

200738033A

厚生労働科学研究費補助金

地域健康危機管理研究事業

地域における健康危機に対応するための  
地方衛生研究所機能強化に関する研究

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉村 健清

平成 20 年 3 月

# 目 次

I. 総括研究報告	
地域における健康危機に対応するための地方衛生研究所機能強化に関する研究	
吉村 健清	1
II. 分担研究報告	
1. 健康危機関連化学物質の迅速スクリーニング法の有効性の評価	
織田 肇	7
2. リアルタイム PCR 法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法の検討	
澤田 幸治	32
3. 主要な食中毒原因菌 8 菌種のスクリーニングのための SYBR Green I PCR の検討	
澤田 幸治	44
4. Real-time PCR を用いた食中毒細菌の網羅的検査法の標準化	
澤田 幸治	56
5. 原因不明感染症に対する迅速な包括的診断法の開発と有効性の評価	
織田 肇	65
6. 地方衛生研究所の疫学機能強化に関する研究	
前田 秀雄	71
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	94

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）

総括研究報告書

地域における健康危機に対応するための地方衛生研究所機能強化に関する研究

主任研究者 吉村 健清 福岡県保健環境研究所長

分担研究者

澤田幸治	北海道立衛生研究所長
前田秀雄	東京都健康安全研究センター所長
織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所長

研究協力者

（化学部門）

渡邊 功	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部環境水質課長
田中之雄	大阪府立公衆衛生研究所	食品医薬品部食品化学課長
熊谷信二	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部生活衛生課長
足立伸一	大阪府立公衆衛生研究所	企画総務部企画調整課主任研究員
尾花裕孝	大阪府立公衆衛生研究所	食品医薬品部食品化学課主任研究員
野村千枝	大阪府立公衆衛生研究所	食品医薬品部食品化学課研究員
田中榮次	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部環境水質課主任研究員
味村真弓	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部環境水質課主任研究員
安達史恵	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部環境水質課研究員
小坂 博	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部生活衛生課主任研究員
吉田俊明	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部生活衛生課主任研究員
中川礼子	福岡県保健環境研究所	保健科学部生活化学課長
芦塚由紀	福岡県保健環境研究所	保健科学部生活化学課研究員
山本重一	福岡県保健環境研究所	環境科学部大気課主任技師

（細菌部門）

山口敬治	北海道立衛生研究所	微生物部主任研究員
須釜久美子	福島県衛生研究所	専門医療技師
池田徹也	北海道立衛生研究所	微生物部細菌科研究職員
福島 博	島根県保健環境科学研究所	微生物部長
貫名正文	神戸市環境保健研究所	微生物部長
木股裕子	神戸市環境保健研究所	微生物部
江藤良樹	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課主任技師

中村祥子	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課主任技師
村上光一	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課専門研究員
堀川和美	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課長

(ウイルス部門)

高橋和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長兼感染症部長
加瀬哲男	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部ウイルス課長
川渕貴子	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部ウイルス課研究員
廣井 聡	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部ウイルス課
皆川洋子	愛知県衛生研究所	研究監兼微生物部長
山下照夫	愛知県衛生研究所	微生物部腸管系ウイルス科長
伊藤 雅	愛知県衛生研究所	微生物部腸管系ウイルス科主任
千々和勝己	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課長
世良暢之	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課専門研究員
石橋哲也	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課専門研究員
中山志幸	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課主任技師

(疫学部門)

岸本 剛	埼玉県衛生研究所	感染症疫学情報担当医監
加藤 政彦	群馬県衛生環境研究所	感染制御センター長
森田 幸雄	群馬県衛生環境研究所	感染制御センター感染制御係長
鈴木 智之	群馬県衛生環境研究所	感染制御センター研究員
堀元 栄詞	富山県衛生研究所	感染症情報センター主任研究員
神谷 信行	東京都健康安全研究センター	疫学情報室長
阿保 満	東京都健康安全研究センター	疫学情報室副参事研究員
小野塚 大介	福岡県保健環境研究所	管理部情報管理課主任技師

## 研究要旨

本研究では、①健康危機管理に重要な病原微生物、有害化学物質の網羅的かつ迅速な検査法の検討、②得られた検査法の有効性について疫学的評価を行い、検査法を提示すること、さらに、③健康危機管理に必要な疫学機能強化のための要因を検討することを目的とした。研究1年目の本年度は、リアルタイムPCR法による食水系感染症原因菌の同定、multiplex RT-PCR法等による呼吸器ウイルス・エンテロウイルスの同定、重金属のスクリーニング試験法について検討した。また、今後の地方衛生研究所に必須である疫学機能のあり方および推進強化する具体的方策を、事例分析により検討した。

細菌部門では、インターカレーター法によるReal Time PCR法を検討するため、サルモネラ、セレウス菌ならびに腸炎ビブリオを用いて実証的試験を行った。その結果、同法による検査の場合、菌種によっては、使用する機器、試薬、さらに反応条件によって検出感度が異なることがわかり、試験条件の設定をさらに検討することが必要と考えられた。

ウイルス部門では、multiplex RT-nested PCRの系を検討したが、Parainfluenza 1~4については、ウイルス分離と比較しても感度は良好であった。また、過去にウイルスが分離できなかった63検体中1検体からインフルエンザA/H1N1型が検出された。一方、エンテロウイルスの同定型別のための3種のプライマーを検討した結果、VP4-VP2領域のプライマーを用いると最も高感度であることがわかった。

