

200840026A

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉村 健清

平成 21 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	9
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	
長井 忠則	29
3. SYBR Green リアルタイム PCR 法による食中毒 21 事例からの原因菌の迅速スクリーニング	
長井 忠則	31
4. Comprehensive and Rapid Real-Time PCR Analysis of 21 Food-borne Outbreaks	
Hiroshi Fukushima, et al.	41
5. Real-Time PCR を用いた食中毒細菌の網羅的検査法の標準化	
江藤 良樹、他	57
6. 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	
長井 忠則	65
7. 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	84
8. 地方衛生研究所の疫学機能強化に関する研究	
前田 秀雄	92
9. 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究	
～アウトブレイクの探知ガイドラインの作成～	
八幡 裕一郎	96

10. 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究 ～試験検査部門と疫学調査部門の連携による効果についての事例調査に基づく検討～ 岸本 剛、他	106
11. 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究 ～保健所が求める感染症業務支援機能の特定～ 鈴木 智之、他	110
12. 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究 ～理化学分野における疫学機能強化について～ 小野塚、他	119
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	121

I . 總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

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

研究代表者

吉村 健清 福岡県保健環境研究所長

研究分担者

長井忠則 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)

熊谷信二	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部長兼生活衛生課長
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長
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
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
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
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
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
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
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
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
山本重一	福岡県保健環境研究所	環境科学部大気課

(細菌部門)

山口敬治	北海道立衛生研究所	微生物部
清水俊一	北海道立衛生研究所	微生物部
森本 洋	北海道立衛生研究所	微生物部
須釜久美子	福島県衛生研究所	微生物課
菅野奈美	福島県衛生研究所	微生物課
小黒祐子	福島県衛生研究所	微生物課
福島 博	島根県保健環境科学研究所	微生物部長
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

村上光一	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課
江藤良樹	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課
中村祥子	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課

(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
倉田貴子	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部ウイルス課
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	所長
山下昭夫	愛知県衛生研究所	生物学部ウイルス研究室長
伊藤 雅	愛知県衛生研究所	生物学部ウイルス研究室
千々和勝己	福岡県保健環境研究所	保健科学部長兼ウイルス課長
世良暢之	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課
石橋哲也	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課
中山志幸	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課
江藤良樹	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課

(疫学部門)

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
岸本 剛	埼玉県衛生研究所	感染症情報センター
尾関由姫恵	埼玉県衛生研究所	感染症情報センター
小澤 邦寿	群馬県衛生環境研究所	所長
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
鈴木 智之	群馬県衛生環境研究所	感染制御センター
堀元 栄詞	富山県衛生研究所	感染症情報センター
小野塚大介	福岡県保健環境研究所	管理部企画情報管理課

研究要旨

本研究では、健康危機管理のため地方衛生研究所が準備すべき網羅的かつ迅速な検査法を選定し、その有効性について疫学的手法を用いて評価することと、地方衛生研究所の疫学機能の強化を目的とする。本年度は、細菌、ウイルス、化学部門で選定した各検査方法について、さらに詳細な検討を行った。また、地研の疫学機能強化のため、試験検査部門との連携や、人材育成のための方法論等について検討した。

細菌部門では、我が国で多く見られる細菌性食中毒原因菌について、インターカレ

一ター法によるReal Time PCR法の実証的試験を行った。食中毒事例で採取された有症者や従事者便をはじめ、食材・食品について検証した結果、従来の分離培養法では5～7日を要していた時間が、この方法では1日以内で妥当な結果を得ることができた。このことから、多種類の遺伝子を同時に検査するReal Time PCR法は、食中毒事例等の食水系感染症の迅速診断に有効な方法であることが確認された。

ウイルス部門では、本年度は、第1に、呼吸器ウイルスを対象としたMultiplex RT nested PCR法について検出感度等を検討するとともに、実際の患者検体についても応用した。その結果、従来の分離培養法では結果を得るまで1週間以上を要していたものが、本法では1～2日程度で十分な感度の結果が得られた。また、第2に、防疫対策上重要度の高いエンテロウイルスを対象とした高感度のPCR法による同定型別法について、実際の患者検体に適用し評価を行った結果、エンテロウイルスが検出され、同法の有用性が示された。

化学部門では、健康危機優先順位が高い重金属（ヒ素、カドミウム、鉛、及び水銀）を対象とし、種々の試料（食品、水、及び生体試料）に適用できる標準的な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。第1は、試料を酸で希釈してろ過し、誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）あるいは誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）により測定する方法である（酸希釈法）。第2は、試料をマイクロウェーブ分解装置で処理し、誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）あるいは還元気化水銀分析法により測定する方法である（マイクロウェーブ分解法）。両法ともに、ヒ素、カドミウム及び鉛では、平均回収率、変動係数とも良好で、水銀では定量法の精度に問題がある場合があるが、定性法としては問題がなく、検査時間の大幅な短縮（約2日→2～6時間）が可能であることから、健康危機発生時に搬入される食品及び生体試料のスクリーニング法として有効であると考えられた。

