

	平成14年	輸入 国内 輸入	10 22 17	83 83 83	830 1826 1411	7470
愛知県衛生研究所	平成13年	国内 輸入	118 63	90 90	10620 5670	
	平成14年	国内 輸入	128 75	160 160	20480 12000	
	平成15年	国内 輸入	137 92	180 180	24660 16560	89990
			検体総数	2012	検査総 数	28502 9

検出農薬総数

国産	796件		
輸入	683件	合計	1479件
			(検出率 0.5 2%)

今回集計したデータベースの特徴は、検体総数こそ約2000検体と国が集計している食品中残留農薬検査結果の約1万余件と比較して少ないものの、検体あたりの農薬検査項目は全国集計の平均約40種類と比較し78～242項目とはるかに多いものである。また、総分析件数約28万件は国の約40万件と比べても遜色なく、むしろ検体あたりの分析項目が多いことから、農作物中の実際の残留農薬実態を把握するには充分かつ信頼性のより高いデータベースが作成できたものと考えられる。

総分析件数に対する農薬検出率は0.52%で、国の検出比率0.7%と類似した値であった。一方、検体あたりの農薬検出率は全体では38.9%、国内産では41.4%、輸入品では36.2%であった。輸入柑橘類によく使用される防カビ剤のように収穫後に使用されるポストハーベスト農薬は残留農薬検査において検出される可能性が必然的に高いことから、輸入品から検出された農薬の約30%がポストハーベスト農薬によって占められていた。

検出された農薬のうち、検出頻度（回数）の高い農薬を下表に示した。

	合計	国産	輸入
1 イマザリル	90		90
2 クロルピリホス	80	15	65
3 イプロジオン	77	45	32
4 シペルメトリン	77	44	33
5 プロシモン	63	58	5
6 アセフェート	57	52	5
7 クロルフェナピル	51	49	2
8 メタミドホス	49	27	22
9 キャブタン	43	34	9
10 カルバリル	38	27	11
11 メチダチオン	36	24	12
12 フェンバレレート	34	23	11
13 クロロタロニル	28	25	3

14	アセタミプリド	27	27	
15	アゾキシストロピン	26	13	13
16	エチオン	25	4	21
17	フェンプロパトリン	25	18	7
18	フェニトロチオン	23	18	5
19	2,4-D	22		22
20	ペルメトリン	22	15	7
21	ジコホール	21	9	12
22	オキサジキシル	17	15	2
23	トリアジメノール	16	2	14
24	オメトエート	15		15
25	ジメトエート	15	1	14
26	エトフェンプロックス	14	14	
27	プロモプロピレート	14	11	3
28	ダイアジノン	13	6	7
29	トリフルミゾール	12	7	5
30	ピテルタノール	12	4	8
31	ピリダベン	11	11	
32	プロパルギド	11	10	1
33	マラチオン	11	5	6
34	クレソキシムメチル	10	9	1
35	クロルピリホスメチル	10	1	9
36	エンドスルファン	9	3	6
37	ブプロフェジン	9	9	
38	プロチオホス	9	7	2
39	メソミル	9	5	4
40	EPN	8	6	2
41	ジクロルボス	8	6	2
42	マイクロブタニル	8	3	5
43	エンドスルファンサルフェート	7	2	5
44	トリアジメホン	7	2	5
45	ビフェントリン	7	6	1
46	フルジオキソニル	8	7	1
47	臭素	7	2	5
48	イソキサチオン	6	6	
49	キノメチオネート	6	6	
50	ジエトフェンカルブ	6	6	
51	総DDT	6		6
52	アクリナトリン	5	5	
53	シアノホス	5	5	
54	ジフェノコナゾール	5	3	2
55	シフルトリン	5	3	2
56	フルバリネート	5	4	1
57	クロルフェンピンホス	4	1	3

58	シハロトリン	4	1	3
59	ディルドリン	4	1	3
60	テブフェンピラド	4	4	
61	トラロメトリン	4	4	
62	トリアゾホス	4		4
63	フェナリモル	4	2	2
64	フェントエート	4	4	
65	ペンディメタリン	4	4	
66	総BHC	4		4
67	キナルホス	3	2	1
68	クロルプロファミ	3		3
69	シラフルオフエン	3	3	
70	テトラジホン	3	3	
71	トリフルラリン	3	2	1
72	トルクロホスメチル	3	3	
73	ヘキサコナゾール	3	3	
74	ホスチアゼート	3	3	
75	メタラキシル	3	3	
76	ジクロフルアニド	2	2	
77	シプロジニル	2	1	1
78	シマジン	2		2
79	デルタメトリン	2		2
80	トリクロルホン	2		2
81	ピリダフェンチオン	2	2	
82	ピリプロキシフェン	2	2	
83	ピリミホスメチル	2	2	
84	ピンクロゾリン	2	2	
85	ファモキサドン	2	2	
86	フルトラニル	2	2	
87	プロベナゾール	2	2	
88	メパニピリム	2	2	
89	モノクロトホス	2		2
90	フォルペット	2	2	
91	エトキサゾール	1	1	
92	エンドリン	1		1
93	ジクロフェンチオン	1	1	
94	ジスルホトン	1	1	
95	スルプロホス	1	1	
96	テブフェノジド	1		1
97	パクロブトラゾール	1	1	
98	パラチオン	1		1
99	ハルフェンプロックス	1	1	
100	ピペロニルプトキサイド	1		1
101	ピラドホス	1	1	

102	フェノキシカルブ	1		1
103	フォスチアゼート	1	1	
104	フルシラゾール	1		1
105	プロクロラズ	1		1
106	プロパモカルブ	1		1
107	プロフェノホス	1		1
108	プロポクスル	1	1	
109	ホレート	1		1
110	メプロニル	1	1	
111	カルボフラン	1	1	
112	ヘプタクロルエポキシド	1	1	
113	ホサロン	1	1	
114	イプロフェンホス	1		1
115	アジンホスメチル	1		1
*	チアベンダゾール	89		89
*	オルトフェニルフェノール	28		28

検出された農薬は115種類で、そのうち検出頻度の最も高かったのは先に述べたように、輸入食品中から検出された防カビ剤のイマザリルであった。また、日本では農薬としてではなく食品添加物として取り扱われていることから上の表では末尾に示したが、柑橘類の洗浄、ワックス工程でイマザリルと同時に使用されることの

