

図1-7 24種のプライマーによる標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (7)

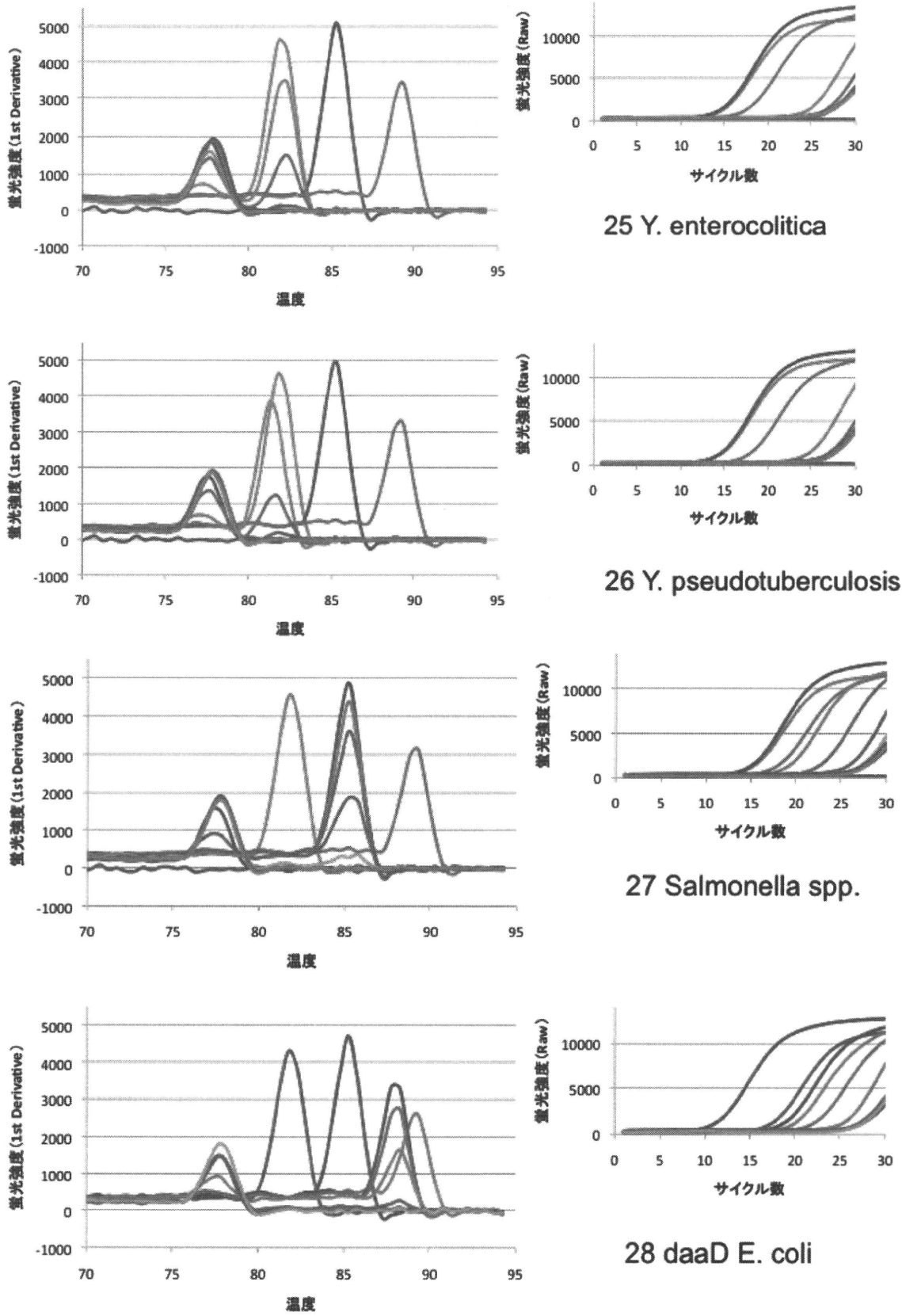
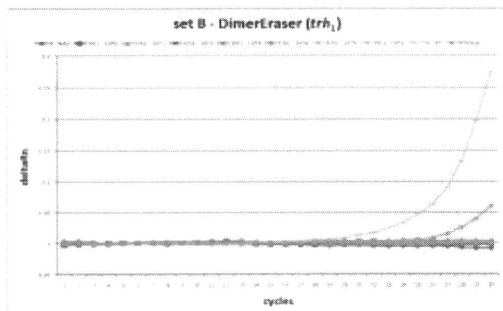


図2-1 *trh*遺伝子増幅に関する追加試験 (*Taq*の変更)

*trh*遺伝子増幅に関する改良試験

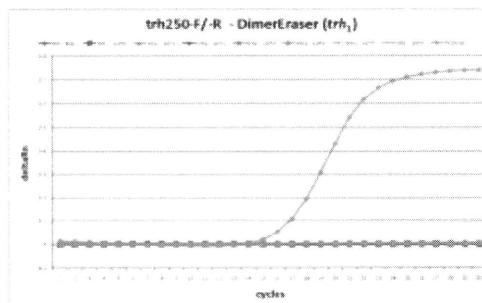
DimerEraserでの増幅曲線

プライマー:RFBS24IVのset B

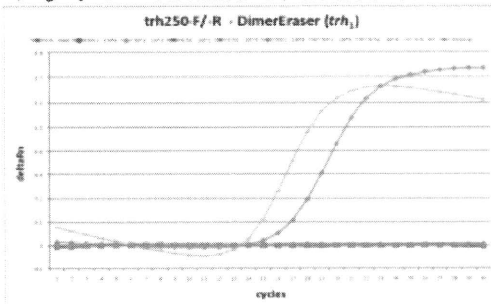


Single primerでの増幅曲線

SYBR Premix DimerEraser 使用



プライマー:trh250-F/trh250-R



SYBR Premix Ex Taq II 使用

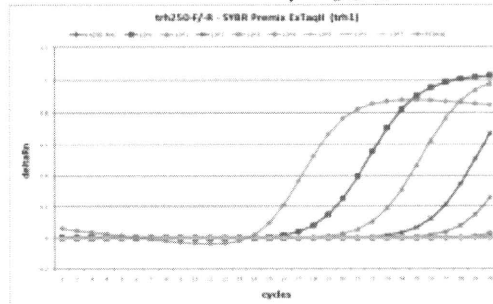


図2-2 *trh*遺伝子増幅に関する追加試験 (伸長反応時間の変更)

