

報 告 書



化学物質分析法開発調査報告書(1,3-ビス[(2,3-エポキシプロピル)オキシ]ベンゼン)
(平成26年度環境省受託事業)

江口芳夫

環境省の委託を受け、環境水中の1,3-ビス[(2,3-エポキシプロピル)オキシ]ベンゼン(別名レゾルシンジグリシジルエーテル(RDGEと略記))の分析法開発調査を行った。

対象物質の分子量：222.23、融点：42.5℃、沸点：147℃ (0.4 mmHg)、用途：プラスチック添加剤(希釈剤)である。

開発した分析法は次のとおり。水質試料200 mLをガラス繊維ろ紙(保留粒子径1 μm)でろ過し、あらかじめアセトン及び精製水の各10 mLを順次通してコンディショニングした固相カートリッジ(Waters製、Sep-Pak Plus C18 (360mg))にろ液を10 mL/minで通水する。通水終了後、固相カートリッジに精製水10 mLを通して洗浄し、遠心分離(3000 rpm, 10 min)及び窒素ガス(約500 mL/min, 40 min)を通気して乾燥する。固相カートリッジにアセトン5 mLをバックフラッシュ法で通液して溶出し、目盛付試験管に受ける。この溶出液を窒素気流により濃縮して1 mL定容とし、内標準液(フェナントレン- d_{10} 5.00 μg/mL) 10 μL及び10%ポリエチレングリコール(PEG) 200溶液20 μLを添加して試験液とし、GC/MS-SIMで分析する。使用カラム：J&W DB-5ms 30 m×0.25 mm×0.25 μm、カラム温度：80℃ (1 min)→10℃ /min→300℃ (3 min)、モニターイオン：RDGE m/z 222.1 (定量用)、166.1 (確認用)、フェナントレン- d_{10} m/z 188.1。

本法は水質試料のRDGEの定量が可能であり、MDLは9.7 ng/L、MQLは25 ng/Lであった。河川水及び海水を用いた添加回収試験の回収率はそれぞれ99%及び97%であった。北九州市内の河川水及び海水試料からはRDGEは検出されなかった。

RDGEは水中での保存性が悪いため、採取後速やかに分析に供する必要がある。固相抽出法を用いる限りは、河川水で2日以内、海水で採水当日に分析すれば、残存率80%の範囲内で分析できる。

食品中残留農薬に関する一日摂取量実態調査 (平成26年度厚生労働省受託事業)

田邊 明、世戸伸一、長井直子、陣矢大助、石橋正博

1 はじめに

市民の食の安心・安全を確保する一環として、市民が日常の食生活においてどの程度の量の残留農薬を摂取しているかを把握するため、マーケットバスケット方式で採集した試料について、低濃度測定が可能なLC/MS/MSを用いて残留農薬測定を行った。なお本調査は平成26年度厚生労働省受託事業である。

2 試験の概要

2.1 試料調製

調査対象食品を「平成20～22年度国民健康栄養調査」の食品分類と食品別摂取量を参考に、飲料水を含む14群に分類し(表1)、各群から選んだ主な食品238品目を市内のマーケットなどで購入した(購入時期：平成26年12月)。調理が必要な食品については、通常行われている調理(米は炊飯するなど)を施した。次に国民健康・栄養調査の北九州ブロックの食品群別摂取量をもとに、群毎に必要な量を混合して均一化し、試料とした。

2.2 前処理

平成17年1月24日付食安発0124001号厚労省通知のLC/MSによる農薬の一斉試験法(農産物)に準じて行った。

【I、II、V～XIV群】 試料20.0gにアセトニトリル50mL及び20mLを加え、それぞれ5分間ホモジナイズ抽出した後ろ過し、抽出液を合わせて100mLに定容した。このうち20mLを分取して塩化ナトリウム10gを含むpH7のリン酸緩衝液20mLで塩析後、有機層をC18ミニカラム(1000mg)に通して精製し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、約2mLまで減圧濃縮した。これをEnvicarb/NH2カラムに負荷して、アセトニトリル/トルエン(3:1)20mLで溶出した。溶出液を約1mLまで減圧濃縮し、窒素吹付けで乾固させ、メタノール1mLを添加して測定用試料とした。

【III群】 試料5gに精製水5mL及びアセトニトリル20mLを加え、1分間ホモジナイズ抽出後、2500rpmで5分間遠心分離し、有機層を分取した。残留物にアセトニトリル20mLを加えて同様に操作し、有機層を合わせた。続く塩析操作以降はI群等と同様の操作を行った。

