

5 衛生公害研究所セミナー

(1) 開催日時

平成21年11月19日(木) 午後1時10分から

(2) 会場

京都市衛生公害研究所 本館1階会議室

(3) 発表演題

ア 食品混入毒物等迅速検査法の標準作業書作成に向けて

生活衛生部門 伴埜 行則

(ア) 目的

食品由来の健康被害発生時における地方衛生研究所の役割の一つに原因物質の特定がある。迅速に検査を実施するために平成21年2月に地方衛生研究所全国協議会の理化学部会において「食品由来健康被害原因物質検査マニュアル」がまとめられた。今回、薬毒物及び自然毒を特定するための検査について、このマニュアルを参考に、従来作成してきたSOPを見直すこととした。

(イ) 方法

過去の食品に毒物が混入された事件(1977年青酸コーラ事件、1985年自動販売機パラコート混入事件、1998年和歌山カレー殺人事件及び1998年アジ化ナトリウム混入事件等)について振り返り、検査対象とすべき毒物の選定を行った。

(ウ) 結果と考察

過去の事例では、多くの試薬が身近にある研究所、大学及び病院等の事件が多く、対象となる毒物は様々である。そのため、原因物質特定のための検査は、あらゆる可能性を考慮に入れる必要がある。現在、健康事案関連のSOPは、和歌山カレー殺人事件を契機に国から配備されたシアンイオン、ヒ素イオン、硝酸・亜硝酸イオン及びコリンエステラーゼ阻害剤の簡易検査キット、簡易検査で判定できない場合の確認試験及び苦情等の依頼により作成したものを中心にSOP No. 4-16-1~16の16種類作成しており、現有の検査機器で対応可能な成分については網羅している。

健康被害発生時には、搬入試料を迅速に検査し、できるだけ早く結果を出すことが優先される。そのため、迅速検査キットが第1の選択肢となるが、簡易キットの誤判定を避けるために、確実に判定できる確認試験等を用意することが必要である。そこで、マニュアルを参考に、簡易キットの適用範囲の拡大を図りながら、確実に確認できる機器分析を組み合わせ、体系的で汎用性の高いSOPにしていくことを今後の課題とした。

イ 簡易検査キットの食品への応用

生活衛生部門 折戸 太一

(ア) はじめに

食品への毒物混入が疑われる場合、最も簡便かつ迅速に検査する方法は、簡易検査キットを用いる方法である。今回、亜鉛イオン、鉛イオン、スズイオン、クロム酸イオン、ホルムアルデヒド、リン酸イオン及びアンモニウムイオンの7項目の簡易検査キットについて検討を行った。

(イ) 方法

野菜ジュース、牛乳及び栄養ドリンクの3種の液体試料に、7項目の標準物質をそれぞれ2濃度添加し、簡易検査キットで定性、半定量を行った。

(ウ) 結果

クロム酸イオンとリン酸イオンでは判定困難であったが、その他の項目では、どの試料でも適宜希釈することにより、判定することが可能であった。ただし、鉛イオン、スズイオン及びアンモニウムイオンの場合、キットのクラススケールの判定と実際の濃度がわずかに異なる場合があった。

(エ) まとめ

試料を希釈することで食品の色素の影響を軽減できるため、今回検討した項目のキットの多くは、食品の検査に

利用できると思われる。今後、その他の試料にも適用可能かどうか検討が必要である。

ウ 遺伝子解析法によるフグ種鑑別の検討

生活衛生部門 伴 創一郎

(ア) はじめに

フグは、強力な神経毒をふくむため、フグによる食中毒は、発生件数こそ少ないが、症状が重く、死亡率が高いことが特徴である。フグに起因する食中毒が起きた場合、原因となるフグ種の同定は、その後の再発防止策をとる上で非常に重要となる。しかし、加工、調理済みの状態でヒレ、皮等が除去されている場合、目視検査による形態学的鑑別は困難である場合が多い。そこで、今回、PCRを用いた外部形態によらないフグ種の鑑別法として、RAPD法、mtDNA（ミトコンドリア DNA）の 16S rRNA 遺伝子領域を対象とした PCR-シーケンス法及び PCR-RFLP 法を検討した。