*trh*遺伝子増幅に関する改良試験

参考 (伸長時間 72°C 30 秒)

	Ct	Tm
10 ⁰	24.72	79.74
10 ⁻¹	27.55	86.46
10 ⁻²	28.51	86.57
10 ⁻³	28.7	86.62
10 ⁻⁴	-	86.48
10 ⁻⁵	28.28	86.59

伸長時間72°C・1minに設定した場合

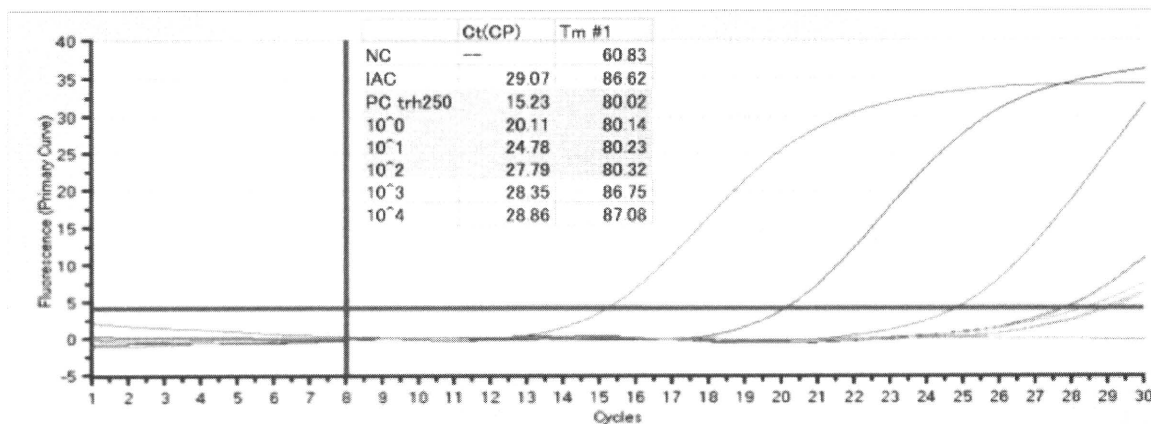


図3-1 Tm値のずれによる推定困難な菌種 (1)

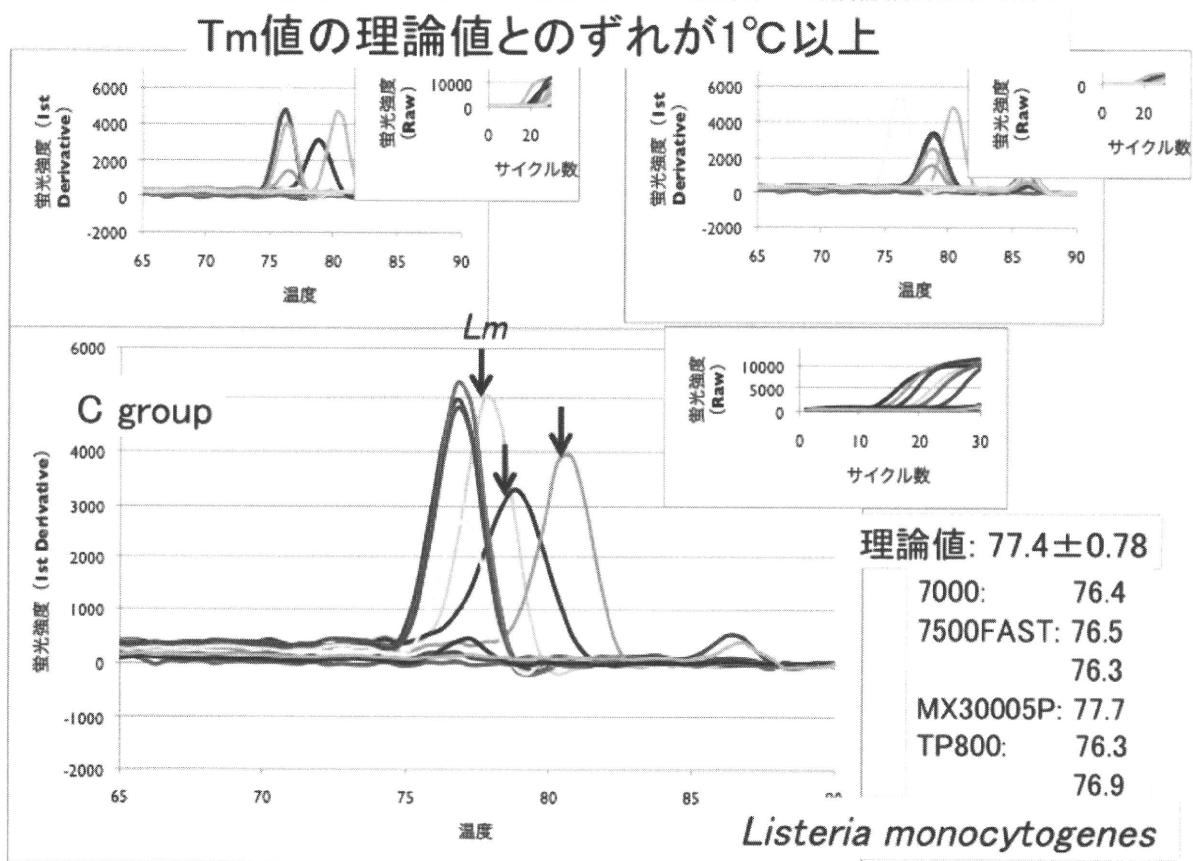
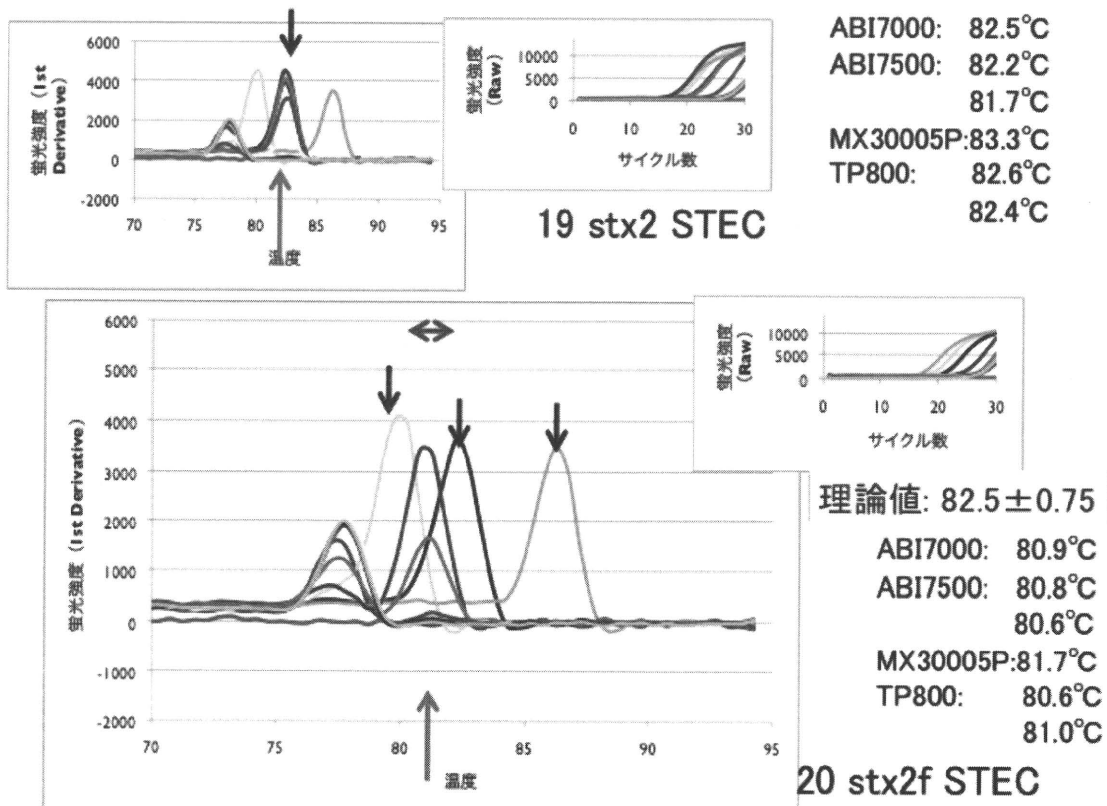