【IV群】 試料5gに無水硫酸ナトリウム5g、アセトニトリル30mL及びヘキサン10mLを加え、1分間ホモジナイズ抽出後、2500rpmで5分間遠心分離し、アセトニトリル層を分取した。残留物にアセトニトリル20mLを加え、1分間振とうし、同様に遠心分離した。得られたアセトニトリル層を合わせ、これにヘキサン20mLを加えて10分間振とう後、ヘキサン層を廃棄した。再度ヘキサン層での洗浄を行い、得られたアセトニトリル層を約20mLに減圧濃縮した後、I群等のC18カラム精製以降と同様に操作した。

2.3 測定条件

測定はLC/MS/MSで行った。測定条件は、キャピラリ電圧：3kV、エクストラクタ電圧：3V、RFレンズ電圧：0.1V、ソース温度：120℃、デソルベーションガス温度：400℃、同流量：850L/hr、コーンガス流量：50L/hr、コリジョンガス：Ar、同流量：0.3ml/minである。コーン電圧等、項目毎の測定条件を表2に示す。

表1 対象食品群

| 群 | 主成分 |
|------|----------|
| I | 米類 |
| II | 穀類・芋類 |
| III | 砂糖類・菓子類 |
| IV | 油脂類 |
| V | 豆類 |
| VI | 果実類 |
| VII | 緑黄色野菜類 |
| VIII | 淡色野菜類・海藻 |
| IX | 調味・嗜好飲料 |
| X | 魚介類 |
| XI | 肉類・卵類 |
| XII | 乳類 |
| XIII | その他の食品 |
| XIV | 飲料水 |

3 結果

VII群、XI群及びXIV群について行った添加回収試験の結果を表3に示す。

次に各群の分析結果を表4に示す。14食品群のうちII群（穀類・芋類）からアゾキシストロビン0.00018ppm 1種類が、III群（砂糖類・菓子類）からはチアクロプリド0.0006ppm・ルフエヌロン0.0009ppm・フルフェノクスロン0.0004ppmの3種類、IV群（油脂類）からイミダクロプリド0.0034ppmの1種類、VI群（果実類）からはイミダクロプリド0.0002ppm・チアクロプリド0.0004ppm・アゾキシストラビン0.00006ppm・ボスカリド0.00007ppm・イマザリル0.0087ppm・ピラクロストラビン0.0002ppmの6種類、VII群（緑黄色野菜）からはチアメトキサム0.0009ppm・アゾキシストロビン0.00007ppmの2種類、VIII群（淡色野菜／海藻類）からはチアメトキサム0.0002ppm・イミダクロプリド0.0002ppm・アゾキシストロビン0.00017ppm・ボスカリド0.0004ppmの4種類、IX群（調味・嗜好飲料）からはチアクロプリド0.0003ppm・ボスカリド0.0003ppmの2種類、XIII群（その他の食品）からは、アゾキシストロビン0.00018ppmの1種類が検出された。これらの残留濃度は、一日許容摂取量に対する1人1日当たりの摂取量が多いものでルフエヌロンの0.076%、最も少ないものはフルフェノクスロンの0.0005%と微量であることが確認された(表4参照)。

* 農薬等ADI関連情報データベース (http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/pest_res/)

検出農薬一覧を表5に示す。

表2 対象物質及びLC/MS/MSイオン化条件

| 農薬成分名 | 保持時間 (分) | モード | 定量イオン | | | | 定性イオン | | | |
|-----------|-------------|------|----------------|----------------|--------------|------------|----------------|----------------|--------------|------------|
| | | | プリカーサ (m/z) | プロダクト (m/z) | コーン電圧 (V) | CE (eV) | プリカーサ (m/z) | プロダクト (m/z) | コーン電圧 (V) | CE (eV) |
| メソミル | 2.63 | ESI+ | 163.1 | 87.8 | 10 | 10 | 163.1 | 105.7 | 10 | 10 |
| チアメトキサム | 2.68 | ESI+ | 292.0 | 211.0 | 20 | 15 | 292.0 | 181.1 | 20 | 15 |
| イミダクロプリド | 3.00 | ESI+ | 256.1 | 174.8 | 20 | 20 | 256.1 | 208.9 | 20 | 20 |
| クロチアニジン | 3.12 | ESI+ | 250.0 | 169.0 | 15 | 15 | 250.0 | 131.8 | 15 | 15 |
| チアクロプリド | 3.74 | ESI+ | 253.0 | 125.8 | 30 | 25 | 255.0 | 125.8 | 30 | 25 |
| アゾキシストロビン | 8.36 | ESI+ | 404.1 | 372.1 | 20 | 15 | 404.1 | 344.0 | 20 | 20 |
| ボスカリド | 8.87 | ESI+ | 343.0 | 307.0 | 30 | 25 | 343.0 | 139.8 | 30 | 30 |
| シアゾファミド | 10.19 | ESI+ | 325.1 | 107.7 | 15 | 15 | 327.1 | 107.7 | 15 | 15 |
| イマザリル | 11.07 | ESI+ | 297.1 | 158.8 | 35 | 20 | 299.1 | 160.8 | 35 | 20 |
| ピラクロストロビン | 11.46 | ESI+ | 388.1 | 162.9 | 20 | 25 | 390.1 | 162.9 | 20 | 25 |
| ルフエヌロン | 13.44 | ESI- | 509.0 | 325.9 | 25 | 20 | 509.0 | 174.9 | 25 | 30 |
| フルフェノクスロン | 14.10 | ESI+ | 489.0 | 157.8 | 25 | 25 | 489.0 | 140.9 | 25 | 25 |

