

# 茨城県衛生研究所年報

第 48 号

Annual report of Ibaraki Prefectural  
Institute of Public Health

2010

茨城県衛生研究所

## はじめに

近年、「感染症の世界的な流行」が大きな問題となっております。インフルエンザ (H1N1) 2009 が瞬く間に世界中を席卷したことは記憶に新しいところであります。また、一部の国では鳥インフルエンザウイルス H5N1 が鳥から人へ感染し、感染者が高い割合で死亡していることが報告されております。このウイルスが、今後人から人へ感染する能力を獲得し、いつ「新型インフルエンザ」のパンデミックを引き起こすか、予断を許さない状況であります。

さらに、本年は「食肉の安全・安心」が大きな問題となっており、焼き肉店えびすの事件を発端として生食への警鐘が鳴らされ、国をあげて安全基準の策定と指導が行われております。

このような情勢にも対応すべく衛生研究所も 10 年ぶりの組織改正を行い、平成 22 年度からは微生物門（旧微生物部と旧遺伝子科学部）を細菌部とウイルス部に再編を行い、実戦的な対応を図ることといたしました。微生物部門の今後の機能強化につながるものと期待しております。

さて、本年 3 月 11 日の東日本大震災では、茨城県も東北地方とともに被害を受け鋭意復旧の努力をしております。衛生研究所も機器の落下、破損等の被害が著しく、検査機能がほぼ復旧するまでには 10 月までを要しました。とりあえずできることからを合い言葉に、簡易検査等や福島原発事故による放射能測定のための夜間検査に職員を派遣するなど、技術職員の活用を図り茨城県の復旧に尽力いたしております。

また、地球温暖化によるマラリアの感染拡大に代表されるように、本来はその地域にはあるべきはずのない感染症や寄生虫等の発生を引き起こしております。このように、世界は日々刻々とつながりを強化して、地球の地域間の縮小化・ボーダーレス化によって、危機の日常化をもたらしているとも考えられます。国及び県においても、危機管理の観点から各種の対策や計画を立て、地域においては保健所等を中心として県民の日常生活の維持向上と健康危機管理を目指した、着実な取り組みがなされております。このため、一面では新型インフルエンザや食の安全問題等の事例についても、いつでもこのような状況が起こりうるという危機管理意識と、住民の方々に対しては過度の不安を与えることのないような情報の提供が、重要かと考えられます。

当衛生研究所でも、普段から検査、調査、研究はもとより、情報の収集、解析を通じて「健康危機管理の技術的中核」としての役割を念頭におき、職員一丸となって、不断の努力を重ねております。

関係者の皆様におかれましては、今後とも尚一層のご指導、ご助言、ご鞭撻をいただきますようお願い申し上げます。

平成 23 年 11 月

茨城県衛生研究所長 杉山 昌秀

## 目 次

### 第1章 総説

- 1 沿革・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
- 2 組織と業務概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
- 3 職員の配置・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

### 第2章 業務の概要

- 1 企画情報部・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
- 2 微生物部・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
- 3 理化学部・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18
- 4 遺伝子科学部・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22

※内容は平成21年度のものであるため、第1章の組織と業務内容とは異なっている。

### 第3章 調査及び研究報告

- 1 鶏卵、豚肉中テトラサイクリン系抗生物質分析の検討・・・・・・・・・・ 25

### 第4章 学会発表要旨・抄録

- 1 茨城県の若年女性におけるヒトパピローマウイルス（HPV）の感染状況（第二報）・・・・ 30
- 2 HPLC-MS/MSを用いた先天性ステロイド代謝異常症一斉診断システムの確立・・・・ 31
- 3 2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向・・・・ 32

### 第5章 他誌掲載論文要旨

- 1 血中マロン酸の高感度定量法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34
- 2 生体サンプル中のオキシステロイド高感度定量法の開発・・・・・・・・・・・・ 35
- 3 ヒト血清中ステロイドの高感度定量法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36
- 4 Q-Invader法による高発癌性ヒトパピローマウイルス14遺伝子型の相対定量法の開発・・・・ 37

# 第 1 章 総 説

## 1. 沿革

昭和30年12月	厚生省通達に基づき、それまで衛生部に設置されていた細菌検査所及び衛生試験所(昭和6年警察部衛生課所属設置)の2機関が統合されて、茨城県衛生研究所として、設置された。 (所在地:水戸市三の丸県庁構内, 建物構造:鉄筋コンクリート2階建)
昭和34年 4月	庶務部, 細菌部, 化学部, 食品衛生部, の4部制が敷かれた。
昭和38年 4月	庶務部, 微生物部, 化学部, 食品衛生部, 放射能部, の5部制となる。
昭和40年10月	水戸市愛宕町4番1号に庁舎竣工, 県庁構内から移転した。
昭和47年 6月	放射能部が環境局公害技術センターへ移管され, 4部制となる。
昭和53年 6月	組織改正により, 庶務部, 微生物部, 環境保健部, 食品薬品部, 生活環境部, の5部制となる。
平成 3年 5月	水戸市笠原町993番2に新庁舎竣工, 旧庁舎から移転した。
平成13年 4月	組織改正により, 庶務部, 企画情報部, 微生物部, 理化学部, 遺伝子科学部, へ改編される。
平成22年 4月	組織改正により, 庶務部, 企画情報部, 細菌部, ウイルス部, 理化学部, へ改編される。

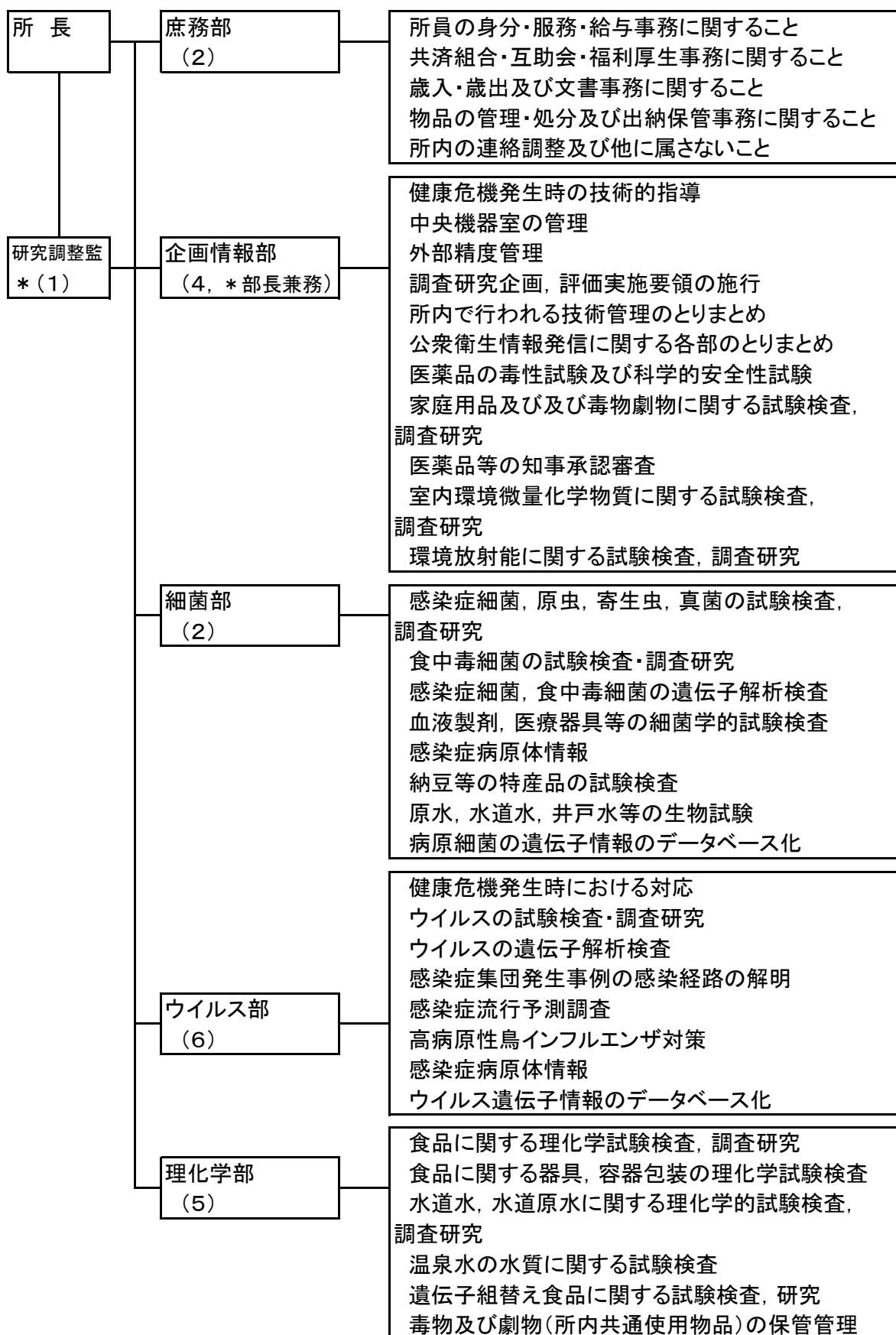
### 【施設の概要】

所在地	水戸市笠原町993番2
敷地	いばらき予防医学プラザ敷地(22, 418㎡)内
建設	平成 1年10月26日 着工 ~ 平成 3年 3月31日 竣工
建物	いばらき予防医学プラザ内庁舎(鉄筋コンクリート3階建・2, 916. 73㎡)