(イ) 方法

フグ鑑別用の試料として、ゴマフグ、コモンフグ、シロサバフグ、ナシフグ、ショウサイフグ、トラフグ、身欠きフグ（シロサバフグ表示の干物）、カワハギを用いた。DNA の抽出は、DneasyBlood&TissueKit(QIAGEN)により行った。

a RAPD 法

PCR 反応試薬には、ReadyToGoRAPDAnalysis Kit (Amersham) を用い、95°C5 分→(95°C 1 分→36°C 1 分→72°C 2 分)×45cycle の条件で PCR 反応を行った。プライマーは、キット付属の 2 種類（RAPD 用プライマー-3, 4）を使用した。

b mtDNA（ミトコンドリア DNA）の 16S rRNA 遺伝子領域を対象とした PCR

(a) フグ種の検知を目的とした PCR 増幅（フグ特異的フォワードプライマーによる PCR 増幅）

フグ種検知用フォワードプライマー 2 種類（TF16S-L2, LC16S-L2）、リバープライマー（16SbrH）を用い、(98°C10 秒→57°C30 秒→72°C1 分)×35cycle の条件で PCR 反応を行った。

(b) フグ種の同定用 PCR 増幅（ユニバーサルプライマー 16SarL, 16SbrH によるシーケンス）

フォワードプライマー（16SarL）、リバープライマー（16SbrH）を用い、(98°C10 秒→53°C30 秒→72°C1 分)×30cycle の条件で PCR 反応を行った。PCR 産物を ExoSAP-IT で精製後、ラベリング反応を行い、塩基配列を決定した。また、決定した塩基配列より、RFLP に使用可能な制限酵素として、XspI を選択し適用を試みた。PCR 産物を XspI で 37°C で一晩反応を行った後、アガロースゲル電気泳動を行い、切断パターンを確認した。

(ウ) 結果及び考察

a RAPD のプライマー 3 の反応では、シロサバフグ、トラフグ、ナシフグと残りの 3 種類のフグ（ゴマフグ、コモンフグ、ショウサイフグ）の 4 群で異なるバンドパターンが得られた。また、プライマー 4 の反応では、シロサバフグ、ショウサイフグ、（ゴマフグ、コモンフグ）、（トラフグ、ナシフグ）の 4 群で異なるバンドパターンが得られた。また、RAPD ではシロサバフグの丸フグとシロサバフグ表示の身欠きフグでは異なるバンドパターンの結果となった。

b mtDNA の 16S rRNA 遺伝子領域を対象とした PCR 増幅では、フグ種検知用プライマーでは、シロサバフグ属では 242bp、トラフグ属では 318bp のバンドが得られ、フグ種特異的な増幅を確認できた。また、ユニバーサルプライマー 16SarL, 16SbrH による増幅バンド（615bp）のシーケンス結果では、GenBank/EMBL/DBJ データベースに登録されているそれぞれの魚種の mtDNA の 16S rRNA 遺伝子領域の配列と一致する結果が得られた。シロサバフグ表示の身欠きフグの配列も丸フグの配列と一致し、精度の高い鑑別が可能であると考えられた。制限酵素 XspI による RFLP では、シロサバフグ、トラフグと残り 4 種類（ナシフグ、ゴマフグ、ショウサイフグ、コモンフグ）の 3 群で異なるパターンが得られた。今回の結果より、種類不明フグによる食中毒の際にも検体が数 10mg 残存していれば、DNA を抽出しフグ種を同定できる可能性があることが考えられた。

エ 先天性代謝異常等検査 ～検査実績及び方法の変更と今後の課題～

臨床部門 木戸 毅

(ア) はじめに

本事業は、昭和52年10月の開始以来、本市市内の産科医療機関にて出生した500,163人の検査を行い、多くの患児を発見し治療につなげてきた。この間、より効果の高い事業とするため様々な検査法が開発されてきた。当部門でも全国的な動向に合わせて、より効果的な検査法へと変更を行ってきたが、近年の急激な検査技術の進歩によって、より迅速で柔軟な対応が求められている。

今回の目的は、現在に至るまでの検査実績を振り返り、本事業の効果を検証する事である。また、上記のような状況を踏まえ、より円滑に検査法の変更が可能となるよう、当部門にて行われた検査法変更の過程及びその効果、問題点を明らかにし、その改善策を検討する。その上で、近年新しい検査法として注目されているタンデムマスを使用した検査について解説し、その導入による効果についても検討する。

(イ) 過去10年間のスクリーニング検査結果及び検査方法の変更

クレチン症は過去10年間、検査方法の変更がなく、疑陽性数、陽性数ともに大きな変化は見られなかった。先天性副腎過形成は平成14年度に疑陽性数、陽性数ともに急激に増加している。これは全国的に検査方法の見直しが行われたためである。以降は、未熟児において偽陽性が生じやすい検査であるため、未熟児の増加に伴い疑陽性数、陽性数ともに増加傾向にある。

アミノ酸代謝異常及びガラクトース血症では二次検査として酵素法を順次導入してきた。導入以前は半定量法であるBIA法で実施しており、カットオフ値近辺の判定困難な検体を疑陽性としていた。導入以降は結果が数値として表れるため、カットオフ値近辺の検体も判定可能になり、疑陽性数が格段に低下した。

