポトーシス、ミトコンドリアの膜電位の低下、膜の脂質過酸化など活性酸素に関与する事項が挙げられる。現在では小胞体ストレス（以下 ER ストレス）も関与していると考えられている(3)(4)。以上のことを背景に、ウィルス感染による細胞障害の診断法として、アポトーシス、ミトコンドリアの膜電位、小胞体ストレスを検討した。

2. 材料、及び方法

1) 細胞・培養条件

細胞名	培養条件	
CRFK(ノカリシウイルス宿主細胞)	DMEM+FBS10%	CO ₂ 5% ; 37°C
MDCK(インフルエンザウイルス宿主細胞)	MEM+FBS10%	CO ₂ 5% ; 37°C
Caco-2(ヒト大腸癌細胞)	MEM+FBS20%	CO ₂ 5% ; 37°C
HepG2(ヒト肝臓癌細胞)	MEM+FBS10% +NEAA1%	CO ₂ 5% ; 37°C
初代培養細胞(著者が樹立した細胞)	DMEM+FBS10%	CO ₂ 5% ; 37°C

2) 細胞障害測定方法

ウィルス感染による細胞障害（アポトーシスなど）を薬品により人工的に発生させ、*in vitro* での測定法を検討する。基本となる測定方法は下記の2種類とする。

① 0 日目 2 wellchamber に細胞播種 (4×10^4)

↓

1 日目 細胞障害をおこす (H₂O₂ 0.5% 15分 37°C 5%CO₂ 下でインキュベート)

↓

無血清培地に交換

↓
Hoechst33258、もしくは DiBAC₃(4)添加
↓
37°C 5%CO₂ 下で 15 分～30 分インキュベート
↓
i. 蛍光顕微鏡(共焦点レーザー顕微鏡)で観察 (写真撮影)
ii. FACS で測定

② 0 日目 2 wellchamber に細胞播種 (4×10^4)

↓
1 日目 無血清培地に交換
↓
ER-Tracher を添加
↓
37°C 5%CO₂ 下で 15 分～30 分インキュベート
↓
洗浄
↓
細胞障害をおこす (H₂O₂ 0.5% 15 分 37°C 5%CO₂ 下でインキュベート)
↓
i. 蛍光顕微鏡 (共焦点レーザー顕微鏡) で観察 (写真撮影)
ii. FACS で測定

I. アポトーシス測定

測定方法：①

下記の a.～c. 3 種類の試薬を検討

a.Hoechst33258 Solution (DOJINDO):励起波長：360～370nm；吸収波長 420nm～

b.DAPI Solution (DOJINDO):励起波長：360～370nm；吸収波長 420nm～

c.Propidium iodide(BD):励起波長：520～550nm；吸収波長：580nm～

II. 小胞体 (以下 ER) ストレス測定

測定方法：②

下記の a.の試薬を検討

a.ER-Tracker(Molecular Probes):励起波長 430～640nm

III. ミトコンドリアの膜電位測定

測定方法：①

下記の a.～b. 2 種類の試薬を検討

a.Mito-Red(DOJINDO):励起波長：560～580nm

b.DiBAC₄(3)(DOJINDO):励起波長：488nm(Ar レーザー)

結果、及び考察

I. アポトーシス測定法について、3 種の試薬を比較した結果、顕微鏡写真の差異は誤差範囲となり、問題はなかった。顕微鏡写真の比較は、NIH (National Institute of Health) 提供ソフトの利用により数値化し検討した。測定結果は、Fig.1 に示されるように、正常

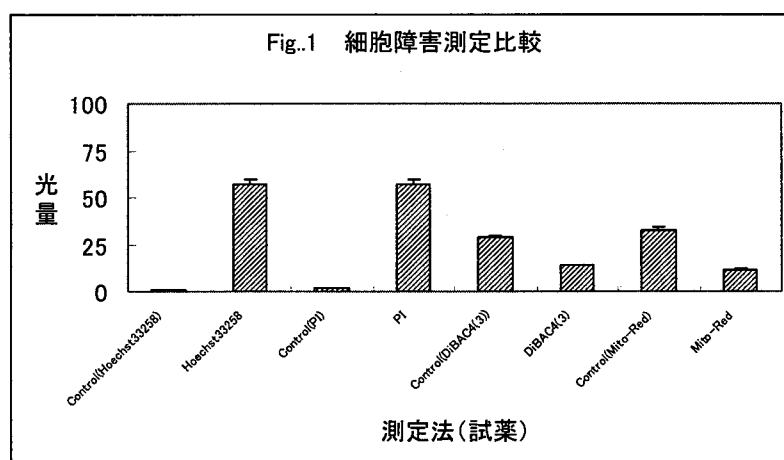
な細胞に Hoechst33258 を添加した場合 (Control-Hoechst33258)、 H_2O_2 の添加で障害をおこした場合 (Hoechst33258) の光量と正常細胞に PI を添加した場合 (Control-PI)、 H_2O_2 の添加で障害をおこした場合 (PI) の 2 種間において差異がないことより、安価であり、使用法が簡易であることなどを考慮し、Hoechst33258 Solution が最適であると判断した。しかし、FACS の測定波長を考慮に入れた場合、Propidium iodide (以下 PI) の使用が最適であった。以上より、顕微鏡下で測定する場合、Hoechst33258 を使用し、FACS においては PI を使用することが最適であることが明らかとなった。

II. ER ストレス測定法であるが、ER を蛍光染色して経時的に観察するということを主眼として検討した。ベクター導入という方法も比較検討した。ベクター導入は、30% くらいの導入率で、ベクター導入としては比較的高率であり、継代も 2~3 回は実施可能であった。ER-Tracker は、導入率が 1~4 時間の添加培養で 70% と高く、蛍光量の低下も遅く、観察するのに十分な時間をとることが可能であるが、継代は不可能という点がマイナスであった。今回は、ER の細胞障害における測定を主眼として比較検討したので、高価で、継代可能なベクター導入ではなく、簡易で、安価な ER-Tracker を選択することにした。FACS においては、DAPI、Hoechst33258 と同様の波長であることより、測定の明確さに欠けるという結果になった。また、光量の変移だけでなく、画像による経時変化をおうのに最適であることが明らかとなった。

III. ミトコンドリアの膜電位測定法であるが、多種ある中から簡易法を検討し、Mito-Red、DiBAC₄(3) を検討した。検討した結果、Fig.1 に示されるように、正常細胞に Mito-Red を添加した場合 (Control-Mito-Red)、 H_2O_2 の添加で障害をおこした場合 (Mito-Red) と正常細胞に DiBAC₄(3) を添加した場合 (Control-DiBAC₄(3))、 H_2O_2 の添加で障害をおこし添加した場合 (DiBAC₄(3)) の 2 種の間での差異はなく、FACS 測定においても測定波長を考慮しても、2 種ともに差異はなかった。ミトコンドリアの膜電位測定に関しては、どちらの試薬を使用しても問題ないという結果になった。

検討の結果、試薬が安価であり、簡易であること、確認方法を蛍光顕微鏡、FACS の 2 種類で実行できることが可能である。また、再現性があることより、アポトーシスの発生、ER ストレスの発生、ミトコンドリアの膜電位の低下を測定することにより、細胞障害の発生を明確にし、経時的に観察することが可能であることが明らかになった。

また、現在引き続き、今回検討した細胞障害発生の診断法は、抗ウイルス活性の診断法、ウイルス感受性試験、ウイルス感染メカニズムの明確化の調査に応用利用している。



参考文献

- (1) Rebamipide Significantly Inhibits Indomethacin-Induced Mitochondrial Damage, Lipid Peroxidation, and Apoptosis in Gastric Epithelial RGM-1 Cells.
Nagano Y, et al. Dig Dis Sci, 2005 Oct.
- (2) Biological effects of anthocyanin from the purple sweet potato extracts on the primary culture cell lines originated the Japanese Sika deer in vitro.
Shirai M, et al. Japan Health Association, 2006 Apr.
- (3) ER Stress Signaling and the BCL-2 Family of Proteins : From Adaptation to Irreversible Cellular Damage. Heta CA. Antioxid Redox Signal, 2007 Sep.
- (4) Hepatitis C virus core trigger apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. Benali-Furet NL, et al. Oncogene, 2005 Jul.

