

# 感染症サーベイランスにおけるウイルス感染症（2020年度）

松本 文昭, 小嶋 裕子, 浦川 美穂, 田栗 利紹

## Annual Surveillance Report of Viral Infectious Diseases (2020)

Fumiaki MATSUMOTO, Hiroko OJIMA, Miho URAKAWA and Toshitsugu TAGURI

Key word : Surveillance, SFTS, Japanese spotted fever

キーワード: サーベイランス、風しん、重症熱性血小板減少症候群、日本紅斑熱

### はじめに

感染症発生動向調査（サーベイランス）は、1999年4月1日に施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（以下、感染症法）に基づき、県内の患者発生状況、病原体の検索等感染症に関する情報をITの活用により早期かつ的確に把握し、その情報を速やかに地域に情報還元（情報提供・公開）することにより、医療機関における適切な初期診断を推進することを目的に実施されている。その後、鳥インフルエンザ（H7N9）や中東呼吸器症候群（MERS）などの新たな感染症の海外における流行や、デング熱の国内感染例の発生<sup>1)</sup>など、昨今の感染症の発生状況、国際交流の進展、保健医療を取り巻く環境の変化等を踏まえ、感染症に対応する情報収集体制を一層強化するために、2014年11月21日に改正感染症法が公布され、さらに2015年9月の感染症法施行規則（省令）の改正に伴い、「長崎県感染症発生動向調査実施要綱」<sup>2)</sup>（以下、県要綱）の一部改正が行われた。

長崎県環境保健研究センターには改正された県要綱に基づき、県内の医療機関からウイルス性の感染症と診断された患者の検体が適宜採取、搬入されている。そこで、2020年度に搬入された検体について、ウイルス遺伝子の検索等を行ったのでその結果について報告する。

### 調査方法

#### 1 検査材料

検査材料は、2020年度に県内の医療機関においてウイルス性の感染症と診断された67名の患者か

ら採取された合計145検体を対象とした。これらの医療機関は、県要綱に基づき、保健所政令市（長崎市、佐世保市）、及び県立保健所管轄の10地域に基幹定点医療機関及び病原体定点医療機関として選定されている。臨床検体の採取部位の内訳は、咽頭ぬぐい液13検体、鼻腔ぬぐい液4検体、糞便（直腸拭い液を含む）7検体、血液48検体、血清39検体、髄液4検体、尿9検体、およびその他21検体であった。

#### 2 検査方法

改正された感染症法の施行に伴い、国立感染症研究所が発行した病原体検出マニュアルや参考文献等<sup>3-5)</sup>に準じて、検体の前処理、遺伝子検査、細胞培養、ウイルス分離・同定等について検査標準作業書を作成し、これらに基づき検査した。

### 調査結果及び考察

表1に疾病別の被検者数及び検体件数の内訳を示す。

#### 1 インフルエンザ（インフルエンザ様疾患を含む）

インフルエンザと診断された9名から採取された9検体（咽頭ぬぐい液5件、鼻腔ぬぐい液4件）に対するインフルエンザウイルスのRT-PCR検査の結果、8検体からインフルエンザウイルスの遺伝子が検出された。インフルエンザウイルスの亜型の内訳は、A/H1pdm09が4件、B/Victoriaが4件であった。2020年は、新型コロナウイルスの世界的な流行という特殊な状況下であり、例年

表 1 . 疾病別の被検者数及び検体件数内訳

疾病名	検査材料(内訳)									
	被検者数 (人)	検体数	咽頭拭い液	鼻腔拭い液	糞便 (直腸拭い液)	血液	血清	髄液	尿	その他
インフルエンザ	9	9	5	4						9
SFTS・リケッチア感染症	48	96				41	34			21
麻疹・風しん	2	5	1			2			2	5
無菌性髄膜炎	1	3				1		1	1	3
その他	7	32	7		7	4	5	3	6	32
計	67	145	13	4	7	48	39	4	9	21

と比べて極めて少ない搬入検体数であったが、流行を探知した際の迅速な注意喚起情報の提供等、まん延防止に向けた取り組みにつなげるために、引き続き保健所と協力しながら原因ウイルスの監視を継続していく。

## 2 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)、リケッチア感染症

SFTS、リケッチア感染症(つつが虫病および日本紅斑熱)を疑う患者検体は、48名分96検体が搬入された。これらの3疾患は、臨床症状等により区別することが困難であるため、検査項目を限定することができない。そのため長崎県では3疾患のうちいずれか一つの診断名であっても3項目の遺伝子検査を行っている。遺伝子検査については、SFTS ウイルス、*Orientia tsutsugamushi*、および *Rickettsia japonica* を対象として実施し、ペア血清による抗体価測定は *O. tsutsugamushi* と *R. japonica* を対象として検査を実施している。そのような体制で行われた検査結果を表2に示す。遺伝子検査の結果2名から SFTS ウイルス、13名から *R. japonica*、3名から *O. tsutsugamushi* の遺伝子が検出された。*O. tsutsugamushi* については、血清型別のため、ダイレクトシーケンスにより、56 kDa type specific antigen gene の部分配列を決定し、MEGA6.0<sup>5)</sup> を用いて近隣結合法<sup>6)</sup> による分子系統樹解析を行った。その結果、Kuroki, Kawasaki, Gilliam がそれぞれ1例ずつ検出された

(図1参照)。ペア血清による抗体価測定を行った10名のうち1名において *R. japonica* に対する特異的抗体価の陽転が認められた。

SFTS 及びリケッチア感染症は野外の藪や草むらに潜んでいる、病原体を保有しているマダニ類に咬まれることで感染が成立する。感染予防のためには咬まれないことが重要であり、具体的には長袖・長ズボンの着用や作業後の着替え、昆虫忌避剤の使用等があげられる。また、屋外活動後はシャワーや入浴で、マダニに刺されていないか確認を行なうことも重要である<sup>7)</sup>。

そのほか、無菌性髄膜炎が1名分3検体、麻疹・風しん疑いが2名分5検体搬入された。無菌性髄膜炎に関しては、病原体検出マニュアルに基づきエンテロウイルス (EVs) 遺伝子の検出を試みたが検出されなかった。麻疹・風しん疑いも病原体検出マニュアルに基づき、ウイルス遺伝子の検出を試みたが、両ウイルスともに検出されなかった。また、県要綱に規定されていない診断名(新生児発熱、心筋炎等)の患者検体7名分32検体が搬入され、EVs、ヒトパレコウイルスの検索を行ったが、いずれも検出されなかった。

## 謝 辞

感染症発生動向調査にご協力頂いた各定点医療機関及び協力医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました長崎市、佐世保市、県立各保健所の関係諸氏に深謝する。

表 2 . ダニ媒介感染症検査結果一覧

症例No.	性別	年齢	遺伝子検査	抗体検査	症例No.	性別	年齢	遺伝子検査	抗体検査
1	女	75	SFTSV	NT	25	男	66	-	NT
2	男	68	NT	-	26	女	76	-	NT
3	男	67	-	NT	27	女	66	R.j.	NT
4	女	28	-	NT	28	女	91	R.j.	NT
5	女	89	SFTSV	NT	29	男	70	-	NT
6	男	75	-	NT	30	女	16	NT	-
7	女	69	-	NT	31	女	81	O.t. (Gilliam)	NT
8	女	78	-	-	32	女	83	NT	R.j.
9	男	68	-	NT	33	男	81	R.j.	NT
10	男	51	-	-	34	女	60	-	NT
11	男	44	-	NT	35	男	58	R.j.	NT
12	女	43	R.j.	NT	36	女	77	R.j.	NT
13	女	61	R.j.	NT	37	男	82	-	NT
14	男	79	R.j.	NT	38	男	72	R.j.	NT
15	男	27	-	NT	39	女	57	R.j.	NT
16	男	70	R.j.	NT	40	男	69	-	NT
17	男	82	-	NT	41	女	92	R.j.	NT
18	男	23	-	NT	42	男	68	O.t. (Kawasaki)	NT
19	男	81	NT	-	43	男	23	-	NT
20	男	69	-	NT	44	男	67	NT	-
21	女	86	R.j.	NT	45	男	79	O.t. (Kuroki)	NT
22	男	88	-	NT	46	男	85	-	-
23	女	65	-	-	47	男	27	-	NT
24	女	82	NT	-	48	男	51	-	NT