化学部門では、入手した26地衛研の健康危機対応検査マニュアル類から重金属の分析法を抽出し、各分析法を検討した。その結果、迅速スクリーニング分析法としては「試料を水または希酸で抽出し、誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP/AES)や誘導結合プラズマ質量分析法(ICP/MS)により測定する方法」が妥当との中間的結論が得られた。また、マイクロウェーブ分解装置による試料の前処理とICP-MS及び水銀分析計を組み合わせた方法を検討した結果、同法が重金属の網羅的、迅速な検査法として、十分適用可能であると考えられた。

疫学部門では、地研の疫学機能を推進強化する要因を実際の5事例についてPRECEED-PROCEED Modelを用いて検討した結果、地研のあり方の再検討、組織体制の強化、所属自治体・地方衛生研究所全国協議会等との連携の推進等の様々な要因が複合的に作用して推進強化されていることが明らかとなった。

### A. 研究目的

地域における健康危機管理体制の一翼として、地方衛生研究所の機能強化が求められている。そこで、本研究は健康危機発生時に対応するため、微生物(細菌、ウイルス)、化学物質を網羅的かつ迅速に分析する手法を検討し、そ

れぞれの検査手法の有効性を疫学的に評価することと、地研の疫学機能強化のための課題と対策を明らかにし、地研の機能強化を図ることを目的とする。今年度は、まず網羅的かつ迅速な検査法の検討を行うことと、地研疫学機能の実態を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### B-1 (細菌部門) インターカレーター法による Real Time PCR 法の検討

検出対象とした菌種は、*Salmonella Enteritidis*、*Escherichia coli* O157、*Campylobacter jejuni*、*Staphylococcus aureus*、*Clostridium perfringens*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Bacillus cereus* 及び *astA* positive *E. coli* であった。Real Time PCR の機器としては、ABI 社製の 7000 型、および、7700 型を用いた。また、反応試薬は SYBR Green 系の試薬を 2 種類使用し、検出結果を比較検討した。

### B-2. (ウイルス部門) multiplex RT-nested PCR 法の検討

過去の文献を調査し、主に呼吸器ウイルスを検出する multiplex RT-nested PCR 法について、プライマーや反応条件を検討した。その結果、確立した手法を用いて、パラインフルエンザウイルスを用いた検出感度の検討、過去にウイルス分離が陰性であった検体についての試験を行った。また、エンテロウイルスを検出するためのプライマーについて、比較検討を行った。

### B-3. (化学部門) 重金属の迅速診断法の確立

#### B-3-1. 地方衛生研究所検査マニュアルの精査

全国の地方衛生研究所 (26 機関) から化学物質健康危機対応検査マニュアルを収集した。収集した検査マニュアルから食品および水試料中のヒ素、水銀、カドミウム、鉛の分析法を抽出し、簡易法、スクリーニング法、確認・定量法に分類した。さらに、それぞれの特徴の把握を行い、迅速スクリーニング法構築の観点から精査・評価した。

#### B-3-2. マイクロウェーブを用いた迅速分析法の検討

高感度還元気化水銀分析装置は日本インス

ツルメンツ社製のマーキュリー/RA-2A を、ICP-MS は Agilent 社製の 7500cs を使用した。

ICP-MS において、カドミウム、鉛、ヒ素の多成分分析を行うための測定条件の検討を行った後、各元素について検量線を作成した。

### B-4. (疫学部門) 疫学機能の強に向けての具体的方策の検討

既に実施されている各地研の疫学機能事例を保健行動モデル (PRECEED-PROCEED Model) を用いて分析し、地研疫学機能のあり方及びその強化に必要な政策を探求し、提案する。調査対象事例は、次の 5 事例であった。

①群馬県「感染制御センターにおける疫学調査機能について」

②東京都「K-net (東京都感染症情報ネットワーク)」

③埼玉県「埼玉県感染症情報センター」

④神戸市「結核菌分子疫学調査体制」

⑤愛媛県「中四国インフルエンザ検査情報ネットワーク」

#### (倫理面への配慮)

本研究においては、検査手法の疫学的評価が主になっているため、本研究における倫理面への対応は、特に必要ないものと思われる。

## C. 研究結果

### C-1. (細菌部門) インターカレーター法による Real Time PCR 法の検討

サルモネラの試験では、SYBR Premix Ex Taq を使用した場合、主要な血清型全てが増幅された。しかし、Power SYBR Green PCR Master Mix を使用した場合は、アニーリング温度を 55℃ に下げることにより、初めて増幅された。同様の結果は、セレウス菌ならびに腸炎ビブリオでみられた。同法を導入するには、機器、試薬等により検出できない

例もあることから、個別に試験条件の設定が必要と考えられる。

## C-2. (ウイルス部門) multiplex RT-nested PCR法の検討

Parainfluenza 1~4について multiplex RT-nested PCRの系を検討し、その結果、検出限界は $10^2$ ~ $10^4$ TCID<sub>50</sub>であり、感度は良好であった。また、過去に呼吸器症状を示す患者から採取され、ウイルスが分離同定できなかった63検体について、同法を適用したところ、新たに1検体からインフルエンザA/H1N1型が検出された。一方、エンテロウイルスの同定型別のための種々のプライマーを検討した結果、VP4-VP2領域のプライマーを用いると最も高感度であることがわかった。