農産物の機能性簡易スクリーニング法の開発とその応用

上野清一（茨城県衛生研究所）

Development of Simple Method for Functional Screening of Agricultural Products and Its Application to Vegetables and Fruits produced in Ibaraki Prefecture

Seiichi UENO

(Ibaraki Prefectural Institute of Public Health)

緒言

近年、野菜や果物等の農産物には、抗変異原性、抗酸化性、免疫賦活性のような生理機能を有する成分が数多く含まれることが明らかにされ、これらを積極的に摂取することが癌をはじめとする多くの疾病の発生や予防に役立つと考えられるようになった^{1) - 3)}。このような農産物が有する機能性は、健康志向の消費者ニーズが高まる中、その品質を評価する上で重要な指標とされ²⁾、本県においても、機能性成分を活かした県内産農産物の高付加価値化事業を展開している現状にある。そこで、農産物の機能性を抗変異原性及び抗酸化性の面から簡便に評価するためのスクリーニング法を検討した。

農産物の抗変異原活性を測定する方法としては、多種多様な手法が報告されているが、Ames 試験を用いた方法が最もよく用いられている⁴⁾。一方、我々が先に報告した Spore rec-assay を利用した抗変異原活性のスクリーニング法⁵⁾は、Ames 試験よりも試験操作や結果の判定が簡便であるという特徴を有する。そこで、この方法を県内産農産物の抗変異原活性調査に適用することにした。また、抗酸化活性の評価法としては、不飽和脂質あるいはそれを含む基質（油脂、生体試料）と被検物質を混和したものに対し、過酸化の方法や過酸化の程度を測定する手段の組み合わせにより、種々な *in vitro* 下での手法が報告されている⁶⁾。本報では、生体試料を用いた抗酸化試験を利用して農産物の抗酸化活性を簡便にスクリーニングする方法について検討した。

実験方法

1. 試薬類

抗変異原活性測定用試薬

変異原溶液：変異原としては、和光純薬製トリップ-P-1 (Trp-P-1)、4-ニトロキノリン-1-オキシド (4-NQO)、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) 及び 2-アミノアントラセン (2-AA) を用い、Trp-P-1、4-NQO 及び MNNG は滅菌精製水に、2-AA は DMSO に溶解し、それぞれ 325、19.5、3,250 及び 50 μ g/ml とした。

ラット肝臓 S-9：ICN Pharmaceutical, Inc. 製

その他の試薬及び溶媒は、市販の特級品を用いた。

抗酸化活性測定用試薬

マイクロソーム懸濁液：ZENO TECH 社製のラットプールド肝マイクロソームを 0.1M リン酸緩衝液 (Na₂HPO₄/

KH₂PO₄, pH7.4) で 1.5mg タンパク質 /ml 懸濁液とした。

ADP, EDTA-Fe³⁺, NADPH, 2-チオバルビツール酸 (TBA), 1,1,3,3-テトラエトキシプロパン : 和光純薬製

2. 試料

県農業総合センターで開発したブドウ, ピーマン, レンコン, クリ, 花豆及びネギの新品種等及びこれらの在来種を試験に供した。

3. 試験溶液の調製

3-1 抗変異原活性

試料原液の調製 : ピーマン, レンコン, クリ及びネギは可食部 (皮, 種等を除いたもの) をミキサーでホモジナイズした。ブドウについては果実全体の他, 果肉部及び果皮部に分別したものについてもホモジナイズした。また, 花豆は小型粉砕機で粉末状にした。Trp-P-1, 4-NQO, MNNG に対する抗変異原活性試験の場合には, 前処理した試料 2.6g に滅菌精製水を加え 10ml とし試料原液とし, 2-AA の場合には, 前処理した試料 2.5g に滅菌精製水を加え 5ml としたものを試料原液とした。

検液及び比較対照液の調製 : Trp-P-1, 4-NQO, MNNG に対する抗変異原活性試験の場合には, 試料原液 (1.25ml) に変異原溶液 (0.05ml) を加えたものを検液, 滅菌精製水 (1.25ml) に変異原溶液 (0.05ml) を加えたものを比較対照液とし, 2-AA の場合には, 試料原液 (0.5ml) に変異原溶液 (0.5ml) を加えたものを検液, DMSO (0.5ml) に変異原溶液 (0.5ml) を加え比較対照液とした。

3-2 抗酸化活性

試料原液の調製 : ブドウ (マリオ) の果実全体をホモジナイズ後, 700 × g 及び 9,000 × g でそれぞれ 10 分間遠心分離し, その上清を試料原液とした。

検液及び比較対照液の調製 : Aroclor1254 を誘導剤としたラット肝ミクロソーム懸濁液 0.5ml を共栓試験管 (10ml) に採り, 試料原液 (50 ~ 100 μ l) を加え検液, ミクロソーム懸濁液に試料原液と同量の精製水を添加したものを比較対照液とした。

4. 試験操作法

4-1 抗変異原活性

抗変異原活性の測定は, 既報⁵⁾ に準じて行なった。すなわち, *B. subtilis* の野生株 (H17 Rec⁺) 及び DNA 組み換え修復能欠損株 (M45 Rec⁻) それぞれの胞子を Kada らの方法⁷⁾ に準じて調製し, 滅菌精製水で 2 × 10⁷ 胞子 /ml の懸濁液とする。M45 及び H17 の胞子懸濁液 0.1ml をそれぞれ直径 90 mm のプラスチックシャーレにとり, 代謝活性化の場合には更にラット肝臓 S-9 を 0.1ml 添加し, B-2broth 寒天 (0.8%) 培地を 10ml 加え混釈し固化する。検液及び比較対照液の 40 μ l をそれぞれ直径 8mm の厚手ペーパーディスクに染み込ませ, 代謝活性化の場合には更に Co-factor 溶液 20 μ l を添加後, 固化した胞子寒天シャーレ中心部にのせる。これを 37°C で 20 時間培養後, ペーパーディスクの回りに生じた生育阻止帯の長さをノギスで測定し, 下記の式 (1) から抗変異原活性を評価した。なお, この条件下における Trp-P-1, 4-NQO, MNNG 及び 2-AA の用量は, それぞれ 0.5, 0.03, 5 及び 1 μ g / ディスクであり, 試料の用量は 10mg/disk であるが, 検液及び比較対照液とも H17 の胞子寒天シャーレ上に生育阻止帯はほとんど認められなかった。

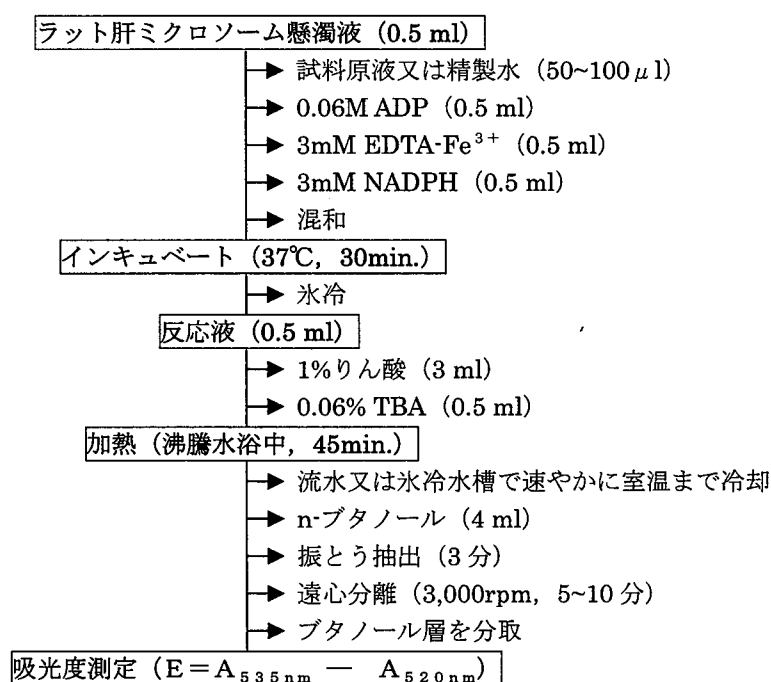
$$\text{抗変異原活性 (\%)} = (1 - S/M) \times 100 \quad (1)$$

M : 比較対照液の M45Rec⁻ 株における生育阻止帯の長さ (mm)

S : 検液の M45Rec⁻ 株における生育阻止帯の長さ (mm)

4-2 抗酸化活性

検液及び比較対照液に対し 0.06M ADP, 3mM EDTA-Fe³⁺ 及び 3mM NADPH 溶液をそれぞれ 0.5ml ずつ添加し攪拌後, 37°Cの水浴中で 30 分間インキュベートする。上記反応液を直ちに氷冷し, その 0.5ml をネジ口遠心沈澱管 (10ml) に採り, 1%りん酸を 3ml を加え, 0.06% TBA 試薬を 0.5ml 添加後沸騰水浴中で 45 分間過熱する。流水で速やかに室温まで冷却し, ブタノール (4ml) を加え振とうする。遠心分離 (3,000rpm, 10 分) 後, ブタノール層を採り吸光度測定を行なう。吸光度は 535nm と 520nm の 2ヶ所で測定し, その差 ($A_{535-520}$) を求める (図式 1)。標準として 10n mol/ml のテトラエトキシプロパン・メタノール溶液 (0.5ml) を用い, 上記と同様の操作を行いその吸



図式 1 抗酸化能簡易スクリーニング法

光度から検液及び比較対照液の過酸化物質濃度 (TBA 値 : n mol MDA/mg タンパク質) を求め⁸⁾, 下記の式 (2) から抗酸化活性を評価した。

$$\text{抗酸化活性 (\%)} = (1 - B/A) \times 100 \quad \text{————— (2)}$$

A : 比較対照液の TBA 値

B : 検液の TBA 値

結果及び考察

1. 県内産農産物の抗変異原活性について

本県産農産物 6 品目 16 種類の Trp-P-1, 4-NQO, MNNG 及び 2-AA に対する抗変異原活性を, 上記 3-1 及び 4-1 に記載した方法で調査した (表 1)。