SFTSV: SFTS ウィルス R.j.: *Rickettsia japonica* NT: Not tested - : Negative

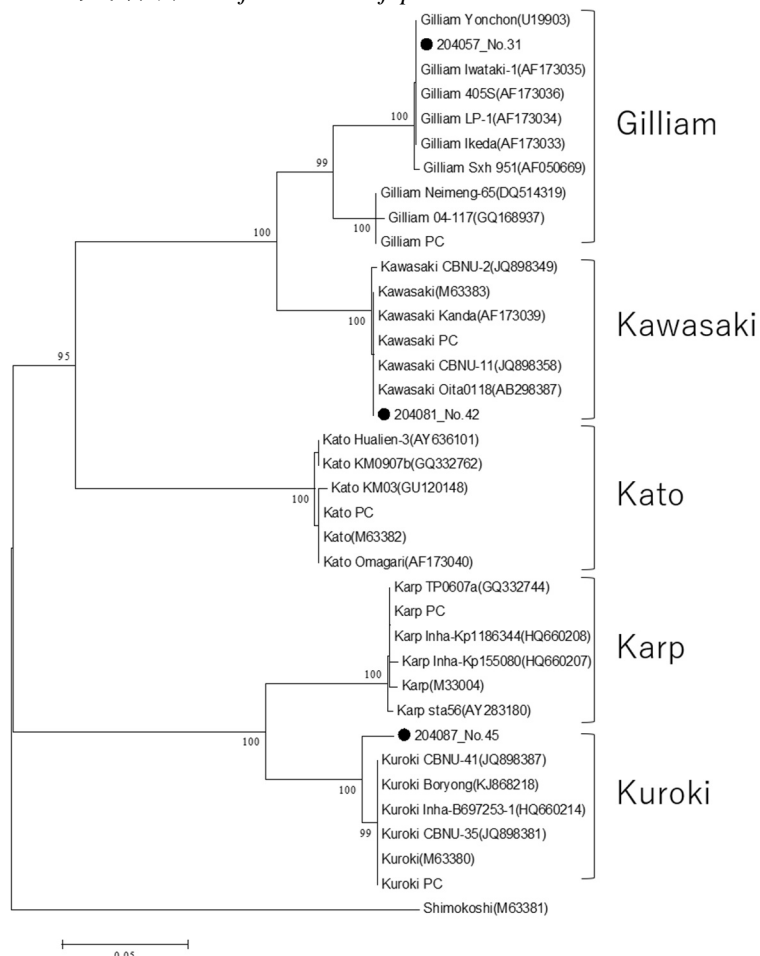


図 1 . *O.tsutsugamushi* 56kDa type specific antigen gene の分子系統樹  
 : 長崎県検出株 系統樹右側の表記が血清型

## 参 考 文 献

- 1) 関なおみ：代々木公園を中心とした都内のデング熱国内感染事例発生について, IASR Vol. 36 pp37-38: 2015年3月号
- 2) 長崎県感染症情報センター：長崎県感染症発生動向調査実施要綱,  
<https://www.pref.nagasaki.jp/bunrui/hukushi-hoken/kansensho/kansen-c/hasseidoukou/>  
(2021.7.14)
- 3) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル,  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>  
(2021.7.14).
- 4) 国立感染症研究所（厚生労働科学研究 新型
- インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の対応方法に関する研究」班）：SFTS ウイルス検出マニュアル,  
(2013).
- 5) Tamura K, *et al.*: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol Biol Evol*, **30**(12), 2725-29, (2013).
- 6) Saitou, N, *et al.*: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol Biol Evol*, **4**, pp406-425 (1987).
- 7) 国立感染症研究所：マダニ対策、今できること, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/sfts/2287-ent/3964-madanitaisaku.html> (2021.7.14)

# 長崎県における日本脳炎の疫学調査 (2020年度)

## 豚の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況調査

小嶋 裕子, 浦川 美穂, 松本 文昭, 田栗 利紹

## Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki (2020)

—Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus—

Hiroko OJIMA, Miho URAKAWA, Fumiaki MATSUMOTO and Toshitsugu TAGURI

キーワード：日本脳炎、アルボウイルス、豚感染、HI抗体陽性率

Key words: Japanese Encephalitis, Arbovirus, Swine Infection, HI Antibody Positive Rate

### はじめに

日本脳炎は極東から東南アジア・南アジア、オーストラリアにかけて広く分布しており、年間およそ68,000人の患者が報告されている<sup>1)</sup>。感染者の大多数は無症状に終わるが、発症すると定型的な脳炎を呈し、1～2日で40°C以上の高熱となり、頭痛、嘔吐、頸部硬直などの髄膜刺激症状が現れ、次いで意識障害、筋硬直、けいれん等の脳炎症状が出現する。致死率は約20%であり、回復してもその半数に精神障害、運動障害等の後遺症が残る。日本では、ワクチンの普及や媒介蚊の制御などにより1966年の2,017人をピークに患者数は減少しているが、毎年数例発生しており、2016年には本県においても4例の患者発生が報告されている。

日本脳炎はFlavivirus属に属する日本脳炎ウイルス (以下、JEV) に感染して起こる。JEVはコガタアカイエカが媒介するアルボウイルス (節足動物媒介性ウイルス) であり、「蚊 豚 (時にトリ) 蚊」のサイクルで生態環を形成している。ヒトはJEVに感染した豚から蚊を介して感染するが、JEV感染の終末宿主であり、ヒト-ヒト感染はない。そこで、厚生労働省では毎年夏に、豚の日本脳炎ウイルス抗体獲得状況から、間接的に日本脳炎ウイルスの蔓延状況を調べている。

本県では、厚生労働省の定めた感染症流行予測調査実施要領に基づいて、豚を対象とした感染源調査を実施するとともに、日本脳炎の発生予防とまん延防止を図ることを目的とした長崎県の「感染症

流行予測調査事業 (日本脳炎感染源調査) における注意喚起等実施要領」に基づき、豚血清からのJEV遺伝子の検出ならびに豚血清中の抗JEV-IgM抗体の測定を行っている。本年度の調査概要について報告する。

### 調査方法

#### 1 感染源調査

##### (1) 調査時期及び回数

6月上旬～9月下旬に計8回実施した。

##### (2) 調査対象及び検体

調査対象は、諫早市内で飼育され佐世保市と畜場に出荷された生後約6ヶ月の肥育豚80頭とし、調査対象の放血血液より得られた血清を検体とした。

##### (3) 調査事項

感染症流行予測事業検査術式に従い、JEV赤血球凝集抑制 (HI) 抗体の測定及び2-ME (2-Mercaptoethanol) 感受性抗体の測定を行った。

#### 2 JEV遺伝子検索

2020年度調査において、遺伝子検索は実施しなかった。

#### 3 JEVの分離

感染源調査で使用した豚血清について、Vero9013細胞に接種してJEVの分離を試みた。24ウェルマルチプレートに単層を形成させたVero9013細胞に維持培養液 (2%非働化胎児血清加Eagle MEM) 900 µLを加え、被検豚血清100 µLを2ウェル

表1 2020年度豚HI抗体陽性率および2-ME感受性抗体陽性率調査結果

採血 月日	採血 頭数	HI 抗体価 (倍)							HI抗体 陽性率 (%)	2-ME抗体 陽性率 (%)
		<10	10	20	40	80	160	320		
6/8	10	10							0	0
6/22	10	9	1						10	0
7/6	10	10							0	0
7/20	10	10							0	0
8/3	10	9		1					10	0
8/24	10	9	1						10	0
9/10	10	10							0	0
9/28	10	10							0	0