### 【歴代所長】

根津 尚光	(昭30. 11 ~ 昭37. 6)	
斎藤 功	(昭37. 7 ~ 昭47. 5)	
野田 正男	(昭47. 6 ~ 昭52. 5)	
藤崎 米蔵	(昭52. 6 ~ 昭56. 9)	
野田 正男	(昭56. 10 ~ 昭60. 8)	
美譽志 康	(昭60. 9 ~ 平10. 3)	
村田 明	(平10. 4 ~ 平11. 3)	水戸保健所長が衛生研究所長兼務
土井 幹雄	(平11. 4 ~ 平19. 3)	* 平17. 4 ~ ひたちなか保健所長を兼務
藤枝 隆	(平19. 4 ~ 平20. 3)	水戸保健所長が衛生研究所長兼務
真家 則夫	(平20. 4 ~ 平21. 3)	
大和 慎一	(平21. 4 ~ 平22. 3)	水戸保健所長が衛生研究所長兼務
杉山 昌秀	(平22. 4 ~ )	

## 2. 組織と業務内容(平成22年4月1日現在)



\* 配置定数20人(事務2, 技術18)に対し, 現員は19人(事務2, 技術17)である。  
欠員1人(ウイルス部配置)について, 5月1日から臨時職員(獣医師)を雇用している。

3. 職員の配置

(1) 部別職員数(平成22年4月1日現在:技術職欠員1人)

所属	内訳 事務	技 術 職					任期付 研究員	技能 労務	計	嘱託及 び臨時 職員	合計
		医師	獣医師	薬剤師	臨床検 査技師	化学農 芸化学					
所長				1				1		1	
庶務部	2							2	1	3	
企画情報部				3		1		4		4	
細菌部			1		1			2		2	
ウイルス部			1		4			5	1	6	
理化学部				2		3		5		5	
計	2	0	2	6	5	4	0	0	19	2	21

## 第 2 章 業 務 の 概 要



## 1. 企画情報部

### 1 試験検査の概況

平成 21 年度試験検査実施状況は次表のとおりである。

項 目	品目数	行政検査（件）	合計(件)
県内流通医薬品試験検査	60	注射剤の不溶性異物試験 20 注射剤の採取容量試験 20 点眼剤の不溶性微粒子試験 20 製油定量法 5 重量偏差試験 15	80
医薬品及び医療機器一斉監視指導に係る試験検査	33	溶出試験 31 外観及び無菌試験 2	33
家庭用品試買試験検査 家庭用品（家庭用エアゾル製品、繊維製品等）	158	メタノール 12 テトラクロロエチレン 12 トリクロロエチレン 12 トリフェニル錫化合物 27 トリブチル錫化合物 27 有機水銀化合物 27 ホルムアルデヒド 119	236
無承認無許可医薬品試験検査 ダイエット食品 強壮食品	51 (21) (30)	甲状腺ホルモン等 168 シルデナフィル等 150	318
外部精度管理	2	含量均一性試験 1 質量偏差試験 1	2
計	304		669

上記表の行政検査は、薬務課及び保健所から送付されたものについて実施した。内容は下記のとおりである。

(1) 県内流通医薬品試験検査 (60 品目)

県内流通医薬品の有効性及び安全性を確保することを目的として、注射剤については不溶性異物試験及び採取容量試験、点眼剤の不溶性微粒子試験、精油を含有する生薬の精油定量法試験、薬局製剤の重量偏差試験を実施した。

重量偏差試験を行った 2 品目については基準を満たさなかった。

(2) 医薬品及び医療機器一斉監視指導に係る試験検査 (33 品目)

国及び県の年度計画に基づき試験検査を実施した。

全ての品目について、基準を満たしていた。

(3) 家庭用品試買試験検査 (158 品目)

県内における家庭用品の試買試験検査を実施することにより、人の健康に被害を及ぼすおそれのある物質を含有する家庭用品を発見、排除し、県民の健康に係る被害の発生又は拡大防止を図ることを目的として実施した。

メタノール、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、トリフェニル錫化合物、トリブチル錫化合物、有機水銀化合物、ホルムアルデヒドについて検査を行ったが、いずれも、有害物質は検出されなかった。

(4) 無承認無許可医薬品検査 (51 品目)

県内における健康食品の試買試験検査を実施することにより、無承認無許可の医薬品の流通防止とそれらが原因となる健康被害を未然に防止することを目的として実施した。

県内で販売されているダイエット目的と推察される製品 21 品目について、8 項目(甲状腺ホルモン、フェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、センノシド、エフェドリン、ノルエフェドリン、シブトラミン、脱 N-ジメチルシブトラミン)の検査を行ったが、全て不検出であった。

また、強壮目的と推察される製品 30 品目については 5 項目(シルデナフィル、バルデynaフィル、タダラフィル、ホンデナフィル、ヒドロキシホモシルデナフィル)の検査を行ったが、全て不検出であった。

2 県内試験検査機関外部精度管理 (水質検査外部精度管理事業)

水道水測定分析に従事する諸機関が、均一に調整された試料を分析することによって得られる結果と前処理条件、測定機器の使用条件等の関係その他分析実施上の具体的な問題点の調査を行うことにより、分析の精度及び正確さの向上を図り、データの信頼性の確保に資することを目的として実施した。

10 検査機関を対象に水道法の水質基準項目の硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、フッ素及びその化合物、塩化物イオンについて外部精度管理調査を実施した。

各機関の変動係数は、すべての機関で 10%以下と小さい値を示し、測定精度は良好と判断された。回収率については、すべての物質について 10 機関すべての測定値が 0.8~1.2 の範囲内にあり、良好と判断された。

### 3 調査研究企画・評価委員会実施

当所が行う調査研究事業について、公正かつ適切な企画・評価を行うことにより、効率的・効果的な調査研究を実施し、もって本県における健康危機管理能力の向上と保健衛生の推進に資することを目的として8月20日(木)に実施した。

完了課題3題，継続課題3題，新規計画課題2題の計7課題について評価委員の審査を受けた。いずれも，研究課題として妥当なものとして評価された。

#### <完了課題>

- 1 健康食品中に含まれる重金属に関する調査
- 2 有機ヒ素化合物の酸化ストレスが脂質過酸化に及ぼす影響
- 3 腸管ウイルス感染症の免疫応答に関する研究および免疫変容に関する研究～ノロウイルス細胞培養系の確立

#### <継続課題>

- 1 セレウス菌嘔吐毒セレウリド HPLC 検出法による簡便化の検討
- 2 食品中残留動物医薬品の簡易前処理法および分析法の検討
- 3 薬剤耐性 HIV の発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究—首都圏近県地域における薬剤耐性変異株の発生動向—

#### <新規計画課題>

- 1 インフルエンザウイルスの受容体とその分布に関する試験研究
- 2 食品中の汚染物質・添加物と夾雑物の分離に関する研究

#### <評価委員>

委員長	日本薬科大学教授	下條 信弘
委員	筑波大学教授	大久保 一郎
	(財)食品薬品安全センター秦野研究所研究顧問	小野 宏
	植草学園大学保健医療学部長	小池 和子
	横浜薬科大学教授	石崎 睦雄
	保健福祉部医監兼次長	染谷 意
	保健所長会代表	湊 孝治

#### 4 学会・研修会等

学会等の名称	開催地	年月日	人員
茨城県試験研究機関研究活動発表会	つくば市	21.7.8	1
第46回全国衛生化学技術協議会年会	岩手県	21.11.12～13	1
平成21年度指定薬物分析研修会議	東京都	22.1.22	1
平成21年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部理化学研究部会	千葉県	22.2.19	2
平成21年度茨城県医薬関連研究機関協議会研修会	つくば市	22.3.19	1
日本薬学会第130回年会	岡山県	22.3.27～28	1

## 2. 微生物部

### 1 試験検査の概況

平成21年度試験検査実施状況を別表に示した。その内容は次のとおりである。

#### (1) 行政検査

##### ア 細菌の分離同定検査

感染症法により三類感染症として届出のあった患者から分離され、保健所等から送付された菌株について同定試験、毒素産生性試験等を実施した。分離菌株は、32株で、その内訳は腸管出血性大腸菌（EHEC）26株、赤痢菌4株、チフス菌2株であった。

また、結核菌の同定を1検体について行った。

##### イ 細菌の分子疫学検査

結核の感染源特定に資するために結核菌9株についてRFLP分析を実施した。

##### ウ ウイルス、リケッチア及びクラミジア等の検出検査

検査依頼があった1903検体について病原体の検出を目的とした検査を実施した。

インフルエンザ（様疾患）は発生動向調査病原体定点医療機関を含め県内の医療機関から提出された咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液またはうがい液1401検体について検査を実施した。その結果、新型インフルエンザ（AH1pdm）1011件、AH1亜型インフルエンザ3件、AH3亜型インフルエンザ59件、B型インフルエンザ4件が検出された。検出された新型インフルエンザ（AH1pdm）のうち50件について薬剤耐性変異解析を行った結果、すべて陰性であった。

その他、横断性脊髄炎疑いの患者の検体（便2検体、髄液1検体）についてエンテロウイルス、アデノウイルス等の分離培養を行った。その結果、便1検体よりエンテロウイルスが分離された。分離ウイルスについて遺伝子解析を行った結果、ポリオウイルス2型（ワクチン株）と判定された。また、無菌性髄膜炎患者から提出された検体4検体についてエンテロウイルス、アデノウイルス等の分離培養を行ったが、ウイルスは分離されなかった。

また、デング熱疑い例2検体（ペア血清）について遺伝子検査を実施した結果、急性期血清よりデングウイルス1型遺伝子が検出された。レプトスピラ症疑い1検体について遺伝子検査を実施したが検出されなかった。

