

LC/MS/MSによる動物用医薬品一斉試験法の検討

○長井直子¹、森永陽子¹、世戸伸一¹、田邊 明²、陣矢大助²
 (¹北九州市環境科学研究所、²北九州市上下水道局水質試験所)

【目的】

畜水産物中の動物用医薬品の試験法については、厚生労働省からHPLCによる一斉試験法及び個別試験法が通知されている。当所では、豚肉、鶏肉、鶏卵、牛乳、魚肉中の20種類の動物用医薬品の検査依頼があり、試料や対象の動物用医薬品の種類に応じて、通知法に基づいてLC/MS/MSによる分析を行っている。しかしながら通知法では、同じ試料であっても、対象医薬品によっては試験法が異なるので、1検体につき複数回の試験を行うため前処理に時間がかかり、また、試料によっては抽出中に目詰まりしたり、項目によっては安定した回収率が得られない場合があるなどの課題があった。

今回、新規のLC/MS/MSを導入し、より高感度な分析が可能となったこともあり、現在検査を行っている20種類の動物用医薬品における一斉試験法を検討したので、結果を報告する。

【方法】

- 1) 試料 市内で市販されていた、畜水産物(豚肉、鶏肉、鶏卵、牛乳、魚肉)5品目。
- 2) 試薬 動物用医薬品20種類(表2)の混合溶液を調製して使用。
- 3) 試験法 埼玉市の「加工食品中の動物用医薬品迅速一斉試験法」¹⁾及び岩手県の「LC/MS/MSによる畜水産食品中の動物用医薬品一斉分析試験法」²⁾をもとに、当所で検査を行っている5種類の試料・20種類の動物用医薬品に最適な条件を検討し、変更した方法を用いた(図1)。精製には、AiSTI Science社C18-50を用いた。
- 4) 装置及び測定条件 表1に示すとおり。