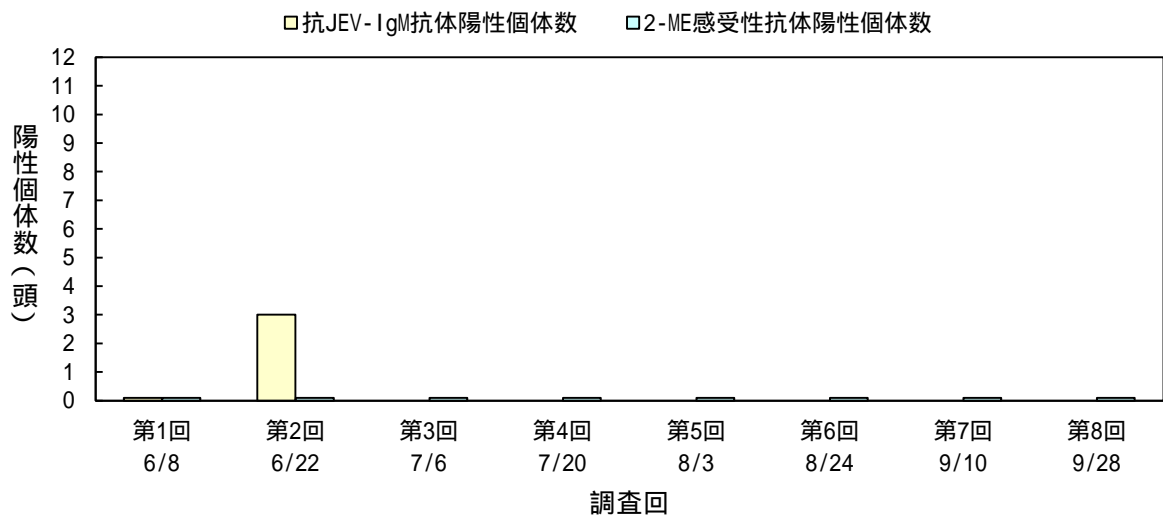


図1 豚の抗JEV-IgM抗体及び2-ME感受性抗体陽性個体数の推移  
抗JEV-IgM抗体測定は陽性個体が確認された第2回目調査回まで実施

ずつ接種、炭酸ガス培養器内で7日間培養して細胞変性効果 (CPE) の有無を判定した。CPEが観察されたウェルについては上記遺伝子検索法によりJEV分離を確認することとした。

4 抗JEV-IgM抗体測定

感染源調査で使用した豚血清を用いて、初感染の指標とされる抗JEV-IgM capture ELISAにより血清中の抗JEV-IgM抗体を測定した。ELISAの条件および抗JEV-IgM抗体陽性の判定基準等は既報に準じた<sup>2)</sup>。

調査結果及び考察

1 感染源調査

2020年度豚HI抗体陽性率及び2-ME感受性抗体

陽性率調査結果を表1に示す。

2020年度は、第2回目調査 (6月22日) でHI抗体陽性の豚が確認された。その後の調査でHI抗体陽性率は増加することなく、第5回目調査 (8月3日) および第6回目調査 (8月24日) において1頭ずつHI抗体陽性豚が確認されるだけであった。最近の感染の指標となる2-ME感受性抗体については、全調査回をとおして陽性豚は確認されなかった。

保毒蚊が生後4~6ヶ月の免疫のない豚を吸血することで豚はJEVに感染し、2~3日の潜伏期を経て約3日間持続するウイルス血症を起こす。このウイルス血症時に吸血した蚊がウイルスに感染し、10~13日の潜伏期を経てウイルスを媒介する<sup>3)</sup>。このことから2020年度本県ではJEVを保有した蚊が6月には活

動を既に開始していたと推察される。

2019年度と同じく今年度も7月以降におけるHI抗体陽性率の低さが目立った。夏季のJEV活動状況は種々の気候要因によって影響される<sup>4)</sup>が、気象庁のデータによると2020年諫早地区7月における日降水量1 mm以上の日数、月降水量はそれぞれ21日と1157 mmであり2019年7月の16日と517 mm、2018年7月の8日と421 mmに比べ多かった。また、9月の月降水量も448.5mmと多く、7月、9月の月降水量は過去10年で最多であった。

雨の影響により媒介蚊の活動が減少することがHI抗体陽性率の低さの要因の一つである可能性も考えられた。

例年調査開始時期が7月初旬であったが、2019年度調査より調査開始時期を6月上旬に早めて実施している。これにより、豚の日本脳炎ウイルス抗体獲得時期がわかり、日本脳炎ウイルスの蔓延状況をより正確に把握できるようになった。

#### 2 JEV遺伝子検索

今年度調査では遺伝子検索は実施しておらず、陽性豚の確認はしていない。

#### 3 JEVの分離

全調査対象豚からJEVは分離されなかった。

#### 4 抗JEV-IgM抗体測定

豚の抗JEV-IgM抗体および2-ME感受性抗体陽性数の推移を図1に示す。第2回目調査（6月22日）で3頭が抗JEV-IgM抗体陽性であった。今年度は陽性豚が確認された第2回目調査以降は抗JEV-IgM抗体測定は実施していない。第2回目調査（6月22日）で抗JEV-IgM抗体陽性豚が確認されたため、注意喚起等実施要領に基づき医療政策課へ報告した。

同じ第2回目調査で2-ME感受性抗体陽性豚が確認されていないことから、いち早くその地域におけるJEVに感染した蚊の活動を把握するうえでは、IgM capture ELISAによるIgM抗体検出がより有用であると考えられる。

### まとめ

- 1 2020年度は第2回目調査（6月22日）の1頭からHI抗体が最初に確認され、2-ME感受性抗体は全調査回を通して確認されなかった。抗JEV-IgM抗体陽性豚は第2回目調査（6月22日）に3頭最初に確認された。
- 2 全調査対象豚血清からJEVは分離されなかった。

### 謝辞と付記

感染症（日本脳炎）流行予測調査事業にご協力いただいた長崎県央農業協同組合、佐世保食肉センター株式会社及び佐世保市食肉衛生検査所の関係各位に感謝する。

### 参考文献

- 1) World Health Organization : Japanese encephalitis (2019), <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis> (2021.5.5アクセス)
- 2) 山下 綾香, 他: 長崎県環境保健研究センター所報63号, 103-107(2017)
- 3) 小早川 隆敏: 改定・感染症マニュアル, 株式会社マクガイヤ, 239~ 240(1999)
- 4) 倉根 一郎: 平成26年度\_環境研究総合推進費終了成果報告書(S-8-1(8))

## 食中毒における病因物質の概要 (2020年度)

高木 由美香, 右田 雄二, 蔡 国喜, 山口 結奈, 田栗 利紹

### Prevalence and Etiological Agents of Food Poisoning in Nagasaki (2020)

Yumika TAKAKI, Yuji MIGITA, Guoxi CAI, Yuina Yamaguchi  
and Toshitsugu TAGURI

キーワード：食中毒, カンピロバクター・ジェジュニ, ノロウイルス, 黄色ブドウ球菌, アニサキス  
Key words: Food poisoning, *Campylobacter jejuni*, Norovirus, *Staphylococcus aureus*, Anisakis

#### はじめに

1997年5月30日の食品衛生法施行規則の改正でノロウイルス(2003年8月29日同規則改正で小型球形ウイルスから名称変更)及びその他のウイルスと腸管出血性大腸菌(VT産生)が、1999年12月28日には同規則改正によりコレラ菌、赤痢菌、チフス菌、パラチフスA菌が、2012年12月28日にはクドア、ザルコシスティス、アニサキス及びその他の寄生虫が食中毒事件票に病因物質として追加された。これらの施行規則の改正により、ウイルス性食中毒が位置づけられるとともに、コレラ菌等の4菌種についても飲食に起因する健康被害発生時は、他の食中毒病因物質と同じ措置がとられるようになった。