図3-2 Tm値のずれによる推定困難な菌種 (2)



地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究

分担報告書(ウイルス部門)

研究代表者	調 恒明	山口県環境保健センター	所長
研究分担者	高橋和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長
研究協力者	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	ウイルス研究室長
	千々和勝己	福岡県保健環境研究所	微生物部長
	世良暢之	福岡県保健環境研究所	ウイルス課長
	吉富秀亮	福岡県保健環境研究所	研究員
	濱岡修二	山口県環境保健センター	研究員
	加瀬哲男	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課長
	山崎謙治	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課主任研究員
	倉田貴子	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員
	中田恵子	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員

研究概要

本年度の研究では、H19-21 年度に作製した迅速網羅的PCR法を各地衛研が臨床検体の検査に応用することが可能であるかを検討するために、第一段階として本PCR法の検出感度の再現性を各4地衛研で確認することを目的とした。その結果、呼吸器マルチプレックスPCRの4衛研での検出感度は多少差はあるが、作製元とほぼ同等の感度であると思われた。また、エンテロウイルスのVP1では不検出がみられたが、VP4では同等の感度であることが確認された。以上より、各衛研で本方法を用いて臨床検体について診断検査を進めることが可能であると判断できた。

A. 研究目的

地方衛生研究所が健康危機管理事例に対処するために必要な網羅的な迅速検査方法、およびそれらや既存の核酸増幅法の精度管理法を確立し、検査機能の強化、充実を計ることを目的とする。

そのためにH19-21 年度に検討した迅速網羅的診断法の性能をさらに向上させ、臨床検体について応用し、その性能を評価することを当面の目標とする。

B. 研究方法

研究協力者である4地衛研において、前年度までに本研究班で確立した網羅的 PCR 法の検出感度の再現性を確認する。

担当する網羅的 PCR 法

1. 呼吸器ウイルスマルチプレックス PCR—
1, 2 福岡県保健環境研究所(以下福岡)
2. 呼吸器ウイルスマルチプレックス PCR—
3, 4 大阪府立公衆衛生研究所(以下大阪)
3. エンテロウイルス PCR 法
愛知県衛生研究所(以下愛知)

C. 研究結果

(1) 網羅的 PCR 法の検出感度の再現性の確認

4衛研で行った各PCR法の検出感度の結果を表1-3に示す。

1. 福岡保健環境研究所が作製した8種類のウイルスを検出する呼吸器マルチプレック

ス PCR 法の検出感度(表1)

大阪の結果では4種のうち3種では基準の検出感度よりもさらに50倍以上の高感度であった。山口では1種のウイルスでやや高感度であった。愛知では基準と同等の感度であった。

2. 大阪が作製した8種類のウイルスを検出する呼吸器マルチプレックス PCR 法の検出感度(表2)

