

200942007A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉村 健清

平成 22 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	8
2. 健康危機管理時における食品中の重金属迅速分析マニュアル	
織田 肇	15
3. 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	51
4. Multiplex リアルタイム SYBR Green PCR 法による食中毒菌の一斉スクリーニング法の検討	
福島 博	78
5. Multiplex リアルタイム SYBR Green PCR を用いた食中毒細菌の網羅的検査法の検証	
江藤 良樹	92
6. 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	97
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	
皆川 洋子	101
8. 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	
世良 暢之	103
9. 疫学機能強化に関する研究	
小澤 邦寿	105
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	120

I . 総括研究報告

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
小澤邦寿 群馬県衛生環境研究所長
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
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
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
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
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
中川礼子	福岡県保健環境研究所	保健科学部生活化学課
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
池田徹也	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
江藤良樹	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課
市原祥子	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課
村上光一	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課

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
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
山下照夫	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
吉富秀亮	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課

(疫学部門)

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
堀元栄詞	富山県衛生研究所	感染症情報センター
神谷信行	東京都健康安全研究センター	疫学情報室長
八幡裕一郎	国立感染症研究所	感染症情報センター
藤田雅弘	群馬県衛生環境研究所	感染制御センター長
田嶋久美子	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
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

本研究は、健康危機管理のため地方衛生研究所（地衛研）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、前年度までに細菌、ウイルス、化学部門で選定した各検査方法について、実際の検体等を用いて検証を行った。また、地衛研の疫学機能強化を目的として、地衛研における感染症疫学部門の設置状況や、設置すべき業務内容について検討した。

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、インターカレーター法によるリアルタイムPCR法の実証的試験を行った。また、24菌種を同時に検出できる系を開発しキット化を行うと共に、食中毒等の食水系感染症事例から得た試料について、検証を加えた。その結果、迅速で網羅的な検査法であることが実証された。

ウイルス部門では、呼吸器系、消化器系や中枢神経系症状を主徴とする原因不明感染症の患者検体を対象に、迅速性、網羅性を考慮し、高感度で最適な手法を確立することを目的とした。この目的を達成するために開発したマルチプレックスone-step RT-PCR法は9属、約230種の呼吸器系ウイルスを同時に、また高感度で比較的迅速（5時間）に検出することができた。また、エンテロウイルスを主な対象としたPCR法による迅速な検出及び同定型別法を脳炎脳症疑い患者糞便検体に対し適用したところ、その原因と推定されるウイルスを検出でき、健康危機管理上その有効性が認められた。

化学部門では、前年度までに、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確立した。そこで、今年度はこれらの分析法のマニュアルを作成した。

疫学部門では、地衛研における感染症疫学部門の設置状況や設置体制の調査と、感染症疫学部門に設置すべき業務内容や機能強化のための方法を検討した。その結果、感染症疫学部門の設置状況は、自治体で多様な格差が存在していたことがわかった。その要因として、本庁・保健所の疫学機能の重要性についての認識が低いことが示唆された。このため、地方衛生研究所の実施すべき疫学機能の標準的モデルを提示することにより、その認識を高めるとともに、自治体間の格差を是正させるための一定のルールを定めることが必要であると考えられた。

A. 研究目的

地域における健康危機管理体制の一端を担う、地衛研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評価することと、地衛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について、引き続き実際の検体を用いた検証を行うとともに、地衛研における疫学機能の実態を明らかにし、地衛研に求められている危機管理機能を検討した。

B. 研究方法

B-1（細菌部門）インターカレーター法によるリアルタイム PCR 法の検討

SYBR 法が地衛研に配備された 4 種類5台のリアルタイムPCR機器を用いて実施できるか、8種の菌について、実証試験を行った。

また、24 菌種を同時に検出できる網羅的検査キット(Rapid Foodborne Bacteria Screening 24: 以下、RFBS24)を開発した。検出対象とした菌種は、*Salmonella* spp. *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Bacillus cereus*, emetic toxin producing *B. cereus*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *astA* positive *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli*

(ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffusively adhesive *E. coli* (DAEC), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Providencia alcalifaciens*であった。このキットを用いて、食中毒(疑いを含む)事例で採取された糞便試料について検査を行い、培養法との比較をおこなった。