疫学部門では、感染症アウトブレイク探知ガイドラインを作成し、過去の事例で検証を行ったが、今後実用化が可能であることが示唆された。また、過去の事例について、疫学部門と検査部門の活動を検証したところ、これら2部門の連携が重要なことが明らかであった。さらに、アンケート調査で、保健所の疫学調査を支援する機能が強く求められていること、地方衛生研究所内での検査部門と疫学部門の相互理解が全体としての疫学機能の向上に必要であることが、示唆された。

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、地研の疫学機能における課題と対策

を明らかにし、その機能強化を図ることを目的とする。今年度は、前年度に手法を選定した、網羅的かつ迅速な検査法のさらに詳しい検討や、実際の検体を用いた検証を行うことと、地方衛生研究所における疫学機能の実態を明らかにするとともに、地方衛生研究所に求められている危機管理機能を検討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、平成 19 年度に検討した主要な食中毒原因菌 8 菌種: サルモネラ・エンテリティデス、カンピロバクター・ジェジュニ、腸管出血性大腸菌、TDH 産生性腸炎ビブリオ、*astA* 陽性大腸菌、ウェルシュ菌、嘔吐毒産生性セレウス菌、黄色ブドウ球菌に加え、一部では腸管毒素原性大腸菌 (ST, LT)、腸管凝集接着性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、赤痢菌、プレシオモナス・シゲロイデス、プロビデンシア・アルカリファシエンシス、エルシニア菌、カンピロバクター・コリー、エロモナス・ヒドロフィラ、コレラ菌、TRH 産生腸炎ビブリオ、下痢毒産生性セレウス菌等であった。検出方法は、SYBR Green を用いた Real Time PCR、並びに duplex Real Time PCR 法であった。同法について、検出感度を検討するとともに、実際の 24 事例の食中毒、感染症集団発生事例について、同法の有効性を検証した。

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

呼吸器ウイルスについては、本年度は Influenzavirus A, B, RSvirus, human Metapneumovirus の系と、Rhinovirus, Enterovirus, Influenzavirus C 及び Coronavirus OC43, 229E の

系の Multiplex RT-nested PCR の手法を決定し、培養細胞であらかじめウイルス力価を測った検体について検出を行い、感度を検討した。また、実際の患者検体、原因不明の感染症集団発生事例について適用した。

エンテロウイルスについては、患者検体について、検出および型別同定用 RT-PCR 法を実施し、プライマーセットの評価を行った。

B-3. (化学部門) 重金属の迅速診断法の確立

B-3-1. 酸希釈法による ICP-AES 法および ICP-MS 法

今年度は、迅速で簡便な検査法として考案した酸希釈・ICP-AES 法および酸希釈・ICP-MS 法の適切性を検討した。食品、水、尿を試料として、ヒ素、水銀、カドミウムおよび鉛の添加試験を行い、平均回収率と変動係数を検討した。

B-3-2. マイクロウェーブを用いた迅速分析法の検討

代表的な食品試料として玄米と清涼飲料水を、生体試料として頭髪を用いてマイクロウェーブ分解の条件を検討した後、予め濃度が定められている認証値付きの標準試料の分析と試料への添加回収試験によって分析法の検証を行った。水銀は高感度還元気化水銀装置で、その他の金属(ヒ素、カドミウムおよび鉛)は ICP-MS で測定した。

B-4. (疫学部門) 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

感染症アウトブレイク探知ガイドラインを作成し、実際に発生した感染症のアウトブレイク事例を用いてシュミレーションを行った。また、実際に起きた集団感染 2 事例について、検査部門と疫学部門の対応を中心に、検証を行った。

一方、群馬県内の 11 保健所において感染症関連業務に従事する職員に対して郵送法による質問票調査を実施し、保健所に対する疫学支援機能の評価と保健所が求める感染症の疫学支援機能の特定を試みた。さらに、地方衛生研究所の理化学部門に所属する職員に対して聞き取り調査を実施し、地方衛生研究所の理化学部門における疫学に対する考え方について調査した。

(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

糞便への 8 種類の菌の添加試験を実施し、前年度に選定した Real Time PCR 法で感度を検討したところ、検体 1g 中に $10^3 \sim 10^5$ CFU の細菌量があれば検出可能であり、分離培養法と比較して、遜色のない感度であった。また、実際の食中毒、感染症集団発生事例についての検証では、24 事例全てで原因と考えられる細菌を短時間に検出でき、同法が迅速診断法として有効であることが示された。

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

呼吸器ウイルスについての multiplex RT-nested PCR の手法を検討した結果、標的とするウイルスの検出感度は、インフルエンザウイルスでは 10^{-2} ffu、その他のウイルスでは $10^{-1} \sim 10^{-3}$ TCID₅₀ と良好であった。また、原因不明の感染症集団発生事例について適用したとこ

ろ、Rhinovirus の集団感染であったことを明らかにできた。一方、過去に感染症発生動向調査で患者から採取された 108 検体について検査を実施したところ、本法による結果はウイルス分離同定結果と 92.6% の一致率であった。一方、エンテロウイルスの検出・同定型別のための RT-PCR 法では、中枢神経系ウイルス感染症が疑われる 20 症例について検討したところ、糞便検体からエンテロウイルスが 5 件検出され、同法の有用性が確認された。また、いずれの方法も 1~2 日で結果が得られ、分離培養法に比べると非常に短時間に結果を得ることができた。