多い同じく防カビ剤であるチアベンダゾールやオルトフェニルフェノールも高頻度に検出されていた。

次いで、殺虫剤のクロルピリホス、シペルメトリン、殺菌剤のイプロジオン、プロシミドンなどの検出頻度が高かった。

検出頻度の高い農薬の検体に対する検出率、最大値、中央値、平均値を下表に示した。

	検出	国内			輸入			
		率(%)	最大値	中央値	平均値	最大値	中央値	平均値
1	イマザリル	6.8				3.3	0.6	0.78
2	クロルピリホス	4.2	0.1	0.03	0.04	0.19	0.04	0.05
3	イプロジオン	4.1	21	0.05	0.66	1.4	0.11	0.29
4	シペルメトリン	4.1	1	0.05	0.18	1.93	0.06	0.13
5	プロシミドン	3.5	0.6	0.05	0.08	0.4	0.15	0.18
6	アセフェート	3.0	23	0.05	63	0.31	0.06	0.13
7	クロルフェナピル	3.9	0.35	0.02	0.06	0.05		0.04
8	メタミドホス	2.6	7.2	0.03	0.34	1.2	0.1	0.3
9	キャプタン	2.3	0.66	0.04	0.09	1.2	0.11	0.25
10	カルバリル	2.0	0.6	0.07	0.12	2.1	0.17	0.37

11	メチダチオン	2.0	3.1	0.12	0.33	0.75	0.04	0.16
12	フェンバレート	1.8	0.74	0.04	0.11	0.11	0.03	0.04
13	クロロタロニル	1.9	5.9	0.03	0.39	0.26		0.13
14	アセタミプリド	2.8	1.6	0.04	0.21			
15	アゾキシストロビン	2.7	0.29	0.04	0.09	2.4	0.04	0.23
16	エチオン	1.4	0.04	0.02	0.02	0.21	0.01	0.08
17	フェンプロパトリン	2.6	3.5	0.15	0.5	0.05	0.03	0.03
18	フェニトロチオン	1.2	7.3	0.07	0.66			
19	ペルメトリン	2.3	2.1	0.03	0.2	0.08	0.02	0.03
20	ジコホール	1.1	0.47	0.08	0.16	0.29	0.07	0.07
21	オキサジキシル	1.8	0.66	0.02	0.09			
22	トリアジメノール	1.1	0.1		0.06	0.09	0.02	0.03
23	オメトエート	1.1				0.56	0.06	0.11
24	ジメトエート	0.8				0.76	0.07	0.13
25	エトフェンプロックス	1.5	17	0.06	1.36			
26	プロモプロピレート	1.1	0.15	0.04	0.05	0.49	0.15	0.23
27	ダイアジノン	0.7	0.03	0.02	0.02	0.2	0.02	0.06
*	2,4-D	27				0.84	0.1	0.2

(単位: ppm)

コマツナ、シソ、パセリ等でイプロジオンやアセフェート等の高濃度の残留も見られたが、これらの葉菜類・ツまものは、重量に対して表面積が多きく且つその成長拡大が遅いため、散布された農薬が高濃度で残留しやすいことが原因と思われた。また、表末尾の2,4-Dについては、使用実績のあるレモン等柑橘類を対象に検査を実施していることから、結果として高頻度に検出されたものと考えられる。しかしながら全体としての検出率は低く、また、各種食品に残留する農薬の濃度も中央値と比較すると低いものが多かった。

農薬の種類により、明らかに国産または輸入品で検出が高いものや、両方からほぼ同数検出されるものがあることが判明するなど、国内外における農薬散布状況を示す貴重な情報も得られ、このような農薬検出の傾向を把握しておくことは非常に重要であると思われる。

検出される115農薬のうち、これら5機関における年間検出件数が10件以上のものが35種類であったが、1件または2件のみ検出された農薬も41種類あった。したがって、ここに掲げた100種

前後の農薬を一斉分析の対象項目として設定することにより、通常のルーチン分析が有効かつ効率的に実施可能であることが判明した。

検出農薬と食品群との関係では、オレンジ、グレープフルーツ、レモンなどの柑橘類では、イマザリル、クロルピリホス、エチオン、メチダチオンの他、2,4-D、それに、国内では食品添加物として取り扱われる防カビ剤チアベンダゾール、オルトフェニルフェノールの検出頻度が高かった。検出事例の多かった野菜果実として、リンゴからはカルバリル15回、キャプタン12回、プルパルギト8回、フェンパスリン6回等が、梨からはキャプタン8回、シペルメトリン6回、カルバリル及びプロモプロピレートの各4回等が高頻度に検出された。また、ほうれん草からはシペルメトリン13回、メタミドホス3回、アセフェート2回等、ピーマンからはプロシミドン8回、クロルフェナピル5回、キャベツからはアセフェート7回、メタミドホス3回、それに、キュウリからはプロシミドン17回、クロルフェナピル10回、アセタミプリド4回等が高頻度に検出された。

主な作物からの検出農薬とその検出回数を下表に示す。

作物名	検出された農薬				
オレンジ	イマザリル33	チアベンダゾール25	クロルピリホス17	2,4-D 3	オルトフェニルフェノール3
グレープフルーツ	チアベンダゾール40	イマザリル28	エチオン18	オルトフェニルフェノール13	メチダチオン5
マンゴ	アゾキシストロビン8	クロルピリホス7	シハルメトリン3		
梨	キャプタン8	シペルメトリン6	カルバリル4	プロモブピレート4	
リンゴ	カルバリル15	キャプタン12	プロパルギト8	フェンハスリン6	クロルピリホス5
ミカン	メチダチオン7	ピリダベン6	クロルフェナール5	アセフェート4	クロルピリホス3
キャベツ	アセフェート7	メタミドホス3	トリアジメノール2	クロルフェナール2	エトフェンプロックス2
キュウリ	プロシミドン17	クロルフェナール10	アセクミプリト4		
チンゲンサイ	シハルメトリン8	クロルフェナール4			
なす	プロシミドン6	クロルフェナール4	クロロピリホス4		
トマト	アセフェート4	クロロピリホス4	プロシミドン4		
ネギ	シハルメトリン5	イプロジオン2	トリアジメノール2		
白菜	フェンハスリン6	クロルフェナール2	アセフェート2		
ピーマン	プロシミドン8	クロルフェナール5	キャプタン2	クロロピリホス2	トイフルミゾール2
ほうれん草	シハルメトリン13	メタミドホス3	アセフェート2	エトフェンプロックス2	クロルピリホス2
レタス	フェンハスリン8	プロシミドン4	アセフェート4		
未成熟インゲン	メタミドホス9	フェンハスリン5	ジメトート4	ジコホール4	
未成熟エンドウ	トリアジメノール5	メタミドホス3	ジメトート2		

(防カビ剤チアベンダゾール、オルトフェニルフェノールは国内では農薬としてではなく食品添加物として規制されている)

今回集計して得られた残留農薬のデータは、地研5機関の最近（平成12年～14年）の残留農薬分析データを本研究で作成した様式に従いデータベースソフト「アクセス」に入力してデータベースを作成した後、農薬の検出状況、頻度、食品と農薬の関連等を集計解析して得られたものである。