表1 県内産農産物の抗変異原活性

農産物*1	抗変異原活性*2				
	Trp-P-1*3	2-AA*4	4-NQO*5	MNNG*6	
ブドウ (巨峰, 在来種)	果実全体	-	+	+	-
	果肉	-	-	-	-
	果皮	-	+++	-	-
ブドウ (巨峰, 種なし)	果実全体	-	+++	-	-
	果肉	-	-	-	-
	果皮	-	+++	-	-
ブドウ (マリオ)	果実全体	-	+	-	-
	果肉	-	-	-	-
	果皮	-	+++	-	-
<hr/>					
ピーマン (みおぎ, 在来種)	-	-	-	-	
ピーマン (鹿島みどり)	-	-	-	-	
<hr/>					
レンコン (霞ヶ浦, 在来種)	+	+++	+	+	
レンコン (早霞)	-	+++	+	+	
<hr/>					
クリ (国見, 在来種)	-	-	+++	+	
クリ (神峰)	+	+	+++	+	
クリ (A-07)	++	+	+++	-	
<hr/>					
花豆 (常陸大黒)	+	+	+++	+	
<hr/>					
ネギ (所内系, 在来種)	軟白部	-	-	-	
	緑葉	-	-	-	
ネギ (赤ひげ)	軟白部	-	-	-	
	緑葉	-	-	-	
ネギ (長悦交配)	軟白部	-	-	-	
	緑葉	-	+++	-	
ネギ (園研1号)	軟白部	-	-	+	
	緑葉	-	+++	-	
ネギ (一本太系)	軟白部	-	-	+	
	緑葉	-	-	-	

*1 : 用量 ; 10mg/disk

*2 : - ; 30%以下, + ; 30%以上, ++ ; 70%以上, +++ ; 90%以上

*3 : 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (0.5 μg/disk)

*4 : 2-aminoanthracene (1 μg/disk)

*5 : 4-nitroquinoline-1-oxide (0.03 μg/disk)

*6 : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (5 μg/disk)

この表から明らかなように、ブドウに関しては、在来種の巨峰及び新品種等（種なし巨峰，マリオ）の果実全体と果皮部に2-AAに対する抗変異原活性が認められた。しかしながら、果肉部には活性が認められないことから、ブドウの抗変異原活性は果皮に由来すると考えられた。そのため、ワイン等果実全体を利用する製品や皮ごと食することのできるマリオのような欧州系ブドウを摂取することがブドウに含まれる抗変異原物質を体内に取り込む有効な方法と考えられる。クリについては、在来種（国見）よりも新品種（神峰及びA-07）の方がより多くの変異原に対し活性を示し、神峰は試験に供した4種の変異原全てに、またA-07は3種の変異原に対し活性を示した。新品種の花豆（常陸大黒）は4種の変異原全てに活性を示した。レンコンは在来種（霞ヶ浦）及び新品種（早霞）とも2-AA、4-NQO及びMNNGに対し活性が認められたが、早霞にはTrp-P-1に対する活性は認められなかった。ネギは5種類で検討したが、新品種の園研1号と一本太系及び長悦交配に2-AAや4-NQOに対する活性が認められた。なお、ピーマンは、在来種（みおぎ）、新品種（鹿島み

どり)とも試験に供した4種の変異原に対する活性は認められなかった。

2. ラット肝ミクロソームを用いた抗酸化試験の検討

2-1 過酸化の基質の検討

生体モデル系の抗酸化試験においては、過酸化の基質として赤血球膜ゴーストやラット肝ミクロソーム等が用いられる⁹⁾。しかし、これら生体試料の調製は煩雑であることから、本報では市販のラット肝ミクロソームを利用した抗酸化試験を検討した。

表2は、各種ミクロソームを図式1の方法に準じて処理した際のブタノール層の吸光度を測定した結果であるが、基質Bで最も高い値を示した。そこで、Aroclor1254を誘導剤としたSprague-Dawleyラットの肝ミクロソームを過酸化の基質として用いることにした。

表2 基質としての肝ミクロソームの検討

基質	動物種	誘導剤	吸光度 ($A_{535-520}$)
A	Sprague-Dawley rat	無し	0.010
B	"	Aroclor 1254	0.060
C	"	3-Methylcholanthrene	0.014
D	"	β -Naphthoflavone	0.017
E	Fischer 344 rat	無し	0.007
F	Wister rat	無し	0.007

2-2 過酸化誘起条件の検討

一般に、ラット肝ミクロソームを用いた抗酸化試験においては、ミクロソーム懸濁液に0.02M ADP, 1mM EDTA-Fe³⁺及び1mM NADPHを添加し、30分間インキュベートすることにより脂質過酸化反応が行なわれる⁹⁾。そこで、Aroclor1254を誘導剤としたラット肝ミクロソームを基質として利用する際のこれら過酸化誘起物質の最適濃度を検討した。

表3は、図式1の試験操作のうちADP, EDTA-Fe³⁺及びNADPH濃度を従来法⁹⁾を基準として0.5~3倍まで変化させた際のブタノール層の吸光度を測定した結果であるが、過酸化誘起物質の濃度の上昇に伴いその値は増加した。そこで、過酸化の誘起には従来法より3倍濃度の高い溶液を用いることにした。

表3 反応試薬濃度の検討

試薬濃度	吸光度 ($A_{535-520}$)
従来法の1/2倍	0.01
従来法*	0.06
従来法の2倍	0.11
従来法の3倍	0.14

* ADP : 0.02M, EDTA-Fe³⁺ : 1mM, NADPH : 1mM

2-3 実試料への適用

以上の検討結果より確立した実験方法4-2のスクリーニング法により、ブドウ(マリオ)の抗

酸化活性を調査した。その結果を表4に示したが、700×g及び9,000×g上清画分とも抗酸化活

表4 ブドウの抗酸化活性

試料	TBA 値 (nmol MDA/mg タンパク質)	抗酸化活性 (%)
なし	31.7	—
700×g 上清, 50 μ l	16.8	47.0
700×g 上清, 100 μ l	8.8	72.2
9,000×g 上清, 50 μ l	21.6	31.9
9,000×g 上清, 100 μ l	13.9	56.2

性が認められ、9,000×g上清よりも700×g上清において強い活性を示した。そこで、次に、この700×g上清を水道水で20%溶液とし飲料水としてマウスに1ヶ月間自由に摂取させ、生体内抗酸化能に対するブドウ（マリオ）の効果を調査した。投与実験は2回実施し、ブドウ抽出液摂取群及び水道水のみを対照群それぞれの肝臓、腎臓及び脳におけるTBA値を4-2の方法に準じて測定した。その結果を表5に示したが、肝では摂取群のTBA値が対照群のそれよりも低値を示し、脂質過酸化を抑制する傾向が認められた。これに対し、腎及び脳では、摂取群と対照群のTBA値にほとんど相違は認められなかった。

表5 マウス臓器のTBA値

	TBA 値 (nmol MDA/g)*					
	実験1			実験2		
	肝臓	腎臓	脳	肝臓	腎臓	脳
対照群	210	414	1,141	218	478	1,127
投与群	181	423	912	168	468	1,156

* n = 5

このように、従来のラット肝マイクロソームによる抗酸化試験を若干改変した本スクリーニング法により、ブドウ（マリオ）の抗酸化活性を客観的に評価することができた。本法はラット肝マイクロソームの調製等煩雑な前処理操作を必要とせず簡便であることから、種々の試料への適用が可能と考えられる。

結 言

農産物の機能性を抗変異原性及び抗酸化性の面から評価するための簡易スクリーニング法を検討した。その結果、我々が先に開発したSpore rec-assayを利用したスクリーニング法により、県内産農産物の抗変異原活性を簡便な操作で迅速に評価することができた。また、農産物の抗酸化活性評価法として、市販のマイクロソームを利用した簡便なスクリーニング法を確立した。

文 献

- 1) 黒田行昭編：“抗変異原・抗発がん物質とその検索法”，講談社，東京，1995，p.2
- 2) 東敬子：農業および園芸，76，3(2001)
- 3) 大澤俊彦：日食工誌，42，728(1995)
- 4) 黒田行昭編：“抗変異原・抗発がん物質とその検索法”，講談社，東京，1995，p.419-444
- 5) Ueno S., Aoki K., Ishizaki M. : *J. Health Sci.*, 46, 29(2000)
- 6) 佐野満昭，富田勲：食品と開発，28，18(1993)
- 7) Kada, T., Hirano, K., Shirasu, Y. : “Chemical Mutagens Vol. 6” (ed. by de Serres, F. J., Hollaender, A.)pp. 149-173(1980)Plenum Pub., New York
- 8) 金田尚志，植田伸夫編：“過酸化脂質実験法”，医歯薬出版，東京，1983，p.84-85
- 9) 川岸舜朗編：“食品中の生体機能調節物質研究法”，学会出版センター，東京，1996，p.17-19

第4章 学会発表抄録

肝細胞癌(McA-RH7777)移植ラットにおける高コレステロール血症の発症メカニズムについて

○本多 彰, 土井幹雄 (茨城県衛生研究所 遺伝子科学部)

平山 剛, 池上 正, 松崎靖司 (筑波大学大学院人間総合科学研究科 消化器内科)