本報告では、2020年度に発生した本県食中毒事例で検出された病因物質について報告する。

#### 調査方法

長崎県生活衛生課が取りまとめた2020年度の食中毒発生状況(長崎市及び佐世保市の発生届出分含む)により、主要病因物質(細菌、ウイルス、寄生虫、自然毒及び化学物質等)ごとに事件数及び患者数を集計した。

各々の食中毒事例について、患者からの聞き取り情報、喫食状況及び細菌検査情報を県内の所轄保健所から収集した。

#### 結果及び考察

長崎県内では5事例の食中毒の発生があった。発生事例の内訳を表1に示した。

##### 1 細菌性食中毒

細菌性食中毒は、カンピロバクター属菌によるものが1事例、黄色ブドウ球菌によるものが1事例発生した。

カンピロバクター属菌による食中毒は、県央保健所管内(事例No.1)で1事例発生した。本事例については、当センターで検査を実施した。有症者4名の検体が搬入され、すべてからカンピロバクター・ジェジュニが検出された。調理従事者3名からカンピロバクター属菌は検出されなかった。

黄色ブドウ球菌による食中毒は、対馬保健所管内で1事例発生した(事例No.3)。当センターに有症者便、従事者便、食材が搬入され、検査を実施した。有症者便13名中10名、食材から黄色ブドウ球菌が分離された。食材は共通食であった弁当の5区画中2区画から黄色ブドウ球菌が検出された。陽性となった12検体中10検体から分離された黄色ブドウ球菌は、エンテロトキシンA型、コアグラゼ型であった。本事例は飲食店で製造され、自治会から敬老の祝いに配布された弁当が原因と断定された。



表 1 長崎県内の食中毒発生状況および病因物質 ( Apr.2020 ~ Mar.2021 )

事例 No.	発生年月日	発生場所	摂食者数	患者数	原因施設	原因食品	病因物質	検出数 / 検体数	検体 (由来)	備考
1	2020/7/19	大村市	7	7	飲食店	7/18に提供された食事	カンピロバクター・ジェジュニ	4/4 0/3	有症者便 従事者便	
2	2020/8/1	長崎市	不明	1	不明	不明	アニサキス			医療機関で患者からアニサキスを抽出
3	2020/9/26	対馬市	53	25	飲食店	9/26に提供された弁当	黄色ブドウ球菌	10/13 0/5 2/5	有症者便 従事者便 食材	弁当内の食品14品を区画ごとに分け5検体とした
4	2020/12/16	川棚町	1479	90	飲食店	不明	ノロウイルス G .4	8/11 2/9	有症者便 従事者便	
5	2021/1/25	長崎市	3	1	不明	不明	アニサキス			医療機関で患者からアニサキスを抽出

本表は、県民生活部生活衛生課の食中毒発生状況一覧表（長崎市、佐世保市発生分含む）から作成した。病因物質の検出数は、環境保健研究センター保健科対応事例のみとした。

## 2 ウイルス性食中毒

ノロウイルスによる食中毒は、県央保健所管内（事例No.4）で1事例発生した。原因と推定された弁当の製造をした施設は県央保健所管内の飲食店であったが、有症者は佐世保市や西彼保健所管内でも探知された。県央保健所から調理従事者9名および有症者2名、西彼保健所から有症者9名の検体が搬入され、当センターで検査を実施した。その結果、有症者11名中8名および従事者9名中2名からノロウイルスG .4が検出された。10名から得られた増幅産物のシーケンス解析を行った結果、解析可能であった塩基配列は10名ですべて一致した。

## 3 寄生虫性食中毒

アニサキスによる食中毒は長崎市保健所管内で2

事例発生した。いずれも医療機関でアニサキスが確認された。

また、3月にクドア・セプトエンピクタータ(以下クドア)による食中毒を疑う事例について、有症者およびヒラメの検体が搬入された。有症者便からクドアの遺伝子は検出されず、ヒラメは顕微鏡検査陰性、遺伝子検査結果は $4 \times 10^4 \text{コピ}^{-1}/\text{g}$ (陽性は $10^7 \text{コピ}^{-1}/\text{g}$ 以上)で陰性であった。

## 謝 辞

本調査を遂行するにあたり、種々の情報を提供していただいた長崎県生活衛生課、長崎市保健環境試験所、長崎市、佐世保市及び長崎県立各保健所の関係各位に深謝する。

# 長崎県環境保健研究センターにおける新型コロナウイルス検査の概要 (2020年度)

松本 文昭, 浦川 美穂, 小嶋 裕子  
右田 雄二, 蔡 国喜, 高木 由美香, 川野 みどり, 田栗 利紹

## Overview of Testing for SARS-CoV-2 in Nagasaki Prefectural Institute of Environment and Public Health (2020)

Fumiaki MATSUMOTO, Miho URAKAWA, Hiroko OJIMA  
Yuji MIGITA, Guoxi CAI, Yumika TAKAKI, Midori KAWANO, Toshitsugu TAGURI

キーワード : SARS-CoV-2, 新型コロナウイルス感染症, 市中肺炎  
Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, Community-acquired pneumonia

### はじめに

2019年12月に中国湖北省で発生したSARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) による新型コロナウイルス感染症 (Coronavirus disease of 2019: COVID-19) は、その後、世界各地に広がり、世界的なパンデミックとなった。さらに、SARS-CoV-2は変異を繰り返し、感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念されるSARS-CoV-2の変異株(Variant Of Concern) =VOC) が出現し、それらによる感染伝播が各国で広がっている<sup>1)</sup>。COVID-19は、主に飛沫感染・接触感染を通じて広がり、1-14日間の潜伏期間を経て、発熱や呼吸器症状、全身倦怠感等で発症する<sup>2)</sup>。初期症状はインフルエンザや感冒と似ており、発症初期にこれらの疾患と区別するのは困難である<sup>3)</sup>ため、抗原検査や遺伝子検査による検査診断が重要となる。当センターでは既報<sup>4)</sup>のとおり2020年2月から行政検査対応を開始しており、ここでは、我が国においてCOVID-19の本格的な流行がはじまった2020年4月以降の検査結果について報告する。

### 材料および方法

#### 1 供試検体

2020年4月1日から2021年3月31日までに、長崎県内でCOVID-19を疑われた者およびCOVID-19患者発生に伴う積極的疫学調査の一環として行われた接触者調査において、保健所長が検査を必要とする判断した者を調査対象とした。調査対象者から採取された鼻咽頭ぬぐい液等の上気道由来検体、

喀痰等の下気道由来検体を検査材料とした。それらの検体は、医療機関や保健所において採取され、主治医や保健所長が臨床症状等を記載した検査票を付して、保健所職員により当センターに搬入された。そのようにして集められた延べ10,381名分の10,665検体を検査に供した。尚、検査検体には、陽性者の陰性確認検査も含まれていた。

また、2020年末から日本国内において、海外渡航歴のない者からのVOCの検出報告が増加したことから、長崎県においても2021年2月26日からVOC1, 2, 3に共通するSpike proteinの501番目のアミノ酸変異(N501Y)を検出する変異株PCRの検査系を整備し、県内で検出された陽性事例に対するスクリーニング検査を開始した。当該検査のために収集された57名分57検体を変異株スクリーニング検査に供した。

#### 2 検体検査

##### (1) 検体前処理

採取検体のうち鼻咽頭拭い液等の上気道由来検体は、10秒間ボルテックスした後の懸濁液を2.0 mLスクリューキャップチューブに移し、12,000 rpm, 15 min.の条件で遠心処理を行い、細胞成分を除去した上清140  $\mu$ LをRNA抽出に供した。