CE：コリジョンエネルギー

表3 繰り返し添加回収試験結果

| 農薬名 | Ⅶ群 回収率% | | Ⅺ群 回収率% | | ⅩⅣ群 回収率% | |
|-----------|---------|-----|---------|-----|----------|-----|
| | 平均 | CV% | 平均 | CV% | 平均 | CV% |
| メソミル | 86.6 | 3.0 | 82.6 | 1.4 | 85.2 | 4.7 |
| チアメトキサム | 73.0 | 4.2 | 59.3 | 4.4 | 82.0 | 5.8 |
| イミダクロプリド | 95.5 | 1.2 | 79.5 | 7.6 | 88.9 | 7.9 |
| クロチアニジン | 92.1 | 2.7 | 72.6 | 6.5 | 92.1 | 7.6 |
| チアクロプリド | 71.4 | 2.8 | 84.6 | 3.9 | 92.0 | 4.4 |
| アゾキシストロビン | 103.2 | 4.0 | 97.5 | 4.4 | 100.6 | 2.3 |
| ボスカリド | 101.2 | 4.3 | 87.1 | 5.7 | 94.5 | 5.7 |
| シアゾファミド | 97.2 | 1.9 | 72.6 | 6.5 | 100.2 | 1.1 |
| イマザリル | 84.7 | 3.0 | 100.8 | 1.2 | 85.4 | 1.9 |
| ピラクロストロビン | 95.6 | 2.6 | 101.4 | 1.7 | 92.3 | 2.7 |
| ルフェヌロン | 107.7 | 5.4 | 97.7 | 3.0 | 103.0 | 0.7 |
| フルフェノクスロン | 119.6 | 2.8 | 132.1 | 6.3 | 102.3 | 2.1 |

標準品添加量：Ⅶ群及びⅩⅣ群：20ng/20g

表4 一日摂取量の一日摂取許容量(ADI)比

| 農薬名 | 検出群 | 検出濃度 | 摂取量 合計 | ADI (mg/kg/day) | ADI (体重50Kgで換算) | ADI比 (%) |
|-----------|------------|-------------------|--------------|--------------------|--------------------|-------------|
| チアメトキサム | Ⅶ,Ⅷ | 0.0002 ~ 0.0009 | 0.12 μ g | 0.018 | 900 μ g | 0.01 |
| イミダクロプリド | Ⅳ,Ⅵ,Ⅷ | 0.0002 ~ 0.0034 | 0.09 μ g | 0.057 | 2,850 μ g | 0.003 |
| チアクロプリド | Ⅲ,Ⅵ,Ⅸ | 0.0004 ~ 0.0008 | 0.53 μ g | 0.01 | 500 μ g | 0.11 |
| アゾキシストロビン | Ⅱ,Ⅵ,Ⅶ,Ⅷ,ⅩⅢ | 0.00006 ~ 0.00018 | 0.09 μ g | 0.18 | 9,000 μ g | 0.001 |
| ボスカリド | Ⅵ,Ⅷ,Ⅸ | 0.0003 ~ 0.0007 | 0.35 μ g | 0.044 | 2,200 μ g | 0.016 |
| イマザリル | Ⅵ | 0.0087 | 0.84 μ g | 0.03 | 1,500 μ g | 0.056 |
| ピラクロストロビン | Ⅵ | 0.0002 | 0.02 μ g | 0.034 | 1,700 μ g | 0.001 |
| ルフェヌロン | Ⅲ,Ⅶ | 0.0009 ~ 0.0059 | 0.53 μ g | 0.014 | 700 μ g | 0.076 |
| フルフェノクスロン | Ⅲ | 0.0004 | 0.01 μ g | 0.037 | 1,850 μ g | 0.0005 |