ノロウイルス（NV）は、66事例の312検体について、RT-PCR法により検査を行った。その結果、227検体からNVが検出された。ロタウイルスは84検体中25検体から検出された。

サポウイルスは53検体中1検体から検出された。

#### エ ウイルス、リケッチア、クラミジアの血清反応

デング熱疑い患者の血清 2 検体（ペア血清）について、デング熱ウイルス IgM 抗体検査，デング熱ウイルス IgG 抗体検査を実施した。その結果、IgM、IgG 両方において有意な抗体上昇がみられた。

つつが虫病およびライム病疑い患者の血清 1 検体について、リケッチア IgM 抗体検査およびリケッチア IgG 抗体検査を実施したが、いずれも結果は陰性であった。また、ボレリア IgM 抗体検査およびボレリア IgG 抗体検査を実施した結果、いずれも陰性であった。

日本紅斑熱疑い患者の血清 2 検体について、リケッチア IgM 抗体検査およびリケッチア IgG 抗体検査を実施したがいずれも結果は陰性であった。

レプトスピラ症疑い患者の血清 4 検体について 15 血清型生菌を用いた血清抗体価測定を実施したがいずれも結果は陰性であった。

なお、これら抗体検査に関しては国立感染症研究所に依頼した。

また、「保健所及び衛生研究所に勤務する職員の B 型肝炎検査及びワクチン接種実施要領」に基づき、95 名について HBs 抗原及び HBs 抗体検査を実施した。

#### オ 食中毒

食中毒及びその疑いの症例で当所が受け付けたのは 52 検体であり、それら菌株の血清型別、毒素産生能等について検査を行った。

内訳は、カンピロバクター属菌 24 検体、セレウス菌 10 検体、ウェルシュ菌 15 検体及び腸炎ビブリオ 3 検体であった。

ノロウイルス（NV）による食中毒は 87 事例 810 検体について、RT-PCR 法により検査を行った。その結果、385 検体から NV が検出された。

#### カ 食鳥肉等の衛生状況調査

県内の認定小規模食鳥処理場 15 施設を対象として 7 月～9 月の夏期と、1 月及び 2 月の冬期に食鳥肉及び使用器具類等の拭き取り検査検体から分離されたサルモネラ属菌、カンピロバクター属菌の鑑別同定を実施した。分離された 35 株を鑑別同定した結果、サルモネラ属菌は夏期に 3 施設の拭き取り検査検体から 5 検体検出され、血清型はすべて *Salmonella Infantis* であった。

カンピロバクター属菌は、夏期に 6 施設から 16 検体、冬期に 4 施設から 14 検体が検出され、すべて *Campylobacter jejuni* と同定された。

### (2) 感染症流行予測調査

平成 21 年素感染症流行予測調査については、保健予防課長の依頼によって、日本脳炎感染源調査・インフルエンザ感受性調査・麻疹感受性調査を実施した。

#### ア 日本脳炎感染源調査

ブタが日本脳炎ウイルスの増幅動物となっていることを利用し、ブタ血清中の日本脳炎ウイルスに対する抗体価を測定することで、その浸淫度を追跡し、夏季での

流行を把握するために実施した。

平成 21 年 8 月から 10 月にかけて、(株)茨城県中央食肉公社に集荷された生後 6 ヶ月の県内産のブタについて毎回 10 頭、8 回採血した 80 頭について、血清中の日本脳炎ウイルスに対する赤血球凝集抑制抗体 (HI 抗体) 価を測定した。その結果、第 3 回採血 (8 月 25 日) に実施した調査で、1 検体で HI 抗体が陽性となった (1:20)。第 4 回採血 (9 月 8 日) では、10 検体中 10 検体で HI 抗体が陽性となったが (1:10 および 1:20 が 4 検体ずつ 1:40 が 2 検体)、2ME 感受性抗体陽性率は 0% であった。また、第 6 回採血 (9 月 29 日) では、2 検体で HI 抗体が陽性となり (1:80 が 1 検体、1:160 が 1 検体)、2ME 感受性抗体陽性率は 100% であった。

#### イ インフルエンザ感受性調査

インフルエンザウイルスに対する血清中の抗体を測定することでヒトの免疫状況を把握し、次シーズンの流行予測に役立てるために実施した。

平成 21 年 9 月～10 月に年齢群ごとに採血した 225 名の血清について 5 種の HA 抗原を用いてインフルエンザウイルスに対する赤血球凝集抑制抗体 (HI 抗体) 検査を実施した。

感染防御の指標となる 1:40 以上の抗体保有状況をみると、A/ブリスベン/59/2007 (H1N1) に対して平均抗体保有率は 43.1% であった。特に 15 歳～19 歳の年齢群で抗体保有率 71.4%、20～29 歳の年齢群で 69.2% と良好であった。

A/ウルグアイ/716/2007 (H3N2) に対する平均抗体保有率は 25.7% であった。抗体保有状況が一番良好だったのは、10～14 歳の年齢群であり抗体保有率は 60.7% であった。

B/ブリスベン/60/2008 (ビクトリア系統) に対する平均抗体保有率は 18.2% であった。30～39 歳の年齢群で抗体保有率 52.6% と一番良好であった。

B/フロリダ/4/2006 (山形系統) に対する平均抗体保有率は 36.4% であり、15～19 歳・20～29 歳の年齢群が比較的抗体保有状況が良好であった。

A/カリフォルニア/7/2009(H1N1)pdm に対する平均抗体保有率は 6.7% であり、5 種の抗原のなかでは一番低かった。各年齢群における抗体保有率は 0～4 歳で 0%、5～9 歳で 0%、10～14 歳で 7.1%、15～19 歳で 42.9%、20～29 歳で 5.1%、30～39 歳で 10.5%、40～49 歳で 20.0%、50～59 歳で 4.8%、60 歳以上で 0% であった。

なお、この調査は水戸市の 8 医療機関の協力を得て実施した。

#### ウ 麻疹感受性調査

麻疹ウイルスに対する血清中の抗体保有状況を調査し、麻疹ワクチン接種効果を調査するとともに今後の流行予測を行うことを目的として実施した。

平成 20 年 9 月～10 月に各年齢群別に採血した 225 名の血清について、富士レビオの「セロディア・麻疹」を用い麻疹 PA 抗体価を測定した。

抗体価が 16 未満の陰性者は 10 名(4.4%)であった。一方陽性者は 215 名であったが、そのうち発症予防レベルといわれる 128 倍に満たないものが 30 名(13.3%)を占めていた。

なお、この調査は水戸市の 8 医療機関の協力を得て実施した。

### (3) 有料依頼検査

#### ア 細菌の分離同定検査

総合健診協会等の民間検査センターから 10 件のサルモネラ属菌の同定検査依頼があった。

#### イ その他の感染症検査

総合健診協会等の民間検査センターから依頼のあった腸管病原性大腸菌の血清型別検査・腸管出血性大腸菌 O157 関連のベロ毒素等について 2 件の検査を行った。

#### ウ 納豆検査

昭和 46 年環第 973 号の部長通知により県内納豆製造業者(茨城県納豆商工業協同組合員)が年 3 回自主検査を行った(130 検体)。いずれも大腸菌群陰性であった。

#### エ 医薬品等細菌検査

血液製剤等の無菌検査を行った (10 検体)。

## 2 研修指導

### (1) 検査課検査業務に係る試験検査技術研修

ア 実施年月日：平成 22 年 1 月 28 日～29 日

イ 参加者：水戸・土浦保健所職員 5 名

ウ 研修内容：セレウス菌の検査法  
その他の食品微生物の検査法  
新型インフルエンザの検査法  
その他の感染症微生物の検査法



### 3 学会・研修会出席

学 会 の 名 称	開 催 地	年 月 日	人 員
地域ブロック広域連携検討会	東京都千代田区	21.9.2	1
衛生微生物技術協議会第30回研究会	大阪府堺市	21.9.10	1
第24回地研全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究部会総会・研修会	東京都江戸川区	21.10.5～6	2
平成21年度全国食品衛生監視員研修会	東京都中央区	21.11.12～13	1
普通第一種圧力容器取扱作業主任者技能講習	茨城県水戸市	21.11.17～18	1
第23回公衆衛生情報研究協議会総会	埼玉県和光市	22.1.21～22	2
第22回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研修会	群馬県前橋市	22.2.4～5	1
第25回日本環境感染症学会	東京都品川区	22.2.6	1
平成21年度希少感染症診断技術研修会	東京都新宿区	22.2.25～26	2

### 3. 理化学部

#### 1 食品試験検査の概況

(1) 平成21年度試験検査実施状況は次表のとおりである。

平成21年度試験検査実施状況

内 容	品 目 数	項 目 数	検 体 数
食中毒・苦情食品・違反食品等の行政検査	7	8 (各種総計)	29
輸入加工食品残留農薬検査	50	43	50
遺伝子組換え食品検査	1	1	10
輸入食品残留農薬検査(柑橘類)	3	12	25
輸入食品検査(食品添加物)	6	3	70
農産物漬物の食品添加物	25	1	25
県外産農産物残留農薬検査	6	125	20
輸入野菜残留農薬検査	12	125	50
アレルギー物質食品検査	50	3	50
外部精度管理	3	5	3
計	163	326	332

#### (2) 業務内容

##### ア 食中毒・苦情・違反食品等の検査

###### ・違反食品

しらす干し中の過酸化水素(検出されてはならない)の試験検査を実施した。

6検体すべてにおいて、0.261~0.0075g/kgの過酸化水素が検出された。

アイスクリーム中の乳固形分・乳脂肪分の試験検査を実施した。10検体中、乳固形分3検体、乳脂肪分4検体において成分規格違反値が確認された。

###### ・苦情食品

牛肉2検体、干物2検体、ボイルズワイガニ1検体について、ヒスタミンの試験検査を実施した。4検体について111.7mg~19.6mgのヒスタミンが検出され、1検体は不検出であった。