【目的】

肝細胞癌の paraneoplastic syndrome として、高コレステロール(CHOL)血症が知られている。近年明らかにされた分子生物学的な CHOL の合成, 分泌, 異化調節機構に基づいて、ラット肝細胞癌モデルでの高 CHOL 血症発症メカニズムについて検討した。

【方法】

ラットの皮下に McA-RH7777 細胞を 4×10^6 個移植し、4 週間後に肝臓、腫瘍、血液を採取した。ステロール・胆汁酸濃度および酵素活性は高分解能 GC/MS 法にて、蛋白発現は Western blot 法にて、また mRNA の定量は GeneChip(Affymetrix)および Real-time PCR 法にて行った。

【成績】

4 週間後に腫瘍サイズは 5.5 ± 1.7 g ($n = 4$) となり、血清 CHOL 濃度は対照の 1.5 倍に増加した。腫瘍組織では CHOL 濃度が増加し、血中への CHOL 分泌を行う ABCA1 と ABCG1 の発現が、mRNA レベルでも蛋白レベルでも著増していた。また、それらの発現を正に制御する核内レセプター-LXR α の活性化状態を、他の LXR α 標的遺伝子の発現と、リガンドであるオキシステロールの濃度

で評価したところ、腫瘍組織ではいずれも増加を認めた。次にオキシステロール増加の原因を明らかにするために、オキシステロール合成系(CHOL 合成系)と分解系(胆汁酸合成系)の評価を行った。その結果、腫瘍組織ではオキシステロール合成系の亢進と分解系の抑制を認めた。CHOL 合成系を促進する転写因子 SREBPs およびその制御蛋白群(SCAP, INSIG-1, INSIG-2) の遺伝子発現は、いずれも腫瘍組織で 5 倍以上に増加しており、そのことがオキシステロールが増加してもコレステロール合成系にフィードバックがかからない原因と考えられた。一方、腫瘍組織では LXR α の活性化と共に FXR/SHP 系の抑制を認め、調節系は胆汁酸合成促進の方向に働いていたが、酵素群がそれに全く反応していなかった。

【結論】

McA-RH7777 移植ラットにおける高 CHOL 血症は、CHOL の合成亢進と異化低下のため腫瘍組織中に蓄積したオキシステロールによって LXR α が活性化され、ABCA1 と ABCG1 の発現が亢進していることが原因と考えられた。

第 4 回東日本胆汁酸研究会 (東京)

Hypercholesterolemia in rats with hepatomas: increased oxysterols accelerate cholesterol efflux but do not inhibit cholesterol biosynthesis nor stimulate bile acid production

Akira Honda,¹ Takeshi Hirayama,² Yasushi Matsuzaki,² Teruo Miyazaki,¹ Tadashi Ikegami,² Mikio Doy,¹ Guorong Xu,^{3,4} Michael Lea,³ and Gerald Salen,^{3,4}

¹Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Japan; ²University of Tsukuba, Tsukuba, Japan; ³UMDNJ-NJ Medical School, Newark, NJ, USA; ⁴VA Medical Center, East Orange, NJ, USA.

Abstract:

Introduction:

Hypercholesterolemia is one of the important paraneoplastic syndromes in patients with hepatoma, but the nature of the defect has not been clarified. We investigated the molecular mechanisms of hypercholesterolemia in a hepatoma-bearing rat model.

Methods:

Buffalo rats were implanted in both flanks with Morris hepatoma (McA-RH7777) cells. After 4 weeks, the animals and untreated control rats were sacrificed and the tumors, liver and blood were collected from each rat.

Results:

Tumor weights became 5.5 ± 1.7 g and serum cholesterol levels were higher in the rats bearing hepatomas than in controls (90 ± 2 vs 60 ± 2 mg/dl). Protein expression and mRNA levels of ABCA1 and ABCG1 were markedly elevated in tumors, which was associated with the activation of LXRalpha due to increased tissue oxysterol concentrations. The accumulation of the oxysterols in the hepatoma appeared to be caused by dual defects. One is

the upregulation of *de novo* cholesterol biosynthesis despite the increased concentrations of tissue cholesterol and oxysterols. Our results showed that mRNA and protein expression levels of SREBP2, SCAP, INSIG-1 and INSIG-2 were all equally overexpressed in tumors, which suggests that the resistance to sterols is due to the excess of the SREBP processing system relative to sterols. The other defect is inhibition of bile acid biosynthetic pathway in spite of reduced SHP expression and activated LXRalpha. Coordinate downregulation of several essential genes involved in bile acid metabolism, i.e. CYP7A1, CYP7B1, CYP8B1, BSEP and NTCP suggests that they are controlled by a common unknown factor.

Conclusions:

Hypercholesterolemia in McA-RH7777 hepatoma-bearing rats were caused by the activation of LXRalpha due to the increased oxysterol concentrations. The accumulation of the oxysterols in the hepatoma is caused by the upregulation of cholesterol biosynthesis and inhibition of bile acid biosynthesis in spite of the increased oxysterol concentrations.

高コレステロール血症は、肝癌の腫瘍随伴症状としてよく知られているが、そのメカニズムにはまだ不明な点が多かった。そこで我々は、肝癌を移植されたラットモデルを用いて、高コレステロール血症の原因を分子レベルで検討した。その結果、担癌ラットにおける高コレステロール血症は、肝癌細胞からコレステロー

ルの分泌が亢進していることが原因であった。分泌亢進の原因は、核内レセプターLXRαが過剰に蓄積した酸化ステロールによって活性化されているためであり、酸化ステロールの増加は、コレステロール合成系にフィードバック制御がかかっていないため、すなわち転写因子SREBPが過剰発現しているためと考えられた。

LC-MS/MSによる血中胆汁酸合成マーカーの高感度分析

○本多 彰, 土井幹雄 (茨城県衛生研究所 遺伝子科学部)
山下幸和, 沼澤光輝 (東北薬科大学 臨床分析化学教室)
池上 正, 松崎靖司 (東京医科大学霞ヶ浦病院 消化器内科)
宮崎 浩 (ファーマックス研究所)

【目的】

7 α -Hydroxy-4-cholesten-3-one (C4)は、ヒトにおける肝のCYP7A1活性および胆汁酸合成量評価のための、既に確立された血中バイオマーカーである。C4の定量には従来UV-HPLCまたはGC-SIMが用いられていたが、それぞれ感度が不十分で多量の血清を必要とする(約1 ml)、サンプル調製が煩雑という欠点があった。そこで今回LC-MS/MSを用いた高感度で、しかもサンプル調製が容易な血中C4定量方法の開発を行った。

【方法】

血清に内部標準として[²H₇]C4を添加し、アセトニトリルと硫酸アンモニウムを加えてC4を抽出した。溶媒を蒸発により除去した後、C4をピコリン酸エステルに誘導体化した。その誘導体をBond Elut C18により精製した後に、ESI-LC-SRMにて定量した。

【成績】

C4-ピコリン酸エステルの最小検出感度は100 fg (S/N =

10)であり、通常のUV-HPLC法と比べて1000倍、我々が過去に報告したGC-SIM法と比べても30倍優れていた。Bond Elut C18によるC4-ピコリン酸エステルの回収率は104 \pm 2%であり、コレステロールの除去率は99 \pm 1%であった。一方、サンプル調製およびLC-SRM分析時の変動係数はそれぞれ5.7%および3.9%であり、添加回収率は平均93.4%であった。使用血清量を漸減していき、定量されたC4値との関係を検討したところ、血清2-50 μ lの範囲で良好な直線性が認められた($r=0.999$; $n=5$; $P<0.0001$)。

【結論】

非極性のステロイドをピコリン酸エステル化することにより、GC-SIM法より簡易なESI-LC-SRM法での高感度定量が可能になった。本分析法を用いることにより、わずか数 μ lの血清で、ヒト肝におけるCYP7A1活性および胆汁酸合成量の評価が可能である。

第28回胆汁酸研究会 (米子市)

PROTEOMIC PROFILING OF FORMALIN-FIXED PATHOLOGICAL TISSUES BY MASS SPECTROMETRY (I)

Akira Honda¹, Mikio Doy¹, Tomoyo Nakano², Yasuhiko Bando², Yasushi Matsuzaki³ and Hiroshi Miyazaki⁴

¹Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki 310-0852, Japan, ²AMR Incorporated, Meguro-ku, Tokyo 152-0031, Japan, ³Tokyo Medical University, Kasumigaura Hospital, Ami, Ibaraki 300-0395, Japan, and ⁴Pharmax Institute, Kawasaki, Kanagawa 213-0021, Japan