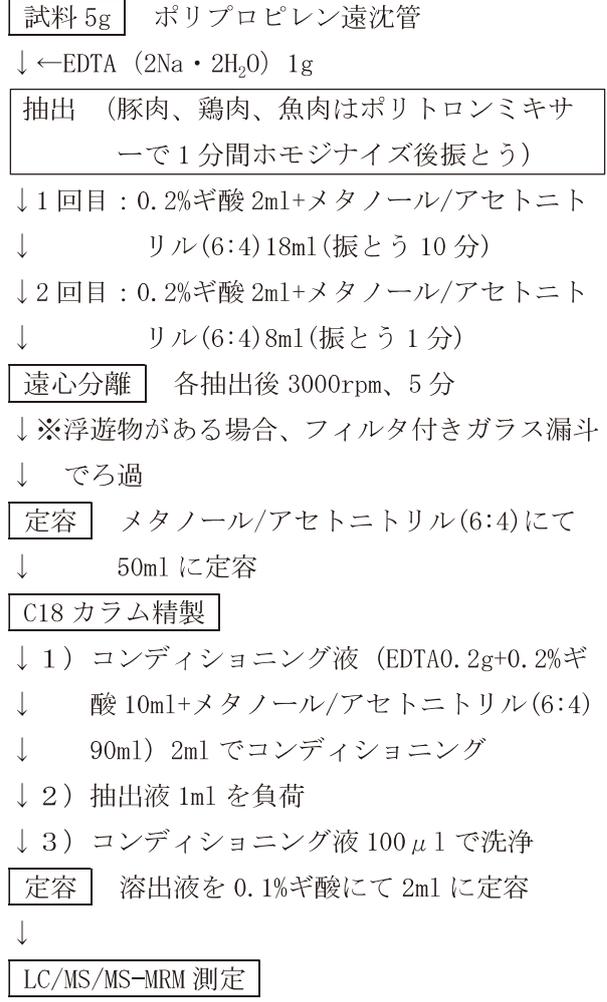


図1 前処理フロー

表1 装置及び測定条件	
LC/MS/MS (Agilent 6460)	
(1) LC条件	
カラム:	ODSカラム 2.1×100mm, 1.7µ m (Waters Aquity BEH C18)
カラム温度:	40°C
注入量:	5µ l
移動相:	A液:0.1%ギ酸溶液、B液:0.1%ギ酸アセトニトリル溶液
流速:	0.4mL/min
グラジエント条件:	5%(0min)→15%(2min)→20%(4min)→20%(5min)→30%(6min)→40%(7min)→45%(8min)→98%(9min)→98%(10min)
(2) MS/MS条件	
イオン源ガス温度:	300°C
シースガス温度:	250°C
キャピラリー電圧:	3.500V

【結果と考察】

1) EDTA の効果について 80%メタノール水で調製した標準混合溶液に EDTA を加えた場合と加えない場合で、C18 カラム(200mg)からの溶出を比較したところ、テトラサイクリン類 (3 種) とスピラマイシン類 (2 種) を含む 9 種の化合物で、EDTA を加えることで溶出率が 53~85%増加した。

2) 抽出溶媒(メタノール/アセトニトリル)の比率について 抽出溶媒の検討のため、メタノール/アセトニトリル溶液 (混合比率 8:1、2:1、1:1、1:2、1:8 及び 0:1) について、鶏卵を用いた添加回収試験を行った。その結果、メタノール比率が高いほどチアベンダゾール及びナイカルバジンの回収率が低下し、またアセトニトリル比率が高いほどネオスピラマイシンの回収率が低下する傾向がみられ、混合比率 1:1 ではほとんどの対象成分が良好な回収率を示した。しかしこの条件を鶏肉に適用したところ、チアベンダゾール等が低回収率を示した。そこでメタノール/アセトニトリルの混合比率を 6:4 として添加回収試験を行ったところ、全ての対象成分が良好な回収率を示したため、同比率の抽出溶媒を用いることとした。

3) 妥当性評価 試料濃度にして 0.01ppm となる

ように標準混合溶液を添加し、室内精度を除く、真度・併行精度について n=5 で評価を行った。その結果、5 品目 20 種類の動物用医薬品すべてで、真度及び併行精度が評価基準を満足した。今後、室内精度を含めた妥当性評価及び、各動物用医薬品の基準値に合わせたさらに低濃度での妥当性評価を行う予定である。

【まとめ】

今回検討した試験法では、固形分の分離が良くなるなど、通知法の際に生じていた前処理時の問題が解消し、畜水産物 5 品目における 20 種類の動物用医薬品すべてにおいて、回収率が良好であった。また、試料及び動物用医薬品の種類に応じて変えていた試験法が統一できたこと、さらに LC/MS/MS が高感度になったため、少量の抽出液からでも検査が可能となったことで、従来と比べて作業量及び溶媒使用量ともに、大幅に削減することができた。

【参考文献】

- 1) 吉田絵美子他, 食品衛生学会誌, Vol. 52, No. 1, p. 59, 2011
- 2) 梶田弘子他, 食品衛生学会誌, Vol. 49, No. 6, p. 381, 2008