## C-3. (化学部門) 重金属の迅速検査法の確立

### C-3-1. 地方衛生研究所検査マニュアルの精査

26地衛研の健康危機対応検査マニュアル類から食品及び水中のヒ素、水銀、カドミウム、鉛の分析法を抽出し、精査・評価した。その結果、迅速分析法として「試料を水または希酸で抽出し、澄明化した抽出液中の金属を誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP/AES)や誘導結合プラズマ質量分析法(ICP/MS)により測定する方法」が妥当と結論づけられた。

### C-3-2. マイクロウェーブを用いた迅速分析法の検討

マイクロウェーブを用いた迅速分析法では、ヒ素、カドミ、鉛、水銀のプランクテストや検量線作成を実施し、健康危機管理のための試験に十分耐えうる結果を得た。

## C-4. (疫学部門) 疫学機能の強に向けての具体的方策の検討

事例の検討から、地研のあり方の再検討、組織体制の強化、連携の推進等の様々な推進要因が複合的に作用して事業が推進されているこ

とが明らかとなった。それらの要因を、前提要因、実現要因、強化要因、環境要因に分けると、次のようになる。

### 1) 前提要因

- ① 地方自治体の疫学機能に対する必要性の高まり
- ② 優れた試験検査機能・実績
- ③ 本庁・保健所との役割分担の見直し

### 2) 実現要因

- ① ジョブ・ローテーションによる人材育成
- ② 多職種の職員配置による組織の広角化
- ③ 実務的疫学研修の履修による基盤強化
- ④ 疫学業務専管組織の配置
- ⑤ 試験検査部門と疫学情報部門の連携体制の強化
- ⑥ 政策的方向性の明確化

### 3) 強化要因

- ① 厚生労働科学研究等研究助成事業への参加
- ② 保健所・市町村との交流
- ③ 関係機関との連携
- ④ マスコミからの取材
- ⑤ 地方衛生研究所ネットワークの交流

### 4) 環境要因

- ① 属人的要因
- ② 財政的要因
- ③ 組織風土

## D. 考察

細菌部門における、インターカレーター法によるReal Time PCR法は、今回対象とした菌種については、ほとんど検出可能であり、実際に健康危機発生時の検査として、実用化が可能であると考えられる。しかし、使用するReal Time PCRの機種、反応試薬の種類、反応条件等により検出感度が異なることが明らかになり、検査法として確立するためには、さらに、条件を検討する必要がある。



ウイルス部門において検討した multiplex RT-nested PCR 法については、パラインフルエンザウイルスを用いた実験で、十分な感度があることが示され、また、ウイルス分離陰性であった検体からインフルエンザウイルス A/H1 亜型が検出された。これらのことから、呼吸器症状を呈する患者の検査に使用できると考えられた。また、多様な臨床症状を示し、また型が非常に多いエンテロウイルスについて、迅速な型別を行うための PCR に使用するプライマーを検討し、使用可能と思われるプライマーを確認できた。

次に、化学部門では重金属の迅速検査法を検討した。地方衛生研究所のマニュアルを調査・検討した結果、迅速分析法としては、誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP/AES) や誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP/MS) が適当という結果を得た。なかでも、ICP/MS ではより高感度の測定が期待できるため、ヒ素、カドミウム、鉛の測定では、マイクロウェーブ分解後に ICP/MS を使用することが可能と考えられた。生体試料からの検出についても、ICP/MS が使用できると考えるが、測定条件をさらに検討する必要がある。

以上 3 部門で検討している、網羅的検査法については、さらに実証的な検証を行い、実用化し、地方衛生研究所における検査法として推奨できることを目指す。

一方、疫学部門で行った、地方衛生研究所の疫学機能の強化に向けての具体的方策の検討では、事例検討の結果、推進要因がいくつか挙げられた。これらの要因を解析し、疫学機能を推進するために、各地方衛生研究所、地方衛生

研究所全国協議会、本庁、厚生労働省の実施すべき方策を提案した。

#### E. 結論

健康危機に対応するためには、地方衛生研究所の機能強化が必要であるが、本研究においては、病原微生物 (細菌、ウイルス)、毒性化学物質の迅速診断法を検討し、食水系感染症原因細菌、呼吸器ウイルス、エンテロウイルス、重金属についての検査法について、実用化が可能と考えられる方法を確立した。今後は、さらに実証的な検証を行い、検査の条件等を改良し、地方衛生研究所全体へ普及できる方法を検討する。

また、疫学的機能の強化については、本年度に検討された具体策を基に、さらに実効性のある方策を、今後考案する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得情報

なし

## Ⅱ. 分担研究報告

地域における健康危機に対応するための地方衛生研究所機能強化に関する研究

分担報告書

健康危機関連化学物質の迅速スクリーニング法の有効性の評価

主任研究者	吉村健清	福岡県保健環境研究所	所長
分担研究者	織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所	所長
協力研究者	渡邊 功	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部環境水質課長
	田中之雄	大阪府立公衆衛生研究所	食品医薬品部食品化学課長
	熊谷信二	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部生活衛生課長
	足立伸一	大阪府立公衆衛生研究所	企画総務部企画調整課主任研究員
	尾花裕孝	大阪府立公衆衛生研究所	食品医薬品部食品化学課主任研究員
	野村千枝	大阪府立公衆衛生研究所	食品医薬品部食品化学課研究員
	田中榮次	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部環境水質課主任研究員
	味村真弓	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部環境水質課主任研究員
	安達史恵	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部環境水質課研究員
	小坂 博	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部生活衛生課主任研究員
	吉田俊明	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部生活衛生課主任研究員
	中川礼子	福岡県保健環境研究所	保健科学部生活化学課長
	芦塚由紀	福岡県保健環境研究所	保健科学部生活化学課研究員
	山本重一	福岡県保健環境研究所	環境科学部大気課主任技師