Proteomic analysis by mass spectrometry is a powerful technique for biomarker discovery that contributes to the diagnosis of specific diseases, targeted therapeutics and evaluation of drug toxicity. Although the analytical methods have evolved, difficulty still lies in the availability of clinical samples and background matrix interference. Formalin-fixed paraffin-embedded tissues are vast pathological archives that exist worldwide. The proteomic analysis of these pathologically characterized clinical samples may enable us to explore pathophysiological biomarkers retrospectively. We investigated the effects of formalin fixation on proteomic profiles in gastric cancer and non-cancer tissues as an example. Gastric cancer is a common disease but specific biomarker has yet to be discovered. Gastric cancer in antrum (A-Ca) and benign tissues in antrum (A-Be) and body of stomach (B-Be) obtained from a gastrectomized specimen were frozen and cryosectioned. For tissue microdissection, one frozen tissue section was air-dried and the other section was placed in 10% buffered formalin overnight. A-Ca, A-Be and B-Be tissues were pathologically characterized and approximately 30,000 cells were microdissected under microscope. The resulting tissue samples were incubated with Liquid Tissue™ MS Protein Prep Kit (Expression Pathology Inc. MD, USA) and digested with trypsin solution including DDT. Each resulted peptide mixture was analyzed by a Nano-flow LC/MS system using ZAPLOUS NFLC/MS (AMR Inc., Tokyo) and obtained tandem mass spectra were searched against the human proteomic databases from NCBI (the National Center for Biotechnology Information, USA) using Bioworks™ with SEQUEST (Thermo Electron San Jose, CA, USA). Total 1056, 651 and 1005 proteins were identified in formalin-fixed A-Ca, A-Be and B-Be tissues, respectively. In comparison, significantly less numbers of proteins (691, 550 and 716; A-Ca, A-Be and B-Be, respectively) were identified in formalin-unfixed tissues. The expression patterns among A-Ca, A-Be and B-Be tissues were analyzed by using the most reliably expressed 621 proteins in formalin-fixed samples and 422 proteins in formalin-unfixed samples. As shown in Fig. 1, B-Be tissue expressed more numbers of proteins than A-Be tissue irrespective of formalin treatment, which was lent support by the pathological observation that mucosa of gastric body consisted of more heterogeneous cells than that of gastric antrum. When proteins specifically expressed in A-Ca tissue were screened, about 45% (181/398) and 42% (81/193) of proteins identified in formalin-fixed and unfixed A-Ca, respectively, were not expressed in the corresponding A-Be or B-Be tissues. These findings indicate that formalin-fixed samples gave not only reliable results but also a significantly much amount of proteomic information compared with formalin-unfixed samples. Retrospective investigation of pathological archives will become a new tool for the discovery of novel biomarkers.

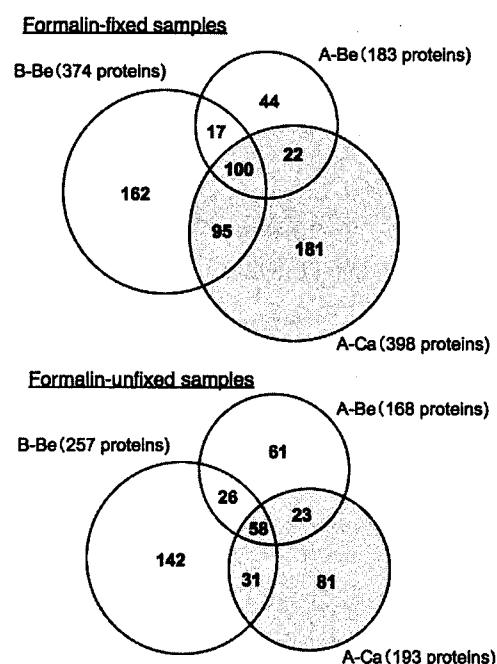


Fig. 1 Proteins identified in gastric tissues

質量分析装置によるプロテオーム解析は、病気の早期診断、治療方法の開発、薬物の生体影響の評価などを目的としたバイオマーカー探索にきわめて有効な手法である。しかし解析手法がどんなに進歩しても、ヒト由来のサンプルを得ることは容易ではなく、研究が遅れているのが現状である。病理組織検査に用いられるホルマリン固定されたパラフィン包埋組織は、通常世界中の多くの病院で永久保存されており、それを用いてプロテオーム解析を行うことができれば非常に有用性が高い。我々は、胃癌および非胃癌部の冷凍保存組織を用いて、ホルマリン固定がプロテオーム解析データに与える影響を検討した。その結果、ホルマリン固定組織を用いても、ホルマリン固定をはずす試薬を用いることにより、凍結乾燥組織と同じようにプロテオーム解析が可能であった。過去のホルマリン固定病理標本を用いたプロテオーム解析は、今後バイオマーカー探索のための非常に有用なツールになるものと考えられた。

鳥インフルエンザ血清抗体検査の手法について

○山崎良直（茨城県衛生研究所 遺伝子科学部）

1.はじめに

平成17年6月、水海道市（現常総市）の養鶏場での初発以来、茨城県内の養鶏業を混乱に貶めた弱毒性鳥インフルエンザウイルスに起因する一連の問題は現段階では一応の収束を見た。これに伴い茨城県内において感染鶏の処分が実施されたが、これに関連して作業従事者におけるH5N2亜型高度病原性鳥インフルエンザ（HPAI）に対する抗体調査を実施することとなった。これには鶏と接触歴のない方々についても検査の対象となっており、県倫理委員会の開催・裁定を待って採血が開始される予定となっている。今回は検査を開始するにあたり、検査法の実際について紹介したい。

2.検査の実際

① 検体血清の非働化：血清中に含まれる非特異因子を排除するために血清1容に対し市販品のRDE（Receptor destroying enzyme）3容を加えて37℃で一晩培養後、更に56℃、30分間処理を行い、これに6容の培養液を加える。最終的な血清の希釈倍数はこの時点で10倍となる。

② 抗原抗体反応と細胞への接種：①で調整した血清を2倍階段希釈し、これに100TCID₅₀（Tissue culture infection dose）に調整したウイルス液（抗原）を等量混合して37℃、30分間培養する（抗原抗体反応）。次いでこの混合液を96穴マイクロプレートに培養したMDCK細胞（犬腎臓由来細胞）に接種し、37℃で3～4日間培養する。培養終了後、ホルマリン処理を実施し細胞の固定を行った後穴内の残留物を染色し、得られた色調を波長630nmにおける吸光度としてプレートリーダーで測定する。

③ 結果の判定：感染価並びに血清抗体価の算定はReed-Muenchの方法により行う。具体的には細胞未接種対照のOD値から標準偏差の3倍を引いた値を陽性限界値とし、この値を下回る数値を陽性と判定している。逆に血清抗体価を測定する際にはこの値を上回る中で最も希釈倍数が高い穴の倍数をその血清抗体価と判定する。

3.問題点・課題等

ある個体において特定の感染症に対する罹患の（可能性の）有無を調べる場合、通常個体における血清抗体価の測定という手法が採られる。しかし、それと同時に個体からの病原体の分離も求められることが多く、血清抗体価のみでの評価は説得力に乏しいこともままある。過去にヒトにおいて感染事例のあったHPAI（H5N1）についてはヒトからのウイルス分離が成功した実績があり、血清疫学的検索との結果が一致していると考えて良いだろう。今回当県における状況では、当該ウイルスがヒトからの分離例が無く、ヒトにおける感染例がない病原体に対する血清抗体価の上昇をいかに合理的に説明するかというところがポイントになる。それにはいくつかの候補があり、HI（赤血球凝集抑制）試験、特異的抗原によるELISA法、ウエスタンブロット（WB）法、そして中和試験法などがある。しかしHI試験法では感度が低く、ELISAにおいては特異的抗原を用いる故の交差反応の問題、WBにおいては抗体の状態で結果が左右されやすい事や多検体処理を視野に入れた場合には実施不可能であることを考えると感度・特異性・実際の運用における簡便度を鑑みて本法が採用されたと思われる。

インフルエンザウイルスの宿主となるトリや他の動物に接触した人々の同ウイルスに対するリスクは詳細な研究によると全く接触のない人々に比べれば高くなる傾向にあるとされている(7,8)。しかし、今回の検査対象ウイルスが過去にヒトにおいて感染事例のない弱毒株ウイルスであることを考えると、その結果の吟味には慎重にならざるを得ないのもまた事実である。実際他府県における事例、また今回の茨城県における事例でもカットオフ値の設定は困難を極めたらしく、あくまでも暫定的なものであるとの但し書きがある。やはり信頼のある科学的検証を行っていくにはかなりの困難を伴うものであり、今後の検査を通して少しでもその解明の一端となれば幸いである。検査結果等に関してはまた時期を見てお話しできればと思う。

Chromosome polymorphism found in wild-caught Japanese sika deer, *Cervus nippon*- Cumulative data in Japan

M.SHIRAI, H.MIYAZAKI,¹⁾ M.DOY, and S.MURAMATSU²⁾

Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito; Chiba Industrial Technology Research Institute, Chiba¹⁾, Japan Animal Technology Association, Tokyo²⁾ Japan

Comparative cytogenetic studies were made on 4 subspecies of the Japanese sika deer, *Cervus nippon*, distributed widely in Japan. Blood and skin tissues were collected from 177 animals (female 80, male 87) after emergency culling for the feedback management of wild life in various regions in Japan: *C.n.esoensis*. (Hokkaido, 27), *C.n.centralis*. (Honshu, 126), *C.n.nippon* (Kyushu, 5), and *C.n.pulchellus* (Tsushima Island, 19). Karyotype of each animal was analyzed using in vitro cultures of collected samples. The normal karyotype ($2n=68, XX$ or $XY, NF7$) were observed on 168 out

of 177 animals (94.9%). Two types of Robertsonian translocations (LM-1 and LM-2) were found in the rest 9 animals as the heterozygous and/or homozygous carriers: 5 cases from *C.n.centralis*. (5/126, 3.9%) and 4 cases from *C.n.pulchellus* (4/19, 21.1%). Therefore, the chromosome number varied from $2n=64, XX$ or XY to $2n=67, XX$ or XY without the change of NF7 in these 9 cases. These results suggest that two types of Robertsonian translocations were naturally induced and stably preserved in the wild population of Japanese sika deer.