C-3. (化学部門) 重金属の迅速検査法の確立

C-3-1. 酸希釈法による ICP-AES 法および ICP-MS 法

食品を試料とした 4 種の重金属の添加試験では、平均回収率は 78~107%、変動係数は 1~13% とともに良好であった。また、ヒ素、カドミウム、鉛については、水道水と河川水の場合は、平均回収率 97~113%、変動係数 1.9~2.9%、尿を試料とした場合は平均回収率は 84~100%、変動係数は 1.8~3.8% と良好な結果が得られた。ただし、水銀では、水道水、河川水を試料とした時は変動係数がやや大きく、尿を試料とした時は、定量が困難と思われた。なお、測定時間を 2 時間程度に短縮できるとともに、操作も簡便化できることがわかった。

C-3-2. マイクロウェーブを用いた迅速分析法の検討

分析法の検証を行った結果、玄米と清涼飲料水についてはヒ素、水銀、カドミウムおよび鉛のすべての元素で良好な結果が得られた。頭髮については、標準試料のヒ素と鉛の定量値が認証値よりもやや高めの値であったが、その他の結果は良好であった。検査時間については、こ

れまでの湿式分解/原子吸光法の半分以下の時間で検査が可能であり、6時間程度で結果を出すことが可能であると考えられた。

C-4. (疫学部門) 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

作成した感染症サーベイランスを利用したアウトブレイクの早期探知のためにガイドラインに基づき、過去の事例を利用し、①サーベイランスデータから異常値の検出、②集積性の検出、③累積患者数での検証したところ、ガイドライン案は概ね良好であった。

検査部門と疫学部門の対応を中心に、実際に起きた集団感染2事例について検証を行ったところ、衛生研究所内に疫学部門があれば、事件当初から検査検体のみならず疫学情報を入手して解析していくことで、県庁や保健所の負担が軽くなり、事件終息がよりスムーズにいった可能性が高いことが報告されていた。

保健所に対する疫学支援機能の評価と保健所が求める感染症の疫学支援機能の特定を目的として実施した調査の結果、保健所の業務を支援する組織の設置を検討する必要があることが示唆された。また、実地疫学調査の専門家の不足・不在は全国的に認められており、各地域で実地疫学における指導者の育成が期待されていることが示唆された。

また、地方衛生研究所の理化学部門では、大学等の教育機関において専門知識を習得する過程で、疫学を学ぶ機会がほとんどないことから、疫学に対する認識不足や誤解が生じており、さらに統計学や情報処理との誤解によって、理化学部門における疫学機能強化の阻害要因となっていることが示唆された。

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、十分な検出感度を示し、実際の事例について同法を応用したところ、ほとんどの事例で、迅速に原因細菌を検出することができた。ただ、一部の菌種や検体によっては、反応条件等により検出感度が異なることがあり、その点に留意すれば、健康危機発生時の迅速検査法として、実用化が可能であると考えられる。

ウイルス部門において検討した呼吸器ウイルスの multiplex RT-nested PCR 法については、検出感度に問題はなく、実際の原因不明の集団感染事例において、Rhinovirus が原因であることを明らかにしたことなどから、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、エンテロウイルスについて、今回は中枢神経症状を呈する患者について検討を行ったが、エンテロウイルスを細胞培養よりも多く検出し、迅速検査法として実用化できることを確認できた。

次に、化学部門では重金属の迅速検査法を検討した。その結果、酸希釈法による ICP-AES 法および ICP-MS 法、マイクロウェーブを用いた迅速分析法ともに、ヒ素、カドミウム、鉛については、定量まで問題なく実施できることがわかった。ただ、水銀に関しては、試料や測定方法によっては、定量はできないが、定性は十分可能であることがわかった。これらの結果から、両法ともに健康危機発生時の迅速分析法としては、十分に実用可能であると考えられる。

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

一方、疫学部門で行った疫学情報解析機能の

強化と人材育成に関する研究では、感染症におけるアウトブレイク探知のためのガイドライン案を過去の事例を利用し、検証したところ概ね良好であった。今後はこれらの地方感染症情報センターの担当者が日常の業務の中で検証を行いガイドラインとして完成させることが今後の課題である。

実際に起きた集団感染2事例についての検証からは、疫学部門と検査部門との連携の重要性を示唆する結果が得られ、試験検査情報と疫学情報を一元的に解析することは、健康危機に対応する際に相乗的効果が期待できると考えられた。

保健所職員に対する調査の結果、地方衛生研究所は初期対応に対する技術的支援、もしくは保健所が時間的・技術的に不可能な詳細な調査の役割を保健所と協議しながら実施することが求められていると考えられた。また、疫学支援機能をもつ組織を設置することによって、各地域において実地疫学の指導者が育成されることが期待される。理化学部門では疫学に対する認識不足や誤解が生じており、日頃から疫学部門への理解を向上させていけば、理化学部門においても疫学機能強化の実現が十分可能であることが示唆された。

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）、有害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、さらに実証的な検討を行い、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提示

することを目指す。

また、疫学的機能の強化については、感染症におけるアウトブレイク探知のためのガイドラインなどのツールの作成や、保健所に対する疫学機能の支援、地方衛生研究所内で疫学部門と検査部門の日常的な連携を図ることなどが、健康危機対策のために有効であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J. and Akiba, Y.: Comprehensive and Rapid Real-Time SYBR Green I PCR Detection of Food-borne Pathogens in Feces from 21 Bacterial Food Poisoning Cases in Shimane Prefecture, Japan. *Int. J. Microbiol.* 2009. <http://www.hindawi.com/journals/ijmb/aip.917623.html>

2) 伊藤雅、山下照夫、都築秀明、椛島由佳、藤浦明、長谷川晶子、長谷聡子、榮賢司、皆川洋子：Human parechovirus の検出ならびに同定方法の検討。愛知県衛生研究所報 58:1-8, 2008.

