

厚生科学研究費補助金

健康科学総合研究事業

健康危機発生時の地方衛生研究所における
調査及び検査体制の現状把握と検査等の
精度管理体制に関する調査研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

今 井 俊 介

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

健康危機発生時の地方衛生研究所における 調査及び検査体制の現状把握と検査等の 精度管理体制に関する調査研究 主任研究者 今井俊介	1
---------------------------------------------------------------------------	---

II. 分担研究報告

1. 化学物質モデルにおける 多検体(多成分)一斉迅速検査の精度管理等の検討 分担研究者 伊藤正寛	7
2. バイオテロ等健康危機発生時の 電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理 分担研究者 小倉 肇	27
3. 欧米諸国の地方衛生研究所相当機関における 危機管理対策の一環としての精度管理制度の 調査と本邦への導入に関する検討(欧米諸国調査) 分担研究者 吉村健清	55
4. 健康危機発生時の原因物質究明戦略に関する検討 分担研究者 土井幹雄	69
5. 健康危機事例発生時の 保健所から提供される情報についての検討 主任研究者 今井俊介	89

I. 総括研究報告

平成17年度厚生科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)

健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制
の現状把握と検査等の精度管理体制に関する調査研究

総括研究報告書

主任研究者 今井 俊介 奈良県保健環境研究センター所長

研究要旨

地方衛生研究所(以下地研)が健康危機事例の原因解明のための地域での中心的検査拠点として機能するためには、精度管理に裏付けられた迅速且つ正確な検査を行うことが必要である。この研究班は、地研全国協議会理事会で推薦された4つのブロックからの分担研究者を中心として、全国の76の地研の協力を得て以下の検討を行った。

1. 理化学分野の迅速且つ正確な検査のあり方のうち、内部精度評価として近畿ブロックを中心とした15地研の連携のもと、農薬を用いた多検体一斉迅速検査を、また、外部精度評価としてトリウム中毒を想定したシミュレーションを参加希望の地研に絞って実施した。その結果は満足出来るものであったが、全地研が参加出来るような工夫が必要であり、健康危機に係わる物質について必ずしも検査体制の整備が進んでいない点が検討課題として残った。
2. 感染性のない組み替えノロウイルスVLPの電子顕微鏡を利用した精度管理を Dr.Gelderblom の指導を受け、ドイツコッホ研究所の精度管理システム(EQA-EMV)を導入して行った。電子顕微鏡を保持している52地研のうち34機関が参加した。固定検体では生検体に比べ同定の感度が落ちたものの、その改良法が明確になったので、次年度以降の精度向上が期待される。
3. 先進国の欧米の健康危機管理の中心的研究機関として、研究協力者による情報収集やインターネットを利用した文献収集などにより、米国のニューヨーク市の Greater New York Hospital Association(GNYHA)、CDC の The Laboratory Response Network(LRN)及びイギリスの Health Protection Agency(HPA)の3機関を選択し、その内容を検討した。いずれも得られた情報は我が国の地研のあり方及び各研究機関内での連携構築のあり方を検討するのに役立つものと思われる。
4. 健康危機事例の際、検査拠点の地研としては保健所から種々の情報を得ることが必要である。しかし、日常起こる食中毒に対する検査においても検体や発生事例の関連情報等を提供する”調査票”といった様式が50%—70%くらいの地研でしか整備されていないことが明らかになった。保健所の積極的疫学的調査との関わりを含めて検討が必要である。

分担研究者

伊藤 正寛	神戸市環境保健研究所	所長
小倉 肇	岡山県環境センター	所長
吉村 健清	福岡県保健環境研究所	所長
土井 幹雄	茨城県衛生研究所	所長

り、我が国でも世界の様々な地域からの影響を大きく受けるようになった。近年見られる鳥インフルエンザ、SARS等の感染症や牛海綿状脳症(BSE)等がその例で、健康危機管理と発生時の的確な対応が国民全体の大きな関心事となっている。

A. 研究目的

20世紀後半の国際的なグローバル化による

健康危機発生時に特に重要なことは原因となった化学物質や微生物等の迅速且つ正確な同定で、従来この技術的役割を地域における技術的中核機

関としての地研が担ってきた。

ところで、このような技術的裏付けのためには、日常から精度管理による高水準の検査技術力が維持されていることが必要である。地研では、平成8年度の食品衛生法の改正により食品部門に業務管理（GLP）制度が導入され、検査結果の保証に寄与してきた。しかし、バイオテロ、食中毒や感染症に係わる事件が近年相次いだこともあり、今後は、現在のGLP制度を踏まえた上で、今まで以上に健康危機管理を想定した精度管理の検討が必要である。

本研究班では、以上の点を踏まえ、現在の地研における1)化学物質モデルにおける多検体一斉迅速検査の内部精度管理の現状や化学物質中毒モデルを利用したシミュレーションを実施した際の外部精度管理の状況、2)バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理、3)欧米等の健康危機管理に対応する各研究機関やその連携等、4)健康危機発生時情報を発信する側の保健所と、検査を行う地研側との情報共有等の連携について食中毒発生時の検査を例にアンケート調査を含めた調査研究を実施した。

B. 研究方法

1. (伊藤班、土井班) 内部精度評価として近畿ブロックを中心とした15の協力地研においてアンケートを実施し、意見交換、議論を通して健康危機発生時の地研における体制整備の実態と問題点の把握を試みた。同時に多検体一斉迅速検査では「食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度に係わる分析法の検討状況について」の農産物中に残留する農薬に対するGC/MSによる一斉試験法に準拠して、7種類の農産物に46種類の農薬添加による内部精度評価を行った。

一方、外部精度評価として、過去の健康危機事例よりタリウムによる重金属中毒の具体的事例をとりあげ、内外の文献より特徴的な症候、検査所見等の臨床症状と保健所による疫学内容調査の記述を添付して、原因究明にいたるシミュレーションを行った。75地研のうち参加した17地研に原因物質としてタリウムの人工尿を作成送付しブラインドテストを行い、その原因物質の同定を行ってもらおうと同時に、9機関については机上参加のみの参加であった。

2. (小倉班) 試料としてノロウイルス VLP を用い、

コッホ研究所の Dr.Gelderblom の指導のもと、電子顕微鏡による形態学的診断の精度管理を行った。ノロウイルス VLP はノロウイルス ORF 2と ORF3 のごく一部を含む領域を組み込んだバキュロウイルスを Tn5 昆虫細胞で発現させたもので、感染性はなく、電顕的形態学上ノロウイルスと同じである。今年はこのノロウイルス材料を電子顕微鏡による検査体制の確立に寄与することを目指した。研究協力者がこれまでに行ってきた電子顕微鏡的検査の経験とコッホ研究所で蓄積された技術を集めて「電子顕微鏡的ウイルス診断のためのウイルス固定法及び染色法マニュアル」を作成し、電子顕微鏡を保持した52地研のうちこの精度管理への参加を希望した34の地研に送り、それに従って精度管理を行った。なお、精度管理試料の適否の検討では、レファランスセンターとして研究協力5研究所の内4研究所以上が適したものを使用することとした。一方、天然痘ワクチンウイルスは、天然痘ウイルスと電子顕微鏡的形態が同じである。それ故、天然痘ウイルスの代わりとして、天然痘ワクチン生ウイルスは次年度の精度管理用の材料であり、各研究協力者にその適宜性について検討した。