ここで得られた残留農薬のデータの概要は、地研ホームページの健康危機管理情報の欄に掲載し、健康危機事例発生時のリファレンスデータの第一歩として有効活用可能なシステムを形成するだけでなく、将来的な残留農薬ポジティブリスト化に向け大きく変化する食品中残留農薬規制に迅速に対応する情報としても有効活用可能なシステムの第一歩が構築されたものと考えられる。

D. 健康危険情報:該当事項なし

E. 研究発表:

- 1) 論文発表:該当事項なし
- 2) 学会発表:該当事項なし

F. 所有権の出願・登録状況:

該当事項なし

平成15年度 厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)
地方衛生研究所の地域における健康危機管理の在り方に関する研究報告書
分担研究「健康危機管理のための試験検査技術の充実・普及に関する研究」
分担研究者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所 所長

研究報告「情報システム上での遠隔研修の検討」

研究協力者 丹野瑗喜子 埼玉県衛生研究所 所長
山本徳栄 同・臨床微生物担当 専門研究員

研究要旨: 地方衛生研究所(以下、地研)においては、原虫類の検査依頼が極めて少ない現状を反映して、原虫類の検査方法を熟知している職員は少ないのが現状であるが、突発的に原虫感染症の集団発生が起こるなどの健康危機が発生することは予想される。そこで、糞便検体や水試料から迅速かつ正確に検査できるように、ビジュアルで詳細なフローチャートとカラーアトラスを作成し、それを地方衛生研究所全国協議会のホームページ(<http://www.chieiken.gr.jp/>)に検査手引書の形で掲載することによって、「情報システム上での遠隔研修」が可能と考え、これまで作成作業を進めてきた。このサイトは50枚のファイルで構成され、試薬、器材および検査工程の写真を178枚、原虫類の写真を158枚用いて、利用者の利便性を重視して作成した。

また、クリプトスポリジウムについては分子生物学的解析を行い、感染ルートの解明など疫学調査に利用できる基礎的データを集積した。まず、ヒトの糞便から検出した5検体、ネコ由来14検体、イヌ由来1検体、クマネズミ由来1検体について、18 SrRNAをコードする遺伝子をターゲットとするPCR産物に関して、その塩基配列をダイレクトシーケンス法で解析した。さらに、これらの相同性の解析、系統樹の作成、そして種名まで明らかにした。次に、PCR-RFLP法については最も有効なプライマーと制限酵素に関する検討を行い、それらを明らかにした。

さらに、このようなサイトを参考とした検査の迅速化、正確性の向上、それに、地研相互間の連絡、協力を強固にした検査体制・検査内容の正確化にも限界があると考えられることから、不明な点がある場合には、大学の研究者及び臨床家を含めた専門家に意見を求められるように、ネットワークを構築した。原虫検査・疾患等に関して造詣の深い先生に同意を頂き、非常時に適切なアドバイスを頂ける研究者として、このサイトの中に氏名や連絡先のリストを掲載した。このリストの閲覧にはパスワードを要求し、原則的に地研の職員以外の利用は出来ないように配慮した。

このサイトは、一時的に仮のアップロードを行い、関係者に意見を求めた。その結果寄せられた意見や指摘事項に対して改善を図り、平成16年3月上旬には正式に公開することができた。

A. 研究目的

地方衛生研究所において、原虫症が疑われる場合に糞便及び水試料を検体として迅速かつ正確に検査を実施できることを目的として、検査手引書の形で多数の写真に掲載したビジュアルなフローチャートと原虫類のカラーアトラスを添付する事によって、理解を深める工夫をする。クリプトスポリジウムについては、ヒトや動物由来のオーシストについて分子生物学的解析を行い、感染ルートを解明するための基礎的データを蓄積する。これらの情報は、遠隔地でも迅速に検査方法とポイントを知ることができるように、地研のホームページに掲載する。また、研究者のみでなく臨床家を含めた専門家の意見を求められるように、ネットワークを構築する。

B. 研究方法

1. 検査装置、器材、試薬類及び原虫類の撮影

使用する器材や検査工程及び原虫類(クリプトスポリジウム、ジアルジア、赤痢アメーバ、サイクロスポーラ他)の写真撮影する。多数の写真を掲載することによって、理解を容易にする。

2. クリプトスポリジウムのPCR-RFLPパターンの集積と塩基配列の解析

ヒト由来以外に、イヌやネコ等に由来するクリプトスポリジウムのPCR-RFLPパターンを集積する。また、特定部位の塩基配列を調べ、患者発生時に、それらのデータをメールで送信し比較することにより、その結果から疫学的解析を行な

ることを可能とする。

3. 研修システムの構築

原虫類の検査法を多角的に解説したサイトを作成し、検査手引書の形でそれをホームページに掲載する。糞便検査では薄層直接塗抹法、ホルマリン・酢酸エチル法、コーン染色法、シヨ糖遠心浮遊法(シヨ糖浮遊法)、抗酸染色、シヨ糖法・抗酸染色複合法、蛍光抗体法、PCR法、PCR-RFLP、フローチャート、行政対応等について解説する。また、水試料では採取法、濾過法、濃縮法、蛍光抗体法、DAPI染色法、フローチャート、行政対応等に関して解説する。平常時の研修用として、また事件発生時においても、ユーザーは地研のホームページから情報を入力し、疑問点はメールや電話で専門家に相談できるネットワークを構築する。

C & D. 研究結果及び考察

1. 原虫類の写真撮影と画像の加工

各種原虫類について、生鮮、固定標本、染色標本などの写真を、新たにデジタルカメラで撮影した。また、既に有するスライドや写真は、デジタル化するためにスキャナーを用いてパソコンに取り込み、解像度を下げるなど加工した。多数の写真の中から特徴的なものを選択し、クリプトスポリジウムは32枚、赤痢アメーバは39枚、ジアルジアは33枚、その他の原虫類は54枚を掲載した。

2. 試薬、器材、検査工程の撮影と画像の加工

原虫類の各種染色キットなど市販の製品を撮影し、その構成や検査方法、特徴

などをまとめた。また、器材や検査工程の写真も撮影し、解像度を下げるなど加工した。

3. ホームページビルダーV7.0によるサイトの作成

原虫類は13種類について解説を載せ、そのうち10種類については複数の写真を掲載した。カラーアトラスはサムネールまたはポップアップにして、拡大できるようにした。また、それぞれの検査方法

は相互にリンクを張るなどの工夫を施した。このサイトはファイル数50枚、原虫類の写真は158枚、試薬、器材、検査工程を撮影した写真は178枚によって構成されている。