17th European Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping, Portugal, 2006

BrdU による SCEs の発生にたいするアントシアニンの効果

○白井 睦, 土井 幹雄 (茨城県衛生研究所 遺伝子科学部)

前報で、紫甘藷に含まれるアントシアニンには、培養細胞にたいして抗酸化作用を示す効果のあることを報告した(白井ら;2006)。本報告では、姉妹染色分体交換 (SCEs) として観察される染色分体への BrdU の影響にたいするアントシアニンの効果を 3 種類の哺乳動物細胞、HepG2 (ヒト肝臓癌由来培養株)、CRFK (ネコ腎臓由来培養株)、ニホンシカ (宮城県金華山産 3 頭の皮膚由来初代培養) を用いて調査した。培養液 (FBS10% に加えた DMEM、EMEM) に BrdU (SIGMA) を 5 μ g/ml に加えて、培養した対照群とそれにアントシアニンを 1% になるように加えて培養した群について、培養

開始後約 8 時間の各細胞群の SCEs 頻度を調査し、比較検討した。非添加群の SCEs 頻度は、HepG2 15.1 SCEs /cell、CRFK 12.4 SCEs /cell、ニホンシカ No.72 12.5 SCEs /cell、No.68 11.6 SCEs /cell、No.77 10.9 SCEs /cell であった。アントシアニン添加群では HepG2 4.9 SCEs /cell、CRFK 3.4 SCEs /cell、ニホンシカ No.72 3.5 SCEs /cell、No.68 3.6 SCEs /cell、No.77 4.2 SCEs /cell であった。この結果から、紫甘藷より抽出したアントシアニンには、培養細胞の SCEs 発生を低減させる効果がみられた。

第 57 回染色体学会 (千葉市)

マイトマイシン C によりウマのリンパ球に誘発された姉妹染色分体交換の頻度

○ 村松 晋¹、白井 睦²、(¹(社) 畜産技術協会、²茨城県衛生研究所 遺伝子科学部)

末梢リンパ球の In vitro 培養を利用して、ウマの染色体にたいするマイトマイシン C の影響を研究した。マイトマイシン C は、0.01、0.05、0.10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように投与し、誘発された姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchanges : SCEs) の頻度を分析した。SCEs の自然発生率は、5.48 SCEs /cell であったが、投与し

たマイトマイシン C によって 0.01 $\mu\text{g/ml}$ で 6.65 SCEs/cell、0.05 $\mu\text{g/ml}$ で 7.45 SCEs/cell、0.1 $\mu\text{g/ml}$ で 9.47 SCEs/cell と投与量に比例して増加がみられた。この結果からマイトマイシン C は、ウマのリンパ球に SCEs の誘発効果を有しており、この系は環境変異源の影響研究のために有用なテスト系であることが示唆された。

第 57 回染色体学会 (千葉市)

有害物質を含有する家庭用品の検査について

茨城県衛生研究所

○石井崇司、福田聡、大曾根圭子、小山田則孝

1 はじめに

家庭用品の検査は、有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律に基づいて、保健衛生上の見地から必要な規制を行うことを目的として行われている行政検査である。クレオソート油は防腐・防虫剤として木材に処理されており、過去に電柱や鉄道の枕木に使用されていたが、最近ではガーデニング用品にも使用され、それに含有される芳香族炭化水素の発ガン性が問題となっている。平成16年6月から、家庭用品に含有する有害物質としてクレオソート油およびクレオソート油処理木材中の芳香族炭化水素であるベンゾ(a)アントラセン (BaA)、ベンゾ(a)ピレン (BaP)、ジベンゾ (a,h) アントラセン (DBA) が規制された。

そこで、今回、県内で市販されているクレオソート油および防腐・防虫処理木材を試買し、実態調査を実施したので、これらの結果について報告する。

2 方法

(1) 試料

茨城県内で販売されていた木材用防腐・防虫剤およびその処理木材製品

(2) 試薬

ベンゾ(a)アントラセン、ベンゾ(a)ピレン、ジベンゾ (a,h) アントラセン、フェナントレン-d10：和光純薬工業(株)製、環境分析用標準品

ジクロロメタン：関東化学工業(株)製、特級試薬

固層抽出カラムカートリッジ：Waters 社製 Sep-Pak Silica Cartridges

(3) 試験溶液の調整および測定方法

① 木材用防腐・防虫剤：試料 0.5g を固相抽出カラムに流し込みジクロロメタン 10ml で溶出した。その液について、50 度で 2ml になるまで減圧濃縮、さらにジクロロメタンを加えて全量を 5ml とし試験溶液とした。

② 木材：試料の表面部分を削り取り細かく刻んだもの約 1g にジクロロメタン 20ml 加えて 37 度で 24 時間静置抽出した。抽出液をろ紙でろ過後、これを木材用防腐・防虫剤と同様に操作した。

試験液 2ml に内標準物質(IS)のフェナントレン-d10のジクロロメタン溶液(6 μ g/ml)0.5ml を加え、1 μ l をガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)に注入した。SIM モードで得られたクロマトグラム上の対象物質と IS とのピーク面積比を求め、検量線から試量中の規制物質の含有量を求めた。

(4) 装置・条件

GC：Hewlett Packard 社製 5890 MS：Hewlett Packard 社製 5972 カラム：DB-5MS

0.25mm×30m、内厚0.25 μ m (J&W) カラム昇温条件:60 $^{\circ}$ C(2min) \rightarrow (25 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 300 $^{\circ}$ C(6min)
 注入口:280 $^{\circ}$ C インターフェイス 250 $^{\circ}$ C

3 結果・考察

試買調査の結果、水戸周辺の量販店では規制の対象となるクレオソート油は一種類であり、その塗布木材は見られなかった。そこで、クレオソート油1種類とその代替品である木材用防腐・防虫剤および防腐・防虫処理済表示のある木材を用いて規制物質の検査を行った。

各標準溶液の検量線は各規制物質ともに0.25~2ppmの範囲では良好な検量線が得られた(図1)。このときの規制物質の定量限界はクレオソート油では2.5ppm、木材では1.25ppmとなり、規制値であるクレオソート油中での10ppm以下、木材中の3ppm以下より低く、十分に信頼性を有することができる。

今回試買した検体中の各規制物質は、クレオソート油ではBaPが、第四類第三石油類ではBaAが定量限界以下ではあるが検出され、防腐・防虫処理済木材ではいずれの物質も不検出であり、規制値以内であった(図2)。公定法による試料のクリーンアップ方法ではSIMモードにおいても内標準物質付近に夾雑ピークが多数検出されるものがあり、そのクリーンアップ方法を検討しなければならない。

クレオソート油の流通は規制により減少傾向にあると考えられるが、過去の実態調査が少ないことや、インターネット販売において中古枕木が多数販売されていることも考慮すると、今後も引き続き実態調査が必要であると考えられる。

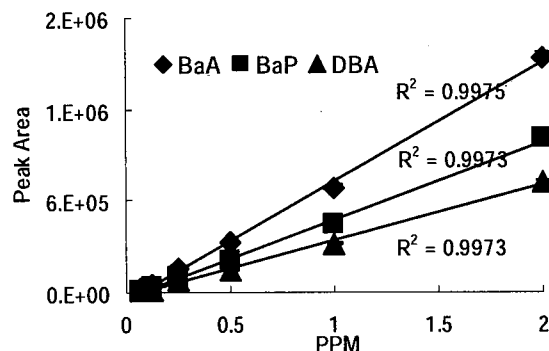


図1. 各規制物質の検量線

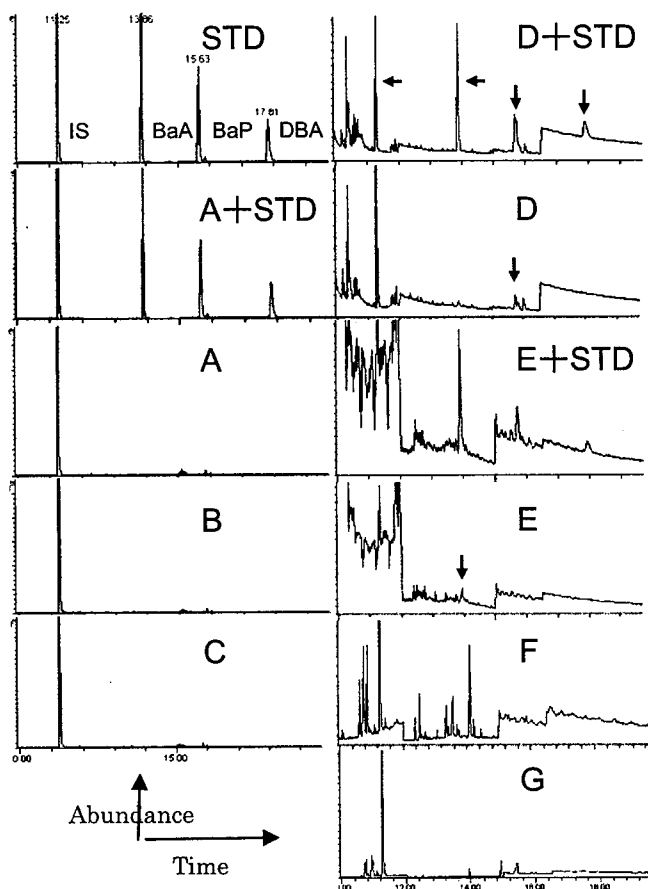


図2. 各試料におけるMS SIMモードによるクロマトグラム

ピーク保持時間 11.25: フェナントレン-d10(IS) 13.86: BaA
 15.63: BaP 17.81: DBA STD: 標準溶液 1ppm A: 杭 B:
 園芸用スタンド C: 板 D: クレオソート油 E: 第四類第三石油類
 F: 合成樹脂 G: 第二石油類