No.		豚肉		鶏肉		鶏卵		魚肉		牛乳	
		回収率,%	RSD,%								
1	スルファジミジン	92.6	3.0	82.5	5.8	89.5	7.3	87.3	4.8	90.8	3.1
2	スルファメラジン	90.8	3.9	86.3	4.3	85.1	5.4	87.6	3.9	87.6	3.7
3	スルファモノメトキシ	90.5	2.3	82.5	6.1	87.8	5.4	92.2	1.5	86.1	3.6
4	スルファジメトキシ	90.3	1.1	83.8	5.5	90.2	4.2	90.8	2.7	86.9	2.0
5	スルファキノキサリン	88.6	3.5	83.4	7.4	87.8	3.9	89.1	4.3	87.9	1.6
6	オキシリン酸	94.3	4.9	85.4	5.7	89.1	6.5	93.4	4.2	88.9	2.6
7	チアンフェニコール	117.2	14.7	90.8	16.5	74.4	17.8	94.8	6.9	83.7	14.6
8	オルメトプリム	89.2	3.2	81.3	3.8	83.3	5.6	89.2	3.3	88.7	2.3
9	トリメトプリム	87.5	3.0	81.9	7.2	85.1	5.6	87.5	1.9	89.4	1.4
10	ピリメタミン	85.4	3.5	76.2	5.6	82.7	4.3	83.6	2.9	91.1	2.0
11	チアベンダゾール	88.7	2.5	80.7	3.0	79.6	5.3	84.7	3.1	87.5	2.5
12	5-ヒドロキシチアベンダゾール	81.8	2.1	78.5	3.5	85.9	4.4	87.8	3.0	90.3	2.1
13	フルベンダゾール	90.2	2.7	83.7	3.5	88.5	4.5	90.2	3.2	87.0	5.4
14	ナイカルバジン	77.0	4.2	73.4	4.6	76.5	5.2	71.1	6.8	82.2	6.1
15	テトラサイクリン	104.1	1.9	91.2	8.0	91.6	6.5	96.1	6.6	97.8	6.9
16	オキシテトラサイクリン	86.7	4.5	78.5	8.7	83.0	6.7	75.3	12.4	93.3	9.0
17	クロルテトラサイクリン	96.1	5.1	81.2	7.4	103.4	7.7	83.1	3.8	101.2	3.9
18	スピラマイシン	82.1	3.5	74.6	8.6	90.9	3.0	88.4	5.7	86.5	3.4
19	ネオスピラマイシン	75.5	3.7	72.9	5.2	80.3	3.0	89.2	2.9	93.9	2.4
20	ベンジルペニシリン	90.9	1.2	86.1	3.7	88.0	3.5	89.9	2.0	91.1	2.9

蚊の生息状況とデングウイルス・チクングニアウイルス保有状況調査

北九州市環境科学研究所 ○東 輝明 徳崎里美

1 はじめに

昨年度、東京都において約40年ぶりとなるデング熱の国内発生が多数報告されたことを受け、本年4月に「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針」が策定された。

本指針では、各自治体の役割として平常時におけるデング熱媒介蚊(主にヒトスジシマカ)の生息状況調査を実施するよう定められている。

北九州市においては、本年度、デング熱媒介蚊の生息状況調査に加え、蚊のデングウイルス及びチクングニアウイルスの保有状況を調査したので報告する。

なお、調査は本市保健福祉局生活衛生課と共同で実施した。

2 概要

(1) 蚊の採集と同定

調査はデングウイルス及びチクングニアウイルスを媒介するヒトスジシマカを対象として行った。調査場所は、対象蚊の生息に適していると考えられ、人が比較的多く利用し、かつ管理者に許諾が得られた、戸畑区の夜宮公園、八幡西区の曲里の松並木公園、小倉北区の勝山公園の3カ所を選定した。本調査の前に予備調査を行って蚊の生息状況、分布を確認、各公園内に調査地点を4地点ずつ設定した。蚊の採集は業者委託により実施した。

本調査は8、9月の2回、約1ヶ月の間隔をあけて、8分間人囀法で行った。ウイルス検査の検体を確保するため、4地点での採集個体数が合計10未満の公園については、30分間の追加採集を行った。

(2) 蚊からのデングウイルス及びチクングニアウイルスの検出

採集した蚊は地点ごとに仕分け、形態学的な同定により対象蚊の雌のみを選別した。

平成26年度に開催された「感染症媒介蚊対策に関する実技検討会」の資料に従い、実体顕微鏡下で胸部を切り分け、20個体までを1プールとした。以降は国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル」に従い、PBS乳剤としてウイルスのRNAを抽出した。

デングウイルスについては、デングウイルス全型共通のプライマーでOne step RT-PCRを行い、必要に応じて型別のプライマー・プローブを使用したリアルタイムRT-PCRによる確認検査を行った。