表5 検出農薬一覧その1

| 農薬名 | | 食 品 群 | | | | | | |
|-----------|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | I | II | III | IV | V | VI | VII |
| メソミル | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 81.5 | 87.4 | 38.4 | 38.2 | 65.1 | 69.1 | 86.6 |
| チアメトキサム | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 75.0 | 54.9 | 23.2 | 20.3 | 35.0 | 38.9 | 73.0 |
| イミダクロプリド | D | N.D. | N.D. | N.D. | 0.0034 | N.D. | 0.0002 | N.D. |
| | L | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 |
| | R | 71.9 | 85.2 | 58.7 | 89.5 | 60.7 | 65.9 | 95.5 |
| クロチアニジン | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 91.7 | 81.1 | 43.2 | 50.8 | 54.8 | 42.8 | 92.1 |
| チアクロプリド | D | N.D. | N.D. | 0.0008 | N.D. | N.D. | 0.0004 | N.D. |
| | L | 0.0003 | 0.00005 | 0.00005 | 0.00005 | 0.00005 | 0.00005 | 0.00005 |
| | R | 72.9 | 68.6 | 81.6 | 30.0 | 60.2 | 90.9 | 71.4 |
| アゾキシストロビン | D | N.D. | 0.00018 | N.D. | N.D. | N.D. | 0.00008 | 0.00007 |
| | L | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 |
| | R | 75.2 | 104.9 | 86.7 | 56.8 | 99.7 | 105.7 | 103.2 |
| ボスカリド | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.0007 | N.D. |
| | L | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 |
| | R | 80.2 | 97.9 | 106.3 | 80.3 | 95.5 | 72.0 | 101.2 |
| シアゾファミド | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 78.3 | 83.9 | 96.8 | 25.1 | 90.4 | 99.8 | 97.2 |
| イマザリル | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.0087 | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 63.9 | 95.7 | 44.5 | 40.2 | 95.1 | 106.0 | 84.7 |
| ピラクロストロビン | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.0002 | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 73.7 | 90.1 | 100.9 | 51.6 | 87.8 | 98.5 | 95.6 |
| ルフエヌロン | D | N.D. | N.D. | 0.0009 | N.D. | N.D. | N.D. | 0.0059 |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 88.3 | 101.9 | 92.4 | 93.5 | 112.6 | 96.0 | 107.7 |
| フルフェノクスロン | D | N.D. | N.D. | 0.0004 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 |
| | R | 83.7 | 119.4 | 91.9 | 81.5 | 111.5 | 129.0 | 119.8 |

D：検出値(ppm)、L：定量限界(ppm)、R：回収率(%) N.D.：定量限界値以下

表5 検出農薬一覧その2

| 農薬名 | | 食 品 群 | | | | | | |
|-----------|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | VIII | IX | X | XI | XII | XIII | XIV |
| メソミル | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 72.0 | 29.0 | 92.5 | 82.6 | 81.3 | 42.2 | 85.2 |
| チアメトキサム | D | 0.0002 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 48.0 | 27.3 | 51.3 | 59.3 | 66.1 | 14.3 | 82.0 |
| イミダクロプリド | D | 0.0002 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 |
| | R | 55.1 | 30.2 | 79.7 | 79.5 | 86.3 | 39.0 | 88.9 |
| クロチアニジン | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 |
| | R | 43.8 | 30.8 | 103.0 | 72.6 | 85.0 | 32.6 | 92.1 |
| チアクロプリド | D | N.D. | 0.0008 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 43.2 | 68.3 | 75.8 | 84.6 | 98.0 | 25.5 | 92.0 |
| アゾキシストロビン | D | 0.00017 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.00018 | N.D. |
| | L | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 | 0.00003 |
| | R | 95.5 | 102.1 | 102.0 | 97.5 | 102.0 | 92.3 | 100.8 |
| ボスカリド | D | 0.0004 | 0.0003 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 |
| | R | 83.4 | 89.0 | 84.2 | 87.1 | 96.8 | 80.3 | 94.5 |
| シアゾファミド | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 |
| | R | 109.9 | 91.1 | 101.0 | 72.6 | 97.3 | 75.5 | 100.2 |
| イマザリル | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 97.9 | 89.2 | 99.7 | 100.8 | 105.1 | 93.1 | 85.4 |
| ピラクロストロビン | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 96.0 | 99.8 | 99.8 | 101.4 | 80.8 | 96.0 | 92.3 |
| ルフエヌロン | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | R | 98.3 | 103.3 | 98.2 | 97.7 | 59.4 | 88.3 | 103.0 |
| フルフェノクスロン | D | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | L | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 |
| | R | 112.0 | 124.6 | 107.8 | 132.1 | 99.8 | 129.0 | 102.3 |