他の3地衛研での実験結果ではほぼ同様の感度であった。

3. 愛知のエンテロウイルス PCR 法の検出感度(表3)

本方法では4種類のコントロールウイルスを用いた。福岡では2種のウイルスでやや高感度であった。山口、大阪では VP1 で不検出の場合が認められた。

結果を要約すると、検討した PCR 法の検出感度は、4衛研で用いた PCR 試薬や増幅機器の違いにより多少異なっていた。特に不検出である場合も見られた。

D. 考察

結果の評価

呼吸器マルチプレックスPCRの4衛研での検出感度は多少差はあるが、作製元とほぼ同等の感度であると思われる。また、エンテロウイルスのVP1では不検出がみられたが、VP4では同等の感度であることが確認されたので、各衛研で本方法を用いて臨床検体について検査を行うことが可能であると判断できる。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1

福岡呼吸器マルチプレックスPCR2種の検出感度の結果要約

病原体名	PC濃度	希釈倍率			
		福岡	大阪	愛知	山口
Influ C	7.3713E+12	1E+10	1E+11	1.00E+11	1.00E+11
Corona OC43	4.1373E+12	1E+11	1E+10	1.00E+12	1.00E+12
Corona NL68	5.1002E+13	1E+10	1E+10	1.00E+11	1.00E+12
Rhino		256	10000	256	1024
Echo25		256	1000	512	256
Mycoplasma		2	100	16	16
Boca		2	100	8	16
Adeno		78125	100000	3.90E+05	1.60E+04
使用機種		ABI 2720	タカラDice	Minicycler	ABI 9700
		ABI Veriti			

使用キット

	1stRT-PCR	2nd PCR
福岡	Qiagen one-step RT-PCR kit	TAKARA ExTaq
大阪	Qiagen one-step RT-PCR kit	KODFX 東洋紡
愛知	Qiagen one-step RT-PCR kit	TAKARA ExTaq
山口	Qiagen one-step RT-PCR kit	TAKARA ExTaq

表 2

大阪呼吸器マルチプレックスPCR2種の検出感度の結果要約

病原体	検出限界				
	大阪		福岡	山口	愛知
Parainfluenza 1	1.00E-03	TCID50/ul	2E-04	0.001	0.00233
Parainfluenza 2	1.00E-2~1.00E-3	TCID50/ul	2.33E-3.2	0.01	2.33E-2.2
Parainfluenza 3	1.00E-1~1.00E-2	TCID50/ul	2.33E-2.4	0.1	2.33E-1.4
Parainfluenza 4	1.00E-04	TCID50/ul	2.33E-4.7	0.001	2.33E-3.7
Influenza A	1.00E-2~1.00E-3	ffu/ul	0.049	0.01	0.0485
Influenza B	1.00E-2~1.00E-3	ffu/ul	0.005	0.01	0.00466
RSV	1.00E-3~1.00E-4	TCID50/ul	7E-05	1E-04	0.000746
Hu Metapneumo	10~100	copy/ul	450	1000	450
使用機種	タカラDice		ABI 2720?	ABI9700	Minicycler
			ABI Veriti		
	1stRT-PCR	2nd PCR			
	Qiagen one-step RT-PCR kit	KODFX 東洋紡			

表 3

愛知エンテロPCR2種の検出感度の結果要約

PCR法による検出限界(希釈倍率 10^x)

	愛知		大阪		山口		福岡	
	VP1	VP4-2	VP1	VP4-2	VP1	VP4-2	VP1	VP4-2
PV-1	-3	-4	-3	-5	-3	-5	-4	-6
EV71	-2	-5	-3	-5	-2	-4	-1	-4
CV-B5	-3	-4	-4	-4	-6	-5	-4	-6
CV-A24	-2	-5	不検出*	-4	不検出	-4	-3	-6

使用キット	愛知のキット	愛知のキット	Qiagen one-step RT-PCR kit	愛知のキット	
			TAKARA ExTaq		
使用機器	* MiniCycler(BIO-RAD)	PERKIN ELMER CETUS	ABI 9700	ABI Veriti	ASTEC

*CA24についてはMinicycler,Diceの機器を用いても同様の結果であった。

平成 22 年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)

「地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究」
分担研究報告書

「健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の
構築と精度管理に関する研究」

研究分担者 田中 敏嗣 (神戸市環境保健研究所)

研究要旨:

地方衛生研究所(地研)は地域及び広域における健康危機管理の科学的、技術的中核としての機能を保持すること、試験検査とその精度管理能力や疫学調査能力などの水準を確保することが求められている。

健康危機関連化学物質特に自然毒による健康危機管理事例は毎年のように死者がでるなど食品衛生上極めて重要な課題である。しかし、発生頻度や地域性など様々な要因から経験や専門性が乏しく多くの地研で対応に苦慮しているのが現状である。

本研究では地研の連携やネットワークを活用し、全国の地研での自然毒による食中毒の事例や試験法をデータベースに集積し、情報の共有を図り、迅速な対応への有効なツールの構築を検討した。また、自然毒の中でも死者事例の多いふぐ毒の LC-MS による迅速試験法を開発し、精度管理を実施することにより健康危機管理への迅速、的確な対応に有効な手法を構築した。

研究協力者

滝川義明、畠山えり子、高橋悟 (岩手県
環境保健研究センター)

阿彦忠之、笠原義正、和田章伸 (山形県
衛生研究所)

伊能睿、石井里枝 (埼玉県衛生研究所)

玉井拙夫、藤巻照久、脇ますみ、熊坂謙
一 (神奈川県衛生研究所)

金田誠一、寺田久屋、谷口賢、小野田絢
(名古屋市衛生研究所)

井端泰彦、茶谷祐行、土田貴正、野澤真
里奈 (京都府保健環境研究所)

織田 肇、木村明生、赤坂 進 (大阪府
立公衆衛生研究所)

田窪良行、山口之彦 (大阪市環境科学研
究所)