3. (吉村班) 健康危機管理対策については、欧米諸国で先進的な取組がなされていることより、インターネットを活用した文献収集、大使館、領事館及び留学経験者などへの問い合わせによる情報収集を中心に、欧米諸国での健康危機管理を担う研究機関について調査し、代表的な3機関を選択した。国と地方の連携状況、精度管理及び疫学調査状況について調査し、地研のあり方を検討する予定である。

4. (今井班) 危機事例の原因物質の同定が迅速に且つ正確に行われるためには、保健所を通じて、多くの検査対象から有効な情報を得ることが必要である。地研と保健所担当者間で最も情報等の体制が取られている食中毒を例に、その検体に関する情報内容等についての、地研の検査担当者へのアンケート調査を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究遂行上、倫理面で問題を生じるおそれはない。しかし地研に対しアンケートを実施する場合でも、回答者が特定されることなく、人権擁護上の配慮を行い、不利益を被ることがないように留意した。

C. 研究結果

1. 健康危機に係わる化学物質のアンケート調査では、有機リン系農薬、シアン、ヒ素、フグ毒等が上位を占めた。しかし、全般に農薬、シアン、重金属等過去に健康被害の発生事例のあった化学物質の検査体制は整っているが、事例の少ない医薬品やテロ関連などにおいて検査体制の整備は進んでいない。

7種類の農産物に46種類の農薬添加した結果は、6種類の農薬をのぞいて、その室間再現精度及び分析精度の指標はいずれも良好で、厚生労働省の判定 A であった。ただし、6種類については、厚生労働省の結果でも回収率が低いものであったり、技術によるものよりむしろその物質そのものの特性による結果が原因していることが示唆された。また、一律基準値の 0.01ppm 添加した試験結果ではマトリックスの影響が認められるものもあったが、概ね 0.01ppm での測定が可能であることが示唆された。

一方、タリウムをブラインドサンプルとして用いた金属中毒のシミュレーションを実施した外部精度評価については、机上シミュレーションを実施した9地研について、5機関から回答が寄せられ、未回答の4機関を除いて、タリウム中毒ないしは、タリウム中毒を含む、重金属中毒の回答であった。1機関ではセレン中毒との回答であった。又、尿検体を送付した17機関中16機関では定性及び定量検査の結果、タリウムと同一していた。使用した機器は ICP/MS が最も多く、続いて原子吸光光度計が使用されていた。

2. ノロウイルス VLP の電子顕微鏡的検査に対する精度管理では34地研の参加を得て、ノロウイルス VLP を試料に生と固定標本での形態学的比較検討を行った。その結果、固定しない生標本では100%の正解率であったが、固定標本では、70.6%とやや低い正解率であった。固定の際のグリッドの非親水化が原因により十分なウイルス粒子の観察が出来なかったものと思われる。

一方、ネガティブ染色法では2地研のみが酢酸ウランを用い、他はリンタンングステン酸であった。酢酸ウランは核原料物質・核燃料物質及び原子炉の規制に関する法律により国際規制物質として届け出が必要となっている為であろうと思われた。グリッドの親

水化法としては、多くの地研でイオン・スプッターを用いていたが、配布マニュアルに示した UV ランプの下で処理する方法を行っている地研も8ヶ所あった。グリッドの親水化処理をしていない2地研には、精度管理のために何らかのグリッド親水化が必要と思われる。

ところで、各レファレンスセンターとしての研究協力者による試料調整、染色、検鏡の結果、固定標本は生標本に比較して観察が幾分難しいものの、精度管理用として十分使用可能であった。小型(径約30nm)であるノロウイルス VLP の場合は親水化しないグリッドでは観察がほとんど無理であったが、大型である(径約250~300nm)天然痘ワクチンウイルスでは親水化しないグリッドでも見ることは可能であった。ただ、グリッドを親水化した方がウイルス数が多く観察された。

結果として、この天然痘ワクチンウイルスは形態保存状態も良く、濃度的にも電子顕微鏡的検査の精度管理試料として適当であるとのレファレンスセンター内の結論となった。

3. 欧米の健康危機管理対応を担うの中心的な研究機関として以下の3つが選択された。

Greater New York Hospital Association (New York City)

国の危機管理の先駆けで、事故情報の一元化が24時間体制で疫学者を中心として配属されている機関である。

The Laboratory Response Network (CDC)

生物と化学物質が別システムで機能しており、検査機関の役割分担が明確されている。又検査機関の特化と連携し、全米のみならず海外の拠点のどこにでもCDC職員を迅速に派遣する機関である。

Health Protection Agency (United Kingdom)

健康危機に一元的に対応する機関で、英国全土で9地域に分割されている。検査機関も同様のネットワークを持つ。

4. 全国地研担当者にアンケートを76配布し、その回収率は59(77.6%)であった。原因究明のための総合判断に本庁もしくは保健所からは地研に約70%以上で意見が求められることがあり、医療機関での検査結果は約90%の地研にリアルタイムに自動的及び依頼すれば教えてもらえる体制である。しかし、食中毒検査で最初の依頼時に検体に関する

る保健所等からの提出情報で57.6%は決まった様式を持っていない。また、発生事例の関連情報についても71%は決まった様式を持っていないことが明らかになった。

D. 考察

地域保健法の中で、地域特性に即した地域保健対策を効果的に推進し、地域における健康危機管理能力を高めるために、地研は病原体や劇毒物についての迅速な検査及び疫学調査の機能の強化を図り、他の地研や国立試験研究機関等との連携構築が必要である、と明記されている。

本研究班では特に、緊急時において、原因となる化学物質、微生物等を迅速且つ正確に同定すべき地研全体としての検査技術力の精度向上に関する方策を明確にすることを目的として研究を行った。そして更に我が国での地研のあり方及びどのような研究機関間での連携システムが健康危機時に効率的に機能するかどうかを目標にまず、先進国での研究機関等での状況を把握するために、情報収集を行った。