トップページは図1のように左側に原虫類の名前と検査方法があり、これをクリックすることにより、次のファイルに進むことができる。

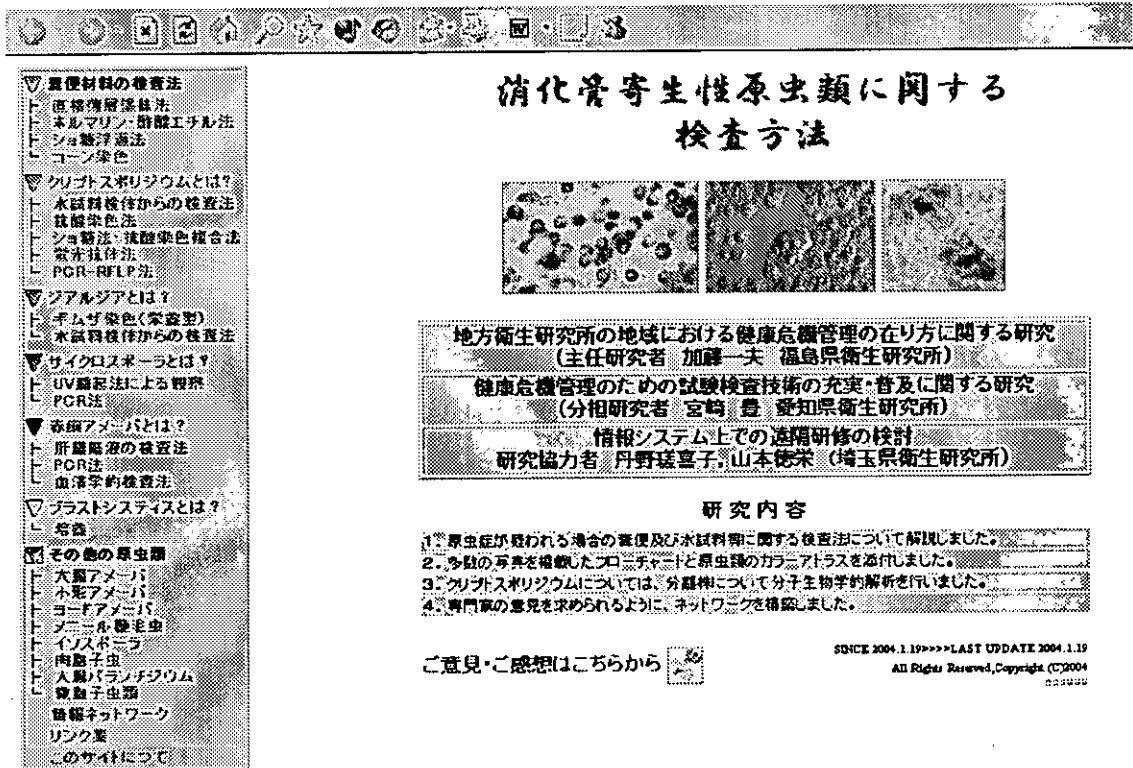


図1 本サイトのトップページ

4. 地方衛生研究所全国協議会保健情報疫学部会の承認

地方衛生研究所のホームページに本コンテンツを掲載するために、仮のアップロードを実施するとともに、地方衛生研究所全国協議会保健情報疫学部会に申請

書を提出し、承認を得た。

5. クリプトスポリジウムのPCR-RFLPパターン集積と塩基配列の解析

1) PCR-RFLP法

本研究に用いたクリプトスポリジウムのオーシストは、埼玉県越生町の集団感染

におけるヒト由来、大阪市立大学(現・金沢大学)井関基弘先生および琉球大学付属病院検査部 中村 広先生に分与を受けたヒト由来、東京女子医科大学 国際環境・熱帯医学教室 山浦 常先生に分与を受けたヒト由来およびクマネズミ由来、さらに埼玉県動物指導センターから糞便の提供を受けたイヌおよびネコ由来であり、合計 21 検体である。

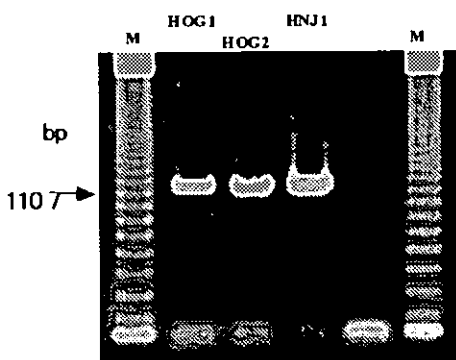


図2 TRAP-CをターゲットとするプライマーCpE, CpZ (Spano *et al.*, 1998)で増幅した。M: マーカー、*C. parvum*: HOG1, HOG2, HN1。

しかし、イヌ(DSA1)、ネコ(FSA1, FSA2)および一人のAIDS患者(HNK1)由来のオーシストでは、このプライマーCpE, CpZ、およびCOWP: *Cryptosporidium* oocyst wall proteinをターゲットとするプライマーcry15, cry9 (Spano *et al.*, 1997)では増幅することができなかった。そこで、これらのオーシストをSSU rRNA: small subunit ribosomal RNAをコードする遺伝子をターゲットとするプライマーF1, R1, F2, R2 (Xiao *et al.*, 1999)で増幅させ、制限酵素Dde I (Invitrogen社)、Ssp I (GIBCOBRL社)およびRsa Iで消化し比較した。その結果、Dde Iで消

PCR-RFLP法によって、ヒト由来の *C. parvum* のオーシストはTRAP-C1: thrombospondin-related adhesive protein of *C. parvum*をターゲットとするプライマーCpE, CpZ (Spano *et al.*, 1998)で増幅した産物を制限酵素Rsa I (Roche社)で消化することにより、ヒト型(以下、検体記号:HOG1, HOG2)とウシ型(HNJ1)に分類することができた(図2, 3)。

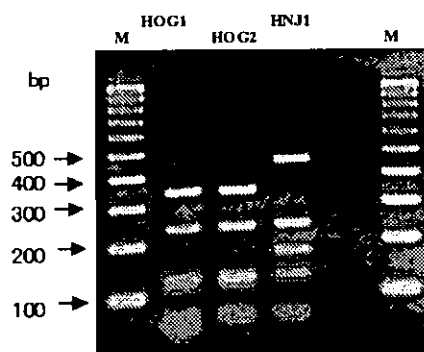


図3 TRAP-CをターゲットとするプライマーCpE, CpZ (Spano *et al.*, 1998)で増幅し、制限酵素Rsa Iで消化した。M: マーカー、*C. parvum*: HOG1, HOG2, HN1。