B-2. (ウイルス部門) RT-nested PCR 法を用いた網羅的迅速診断法の検討

呼吸器系ウイルスのうち、Influenzavirus A, B 及び C, RS virus, human Metapneumovirus, Rhinovirus, Enterovirus, Coronavirus, Parainfluenza virus, Bocavirus, Adenovirus の 9 属、約 230 種を検出するマルチプレックス PCR 法を作製した。この方法を、原因不明感染症の集団発生事例や個別発生事例について、病原体の同定に応用した。

一方、エンテロウイルスについては、これまでに確立した検査法を、中枢神経系感染症疑い患者検体のうち、糞便あるいは直腸ぬぐい液が採取された症例について応用し、評価を行った。

B-3. (化学部門) 重金属の迅速診断法の確立

昨年度までに、重金属(ヒ素、カドミウム、鉛、水銀)を迅速に検出するために、酸希釈法による ICP-AES 法および ICP-MS 法、及びマイクロウェーブ分解法による ICP-MS 法について、手法を確立した。そこで、これらの方法を用いた、食品、水および生体試料中重金属の迅速分析法のマニュアルを作成した。

B-4. (疫学部門) 疫学情報機能強化に関する研究

地衛研における感染症疫学部門の設置状況や設置体制を把握するために、2007 年に全ての地衛研を対象に質問票調査を実施したので、その結果を解析した。また、平時において地方感染症情報センター(IDSC)に求められる機能と、新型インフルエンザ対応において IDSC に求められる機能について、5 つの地方自治体において、本庁・保健所と地衛研職員に対して質問票調査を実施した。

(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リアルタイム PCR 法の検討

8 菌種毎に異なる機種による試験を行った。その結果、4 種類 5 台の機器全てで、それぞれの菌株の対象遺伝子陽性示すためには、換算菌濃度で 10^4 ~ 10^6 cfu/mL が必要であることがわかった。急性期の患者便には 10^6 cfu/g 以上の菌が含まれているといわれており、今回の結果は、使用した primer で、急性期便試料からはほぼ検出可能と考えられた。

Fukushima *et al*²が開発した RFBS24 法を、実際の食中毒事例から得た糞便試料に応用した。その結果は、サルモネラを除いてほぼ良好な結果を示した。培養法と比較したのは、34 事例 193 試料であったが、その中でどちらも陽性であったのは 107 試料、どちらも陰性であったのは 73 試料、計 180 試料であった(一致率 93.2%)。このことから、RFBS24 法は培養法とほぼ同等の結果を得られると考えられる。

C-2. (ウイルス部門) RT-nested PCR 法を用いた網羅的迅速診断法の検討

呼吸器系ウイルスについてのマルチプレックス RT-nested PCR の手法を、高齢者施設における原因不明の呼吸器疾患の集団発生 1 事例に対して応用したところ、原因ウイルスは Rhinovirus と同定できた。また、RS virus 感染を疑う個別発生事例 117 例において、約 9 割の症例でウイルスを同定可能であった。なお、約半数の症例で複数のウイルスが検出された。また、小児科より搬入された 90 検体について本法を適用した結果、Rhinovirus が 32 検体、Parainfluenza virus が 18 検体、human Metapneumovirus が 16 検体、Adenovirus が 3 検体、Bocavirus が 1 検体から検出された。この結果から、実際の臨床検体に適用しても包括的な迅速診断法としてその効果を十分に発揮することが期待できた。

一方、エンテロウイルスでは、21 年度は検討した全ての血清型に反応するが感度の高くないプロトコル A、Polio virus をのぞく検討した全てのウイルス型を A よりも高感度に検出し、PCR 産物を用いる型別が可能なプロトコル B、全てのウイルス型を高感度に検出したが、PCR 産物からの型別は一部困難であるプロトコル C に加えて Adenovirus 検出 PCR を実施することとした。Adenovirus PCR 法を加えた結果、PCR 陽性分離陰性 7 例 (Adeno 3 2 例、Cox. A2、A6、Echoll、Adeno 6 各 1 例、CoxA16 及び Adeno 3 検出 1 例)、PCR 陰性分離陽性 1 例 (Influenza virus)、PCR 及び分離陰性 17 例と PCR の感度が前年度に比べると改善した。

C-3. (化学部門) 重金属の迅速検査法の確立

迅速検査法のマニュアルを作成し、本研究の報告書に記載し、全国の地方衛生研究所に配布

する。マニュアルの構成は以下のとおりである。

- I. 試薬類
 1. 標準品
 2. その他の試薬等
- II. 装置
- III. 器具等
- IV. 試料溶液および標準液の調製
 1. 試料溶液
 - 1) 試験用検体の調製
 - 2) 抽出
 2. 標準溶液
- V. 定性・定量
測定条件
- VI. 計算式
- VII. 判定
- VIII. 文献
- IX. フローシート