さんまの缶詰7検体について、金属(スズ、アンチモン、鉛)の試験検査を実施した。スズは、6検体から6.6~99ppm検出され、1検体は不検出であった。アンチモン及び鉛はすべて不検出であった。

###### ・食中毒疑い

フグ白子 1 検体について、フグ毒の試験検査を実施した。不検出であった。

#### イ 輸入加工食品残留農薬検査

中国産冷凍餃子にメタミドホス等の有機リン系農薬が混入して健康被害が生じた事件に関連して、県内に流通する輸入加工食品の安全性を確認するため有機リン系農薬の検査 43 項目について試験検査を実施した。輸入加工食品 50 検体について実施した結果、食品衛生法上問題のあるものはなかった。

#### ウ 残留農薬検査（県外産農産物）

平成 21 年度は県外で生産された 6 品目（ダイコン、キュウリ、キャベツ、レタス、トマト、ニンジン）の野菜 20 検体について農薬 125 項目の検査を行った。その結果、キュウリ 1 検体からクレソキシムメチル 0.03ppm、キャベツ 3 検体からプロシミドン 0.02、0.03 及び 0.04ppm、レタス 1 検体からクロチアニジン 0.04ppm 検出されたが、いずれも基準値以下で、食品衛生法上問題がなかった。

#### エ 残留農薬検査（輸入野菜）

輸入野菜 10 品目（ブロッコリー、ピーマン、アスパラガス、さといも、たけのこ、にんじん、カリフラワー、ハウレンソウ、未成熟インゲン、カボチャ）50 検体について農薬 125 項目の検査を行った。その結果、ピーマン 1 検体からイミダクロプロリド 0.10ppm、チアメトキサム 0.03ppm、クロチアニジン 0.04ppm、カボチャ 3 検体からイミダクロプロリド 0.01～0.02ppm、1 検体からミクロブタニル 0.02ppm、ハウレンソウ 1 検体からイミダクロプロリド 0.03ppm、メトキシフェノジド 0.15ppm が検出され、いずれも基準値を超えるものはなかった。

#### オ 輸入食品残留農薬検査（柑橘類）

柑橘類 25 検体（グレープフルーツ 10、オレンジ 8、レモン 7）について有機リン系農薬 12 項目の検査を行った。その結果、オレンジ 1 検体からクロルピリホス 0.17ppm 検出されたが、基準値以下であった。

#### カ 輸入食品検査（食品添加物）

輸入食品 70 検体（乾燥果実 5、乾燥かんぴょう 4、ワイン 22、菓子類 35、煮豆 4）について残存する二酸化硫黄（亜硫酸塩）、TBHQ、THBP の検査を行ったが、基準値を超えるものはなかった。

#### キ 農産物漬物の添加物検査

漬物 25 検体（塩漬、しょうゆ漬、みそ漬、かす漬、こうじ漬）について、保存料（ソルビン酸及びソルビン酸カリウム）の検査を行ったが、基準値を超えるものはなかった。

#### ク 遺伝子組換え食品検査

大豆 10 検体（ラウンドアップレディ大豆遺伝子）について検査を行ったが、食品衛生法上、問題のあるものはなかった。

#### ケ 食品中のアレルギー物質検査

加工食品50検体について、食品衛生法上表示義務のある特定原材料（小麦、そば、落花生）の検査を行った。そばで1件陽性があり、他は食品衛生法上、問題のあるものはなかった。

## 2 飲用水水質検査の概況

(1) 平成21年度試験検査実施状況は次表のとおりである。

平成21年度試験検査実施状況

内 容	採 水 地 点	項 目 数	検 体 数
苦情・事故等検査	高萩市秋山地区他10ヶ所	5	10
外部精度管理		3	1
計		8	11

(2) 業務内容

#### ア 苦情・事故等検査

トリクロロエチレン等揮発性有機化学物質（VOC）による地下水汚染調査について井戸水の分析依頼があり、計10検体を検査した。当所で実施した項目については問題はなかった。

#### イ 外部精度管理

平成21年度外部精度管理1検体5項目について実施した。結果については概ね良好であった。

## 3 学会発表・論文等

・嘔吐型セレウス菌による食中毒事例、清涼飲料水等中のミネラル濃度の分析について

茨城県食品衛生担当者研修会（2009.6.24）において発表

・鶏卵、豚肉中テトラサイクリン系抗生物質の簡易前処理法及び分析法の検討、清涼飲料水及びサプリメント中ミネラル濃度の分析

全国衛生化学技術協議会年会（2009.11.12～13）において発表

・ダイズ加工食品からの遺伝子組換え体検知法の検討

茨城県薬剤師会学術大会（2009.11.8）において発表

#### 4 学会・研修会出席

学会の名称	開催地	期日	参加人数
第57回質量分析総合討論会	大阪府	21.5.14・15	1
第97回日本食品衛生学会学術講演会	東京都	21.5.15	1
平成21年度食品安全行政講習会	東京都	21.6.4	1
平成21年度食品衛生検査施設 信頼性確保部門責任者等研修会	東京都	21.8.24	1
全国食品衛生監視員協議会第49回 関東ブロック研修大会	山梨県	21.8.28	1
日本食品衛生学会第98回学術講演会	函館市	21.10.7・8・9	2
日本分析化学会第57年会	函館市	21.10.7・8・9	1
第42回日本薬剤師会学術大会	滋賀県	21.10.10	1
日本食品微生物学会総会30周年記念 学術総会	東京都	21.10.19・20・21	1
第69回日本公衆衛生学会総会	奈良県	21.10.21・22・23	1
第32回情報化学討論会	山口県	21.10.28・29・30	1
日本食品衛生学会公開講演会	東京都	21.11.10	1
第46回全国衛生化学技術協議会年会	岩手県	21.11.12・13	2
地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部 理化学専門家会議	栃木県	22.1.15	1
第15回LCテクノプラザ	千葉県	22.1.28・29	1
日本食品衛生学会第12回特別シンポジウム	東京都	22.1.29	1
厚生労働科学研究シンポジウム 「安全な食品で健やかな暮らし」	東京都	22.2.12	1
地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部 理化学研究部会	千葉県	22.2.19	2
厚生労働科学研究シンポジウム 「化学物質と環境・健康」	東京都	22.3.2	1
日本薬学会第130年会	岡山県	22.3.27・28	1

#### 4. 遺伝子科学部

##### 1 試験検査の概況

(1) 平成21年度における試験検査の実施状況は下表のとおりである。

試験項目	件数		計
	水道原水	浄水	
pH	5	5	10
濁度	5	5	10
残留塩素濃度	-	5	5
大腸菌	5	-	5
嫌気性芽胞菌	5	-	5
クリプトスポリジウム	5	5	10
ジアルジア	5	5	10
合計	30	25	55

##### (2) 業務内容

###### ア 病原性微生物等実態調査

病原性微生物等実態調査実施要領に基づき、水道原及び浄水中のクリプトスポリジウム等の汚染状況の実態を把握し、水道施設の適正な水質管理対策に資した。

平成21年度は5つの水源(5施設)について上記項目についての調査を行った。

その結果、クリプトスポリジウム、ジアルジアは検出されなかった。残留塩素と浄水濁度は基準内(原水濁度は基準なし)、大腸菌および嫌気性芽胞菌は検出されなかった。

##### 2 学会・論文等発表

###### (1) 学会等発表

###### ア HPLC-MS/MS を用いた先天性ステロール代謝異常症一斉診断システムの確立

第51回日本先天代謝異常学会総会、第8回アジア先天代謝異常症シンポジウム  
2009. 東京都

###### イ 2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向

第23回日本エイズ学会学術集会  
2009. 名古屋市

###### ウ 茨城県の若年女性におけるヒトパピローマウイルス(HPV)の感染状況(第二報)

地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究部会第24回研究会

2009. 10, 東京都

(2) 論文発表

- ア Highly-sensitive quantification of serum malonate, a possible marker for *de novo* lipogenesis, by LC-ESI-MS/MS  
血中マロン酸の高感度定量法の開発  
J. Lipid Res. 50, 2124-2130 (2009)
- イ Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS  
ヒト血清中ステロールの高感度定量法の開発  
J. Lipid Res. 49, 2063-2073 (2008)
- ウ Highly sensitive quantification of key regulatory oxysterols in biological samples by LC-ESI-MS/MS  
生体サンプル中のオキシステロール高感度定量法の開発  
J. Lipid Res. 50, 350-357 (2009)
- エ Comparative quantitative analysis of 14 types of human papillomavirus by real-time polymerase chain reaction monitoring Invader reaction(Q-Invader assay)  
Q-Invader法による高発癌性ヒトパピローマウイルス14遺伝子型の相対定量法の開発  
Diagn Microbiol Infect Dis. 66,58-64(2010)

3 学会・研修会等出席状況

	(学 会 等 の 名 称)	(開催地)	(年月日)	(人員)
1	第50回日本臨床細胞学会総会(春期大会)	東京都	21.6.26~28	1
2	日本ヒトプロテオーム機構第7回大会	東京都	21.7.27~28	1
3	地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部 第24回ウイルス研究部会	東京都	21.10.5~6	1
4	第57回日本ウイルス学会学術集会	東京都	21.10.25~26	1