3) 山下照夫、伊藤雅、水谷絵美、藤原範子、皆川洋子：無菌性髄膜炎からのエンテロウイルス検出状況、2004～2008年。病原微生物検出情報 30(1):6-8, 2009.

2. 学会発表

1) 野村千枝、北川幹也、尾花裕孝：食品中に

混入された重金属の迅速簡易分析法の開発。
第 96 回日本食品衛生学会学術講演会、神戸、
2008.

2) 福島博：SYBR green リアルタイム PCR 法
による食中毒 21 事例からの原因菌の迅速スク
リーニング。第 29 回食品微生物学会学術総会、
広島、2008 年 11 月。

3) 伊藤雅、山下照夫、皆川洋子：愛知県に
おけるヒトパレコウイルス (HPeV) の検出
状況。第 49 回日本臨床ウイルス学会、愛知
県犬山市、2008 年 6 月。

4) 灘岡陽子、梶原聡子、池田一夫、阿保満、
神谷信行他：東京都におけるインフルエンザ定
点追加指定とサーベイランス結果への影響。
第 22 回公衆衛生情報研究協議会研究会、2009
年 1 月。

5) 塩原正枝、鈴木智之他：群馬県感染症発
生動向調査で報告された百日咳に対する医療
機関へのアンケート調査結果（ワクチン接種歴
と診断方法）。第 22 回公衆衛生情報研究協議
会研究会、2009 年 1 月。

6) 八幡裕一郎：ルーモアサーベイランスに
よるアウトブレイクの探知と対策。第 22 回公
衆衛生情報研究協議会研究会、2009 年 1 月。

7) 岸本剛他：埼玉県におけるコレラ菌食中
毒事例について。第 22 回公衆衛生情報研究協
議会研究会、2009 年 1 月。

8) 川本薫、岸本剛他：0157 等原因調査事
業による県内散発患者間の共通性の検討。第
22 回公衆衛生情報研究協議会研究会、2009 年 1
月。

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

分担研究報告書

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

研究代表者	吉村健清	福岡県保健環境研究所	所長
研究分担者	織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所	所長
研究協力者	熊谷信二	大阪府立公衆衛生研究所	生活環境部長 兼 生活衛生課長
	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長
	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
	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
	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
	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（ヒ素、カドミウム、鉛、水銀）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。第 1 は、試料を酸で希釈してろ過し、誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）あるいは誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）により測定する方法である（酸希釈法）。第 2 は、試料をマイクロウェーブ分解装置で処理し、誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）あるいは還元気化水銀分析法により測定する方法である（マイクロウェーブ分解法）。

酸希釈法では、各種の食品を硫酸で抽出し硝酸と水で希釈後、ろ過して、誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）を用いて測定した結果、平均回収率は 78～107%、変動係数は 1～13%と良好な回収率が得られた。また、水道水と河川水を硝酸と水で希釈し、ICP-MS を用いて測定した結果、ヒ素、カドミウム、鉛については、平均回収率 97～113%、変動係数 1.9～2.9%と良好な結果が得られた。水銀については、平均回収率は 123%、91%と比較的良好な結果が得られたが、変動係数が 9.6%、12%とやや高い値を

示した。そこで、水銀について定性分析を行ったところ、1試料あたり約5分という短時間で、未知試料における水銀の有無の確認が可能であることがわかった。さらに、尿を、ヒ素、カドミウム、鉛については硝酸および水で24倍希釈後、水銀については硝酸および水で60倍希釈後、ろ過し、ICP-MSを用いて測定した。ヒ素、カドミウムおよび鉛の平均回収率は84~100%、変動係数は1.8~3.8%と良好であった。一方、水銀は、尿中からの検出は可能であるが、定量は困難であると判断された。ただし、高濃度の場合の確認できるため、健康危機管理時に対応可能と判断できた。以上の検討により、酸希釈法を用いれば、測定時間を2時間程度に短縮できるとともに、操作も簡便化できることがわかった。

マイクロウェーブ分解法では、代表的な食品試料として玄米と清涼飲料水を、生体試料として頭髪を用いて分解条件を検討した後、分析法の検証を行った。予め濃度が定められている認証値付きの標準試料の分析や、試料への添加回収試験によって分析法の検証を行った結果、玄米と清涼飲料水についてはAs、Hg、Cd、Pbのすべての元素で良好な結果が得られた。頭髪については、標準試料のAsとPbの定量値が認証値よりもやや高めの値であったが、その他の結果は良好であった。また、検査時間の短縮化が可能であることから、健康危機発生時に搬入される食品及び生体試料のスクリーニング法としての有効性が示された。