C-4. (疫学部門) 疫学情報機能強化に関する研究

全ての地衛研を対象に実施した質問票調査では、回答が得られた 51 ヶ所 (回答率; 72%) のうち、41 ヶ所で疫学・情報事業を実施しており、この 41 ヶ所すべてにおいて、感染症に関連する事業が実施され、多くで感染症発生动向調査が実施されていた。しかし、感染症疫学を担当する専門部門が設置されていたのは、19 ヶ所と少なかった。また、感染症疫学を担当する専門部門に設置されている備品や予算には自治体間で大きな相違があった。また、5 つの地方自治体の本庁・保健所と地衛研職員に対して実施した調査では、本庁・保健所と地衛研が考える、感染症疫学部門に必要な業務を「優先設置業務」と「設置推奨業務」に分類した。その結果、保健所職員が設置するべきと考えている IDSC の機能と、地衛研職員が設置するべきと考えている疫学機能との間に、相違が存在す

る場合があることが明らかになった。情報を発信する IDSC は、情報を受け取る保健所や本庁の期待に適切に対応することも、本部門の機能強化としても重要な事柄であると考ええる。一方、平時と新型インフルエンザ対応時において、IDSC に求められる業務内容に大きな相違は特定されなかった。

D. 考察

細菌部門での検討結果から、次のことが明らかになった。(1)食中毒発生時にリアルタイム PCR を用いることにより、従来法に比べ迅速な結果が得られ、効率的対応を可能にする、(2)迅速に複数の病原遺伝子を検出するため、原因物質の特定について重層的な解析を可能にし、原因究明に資することが可能となる、(3)原因不明の事例について網羅的に検査することにより、迅速に原因推定を可能にし、事例への対応が適切に行われることが考えられる。

ウイルス部門において検討した呼吸器ウイルスのマルチプレックス RT-nested PCR 法については、9 属、約 230 種のウイルスを同時に、また高感度で比較的迅速（5 時間）に検出することができた。さらに、呼吸器感染症の集団、また個別事例において、その原因ウイルスを診断でき、健康危機管理上その有効性が認められる。エンテロウイルスの検出法では、網羅的で高感度とされる新たな PCR 法（プロトコル A）は、検出感度は従来法より劣っていたが、陽性検体の型別に関する情報量が多い点が有用であった。21 年度は Adenovirus PCR 法を併用したところ、PCR 法の感度がウイルス分離を上回ることができた。

次に、化学部門では昨年度は、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分析法を確立した。一つは、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。もう一つは、食品試料及び生体試料の迅速な前処理方法として、マイクロウェーブ分解装置を用いた方法である。今年度は、これらの分析法のマニュアルを作成した。健康危機が発生した時には、迅速に分析することが必要であり、そのために、分析の流れをフローシートにし、標準液の調整方法を図でも示した。この分析マニュアルを使用すれば、迅速で簡便に、食品、水および生体試料中の重金属の測定が可能である。

以上 3 部門で検討した検査法については、網羅的かつ迅速に結果を得ることが期待でき、地衛研全体で健康危機に備え、準備しておく検査法として推奨できる。ただ、細菌、ウイルスの検査法については、さらに研究することで、感度や操作性を向上させることが可能と考えられる。また、今後はこれらの検査法も含め、地衛研で実施している検査の精度管理についても、検討する必要があると考えられる。

一方、疫学部門で行った疫学機能強化に関する研究では、感染症疫学部門の業務環境に、自治体間で格差が存在していたことがわかった。その解決策としては、一つには、地方衛生研究所全国協議会等が中心となり、標準的な感染症発生動向業務や感染症疫学事業のモデルを提示することにより、疫学部門の重要性についての本庁・保健所の認識を高めることが考えられる。また、自治体間格差を是正させるためには、本部門の設置に対して一定のルールを定めることが、我国の公衆衛生行政における感染症疫学の機能強化の基礎となると考える。すなわち、

本部門の設置を制度的に定めることが必要であると考えられる。

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）、有害化学物質の網羅的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、さらに検査法の完成度を高め、地衛研全体へ普及させていくとともに、検査の精度管理も考慮する必要がある。

また、疫学的機能の強化については、現状の感染症疫学部門は本庁や保健所の需要に対応できる環境整備が不十分、かつ自治体間格差が存在したが、その要因として、本庁・保健所の疫学機能の重要性についての認識が低いことが示唆された。このため、地方衛生研究所の実施すべき疫学機能の標準的モデルを提示することにより、その認識を高めるとともに、自治体間の格差を是正させるための一定のルールを定めることが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 野村千枝, 尾花裕孝, 織田肇: 健康危機対応を目的とした食品中有害重金属等の迅速分析法の検討, 食品衛生学雑誌, 50(5), 253-255 (2009) .