## 第 3 章 調査及び研究報告



## 鶏卵、豚肉中テトラサイクリン系抗生物質分析の検討

白田 忠雄, 萩原 彩子, 山本 浩嗣, 山本 和則, 岡崎 忠

### 要旨

鶏卵、豚肉などの複雑なマトリクス成分を持つ試料を分析したクロマトグラムでは、夾雑物と対象分析種とのピークの重なりやベースラインの上昇を経験することがしばしばある。本研究では、紫外可視部領域スペクトル(UV-Vis)の微分スペクトルクロマトグラムによって鶏卵、豚肉中に残留するテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) の定量法を調査した。その結果、鶏卵、豚肉では夾雑物由来ピークのため定量が不可能であったテトラサイクリン (TC) と、豚肉中ドキシサイクリン (DOXY) では、それぞれ 3 次微分の 401nm、399nm で解析して夾雑物由来のピークを軽減したクロマトグラムが得られた。定量下限は鶏卵、豚肉ともに全て 0.02 $\mu$ g/g であった。

キーワード： テトラサイクリン系抗生物質, 微分スペクトルクロマトグラム

### 序文

平成 18 年 5 月にポジティブリスト制度が施行され、約 250 種の動物用医薬品に暫定基準値が設定された。これにより、簡便で迅速な検査法の開発や工夫が数多く試みられている。一方、鶏卵、豚肉、はちみつなどの複雑なマトリクス成分を持つ試料のクロマトグラムでは、夾雑物の存在により対象分析種と類似の保持特性をもつ分析種とのピークの重なりやバックグラウンドの影響によりベースラインの上昇を経験することがしばしばある。このため、対象分析種の定量を困難にすることが少なくない。これらの影響を除去する方法として分析装置、分離条件の工夫や物理化学的な前処理の追加などを実施することが一般的である。他方、物理化学的前処理ではなく、いわば“データの前処理”として得られたデータに対して数学的な処理を施す方法もよく知られている。その一つがスペクトルに微分を用いる方法である。微分は分光学では一般的によく知られており、この方法をクロマトグラムに応用した方法が山

本らにより提案されている<sup>1)</sup>。微分の特徴的な利点はスペクトル次元において重なり合って観測されたピークの分解能を高めることと、Savitzky-Golay 法<sup>2)</sup>などの filtering algorithm を用いることでスペクトル中のノイズを軽減できることである。前回、我々は、はちみつ中のテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) について本法を適用して報告した<sup>3)</sup>。今回、豚肉、鶏卵について本解析方法を用いて検討したのでその結果を報告する。

### 実験方法

#### (1) 試料

市販の鶏卵、豚肉を用いた。

#### (2) 試薬

エチレンジアミン四酢酸ナトリウム(EDTA)含有クエン酸緩衝液、飽和 EDTA 溶液、イミダゾール緩衝液(pH7.2)、1.36%リン酸一カリウム溶液は個別通知法<sup>4)</sup>に準じて調製した。  
2%メタリン酸溶液：関東化学株式会社製鹿特級を 20g 採り、超純水で 1 L に用事調製した。  
メタノール：関東化学株式会社製 HPLC 用

標準品 塩酸オキシテトラサイクリン(OTC)、塩酸テトラサイクリン (TC)、塩酸クロルテトラサイクリン(CTC)：和光純薬工業株式会社製；塩酸ドキシサイクリン(DOXY)：MP Biomedicals 株式会社製

標準原液：メタノールにより 1000  $\mu$ g/ml に調製した。

混合希釈標準溶液：標準原液を 1.36%リン酸一カリウム溶液で希釈して調製した。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム：GL-Science 社製 InertSep PLS-2 (以下:PLS-2)

### (3) 装置及び測定条件

装置：島津 LC-10A-VP

カラム：Tsk-gel ODS-100V 4.6 $\times$ 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：イミダゾール緩衝液(pH7.2)：  
メタノール(3:1)

流速：1.1ml/min

注入量：100  $\mu$ l

検出器 1：フォトダイオードアレイ

時間範囲 0~10分(ステップ 0.64sec)

波長範囲 290~475nm(ステップ 1nm)

データ数 938 行 $\times$ 186 列

検出器 2：蛍光検出器

測定波長：励起波長 380nm

蛍光波長 520nm

### (4) 試験溶液の調製

試料 5g に 2%メタリン酸を 25ml 入れた後 1 分間ホモジナイズする。3000rpm、10 分遠心後、上清を分取し、残さを同様に処理して分取した上清を合わせる。メタノール、超純水各 10ml と飽和 EDTA 水 5ml であらかじめコンディショニングした PLS-2 へ上清を全量負荷し、超純水 30ml で洗浄、乾燥後、メタノール 10ml で溶出する。この溶出液を減圧濃縮し、窒素ガスで乾固後 1.36%リン酸一カリウム溶

液 1ml で溶解して試験溶液とした。

### (5) 微分処理

フォトダイオードアレイからアスキー変換により得られたデータをエクセル上に展開し、Savitzky-Golay 法<sup>2)</sup>により微分処理をした。

## 実験結果及び考察

### (1) 抽出法の検討

テトラサイクリン系抗生物質のメタリン酸を用いた抽出法は、メタノールとの混液を用いた方法が石井らにより報告されている<sup>5)</sup>。この方法により標準品を PLS-2 に負荷したところ、回収率が 15%未満であったため、メタリン酸のみで抽出法を検討した。その結果、1%、2%で除蛋白、回収率(概ね 70%以上)ともに良好な結果が得られた。したがって、メタリン酸の劣化も考慮して 2%の濃度を採用した結果、62~84%の回収率が得られた(表 1)。

表1 回収率

	卵(n=3)		豚(n=3)	
	recovery	RSD	recovery	RSD
	%	%	%	%
OTC	84	3.7	81	4.1
TC	83	1.1	76	3.8
CTC	66	4.3	70	4.3
DOXY	-	-	62	9.3

\* OTC、CTCは蛍光の強度、TC、DOXYは吸光度の微分強度

\* 負荷量 卵:0.2  $\mu$ g/g, 豚:0.1  $\mu$ g/g

\* DOXYのみ面積,他は高さから計算

### (2) 微分の効果

卵, 豚について得られた結果を図 1, 図 2 に示した。OTC, CTC は, 卵, 豚ともに溶出位置に妨害ピークがないため個別通知法の蛍光クロマトグラムを採用した。TC 及び DOXY(豚のみ)については, 卵, 豚ともに蛍光クロマトグラム, 紫外可視検出クロマトグラムの溶出位置に妨害ピークが確認された。そのため, スペ

クトルを3次微分処理しTC, DOXYの感度が得られかつ妨害ピークの強度がゼロに近い波長を用いた(TCは3次微分401nm, DOXY(豚のみ)は,3次微分399nm)。その結果,妨害ピークの影響を軽減したクロマトグラムを描くことができた。また,定量下限は鶏卵,豚ともに全て0.02 $\mu$ g/gであった。

**結論**

本研究では,鶏卵,豚肉中のTCsについて,夾雑物の影響を除去するために,紫外可視部領域スペクトルの微分スペクトルクロマトグラムの定量法について調査した。その結果,鶏卵ではTCが,豚肉ではTC, DOXYが夾雑物由来ピークのため定量が不可能であったが,TC, DOXYそれぞれ3次微分の401nm,399nmで解析することにより夾雑物由来のピークを軽減したクロマトグラムが得られ,定量できることが分かった。

**文献**

- 1) A. Yamamoto, A. Matsunaga, M. Ohto, E. Mizukami, K. Hayakawa, and M. Miyazaki: *Analyst*, 120, 377-380(1995)
- 2) A.Savitzky and M.J.E.Golay : *Anal.Chem.* 36,1627-1639(1964)
- 3)白田忠雄、山本浩嗣、柳岡知子、山本和則、村上りつ子：第44回全国化学技術協議会年会講演集 121-122(2007)
- 4)平成17年1月24日食安発第0124001号「食品に残留する農薬、飼料添加物、又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」
- 5)石井里枝、堀江正一、村山三徳、米谷民雄：食衛誌 47 277-283(2006)