喀痰検体は、1~3倍量の滅菌済PBS (-) を添加後、ボルテックスにより懸濁させ、2.0 mLスクリューキャップチューブに移した後、15,000 rpm, 30 min.の条件で遠心処理を行い、細胞成分を除去した上清140  $\mu$ LをRNA抽出に供した。

## (2) RNA抽出

QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いて、添付文書に基づき精製操作を行い、キットに同梱されているBuffer AVEにより溶出した60 µLのRNA抽出液をPCR検査に供した

## (3) PCR検査

新型コロナウイルス検出マニュアル<sup>4)</sup>に記載されたプライマーおよびプローブを用いて、real time PCR法によるSARS-CoV-2の遺伝子検出を実施した。PCR 試薬は、FastVirus 1-step RT-PCR mix (ThermoFisher) を用いた反応を行い、40サイクル以内に増幅曲線の立ち上がりを確認できた検体を陽性と判定した。

## (4) N501Y変異株PCR検査

国立感染症研究所より例示された「リアルタイム one step RT-PCR 法による SARS-CoV-2 Spike N501Y変異の検出」に示されたプライマーおよびプローブを用いて、FastVirus 1-step RT-PCR mix (ThermoFisher) による反応を行い、N501Y変異の有無を判定した。

## 結 果

調査期間中に搬入された10,381名分10,665検体のうち、220名分302検体からSARS-CoV-2の遺伝子が検出された。尚、302検体のうち73検体は陽性者の陰性確認検査であった。陽性者の内訳は、何らかの症状を呈した「患者」が172名、特に症状が確認されなかった「無症状病原体保有者」が48名であった。

変異株PCR検査のために収集された57名分57検体を調査した結果、3名分3検体からN501Y変異を有するSARS-CoV-2の遺伝子を検出した。53名の検体からはN501Y変異は検出されず、1名は遺伝子量が極めて少ないため判定不能であった。陽性となった3名のうち2名は国立感染症研究所においてVOC1 (アルファ型)と同定され、残る1名は遺伝子量が極めて少なかったため解析不能であった。

## 考 察

2020年度に当センターで実施したCOVID-19にかかる行政検査において陽性となった288名のうち無症状者が212名と7割を占めていた。これは、医療機関や民間検査センターのCOVID-19検査能力の拡充に伴い、当センターに搬入される主な検体が、接

触者調査で採取された無症状者に由来するものが多くなった影響と考えられた。

2021年6月現在も、感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念されるSARS-CoV-2の変異株 (VOC) の感染者が世界各地から継続して報告されており、国内においても渡航歴のない者や、渡航者と疫学的関連がない者からの新規変異株感染者が報告されている状況にある<sup>6)</sup>。新たな変異株の出現・流行に備えて、それらを迅速に検出可能な検査体制を維持していくことが必要と考えられた。

## 謝 辞

COVID-19疑い例調査にご協力頂いた各医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました佐世保市、県立各保健所並びに各振興局等の関係諸氏に深謝する。

## 参 考 文 献

- 1) World Health Organization, Tracking SARS-CoV-2 variants, <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (2021.7.14)
- 2) 国立感染症研究所 感染症疫学センター: 〈注目すべき感染症〉新型コロナウイルス感染症 (COVID-19), IDWR 2020年第23号
- 3) 令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業 一類感染症の患者等の発生に備えた臨床的対応に関する研究班: 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の診療の手引き 第2.1版, p6
- 4) 長崎県環境保健研究センター所報 65, (2019) 資料, 長崎県環境保健研究センターにおける新型コロナウイルス検査の概要, <https://www.pref.nagasaki.jp/shared/uploads/2021/03/1614836793-1.pdf> (2021.7.14)
- 5) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-2020-04-14-10-09-54.html>
- 6) 国立感染症研究所 感染症疫学センター: IDWR 2021年第25号〈注目すべき感染症〉 直近の新型コロナウイルス感染症およびRSウイルス感染症の状況

# 長崎県における三類感染症の発生状況の概要 (2020年度)

右田 雄二, 高木 由美香, 蔡 国喜, 田栗 利紹

## Occurrence of Category III Infectious Diseases in Nagasaki (2020)

Yuji MIGITA, Yumika TAKAKI, Guoxi CAI and Toshitsugu TAGURI

キーワード: 腸管出血性大腸菌、MLVA法

Key words: EHEC, MLVA

### はじめに

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」により三類感染症に分類される。コレラ、細菌性赤痢、腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) 感染症、腸チフスおよびパラチフスについては、感染源の究明と感染拡大防止のため、長崎県感染症発生動向調査事業に基づき、菌の検索および疫学調査を実施している。今回、2020年度に長崎県内で発生した三類感染症の発生状況および分離同定された菌株に対する分子疫学解析結果をまとめたので報告する。

### 調査方法

#### 1 発生状況

2020年度に長崎県において医師の届出に基づき感染症サーベイランスシステムに報告された三類感染症について取りまとめた。

#### 2 分子疫学解析

県立保健所管内および佐世保市保健所管内で発生した腸管出血性大腸菌感染症から分離同定されたEHECについては当センターにて血清型別、Vero毒素検査 [Polymerase Chain Reaction (PCR) 法、real-time PCR法もしくはReversed Passive Latex Agglutination (RPLA) 法] を実施、確認後、分子疫学解析のため国立感染症研究所 (以下、感染研) に送付し、解析結果の還元を受けた。

感染研では、2014年シーズンより EHEC O157、O26、およびO111について、2017年からはO103、O121、O145、O165およびO91の菌株について反復配列多型解析法 (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis, MLVA)<sup>1)</sup>による解析を開始している。これらの8血清型以外の菌株については、パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel

Electrophoresis, PFGE) 法によるRFLP解析を実施している。

### 結果および考察

#### 1 発生状況

長崎市保健所、佐世保市保健所および各県立保健所 (西彼、県央、県南、県北および壱岐) に届出された三類感染症は、EHECが113件であった。

長崎県内EHEC感染症の月別届出件数は、2020年4月2件、5月2件、6月11件、7月15件、8月34件、9月15件、10月4件、11月2件、12月3件、2021年1月1件および2月1件と推移し、患者の8割は夏期 (6~9月) に集中していた。届出のうち有症者は3割 (34件) と低かったが、これは二次感染者の大部分が発症することなく無症状であったためである (図1)。

年齢階級別にEHEC感染状況をみると、9歳未満が73件で全体の6割を超えていた (図2)。

管轄保健所地域別にみると、西彼1事例1件、県央3事例3件、県南12事例67件、県北3事例4件、壱岐8事例11件、佐世保市4事例4件および長崎市4事例23件であった。今年度は県南地域のEHECの患者発生が多く、感染者10名を超える保育施設の集団感染が2事例 (No.7、12) みられた。長崎市においても1事例 (No.35) の保育施設の集団感染事例が発生した (表1)。

EHECのO血清型別については、O157が48件、O103が25件、O121が19件、O26が7件、O111が5件みられ、O3、O5、O112ac、O115、O118、O150、O152、O182およびO183はそれぞれ1件であった (表1)。