ところで、精度管理には、内部精度評価(添加回収試験、分析者自身が農薬を添加)と外部精度評価(ブラインドスパイク試験、分析者は添加されている農薬の種類及び濃度を知らない)が知られている。伊藤班では化学物質モデルとして46種類の農薬を用い、7種類の農産物に添加し、GC/MS測定による一斉試験法の内部精度評価を近畿ブロックを中心とした15機関の共同試験として実施した。健康危機管理に係わる化学物質は構造、分子量、極性、揮発性等多種多様であり、又その数も極めて膨大である。迅速に且つ正確な検査をするためには、多検体を一斉に分析することが必要ではあるが、同時に極めて高い技術を必要とされ、その意味でも精度管理が重要である。今回の結果からは、6種類以外の40農薬についてはいずれも厚生労働省のA判定という良好な結果が得られ、地研での内部精度管理が十分に行われていることを示唆している。これは昨年に丹野等により行われた地域保健総合推進事業「健康危機管理における地研の広域連携システムの構築」の中でのモデル事業「ポジティブリスト関係品目残留農薬検査分析法」で今井等を中心として近畿ブロック内で実施された経験が十分に生かさ

れていると思われる。

他方、アンケート調査の結果、健康危機に直接関わる化学物質については、過去に健康被害の発生事例があった物質については検査体制が整っているが、事例の少ない医薬品やテロ関連などにおいて検査体制の整備は進んでいない点が検討課題として残る。

一方、健康危機発生事例に迅速に対応出来るためには、日常から症例によるシミュレーションを実施することが必要である。土井班では過去の健康危機事例から得られた情報や経験より、原因物質としてタリウムを含む人工尿を作成し、特徴的とされる症候、検査所見等の臨床症状、保健所による暫定的疫学調査を盛り込み、希望した地研に送付して最終的にタリウムと同定出来るかどうか分析を行った。参加率はシミュレーションの実施が年度末の極めて多忙な時期に重なったことや、ある自治体の危機管理マニュアルでは、検査については警察と科学捜査研究所が受け持ち地研は関与しない等の理由で約22%と低率であった。しかし、参加した地研においては尿中のタリウムを殆ど同定した。又、症例の机上検討のみに参加した地研でも5機関中4機関で正解を得られた。そこでは過去の健康危機事例を参考に、十分にデータベース等を活用して結論に至ったようであったが、全体としては原因物質を特定する文献検索データベースが質、量ともまだまだ不十分のようであった。しかし、地研の危機管理事例集が極めて有効であった事実はこれからの危機管理への対応に対して一つの方向性を出している。又、以上のシミュレーションについては全地研で実施出来るような工夫が必要である。

小倉班では電子顕微鏡を利用したウイルス検査の精度管理を行った。生物剤テロとしてはヒトからヒトへの伝染力が強く致死率の高い天然痘や炭疽菌等が最も恐れられている。炭疽菌については平成13年の米国同時多発テロ以降の炭疽菌事件に我が国で続出した炭疽菌を模倣した”白い粉”事件において地研は国立感染症研究所との連携のもとその検出に大きな役割を果たしてきた。しかし、ウイルスに対する体系だった精度管理の試みは十分なされていない。現在、世界においてウイルス検査精度管理で中心的役割を果たしている機関の一つとしてドイツのコッホ研究所が知られている。それ故、

Dr. Geldblom によりコッホ研究所で実施されている精度管理システム (EQA-EMV) を地研に導入したわけである。今回は天然痘ウイルスを扱う前に我が国で経年的に流行しており社会問題にもなっているノロウイルスに焦点を当てた。感染力のない組み替えノロウイルス VLP を用い電子顕微鏡を利用した精度管理を実施した。ところで、近年微生物等の同定には PCR 法やリアルタイム PCR 法といった遺伝子検査法が頻繁に利用されている。ウイルスや細菌が極々微量であっても、その直接の DNA や RNA を扱うために短時間で感染の危険性も少なく、診断が可能であるからである。しかし、危険度の高い未知のウイルスに対しては始めから遺伝子検査をするのは不可能であり、まず形態学的に鑑別することが重要になる。この意味で、電子顕微鏡的診断法は高く評価されている。また、ウイルスの遺伝子変異は早いことが知られており、唯一 PCR にのみ頼っていると、偽陰性結果となることが心配される。また、ノロウイルスとロタウイルスのような複数のウイルスによる集団感染性胃腸炎発生も見られることから、これらのウイルスを同時に検索可能な検査法としての電子顕微鏡の有効性は言うまでもない。また、PCR 法によるウイルス検査の精度管理はコッホ研究所でテロ対策として一部実施していたが、地研レベルでは精度管理試料の入手、調整他システムとしての導入は困難であると思われる。

結果に示したように、電子顕微鏡検査による、生標本の正解率は 100% であったが、固定標本では 70% とやや低い正解率であった結果は、少々問題である。というのは危険度が高い未知のウイルスが想定される場合は感染力を防ぐため、まず試料を固定しなければならないからである。しかし、今回の検討により、固定によりグリッドでの非親水化による影響が明確になり、この点を改善することで固定検体での検査水準の向上が期待出来よう。

一方、欧米諸国では全国規模でのバイオテロや感染症等の健康危機管理に対応する研究機関は既に存在し、それらの連携はすでに構築され稼働している。それ故、このような先進諸国の研究機関を調査することは、精度管理体制を含めて、我が国における地研のあり方や連携等の構築に際して大いに役立つものと思われる。米国ではニューヨーク市の Greater New York Association (GNYA)、

CDC の The Laboratory Response Network (LRN)、イギリスの Health Protection Agency (HPA) 等である。GNYA では米国の危機管理の先駆けであり情報が一元化された 24 時間体制の機関、LRN は CDC を中心とした組織間連携で縦 (民間-州政府-連邦) と横 (連邦組織-連邦組織) の連携が構築されている。一方、HPA では健康危機に一元的に対応し、全国 9 地域に分割され且つそれぞれがネットワークシステムを構築している。また、それぞれがいずれも国や地域に応じて構築されており、我が国における地研のシステムにそのまま当てはまるかどうかは不明である。例えば、CDC の場合は米国の連邦全体に機能が及び、あまりにも大規模すぎる。その意味で我が国では GNYHA や HPA と言った研究機関等のシステムが参考になるかも知れない。いずれにしても我が国の地研としてはどのようなシステムが相応しいのか、或いはどのような連携を構築すべきなのか、十分な情報を収集し検討することが必要である。

健康危機発生の際の検査拠点としての地研と検査対象の情報収集の役割を担う保健所との連携は表裏一体として考えられている。中でも食中毒検査は保健所及び地研にとって日常発生する行政検査で極めて重要である。しかし、保健所からの検体に関する提出情報や発生事例の関連情報においても決まった様式を持っている地研の率が低い状況は少々問題と思われる。内部精度管理の信頼性確保のためには各検査機関において検査標準作業書 (SOP) を作成し、その手順に従って、検査を行っている。今回アンケート調査で取り上げた食中毒の調査票モデルはある意味ではこの検査標準作業書に相当するかもしれない。この意味で、保健所の行うべき積極的疫学調査への地研の関わりやその役割分担等を含めて今後の課題と思われる。