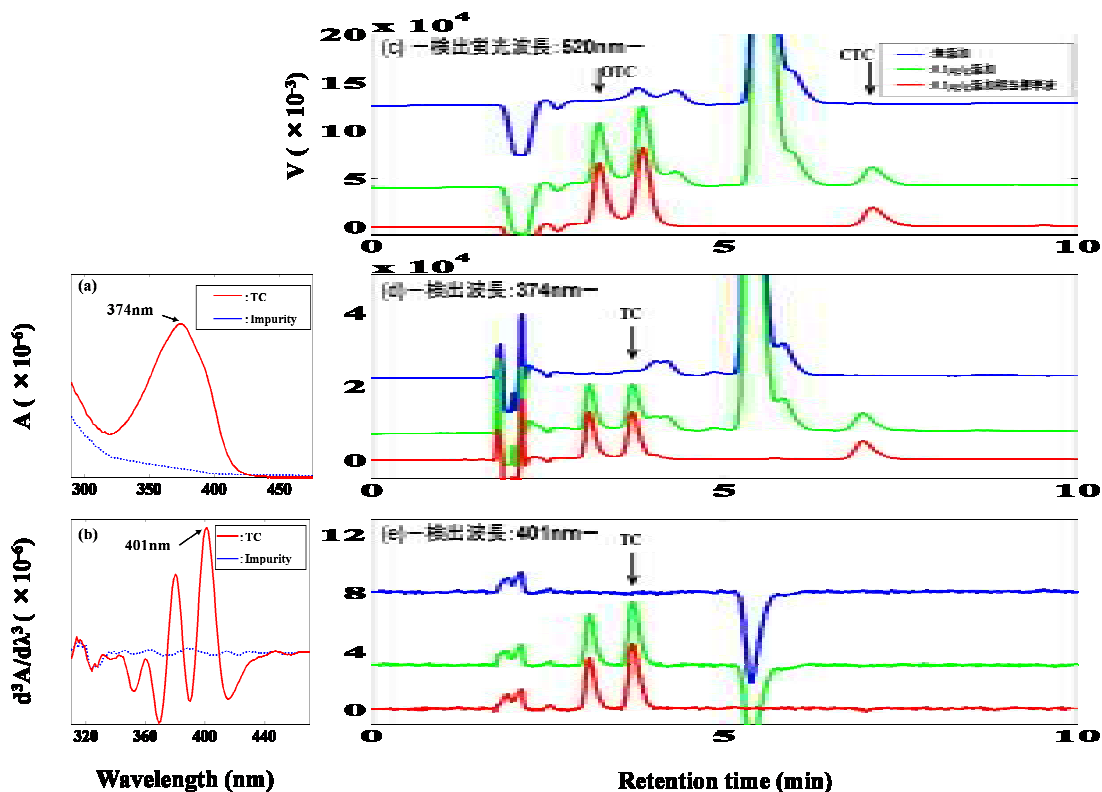


図1 TC溶出位置のスペクトル及び微分処理前後のクロマトグラム(卵)  
 (a)夾雑物, TCの吸収スペクトル, (b)3次微分スペクトル, (c)蛍光クロマトグラム  
 (d)微分処理前クロマトグラム, (e)微分処理後クロマトグラム

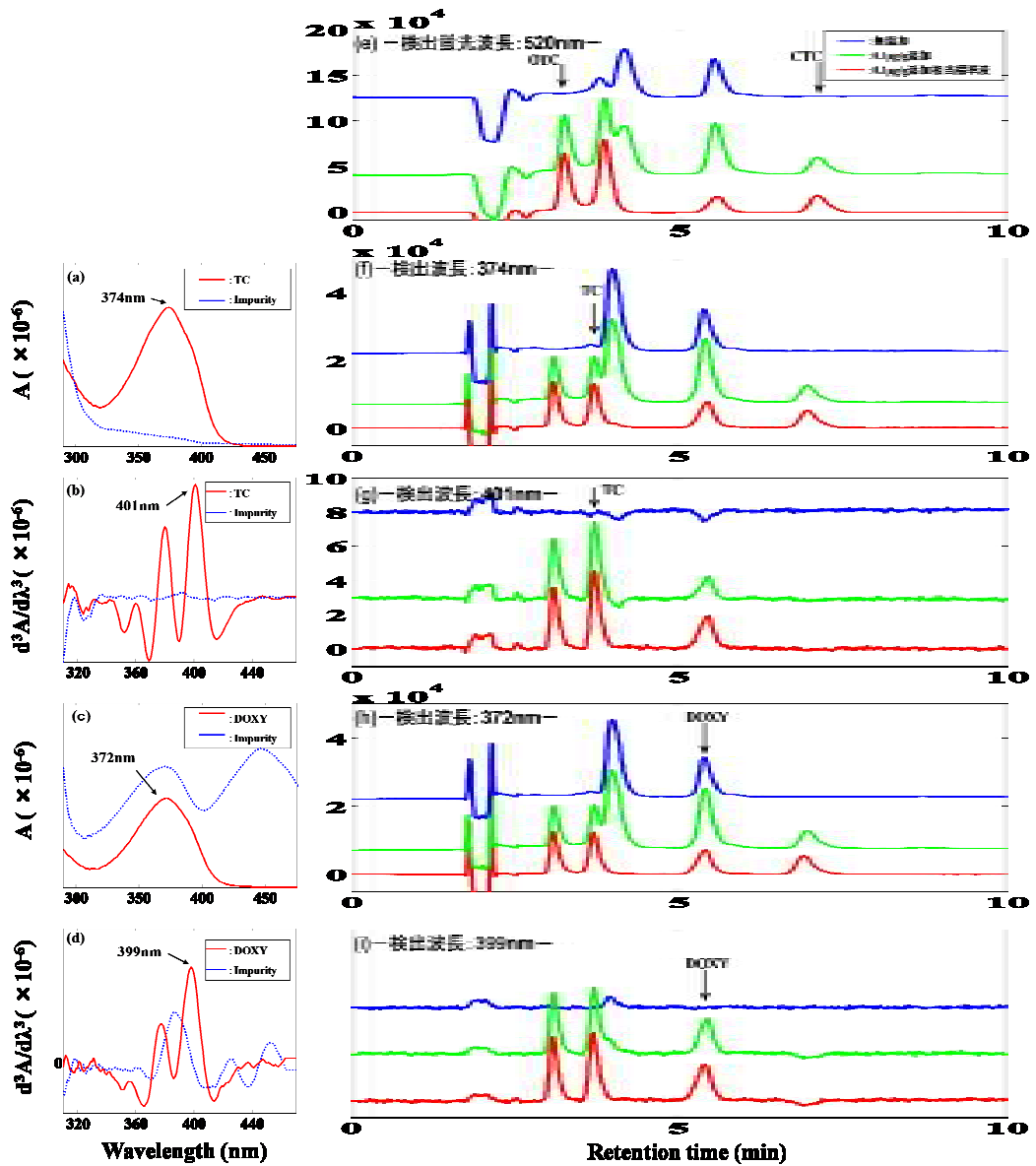


図2 TC, DOXY溶出位置のスペクトル及び微分処理前後のクロマトグラム(豚)  
 (a)夾雑物, TCの吸収スペクトル, (b)TCの3次微分スペクトル, (c)夾雑物, DOXYの吸収スペクトル,  
 (d)DOXYの3次微分スペクトル, (e)蛍光クロマトグラム, (f)微分処理前クロマトグラム-374nm,  
 (g)微分処理後クロマトグラム-401nm, (h)微分処理前クロマトグラム-372nm, (i)微分処理後  
 クロマトグラム-399nm

## 第 4 章 学会発表要旨・抄録

## 茨城県の若年女性におけるヒトパピローマウイルス (HPV) の感染状況 (第二報)

原 孝, 増子京子, 大和慎一

### [目的]

子宮頸がんの年齢調整死亡率は、わが国では 1958 年以降低下していたが、若年者のがんの増加により 1993 年を底にして上昇に転じたため、茨城県は検診対象年齢を下げるなど子宮頸がん検診に先駆的に取り組んでいる。子宮頸がんの発生には HPV が深く関与しており、少なくとも 13 の遺伝子型が high-risk 型 HPV として知られている。そのため、県内若年女性に対する high-risk 型 HPV の感染実態調査を平成 19 年度から 3 ヶ年計画でスタートしたが、2 年分の結果がまとまったので、その一部について報告する。

### [材料及び方法]

対象は、共同研究機関（産婦人科の一次医療機関及び二次医療機関の各 1 機関）を子宮頸がん検診等のために受診した者の中から、インフォームド・コンセントを受けた 39 歳までの女性とした。試料は、SurePath 液又は ThinPrep 液に保存された頸部細胞とし、はじめにハイブリッドキャプチャー法 (HPV-DNA 「ミツビシ」HCII) により 13 の high-risk 型 HPV のスクリーニングを行った。陽性者については、さらに GeneSQUARE 法、一部の陽性者には Q-Invader 法を併用して遺伝子型別等を行った。

### [結果]

一次医療機関受診者の HPV 感染率は 14.0% (457/3,259 人) であり、年齢別にみると 20 歳代前半群が 23.9% と最も高かった。HPV の遺伝子型の中で、検出頻度の最も高かったのは 52 型 (17.6%) であった。以下、58 型 (13.5%)、16 型 (11.2%)、51 型 (7.0%)、56 型と 39 型 (ともに 6.6%) の順に検出され、これらの遺伝子型で全体の約 70% を占めた。感染者の 37.1% に複数の遺伝子型の感染している混合型感染例がみられ、な

かには 8 つの遺伝子型に感染している症例もあった。混合感染の割合は 30 歳代後半では 25.4% であったが、年齢の低下とともに上昇し、19 歳以下では 45.4% であった。混合型感染例の遺伝子型間におけるウイルス量の差は、最も大きい症例で  $10^5$  以上あった。

一方、二次医療機関受診者の感染率は 52.3% (134/256 人、平成 20 年度) であり、検出頻度が最も高い遺伝子型は 16 型 (18.8%) であった。

HCII 陽性例から、13 遺伝子型以外の遺伝子型 (単独型感染例のみ) が 6.6% (19/288 例) 検出された。

### [考察]

一次医療機関受診者の high-risk 型 HPV の感染率は 14.0% であり、井上らの報告による金沢市住民の感染率 15.0% (648/4,306 人) とほぼ同じであった。大学や二次医療機関における感染率は、がんや前がん病変の患者を多く診るため偏りがある。そのため、この一次医療機関の受診者のデータは、わが国における地域の HPV の感染状況を反映するものとして参考になると思われる。遺伝子型に関しても同様である。混合型感染例の割合が若年者ほど高いという結果については、混合型感染例は単独型感染例より持続化しやすいという報告があり、若年者に子宮頸がんが増加しているという現状と考えると興味深い。スクリーニング法として用いた HCII 法は、子宮頸がんのスクリーニング用として信頼性が高く欧米で汎用されているが、今回、13 の遺伝子型以外の遺伝子型が単独型感染例のうちの 6.6% にみられた。それらは非特異反応であると考えられるが、研究者によっては high-risk 型としていたり、未評価であったりするもあり、決してキットの評価を下げるものではないと考える。