第5章 他誌掲載・論文要旨

Hypercholesterolemia in rats with hepatomas: increased oxysterols accelerate efflux but do not inhibit biosynthesis of cholesterol

Takeshi Hirayama¹, Akira Honda², Yasushi Matsuzaki³, Teruo Miyazaki²,
Tadashi Ikegami³, Mikio Doy², Guorong Xu⁴, Michael Lea⁴, and Gerald Salen⁴

¹Division of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan

²Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki, Japan

³Department of Medicine, Tokyo Medical University, Kasumigaura Hospital, Ami, Ibaraki, Japan ⁴Department of Medicine, University of Medicine and Dentistry of New Jersey-New Jersey Medical School, Newark, NJ, USA

Hepatology 44, 602-611 (2006)

Hypercholesterolemia is one of the important paraneoplastic syndromes in patients with hepatoma(s), but the nature of the defect has not yet been elucidated. We investigated the molecular mechanisms of hypercholesterolemia in a hepatoma-bearing rat model. Buffalo rats were implanted in both flanks with Morris hepatoma 7777 (McA-RH7777) cells. After 4 weeks, the tumor weights were 5.5 ± 1.7 g and serum cholesterol levels increased from 60 ± 2 to 90 ± 2 mg/dl. Protein expression and mRNA levels of the ATP-binding cassette transporter A1 and G1 (ABCA1 and ABCG1) were markedly higher in tumors than in livers. These increases were associated with the activation of liver X receptor α (LXR α) as a result of the increases in tissue oxysterol concentrations. The accumulation of oxysterols in the hepatomas appeared to be caused mainly by the up-regulation of

cholesterol biosynthesis, despite the increased tissue sterol concentrations. Our results showed that over-expression of the sterol regulatory element-binding protein (SREBP) processing system relative to sterol concentrations contributed to the resistance to sterols in this tumor. In addition, bile acid biosynthesis was inhibited despite the reduced expression of the small heterodimer partner (SHP) and activated LXR α , which also appeared to contribute to the accumulation of oxysterols followed by the acceleration of cholesterol efflux. In conclusion, hypercholesterolemia in McA-RH7777 hepatoma-bearing rats was caused by the increased cholesterol efflux from tumors due to the activation of LXR α . Over-expression of the SREBP processing system contributes to the activation of LXR α by maintaining high tissue oxysterol levels.

高コレステロール血症は、肝癌の腫瘍随伴症状としてよく知られているが、そのメカニズムにはまだ不明な点が多かった。そこで我々は、肝癌を移植されたラットモデルを用いて、高コレステロール血症の原因を分子レベルで検討した。その結果、担癌ラットにおける高コレステロール血症は、肝癌細胞からコレステロールの分泌が亢進してい

ることが原因であった。分泌亢進の原因は、核内レセプターLXR α が過剰に蓄積した酸化ステロールによって活性化されているためであり、酸化ステロールの増加は、コレステロール合成系にフィードバック制御がかかっていないため、すなわち転写因子 SREBP が過剰発現しているためと考えられた。

Dehydroepiandrosterone and its derivatives: potentially novel anti-proliferative and chemopreventive agents

Yasushi Matsuzaki¹, and Akira Honda²

¹Department of Medicine, Tokyo Medical University, Kasumigaura Hospital, Ami, Ibaraki, Japan

²Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki, Japan

Curr. Pharm. Des. 12, 3411-3421 (2006)

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is the most abundant adrenal androgenic steroid in young adult humans. The physiological functions of DHEA in preventing human carcinogenesis are still controversial, but a lot of reports have shown that pharmacological doses of DHEA show chemopreventive and anti-proliferative effects on tumors in rodents. Although a therapeutic dose of DHEA has been reported to promote hepatocarcinogenesis in rats due to peroxisomal proliferation, it remains unclear whether DHEA is a peroxisome proliferator in human liver. The chemopreventive and anti-proliferative effects of DHEA are not explained by a single mechanism, and at least four mechanisms seem to contribute to these effects: 1) depletion of NADPH and ribose-5-phosphate due to the inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, 2) suppression of cholesterol biosynthetic pathway by inhibition of HMG-CoA reductase, 3) interference with cell proliferation signaling pathways, and 4)

suppression of nitric oxide generation through down-regulation of nitric oxide synthase II. In addition to studies of the mechanisms underlying the anti-neoplastic effects, searches for more potent and less androgenic DHEA derivatives are ongoing. A small amount of DHEA is endogenously metabolized to 7-oxygenated DHEA, and this may represent a metabolic pathway to more potent steroid hormones. Androsterone, epiandrosterone and etiocholanolone have been considered to be merely inactive end products of DHEA, but may in fact be physiological effectors in their own right. In addition, DHEA analogs such as 3 β -methyl-5-androsten-17-one, 16 α -fluoro-5-androsten-17-one and 16 α -fluoro-5 α -androstan-17-one have been synthesized and shown to be more effective inhibitors of tumor growth, compared with DHEA itself. However, to design potent and safe DHEA derivatives, identification of the DHEA receptor and clarification of the mechanisms of DHEA action are required.

デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)は副腎で作られるホルモンであり, 加齢と共に血中濃度が減少する。また, 長寿の人ではこのホルモンの血中濃度が高いことが知られている。抗腫瘍作用は様々な DHEA の作用のうちの1つであるが, メカニズムについてはまだ不明な点が多い。我々は実験的検討と文献的考察により, 1) glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性の抑制による NADPH とリボース-5-リン酸の欠乏, 2)

HMG-CoA reductase 活性の抑制によるコレステロール合成の抑制, 3) MAP kinase などの細胞増殖シグナル経路の抑制 4) nitric oxide synthase II の抑制による nitric oxide 産生の抑制など多くのメカニズムが働いていることを明らかにした。また, DHEA そのものだけでなく, DHEA の代謝物, または誘導体などにも抗腫瘍作用を有するものがあることが明らかになり, 今後は DHEA よりも活性が強い誘導体の開発が期待される。

胃炎・胃癌の実験モデル②

白井 睦¹, 松井 裕史²

(¹茨城県衛生研究所遺伝子科学部, ²筑波大学大学院人間総合科学研究科)

G. I. Research Journal of Gastrointestinal Research Vol. 14, No. 2 (2006)

先の胃炎・胃癌モデル①では、胃炎と胃粘膜傷害の研究モデルについて紹介した。それに続く一連の研究は、実験的な胃癌発症の研究である。実験的な胃癌の発症に関する動物実験は、発癌剤を主とする科学物質の投与による研究が、以前から広く行われてきた。しかし、近年になって Warren、Marshall 両博士による *Helicobacter pylori* (以下ピロリ菌) の感染が胃癌発症の一因であること

が示され、それ以来この方向の研究もすすめられている。胃癌の発症には、発癌剤やピロリ菌の他にも多くの要因の関与が考えられており、しかも長期にわたる試験が必要である。胃癌発症の病態生理の解明をすすめていく上で動物実験は不可欠である。

今回は、実験動物を用いて、実験的に胃癌を誘発させる胃癌モデルをまとめて紹介する。

紫甘藷抽出アントシアニンによる細胞増殖影響

白井 睦¹, 宮崎浩子², 田中正男², 松井裕史³

(¹茨城県衛生研究所遺伝子科学部, ²千葉県産業技術支援研究所食品科学部, ³筑波大学大学院人間総合科学研究科)

Journal of Japan Health Medicine Association Vol.14(1) (2006)

抗酸化作用の効果があるといわれているポリフェノール的一种であるアントシアニン(紫甘藷より抽出)を哺乳類の初代培養細胞に添加して培養した結果、細胞毒性はなく細胞増殖促進効果が明らかとなった。アントシアニン添加培地で培養

した細胞と、正常培養した細胞においてミトコンドリアの膜電位、アポトーシスについて調査した。その結果、アントシアニン添加培地で培養した細胞は、正常培養した細胞よりもミトコンドリアの膜電位が高く、増殖速度が速いことがわかった。