2) 芦塚由紀, 岡本華菜, 山本重一, 中川礼子: 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の検討, 福岡県保健環境研究所年報 第 36 号, 61-66, (2009).

2. 学会発表

1) 福島博: Multiplex Real-time SYBR Green PCR による食中毒原因菌 24 標的遺伝子の同時スクリーニング法の開発, 第 30 回日本食品微生物学会学術総会, 東京, 2009.

2) 福島博: Multiplex Real-time SYBR Green PCR による食中毒原因菌 24 標的遺伝子の同時スクリーニング法の開発, 平成 21 年度日本獣医公衆衛生学会, 宮崎, 2010.

3) 福島博: Multiplex Real-time SYBR Green PCR による食中毒原因菌 24 標的遺伝子の同時スクリーニング法の開発, 第 84 回日本感染症学会総会, 東京, 2010.

4) 伊藤 雅, 山下照夫, 藤浦明, 長谷川晶子, 秦 眞美, 小林慎一, 榮 賢司, 皆川洋子: ヒトパレコウイルス (Human parechovirus: HPeV) 感染症について. 衛生微生物技術協議会第 30 回研究会シンポジウム III 堺市 2009.

5) 伊藤 雅, 山下照夫, 皆川洋子: 臨床検体から検出されたカルディオウイルス属 Saffold virus について. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 東京都 2009.

6) 小林慎一, 伊藤 雅, 山下照夫, 皆川洋子: 平成 20 年度の愛知県におけるノロウイルスとサポウイルスの検出状況. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 東京都 2009 年.

7) 芦塚由紀, 岡本華菜, 山本重一, 中川礼子: マイクロウェーブ分解装置を用いた食品中重金属の迅速測定法について, 第 30 回九州衛生環境技術協議会, 大分, 2009.

H. 知的所有権の取得情報

特許出願中。

出願者 島根県保健環境科学研究所 福島博
件名: リアルタイム PCR 法による食品媒介病原菌の網羅的迅速検出方法

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	熊谷信二	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部長
	尾花裕孝	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部食品化学課長
	足立伸一	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課長
	吉田俊明	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課主任研究員
	野村千枝	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部食品化学課研究員
	安達史恵	大阪府立公衆衛生研究所	衛生化学部生活環境課研究員
	中川礼子	福岡県保健環境研究所	保健科学部生活化学課研究員
	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

昨年度は、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確立した。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、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、①食品を硫酸で抽出し硝酸と水で希釈後、ろ過して ICP-AES を用いて測定、②飲料水を硝酸と水で希釈し、ICP-MS を用いて測定、③尿を硝酸と水で希釈後、ろ過し、ICP-MS を用いて測定する。今年度は、これらの分析法のマニュアルを作成した。試薬類、装置、器具類、試料溶液・標準液の調製、定性・定量、計算式、判定、文献という構成である。健康危機が発生した時には、迅速に正確に分析することが必要であり、そのために、分析の流れをフローシートにし、標準液の調製方法を図でも示した。また、昨年の検討結果を参考資料として添付した。この分析マニュアルを使用すれば、迅速で簡便に、食品、水および尿中の重金属の測定が可能である。

マイクロウェーブ分解法では、食品および頭髪をマイクロウェーブ分解装置により灰化し、ICP-MS あるいは還元気化水銀分析法により測定する。昨年度は、分析法の検討を行い、従来酸分解法である湿式分解法よりも迅速に分析

が可能であることがわかった。今年度は、これらの分析法のマニュアルを作成した。マニュアルの構成は、試薬類、装置、器具類、試料溶液・標準液の調製、定性・定量、計算式、判定、文献とした。参考資料として、昨年度の迅速分析法の検証結果と、迅速分析法を用いて重金属を分析する際の注意点をまとめたものを作成した。このマニュアルを活用することにより、健康危機発生時にマイクロウェーブ分解法を用いて迅速な重金属測定が可能である。