田中智之、神藤正則、福田弘美 (堺市衛
生研究所)

山村博平、三橋隆夫、吉岡直樹 (兵庫
県立健康生活科学研究所)

山内光晴、佐想善勇（姫路市環境衛生研究所）

島田美昭、橋爪 崇、久野恵子、高井靖智（和歌山県環境衛生研究センター）

森野吉晴、浦崎美和、小田美紀、北尾拓也（和歌山市衛生研究所）

調 恒明、立野幸治、三浦 泉、吹屋貞子（山口県環境保健センター）

仲宗根民男、玉那覇康二、玉城宏幸、佐久川さつき（沖縄県衛生環境研究所）

川上史朗、上田泰人、矢野昌弘、杉浦義紹、大久保祥嗣、山口葉子、田中徳子（神戸市環境保健研究所）

A. 研究目的

地方衛生研究所（地研）には地域及び広域における健康危機管理の科学的、技術的中核としての機能を保持すること、試験検査とその精度管理能力や疫学調査能力などの水準を確保することを求められている。

健康危機関連化学物質特に自然毒による健康危機管理事例は細菌性食中毒に比べ件数、患者数は多くないが、毎年のように死者がでるなど食品衛生上極めて重要な課題である。

厚生労働省の食中毒発生事例統計 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokucu/04.html>, 2001-2009) の 10 年間では細菌による食中毒の発生件数が 11,033 件に比べ自然毒は 1,189 件で全体の 7.3% である。しかし、死者数では細菌による 21 人（件数に対する割合：0.19%）に対し、自然毒による死者数は 40 人で件数に対する割合は 3.4% で 17 倍と極めて高い。また、魚毒、貝毒などの動物性自然毒とキノコ

毒、植物毒などの植物性自然毒による発生頻度に地域差があり、前者が西日本、後者が東日本に多い傾向が認められる。

このように、発生頻度や地域性など様々な要因から地研の日常的な業務として行っているところは少なく、事例が発生すると経験や専門性が乏しいことからその対応に苦慮しているのが現状である。したがって、地研の連携やネットワークを活用し、まず全国の地研が中毒事例を共有し、同様の事例の再発に備えることが迅速な対応に極めて有用な手段となる。

本研究では自然毒による食中毒の事例や試験法をデータベースに集積し、情報の共有を図り、迅速な対応への有効なツールの構築を検討した。また、自然毒の中毒事例の中でも、毎年のように発生し、死亡事例も多く報告されているふぐ毒の試験法について検討した。

食品衛生法におけるふぐ毒の試験法はマウスによる方法であるが、マウスの調達に時間を要し、致死試験においても定量までは数時間が必要で、迅速な対応がとれていないのが現状である。近年、農薬のポジティブリスト化等により地研に高性能な微量分析装置である液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) の導入が図られている。この LC-MS/MS は農薬のみならず、自然毒のような水溶性あるいは難揮発性化学物質の分析に適している。

そこで、LC-MS/MS を用いてふぐ毒（テトロドトキシン、TTX）の迅速試験法を構築し、その精度管理を実施した。さらに、有毒ふぐを用いて LC-MS/MS による迅速試験法とマウス試験法での毒力を比較し、

その適用性を検討した。

B. 研究方法

1. 自然毒による中毒事例の集積

地方衛生研究所職員専用ホームページにある既存のデータベース「自然毒中毒事例情報システム」を活用し、事例の集積と情報共有を図る。

1) 操作の手順

- ・ システムにログインする
 - ・ 基本情報を入力し、登録する
 - ・ 試験結果詳細を入力し、登録する
- 登録済みデータは登録した地研は修正することができる。他の地研は加筆、修正はできない。
- ・ 入力項目と最大文字数は表 1 の通りである。

表 1 入力項目と最大文字数

項目名	最大文字数
自然毒分類	リストから選択
衛研名	自動的に付与
報告者	全角 40, 半角 80
件名	全角 50, 半角 100
原因食品	全角 50, 半角 100
症状	全角 500, 半角 1000
摂食者数	半角数字 6
発症者数	半角数字 6
死亡者数	半角数字 6
試験概要	全角 200, 半角 400
文献	全角 150, 半角 300
備考	全角 100, 半角 200
画像情報	bmp, jpg, gif 形式

2. LC-MS/MS によるふぐ毒(TTX)の迅速試験法の開発

2.1 実験方法

2.1.1 分析対象物質

ふぐ毒は TTX とその多くの同族体が知られている。図 1 はその一例を示したが、毒作用の主物質は TTX で毒性も最も強い。また、同族体の標準品の入手は困難であることから、分析対象物質は TTX ($C_{11}H_{17}N_3O_8$, MW:319.3) とした。

2.1.2 試料

あらかじめ TTX が不検出であることを確認した養殖ふぐの肝を添加試料とした。

2.1.3 試薬

- 1) TTX 標準品は和光純薬製あるいは TOCRIS bioscience 社製を用いた。
- 2) 限外ろ過は Amicon Ultra-4 10kDa Ultracel-PL menb (Millipore) を用いた。
- 3) メンブランフィルター (0.45 μ m) は Millex-LH13 (Millipore) を用いた。
- 4) メンブランフィルター (0.20 μ m) Millex-LG4 (Millipore) を用いた。
- 5) LC 用カラム: Xbridge Amide (Waters)、ZIC-pHILIC (MERCK)、TSK gel Amide-80 (東ソー)、Atlantis HILIC Silica (Waters)、Discovery HS F5 (SUPELCO) を用いた。

2.1.4 装置

- 1) API4000Qtrap (ABSciex)
- 2) API3200QTrap (ABSciex)
- 3) Triple QUAD5500 (ABSciex)
- 4) API3000Q (ABSciex)
- 5) API2000 (ABSciex)
- 6) TSQ Quantum Discovery Max (ThermoFisher SCIENTIFIC)
- 7) Xevo TQ (Waters)