## HPLC-MS/MS を用いた先天性ステロール代謝異常症一斉診断システムの確立

○本多 彰<sup>1</sup>, 宮崎 照雄<sup>1</sup>, 池上 正<sup>1</sup>, 原 孝<sup>2</sup>, 松崎 靖司<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京医科大学 茨城医療センター, <sup>2</sup>茨城県衛生研究所

【緒言】先天性ステロール代謝異常症は、コレステロールの吸収・生合成・異化を司る経路の先天異常である。比較的新しい疾患群であるが、これまでに 10 種類以上の疾患が発見されている。罹患時に血清や組織中で上昇または減少するステロールは、どれも構造が非常に類似しているのが特徴である。従って、一度の分析ですべてを一斉に定量するシステムは世界的にも開発されていないばかりか、わが国ではこのうちの 1 つのステロールでさえも、常時分析依頼を受けられる施設は限られている。このような現状から、今回 HPLC-MS/MS を用いたステロールの一斉分析法を開発し、わが国において同疾患群の診断システムを確立することを目的とした。

【方法】血清 1  $\mu$ L に内部標準として重水素標識ステロールおよび Coprostanol を添加した後、37°C の 1 N Ethanol KOH 中で 1 時間アルカリ加水分解を行った。n-Hexane にて中性ステロールを抽出し、ピコリン酸で誘導体化した後にその 1/50 量を逆相 C18 カラムを用いた HPLC-MS/MS 装置に導入した。HPLC の移動相には Acetonitrile:Methanol:Water 系のグラジエントを用い、分析時間は 40 分とした。また、MS/MS のイオン化には Positive-electrospray ionization(P-ESI) を用い、Selected reaction monitoring(SRM)法にて分析した。

【結果】1) 誘導体化による高感度化, 2) HPLC による分離条件, 2) SRM によるモニタリングイオンの選択, という 3 つを最適化することにより、

わずか 1  $\mu$ L の血清を用いて、コレステロールのほか、ラノステロール以降のコレステロール合成系中間産物 (19 種類), オキシステロールを含めた胆汁酸合成系中間産物 (19 種類), およびコレステロール吸収系の異常で変動するステロール (3 種類) など、合計 40 種類以上のステロールを同時定量することが可能になった。各ステロールの最小検出感度は 1 pg 以下であり、代表的なステロールに関して行った再現性と添加回収に関する実験では、良好な結果が得られた。先天性ステロール代謝異常症の例として Smith-Lemli-Opitz 症候群 ( $3\beta$ -hydroxysteroid  $\Delta^7$ -reductase deficiency), CHILD 症候群 ( $3\beta$ -hydroxysteroid  $\Delta^8$ ,  $\Delta^7$ -isomerase deficiency), シトステロール血症 (ABCG5/8 deficiency), 脳腱黄色腫症 (CYP27A1 deficiency) の血清を分析した。その結果、それぞれの疾患の診断マーカーとして用いられているステロール濃度の上昇のみならず、それによるコレステロール代謝系全体の変化を評価することも可能であった。

【考察】今回我々が開発したステロールの一斉分析法は、わずかな血清を用いてステロールの網羅的な解析を可能にした。さらに組織、羊水など他の生体サンプル中ステロール分析への応用も可能である。本方法は、わが国における先天性ステロール代謝異常症の生化学的診断システムの確立に寄与すると共に、病態解析や治療効果の評価にも有用であると考えられた。

第 51 回日本先天代謝異常学会総会、第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム (東京)

## 2003-2008年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向

服部純子<sup>12</sup>、瀧永博之<sup>3</sup>、吉田 繁<sup>4</sup>、千葉仁志<sup>4</sup>、小池隆夫<sup>4</sup>、佐々木 悟<sup>5</sup>、伊藤俊広<sup>5</sup>  
内田和江<sup>6</sup>、原 孝<sup>7</sup>、佐藤武幸<sup>8</sup>、上田敦久<sup>9</sup>、石ヶ坪良明<sup>9</sup>、近藤真規子<sup>10</sup>、今井光信<sup>10,11</sup>  
長島真美<sup>12</sup>、貞升健志<sup>12</sup>、古賀一郎<sup>13</sup>、太田康男<sup>13</sup>、山元泰之<sup>14</sup>、福武勝幸<sup>14</sup>、田中理恵<sup>15</sup>  
加藤信吾<sup>15</sup>、宮崎菜穂子<sup>2,16</sup>、藤井 毅<sup>16</sup>、岩本愛吉<sup>16</sup>、西澤雅子<sup>17</sup>、仲宗根正<sup>17</sup>、巽 正志<sup>17</sup>  
椎野禎一郎<sup>17</sup>、林田庸総<sup>3</sup>、岡 慎一<sup>3</sup>、伊部史朗<sup>1</sup>、藤崎誠一郎<sup>1</sup>、金田次弘<sup>1</sup>、横幕能行<sup>1</sup>  
浜口元洋<sup>1</sup>、上田幹夫<sup>18</sup>、大家正義<sup>19</sup>、田邊嘉也<sup>19</sup>、渡辺香奈子<sup>20</sup>、渡邊 大<sup>21</sup>、矢倉裕輝<sup>21</sup>  
白阪琢磨<sup>21</sup>、栞原 健<sup>22</sup>、小島洋子<sup>23</sup>、森 治代<sup>23</sup>、中桐逸博<sup>24</sup>、高田 昇<sup>25</sup>、木村昭郎<sup>25</sup>  
南 留美<sup>26</sup>、山本政弘<sup>26</sup>、松下修三<sup>27</sup>、藤田次郎<sup>28</sup>、健山正男<sup>28</sup>、堀 成美<sup>29</sup>、杉浦 亙<sup>1,17</sup>

(<sup>1</sup>国立病院機構名古屋医療センター、<sup>2</sup>財団法人エイズ予防財団、<sup>3</sup>国立国際医療センター、  
<sup>4</sup>北海道大学、<sup>5</sup>国立病院機構仙台医療センター、<sup>6</sup>埼玉県衛生研究所、<sup>7</sup>茨城県衛生研究所、<sup>8</sup>千葉  
大学、<sup>9</sup>横浜市立大学、<sup>10</sup>神奈川県衛生研究所、<sup>11</sup>田園調布学園大学、<sup>12</sup>東京都健康安全研究セン  
ター、<sup>13</sup>帝京大学、<sup>14</sup>東京医科歯科大学、<sup>15</sup>慶応義塾大学、<sup>16</sup>東京大学医科学研究所、<sup>17</sup>国立感染  
症研究所、<sup>18</sup>石川県立中央病院、<sup>19</sup>新潟大学、<sup>20</sup>新潟県保健環境科学研究所、<sup>21</sup>国立病院機構大阪  
医療センター、<sup>22</sup>独立行政法人南京都病院、<sup>23</sup>大阪府立公衆衛生研究所、<sup>24</sup>川崎医科大学、<sup>25</sup>広島  
大学病院、<sup>26</sup>国立病院機構九州医療センター、<sup>27</sup>熊本大学、<sup>28</sup>琉球大学、<sup>29</sup>聖路加看護大学)

近年、新規感染症例への薬剤耐性 HIV の感染拡大が問題になっている。2003-2008 年の新規 HIV/AIDS 診断症例 (03 年:288 例、04 年:290 例、05 年:423 例、06 年:457 例、07 年:473 例、08 年:620 例) の薬剤耐性を調査した結果、耐性症例の頻度は 03 年:4.9%、04 年:5.2%、05 年:7.8%、06 年:6.6%、07 年:9.7%、08 年:8.1%と年々増加傾向が認められた。



## 第 5 章 他誌掲載・論文要旨

## Highly-sensitive quantification of serum malonate, a possible marker for *de novo* lipogenesis, by LC-ESI-MS/MS

血中マロン酸の高感度定量法の開発

Akira Honda,<sup>1,2</sup> Kouwa Yamashita,<sup>3</sup> Tadashi Ikegami,<sup>4</sup> Takashi Hara,<sup>5</sup> Teruo Miyazaki,<sup>1,2</sup>  
Takeshi Hirayama,<sup>4</sup> Mitsuteru Numazawa,<sup>3</sup> and Yasushi Matsuzaki,<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Center for Collaborative Research, <sup>2</sup>Department of Development for Community Medicine and

<sup>4</sup>Department of Gastroenterology, Tokyo Medical University Ibaraki Medical Center, Ami, Ibaraki, Japan

<sup>3</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Miyagi, Japan

<sup>5</sup>Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki, Japan.

J. Lipid Res. 50, 2124-2130 (2009)

We describe a new sensitive and specific method for the quantification of serum malonate (malonic acid, MA), which could be a new biomarker for *de novo* lipogenesis (fatty acid synthesis). This method is based upon a stable isotope-dilution technique using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). MA from 50  $\mu$ l of serum was derivatized into di-(1-methyl-3-piperidinyl) malonate (DMP-MA), and quantified by LC-MS/MS using the positive electrospray ionization (P-ESI) mode. The detection limit of the DMP-MA was approximately 4.8 fmol (500 fg) (S/N = 10), which was more than 100 times more sensitive compared with that of MA by LC-MS/MS using the negative electrospray

ionization (N-ESI) mode. The relative standard deviations between sample preparations and measurements made using the present method were 4.4% and 3.2%, respectively, by one-way ANOVA. Recovery experiments were performed using 50  $\mu$ l aliquots of normal human serum spiked with 9.6 pmol (1 ng) to 28.8 pmol (3 ng) of MA, and were validated by orthogonal regression analysis. The results showed that the estimated amount within a 95% confidence limit was  $14.1 \pm 1.1$  pmol, which was in complete agreement with the observed  $\bar{X}_0 = 15.0 \pm 0.6$  pmol, with a mean recovery of 96.0%. This method provides reliable and reproducible results for the quantification of MA in human serum.