(ウ) タンデムマススクリーニング

本方法ではスクリーニング対象疾患であるアミノ酸代謝異常3疾患に加えて、22疾患が検査可能である。昨年度に日本で出生した約110万人のうち、約22万人が本方法によって検査を受けており、今年度はさらに増加する見通しである。受診の可否によって自治体間で医療格差が生じており問題視されている。

当部門では、タンデムマス検査を対象3疾患のみの検査法として導入した場合でも、検査精度及び検査にかかるコスト、人員、時間は従来法と同等以上であり、検査法の変更としてすぐにでも導入が可能な状態である。また、精密検査体制を確立すれば、残りの22疾患についても対象疾患に加えていくことが出来る。

(エ) 今後の課題

測定値には検査法ごとに多少の差異が生じるため、検査法変更の際はカットオフ値を適正な値に再設定する必要がある。このためには、真の患者数を把握するために後追い調査を行い、偽陽性率、偽陰性率を算出し、これらが最小となる値を設定しなければならない。しかし、残念な事に本市では後追い調査の体制が十分に機能しておらず、他都市の状況を頼りにカットオフ値を設定している状況である。また、タンデムマス検査のような新しい検査法の情報迅速に入手し、対応していく体制も今後さらに重要となる。これらを改善するためには行政と採血医療機関が密に連携し、各々の役割を確実に実行していく体制を構築することが必要である。

オ 平成20年度 京都市が実施するHIV抗体検査に係るアンケートの集計結果

疫学情報部門 中司 眞二

(ア) はじめに

京都市では、昭和61年6月からAIDS相談を開始し、昭和62年1月からは、HIV抗体検査を開始した。以降、平成17年6月には夜間検査、平成19年6月には休日検査の体制を整え、市内11保健所で実施する平日昼間検査においては、希望により、STD検査を同時に受検できることとなった。

平成18年5月からは、検査に伴うカウンセリング事業の質的向上及び今後のHIV感染予防の取り組みに活かす目的で、検査前及び検査後の相談事業に、統一形式の質問票が導入され、これらの集計解析を、疫学情報部門が担当することとなった。

今回は、この質問票の集計結果を、平成18年度、19年度、20年度の3箇年度で比較し、得られた受検者（質

問票回答者)の傾向について、報告する。

(イ) 結果

- a 平成18年度の受検者の男女比は、ほぼ6対4であったが、次第に女性の占める比率が上がってきている。
- b 受検者の年代は3箇年度を通じて、20歳代がほぼ半数を占め、次いで30歳代、40歳代が多い。
- c 受検者の国籍は、3箇年度を通じて、約98%が日本であるが、「その他」もわずかながら上がってきている。
- d 受検者の居住地は、3箇年度を通じて、約8割が京都市内である。
- e 3箇年度を通じて、約75%が「はじめて」の受検者である。
- f 3箇年度を通じて、9割前後の受検者が受検理由を「性的関係による感染が心配」とし、それらの9割強が異性間交渉である。
- g 感染の可能性がある本人が考える時期から検査で感染が分かるようになるまでの期間(ウインドウ・ピリオド)をおかずに受検する者の比率は、3箇年度の間に、わずかながら上がってきている。
- h HIVやSTDに関する基礎知識は、「はじめて」の受検者より、「2回目以上」の受検者のほうが正解率が高いが、全般的にはまだまだ不十分である。

(ウ) 結語

近年、HIV抗体検査は、郵送によるものなども普及しつつあるが、今回の集計を通じ、受検者の約75%が「はじめて」の受検者であり、また、HIVやSTDの基礎知識の普及がまだまだ不十分な現状のなか、「2回目」以降の受検者では、その正解率が上がるなどから、現在のカウンセリングを含めた対人的な検査体制は、意義あるものといえる。

HIV陽性者の発見にとどまらず、こうした事業を、HIVを含めたSTDに対する啓蒙の機会と捉え、積極的にこのカウンセリング事業を活用し、一層の充実をはかることが望まれる。

カ 腸管出血性大腸菌のパルスネットについて

微生物部門 渡辺 正義

同一の食品の流通により、広域に感染症が集団発生した事件が起こっている。そのため、散発にみえる感染症が全国的な集団発生(diffuse outbreak)かどうかを探知するために、原因菌の同一性を判断する手法が検討されてきた。

腸管出血性大腸菌(O157など)の場合はPFGEパターンが使われている。制限酵素を使って、切断されたDNA断片の電気泳動像を比較する。異なる集団発生間では電気泳動像が異なることが経験的に知られている。