- 8) 6210 TOF-MSD (Agilent Technologies)
- 9) Micromass Quattro Ultima Pt (JASCO)
- 10) 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies)

2.1.5 試験溶液の調製

- 1) 磨砕した試料 10g を正確に量り採る
- 2) 0.1% 酢酸溶液 25mL を加え、沸騰水浴中で 10 分間加熱、攪拌抽出した。
- 3) 冷却後 2) を吸引ろ過し、0.1% 酢酸溶液でろ紙を洗い 50mL に定容し、抽出溶液とした。
- 4) 抽出溶液 1mL をとり、0.1% 酢酸溶液で 12.5~500 倍に希釈した。
- 5) 4) 溶液の 2mL をメンブランフィルター (0.45 μ m) に通し、Amicon Ultra-4 10kDa を用い、限外ろ過 (3500rpm、10 分、5 $^{\circ}$ C)、その 1mL を分取した。
- 6) 5) をメンブランフィルター (0.20 μ m) に通し、LC-MS/MS 用試験溶液とした。

2.1.6 LC-MS/MS 測定

LC 用カラムにより分離した TTX を 2.1.4 に示した装置を用い測定した。14 機関は LC-MS/MS、1 機関は LC-TOF/MS を用いた。移動相は 0.1%ギ酸及びアセトニトリルの混液を使用し、アイソクラティックあるいは濃度勾配法で分離した。プリカーサーイオンは 320、プロダクトイオンは 162 または 302 で測定した。

2.1.7 複数機関による共同試験

- 1) 試験機関数：協力研究者に示した機関の内 15 機関で実施した。
- 2) 回収試験の添加濃度：10MUに相当する TTX濃度である 2.2 μ g/g を添加した。また、

1/10濃度の 0.22 μ g/g 添加試料においても検出の可能性を検討した。

- 3) 試験回数：無添加を 1 試行、添加を 5 試行とし、1/10濃度については 1 試行とした。
- 4) 検量線：機器の感度を検討し、異なる濃度 5 点の直線性が得られる範囲で定量した。
- 5) 定量方法：0.1%酢酸で調製した標準溶液を用い定量した。さらに、マトリックス効果を検証するため、マトリックス標準液と比較し、マトリックス効果が認められた機関の結果はマトリックス標準液による補正を行った。

共同試験は平成 22 年 11 月より 23 年 1 月に実施した。

3. ふぐ毒の LC-MS/MS による迅速試験法とマウス試験法との毒力 (MU) の比較検討

3.1 1 M が 220ng に相当することから、LC-MS/MS により求めた定量値を 220 で除し、通知法により求めた毒力 (MU) と比較した。

3.2 通知法：2.1.5 の 1)~3) と同様に調製した抽出溶液を試験溶液とした。ddy 系雄マウスの 19-21g に試験溶液 1mL を腹腔内注射し、10 分程度で致死させる毒力を算出した (食品衛生検査指針理化学編 2005、p. 661-666)。

C. 結果及び考察

1. 自然毒による中毒事例の収録件数

- 1) 収録総件数：248 件
- 2) 魚類：80 件 (ふぐ毒 66, シガテラ 9 など)
- 3) 貝・蟹類：35 件 (麻痺性 16, テトラミン 12 など)

- 4) キノコ : 58 件
- 5) 山野草 : 33 件
- 6) 栽培植物 : 28 件

2. LC-MS/MS によるふぐ毒 (TTX) の迅速試験法の開発

1) 通知法に従い抽出溶液を調製し、希釈、限外ろ過を行い調製した試験溶液を LC-MS/MS で測定した。

2) LC 及び LC-MS/MS 条件の検討

表 2 に示した LC 分離カラム 3 種について分離能及び保持時間を比較した。LC-MS の測定条件は表 3 に示す条件で行った。図 2 に示したように、3 種類のカラムにおいて保持時間 3.21 分から 5.35 分で条件①が少しテーリングを認めたが、分析は可能であった。したがって、各機関ではアミドカラムや HILIC カラムなど 2.1.3 5) に示したカラムを使用した。また、LC-MS/MS の測定はプリカーサーイオン 320 を採用し、プロダクトイオンは 162 または 302 で測定した。

3) 標準溶液の直線性 : 機種別の検出感度の違いにより、各機関が用いた濃度は異なるが、0.2~100 ng/mL の範囲で直線性が得られた。

4) 15 機関による共同試験結果について平均値の 2 シグマ処理を行ったところ、1 機関が除外されたため、14 機関の結果を表 4 に示した。添加回収試験 5 試行の平均値、回収率及び併行再現性 (RSD_r)、Z スコア、機関間 (室間) 再現性 (RSD_R)、HorRat 値を記載した。

各機関の回収率は 84.0~108% でかつ RSD_r、Z スコアも良好な結果であった。機関間では RSD_R が 10.7%、HorRat 値

が 0.8 で良好な値を示し、2.2µg/g 濃度の精度管理目標値 (回収率 70~120%、Z スコア ± 2 以下、RSD_R 14.2% 以下、HorRat 2.0 以下) の範囲内の結果が得られ、今回共同試験を実施した LC-MS/MS による迅速試験法の妥当性が確認された。

5) 検出限界 : 基準値 (10MU/g=2.2µg/g) の 1/10 濃度である 0.22µg/g の添加試験により検出が可能であることを確認した。また、機種により検出限界は異なったが S/N=3 として 0.082~4.4pg が担保された。これらの結果をマウス試験の場合の定量下限値 1.1µg/g (5MU/g) と比較すると 5 倍以上の感度が得られ、今回検討した LC-MS/MS による迅速試験法は食品の残品等低濃度の試験にも有効に活用できことが示唆された。

6) マトリックス効果 : 機種により検出限界が異なることから抽出溶液の希釈率が 12.5~500 倍と機関間で大きな違いがあった。使用機種によってはマトリックス影響が認められ、マトリックス検量線による定量が必要となった。