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。そのためには、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）を用いる分析法により適切に測定できることを確認した。今年度は、それらの方法をマニュアル化した。

B. 研究方法

1) マニュアル作成

昨年度に確立した、食品、水および尿中重金属の迅速分析法のマニュアルを作成した。

C. 研究結果

1) マニュアルの構成

作成したマニュアルを別紙1、2および3に示す。マニュアルの構成は以下のようなものである。

I. 試薬類

1. 標準品
2. その他の試薬等

II. 装置

III. 器具等

IV. 試料溶液および標準液の調製

1. 試料溶液

- 1) 試験用検体の調製
- 2) 抽出

2. 標準溶液

V. 定性・定量

測定条件

VI. 計算式

VII. 判定

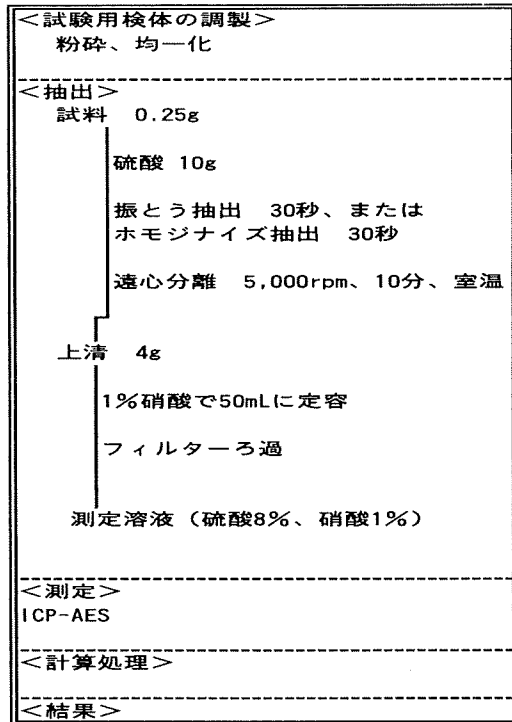
VIII. 文献

IX. フローシート

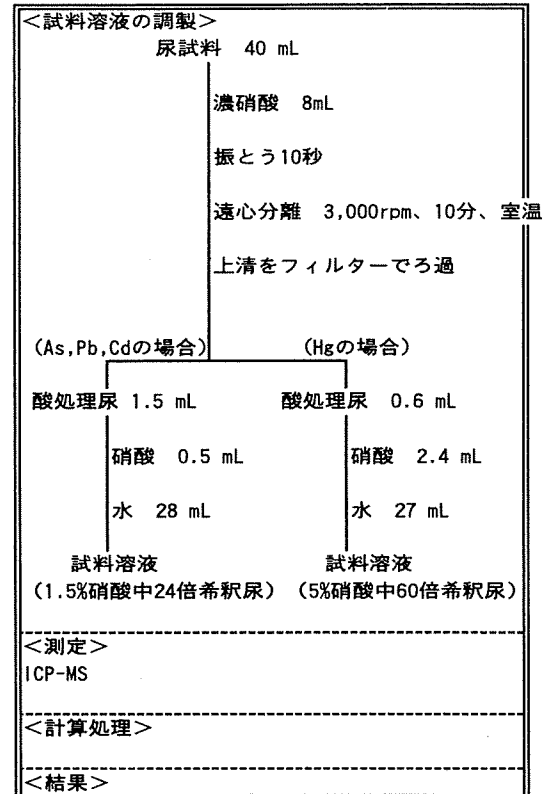
2) フローシート

食品、水および尿の迅速測定法のフローシートを以下に示す。

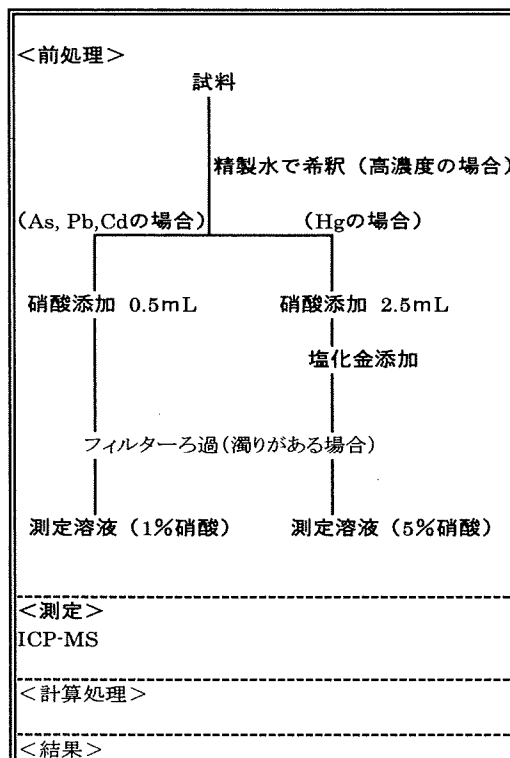
①食品



③尿



②水



D. 考察

昨年度は、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分析法を確立した。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）。

昨年度の検討では、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。さらに、尿を硝酸と水で希釈後、

ろ過し、ICP-MS を用いて測定した結果、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、水道水、河川水および尿中の水銀については、定量は困難であると判断されたが、高濃度の場合は確認できるため、健康危機管理時に対応可能と判断できた。これらの検討により、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。