化すると、ヒト由来の *C. parvum* をヒト型とウシ型に分けることはできなかったが、それらのオーシストとイヌ、ネコおよび一人のAIDS患者(HNK1)由来のオーシストを明瞭に区別することができた(図4)。

一方、Ssp IおよびRsa Iで消化した場合には、それらを明瞭に区別することは出来なかった(図5, 6)。これらの結果から、PCR-RFLP法によって疫学的調査を行う場合、複数のプライマーと制限酵素を組み合わせることが重要であることが明らかになった。

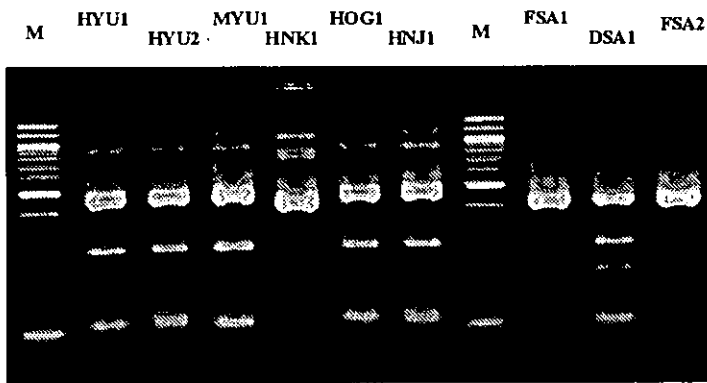


図4 SSUrRNAをコードする遺伝子をターゲットとするプライマーF1, R1, F2, R2 (Xiao *et al.*, 1999)で増幅し、制限酵素 *Dde I* で消化した。 *C. parvum* : HYU1, HYU2, MYU1, HOG1, HNK1, *C. felis* : FSA1, FSA2、 *C. canis* : DSA1、 M : マーカー

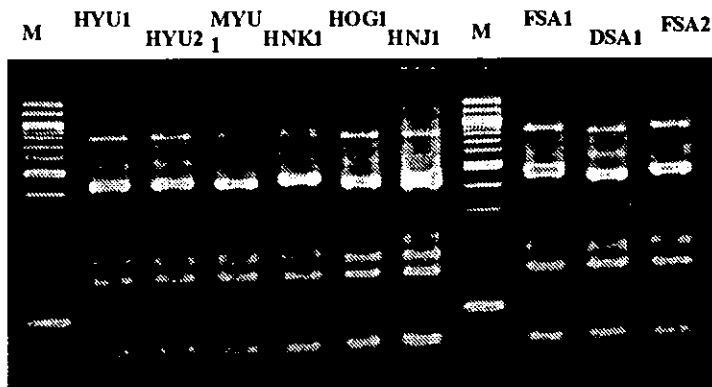


図5 SSUrRNAをコードする遺伝子をターゲットとするプライマーF1, R1, F2, R2 (Xiao *et al.*, 1999)で増幅し、制限酵素 *Ssp I* で消化した。 *C. parvum* : HYU1, HYU2, MYU1, HOG1, HNK1, *C. felis* : FSA1, FSA2、 *C. canis* : DSA1、 M : マーカー

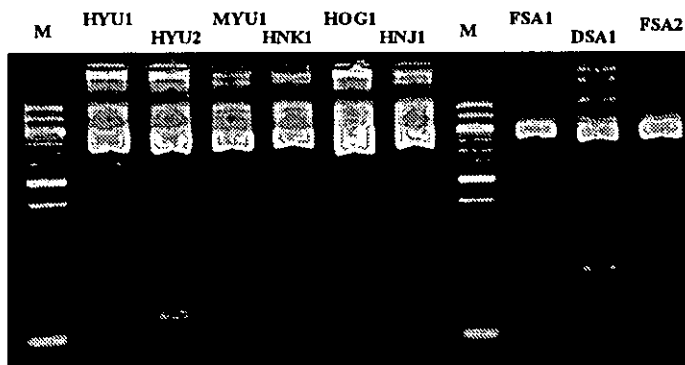


図6 SSUrRNAをコードする遺伝子をターゲットとするプライマーF1, R1, F2, R2 (Xiao *et al.*, 1999)で増幅し、制限酵素 *Rsa I* で消化した。 *C. parvum* : HYU1, HYU2, MYU1, HOG1, HNK1, *C. felis* : FSA1, FSA2、 *C. canis* : DSA1、 M : マーカー

2) DNA塩基配列の解析

全オーシスト21検体について、18SrRNA:18S ribosomal RNAをコードする遺伝子をターゲットとするプライマー18SiF、18SiR (Morgan *et al.*, 1997) を用い、約300bp のPCR産物について、ダイレクトシーケンス法を行ってDNA塩基配列を解析した。まず、USB社製 PCR Product Pre-Sequencing Kit による未反応プラ

イマーおよび未反応dNTPの除去を行い、それをABI社製Big Dye Terminator v3.1 によって、サイクルシーケンシングを行った。

3) 相同性の解析

これまでに集積した21検体のDNA塩基配列について、データの解析ソフトGENE TYX-WIN Ver. 5(ソフトウェア開発(株))を用いて、相同性を調べた(図7、表1)。

図7 ヒト、イヌ、ネコおよびクマネズミから検出した*Cryptosporidium* spp.の相同性

	HYU1	HYU2	HOG1	HNJI	HNK1	MYU1	DSA1	FSA1	FSA2	FSA3	FSA4	FSA5	FSA6	FSA7	FSA8	FSA9	FSA10	FSA11	FSA12	FSA13	FSA14	
HYU1																						
HYU2	99.6																					
HOG1	99.2	99.6																				
HNJI	96.2	95.8	95.4																			
HNK1	88.1	88.5	88.1	86.5																		
MYU1	95.4	95.8	95.4	98.7	86.5																	
DSA1	92.0	92.4	92.0	94.0	85.7	94.4																
FSA1	85.7	86.1	85.7	84.1	96.0	84.9	83.7															
FSA2	87.7	88.1	87.7	86.1	98.4	86.1	85.3	94.9														
FSA3	85.7	86.1	85.7	83.7	95.3	83.7	82.9	92.5	96.4													
FSA4	86.6	87.0	86.6	84.5	96.5	84.2	83.3	93.3	98.0	97.6												
FSA5	87.7	88.1	87.7	86.5	98.4	86.2	85.3	94.5	99.2	95.7	97.6											
FSA6	87.3	87.7	87.3	85.7	98.0	85.7	84.9	94.1	98.8	95.2	96.8	98.8										
FSA7	88.1	88.5	88.1	86.5	98.8	86.5	85.7	94.9	99.6	96.0	97.6	99.6	99.2									
FSA8	87.4	87.7	87.4	85.8	98.0	85.8	85.0	93.7	98.8	95.3	96.9	98.8	98.4	99.2								
FSA9	86.2	86.6	86.2	84.6	96.9	85.0	83.9	92.9	97.6	94.1	95.7	98.0	97.2	98.0	97.6							
FSA10	87.3	87.6	87.3	86.1	98.0	86.1	84.9	94.0	98.8	95.2	97.2	99.6	98.4	99.2	98.4	98.8						
FSA11	87.7	88.1	87.7	86.2	98.4	86.2	85.3	94.5	99.2	95.7	97.2	99.2	98.8	99.6	99.2	98.4	98.8					
FSA12	87.4	87.7	87.4	86.2	98.0	85.8	85.0	94.1	98.8	95.3	97.2	99.6	98.4	99.2	98.4	97.6	99.2	98.8				
FSA13	87.3	87.6	87.3	83.3	97.6	85.3	85.3	94.4	99.2	96.0	97.6	98.4	98.0	98.8	98.0	96.9	98.0	98.4	98.0			
FSA14	86.5	86.9	86.5	84.9	97.2	85.3	84.1	93.7	98.8	96.8	97.6	98.0	97.6	98.4	97.6	96.5	97.6	98.0	97.6	98.4		