チクングニアウイルスについては、リアルタイムRT-PCRにより検査した。

3 結果

蚊の採集数は1回目164個体、2回目92個体の計256個体で、このうち254個体がヒトスジシマカ(メス:193個体)であった。本種の採集数を表に示す。なお、他の種は、1回目の調査で採集されたアカイエカ2個体のみであった。

デングウイルス遺伝子の保有状況は、全型共通のプライマーによるRT-PCRの結果、2回の調査とも、陽性対照(分子量511bp)近傍にバンドを認める検体があった。これらの検体について、型別のプライマー・プローブを用いたリアルタイムRT-PCRによる確認検査を実施したところ、デングウイルス遺伝子は検出されず、全ての検体について陰性となった。全型共通のプライマーによるRT-PCRの電気泳動像を図に示す。

チクングニアウイルスについても、全ての検体から遺伝子は検出されず陰性であった。

表 ヒトスジシマカの地点別採集個体数

公園名	地点名	8月11日		9月4日	
		メス	オス	メス	オス
夜宮	1	5	3	5	8
	2	0	0	2	0
	3	8	3	3	1
	4	51	7	3	2
	計	64	13	13	11
曲里	1	5	0	2	0
	2	1	0	2	0
	3	1	0	1	0
	4	0	0	0	0
	1(追加分)	19	4	6	0
	計	26	4	11	0
勝山	1	4	0	2	2
	2	29	15	39	10
	3	1	0	0	3
	4	4	2	0	1
	計	38	17	41	16
合計		128	34	65	27



① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ - + M

図 全型共通のプライマーを用いたデングウイルスのRT-PCR結果

①～⑩：検体、+：陽性対照、-：陰性対照、
M：100bp：分子量マーカー
⑤ ⑥ ⑧のレーンに陽性対照付近のバンドが認められる。

4 考察

調査対象のヒトスジシマカは日中、屋外における吸血行動が盛んな種として知られており、今回の採集場所、採集方法はその生態に沿ったもので、十分な採集数が得られた。

採集数は地点ごとのばらつきが大きく、本種が好んで産卵する雨水溝等の小水系があり、直射日光がさえぎられ、待ち伏せや休憩場所となる藪付近等では多い傾向にあった。

デングウイルスの検出については、蚊の胸部のみを用いて1プールを20個体以下とし、さらに乳剤を遠心分離した上清をポアサイズ0.2 μ mのフィルターでろ過したものを検体としたが、全型共通のプライマーを用いたRT-PCRでは、陽性対照の511bp近傍にバンドが認められた検体がいくつかあった。これらの検体については、型別のプライマー・プローブを用いたリアルタイムRT-PCRによる確認検査を要した。

確認検査は、型別のプライマーを用いたPCRで可能であることから、検体数が多い平常時のモニタリング調査では、全型共通のプライマーでスクリーニングし、疑わしいものを確認検査する今回の方法は、合理的かつ効率的であると思われる。

北九州市におけるマダニの生息状況とSFTSウイルス保有状況調査

北九州市環境科学研究所 ○木村尚志 徳崎里美
建設局水環境課 小林孝行

1 はじめに

近年、マダニによって媒介される新興ウイルス感染症であるSFTS（重症熱性血小板減少症候群）が注目されている。日本では平成25年1月に初めて確認され、西日本を中心に患者が報告されている。本年度は福岡県内でも患者が確認された。

当所では、平成26年度に北九州市内の複数の地点でマダニを採集し、マダニの分布状況を調査、SFTSウイルス遺伝子の検出を試みた。また、北九州市動物愛護センターで捕獲された犬からマダニを採取し、同様にウイルス遺伝子の検出を試みたので報告する。