#### 2 分子疫学解析

MLVA法ではリピート数が完全に一致すると「密接に関連する」と解釈され、相違する部位数が1部位

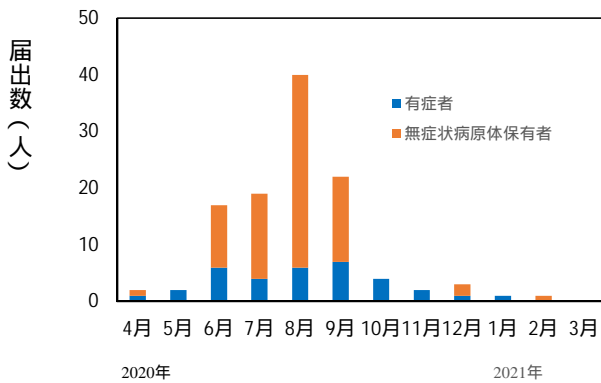


図1 EHEC月別届出件数

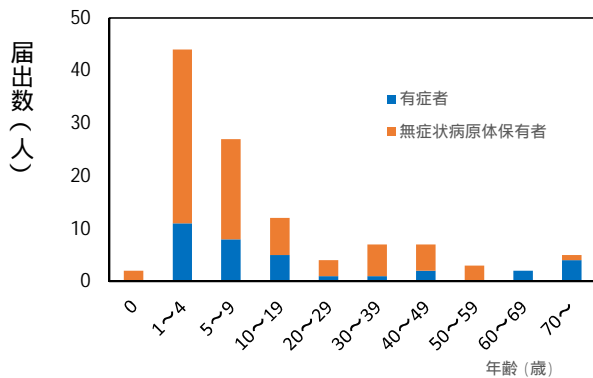


図2 EHEC年齢階級別届出件数

であると「関連の可能性有り」となり、PFGEで言う1～3バンド違いと近い考え方になる<sup>2)</sup>。EHECのMLVA解析結果を事例ごとに表1に示す。O157、O26、O111、O103およびO121については解析済みMLVA型を示し、他県での分離株も含めてMLVA法で相違する部位数が1部位である株 (Single locus variant, SLV) 同士については、まとめて同一MLVA complexとされMLVA型とともに示した。他自治体とMLVA型が一致もしくは類似する菌株の場合はコメントとして示した。

2020年度に県内で発生したEHEC感染症35事例のうち、分子疫学的に他の自治体と一致もしくは類

似するEHECが分離されたのはNo.1、3、8、14、17、26、30および35の8事例あった。2020年7月、長崎市の保育園O121集団事例 (No.35) については、同年7月に県北 (No.17) や福岡市でも同じMLVA遺伝子型「17m5022」が確認された。2020年9月、佐世保市のO103散发事例 (No.30) についても、同年5～12月にかけて国内で広域に同じMLVA遺伝子型「18m4005」の株が分離されたが、明確な疫学的関連性は確認されなかった。

県内で見ると、異なる事例と扱われた2020年8～9月に発生した県南O103の3事例 (No.9、11および13) は同じMLVA型「20m4028」であった。同様に2020年6月に発生した壱岐O111の2事例 (No.21および22) も同じMLVA型「20m3013」であった。これらの事例については、感染源が共通である可能性もあるが、分解能の低い血清型もあるため、患者間の接触歴や共通食材の喫食などの疫学的リンクの確認が必要不可欠である。

PFGE法やMLVA法において遺伝子型が一致する株においては、分離地が異なっても発生時期が近い場合、共通の感染源の存在が疑われる。今後、集団感染事例や広域散发事例の可能性を探知する上で、PFGE法やMLVA法の解析結果を早期に還元し、感染症や食中毒の原因究明並びに拡大防止に努めることは重要と考える。

### 謝 辞

本調査を遂行するにあたり、情報を提供いただいた長崎市、長崎県立各保健所および長崎市保健環境試験所の担当者、並びに長崎県医療政策課感染症対策班の担当者に深謝する。

### 参 考 文 献

- 1) Izumiya H, et al., Microbiol Immunol 54: 569-577, (2010).
- 2) Ishihara T, et al., IASR Vol.35:129-130, 2014

表1 2020年度長崎県において分離された腸管出血性大腸菌株

事例No.	管轄保健所	発生時期	発生規模	血清型	毒素型	菌株数	解析結果		
							MLVA型 ( )	MLVA complex	コメント
1	西彼	2020年7月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	20m0287 (1)		2020年8月(埼玉)の分離株と一致
2		2020年7月	散発	O157:H7	VT1 VT2	1	16m0206 (1)		
3	県央	2020年8月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	20m0310 (1)	20c031	2020年8月(福岡)、9月(大分)の分離株と類似
4		2021年2月	散発	O3:H8	VT1	1			佐賀県分離株と類似(PFGEによるRFLP解析)
5		2020年6月	散発(保育園)	O157:H-	VT1 VT2	5	20m0057 (5)		
6		2020年8月	散発(保育園)	O157:H7	VT2	9	20m0305 (9)		
7		2020年8月	集発(保育園)	O157:H7	VT2	24	20m0306 (20) 20m0307 (1) 20m0309 (1) 20m0308 (2)	20c032 20c032 20c032	
8		2020年8月	散発	O121:H19	VT2	1	18m5007 (1)		2020年1月(鹿児島県)、6月(徳島県)の分離株と一致
9		2020年8月	散発(家族内)	O103:H2	VT1	3	20m4028 (3)		
10	県南	2020年8月	散発	O152:H8	VT1	1			
11		2020年9月	散発(家族内)	O103:H2	VT1	2	20m4028 (2)		
12		2020年9月	集発(保育園)	O103:H2 O183:H18	VT1 VT1	14 1	20m4029 (14)		
13		2020年9月	散発(家族内)	O103:H-	VT1	2	20m4028 (2)		
14		2020年10月	散発	O157:H-	VT1 VT2	1	20m0375 (1)		2020年10月(久留米市)の分離株と一致
15		2020年11月	散発	O157:H7	VT2	1	20m0445 (1)		
16		2020年12月	散発(家族内)	O157:H7	VT2	3	20m0446 (3)		
17		2020年7月	散発	O121:H19	VT2	1	17m5022 (1)		2020年7月(福岡市、長崎市)の分離株と一致
18	県北	2020年9月	散発(接触あり)	O103:H-	VT1	2	20m4030 (2)		
19		2021年1月	散発	O103:H-	VT1	1	21m4001 (1)		
20		2020年6月	散発(家族内)	O111:H-	VT1	2	20m3012 (2)		
21		2020年6月	散発	O111:H-	VT1	1	20m3013 (1)	20c303	
22		2020年6月	散発(家族内)	O111:H-	VT1	2	20m3013 (1) 20m3021 (1)	20c303	
23	壱岐	2020年6月	散発(家族内)	O150:H2 O182:H25	VT1 VT2 VT2	1 1			
24		2020年7月	散発	O118:H16	VT1	1			
25		2020年10月	散発	O115:H10	VT1	1			
26		2020年10月	散発	O26:H11	VT1	1	19m2010 (1)		2020年8月(奈良県)の分離株と一致
27		2020年10月	散発	O5:H-	VT1	1			
28		2020年5月	散発	O157:H-	VT2	1	20m0056 (1)		
29		2020年6月	散発	O112ac:H16	VT2	1			
30	佐世保市	2020年9月	散発	O103:H-	VT1	1	18m4005 (1)		2020年5月(愛媛県)、6月(福岡市、大分県)、7月(大分県)、8月(愛知県、堺市)、9月(佐賀県、横浜市)、12月(群馬県)の分離株と一致
31		2020年11月	散発	O157:H7	VT1 VT2	1	20m0444 (1)		
32		2020年4月	散発(家族内)	O26:H11	VT1	2	20m2025 (2)		
33	長崎市	2019年5月	散発	O121:H19	VT2	1	19m5033 (1)		
34		2020年6月	散発(保育園)	O26:H-	VT1	4	20m2035 (4)		
35		2020年7月	集発(保育園)	O121:H19	VT2	16	17m5022 (16)		2020年7月(福岡市、長崎県)の分離株と一致

\* 集発：感染者10名以上      \*\* MLVA型：( )内は菌株数

# 農産物中の残留農薬の検査結果 (2020 年度)

吉村 裕紀, 谷口 香織, 辻村 和也

## Survey of Pesticide Residues in Agricultural Products (2020)

Hiroki YOSHIMURA, Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: 残留農薬、一斉分析、農産物