表1 検体記号とオーシストの由来

検体記号	由来	検体記号	由来	検体記号	由来
HYU1	ヒト	FSA1	ネコ	FSA8	ネコ
HYU2	ヒト	FSA2	ネコ	FSA9	ネコ
HOG1	ヒト	FSA3	ネコ	FSA10	ネコ
HNJI	ヒト	FSA4	ネコ	FSA11	ネコ
HNK1	ヒト	FSA5	ネコ	FSA12	ネコ
MYU1	クマネズミ	FSA6	ネコ	FSA13	ネコ
DSA1	イヌ	FSA7	ネコ	FSA14	ネコ

2) DNA塩基配列の解析

全オーシスト21検体について、18SrRNA:18S ribosomal RNAをコードする遺伝子をターゲットとするプライマー18SiF, 18SiR (Morgan *et al.*, 1997) を用い、約300bp のPCR産物について、ダイレクトシーケンス法を行ってDNA塩基配列を解析した。まず、USB社製 PCR Product Pre-Sequencing Kit による未反応プラ

イマーおよび未反応dNTPの除去を行い、それをABI社製Big Dye Terminator v3.1によって、サイクルシーケンシングを行った。

3) 相同性の解析

これまでに集積した21検体のDNA塩基配列について、データの解析ソフトGENE TYX-WIN Ver. 5(ソフトウェア開発(株))を用いて、相同性を調べた(図7、表1)。

4) 系統樹の作成

インターネットのサイト「CLUSTALW: Multiple Sequence Alignment」(<http://clustalw.genome.ad.jp/>) から、「Execute Multiple Alignment」を利用して全塩基配列を縦に並べた一覧を作成し、さらに別の

サイト(<http://www.megasoftware.net/>)から「MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 2」をダウンロードして、系統樹を作成した(図8)。

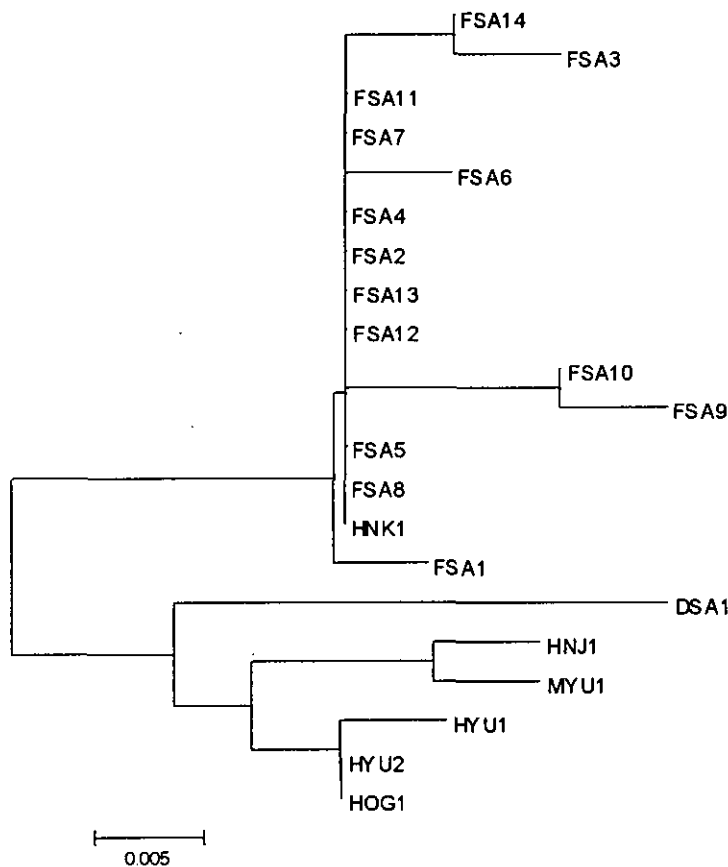


図8 ヒト、イヌ、ネコおよびクマネズミから検出した*Cryptosporidium* spp. の系統樹

5) 種名の検索

塩基配列は DNA のデータベースにメールで送信し、種名を検索した。すなわち、国立遺伝学研究所のホームページ(<http://www.nig.ac.jp/>)の「データベース・サービス」から、「FASTA」<http://www.>

[ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html](http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html) まで進み、「検索配列データ」をアップロードして、データを入手した。さらに、そこに記載されたアクセス番号を、「getentry」(<http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getstart-j.html>)のページにコピーし検索

することにより、詳細な情報を得ることができた。

その結果、ヒト由来の原虫は*C. parvum*が4検体、*C. felis*が1検体であり、イヌ由来の1検体は*C. canis*、ネコ由来の14検体は*C. felis*、クマネズミ由来の1検体は*C. parvum*であることが判明した。

本研究で蓄積した基礎的データと手法は、感染ルートの解明などの疫学調査に活用できると考えられた。

6. 専門家とのネットワークの構築

このサイトを参考とした検査の迅速化、検査体制・検査内容の正確化にも限界があると考えられることから、不明な点がある場合には、専門家に意見を求められるように、ネットワークを構築した。原虫検査・疾患等に関して造詣の深い研究者、臨床家等7名(大学、独立行政法人、公立病院、水道事業体、地研の各職員)の同意を得、非常時に適切なアドバイスをもらえる専門家として、このサイトの中に氏名や連絡先のリストを掲載した。このリストの閲覧にはパスワードを要求し、原則的に地研の職員以外の利用は出来ないように配慮した。

E. 結論

地研における突発的な原虫感染症の集団発生などの健康危機において、糞便検体や水試料から迅速かつ正確に検査ができるように、ビジュアルで詳細なフローチャートとカラーアトラスを作成し、それを地方衛生研究所全国協議会のホームページ(<http://www.chieiken.gr.jp/>)に掲載