D：検出値(ppm)、L：定量限界(ppm)、R：回収率(%) N.D.：定量限界値以下

要旨

2014年10月市内A・B区で細菌性赤痢が散発した。うちA区にある幼稚園で本菌による集団発生が継続して起こった。分離された菌株は全てD群赤痢菌(*Shigella sonnei*)であった。PFGE法による分子疫学的解析の結果、全ての菌株が同一のパターンを示し共通の感染原因が示唆された。また、MLVA法(国立感染症研究所に依頼)では本分離菌株のパターンは国内では分離されたことのないパターンと判明したが、患者、患者家族および園関係者の中に近々の海外渡航者はおらず、保健所および国立感染症研究所感染症疫学センターFETPチームの疫学調査からも共通の感染原因を確定するには至らなかった。

A はじめに

細菌性赤痢は全国で毎年200例程度届出のある3類感染症である。その多くが海外渡航者由来のものであるが、国内集団発生事例も数件報告がある。血清型ではD群赤痢菌が細菌性赤痢の中では届出の大半を占め、他の血清型に比べ比較的軽微な症状とされている。

本市では、2014年2件(本論文事例は除く)、2011年2件、2008年3件の届出を受けたが、いずれも散発事例で、集団発生事例は2001年韓国産カキによる西日本を中心とした広域集団食中毒事件のみである。

B 研究目的

2014年9月下旬～10月上旬にB区小学校児童およびその家族内で細菌性赤痢が発生し3人から菌株が分離された。また、10月初旬にA区幼稚園園児2家族4人から細菌性赤痢菌株が分離された。この散発事例は終息することなく、同幼稚園の10月19日の運動会開催後から同月25日にかけて園児および園児家族9人が発症し菌株が分離された。また、患者園児の家族1人からも無症状で菌株を分離している。そこで、市内A・B区の散発事例および同一幼稚園における集団発生事例の細菌性赤痢の疫学的な関連を究明するために、表現型別分類である血清型および薬剤感受性試験と遺伝子型別分類である病原性遺伝子の保有状況やPFGE法およびMLVA法(国立感染症研究所に依頼)の検査解析を実施した。

C 研究方法

1. 供試菌株

9月27日から10月25日に発症した患者、あるいは患者家族の無症状病原体保有者から分離したD群赤痢菌17菌株が保健所から搬入された。菌株の詳細を表1に示す。また、有症者21名の症状比率は下痢95%、発熱71%、腹痛48%、嘔吐38%、膿粘血便19%、頭痛10%、しぶり便5%および痙攣5%であった。

2. 方法

(1) 表現型別分類

赤痢菌の血清型は赤痢菌免疫血清「生研」(デンカ生

研)を用いて生菌試料で使用説明書に従い凝集試験を実施した。

薬剤感受性試験は、KBディスク法によるセンシディスク(日本BD)12薬剤を用いCLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に従い実施した。12薬剤はアンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ストレプトマイシン(SM)、ナリジクス酸(NA)、クロラムフェニコール(CP)、ノルフロキサシン(NFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフォタキシム(CTX)、ホスホマイシン(FOM)、スロフォメトキサゾール/トリメトプリム(SXT)を用いた。

(2) 遺伝子型別分類

赤痢菌細胞侵入因子であるipaH遺伝子およびプラスミド性のinvE遺伝子の検出には、タカラバイオの市販プライマーを用いて使用説明書に従いPCR反応を実施した。

PFGE法はCDC(米国疾病管理予防センター、U.S. Centers for Disease Control and Prevention)のプロトコルに基づいて実施した。すなわち制限酵素Xba I消化後、泳動条件は6.0V/cm、パルスタイム2.2-54.2秒、泳動時間19時間、バッファー温度14℃の条件で実施した。

MLVA法は10月16日に最初の届出のあった3菌株を国立感染症研究所細菌第一部第二室に送付し、分子疫学的解析を依頼した。

D 研究結果

(1) 表現型別分類

D群I相の単一血清型は12菌株、II相の単一血清型は2菌株、I・II相混合血清型は3菌株認められた。散発および集団発生の違いによる相の違いは認めなかった。

薬剤耐性型は、1菌株がSMの1薬剤耐性型であった。残り16菌株は全てSM・TC・SXTの3薬剤耐性型であった。1薬剤耐性型の1菌株は患者園児由来であり、他の患者との症状の違いは認めなかった。