Key words: Pesticide residues, Simultaneous determination, Agricultural products

### はじめに

長崎県食品衛生監視指導計画に基づき、県内で流通する農産物中の残留農薬検査を実施した。

### 調査方法

#### 1 試料及び試薬

表 1 に示す 55 試料について検査を行った。なお、みかんについては果皮を除いたもののみ検査した。

農薬標準溶液は、関東化学製農薬混合標準溶液 48、54、58、63、70、77、78 及び 79 を使用した。試薬に関しては、超純水及びメタノールは関東化学製の LC/MS 用、試料の前処理に用いたアセトニトリル、アセトン、ヘキサン及びトルエンは関東化学製の残留農薬試験・PCB 試験用(5000 倍濃縮)、その他の試薬は残留農薬試験用又は特級を用いた。検体の前処理における精製には、スペルコ製 ENVI-Carb/LCNH2 (500 mg/500 mg、6 mL)を用いた。

#### 2 検査対象農薬

検査対象農薬は、表 2 に示す 232 農薬の中から農産物の種類に応じ A~H のグループ分けをし、171~201 農薬を選択した。報告下限値はアセタミプリドのみ 0.05 ppm、他は全て 0.01 ppm とした。

#### 3 装置

(1) ガスクロマトグラフタンデム質量分析法 (GC/MS/MS)

島津製作所製 GCMS-TQ8040 を使用した。

(2) 液体クロマトグラフタンデム質量分析法 (LC/MS/MS)

LC 部は株式会社島津製作所製 LC-10ADvp システム、MS/MS 部は株式会社エービー・サイエックス製 API2000 を使用した。

#### 4 分析方法

分析は、厚生労働省通知<sup>1)</sup>「GC/MS による農薬等の一斉分析法(農産物)」及び「LC/MS による農薬等の一斉分析法 I(農産物)」に準じて行った。

### 検査結果

2020 年度残留農薬検査の結果、農薬を検出した農産物の一覧を表 3 に示す。全 55 試料のうち 17 試料から報告下限値以上の農薬が検出された。うち 1 試料(県産まくわうり)については当該農産物に適用のないエトフェンプロックス 0.01 ppm が検出されたものの、全ての試料が食品衛生法に基づく残留基準値以内であった。

### 参考文献

1) 食安発第 1129002 号 厚生労働省医薬食品局食品安全全部長通知“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(一部改正).” (2015 年 11 月 29 日)。

表 1 検査対象農産物

区分	検査項目 グループ	農作物名	検体数	区分	検査項目 グループ	農作物名	検体数
県内産	A	かんしょ	3	県外産	A	かんしょ	1
		さといも	3			だいこんの根	1
		ばれいしょ	14		C	なす	1
	B	みかん <sup>1</sup>	1			ニガウリ	1
		C	かぼちゃ		1	D	にんじん
	きゅうり		9		H		キャベツ
	トマト		6				
	なす		1				
	ニガウリ		3				
	D	にんじん	4				
	F	まくわうり	1				
	他	未成熟メロン	1				

1 一部の農薬については検査対象外とした(残留基準値が果皮を含むもの対象となったため)

表 2 検査対象農薬

No	項目名	機器	A	B	C	D	E	F	G	H	他
			根菜	酸性 果実	なす 科 り科	にん じん	かん きつ 類	その 他果 実類	葉菜 緑黄 色	葉菜 淡色	グル ープ 外
1	1,1-ジクロロ-2,2-ビス (4-エチルフェニル)エタン	GC									
2	2-(1-ナフチル)アセタミド	GC									
3	EPN	GC									
4	XMC	GC									
5	アザコナゾール	GC									
6	アジンホスメチル	GC									
7	アセタミプリド	GC									
8	アセトクロール	GC									
9	アゾキシストロピン	LC									
10	アトラジン	GC									
11	アニロホス	GC									
12	アメトリン	GC									
13	アラクロール	GC									
14	イサゾホス	GC									
15	イソキサチオン	GC									
16	イソフェンホス	GC									
17	イソプロカルブ	GC									
18	イソプロチオラン	GC									



No	項目名	機器	A 根菜	B 酸性 果実	C なす 科う り科	D にん じん	E かん きつ 類	F その 他果 実類	G 葉菜 緑黄 色	H 葉菜 淡色	他 グル ープ 外
19	イプロバリカルブ	LC									
20	イプロベンホス	GC									
21	イマザリル	LC									
22	イミダクロプリド	LC									
23	イミベンコナゾール	GC									
24	インダノファン	LC									
25	ウニコナゾール P	GC									
26	エスプロカルブ	GC									
27	エタルフルラリン	GC									
28	エチオン	GC									
29	エディフェンホス	GC									
30	エトキサゾール	GC									
31	エトフェンブロックス	GC									
32	エトフメセート	GC									
33	エトプロホス	GC									
34	エボキシコナゾール	LC									
35	エンドスルファンスルファート	GC									
36	オキサジアゾン	GC									
37	オキサジキシル	GC									
38	オキサジクロメホン	LC									
39	オキシカルボキシ	LC									
40	オキシフルオルフェン	GC									
41	カズサホス	GC									
42	カフェンストロール	GC									
43	カルバリル	LC									
44	カルフェントラゾンエチル	GC									
45	カルボフラン	LC									
46	キナルホス	GC									
47	キノキシフェン	GC									
48	キノクラミン	GC									
49	キントゼン	GC									
50	クレソキシムメチル	GC									
51	クロチアニジン	LC									
52	クロマゾン	GC									
53	クロマフェノジド	LC									
54	クロルタールジメチル	GC									
55	クロルピリホス	GC									
56	クロルピリホスメチル	GC									
57	クロルフェナピル	GC									

No	項目名	機器	A 根菜	B 酸性 果実	C なす 科う り科	D にん じん	E かん きつ 類	F その 他果 実類	G 葉菜 緑黄 色	H 葉菜 淡色	他 グル ープ 外
58	クロルフェンソク	GC									
59	クロルフェンビンホス	GC									
60	クロルブファム	GC									
61	クロルプロファム	GC									
62	クロロクスロン	LC									
63	クロロベンジレート	GC									
64	シアナジン	GC									
65	シアノホス	GC									
66	ジウロン	LC									
67	ジエトフェンカルブ	GC									
68	ジクロシメット	GC									
69	ジクロトホス	GC									
70	ジクロフェンチオン	GC									
71	ジクロホップメチル	GC									
72	ジクロラン	GC									
73	シニドンエチル	GC									
74	シハロホップブチル	GC									
75	ジフェナミド	GC									
76	ジフェノコナゾール	GC									
77	シフルフェナミド	LC									
78	ジフルフェニカン	GC									
79	シプロコナゾール	GC									
80	シマジン	GC									
81	シメコナゾール	LC									
82	ジメタメトリン	GC									
83	ジメチピン	GC									
84	ジメチルピンホス	GC									
85	ジメテナミド	GC									
86	ジメトエート	GC									
87	ジメトモルフ	LC									
88	シメトリン	GC									
89	ジメピベレート	GC									
90	シラフルオフェン	GC									
91	スピロキサミン	GC									
92	スピロジクロフェン	GC									
93	ターバシル	GC									
94	ダイアジノン	GC									
95	チアクロプリド	LC									
96	チアベンダゾール	LC									

No	項目名	機器	A	B	C	D	E	F	G	H	他
			根菜	酸性 果実	なす 科 り科	にん じん	かん きつ 類	その 他果 実類	葉菜 緑黄 色	葉菜 淡色	グル ープ 外
97	チオベンカルブ	GC									
98	チフルザミド	GC									
99	テトラクロルピホス	GC									
100	テトラコナゾール	GC									
101	テトラジホン	GC									
102	テニルクロール	GC									
103	テブコナゾール	GC									
104	テブフェノジド	LC									
105	テブフェンピラド	GC									
106	テフルトリン	GC									
107	テルプトリン	GC									
108	トリアジメノール	GC									
109	トリアジメホン	GC									
110	トリアゾホス	GC									
111	トリアレート	GC									
112	トリシクラゾール	GC									
113	トリデモルフ	LC									
114	トリブホス	GC									
115	トリフルムロン	LC									
116	トリフルラリン	GC									
117	トリフロキシストロピン	GC									
118	トルクロホスメチル	GC									
119	トルフェンピラド	GC									
120	ナプロバミド	GC									
121	ニトロタールイソプロピル	GC									
122	ノバルロン	LC									
123	ノルフルラゾン	GC									
124	パクロブトラゾール	GC									
125	パラチオン	GC									
126	パラチオンメチル	GC									
127	ハルフェンプロックス	GC									
128	ピコリナフェン	GC									
129	ピテルタノール	GC									
130	ピフェノックス	GC									
131	ピフェントリン	GC									
132	ピペロニルプトキシド	GC									
133	ピペロホス	GC									
134	ピラクロストロピン	LC									
135	ピラクロホス	GC									