第1部. 酸希釈法

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、同事件を教訓とし、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、迅速で簡便な検査法のマニュアルの整備が必要である。このため、昨年度は、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、カドミウムおよび鉛に関する迅速で簡便な検査法を確立するための情報として、地方衛生研究所の検

査マニュアルおよび分析法を記載した学術文献を収集し検討した。その結果、前処理法として、大量の酸と時間を必要とする湿式・乾式分解法ではなく、短時間の処理が可能で操作が簡便な、酸による希釈法を用い、測定機器として、多成分同時分析が可能な誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）および誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を用いる分析法が適切であるとの結論に至った。今年度は、迅速で簡便な検査法として考案した酸希釈・ICP-AES法および酸希釈・ICP-MS法の適切性を検討した。

B. 研究方法

B-1. 食品

1). 試薬および器具

標準溶液の調製には、和光純薬工業製のヒ素、

カドミウム、鉛および水銀の標準液(1,000 mg/L)を用いた。L-(+)アスコルビン酸、硫酸および硝酸(重金属分析用)は和光純薬工業製を用いた。分析に用いる水は Millipore 製の Milli-Q SP.TOC. により精製したもの(Milli-Q 水)を用いた。使用器具(ピペットマンチップ、遠沈管、シャフト)は全て樹脂(PP)製のものを単回使用とした。

2). 試料の調製

① 試料

試料は冷凍食品を中心に、そばめし、ハヤシライス、大粒肉焼売、五目春巻き、豚カルビ焼肉、海老焼売、ホワイトシチュー、ビーフシチュー、お好み焼き、餃子、中華丼の具、レトルトカレー、牛乳、乳飲料、コーヒー、ジュースなどを用いた。

② 添加量

過去に中毒事例があった無機毒の例としては亜ヒ酸(三酸化二ヒ素、 As_2O_3)、塩化水銀、塩化カドミウム、硝酸タリウムなどが挙げられる。その中でも特に、亜ヒ酸は最小中毒量(急性、経口、ヒト、成人)が5 mg (3.8 mg As)であり、他の無機毒と比較すると、毒性が非常に高い。他の無機毒も同様の方法での分析が可能と考えられることから、ヒ素の最小中毒量を、検出すべき最低量とした。喫食量については健康危機発生時、試料を50 g 喫食すると設定し、添加濃度を100 $\mu\text{g/g}$ とした。

ただし、以下の理由により、ヒ素については、喫食量が200 gの場合も想定し、添加濃度20 $\mu\text{g/g}$ についても検討した。すなわち和歌山カレー事件¹⁾³⁾では、カレーを食べてから嘔吐までの時間は、直後のものが被害者59名中18名(30.5%)、5分後が13名(22.0%)、10分後が8名(13.6%)であったが、30分以上経過して嘔吐した者も8名存在した。したがって、カレー1食分(200 g程度)を食べたものもいた可能性がある。このため、新たにヒ素についてのみカレー200 gを喫食量と設定し、ヒ素を検出できるか、検討を行った。

③ 使用する酸に関する検討

試料の抽出に用いる酸として、硝酸および硫酸

の適切性について検討した。

④ 添加回収試験

均質化した加工食品0.25 gに、ヒ素、カドミウム、鉛および水銀を25 μg 添加後(添加濃度100 $\mu\text{g/g}$)、濃硫酸で10 gにした。ホモジナイズ後、その内4 gを採り1%硝酸で50 mLに定容した(500倍希釈、0.2 $\mu\text{g/mL}$)。これをフィルターろ過(0.45 μm 、PTFE)して試験溶液とした。

3) 標準溶液

標準液を希釈して、0.02~0.5 mg/Lの標準溶液を作成した。酸濃度は試料と同じになるよう調製した(硝酸1%、硫酸8%)。

4) ICP-AES

測定には島津製作所製ICPS-7510を使用した。分析条件は以下の通りである。高周波出力:1.2 kW、Solvent rinse:90 s、Sample rinse:60 s、ガス:アルゴン(Coolant 12 L/min、Plasma 1.2 L/min、Carrier 0.7 L/min)、横方向観測、チャンバ:サイクロン型、試料吸上げ管:PTFE製、測定波長:As 193.696 nm、Hg 194.227 nm、Cd 226.502 nm、Pb 220.351 nm。

試験溶液をICP-AESに導入し、各元素の発光強度と標準溶液のそれを比較して定量した(絶対検量線法)。定量下限値は、試料中の食品成分や硫酸の妨害を考慮して0.10 mg/L(50 $\mu\text{g/g}$)とした。

B-2. 水

1) 試薬および器具

標準溶液の調製には、和光純薬製のヒ素、カドミウム、鉛および水銀標準液1000 mg/Lを、内部標準溶液の調製には、和光純薬製ガリウム、インジウムおよびタリウム標準液1000 mg/Lを用いた。硝酸は和光純薬製の超微量分析用を用いた。また水銀測定時の安定化剤として、Alfa Aesar社製塩化金を用いた。精製水はイオン交換した後に、Millipore製Direct-Qにより精製したものをを用いた。使用器具類は全てプラスチック製のものを単