し、「情報システム上での遠隔研修」を可能にした。

また、クリプトスポリジウムについては分子生物学的解析を行い、感染ルートの解明など疫学調査に利用できる基礎的データを集積した。

さらに、このサイトを参考にしながら、不明な点がある場合には、専門家に意見を求められるように、ネットワークを構築した。

このサイトは、本研究の目的のために作成した独自のものであり、国立感染症研究所レファレンス委員会および衛生微生物技術協議会レファレンス委員会等が作成した「診断マニュアル」とは、異なる方法も掲載されている。写真を見ながら検査方法とコツをイメージし、業務の参考にして頂けることを期待しつつ作成した。従って、地研の職員だけでなく、病院の検査室、検査センター、医師、看護師、学生などにも、幅広く活用されることが予想される。

このサイトは、平成16年3月上旬に、正式に公開することができた。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

- 1) 山本徳栄、森田久男、広瀬義文、中澤清明、高岡正敏、中川善雄、斉藤正樹、坂本照正、井関基弘:水試料に添加したクリプトスポリジウムのオーシストの回収率についての検討。埼玉県衛生研究所報 No. 35, 70-75, 2001.
- 2) 斉藤利和、小山雅也、山本徳栄:埼玉

県内における犬、猫に関する寄生虫の
保有状況 刳 第2報 刳. 第3回埼玉県健
康福祉研究発表会. 2002. 3. 15.

3) 斉藤利和、板屋民子、山本徳栄、砂押
克彦、高柳 保、山口正則: 埼玉県内
における犬、猫に関する寄生虫の保有状
況 刳 第3報 刳. 第4回埼玉県健康福祉
研究発表会. 2003. 3. 11.

4) 前野直弘、藤原二郎、大畑佳代子、小
山雅也、町田敏治、深井正之、板屋民
子、篠宮哲彦、大澤 浩、川田 廣、
名雪博二、山本徳栄、山口正則: 埼玉
県内全域における犬、猫に関する寄生
虫の保有状況 刳 第1報 刳. 第5回埼玉
県健康福祉研究発表会. 2004. 3. 19.

H. 知的所有権の取得状況

該当事項なし。

平成15年度厚生科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)
「地方衛生研究所の地域における健康危機管理のあり方に関する研究」
分担研究「健康危機管理のための試験検査技術の充実・普及に関する研究」班
3)「保健所と地研の試験検査技術の向上のための連携の検討」

平成15年度研究報告

研究協力者 島根県保健環境科学研究所 所長 関 龍太郎
生活科学科長 犬山 義晴
主任研究員 岸 亮子
主任研究員 糸川 浩司

研究要旨:

本研究において、平成13年度は県内7保健所を対象に、平成11年に緊急配備された毒劇物のスクリーニング用簡易検査キットについて、配備後3年間の使用状況等についてアンケート調査を行ったところ、使用方法についての研修希望と、簡易検査キット使用に関する情報提供の要望が多かった。これを踏まえて平成14年度は、簡易検査キットの反応特性を検証するために、食品にヒ素及び亜鉛を混入した検体を作製し、簡易検査キットを用いた測定を行った。また、蛍光X線分析装置を用いて、同じ検体を定性定量的に測定し、データベースを作成するための基礎的データを得た。

そこで、本研究の最終年度となる平成15年度は、毒劇物の簡易検査キットについての使用及び保管状況等と毒劇物に関する検査体制についてのアンケート調査を、全国の地方衛生研究所を対象に行った。実際の分析としては、昨年度のヒ素および亜鉛に引き続いて、シアン及びコリンエステラーゼ阻害剤検出キットについて、食品を使った分析を行ない、これらの簡易検査キットの反応特性を検証した。また、平成14年度、15年度に検証した3つの簡易検査キットについての検査マニュアルを作成し、県内7保健所の食品衛生監視員に対し、実習を含めた研修を行ない、毒劇物に関する健康危機管理時の検査体制についての連携を深めた。

A. 研究目的:

和歌山カレー毒物混入事件発生後、都道府県市区の各保健所に対して、劇毒物のスクリーニング検査用の簡易検査キットが緊急配備された。しかし、簡易検査キットは簡便で迅速に測定できる利点がある反面、疑似反応や食品中の夾雑物による影響を受けやすく判断に迷いが生じやすいた

め、最終的には機器による精密分析を実施する必要がある。このため、簡易検査キットの反応特性を把握するための検討と、当所配備の蛍光X線分析装置を使用して食品中の重金属成分の分析を行い、データベース作成に向けた基礎的データの収集を行う。これらの検討を基に、劇毒物分析実施マニュアルの作成を検討する。ま

た、保健所への研修開催あるいは情報交換を行ない、毒劇物検査に関する検査技術の充実と普及、今後の健康危機管理事態への対応を考察する。

B. 研究方法：

1. アンケートおよび意見交換

平成15年度の地方衛生研究所全国協議会中国四国支部会議において、毒劇物簡易検査キットおよび毒劇物迅速検査体制に関する議題を提出し、意見交換を行った。さらに、平成15年6月13日付で全国の地衛研に対して、毒劇物簡易検査キットおよび毒劇物迅速検査に関するアンケート調査をメールにて行った。

2. 簡易検査キットの検証

過去に劇毒物混入の事例発生のある清涼飲料(お茶、コーヒー、ジュース等)、カレー等の食品に既知量の有害化学物質(シアン、有機リン系農薬)を添加して、保健所配備の簡易検査キットまたは市販の水質検査キットでの分析を行った。

1) 検体の作成

清涼飲料は市販のものを使い、ウーロン茶、コーラ、グレープジュース、ミルクコーヒー、ポタージュスープ、みそ汁および緑茶に、有害化学物質(KCN、スミチオン乳剤)が既知濃度となるように溶解した。

2) 簡易検査キットは次のものを使用した。

パックテスト 遊離シアン

メルコクアント シアン化物テスト

Agri-Screen AT-10(または25) Kit

3. 保健所との研修及び意見交換の実施

上記のデータやこれまでの厚生科学研究その他を参考に、簡易検査キットについて検査マニュアル(部分)を作成し、保健所に対して実習も含めた研修を行った。研修後、簡易検査キット、研修、迅速検査体制についての意見交換をした。