E. 結論

地研が健康危機事例の原因物質の同定に資する精度管理体制の状況を調査検討した。

化学物質についての内部精度評価としてその検査の迅速・正確を中心に一度に多量の試料をこなせることを前提として近畿ブロックを中心とした 15 地研で連携して、多検体一斉迅速検査で 46 の農薬で検討を行った。大部分は極めて良好な結果が得ら

れ、厚生労働省のA判定が大部分を占めた。良好でなかった結果については技術的な問題より、むしろ物質そのものの特性による影響と思われる。一方、アンケートの結果、健康危機に係わる物質については事例の少ない医薬品やテロ関連物質については検査体制の整備はまだ不十分でその改善のための検討は、次年度以降の課題として残った。

一方、外部精度評価として、重金属のタリウム中毒を事例としてシミュレーションを実施した。参加した地研については殆どの地研で尿中のタリウムを同定出来、且つ症例検討のみの机上参加した地研の結果も原因物質としてタリウムを推定出来、満足すべき結果であった。しかし、その検討の過程では文献検索データベースが質・量ともまだまだ不十分であったとの結果は検討を要する。ただし、地研が作成している危機管理事例集が有効であったことはこのデータを積み上げることで将来の危機管理体制への構築につながるものと思われる。一方、今回の参加地研数は実施時期などの問題で22%と少なかった点は問題である。全地研が参加出来るような工夫を含め今後の課題と思われる。

微生物については感染力のない組み替えノロウイルス VLP の電子顕微鏡による精度管理をドイツのコッホ研究所との連携で行うことが出来た。今回は生検体では100%の正解率であったが、固定検体では70%とやや低下した。何よりも感染力の強い危険ウイルスを扱うには生検体は極めて危険であり、固定検体を利用しなければならないので、以上の結果は少々問題である。しかし、固定に際して生じたグリッドの非親水化という問題が明確になったので、次年度の痘瘡ワクチンウイルスを用いた試みに期待される。

健康危機管理において原因物質同定の検査技術力を担う精度管理を含む地研のあり方や地研間での連携への取組が始まったばかりである。この意味で、欧米諸国での健康危機管理を担う研究機関及び連携システムを知ることは重要であり、その良い点を我が国でも是非取り入れることが望まれる。今回はインターネットを利用した文献収集、大使館、領事館及び留学経験者への問い合わせに情報収集をもとにアメリカではニューヨーク市の Greater New York Hospital Association、CDCの The Laboratory Response Network 及びイギリスの

Health Protection Agency を取り上げた。いずれも得られた情報は我が国での地研のあり方及び連携構築を生かしていくの役立つものと思われる。

最後にアンケート調査の実施により、食中毒をキーワードに保健所からの検体に関する検出情報や発生事例の関連情報については60%－70%の地研しか調査票といった決まった様式を持っていなかったことは問題と思われる。保健所が感染症等の際に行うようにされている積極的疫学調査へのあり方を含め、地研がどのような関わりを持って行くかが今後の課題と思われる。

F. 研究発表

今井 俊介

ポジティブリスト関係品目残留農薬検査分析法
(平成16年度 地域保健総合推進事業「健康危機管理における地研の広域連携システム」)、
186-209,2005

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

特記事項無し

1. 特許取得

特記事項無し

2. 実用新案登録

特記事項無し

3. その他

特記事項無し

II. 分担研究報告

健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制
の現状把握と検査等の精度管理体制に関する調査研究

分担研究報告書

化学物質モデルにおける多検体（多成分）一斉迅速検査の精度管理等の検討

分担研究者 伊藤正寛 神戸市環境保健研究所長

研究要旨 「化学物質モデルにおける多検体（多成分）一斉迅速検査の精度管理等の検討」として近畿地区の13地方衛生研究所と広域連携を視野に名古屋市衛生研究所及び福岡県保健環境研究所を加えた15機関の協力を得て、1）健康危機に係わる化学物質の検査体制に関し、アンケートによる現状把握、2）化学物質モデルにおける多検体（多成分）一斉迅速検査の精度管理等の検討を実施した。

アンケート調査では、検査体制は有機リン系農薬、シアン、ヒ素等過去に健康被害の発生事例のあった化学物質についてはほぼ整備されているが、原因物質の特定には地方衛生研究所間の連携は不可欠であり、検査マニュアル、データベース、試薬等の体制整備においても、あらためて地方衛生研究所間の連携強化、ネットワークの重要性が確認された。

化学物質モデルとして46種の農薬を用い、7種類の農産物に添加し、GC/MS測定による一斉試験法の精度管理を15機関の共同試験として実施した。対象とした農薬46種はその物性が多種多様で多くの情報が得られ、健康危機における化学物質の一斉迅速検査方法の検討のための化学物質モデルとして有効なものであった。また多成分一斉試験及びGC/MS測定において有用な論議、技術能力及び精度管理技術の向上が図られた。特に、15の複数機関での共同試験として実施したことにより、地方衛生研究所間の連携強化、情報の共有化を推進することができた。また、今後の化学物質による健康危機発生時のネットワーク化に大きく貢献できるものとする。

研究協力者

田中敏嗣、小島信彰、伊藤光男、上田泰人、金田誠一、田村征男、丸山吉正、加藤陽康
中道民広、飯島義雄（名古屋市衛生研究所）
（神戸市環境保健研究所） 吉村健清、中川礼子、芦塚由紀、堀就英

(福岡県保健環境研究所)
辻元宏、山中直、原田浩之、瀧野昭彦
(滋賀県衛生科学センター)
中川雅夫、塩崎秀彰、柳瀬杉夫、大藤升美
(京都府保健環境研究所)
松井祐佐公、川勝剛志、伴埜行則
(京都市衛生公害研究所)
織田肇、田中之雄、住本建夫、村田弘
(大阪府立公衆衛生研究所)
中尾昌弘、森義明、山口之彦、宮本伊織
(大阪市立環境科学研究所)
田中智之、松本憲一、大仲輝男、神藤正則
(堺市衛生研究所)
吉村幸男、市橋啓子、秋山由美、吉岡直樹

松岡智郁
(兵庫県立健康環境科学研究所)
南隆之、谷口秀子、佐想善勇
(姫路市環境衛生研究所)
岩谷博、宮田伸一、藤本敏子、谷口誠
(尼崎市立衛生研究所)
今井俊介、大前利市、素輪善典、宇野正清
伊吹幸代、植田直隆
(奈良県保健環境研究センター)
錦見盛光、山東英幸、久野恵子
(和歌山県環境衛生研究センター)
中北照男、宇治田正則、木野善夫
(和歌山市衛生研究所)

A. 研究目的

1. 健康危機に係わる化学物質の検査体制に関するアンケートの実施

化学物質による健康危機発生は多くの死者を出した松本サリン事件、カレーヒ素混入事件が衝撃的であったが、日常的にも、事件、事故、苦情や身体異常を訴える事例が多く、地方衛生研究所での迅速な対応、検査体制の確立が求められている。加えて、的確に原因物質を特定できる技術力及び精度管理も必要である。今回、15の協力研究機関においてアンケートを実施し、意見交換、論議を通して健康危機発生時の地方衛生研究所における体制整備の実態と問題点の把握を試みた。