(2) 遺伝子型別分類

赤痢菌の病原性遺伝子保有状況をPCR法で分類したところ、ipaH遺伝子およびinvE遺伝子ともに保有する株が15株あった。残り2株はともにプラスミド性のinvE遺伝子を保有せず、ipaH遺伝子のみを保有していた。

PFGE法による分子疫学的解析の結果は、B区在住の小学校児童および同家族由来菌株3菌株とA区幼稚園集団発生事例由来菌株14菌株中13菌株の泳動パターンが全て一致した。また、残り1菌株(A区幼稚園園児患者由来)も1バンドだけ異なる類似性の高い泳動パターンであった。

MLVA法による解析では3菌株ともパターンが一致した。また、このMLVAパターンは国立感染症研究所が2009年より国内で分離収集した他の赤痢菌株とは一致しなかった。

E 考察

分子疫学的解析でのPFGEの泳動パターンは通常、一致する場合は「区別できない」、2～3バンド異なる場合は、「極めて関連性が高い」と解釈される。A・B区にまたがって発生した細菌性赤痢菌株の関連性は極めて高く共通の感染原因があると推測できた。また、D群赤痢菌は相変異を起こしやすく、I相からII相に変異した過程で病原性が脱落すると考えられている。今回、2菌株が赤痢菌細胞侵入因子であるプラスミド

性のinvE遺伝子が陰性であったが、この2菌株は本因子が相変異と同様に脱落したものと推測された。

薬剤感受性試験については、17菌株中16菌株が3薬剤(SM・TC・SXT)耐性の同一パターンを示した。この3薬剤耐性の頻度は近年の分離株では非常に高く、分離菌株の80%程度が同薬剤に耐性という報告もある。また、1人の園児より分離した1菌株は1薬剤(SM)耐性であり、他の菌株の耐性パターンと異なった。これはこの菌株だけが感染原因の由来が異なっていたためなのか、あるいは耐性遺伝子の脱落がこの菌株にのみ起こったためなのか不明であった。

今回散発および集団発生した細菌性赤痢事例は、積極的な疫学調査が行われたが、感染原因の解明には至らなかった。D群赤痢菌は無症状で病原体を保有することも多く、二次汚染防止のため積極的な消毒を行うことが感染拡大防止につながる。しかし、幼稚園など高リスクグループにおいては、迅速な消毒等の衛生対策が措置されない場合には重篤な感染拡大が危惧される。今後迅速な疫学対策を推進する上でさらに当研究所においてもより一層の協働に努めたい。

謝辞

最後に、疫学調査およびMLVA解析を実施していただきました国立感染症研究所感染症疫学センターFETPチームならびに細菌第一部第二室の皆様へ感謝申し上げます。

表1 細菌性赤痢患者および保菌者一覧表

| 区 | 家族略号 | 年齢 | 内訳 | 発病日 | 10/19運動会参加 | 園児クラス | 菌分離 |
|------|------|------|--------|--------|------------|-------|-----|
| A | 1-1 | 32 | 園児家族 | 10月8日 | | A | ○ |
| | 1-2 | 4 | 園児 | なし | | A | ○ |
| | 1-3 | 1 | 園児家族 | 10/初 | | A | ○ |
| | 1-4 | 42 | 園児家族 | 10月8日 | | A | - |
| | 2-1 | 6 | 園児 | 10月9日 | | T | ○ |
| | 2-2 | - | 園児家族 | 10月5日 | | T | - |
| | 2-3 | 31 | 園児家族 | 10月14日 | | T | - |
| | 2-4 | 27 | 園児家族 | 10月15日 | | T | - |
| | 2-5 | - | 園児家族 | 10月12日 | | T | - |
| | 3 | 4 | 園児 | 10月19日 | ○ | P | ○ |
| | 4 | 4 | 園児 | 10月23日 | | P | ○ |
| | 5-1 | 5 | 園児 | 10月23日 | ○ | P | ○ |
| | 5-2 | 2 | 園児家族 | 10月25日 | | P | - |
| | 6 | 5 | 園児 | 10月23日 | ○ | P | ○ |
| | 7 | 5 | 園児 | 10月24日 | | P | ○ |
| | 8-1 | 5 | 園児 | 10月24日 | | P | ○ |
| | 8-2 | 39 | 園児家族 | なし | | P | ○ |
| | 9 | 34 | 園児家族 | 10月24日 | ○ | P | ○ |
| 10-1 | 5 | 園児 | 10月25日 | ○ | T | ○ | |
| 10-2 | 43 | 園児家族 | 10月25日 | ○ | T | ○ | |
| B | 11-1 | 7 | 学童 | 10月10日 | | | ○ |
| | 11-2 | 5 | 学童家族 | 9月27日 | | | ○ |
| | 11-3 | 40 | 学童家族 | 10月4日 | | | ○ |