研究要旨

健康危機優先順位が高い重金属を対象とし、種々の試料（食品、水、生体試料）に適用できる標準的な重金属の迅速スクリーニング分析法を新たに構築することを試みた。

全国の地方衛生研究所で設定されている健康危機対応検査マニュアルを収集し、入手できた 26 地衛研の健康危機対応検査マニュアル類から食品および水試料中のヒ素、水銀、カドミウム、鉛の分析法を抽出し、分析操作性などを基準に簡易法、スクリーニング法、確認・定量法に分類し、各分析法の特徴の把握・整理及び精査・評価した。その結果、目指すべき迅速スクリーニング分析法は「試料を水または希酸で抽出し、澄明化した抽出液中の金属を誘導結合プラズマ発光分光分析法

(ICP/AES) や誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP/MS) により測定する方法」が妥当との中間的結論が得られた。

また、マイクロウェーブ分解装置による試料の前処理と ICP-MS 及び水銀分析計を組み合わせた方法を構築することを目的とし、今年度はその準備段階として、ICP-MS 等の機器分析における測定条件の検討と試薬調製等に使用する水のブランケットテストを行った。その結果、構築する分析法が健康危機管理のための試験に十分適用可能であると考えられた。

さらに、尿中鉛、カドミウム、水銀およびヒ素濃度を ICP-MS で測定する方法について文献検索を行った結果、28 件が抽出された。これらの中から、前処理が簡便で 4 つの金属が同時に測定でき、かつガスクロマトグラフ、イオンクロマトグラフあるいは高速液体クロマトグラフなどを使用しないで ICP-MS だけで測定する方法が健康危機管理時の測定法として適切であると考えられた。

## A. 研究目的

平成 10 年 7 月に和歌山市で発生した「カレー毒物混入事件」後、本事件を教訓とし、地域における健康危機に際し、地方衛生研究所が迅速かつ的確にその原因究明を行うことが被害の拡大防止や治療法の決定のために重要であると認識された。このためには、健康危機管理要領の策定、資材・設備・機器等の整備、検査に係わる人材の育成・研修、定期的な訓練に加え、迅速で正確な検査マニュアルの整備が必要である。平成 17 年度厚労科学研究「健康危機管理のための地方衛生研究所のあり方に関する提言」によると、地方衛生研究所が保有する健康危機対応検査マニュアルについては、全国で 23 機関の地方衛生研究所で健康危機対応検査マニュアルが作成されていると報告されている。しかし、検査項目や検査対象物質は示されているものの、標準的な検査マニュアルについては示されていない。

本研究では、健康危機管理上優先順位が高い重金属、すなわち米国 CDC (疾病管理予防センター) の ATSDR (毒物および難病登録局)

の優先順位リスト上位化合物であるヒ素、水銀、カドミウム、鉛を検査対象項目とし、食品、水、生体試料を検査対象物質として、標準的な重金属の迅速スクリーニング分析法を新たに構築することとした。また、構築した迅速スクリーニング分析法の有効性を評価するとともに、地方衛生研究所の健康危機管理の対応能力を向上させることを目的とした。

## B. 研究方法

### B-1. 地方衛生研究所検査マニュアルの精査(食品・水)

#### B-1-1. 情報収集

全国の地方衛生研究所(77 機関)にアンケート調査を行い、各機関で設定されている化学物質健康危機対応検査マニュアルを収集した。その結果、26 地衛研から情報の提供を受けた。

#### B-1-2. 検査マニュアルの分類

収集した検査マニュアルから食品および水試料中のヒ素、水銀、カドミウム、鉛の分析法を抽出し、これらに記載されている分析法を、分析操作性などを基準に簡易法、スクリーニング

法、確認・定量法に分類した。簡易法は試料水抽出液等に浸すだけで結果を短時間に肉眼比色判定できる試験紙やキット類を、また、スクリーニング法は測定物質を誤認せずある程度の精度で迅速に定量できる方法を、さらに確認・定量法は確実な抽出、灰化等妨害成分を排除する精製、精度の高い検出系を組み合わせた分析法を対象とした。

### B-1-3. 検査マニュアルの精査・評価

分類した簡易法、スクリーニング法及び確認定量法について、それぞれの特徴の把握を行い、迅速スクリーニング法構築の観点から精査・評価した。さらに予備実験として数種の食品などに4金属を添加し、想定された迅速スクリーニング法で分析できるか検討した。

## B-2. マイクロウェーブを用いた迅速分析法

### B-2-1. 試薬及び器具

重金属測定用の標準溶液は、SPEX社製の誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)用重金属混合標準溶液XSTC-331(29元素混合10ppm溶液)及び和光純薬工業株式会社製の水銀標準液(1000mg/L)を用いた。濃硝酸は和光純薬工業株式会社製の超微量分析用を使用した。内部標準溶液には、SPEX社製のインジウム標準液(1000mg/L)を用いた。

### B-2-2. 装置

高感度還元気化水銀分析装置は日本インストルメンツ社製のマーキュリー/RA-2Aを、ICP-MSはAgilent社製の7500csを使用した。超純水製造装置はミリポア社のmiliQ SP UFを使用した。