2. 化学物質モデルにおける多検体（多成分）一斉迅速検査の精度管理等の検討

健康危機における化学物質の測定法としてGC、GC/MS、LC、LC/MS、UV、AAS、ICP/MS、簡易検査キット、Bio-assay、

ELISAなどがあげられる。なかでも、GC/MSは各地方衛生研究所に広く普及しており、データベース、ライブラリーも充実し、最も有効な機器の一つである。

また、GC/MS測定技術の向上、精度管理、問題点の把握を図ることは健康危機発生時の原因物質の迅速、正確な同定等様々な課題への対応能力を促進することができる。

さらに、各地方衛生研究所間で連携し、情報、ノウハウを共有し、ネットワーク化を推進することによって衛生行政の技術的中核としての健康危機管理体制構築に大きく貢献することができる。

一方、健康危機管理に係わる化学物質は膨大である。しかし、アンケートでも認められるように農薬が重要な化学物質としてあげられる。農薬は構造、分子量、極性、揮発性等が多種多様で、多成分を一斉に分析することは高い技術力を必要とし、その精度管理は重要である。

従って、本研究班において、GC/MSを用いた農薬分析を近畿の13地方衛生研究所と

広域連携を視野に名古屋市衛生研究所及び福岡県保健環境研究所を加えた15機関の共同試験として実施することによって、健康危機発生時の地方衛生研究所における検査体制の強化に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1. アンケート調査

15協力研究機関を対象に検査体制等について以下の項目についてアンケートを実施した。

1.1 質問項目

- 1) 検査する必要があると思われる化学物質と現在の体制
- 2) 上記1)の中で、他機関と連携を希望する化学物質
- 3) 健康危機を引き起こす化学物質の検査についての意見

1.2 回答方法

- 1) 化学物質名を総称または個別物質名で記入。それぞれについてマニュアル（あり、一部あり、なし）、検査（可能、一部可能、不可）から1項目を選択し○で回答。
- 2) 番号で回答
- 3) 自由記入

2. 精度管理の検討

2.1 実験方法

2.1.1 試料

農産物は市販のオレンジ、玄米、トマト、人参、ピーマン、ほうれん草、リンゴを用いた。

2.1.2 試薬

標準溶液：残留農薬分析用GC/MS用農薬

混合標準溶液（関東化学（株）製品番号34010-96、農薬混合標準溶液34）を使用した。次の46種の混合液で各10ppm、但しアセチンプロピルは50ppmの濃度。また、クロルフェンピノス及びジメチルピノスはE、Z体を含む。p,p'-DDE、 α -BHC、 β -BHC、 δ -BHC、アセチンプロピル、イソフェノス（キソン体）、イソフェノス（本体）、イソプロカルブ、エチオフェンカルブ、エトプロホス、カクタール、キルホス、キノメチオネート、クロルフェンピノス、ジエトフェンカルブ、ジクロルホス（DDVP）、シロトリン、シパールメトリン、ジメチルピノス、テニクロール、テフルトリン、デルタメトリン、テルブホス、トリアジメノール、トルクロホスメチル、ハクロプロトラゾール、ピタルタノール、ピリダベン、ピリミジフェン、ピリミホスメチル、フェナリモル、フェンスルホチオン、ブチレート、フルトリネート、フルシラゾール、フルトラニル、フルハリネート、プレチラクロール、プロピコナゾール、ベンダイオカルブ、ホロン、マラチオン、メチカルブ、メラクロール、メフェナセット、レナシル。

固相カートリッジカラム：ENVI-Carb/LC-NH₂ 6ml Tube (500mg/500mg) (Supelco社製)、同一ロットを使用した。

2.1.3 装置

ガスクロマトグラフ・質量分析計：

- 1) Agilent 6890N/5973inert
- 2) Agilent 5890 II/5971A
- 3) Agilent 6890N/5972A
- 4) 島津 GC-2010/QP2010
- 5) Agilent 6890N/日本電子JMS-K9
- 6) Polaris Trace GC/Polaris Q
- 7) Varian CP-3800/Sarurn 2000

2.1.4 試験溶液の調製

平成17年8月25日付厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課による「食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度に係

わる分析法の検討状況について」の農産物中に残留する農薬に対するGC/MSによる一斉試験法に準拠した。概要は図1-1、1-2に示したが、試料20.0g（玄米は10.0g）からアセトニトリルで抽出し、100mlに定容後、その20mlを塩析する。分取したアセトニトリル層をENVI-Carb/LC-NH₂カラムで精製し、GC/MS測定用の試験溶液を調製した。

2.1.5 複数機関による共同試験

試験機関数：協力研究者に示した15機関でそれぞれが1から3農産物を試験し、同一試料を各3機関で実施した。

添加試料：2.1.1に記載した7種類の農産物を用いた。

添加濃度：2.1.2に記載した46種類の農薬を0.1ppm、但しアセタミプリドは0.5ppmを添加した。添加方法は、細砕した試料20.0g（玄米は10.0g）に2ppmの混合標準アセトン溶液1ml（玄米は0.5ml）を添加し、30分経過後、2.1.4に従い試験溶液を調製した。

試験回数：無添加を1試行、添加を3試行

定量方法：アセトン・ヘキサン（1：1）で調製した標準溶液及びMatrix標準液（2g相当の無添加試料を乾固後、0.2ppm標準溶液1mlで溶解）を用いて定量した。

共同試験は平成17年10月より同12月に実施した。

2.1.6 一律基準値における添加回収試験

厚生労働省は食品衛生法改正に伴い平成17年11月29日付厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知（食安発第1129001号）においてヒトの健康を損なうおそれのない量として一律基準値0.01ppmを定めた。この濃

度レベルの定量性を検討するため、0.01ppm添加における回収試験をトマト、人参、ピーマンを用いて実施した。

C. 研究結果

1. アンケート結果について

15機関すべてから回答があった。

1.1 表1に検査を必要とする化学物質名と回答した機関の数を示す。検査が必要な化学物質として有機リン系農薬（14）、シアン（14）、ヒ素（12）、フグ毒（8）、アジ化ナトリウム（8）、有機水銀化合物（6）、パラコート（6）、有機塩素剤（5）、麻痺性貝毒（5）、カーバメート剤（5）、ジクワット（4）、キノコ毒（4）、カドミウム（4）などが上位を占めた。化学物質の検査が必要と回答した機関中、85%がマニュアル（一部を含む）があり、89%が検査（一部を含む）可能と回答があった。農薬、シアン、重金属等過去に健康被害の発生事例のあった化学物質の検査体制は整っているが、事例の少ない医薬品、テロ関連などにおいて検査体制の整備が進んでいなかった。