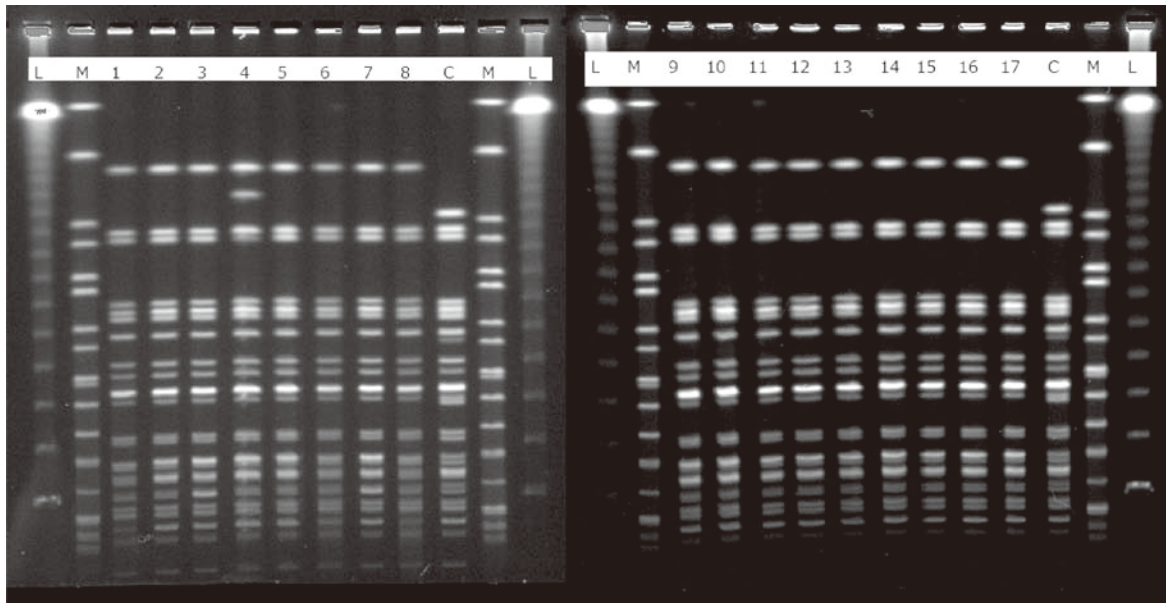


図1 赤痢菌のPFGE写真(下表 レーン番号および表1 家族略号)

| | | | | | | | |
|---|------|----|------|----|------|---|--------------------------------------|
| 1 | 1-1 | 7 | 11-3 | 13 | 8-1 | L | λ ラダー |
| 2 | 2-1 | 8 | 3 | 14 | 9 | M | <i>Sal</i> BraenderupH9812 |
| 3 | 11-1 | 9 | 4 | 15 | 10-1 | C | 2008年市内分離株(<i>Shigella sonnei</i>) |
| 4 | 1-2 | 10 | 5-1 | 16 | 10-2 | | |
| 5 | 1-3 | 11 | 6 | 17 | 8-2 | | |
| 6 | 11-2 | 12 | 7 | | | | |

astA遺伝子を保有する大腸菌による食中毒事例について

環境科学研究所 中村悦子、藤田景清、徳崎里美、齊藤 寛

1 はじめに

下痢原性大腸菌は表1のとおり分類されている。このうち病原因子としてastA遺伝子のみを保有する大腸菌については、病原性の有無が明らかではなく、他の下痢原性大腸菌として分類されている。しかし、胃腸炎の原因菌となることがあり、これまでも各地で食中毒の発生事例が報告されている。本市においても、平成26年度にastA遺伝子のみを保有する大腸菌が原因と考えられる食中毒が発生したので、その概要を報告する。

表1 下痢原性大腸菌の分類

| 分類 | 発生機序 | 主な病原因子 |
|----------------------------|---------|-----------|
| 腸管出血性／Vero毒素産生性(EHEC、VTEC) | 毒素 | VT1、VT2 |
| 腸管毒素原性(ETEC) | 毒素 | LT、ST |
| 腸管侵入性(EIEC) | 侵入性 | invE、ipaH |
| 腸管病原性(EPEC) | 細胞局在付着性 | eae |
| 腸管凝集付着性(EAggEC) | 細胞凝集付着性 | aggR |
| 他の下痢原性 | 不明 | astA |