### B-2-3. 測定条件の検討

ICP-MSにおいて、カドミウム、鉛、ヒ素の多成分分析を行うための測定条件の検討を行った後、各元素について検量線を作成した。

10ppmのカドミウム、鉛、ヒ素を含む市販の混合標準液を2%硝酸で希釈し、1、2、5、10、20、50、100ppbの7点の濃度で検量線用標準液を作製した。各標準溶液5mlに、1000ppb溶液に希釈した内標準のインジウム標準溶液を50μLずつ加えてよく混合した後、検討したICP-MSの条件で測定を行った。得られた測定結果より、検量線を作成した。水銀については別途マイクロウェーブ分解粗抽出液の一部をとり、還元気化水銀分析計を用いて分析を行うこととした。水銀分析計はゼロと10ppbの2点検量線で測定した。

### B-2-4. 試薬調製の水のブランクテスト

迅速スクリーニング法の構築に向けての準備段階として、試薬調製等に使用する水のブランクテストを行った。精製水を蒸留して作製した蒸留水と、超純水製造装置で精製した超純水(miliQ)のブランク値を、カドミウム、鉛、ヒ素はICP-MSで、水銀は還元気化水銀分析計で測定した。ICP-MSの分析は、水サンプル5mlに内標準(インジウム1000ppb)50μLを加えて混合し、内部標準法で分析した。

## B-3. 生体試料中の迅速分析法

### B-3-1. 地方衛生研究所の検査マニュアル

全国の地方衛生研究所で設定されている検査マニュアルの中から、生体試料中の無機物の測定法を抽出した。

### B-3-2. 文献検索

文献検索サービスPubMedにより、尿中の鉛、カドミウム、水銀およびヒ素濃度をICP-MSを用いて測定している文献を抽出した。また、抽出された文献では測定法の詳細を記述しないで、別の文献を引用している場合は、その文献も抽出した。

## C. 研究結果

### C-1. 地方衛生研究所検査マニュアルの精査(食品・水)

#### C-1-1. 試験法の抽出・分類

ヒ素、水銀、鉛、カドミウムについて分析法を抽出し、簡易法、スクリーニング法及び確認・定量法の3方法に分類しその概要を以下にまとめた。

##### C-1-1-1. ヒ素

代表的なヒ素の分析手法の概要を表1に示した。

##### C-1-1-1-1. 簡易法

15機関が簡易法を設定し、メルコクアントカパックテストのキット法を採用している場合が多い。メルコクアントヒ素イオン試験キットでは、ヒ素を30分の水素化反応後試験紙の呈色で判定し、試験紙の呈色を標準色素表と比較することで大まかな定量が可能である。パックテストでは酸化モリブデン法の呈色反応により判定している。

##### C-1-1-1-2. スクリーニング法

7機関がスクリーニング法を設定している。試料の抽出では、水または希硝酸により抽出し、ICP-MS、ICP/AES、水素化原子吸光で定量的に測定しているが、前処理にほとんど手をかけずに蛍光 X 線により定性的に検出する機関もある。

##### C-1-1-1-3. 確認・定量試験

21機関が確認・定量試験を設定している。ほとんどの機関が試料の灰化後ヒ素を測定するが、マイクロウェーブを所有している機関では短時間に灰化を行える。手作業では加熱灰化中にヒ素が揮散しやすいので乾式ではなく湿式灰化を採用している機関が多い。検出系はスクリーニング法と同じような手法が多いが、ジエチルジチオカルバミン酸銀法により比色測定

する例もあった。マイクロウェーブ処理以外の灰化には時間を要するので本研究で求められる迅速性には適していない。一方岩手県では、カレーに添加したヒ素を水抽出する場合とマイクロウェーブ抽出した場合で回収率を比較しているが、水抽出だけでも遜色ない結果を示しており、本研究の方向性を考える上で有用な情報と考えられる。

##### C-1-1-2. 水銀

代表的な水銀の分析手法の概要を表2に示した。

##### C-1-1-2-1. 簡易法

2機関が簡易法を設定し、1機関がヨシテスト水銀を採用しているが、当該キットは現在市販されていないようである。従って水銀を市販キットにより簡易検査できる可能性は極めて低いと思われる。

##### C-1-1-2-2. スクリーニング法

4機関がスクリーニング法を設定している。主な手法は、試料を水抽出後金アマルガム捕集原子吸光測定する方法、試料を希硝酸抽出後ICP-MSにより測定する方法などがある。

##### C-1-1-2-3. 確認・定量試験

17機関が確認・定量試験を設定している。水銀分析では一部機関でマイクロウェーブ灰化抽出を行う以外は、スクリーニング法と同じような方法を組み合わせて定量・確認法として位置づけている機関が多い。従って個々の機関が区別しているスクリーニング法と定量・確認試験法は内容的には大差がない。

##### C-1-1-3. 鉛

代表的な鉛の分析手法の概要を表3に示した。

##### C-1-1-3-1. 簡易法

1機関だけが簡易法を設定している。鉛やカドミウムについてはほとんどの機関が日常的に検査しており、特に簡易法を設定しなくても

迅速に検出できる体制ができていることが簡易法をほとんど設定していない理由かもしれない。

#### C-1-1-3-2. スクリーニング法

6 機関がスクリーニング法を設定している。主な手法は、試料を水や希硝酸抽出後原子吸光や ICP-MS により測定する方法などである。定性的には蛍光 X 線測定も設定されている。手動灰化を前処理に採用している機関は少ない。