今年度は、これらの分析法のマニュアルを作成した。試薬類、装置、器具類、試料溶液・標準液の調整、定性・定量、計算式、判定、文献という構成である。健康危機が発生した時には、迅速に分析することが必要であり、そのために、分析の流れをフローシートにし、標準液の調整方法を図でも示した。また、昨年の検討結果を参考資料として添付した。この分析マニュアルを使用すれば、迅速で簡便に、食品、水および尿中の重金属の測定が可能である。

E. 研究発表

- 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) 野村千枝, 尾花裕孝, 織田肇: 健康危機対応を目的とした食品中有害重金属等の迅速分析法の検討, 食品衛生学雑誌,50(5), 253-255 (2009)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

第2部. マイクロウェーブ分解法

A. 研究目的

重金属を測定する際の試料の前処理法の一つとして硝酸や硫酸等を用いて試料成分を分解する酸分解法がある。しかしながら、従来からのケルダールフラスコを用いた湿式分解法では、分解完了までに1～2日と非常に時間を要する。そこで、我々はマイクロウェーブ分解装置を用いた前処理法を検討した。マイクロウェーブ分解装置は、まだそれほど普及率は高くないが、環境試料の分解への応用例は多い。食品への応用は少ないが、堅い固形試料も短時間で分解が可能であるため、食品分析においても有用性が期待できる装置である。昨年度は、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。対象元素は健康危機管理上優先順位が高いカドミウム、鉛、ヒ素、水銀とした。その結果、頭髪中のヒ素、鉛については認証値付きの試料においてやや高めめの値であったが、その他は良好な結果であり、健康被害発生時のスクリーニング検査法として適用可能と考えられた。今回は、確立したマイクロウェーブ分解法を用いた重金属迅速分析法のマニュアルを作成した。

B. 研究方法

1) マニュアルの作成

健康危機発生時に対応した迅速分析法（マイクロウェーブ分解法）のマニュアルを作成した。

C. 研究結果

1) 検査マニュアル

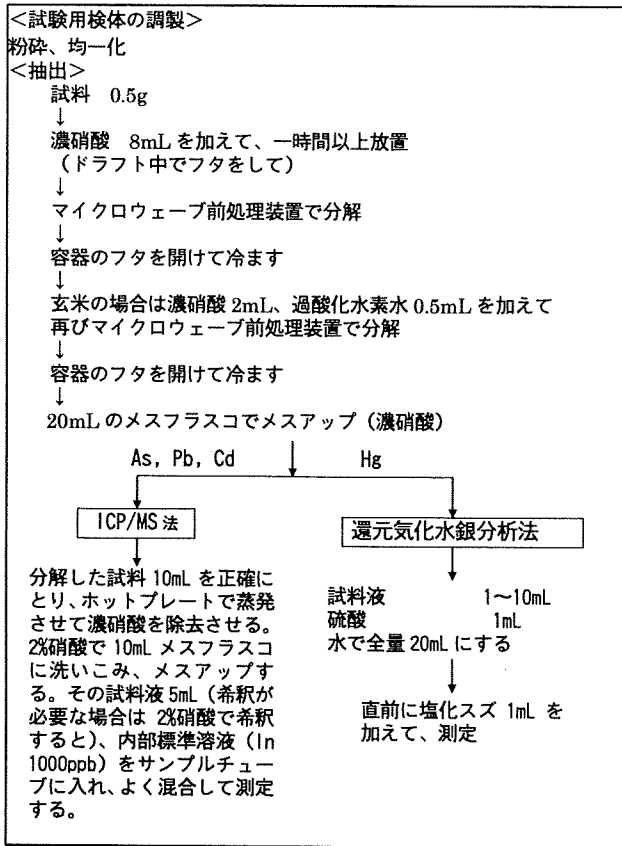
分析対象の試料別（食品試料及び生体試料）にマイクロウェーブ分解装置を用いた迅速分析法の検査マニュアルを作成した。