今回検討した LC-MS/MS による迅速試験法は約 2 時間で TTX の定量値を得ることができ、また、精度管理にも良好な結果であったことから、健康危機管理への迅速、的確な対応に有効な手段として活用が期待される。

3. ふぐ毒の LC-MS/MS による迅速試験法とマウス試験法との毒力 (MU) の比較検討

有毒ふぐの肝を試料として LC-MS/MS による迅速試験法による定量値を MU に換算した値とマウス試験法での MU 値を比較し

た結果を表 5 に示した。マウス試験法に対する LC-MS/MS 法の測定値の比率は 66%～108%と変動が認められた。同等の値を示す試料からシマフグのように 66%、75%とマウス法に比べ低い MU を示す試料も認められた。

LC-MS/MS 法、マウス試験法それぞれに測定誤差があることに加えて、図 1 に TTX とその同族体の一部を示したように、TTX 以外の同族体の毒性が影響したことも考えられる。したがって、今後さらに魚種、部位等多くの試料について検討を加える必要が認められた。そしてこれらデータの解析を行うことにより、マウス法を補完する、あるいは代わる迅速試験法として食品衛生や健康危機管理に有効な活用が期待される。

D. 結 論

1. 既存のデータベース地方衛生研究所職員専用ホームページにある「自然毒中毒事例情報システム」を活用し、自然毒の中毒事例の集積を行い、地研の連携やネットワーク、情報共有の再構築を図った。

2. LC-MS/MS を用いて約 2 時間で TTX を定量できる迅速試験法を開発し、精度管理の実施により健康危機管理への迅速、的確な対応に有効な手段を構築した。

3. 開発した LC-MS/MS 迅速試験法とマウス試験法での MU 値を比較検討することによって、近い将来マウス法を補完する、あるいは代わる迅速試験法として用いられる可能性が示唆された。

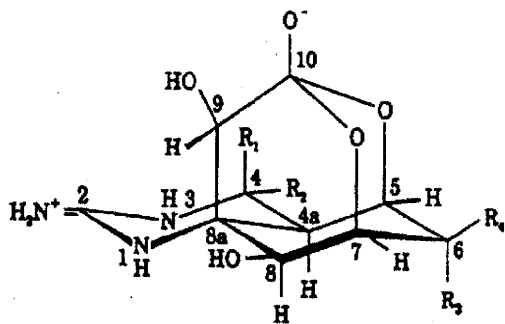
E. 研究発表

1. 学会発表

矢野昌弘、上田泰人、田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）：LC-MS/MS を用いたふぐ毒の迅速分析、第 46 回全国化学技術協議会年会、盛岡、2009 年 11 月 12-13 日

F. 知的所有権の取得状況

なし



*1	R1	R2	R3	R4	毒性 (K_0) *2
Tetrodotoxin (TTX)	H	OH	OH	CH ₂ OH	1 (1.8)
4-epiTTX	OH	H	OH	CH ₂ OH	(68)
6-epiTTX	H	OH	CH ₂ OH	OH	1/6 (39)
11-deoxyTTX	H	OH	OH	CH ₃	1/7 (37)
11-norTTX-6(R)-ol	H	OH	H	OH	1/7 (31)
11-norTTX-6(S)-ol	H	OH	OH	H	1/5 (23)
11-oxoTTX	H	OH	OH	CH(OH) ₂	(1.5)

*1 : <http://www.mhlw.go.jp/topic/syokuchu/poison/index.html>

*2 : 山下まり、臨床検査、53、707-711 (2009)、 K_0 : ラットシナプス膜との解離定数

図1 テトロドトキシン及び同族体の構造と毒性

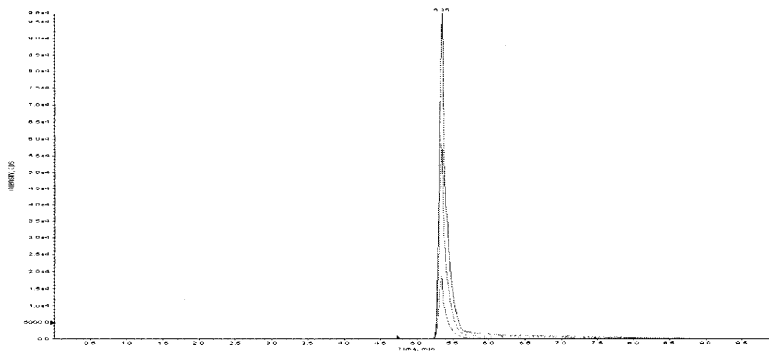
表2 LC分離カラム測定条件

	① (*1)	②	③						
装置	API 4000 Q Trap (ABSciex)								
カラム	Waters Atlantis HILIC, 3 μm 2.1 x 150 mm	Waters Xbridge Amide, 3.5 μm 2.1 x 150 mm	SeQuant ZIC-HILIC, 3.5 μm 2.1 x 150 mm						
移動相	A液:0.1%ギ酸水溶液 B液:アセトニトリル								
	時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
	0	5	95	0	60	40	0	70	30
	0.1	60	40	10	60	40	10	70	30
	6.0	60	40						
	6.1	85	15						
10.0	85	15							
流速	0.2 ml/min								
注入量	5 μL								
カラムオープン温度	40 °C								

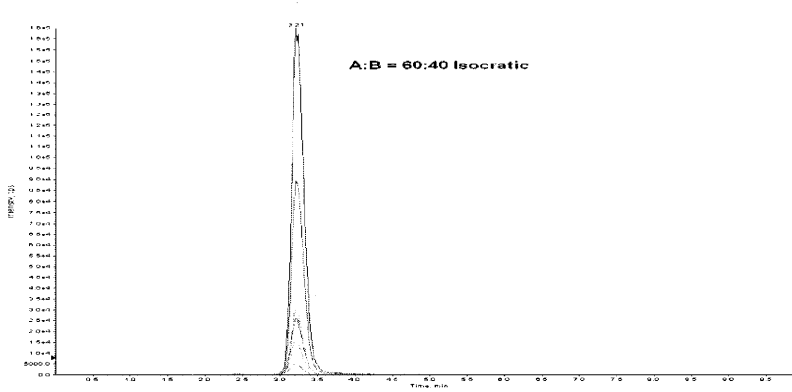
*1: 秦野真澄ら: 愛媛県衛生環境研究所年報, 8, 17-20 (2005)