1996年から、医療機関や地方衛生研究所(地研)で分離された腸管出血性大腸菌が、保健所・地研を經由して国立感染症研究所(感染研)に集約され、PFGEパターンの収集と分析が行われてきた。しかしdiffuse outbreakの迅速な探知のためには、地研と感染研及び地研間相互でPFGE情報が共有化できるシステム(パルスネット)が必要であり、そのための研究班を設置して検査法の標準化と精度管理を行っている。

特例ではあるが、飲食チェーン店を介したdiffuse outbreakでは感染研への菌株送付から検査結果が迅速に報告され、感染源が疑われた菌株のPFGEパターン画像も地研研究班を通じて全国に配布された。今後は、パルスネットを有効活用し、自治体を越えたdiffuse outbreakに対応するためのシステム作りが必要と考えられる。

キ BSEの現状について

食肉検査部門 栗田 知明

(ア) 牛海綿状脳症とは

1986年に英国にて報告された比較的新しい疾病で、日本では2001年9月に初の感染例が発見された。原因は、プリオンと呼ばれる蛋白質の構造変化による異常化とその異常プリオンの蓄積による脳・神経細胞の破壊とされている。潜伏期間は平均で5から6年と発症までの期間が長く、また罹患部位が脳及び神経細胞であるため生体時の診断が難しい。主な症状は神経症状で、最もよく認められるのが不安動作、後肢の運動失調、知覚過敏である。

(イ) BSEの蔓延

BSEの起こりは英国での動物の肉骨粉を製造する際の処理方法が1979年頃から変化したことが関係していると考

えられている。英国では1988年に反芻獣由来の蛋白飼料の反芻獣への使用を規制したが、欧州各国では1994年にEUが規制するまで英国から流出した肉骨粉が流通していた。同様に欧州で売れなくなった肉骨粉がアジアにも流通し、BSEが世界各国に蔓延したと考えられている。

(ウ) 牛肉の安全性

BSE発生後、消費者の牛肉離れが起こった。これは、BSEと人のプリオン病である変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(v-CJD)との関連性が示唆されたことによる。当時、BSEは新疾病であったため、科学的に解明されていない部分が多く、消費者に対する説明が十分になされないままであった。しかし、その後の研究により、感染性を持つ部分等が明らかとなり、適切に処理された物であれば安全であることがわかっている。現在、日本においても牛由来の蛋白飼料の使用禁止、特定危険部位(SRM)の除去、BSEスクリーニング検査の実施(21ヶ月齢以上)が義務付けられ、BSEの根絶及び人へのリスク除去に向けた活動が行われている。

(エ) 今後

国際獣疫事務局(OIE)のBSEリスクステータスで、日本は『管理されたリスク国』に分類されている。しかし、この状態を維持出来れば、数年後には『無視できるリスク国』となる予定である。それに向けて、国だけでなく、自治体においても課題に向けた調整が必要であると考ええる。

ク 京都府下で初めて確認されたアルゼンチンアリについて

衛生動物部門 大西 修

アルゼンチンアリ(学名 *Linepithema humile*)は、名前のおりブラジル南部、ウルグアイ、パラグアイ、アルゼンチン北部地域を原産地とするアリである。日本では、1993年に広島県廿日市市で生息が確認された。その後、山口県、兵庫県、愛知県、岐阜県、神奈川県で生息が確認され、全国的な問題となりつつある。そのアルゼンチンアリが平成20年12月15日に京都府下で初めて確認されたので報告した。

発見された場所は、京都市伏見区の京阪電鉄中書島駅を中心とした半径約100メートル内に存在する5箇所である。いずれも、冬季に係わらず多くの働きアリが列を作って活動していた。

ケ 鉱物油による水質汚染時のGC/MSを用いた定性分析事例について

環境部門 勝見 潤子

河川における油膜・鉱物油臭の苦情及び地下水の鉱物油臭の苦情に対し、当部門では、水質検査において、GC/MSを用いて鉱物油(ガソリン、灯油、軽油、重油)との成分比較をすることにより、鉱物油の定性分析を行った。

河川水の水質汚染の場合には、油膜が含まれているため、ヘキサン抽出して鉱物油全成分と比較した。

地下水の水質汚染の場合には、油膜がなく、水に長時間接しているため、灯油、軽油、重油では主成分(脂肪族直鎖炭化水素類)よりも水に溶けやすい芳香族成分(揮発性成分等)の割合が高くなる。このため、ガソリン、灯油、軽油、A重油をそれぞれ容量比1/25で蒸留水に加え、ゆるやかに6時間攪拌した後の水層部分の成分(鉱物油の水溶性成分)とヘッドスペース法で比較した。

結果は、河川水の水質汚染(全成分比較)、地下水の水質汚染(水溶性成分比較)とも、それぞれ鉱物油と同一の成分が検出され、鉱物油の定性分析を行うことができた。