#### C-1-1-3-3. 確認・定量試験

18 機関が確認・定量試験を設定している。大まかにとらえてスクリーニング法と確認・定量試験の違いは、確認・定量試験では試料の灰化抽出をほとんどの機関が採用していること、灰化後さらに溶媒(DDTC-MIBK)抽出を追加、検出系にフレイムレス原子吸光の採用などである。

#### C-1-1-4. カドミウム

代表的なカドミウムの分析手法の概要を表 4 に示した。多くの機関において基本的には同じ分析法をカドミウムと鉛試験法に採用している。

##### C-1-1-4-1. 簡易法

2 機関が簡易法を設定し、2 機関がヨシテストカドミウムを採用しているが、市販されていることを確認できなかった。

##### C-1-1-4-2. スクリーニング法

6 機関がスクリーニング法を設定している。主な手法は、試料を水や希硝酸抽出後原子吸光や ICP-MS により測定する方法などがある。定性的には蛍光 X 線測定も設定されている。

##### C-1-1-4-3. 確認・定量試験

18 機関が確認・定量試験を設定している。鉛と同様にスクリーニング法と確認・定量試験の違いは、確認・定量試験では試料の灰化抽出をほとんどの機関が採用していること、灰化後さ

らに溶媒(DDTC-MIBK)抽出を追加、検出系にフレイムレス原子吸光の採用などである。

#### C-1-2. 分析法の評価

##### C-1-2-1. 簡易法

健康危機管理時など緊急時に食品試料中の化学物質を分析する場合、まず何がどの程度含まれているのかを迅速に明らかにすることが要求される。試料水抽出液などに浸すだけで結果を短時間に肉眼比色判定する試験紙法はその条件をかなり満たしている。問題点としては、一成分だけしか検出できず、未知成分の検出には適していない。また、測定に食品成分の影響を受ける場合もあり精度の点では劣る可能性がある。さらに現在販売が中止されているキット類もあり、標準的な初期検査手法として採用しにくい。

##### C-1-2-2. スクリーニング試験

一般的な金属類の分析では、前処理法として食品成分など有機成分を分解(灰化)して妨害成分を除いてから対象成分の測定を行うことが多い。しかし灰化には特殊な装置か手間と時間を要する。中毒症状を起こすような事例では、試料中の対象成分濃度が比較的高いことが予測される。また原因成分は意図的あるいは非意図的に試料に加えられる可能性が高い。従って試料に蓄積した成分が主対象ではないので、抽出効率が高くなくても対応できると考えられる。検出感度や選択性の高い分析装置あるいは検出反応を用いれば、抽出液を希釈することにより共存成分の影響が減り灰化などの前処理操作を省いても測定することは可能と考えられる。岩手県が行ったマイクロウェーブ灰化と灰化なしの比較実験では、添加食品中のヒ素濃度に大きな差は認められなかった。

危機原因物質を迅速に分析することを目指す本研究では、試料を水や希酸溶液で抽出し、

その抽出液を希釈後測定するスクリーニング法が一番重要と考えられる。

#### C-1-2-3. 確認・定量試験

金属分析において精度を高めるには、食品など共存成分を無機物に分解する灰化操作が、手法としては明解で効率がよい。灰化は抽出と精製の両操作を兼ねているが、電気炉での加熱分解（乾式灰化法）は一夜以上の長時間が必要である。また揮散性のあるヒ素や水銀には適していない。加熱した鉍酸による分解（湿式灰化法）はやや時間が短く概ね3-5時間であるが、常に灰化を監視しながら分解を行うので操作が煩雑である。最近普及しつつある高周波（マイクロウェーブ）による加熱条件下での酸分解法は、1時間を目途に灰化を行い、灰化装置が自動的に灰化を制御する。高周波分解を導入すれば約1日以内で分析結果を出せるが、旧来の灰化法を使用すれば分析に2日以上必要となる。各機関の高周波分解装置の導入割合は26機関中4機関のみで、普及度が低いのが難点である。各機関での導入率の低さを考慮すれば、緊急時における標準的な分析法としては採用しにくいと判断した。

#### C-1-2-4. 予備試験

分析法評価から判断して今後の方向性は、試料抽出液を灰化せずにICP/MSやICP/AESで網羅的に金属を検出する分析法が示唆された。そこで図1に示すような方法で予備的な添加回収試験を行った。その結果ほぼ満足できる結果を得られた。

### C-2. マイクロウェーブを用いた迅速分析法

#### C-2-1. 測定条件の検討

ICP-MSにおいて、ヒ素、カドミウム、鉛の同時分析を行うための測定条件を検討した後、1-100ppbの範囲で7点の濃度の標準溶液を測

定し、検量線を作成した。測定条件を表5に示す。水銀は還元気化水銀分析計を用いて、波長253.7nmで測定を行った。ヒ素、カドミウム、鉛のいずれの元素の検量線も、1-100ppbの範囲で良好な直線性が得られた。

#### C-2-2. 試薬調製用の水のブランクテスト

次に、実験に使用する水として蒸留水と超純水(miliQ)におけるヒ素、カドミウム、鉛、水銀のブランク値を測定した結果、どちらの水もほぼ同程度の値(0.2ppb以下)であった。これらの値であれば、健康被害発生時の食品等の検査には問題なく使用可能であると考えられた。