1.2 連携について

15機関中、9機関が連携を必要とする化学物質を回答し、植物動物毒は6施設、農薬類は4施設、重金属類、神経剤は2施設が連携が必要であると回答した。

1.3 自由意見

15機関中9機関より回答があった。代表的な自由意見を示す。

1) 連携、マニュアルについて

・検査マニュアルを近畿の各機関で共有化

し、どの機関でどの項目が分析可能かを事前に把握できるようなシステムが必要。複数の機関での確認検査のできる体制も必要。

- ・原因物質の特定が困難であると判断した場合に、他機関とのネットワーク作業が必要。

- ・インターネットで容易に手に入る脱法ドラッグ等についての科学的情報やその検査のために必要な標準品の入手法について、情報の共有を希望。

- ・初期対応をスムーズに行うために、症例と化学物質を関連づけるデータベースの整備が必要。

2) 機器について

- ・搬入された未知の検体を迅速に定性できる機器等の情報が必要。

- ・LC/MS、IPC/MS等がないため、定性検査が迅速に行えず、マニュアルの中でも「他機関への検査を依頼」を明記している。また動物実験の設備がなく最終確認ができない化学物質検査がある。

2. 精度管理の検討結果

GC/MSによる測定ではSCAN法が8機関、SIM法が7機関であった。測定したクロマトグラムを例を図2に示した。

7種類の農産物に46種類の農薬添加した複数機関による共同試験結果を農産物別に表2-1から表2-7に示した。溶媒標準溶液及びMatrix標準溶液による定量値について、3機関3試行の平均回収率、併行再現性(RSD_r)及び室間再現性(RSD_R)、HORRAT_r値を記載した。カプタホールは抽出及びGC/MS測定の過程での分解、また、キノメチオネートはENVI-Carb/LC-NH₂カラムにおいて吸着され、ほとんど回収されないため

結果表から除いた。クロルフェンビンホス及びジメチルビンホスはE、Z体があるが、主フラグメントイオンあるいは両イオン総和の結果とした。

平成17年8月25日付厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課から残留農薬等に対するポジティブリスト制度に係わる分析法の検討状況等が公表され、農産物中に残留する農薬に対するGC/MSによる一斉試験法についてはオレンジ、玄米、キャベツ、大豆、馬鈴薯、ほうれん草、リンゴを用いた添加回収結果から一斉試験が適用できる農薬を示している。判定基準としてA:平均回収率の中央値が70から120%、B-1:同120%以上、B-2:同50から70%、C:同50%以下が明示されている。添加対象農産物がオレンジ、玄米、ほうれん草、リンゴの4種類については今回用いたのと同じであるが他の3種類が異なる。しかし、厚労省の判定基準についても表に記載し、結果を比較した。

検討した農薬で厚労省判定がAと示されている農薬において70から120%の回収率が得られなかったのは人参及びピーマンの α -BHC、テルブホスであった。その回収率は64.8から68.2%でMatrix標準溶液でも改善されず70%を下回った。しかし、厚労省の結果も回収率の中央値が双方とも76%と低い値であることから、本法では回収率の低い農薬といえる。A判定以外で回収率が70%が得られなかった農薬はエチオフェンカルブ、ジクロルボス、ピリミジフェン、ブチレートであった。ジクロルボス、ブチレートはそれぞれの蒸気圧が2100mPa、1730mPaと高く、濃縮時での低回収が考えられる。また、エチオフェンカルブ、ピリ

ミジフェンはGC/MS注入口での熱分解や精製カラムでの吸着などが回収率へ影響したものと考えられる。

一方、溶媒標準溶液による定量値において回収率が120%より大きい値を示した農薬がいくつか認められた。しかし、いずれの農薬もMatrix標準溶液での定量値では70から120%の範囲で良好な回収率が得られた。特に、厚労省検討会では採用されていなかった人参において顕著でマトリックスの影響が大きいことが示唆された。

以上のように低回収率を示した6種類以外の40農薬について、その室間再現性(RSDR)及び分析法精度の指標に用いられるHORRAT_r値の結果はいずれも良好で、HORRAT_r値は1.5以下であった。特に、厚労省判定が示されていないフルシラゾール、ベンダイオカルブ、メチオカルブにおいても良好な値を示したことは、フルシラゾールが抽出液にリン酸緩衝液を使用する個別法であり、ベンダイオカルブ、メチオカルブはポストカラム法によるHPLC分析であることを考慮すると、迅速多成分一斉分析の観点から、本法での適用性を示唆した有用な結果であった。

一律基準値である0.01ppm添加した試験結果を表2-8に示した。上記と同様40種の農薬におけるデータは、感度の低いピレスロイド系農薬は定量値が安定していないが、トマト、人参においてマトリックス標準溶液による定量値が良好であった。ピーマンにおいてもマトリックスの影響が認められる。個々の農産物による定量性の検討、精度管理の必要性があるが、本研究において検討した農薬において0.01ppmでの測定が可能であることが示唆された。

D. 考察

1. 健康危機に係わる化学物質は多く、個々に対応することは極めて困難な課題である。従って、地方衛生研究所の連携、ネットワークの強化が重要であり、特に、試験法のマニュアル化、標準品、情報の提供等の体制整備が必要である。また、市販の簡易検査キットの活用も論議されたが、食品への適用性等課題もあり、今後検討する必要性がある。

2. 農薬のポジティブリスト制度における試験法として平成17年11月29日付厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知(食安発第1129002号)で通知された。今回実施した一斉試験法とは果物、野菜、ハーブ、茶及びホップの場合の最終試験溶液量が2mlから1mlに変更されたことにより、検出限界値が下がり、一律基準を充たす可能性が増した。一方、マトリックスの影響も大きくなる可能性もあり、農産物毎の精度管理がより求められることが予想される。

本研究班で検討した農薬は46種類と基準化された農薬の一割にも満たないが、その物性は多種多様で、試験結果からは多くの情報が得られ、健康危機における化学物質モデルとして効果的な試料となった。また多成分一斉試験及びGC/MS測定の各機関からの結果について有用な論議を通し、問題点、留意事項等々、貴重な情報の共有、技術能力及び精度管理技術の向上が図られた。

特に15の複数機関での共同試験においてネットワーク化、地方衛生研究所間の連携強化ができたことは大きな成果であった。

加えて、精度管理における論議において

は分析法バリデーションの重要性が論議された。農薬の一斉試験法として①今回実施した方法以外に②秋山ら（食衛誌 37, 351, 1996）、③根本ら（食衛誌 41, 233, 2000）、④Fillionら（J.AOAC Int. 83, 698, 2000）などの報告があり、それぞれの特徴がある。