2 食中毒事件の概要

平成26年5月26日、複数名が下痢、腹痛等の症状を呈しているとの通報が保健所にあった。患者の共通食は、前日に開催された小学校の運動会において提供された仕出し弁当であった。教職員や来賓等266名が摂食し、うち174名が発症したが、重症者はいなかった。発症までの潜伏時間は5.5～50時間であった。

3 検査材料と方法

保健所の要請に応じ、患者便19検体、調理従事者便6検体、食品残品5検体及び施設拭き取り10検体について、食中毒原因菌の検査を実施した。また、患者便については、併せてノロウイルスをはじめとする食中毒の原因となるウイルスの検査を実施した。

検査の流れを表2に示す。検体を増菌培養後、菌株が分離されたものについて、病原因子の検出及び血清型別を行った。

また、菌株が同一由来のものであるかを確認するため、ディスク法による薬剤感受性試験及びパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析を行った。

表2 検査の流れ

| | | | | |
|----|---|------|---|---|
| 培養 | → | 菌株分離 | → | <ul style="list-style-type: none">・PCR法による病原因子の検出・血清型別・薬剤感受性試験（薬剤：AM、CTX、GM、K、S、TE、CIP、C、NA、SXT、NOR、FF）・PFGE法による遺伝子解析（Xba IによりDNAを断片化して分離） |
|----|---|------|---|---|

4 結果

(1) 検体からの菌の分離

患者便12検体、調理従事者便5検体、施設拭き取り2検体から大腸菌が検出されたが、VT、eae等の下痢原性大腸菌の病原因子は保有していなかった。

その後、病院で実施した患者の検便で複数の患者から同一の血清型の大腸菌が検出されたという情報があり、分離菌株の血清型別を行ったところ19株全てがO1:H45であったことから、この集団に対し同じ大腸菌による感染が起きたことが疑われた。そこで、PCR法によりastA遺伝子の検出を試みたところ、全ての分離菌株がこれを保有していることが明らかになった。表3にastA遺伝子保有大腸菌の分離状況を示す。

なお、今回サルモネラ等その他の細菌についても検査を行っているが、大腸菌以外に食中毒の原因となったと考えられる細菌は分離されていない。また、ウイルスも検出されなかった。

表3 astA遺伝子保有大腸菌の分離状況

| 検体 | 検体数 | astA 遺伝子保有大腸菌 (O1:H45) の分離数 |
|--------|-----|-----------------------------|
| 患者便 | 19 | 12 |
| 調理従事者便 | 6 | 5 |
| 食品残品 | 5 | 0 |
| 施設拭き取り | 10 | 2 |

(2) 薬剤感受性試験

分離した17菌株について薬剤感受性試験を行った結果、全ての菌株がアンピシリン、セフトキシム及びナリジクス酸に対し耐性であり、同一の性状を示した。

(3) PFGE法による遺伝子解析

17菌株のPFGEパターンを図1に示す。パターンは全て一致しており、同一の遺伝子型であることが明らかとなった。

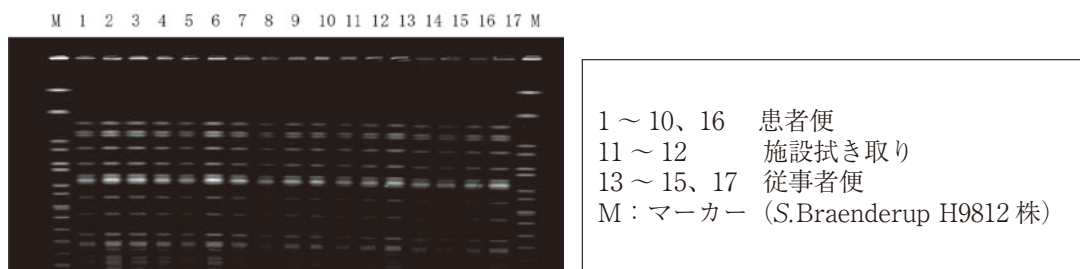


図1 分離菌株のPFGEパターン

5 まとめ

本事例においてastA遺伝子保有大腸菌が患者便や施設拭き取り等から多数検出されたが、血清型及び薬剤感受性試験の結果から同一の性状であることがわかった。また、遺伝子解析の結果も一致していることから、同一の由来の菌株であることが推察された。

病原因子としてastAのみを保有する大腸菌については、生化学性状が同じものが多数の患者から検出された場合は食中毒の原因菌と判断して良いことになっている。本事例においても、保健所は患者の疫学情報や分離菌株の性状などを考慮し、弁当が原因のastA遺伝子を保有する大腸菌による食中毒であったと判断した。

astA等、下痢原性大腸菌の病原因子の病原性についてはまだ不明な点もあることから、今後もさらに情報収集が必要である。