### C-3. 生体試料中の迅速分析法

#### C-3-1. 地方衛生研究所の検査マニュアル

全国の地方衛生研究所で設定されている検査マニュアルの中で生体試料中の無機物の測定法を記載したものを表6にまとめた。福岡県保健環境研究所では、胃吸引物および血液・胆汁中のアジ化ナトリウム、尿中のヒ素が、熊本県保健環境科学研究所では、胃内容物、尿、血液および茶中のアジ化ナトリウムの測定法が定められていた。

#### C-3-2. 文献検索

選択された文献と概要を表7に示す。文献数は28であるが、1つの文献に複数の金属の測定法が記述されているものも多く、鉛、カドミウム、水銀、およびヒ素の測定法を記述したものはそれぞれ16、10、7、12であった。

前処理法として様々なものが記載されており、例えば、②尿を硝酸で希釈する(酸性調整する)、⑤尿を硝酸・塩酸で希釈する(酸性調整する)、③尿を鉍酸で加熱湿式分解後、水で希釈、④尿を遠心分離後、上澄み液を超純水で希釈する、⑥尿を遠心分離後、上澄み液をろ過し、硝酸で希釈する、①尿をpH1.0-1.1に調整し活性炭



を加えて過熱し、さらに APCD と反応させた後、MIBK 抽出し、蒸発乾固後、硝酸・過酸化水素で溶出する、㊸尿を塩酸・重クロム酸カリウム溶液で希釈、などの方法が記載されていた。さらに内部標準として、Re、Bi、Rh、Ir、Sc、Ge、Y、Tb など添加して測定試料としている。

水銀およびヒ素については、無機・有機を分離して測定する方法、あるいはイオン価により分離して測定する方法も示されている。例えば、㊹尿に塩酸および NaBH<sub>4</sub> を添加し、ヘリウムでバブリングして、生じたガスを乾燥用チューブを通した後、液化窒素でトラップし、さらにガスクロマトグラフで分離して最後に ICP-MS で検出する、㊺尿を遠心分離後、ろ過し、内部標準を添加後、イオンクロマトグラフあるいは高速液体クロマトグラフで分離して最後に ICP-MS で検出する、などである。

ICP-MS の検出 m/z は、鉛が 204、206、207、208、カドミウムが 111、114、水銀が 200、202、およびヒ素が 75 であった。検出限界は文献によって大きく異なり、鉛では 0.01 - 1 μg/L、カドミウムでは 0.01 - 0.15 μg/L、水銀では 0.01 - 0.5 μg/L、ヒ素では 0.002 - 2 μg/L が示されている。

## D. 考察

### D-1. 地方衛生研究所検査マニュアルの精査(食品・水)

一般的な金属分析では、まず測定対象を定め最も感度や選択性が高い検出系により測定する。例えば原子吸光分析がこれに該当する。今回調査した地衛研マニュアルには最初から測定金属を限定し、それぞれの金属ごとに最適の検出系を選ぶように指示されているものがあった。

しかし健康危機状況では測定対照が明確化できないと想像されるので、まず網羅的に金属種を測定することが検出の第一段階となる。先の原子吸光分析では、金属種ごとに波長の異なるランプを装着したり、水銀測定には専用装置が必要となる。従って高感度ではあるが、網羅的に未知成分を探索するには適していない。蛍光 X 線測定は定性的な情報が主であり、比色分析は単一金属を対照にしており多成分分析には適用しにくい。

誘導結合プラズマ質量分析 (ICP/MS) では金属の質量を、誘導結合プラズマ発光 (ICP/AES) では励起状態での発光波長を指標にしており、極めて金属特異的かつ安定した高感度検出が可能である。ICP 系の測定には走査モードがあり、一度の測定で連続的に金属種を探索・定量できるので、未知成分の探索にも適している。また質量や発光波長といった絶対的な指標を用いるので、装置が正常に作動していれば標準物質が無くても定性判断が可能である。定量モードでは比較的感度の劣る ICP/AES においても数十 ppb レベルでの測定が可能で、ICP/MS ではより高感度の測定が期待できる。装置の普及度においても、ICP/MS は全国の衛生研究所に配備されており標準的な分析法に組み入れても支障のない状況である。

予備試験で添加した金属濃度は 0.1ppm であるが、この添加試料を 10g (約スプーン一杯) 食べた想定すると 1mg 摂取に相当し、体重を 50kg とすれば 0.02mg/kg の体中濃度となる。毒物であるヒ素や水銀の経口致死量は約 1mg/kg レベルなので、その 1/50 程度の試料中の 4 金属を定量出来る方法であり、簡単ではあるが有害成分の探索分析法としての条件を満たしていると考えられる。

## D-2. マイクロウェーブを用いた迅速分析法

マイクロウェーブ分解後に用いる測定機器として、ヒ素、カドミウム、鉛は ICP-MS を、水銀は気化しやすいことから還元気化水銀分析計を用いて行うこととした。各元素の測定条件の検討を行い、標準溶液の測定、さらに試薬調製用の水のブランクテストを行った結果、健康被害発生時の食品等の試験に問題なく使用できると考えられた。

今後、食品及び生体試料の実試料について、マイクロウェーブ前処理装置による分解条件の検討を行った後、添加回収試験及び環境標準試料(認証値付き試料)の定量を行い、分析法の検証を行いたいと考えている。

## D-3. 生体試料中の迅速分析法

生体試料の分析については、前処理が簡便で4つの金属が同時に測定でき、かつガスクロマトグラフ、イオンクロマトグラフあるいは高速液体クロマトグラフなどを使用しないで ICP-MS だけで測定する方法を採用する。しかし、当所の ICP-MS で測定できる条件などが文献で採用されている方法とは異なっている可能性もあるため、実際に尿に金属を添加して測定条件を検討する必要がある。