本研究班の会議において兵庫県立健康環境科学研究センターから①、②、④の方法による結果の比較が示され、方法による精度管理を論議した。この課題には厚労省も真度、精度、検出限界、定量限界、特異性、GC/MSでの正確な測定にはマトリックス添加標準溶液、標準添加法の必要性を謳っており、貴重な情報の論議、共有が図られた。

このように本研究により健康危機発生時の地方衛生研究所における検査体制及びネットワークの強化が極めて有効的に推進され、当初の目的を達成できたと考える。しかし、健康危機に係わる化学物質の多様性、検査体制、精度管理等、検討課題も多く、今後さらに地方衛生研究所間の連携による継続した取り組みが望まれる。

E. まとめ

1. アンケート調査では、健康危機発生時の迅速対応が求められるが、検査マニュアル、データベース、試薬等の体制整備において、あらためて地方衛生研究所間の連携、ネットワークの重要性、必要性が確認され

た。

2. 検査体制整備の現状は有機リン系農薬、シアン、ヒ素等の毒・劇物で個別事例の化学物質については、ほぼ各地方衛生研究所とも対応可能であるが、原因物質の特定にはネットワーク、地方衛生研究所間の連携は不可欠である。

3. 精度管理の検討では化学物質モデルとして農薬46種を用い、対象農産物7種類に添加し、GC/MS測定による一斉試験法の精度管理を15機関の共同試験として実施した。

4. GC/MS測定においてマトリックス影響が大きいこと、また回収率の低かった6種の農薬についてその原因を考察した。

5. 40種の農薬の15機関での共同試験は良好な結果を示し、HORRAT_r値は1.5以下であった。

6. フルシラゾール、ベンダイオカルブ、メチオカルブの3種の農薬が今回実施した一斉試験法において適用の可能性を明らかにした。

7. 15機関が共通の化学物質、方法を用いて試験方法の精度管理について共同研究を行ったことは、今後の化学物質による健康危機発生時の迅速な検査体制のネットワークの構築に大きく貢献すると考える。

F. 知的所有権の取得状況

なし

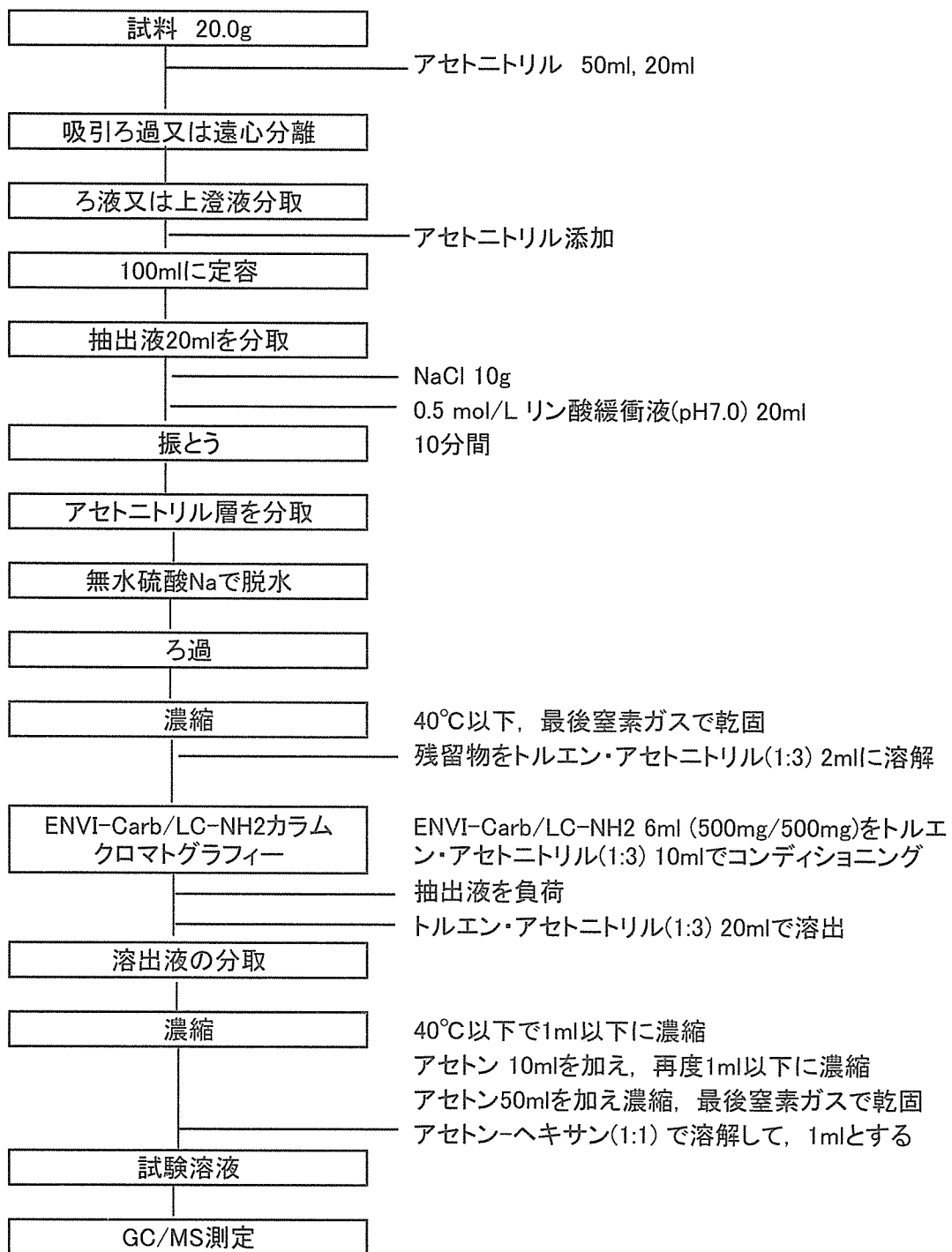


図 1 - 1 農産物中の残留農薬GC/MSによる一斉試験法 (野菜・果物の場合)