表3 LC-MS/MSによるTTXの測定条件

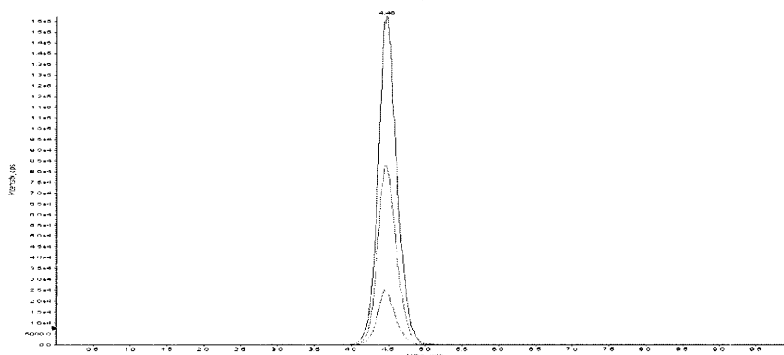
Q1(プリカーサーイオン)	Q3(プロダクトイオン)	DP (volt)	EP (volt)	CE (volt)	CXP (volt)
320.1	302.2	96	10	35	20
320.1	162.1	96	10	53	10
320.1	77.1	96	10	93	12



測定条件① (保持時間 : 5.35 min)



測定条件② (保持時間 : 3.21 min)



測定条件③ (保持時間 : 4.48 min)

図 2 3種類の LC 分離カラムによる LC-MS/MS クロマトグラム

表 4 LC-MS/MS 迅速試験法による TTX 測定結果

機関	平均値 (μg/g)	回収率 (%)	RSDr (%)	Z スコア
A	2.21	100	6.7	0.26
B	2.35	107	13.5	1.11
C	1.88	85.6	12.9	-1.68
D	2.07	93.9	4.4	-0.59
E	1.98	89.8	3.8	-1.13
F	1.85	84.0	2.0	-1.89
G	2.33	106	3.0	0.96
H	2.16	98.0	7.0	-0.05
I	2.36	108	8.2	1.19
J	2.12	96.2	18.6	-0.29
K	2.24	102	2.6	0.46
L	2.21	101	5.0	0.28
M	2.30	104	4.8	0.78
N	2.26	103	4.9	0.59
機関間	平均値 (μg/g)	回収率 (%)	RSDR(%)	HorRat
	2.16	98.4	10.7	0.8

表 5 LC-MS/MS 迅速試験法とマウス試験法による毒力 (MU) の比較検討結果

天然フグ	検査部位等	LC-MS/MS 法 (MU)	マウス法 (MU)	LC-MS/MS 法/マウス法
マフグ	皮	81	98	83%
マフグ	肝臓	246	241	102%
ゴマフグ	皮	20	23	87%
ゴマフグ	肝臓	79	73	108%
ヒガンフグ	皮	5	不検出	
ヒガンフグ	肝臓	8	10	80%
シマフグ	卵巣	192	293	66%
シマフグ	肝臓	266	356	75%
ナシフグ	皮	7	不検出	
ナシフグ	肝臓	7	5 未満	

平成22年度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

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究

分担研究報告書

研究分担者	群馬県衛生環境研究所	小澤 邦寿
研究協力者	産業医科大学	吉村 健清
	国立感染症研究所	八幡裕一郎
	東京都健康安全研究センター	中西 好子
		神谷 信行
		灘岡 陽子
	埼玉県衛生研究所	岸本 剛
		尾関由姫恵
	福岡県保健環境研究所	小野塚大介
	山口県環境保健センター	吹屋 貞子
	群馬県衛生環境研究所	田嶋久美子
		鈴木 智之

研究要旨

- 1) 地方衛生研究所（地衛研）における疫学機能の強化方法を検討することを目的として、近隣の地衛研とテーマを明確にした実務レベルでの相互派遣研修を行い、その組織的なサポートとして実務的疫学手法の研修会等を開催した。これらにより担当者のスキルアップと管理監督者等の理解を深め、近隣地方衛生研究所の疫学担当者間で情報交換と相互交流により連携した疫学機能強化のための人材育成の基盤形成ができると思われる。
- 2) 地方衛生研究所（地衛研）における疫学機能の強化方法を検討することを目的として、地衛研職員に質問票調査を実施した。広域事例が発生したとき、地方感染症情報センター担当者（担当者）は、近隣地自体の担当者に電話やメールで連絡を取りながら、情報を交換し、業務を進めていることが明らかになった。NESID上で情報を共有することが可能になれば、自治体の感染症対策が円滑に進み、予防啓発活動に利用できると考えている担当者が多くいるため、今後は、NESIDの情報が共有できることを希望する。
- 3) 地方感染症情報センター職員に対する研修会の実施の必要性やその内容などに対する需要を把握することを目的として質問票調査を実施した結果、「疫学」や「感染症サーベイランス」をテーマとした地方感染症情報センター職員に対する研修会には非常に大きな需要があることが確認された。研修会は「年に1回」、「年度上半期」もしくは「公衆衛生情報研究協議会」に併せて、「2-3日」以内の開催に対しての希望がそれぞれ多かった。また、ブロック単位で、かつ講義・グループワークの双方による研修が望まれている。研修会実施にはいくつかの課題が存在するが、即座に地方感染症情報センター担当者に対する継続的な研修会開催の準備を進めるべきである。