バイオケミカルエンジニアリングの基礎から有用物質生産・ 環境調和技術まで

白井 睦（茨城県衛生研究所遺伝子科学部）

バイオプロセスハンドブック 第6章動物工学の基礎 p.211-223 株式会社エヌ・ティー・エス,2006

これまでの化石資源に依存した生産プロセスは、プロセス自体や製品の環境負荷が大きいことや資源の枯渇等が問題となっている。これを克服するために、生産プロセスに生物機能を活用するバイオプロセスが試みられている。近年のゲノム解析の進展により、生産目的にあわせた生物を設

計し、物質生産を効率的に行うことが可能となりつつある。本書では、各生物種ごとのバイオケミカルエンジニアリングの基礎から、有用物質生産技術や環境修復技術などの実用化に向けた分野別事例を詳解する。

Robertsonian translocations in the wild population of Japanese Sika deer (*Cervus nippon*)

Shirai, M.¹ and S. Muramatsu²

(¹ Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, ² Japan Animal Technology Association, Tokyo, Japan)

Chromosome Science(9:89-93,2006)

Short title: Robertsonian translocations in the wild Japanese Sika deer population

The cytogenetic features of 177 wild-caught Japanese Sika deer, *Cervus nippon*, were studied in four subspecies collected from Hokkaido (*C. n. yesoensis*, 27 specimens), Honshu (*C. n. centralis*, 126), Kyushu (*C. n. nippon*, 5) and Tsushima Island (*C. n. pulchellus*, 19). The normal karyotype of

Japanese Sika deer consisted of 68 chromosomes ($2n = 68$; 1 pair of medium sized metacentrics, 32 pairs of acrocentrics, and a sex chromosome pair of XX or XY). The majority of these samples exhibited normal karyotypes. However, two types of Robertsonian translocations (LM-1 and LM-2) were observed in a few animals collected from Honshu (5/126, 4.0%) and Tsushima Island (4/19, 21.1%).

Highly sensitive quantification of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in human serum by LC-ESI-MS/MS

Akira Honda¹, Kouwa Yamashita², Mitsuteru Numazawa², Tadashi Ikegami³,
Mikio Doy¹, Yasushi Matsuzaki³, and Hiroshi Miyazaki⁴

¹Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki, Japan

²Department of Pharmaceutical Science, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Miyagi, Japan

³Department of Medicine, Tokyo Medical University, Kasumigaura Hospital, Ami, Ibaraki, Japan

⁴Pharmax Institute, Kawasaki, Kanagawa, Japan

J. Lipid Res. 48, 458-464 (2007)

We describe a highly sensitive and specific method for the quantification of serum 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4), which has been used as a biomarker for bile acid biosynthesis. This method is based upon a stable isotope-dilution technique by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). C4 was extracted from human serum (2–50 μ l) by a salting-out procedure, derivatized into the picolinoyl ester (C4-7 α -picolinate), and then purified using a disposable C₁₈ cartridge. The resulting picolinoyl ester derivative of C4 was quantified by LC-MS/MS using the electrospray ionization (ESI) mode. The detection limit of the C4 picolinoyl ester was found to be 100 fg (S/N = 10), which was approximately 1,000 times more sensitive than the detection limit of

C4 with a conventional HPLC-UV method. The relative standard deviations between sample preparations and between measurements by the present method were calculated to be 5.7% and 3.9%, respectively, by one-way layout analysis. The recovery experiments were performed using serum spiked with 20.0 – 60.0 ng/ml of C4 and were validated by polynomial equation. The results showed that the estimated concentration with 95% confidence limit was 23.1 ± 2.8 ng/ml that coincided completely with the observed $\bar{X}_0 = 23.3 \pm 0.1$ ng/ml with a mean recovery of 93.4%. The present method provides highly reliable and reproducible results for the quantification of C4, especially in small volumes of blood samples.

肝臓におけるコレステロール分解（胆汁酸合成）の律速酵素である CYP7A1 の活性を血液でモニターする手段として、血液中 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4)を定量する方法がある。従来の HPLC による方法は感度が悪く 1

回 1 ml の血清を必要とするため、通常の臨床検査には向かなかった。我々が開発した LC-MS/MS による方法は、わずか 2 μ l の血清で C4 の定量を可能とし、非常に高感度であると共に高精度であった。

Highly sensitive assay of HMG-CoA reductase activity by LC-ESI-MS/MS

Akira Honda¹, Yuji Mizokami², Yasushi Matsuzaki², Tadashi Ikegami²,
Mikio Doy¹, and Hiroshi Miyazaki³

¹Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki, Japan

²Department of Medicine, Tokyo Medical University, Kasumigaura Hospital, Ami, Ibaraki, Japan

³Pharmax Institute, Kawasaki, Kanagawa, Japan

J. Lipid Res. 48, 1212-1220 (2007)

We have developed a new sensitive and specific non-radioisotope assay method to measure the activity of HMG-CoA reductase, the rate-controlling enzyme in the cholesterol biosynthetic pathway. The present method was based upon a stable isotope-dilution technique by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using electrospray ionization in positive mode. Mevalonic acid, the product of HMG-CoA reductase, was converted to mevalonolactone (MVL) in an incubation mixture, extracted by a salting-out procedure, derivatized into the mevalonyl-(2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide, and then purified using a disposable silica cartridge. The resulting mevalonylamide was quantified by selected reaction monitoring using the positive electrospray ionization mode. The detection limit of this mevalonylamide was found to be 240 amol (S/N = 3), which was approximately 833 times more sensitive

than that of MVL measured by a conventional radioisotope (RI) method (200 fmol). The variances between sample preparations and between measurements by the present method were analyzed by one-way layout and calculated to be 3.2% and 1.8%, respectively. The recovery experiments were performed using incubation mixtures spiked with 0.77 – 2.31 nmol/mg protein of MVL and were validated by polynomial equation. The results showed that the estimated concentration within a 95% confidence limit was 0.47 ± 0.07 nmol/mg protein, which coincided completely with the observed $\bar{X}_0 \pm SD = 0.47 \pm 0.01$ nmol/mg protein with a mean recovery of 94.6%. The present method made it possible to measure HMG-CoA reductase activity with a high degree of reproducibility and reliability, and especially with sensitivity superior to the conventional RI method.

肝臓におけるコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA reductase の活性を、従来の放射性同位体を用いず、安定同位体を用いた LC-MS/MS によって測定する方法を開発した。HMG-CoA reductase による生成物 mevalonic acid (MVA)を酸

性条件下で mevalonolactone (MVL)に変換し、さらに mevalonyl-(2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide に誘導体化して分析した。最小検出感度 240 amol (S/N = 3)と非常に高感度で、しかも高精度な、放射性物質を用いない新しい分析方法が開発された。

第6章 研究報告書要旨

茨城県における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究 —首都圏近県地域における薬剤耐性変異株の発生動向—

原 孝¹, 増子京子¹, 大石 毅², 千野根純子³, 片岡俊輔⁴, 山上隆也⁵, 畦上由佳⁶

(¹茨城県衛生研究所, ²東京医科大学霞ヶ浦病院, ³栃木県保健環境センター, ⁴宇都宮市衛生環境試験所, ⁵山梨県衛生公害研究所, ⁶長野県環境保全研究所)

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「薬剤耐性 HIV の発生動向把握のための
検査方法・調査体制確立に関する研究」(主任研究者 杉浦 亙 国立感染症研究所エイズ
研究センター第二研究グループ長) 平成 18 年度総括・分担研究報告書 128-131

茨城県, 栃木県, 宇都宮市, 山梨県及び長野県にわたる薬剤耐性 HIV-1 の調査体制を構築した。これら首都圏近県地域における HIV/AIDS の累計報告数は全国の 11.6% (1,397 人) を占め, 東京都に次いで多い。

今回, 5 県市の地方衛生研究所及びエイズ拠点病院から得られた 2003 年から 2006 年までの未治療例の 37 検体について耐性変異の検出を試みたところ, 薬剤耐性に関係する変異は認められなかった。しかし, 同時期の保健所における HIV 感染者等の捕捉率は 11.7% (36/308 人) にすぎないため, 今回の調査結果からだけでは, 当地域に薬剤耐性 HIV-1 が浸淫している可能性を否定することはできないと思われる。薬剤耐性 HIV は, 全国的には未治療者から約 5% の頻度で検出されており, 今後とも継続的に監視することが必要である。

B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染症に用いられる抗ウイルス薬は HIV 感染症の治療にも使用されているため, HBV の重複感染は HIV 感染症の治療に大きな影響を及ぼすことがある。そのため, HBV の重複感染の状況についても併せて調査した。その結果, 対象者の 14.8% (4/27 人) に HBs 抗原が検出され, 比較的高い割合で重複感染のあることが判明した。感染 HBV のジェノタイプとして, これまで我が国ではみられなかった Ae 型 (欧米型) や Aa 型 (アジア・アフリカ型) が検出された。ジェノタイプ Ae は, 最近, 首都圏や大都市圏で報告が増えており注目されている。HBV/Ae が首都圏近県でも検出されたということは, 同じく首都圏等に局限していた薬剤耐性 HIV が首都圏近県地域へ拡散している可能性のあることを示唆するものであると考えられる。

茨城県衛生研究所年報 第45号

平成19年12月28日発行

編集兼発行 茨城県衛生研究所

水戸市笠原町993-2

電話 029-241-6652

印刷 株式会社高野高速印刷

水戸市平須町1822-122

電話 029-305-5588