検査マニュアルの構成は、I. 試薬類、II. 装置、III. 器具等、IV. 試料溶液および標準液の調製、V. 定性・定量、VI. 計算式、VII. 判定、VIII. 文献、IX. フローシートとした。作成したマニュアルを別紙4及び5に示す。参考資料として、分析法の検証を行った際の標準試料の分析値や添加回収試験の結果を記載した。カドミウム、鉛、ヒ素、水銀以外の8元素（クロム、コバルト、銅、セレン、タリウム、ニッケル、マンガン、亜鉛）についても検討した結果を記載した。また、マイクロウェーブ分解装置や、ICP-MSを用いて重金属を分析する場合の注意点について記載することとした。迅速分析法の検討を通して得た情報をまとめたものを作成し、検査に有用な情報を共有化できるようにした。

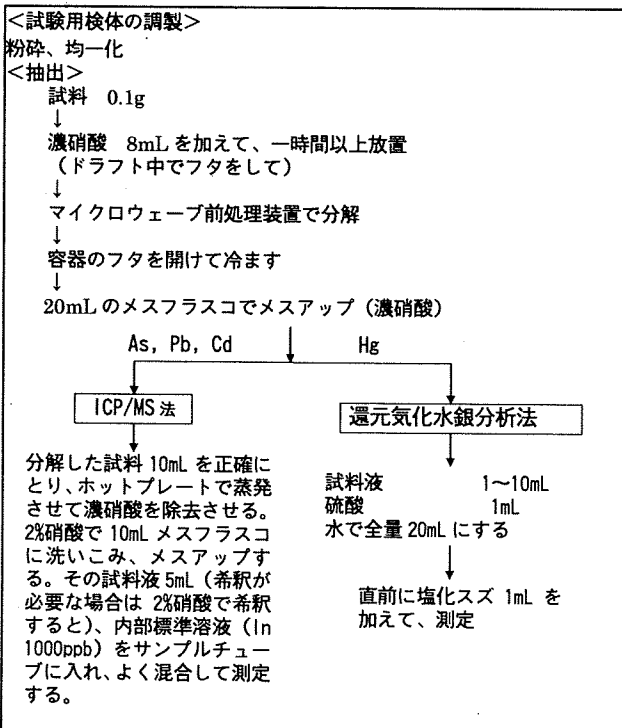
2) フローシート

マイクロウェーブ分解を用いた分析法のフローシートを以下に示す。検査マニュアルに沿って、対象試料（食品試料及び生体試料）ごとに作成し、検査法の流れが容易に把握できるようにした。

① 食品試料



② 生体試料



D. 結論

昨年度の研究で、健康危機発生時に対応するための食品試料及び生体試料の迅速な前処理装置として、マイクロウェーブを用いた方法の検討を行った。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、環境標準試料(認証値付き試料)の定量及び添加回収試験により分析法の検証を行った結果、ほぼ良好な結果が得られ、健康危機発生時の検査法として適用できることがわかった。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、一日で結果を出すことが可能であると推察された。健康被害発生時のスクリーニング検査法として非常に有用な方法と考えられたことから、本年度はマイクロウェーブ分解法を用いた迅速分析法の検査マニュアルを作成した。マニュアルには、検査に使用する試薬類、装置、器具類、試料溶液・標準液の調製方法、定性・定量方法、計算式、判定方法、文献を記載した。また、分析の流れが一目でわかるようにフローシートを作成した。さらに参考資料として、迅速分析法の検証結果、迅速分析法を用いて重金属を分析する際の注意点をまとめたものを作成し、検査に有用な情報を共有化できるようにした。これらのマニュアルを活用することにより、今後、より迅速で網羅的な検査が可能となる。

E. 研究危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

芦塚由紀, 岡本華菜, 山本重一, 中川礼子:
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の検討, 福岡県保健環境研究所年報 第36号, 61-66, 2009.