回使用とした。

2) 試料の調製

当所水道水（大阪市）および河川水（大阪府内河川表流水）にヒ素、カドミウム、鉛および水銀を添加して試料とした。ヒ素（亜ヒ酸として）の中毒量は約 5～50 mg、水銀（塩化水銀（Ⅱ）として）の中毒量は約 100 mg である⁴⁾。飲料水の摂取量を 1L と設定し、添加濃度をヒ素 50 mg/L、水銀 20 mg/L とした。カドミウムおよび鉛については、ヒ素と同一とした。

① ヒ素、カドミウム、鉛

ヒ素、カドミウムおよび鉛を添加した水道水および河川水を精製水で希釈し、ICP-MS における測定濃度範囲になるよう調整して試料溶液とした。試料溶液の硝酸濃度が 1% となるよう硝酸を添加した。

② 水銀

水銀を添加した水道水および河川水を精製水で希釈し、ICP-MS における測定濃度範囲になるよう調整して試料溶液とした。ICP-MS 分析では、試料溶液の硝酸濃度は 1% とすることが多いが、水銀の場合は 5% 硝酸溶液を用いた方が安定な測定結果が得られたため 5% となるよう硝酸を添加した。また、低濃度の水銀溶液は揮発する傾向があるため⁵⁾、揮発防止の目的で塩化金を添加した。

3) 標準溶液および内部標準溶液

① ヒ素、カドミウム、鉛

各標準液を精製水で希釈し、それぞれ 0、2、5、10 および 20 $\mu\text{g/L}$ の標準溶液を調製した。内部標準溶液としては、ガリウム、インジウムおよびタリウムの各標準液を混合し精製水で希釈して各元素濃度が 50 $\mu\text{g/L}$ の溶液を調製した。標準溶液および内部標準液の硝酸濃度は 1% とした。

② 水銀

標準液を精製水で希釈し、0、100、200 および 400 ng/L の標準溶液を調製した。内部標準溶液としては、タリウム標準液を 1% 硝酸にて希釈し 50 $\mu\text{g/L}$ の溶液を調製した。標準溶液および内部標準

液の硝酸濃度はそれぞれ 5% および 1% とした。

4) ICP-MS

測定には島津製作所製 AS-9 Auto Sample Changer および ADU-1 Auto Dilution Unit を連結した島津製作所製 ICPM-8500 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer を使用し、冷却水は東京理化工機製 Eyela Digital Uni Ace UA-100 にて 2°C に制御した。装置の制御およびデータ処理は連結したヒューレット・パッカード製 HP Compaq d330 ST（内蔵ソフト：ICPM-8500 Ver 1.22）により行った。測定対象物質および内部標準物質の測定質量数を表 1 に、測定条件を表 2 に示す。

本装置の測定には定量モードと定性モードがあり、定量モードは標準溶液のイオン強度を用いて検量線を作成後、実試料のイオン強度を測定し、目的元素の定量を行う方法である。定性モードは元素が存在する質量レンジ（5～240）を走査測定し、質量スペクトルを得ることで、元素の検出および確認を行う分析法であり、高精度ではないが、短時間に多くの質量数が分析可能である。今回はまず定量モードにより、ヒ素、カドミウム、鉛および水銀を内部標準法で測定した。なお、内部標準物質として、ヒ素にはガリウム、カドミウムにはインジウム、鉛および水銀にはタリウムを用いた。

ICP-MS における測定濃度範囲が、ヒ素、カドミウムおよび鉛は $\mu\text{g/L}$ レベル、水銀は ng/L レベルと大きく異なるため、両者を別々に測定した。また、ヒ素の測定質量数 75 は、アルゴンガスと試料中の塩素イオンにより形成される $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ によりスペクトル干渉を受けるため、干渉値を質量数 77 および 82 の測定値を用いて自動補正した（ヒ素補正值 = ヒ素測定値 - 干渉値 = $^{75}\text{C} - ^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl} = ^{75}\text{C} - 3.127(^{77}\text{C} - 0.825 \times ^{82}\text{C})$ 、式中の $\times\text{C}$ は質量数 X における測定強度をしめす）。さらに水銀に対しては定性モードでの測定も合わせて行った。

表1.測定元素および内部標準元素の測定質量

測定物質 元素名			内部標準物質 元素名			内部標準物質 元素名		
測定質量(m/z)			測定質量(m/z)			測定質量(m/z)		
			水測定の場合			尿測定の場合		
As	ヒ素	75	Ga	ガリウム	69	Ge	ゲルマニウム	74
Cd	カドミウム	114	In	インジウム	115	In	インジウム	115
Pb	鉛	208	Tl	タリウム	205	Bi	ビスマス	209
Hg	水銀	202						

表2. ICP-MSの測定条件

ICP/MS	島津ICPM8500
高周波出力(RFpower)	1.2 kw
プラズマガス流量(Ar)	1.5 L/min
キャリアガス流量(Ar)	0.56 L/min
サンプリング深さ	5 mm
積分時間	1.0 - 8.0 sec/point