## E. 結論

### E-1. 地衛研検査マニュアルの精査(食品・水)

26 地衛研から提供された情報の精査、迅速法開発という観点から考えると、目指すべき分析法の概略は、試料を水又は希硝酸などで抽出→遠心分離(食品除去)→ろ過(浮遊物除去)→希釈→測定(ICP/AES、ICP/MS)という手順が最適と結論した。来年度は分析法としての詳細条件を検討した上で、精度、再現性、適応出来る試料の範囲の検証などを行い健康危機

管理下における金属分析法を確立したい。

## E-2. マイクロウェーブを用いた迅速分析法

マイクロウェーブ分解装置を用いた重金属の迅速分析法を構築するための準備段階として、測定機器の条件の検討や、試薬調製用の水のブランクテストを行った。その結果、健康危機管理のための試験に十分耐えうる結果を得た。

## E-3. 生体試料中の迅速分析法

生体試料の分析については、地方衛生研究所の中で検査マニュアルを作成しているところは2研究所のみであった。尿中鉛、カドミウム、水銀およびヒ素濃度を ICP-MS で測定する方法について文献検索を行った結果、28 件が抽出された。これらの中から、前処理が簡便で4つの金属が同時に測定でき、かつガスクロマトグラフ、イオンクロマトグラフあるいは高速液体クロマトグラフなどを使用しないで ICP-MS だけで測定する方法が健康危機管理時の測定法として適切である。

## F. 研究危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権の取得情報

なし

表1 地衛研が作成した検査マニュアル中の代表的なヒ素の分析手法の概要

都道府県名	岩手県	横浜市	横須賀市	京都府	和歌山市	集計
簡易テスト法	なし	なし	簡易キット	簡易キット	なし	15
操作概要			試料を水で10-100倍希釈	ヒ素を水酸化後酸化させ、懸垂ろ紙上での呈色反	パックテスト(環境水)	
検出系			パックテスト	メルコクアント Arsen-test 標準色変表と比較		メルコクアント Arsen-test:6 パックテスト:2 グートツアイト(半定量):1 ろ紙呈色:1 不明:5
特徴			定性試験	検出限界 2ppm		
スクリーニング試験	あり	なし	あり	あり	あり	7
操作概要	試料を水で抽出後キャピラリー電気泳動		試料に水を加え混和後ろ過	蛍光X線分析法、湿式灰化後ICP、ICP-MS	試料を希硝酸で抽出し、ICP-MS測定	
検出系	キャピラリー電気泳動		水素化原子吸光	蛍光X線、ICP-AES、ICP-MS	ICP-MS	水素化物発生-原子吸光:3 蛍光X線:2 ICP-AES:2
特徴	ヒ酸化合物、亜ヒ酸化合物として測定 ICP測定も可			蛍光X線分析法は定性的だが、前処理が簡単	半定量の位置づけ	
確認・定量試験	あり	あり	あり	あり	あり	21
操作概要	マイクロウェーブ抽出後ICP-AES分析	試料を水で希釈し原子吸光分析	蓋をして硝酸を加えて加熱分解	湿式灰化後、水素化原子吸光分析	試料をマイクロウェーブで灰化後、ICP-MS測定(食品) 水素化物発生-原子吸	
検出系	ICP-AES	水素化原子吸光	水素化原子吸光	水素化原子吸光	ICP-MS	水素化物発生-原子吸光:9 ICP-AES:4 ICP-MS:8 分光光度計:3
特徴	金属類(ICP/発光)として記載マイクロウェーブ処理しなくても測定可能データ有り	前処理で灰化しないので迅速				
付帯情報	最終判定は公定法。カレーでの添加回収情報	作業手順書あり	カレーでの添加回収情報			

表2 地衛研が作成した検査マニュアル中の代表的な水銀の分析手法の概要

都道府県名	岩手県	横浜市	横須賀市	滋賀県	和歌山市	集計
簡易テスト法	なし	なし	なし	なし	なし	2
操作概要						
検出系						ヨシテスト:1 不明:1
特徴						
スクリーニング試験	なし	なし	あり	なし	あり	4
操作概要			試料に水を加え混和後ろ過		試料を希硝酸で抽出し、ICP-MS測定	
検出系			金アマルガム捕集原子吸光分析		ICP-MS	水銀分析計:1 金アマルガム捕集原子吸光:1 蛍光X線:1 ICP-AES:1 ICP-MS
特徴			実質前処理無し		半定量の位置づけ	
確認・定量試験	あり	あり	あり	あり	あり	17
操作概要	マイクロエーブ抽出後ICP-AES分析	試料を直接または水で希釈し水銀分析計で測定	水抽出液を湿式灰化	試料を湿式灰化	試料をマイクロエーブで灰化後、ICP-MS、水銀分析計測定	
検出系	ICP-AES	水銀分析計	金アマルガム捕集原子吸光	原子吸光、ICP-MS	ICP-MS 還元気化-原子吸光	原子吸光:3 ICP-AES:4 ICP-MS:7 水銀分析計:3 還元気化-原子吸光:5 金アマルガム捕集原子吸光:3 GC:1(有機水銀)
特徴		前処理しないので迅速		重金属試験法として一括。個々の元素は記載無し		
付帯情報				水銀に適用できるか不明		