2 調査方法

(1) マダニの採集と分類

市内でのマダニの採集は平成26年4月から10月まで旗振り法により行った。採集したマダニは顕微鏡下で観察し形態的に種類および発育段階別に分類した。

マダニの採集地点は主にイノシシ等の野生動物が出没する公園等から選定した。採集は、戸畑区中央公園、八幡東区河内貯水池、門司区小森江、小倉南区平尾台を中心に行い、その他に小倉北区足立山、八幡東区皿倉山、戸畑区夜宮公園の合計7地点でのべ24回実施した。

また、北九州市動物愛護センターの協力により、平成26年11月から平成27年4月までに捕獲された犬4頭からマダニを採取し同様に分類した。

(2) マダニからのSFTSウイルス遺伝子の検出

SFTSウイルス遺伝子の検出は国立感染症研究所の「マダニからのSFTSウイルス検出マニュアル(Ver 3.1)」に準じて、Isogen II中で検体を破砕してRNAを抽出した後、リアルタイムPCR法により行なった。種類毎に分類したマダニを若虫については5匹を1検体、成虫については1匹を1検体として合計169検体についてSFTSウイルス遺伝子の検出を行なった。

3 調査結果

採集されたマダニは521個体であった(不明を含む:表1、2)。チマダニ属として、キチマダニ、フタトゲチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニ、オオトゲチマダニの5種類が採集され、全体の85%を占めていた(表3)。特にキチマダニ、フタトゲチマダニについては採集数が多く、調査を行ったほぼ全ての地点で採集された。その他の種類ではキララマダニ属のタカサゴキララマダニとマダニ属のアカコッコマダニが採集された。

SFTSウイルス遺伝子の検出を行なった169検体については、いずれもSFTSウイルス遺伝子は検出されなかった。

表1 マダニの採集結果(市内)

採集地点		採集個体数		計
		成虫	若虫	
戸畑区	中央公園	26	64	90
八幡東区	河内貯水池	4		4
門司区	小森江	33	200	233
小倉南区	平尾台	12	143	155
その他		4	7	11
計		79	414	493

表2 マダニの採取集結果(捕獲犬)

捕獲地点	捕獲日	採集個体数			計
		成虫	若虫	不明	
小倉北区	H26. 11. 26	3	4		7
門司区	H26. 12. 8	4	2		6
門司区	H26. 12. 15	2			2
八幡西区	H27. 4. 6	10		3	13
計		19	6	3	28

表3 採集したマダニの分類

採取地点		戸畑区 中央公園	八幡東区 河内貯水池	門司区 小森江	小倉南区 平尾台	その他	捕獲犬	計
キチマダニ	成虫	6		20	10		19	55
	若虫	27		110	128	5	2	272
フタトゲチマダニ	成虫	17	4	6	1	2		30
	若虫	23		2	10			35
タカサゴチマダニ	成虫	2		3	1	1		7
	若虫	6		22	2			30
ヤマアラシチマダニ	成虫			2		1		3
	若虫							
オオトゲチマダニ	成虫							
	若虫				1			1
タカサゴキララマダニ	成虫			66		2		68
	若虫							
アカコッコマダニ	成虫			2				2
	若虫	2			2	2		6
不明	成虫	1						
	若虫	4					7	12

4 まとめ

今回の調査では調査地点毎に採集数に大きな差があったが、3属7種のマダニを確認することができた。キチマダニ、フタトゲチマダニについては採集数が多く、調査を行ったほぼ全ての地点で採集された。このことから、これらは市内に広く分布している種であると考えられた。またタカサゴキララマダニは68個体中66個体が小森江で採集されていることから、周辺の山系に優占的に生息していることが想定された。

国の調査では、フタトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ、オオトゲチマダニ、キチマダニ及びタカサゴキララマダニからSFTSウイルスの遺伝子が検出されている。今回の調査では、このうち4種が採集されたが、SFTSウイルスの遺伝子は検出されなかった。

しかし、平成27年6月には北九州市内で初めての患者が確認されており、SFTSウイルスを保有したマダニの存在が示唆される。今後、マダニ媒介性の感染症について調査を行う時には今回の調査結果を活用していきたい。