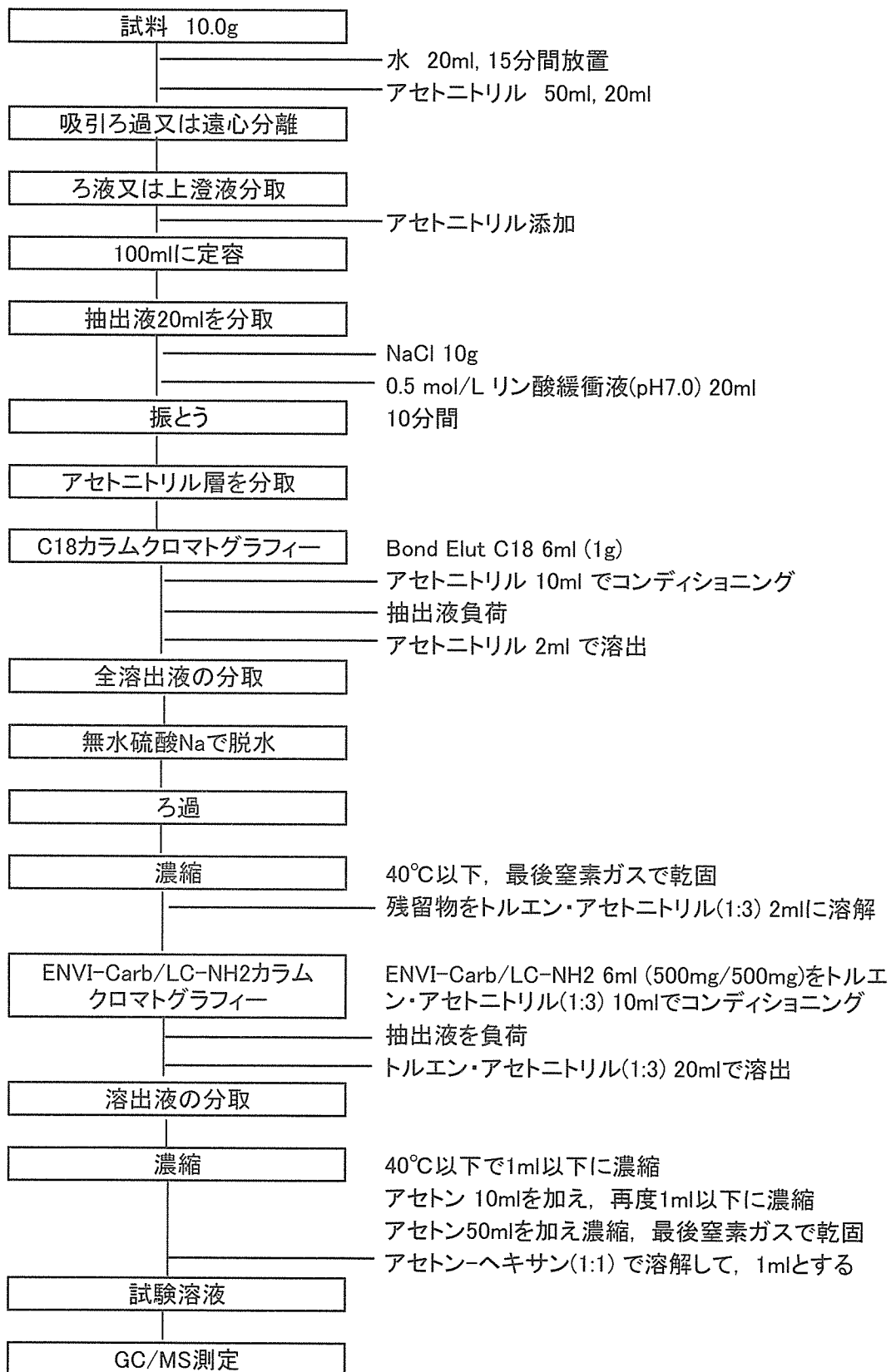


図 1 - 2 農産物中の残留農薬GC/MSによる一斉試験法（穀類・豆類・種実類の場合）

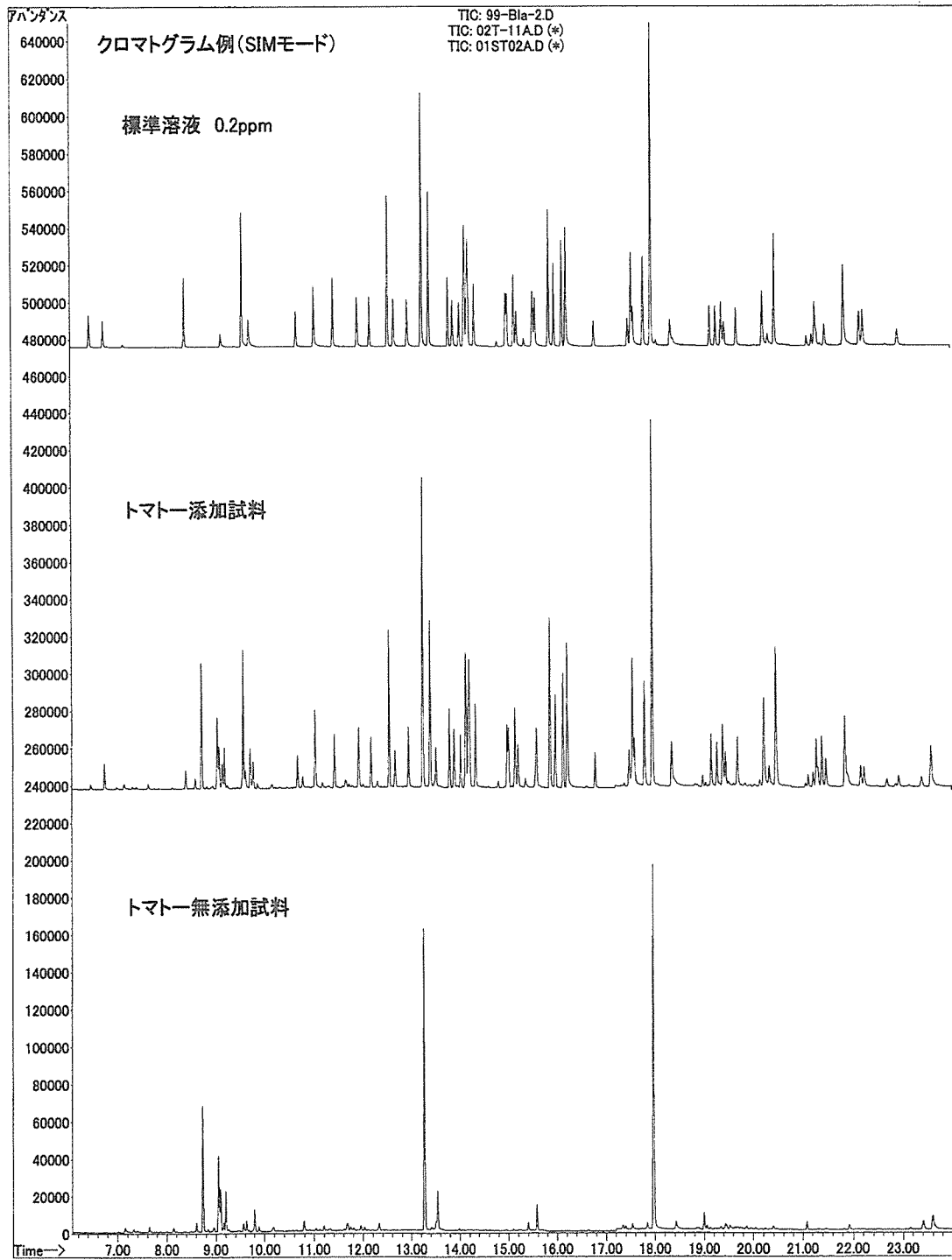


図2 農薬のクロマトグラム例