B-3. 尿

1) 試薬および器具

ヒ素、カドミウムおよび鉛の標準液にはジーエルサイエンス社製 Quality Control Standard 1 (19 金属混合、各 100 µg/ml) と和光純薬工業製の単一成分の標準液、ヒ素標準液 (1000 mg/L)、カドミウム標準液 (100 mg/L) および鉛標準液 (1000 mg/L) を使用した。水銀の標準液にはジーエルサイエンス製 Plasma CAL Hg (1000 µg/ml) を使用した。内部標準液には、和光純薬工業製のゲルマニウム (1000 µg/ml 水溶液)、インジウム (1000 µg/ml) およびビスマス (1000 µg/ml) を用いた。硝酸は同社製の有害金属測定用を使用した。水はすべて Millipore 製 Milli-RX12 により精製したものをを用いた。使用器具類は全てプラスチック製のものを単回使用とした。

2) 試料の調製

健常日本人における各元素の尿中排泄量は、ヒ素 130 µg/g クレアチン⁶⁾、カドミウム 2.1 µg/g クレアチン⁷⁾、鉛 2.2 µg/g クレアチン⁸⁾、水銀 1.5 µg/g クレアチン⁹⁾ であることが報告されており、ヒ素の排泄量は他に比較して 100 倍のレベルである。各元素によ

る中毒時にはいずれも健常時の 10 倍以上の量が尿中に排泄されると仮定し、ヒ素は 2 mg/L、カドミウム、鉛および水銀は 20 µg/L の尿中濃度レベルでの定量法の確立を試みた。なお、分析装置の特性上、高濃度 (1 µg/L レベル以上) の水銀の導入は望ましくないため、水銀のみ単独で調製した。

① ヒ素、カドミウム、鉛

健常人 5 名よりスポット尿を紙コップに採取した。採取した尿をポリプロピレン製自立型遠沈管 (50 ml 入り) に 40 ml 分取し、硝酸 8 ml を加えてよく混和した。遠心分離 (3000 回転×10 分) した後、上澄み液をプラスチック製ディスポーザブルシリンジで吸引し、PTFE 製ディスポーザブルシリンジフィルター (東洋濾紙製、DISMIC-25HP、0.45 µm) により濾過して酸処理尿を得た。ポリプロピレン製自立型遠沈管に酸処理尿 1.5 ml を分取し、硝酸 0.5 ml、水 28 ml を加え試料溶液とした (1.5%硝酸中 24 倍希釈尿)。次の回収率試験ではこの検体を Blank 試料とした。

また、回収率の検討のため、上記と同様にして得られた酸処理尿 1.5 ml を各人ごとに 5 本の遠

沈管に分取し、それぞれに硝酸 0.5 ml、標準溶液 0.3 ml (1%硝酸中にヒ素 10 mg/L、カドミウムおよび鉛 100 µg/L 含有するように調製)、水 27.7 ml を加え試料溶液を調製した (添加試料、添加量：ヒ素 3 µg (尿中濃度として 2400 µg/L)、カドミウムおよび鉛 0.03 µg (同 24 µg/L))。

② 水銀

採取した尿を上記のヒ素、カドミウムおよび鉛の分析における試料調製法と同様に処理し、酸処理尿を得た。ポリプロピレン製自立型遠沈管に酸処理尿 0.6 ml を分取し、硝酸 2.4 ml、水 27 ml を加え試料溶液とした (5%硝酸中 60 倍希釈尿)。次の回収率試験ではこの検体を Blank 試料とした。

また、回収率の検討のため、酸処理尿 0.6 ml を各人ごとに 5 本の遠沈管に分取し、それぞれに硝酸 2.3 ml、標準溶液 1.2 ml (5%硝酸中に水銀 10 µg/L 含有するように調製)、水 25.9 ml を加え試料溶液を調製した (添加量：0.012 µg (尿中濃度として 24 µg/L))。

3) 標準溶液および内部標準溶液

① ヒ素、カドミウム、鉛

標準液 Quality Control Standard 1 を 1%硝酸 (濃硝酸 1.64 ml→100 ml) にて希釈し、自立型遠沈管中にヒ素、カドミウム、鉛の各元素濃度が 0、0.1、1.0、10 および 100 µg/L の標準溶液を調製した。内部標準溶液としては (表 1)、ゲルマニウム、インジウムおよびビスマスの各標準液を等量ずつ混合し、1%硝酸にて希釈して、100 ml・ポリプロピレン製メスフラスコに各元素濃度 50 µg/L の溶液を調製した。

② 水銀

標準液 Plasma CAL Hg を 5%硝酸 (濃硝酸 8.2 ml→100 ml) にて希釈し、0、2.5、5.0 および 10 µg/L の希釈溶液を調製した。健常者各人の尿から調製した酸処理尿を等量ずつ混合し、プール尿を作成した。4 本の自立型遠沈管中にプール尿 0.6 ml、硝酸 2.3 ml、各水銀希釈溶液 1.2 ml、水 25.9 ml を加えて、水銀濃度 0、100、200 および 400

ng/L の標準溶液を調製した。内部標準溶液としては (表 1)、ビスマス標準液を 1%硝酸にて希釈して、100 ml・ポリプロピレン製メスフラスコに濃度 50 µg/L の溶液を調製した。

4) ICP-MS

使用した装置および分析条件は水の場合と同様である。ただし、内部標準物質として、ヒ素にはゲルマニウム (測定質量数 74) を、カドミウムにはインジウム (同 115) を、鉛および水銀にはビスマス (同 209) を用いた (表 1)。