生体における脂肪酸の生合成を非侵襲的にモニターすることを目的に、血中マロン酸濃度を高感度で定量する方法の開発を行った。血清 50  $\mu$ l からマロン酸を抽出し、ジ-(1-メチル-3-ピペリジニル)マロネートに誘導体化し、ポジティブ ESI モードの LC-MS/MS で定量した。

最小検出感度は約 500 fg であり、誘導体化せずにネガティブ ESI モードによってマロン酸を直接測定した場合よりも、100 倍以上高感度であった。本法は 5% 以下の変動係数と 95% 以上の添加回収率が得られ、高感度であるのみならず高精度であることが確認された。

## Highly sensitive quantification of key regulatory oxysterols in biological samples by LC-ESI-MS/MS

生体サンプル中のオキシステロール高感度定量法の開発

Akira Honda,<sup>1</sup> Kouwa Yamashita,<sup>2</sup> Takashi Hara,<sup>3</sup> Tadashi Ikegami,<sup>4</sup> Teruo Miyazaki,<sup>1</sup> Mutsumi Shirai,<sup>3</sup> Guorong Xu,<sup>5</sup> Mitsuteru Numazawa,<sup>2</sup> and Yasushi Matsuzaki,<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Center for Collaborative Research and <sup>4</sup>Department of Gastroenterology, Tokyo Medical University Kasumigaura Hospital, Ami, Ibaraki, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Miyagi, Japan

<sup>3</sup>Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki, Japan.

<sup>5</sup>Department of Medicine, University of Medicine and Dentistry of New Jersey-New Jersey Medical School, Newark, NJ, USA

J. Lipid Res. 50, 350-357 (2009)

We describe a highly sensitive and specific method for the quantification of key regulatory oxysterols in biological samples. This method is based upon a stable isotope dilution technique by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). After alkaline hydrolysis of human serum (5  $\mu$ l) or rat liver microsomes (1 mg protein), oxysterols were extracted, derivatized into picolinyl esters and analyzed by LC-MS/MS using the electrospray ionization (ESI) mode. The detection limits of the picolinyl esters of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol, 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 22R-hydroxycholesterol, 24S-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol and 24S,25-epoxycholesterol were 2-10 fg (5-25 amol)

on-column (signal-to-noise ratio = 3). Reproducibilities and recoveries of these oxysterols were validated according to one-way layout and polynomial equation, respectively. The variances between sample preparations and between measurements by this method were calculated to be 1.8 to 12.7% and 2.9 to 11.9%, respectively. The recovery experiments were performed using rat liver microsomes spiked with 0.05 to 12 ng of oxysterols and recoveries of the oxysterols ranged from 86.7 to 107.3% with a mean recovery of 100.6%. This method provides reproducible and reliable results for the quantification of oxysterols in small amounts of biological samples.

生体サンプル中のオキシステロール濃度を高感度で定量する方法の開発を行った。血清 5  $\mu$  L または肝ミクロソーム(1 mg protein)からオキシステロールを抽出し、水酸基をピコリン酸とエステル化させた後に、ポジティブ ESI モードの LC-MS/MS で定量した。最小検出感度は 2-10 fg であり、主要なオキシステロールは 5% 以下、

濃度の低いオキシステロールでも 15% 以下の変動係数と 87-107% の添加回収率が得られた。本法は、生体に微量に存在し脂質代謝の制御に重要な役割を有するオキシステロールを、高い信頼性の下で高感度測定することを可能にした。

## Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS ヒト血清中ステロールの高感度定量法の開発

Akira Honda,<sup>1</sup> Kouwa Yamashita,<sup>2</sup> Hiroshi Miyazaki,<sup>3</sup> Mutsumi Shirai,<sup>4</sup> Tadashi Ikegami,<sup>5</sup> Guorong Xu,<sup>6</sup>  
Mitsuteru Numazawa,<sup>2</sup> Takashi Hara,<sup>4</sup> and Yasushi Matsuzaki,<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Center for Collaborative Research and <sup>5</sup>Department of Gastroenterology, Tokyo Medical University  
Kasumigaura Hospital, Ami, Ibaraki, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Miyagi, Japan

<sup>3</sup>Pharmax Institute, Kawasaki, Kanagawa, Japan

<sup>4</sup>Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki, Japan.

<sup>6</sup>Department of Medicine, University of Medicine and Dentistry of New Jersey-New Jersey Medical School,  
Newark, NJ, USA

J. Lipid Res. 49, 2063-2073 (2008)

We have developed a highly sensitive and specific method for the analysis of serum sterol profiles. Sterols in 1  $\mu$ l of dried serum were derivatized into picolinyl esters (3 $\beta$ -picolinate) and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using the electrospray ionization (ESI) mode. In addition to cholesterol, 19 cholesterol precursors, cholestanol, campesterol, sitosterol and sitostanol were identified simultaneously. Quantitative analyses for the picolinyl esters of 11 available sterols were performed and detection limits were found to be less than 1 pg on-column. Reproducibilities and recoveries of 8 non-cholesterol sterols were validated according to one-way layout and polynomial equation, respectively. The variances

between sample preparations and between measurements by this method were calculated to be 1.6 to 8.2% and 2.5 to 16.5%, respectively. The recovery experiments were performed using 1  $\mu$ l aliquots of normal human serum spiked with 1 to 6 ng of sterols, and recoveries of the sterols ranged from 88.1 to 102.5% with a mean recovery of 98.1%. The present method provides reliable and reproducible results for the identification and quantification of neutral sterols, especially in small volumes of blood samples, which is useful for serological diagnosis of inherited disorders in cholesterol metabolism and for non-invasive evaluation of cholesterol biosynthesis and absorption in humans.

血中のステロール濃度を高感度で定量する方法の開発を行った。血清 1  $\mu$ L から 24 種類のステロールを抽出し、3 $\beta$ 位の水酸基をピコリン酸とエステル化させた後に、ポジティブ ESI モードの LC-MS/MS で定量した。最小検出感度は 1 pg 未満であり、多くのステロールは 5%以下、非常に

濃度の低いステロールでも 20%以下の変動係数と 88–102%の添加回収率が得られた。本法は極わずかの血清を用いて、先天性ステロール代謝異常症の診断や、ヒトにおけるコレステロールの合成と吸収の評価に応用可能と考えられた。

## Comparative quantitative analysis of 14 types of human papillomavirus by real-time polymerase chain reaction monitoring Invader reaction (Q-Invader assay)

Q-Invader法による高発癌性ヒトパピローマウイルス14遺伝子型の  
相対定量法の開発

Kenichi Tadokoro<sup>a</sup>, Yuki Akutsu<sup>a</sup>, Kazuya Tanaka<sup>a</sup>, Tsuyoshi Saito<sup>a</sup>, Toshikazu Yamaguchi<sup>a</sup>,  
Toru Egashira<sup>a</sup>, Isamu Ishiwata<sup>b</sup>, and Takashi Hara<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Development of Clinical Genomics, BML, Inc. Saitama, Japan

<sup>b</sup>Ishiwata Obstetric and Gynecologic Hospital, Mito, Ibaraki, Japan

<sup>c</sup>Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki, Japan

Diagn Microbiol Infect Dis. 66,58-64(2010)

---

Human papillomavirus (HPV) is associated with several cervical diseases. A simple, rapid, cost-effective assay for identifying viral genotypes would greatly aid efforts for early detection and disease prevention. A real-time polymerase chain reaction monitoring Invader reaction assay (Q-Invader assay) was developed for genotyping and comparative quantitative analysis of 14 high-risk HPV genotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, and 68). A total of 131 cervical samples containing HPV in Japan were

examined by Q-Invader assay, and the results were compared with those from sequencing with consensus and genotype-specific primers. Genotypes determined by Q-Invader agreed with those of sequencing in all samples. Coinfections with multiple high-risk genotypes were correctly identified by Q-Invader assay in 27 samples. In addition, the relative ratios of the genotypes were determined. Thus, Q-Invader assay is a useful tool for genotyping and comparative quantitative analysis of high-risk HPV types.

---

ヒトパピローマウイルス (HPV) は子宮頸がん  
と関係している。ウイルスの遺伝子型を同定する  
ための簡便で迅速、費用効果の高い測定法は、疾  
患の早期発見と予防に大いに役立つ。そのため、  
14 の高発癌性 HPV の遺伝子型別とウイルス量  
の相対定量のために、インバーダー反応を利用し  
たリアルタイム PCR 法 (Q-インバーダー法) を  
開発した。日本の 131 の子宮頸部のサンプルを  
Q-インバーダー法でテストし、その結果

をコンセンサスプライマー及び型特異的プライ  
マーで解析した塩基配列の結果と比較したとこ  
ろ、すべてのサンプルにおいて、遺伝子型は一致  
した。また、27 サンプルにおいて複数の高発癌  
性 HPV の共感染が正しく同定された。そのうえ、  
遺伝子型間のウイルス量の相対的な比率がわか  
りました。このように、Q インバーダー法は、  
高発癌性 HPV の遺伝子型別と相対定量のための  
有用なツールである。

茨城県衛生研究所年報 第48号

平成23年11月発行  
編集兼発行 茨城県衛生研究所  
水戸市笠原町993-2  
電話 029-241-6652  
FAX 029-243-9550