2. 学会発表

芦塚由紀, 岡本華菜, 山本重一, 中川礼子: マイクロウェーブ分解装置を用いた食品中重金属の迅速測定法について, 第30回九州衛生環境技術協議会, 大分, 2009

G. 知的所有権の取得情報

なし

別紙 1

健康危機管理時における食品中の重金属迅速分析マニュアル (ヒ素、鉛、水銀、カドミウム)

I. 試薬類

1. 標準品

ヒ素 (As)、鉛 (Pb)、水銀 (Hg)、カドミウム (Cd) 標準原液 (1,000 mg/L(ppm)) : JCSS 認定、和光純薬工業製等、冷所 (25℃以下) 保存 (使用期限 : 容器に記載)

2. その他の試薬等

- 1) 硫酸 : 有害金属測定用
- 2) 硝酸 : 有害金属測定用
- 3) 水 : 純水製造装置により精製したもの
- 4) 1%硝酸 : 硝酸 1 mL に水を加え、100 mL に定容する。
- 5) 8%硫酸 : 水約 90 mL に硫酸 8 g を加え、放冷後 100 mL に定容する。

II. 装置

- 1) 純水製造装置 : 日本ミリポア製 MILLI Q SP.TOC.等
- 2) 上皿天秤 (実感量 0.01 g で測定できるもの)
- 3) ホモジナイザー (ディスポーザブルタイプのシャフトが使用できるもの)
: キアゲン製 TissueRuptor™等
- 4) 高速遠心機 (50mL PP 遠沈管を 5,000 rpm で遠心できるもの)
: 日立工機製 himac SCR20B 等
- 5) 高速振とう機 (50mL PP 遠沈管を振とうできるもの)
- 6) マイクロピペッター
- 7) 誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-AES) : 島津製作所製 ICPS-7510 等

III. 器具等

- 1) 50 mL ポリプロピレン製遠沈管 (50 mL PP 遠沈管)
- 2) ディスポーザブルタイプのホモジナイザーシャフト : TissueRuptor Disposable Probes 等
- 3) メンブランフィルター : 親水性 PTFE、φ13 mm、0.20 μm(必要に応じてプレフィルターを用いる)、アドバンテック東洋製 DISMIC 等
- 4) 12 mL ディスポシリンジ : アズワン製 PP ディスポシリンジ等
- 5) 10 mL PP 遠沈管 : 栄研化学製丸底スピッツ等
- 6) チップ

- 7) 駒込ピペット各種： PP製が望ましい。
- 8) プラスチック製手袋、マスク等

IV. 試料溶液および標準液の調製

1. 試料溶液^{※1}

1) 試験用検体の調製

ポリ袋やフードプロセッサー等で粉碎・均一化する。

2) 抽出

試料 0.25 g を 50 mL PP 遠沈管に採り、硫酸 10 g^{※2, ※3}を加え、振とう抽出、あるいはホモジナイザーで 30 秒間抽出する。必要であれば、室温毎分 5,000 回転で 10 分間遠心分離する。上清 4 g を 50 mL PP 遠沈管に採り、1%硝酸で 50 mL に定容し、抽出液とする。これをメンブランフィルターでろ過し試料溶液とする。

2. 標準溶液（別紙参照）^{※1}

標準原液を 1%硝酸および 8%硫酸を含む水溶液で 0.01~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm) になるように調製する（用時調製）。

※1 試料溶液および標準溶液の調製は、器具からの汚染を避けるためメスフラスコおよびホールピペットの代わりに、50 mL PP 遠沈管等のディスポーザブル容器およびマイクロピペットを用いて調製する。

※2 酸使用時には、手袋およびマスクをして取り扱う。手袋はプラスチック製が望ましい。

※3 明らかに有機物を多く含有せず、かつアスコルビン酸等の酸化防止剤の表示が無い場合は、10%硝酸 10 mL を用いて抽出しても良い。この場合、標準溶液の作成には、硫酸の代わりに 10%硝酸を用いる。

V. 定性・定量

標準溶液および試料溶液を ICP-AES に導入する。標準溶液については、それぞれの金属の発光強度を測定し、検量線を作成する。試験溶液についても、同様にそれぞれの金属の発光強度を測定し、Ⅵの計算式より試料溶液中の金属の濃度を算出する。ICP-AES の測定条件例を以下に示す。

[ICP-AES 測定条件例]

装置：ICPS-7510

周波数：27.120 MHz

高周波出力：1.2 kW

ガス：アルゴン