C. 結果および考察

C-1. 食品

1) 酸に関する検討

試料の抽出に用いる酸として、まず 10%硝酸について検討した。カレーや牛乳などのタンパクや脂質を多く含む試料の場合、ヒ素、カドミウム、および鉛については良好な回収率が得られたが、水銀については、牛乳 57%、カレー 63%と低値を示した (表 3)。一方、L-アスコルビン酸を含む食品 (表示に基づくビタミン C 含量：レモンウォーター 2,000 µg/L、はちみつ黒酢ダイエット 3,200 µg/L、ゼリータイプビタミンレモン 5,556 µg/L、炭酸ビタミンレモン 7,143 µg/L) では、水銀の回収率が約 220~455%と顕著に高い回収率を示した。

L-アスコルビン酸が水銀強度に対し正の影響を与えることは経験的に知られている (図 1)。このため水銀の真値を測定するには L-アスコルビン酸の影響を除く必要がある。そこで、L-アスコルビン酸を含む有機物の除去を目的として、濃硫酸による抽出を検討した。図 2 に示すように、この影響を除くためには、試料量の約 20~50 倍量の濃硫酸が必要であった。そこで試料量の 40 倍の濃硫酸を用いて水銀の回収率を検討した結果 (表 4)、硝酸では問題があった L-アスコルビン酸を含む食品中の添加回収率は、ゼリータイプの飲料を除き、97~130%となり、L-アスコルビン酸の影響を除くことができた。同時に食品からの

回収が困難であったカレー(107%)や牛乳(99%)においても、良好な回収率が得られた。

2) 添加回収試験

濃硫酸による抽出法を用いて、13食品について添加回収試験(添加濃度 100 µg/g)を行った結果、平均回収率は78~107%、変動係数は1~13%と良好な結果が得られた(表5)。

ヒ素については、添加濃度を20 µg/gとして、同様の方法で前処理および測定を行ったが、12食品について、平均回収率は71~106%、変動係数は3~11%と良好な結果が得られた(表6)。

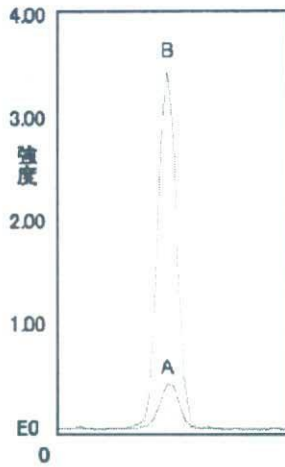


図1. L-アスコルビン酸が水銀強度に与える影響

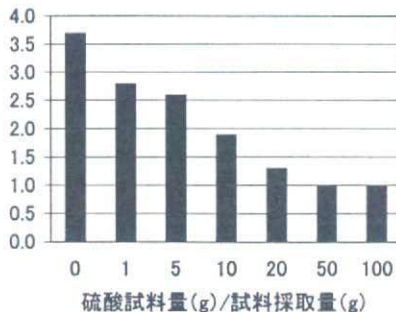


図2. L-アスコルビン酸に対する硫酸処理の効果
L-アスコルビン酸500 µg/gを添加した水銀標準液(0.2 mg/L)の強度比
(強度比: 検出した水銀強度/水銀標準液の強度)

表3. 予試験(硝酸希釈法)における水銀の添加回収率(%) (n=1)

試料	回収率(%)	表示に基づくビタミンC含量
水	92	-
牛乳	57	-
レトルトカレー	63	-
オレンジジュース	380	-
ヤクルト	114	-
茶	96	-
レモンウォーター	310	2,000
はちみつ黒酢ダイエット	220	3,200
ビタミンレモン(ゼリー)	455	5,556
ビタミンレモン(炭酸)	350	7,143

表4. 硫酸希釈法における水銀の添加回収率(%) (n=1)

試料	回収率(%)	表示に基づくビタミンC含量
水	100	-
牛乳	99	-
レトルトカレー	107	-
オレンジジュース	100	-
ヤクルト	97	-
茶	95	-
レモンウォーター	130	2,000
はちみつ黒酢ダイエット	100	3,200
ビタミンレモン(ゼリー)	320	5,556
ビタミンレモン(炭酸)	100	7,143

表5. 硫酸希釈法における平均添加回収率(%) (n=5)
添加濃度 100 µg/g の場合

試料	As	Hg	Cd	Pb
牛乳	88±3	99±2	97±2	92±3
そばめし	98±4	93±5	95±1	102±4
ハヤシライス	93±7	94±11	94±4	96±8
大粒肉焼売	100±	79±9	91±2	93±5
五目春巻き	98±3	78±8	90±3	92±5
豚カルビ焼肉	91±8	79±6	92±3	98±9
海老焼売	82±4	102±12	97±5	97±4
ホワイトシチュー	96±5	85±9	91±4	90±5
ビーフシチュー	97±9	84±8	95±4	96±5
お好み焼き	96±6	80±5	93±5	99±6
餃子	83±7	106±13	97±4	96±6
中華丼の具	99±3	88±9	96±2	99±4
レトルトカレー	87±5	107±8	102±3	97±5