C&D. 研究結果および考察：

1. アンケート調査

1) 中国四国支部会議において

地研全国協議会中国四国支部会議では、簡易検査キットも含めた毒劇物検査体制あるいは迅速検査マニュアル作成について、平成13年の理化学部会と平成14年の所長部会で議題として取り上げられ、中四国各県の取り組みが紹介されていた。平成13年には毒薬物検査マニュアルが策定されている県は2県、検討中の県が1県という状態であった。策定されていた県のうち1県では食品への薬物混入事件を機に初動調査、警察との連携、連絡体制等が決められ、これに基づいて、地研での健康危機管理対策マニュアルが制定され、各部の分析対応マニュアルが作成されていた。カレー毒物混入事件の後、全国で類似の事件が散発的に起こっており、事例に遭遇した研究所では、系統的で迅速な毒劇物検査マニュアルの必要性が強く認識されたことと推察された。平成15年には4県で策定、3県で検討中という状況にあり、全体として整備が進んでいた。また、残りの2県はインターネットや各種単行本を元に検査を行っていた。

2) 全国地研へのアンケート調査(迅速検査キットに関して)

平成15年6月13日付で全国地方衛生研究所74箇所に対して、メールにて、アンケートを送付した。このうち、保健所4カ所を含む57の回答があった。1つの地研から毒劇物検査マニュアルの送付を受けた。

結果は別紙のとおりであった。迅速検査キットに関して、保健所では主に衛生部門、検査部門で所管していた。使用経験は「なし」が27件(47.4%)、「ある」が20件(35.1%)であった。補充の予定については「ある」が27件(47.4%)、「なし」が20件(35.1%)であった。検査キットの使用法等についての研修の要望は、「ある」が17件(29.8%)、「ない」が36件(63.2%)であった。研修先として、研修の要望「ある」と回答したほとんどのところが地研での研修を要望していた(17件中14件)。使用経験が「ない」割合から比較すると研修の要望が少ないようだ。具体的な使用事例は29件が集まった。有症苦情が12件、不審食品の検査が2件、疑食中毒事例が2件、研修に使用2件、水質検査4件等であった。島根県内で2年間に8件が集まったことを考えると、数的に少ないかと思われたが、県内での利用同様に様々な場面で利用されていた。これらの利便性が、使用経験の少なさに比して補充の予定が「ある」の件数が多い理由の一つになっていると推察された。研修内容の希望では、研修の要望を「ある」と回答した全てのところ(17件)で検査実習が要望され、ついで検査マニュアル(6件)、健康危機管理全般

(2件)となっていた。

3) 全国地研へのアンケート調査(健康危機における毒劇物の緊急検査について)

健康危機管理における毒劇物の緊急検査に関しての設問(回答件数53)では、対応部署は地研49件(92.5%)、警察鑑識28件(52.8%)、保健所検査課19件(35.8%)であり、毒劇物の緊急検査における地研の重要性が再認識された。過去3年間の対応部署における検査依頼の有無では「ある」23件(43.4%)、「ない」28件(52.8%)であった。実際に4割を超える地研が毒劇物の緊急依頼を受けていることが判った。緊急依頼の内容では、化学性食中毒が11件(20.8%)、警察が関与する事件、水質汚染およびその他が8件(15.1%)ずつであった。こうした必然性を受けてか、検査方法について、系統的な検査マニュアルが必要ないというところは一つもなかったが、「検討中」のところは16件(30.2%)、「国等による作成を希望」が13件(24.5%)あった。過去の事例集では「厚生労働省の全国食中毒事件録を利用している」が25件(47.2%)、「整備してある」と「作成中」は合わせて13件(24.5%)であった。試験法に関する情報の入手法は「他の地研、国より入手」が46件(86.8%)、「インターネット、文献検索情報を活用」が43件(81.1%)、「中毒情報センターを活用」が21件(39.6%)で、迅速に正確・的確な情報を入手するために、すべての可能な手段で求めていることが伺われる。機器の整備については、大半が「現行では不十分」(31件、58.5%)と感じており、「専用機器が整備されている」と

「検討中」はそれぞれ2件(3.8%)であった。整備を要望する機器としてLC/MS(12件)、ICP/MS(8件)、蛍光X線分析装置(6件)などが挙げられていた。有害ガスに対応するためのケミカルハザード室について「整備されている」が8件あり、平成10年度に行われた調査よりも増加していたが、大半が「ドラフトで対応」(31件、58.5%)としており、平成10年度同様特別な施設を準備する必要はないと感じていることが実証された。事件発生時に対応できる人材の育成には、「計画的に育成している」が3件(5.7%)しかなく、「現場職員で対応」18件(34.0%)としながらも、「国・地研での研修が必要」(27件、50.9%)との認識が大きかった。検査方法については「経験者の判断」にゆだねるところが最も大きい(19件、35.8%)にもかかわらず、その人材育成が思うようにいかない現状が浮き彫りにされており、平成10年度から明確な前進が見られていない。緊急時検査担当部署の連携では、「連携の必要がある」(27件、50.9%)としながらも、実際に連携しているのは19件(35.8%)で連携相手としては、他の地研(43件、81.1%)、国立研究機関(37件、69.8%)、警察鑑識(36件、67.9%)である点は平成10年度から変化が見られず、連携体制が進んでいない状況が把握された。その他の答えとして、保健所(2件、3.8%)との回答があったが、当たり前すぎて認識されていないのか、あるいは意外に見落とされている可能性も否定できなかった。前半のアンケート調査では、保健所に配布されたキットについて地研に照会したで、不明とい

う回答も若干見られ、保健所との情報の交換がさらに進むことが望まれた。

2. 簡易検査キットによる分析(表参照)

1) メルコquant シアン化物イオンテスト(表3)

このキットでは、測定範囲は1~30ppmであった。

添付の容器に検体を入れ、pHを調整後、試薬1(第三リン酸)、試薬2(ピリジン)を入れ、試験紙を30秒間浸し、検体から出したら直ちに(10秒以内に)濃度の判定をするようになっていた。

各種陽イオン、陰イオンが測定に影響する以外に、生体試料、特に胃液が混入したようなもの(例:吐瀉物等)の分析は困難であるとの情報を得た。胃の内容物の性状や各種酵素の存在が試験結果に影響し、疑陽性や疑陰性の結果をもたらす可能性を有するとのことであった。

計算値が1ppmとなるような検体では、いずれの食品でも試験紙の色が薄くて、陰性との見分けがつきにくい上に、試験紙の退色が秒単位で起こるので、難しさを感じた。また、30秒、10秒、という操作時間の区切りが、複数の検体を同時測定するには困難であった。

2) 簡易水質分析製品 パックテスト

遊離シアン(表4)

パックテスト 遊離シアンでは4-ピリジンカルボン酸比色法により、0~2ppmの判定ができることになっている。コーラや烏龍茶などの色の濃い検体では、10倍程度の希釈では発色が茶色がかってよく確認できなかったため、それぞれ100倍以上に希釈して測定したところ、感度よく測定する