No	項目名	機器	A	B	C	D	E	F	G	H	他
			根菜	酸性 果実	なす 科う り科	にん じん	かん きつ 類	その 他果 実類	葉菜 緑黄 色	葉菜 淡色	グル ープ 外
136	ピラゾホス	GC									
137	ピラフルフェンエチル	GC									
138	ピリダフェンチオン	GC									
139	ピリダベン	GC									
140	ピリフェノックス	GC									
141	ピリプチカルブ	GC									
142	ピリプロキシフェン	GC									
143	ピリミカーブ	LC									
144	ピリミノバックメチル	GC									
145	ピリミホスメチル	GC									
146	ピリメタニル	GC									
147	ピロキロン	GC									
148	ピンクロゾリン	GC									
149	フィプロニル	GC									
150	フェナミホス	GC									
151	フェナリモル	GC									
152	フェニトロチオン	GC									
153	フェノキサニル	GC									
154	フェノキシカルブ	LC									
155	フェノチオカルブ	GC									
156	フェノトリン	GC									
157	フェノブカルブ	GC									
158	フェンアミドン	GC									
159	フェンスルホチオン	GC									
160	フェンチオン	GC									
161	フェントエート	GC									
162	フェンブコナゾール	GC									
163	フェンプロバトリン	GC									
164	フェンプロピモルフ	GC									
165	フェンメディファム	LC									
166	フサライド	GC									
167	ブタクロール	GC									
168	ブタミホス	GC									
169	ブピリメート	GC									
170	ブプロフェジン	GC									
171	フラチオカルブ	LC									
172	フラムプロップメチル	GC									
173	フラメトビル	LC									
174	フルアクリピリム	GC									

No	項目名	機器	A	B	C	D	E	F	G	H	他
			根菜	酸性 果実	なす 科 り科	にん じん	かん きつ 類	その 他果 実類	葉菜 緑黄 色	葉菜 淡色	グル ープ 外
175	フルジオキシニル	GC									
176	フルシラゾール	GC									
177	フルチアセトメチル	GC									
178	フルトラニル	GC									
179	フルトリアホル	GC									
180	フルフェンビルエチル	GC									
181	フルミオキサジン	GC									
182	フルミクロラックペンチル	GC									
183	フルリドン	LC									
184	プレチラクロール	GC									
185	プロシミドン	GC									
186	プロチオホス	GC									
187	プロバクロール	GC									
188	プロバジン	GC									
189	プロバニル	GC									
190	プロバルギット	GC									
191	プロピコナゾール	GC									
192	プロビザミド	GC									
193	プロヒドロジャスモン	GC									
194	プロフェノホス	GC									
195	プロボキスル	GC									
196	プロマシル	GC									
197	プロメトリン	GC									
198	プロモブチド	GC									
199	プロモプロビレート	GC									
200	プロモホス	GC									
201	プロモホスエチル	GC									
202	ヘキサコナゾール	GC									
203	ヘキサジン	GC									
204	ヘキシチアゾクス	LC									
205	ベナラキシル	GC									
206	ベノキサコール	GC									
207	ペルメトリン	GC									
208	ペンコナゾール	GC									
209	ペンディメタリン	GC									
210	ベンフルラリン	GC									
211	ベンフレセート	GC									
212	ホサロン	GC									
213	ボスカリド	LC									

No	項目名	機器	A	B	C	D	E	F	G	H	他
			根菜	酸性 果実	なす 科う り科	にん じん	かん きつ 類	その 他果 実類	葉菜 緑黄 色	葉菜 淡色	グル ープ 外
214	ホスチアゼート	GC									
215	ホスファミドン	GC									
216	ホレート	GC									
217	マラチオン	GC									
218	マイクロブタニル	GC									
219	メカルバム	GC									
220	メタベンズチアズロン	LC									
221	メタラキシル及びメフェノキサム	GC									
222	メチダチオン	GC									
223	メトキシクロール	GC									
224	メトキシフェノジド	LC									
225	メミノストロピン	GC									
226	メトラクロール	GC									
227	メパニピリム	LC									
228	メフェナセット	GC									
229	メフェンピルジエチル	GC									
230	メプロニル	GC									
231	モノクロトホス	GC									
232	レナシル	GC									
検査項目数			187	197	185	201	171	179	172	187	199

表3 残留農薬検査結果

グループ	農産物名	検出数/検体数	区分	検出農薬	検出値 ppm	分析値 ppm	基準値 ppm
A	かんしょ	1/4	県外産	フィプロニル	0.01	0.01	0.01
	だいこんの根	1/1	県外産	ホスチアゼート	0.02	0.0	0.2
	ばれいしょ	1/14	県内産	イミダクロプリド	0.01	0.0	0.4
C	きゅうり	5/9	県内産	アセタミプリド	0.06	0	2
				アゾキシストロピン	0.01	0	1
				ジエトフェンカルブ	0.01	0	5
			県内産	アゾキシストロピン	0.01	0	1
			イミダクロプリド	0.02	0	1	
			クロチアニジン	0.01	0	2	
			クロルフェナビル	0.03	0.0	0.5	
			プロシミドン	0.02	0	4	
			県内産	クロルフェナビル	0.02	0.0	0.5
	県内産	クロルフェナビル	0.04	0.0	0.5		
	県内産	アセタミプリド	0.08	0	2		
	ニガウリ	1/4	県内産	クロチアニジン	0.01	0	2
	トマト	4/6	県内産	クロルフェナビル	0.05	0	1
				クロルフェナビル	0.03	0	1
				トルフェンピラド	0.05	0	2
				クロルフェナビル	0.01	0	1
アゾキシストロピン				0.01	0	3	
			ブプロフェジン	0.04	0	1	
D	にんじん	2/5	県内産	メタラキシル及び メフェノキサム	0.01	0.0	0.4
			県外産	ボスカリド	0.01	0	2
F	まくわうり	1/1	県内産	エトフェンブロックス <sup>1</sup>	0.01	0.01	0.01
H	キャベツ	1/3	県外産	ボスカリド	0.02	0	5

1 当該農産物への適用なし

# 食品の一斉収去検査結果(2020年度)

山口 恵里果, 吉村 裕紀, 高木 由美香, 右田 雄二, 辻村 和也, 田栗 利紹

## Survey Report of Standards for Use of Sorbic acid, Peroxide Value and Acid Value, and Contamination of Coliform, on Food Inspection (2020)

Erika YAMAGUCHI, Hiroki YOSHIMURA, Yumika TAKAKI, Yuji MIGITA,  
Kazunari TSUJIMURA and Toshitsugu TAGURI

キーワード: 食品添加物, ソルビン酸, 大腸菌群, 漬物, 魚肉練り製品, 酸価, 過酸化物質, 揚げ麺

Key words: standards for use, food additive, sorbic acid, coliform bacteria, Japanese pickles, fish paste products, acid value, peroxide value, fried noodles

### はじめに

2020年度食品中の添加物等の検査(一斉収去検査)を実施した。漬物および魚肉練り製品 20 検体について保存料(ソルビン酸)定量検査、このうち魚肉練り製品 14 検体について、併せて大腸菌群の検査を実施した。即席めん類 14 検体については、規格基準試験(酸価及び過酸化物質)を行ったので報告する。

### 調査方法

1 漬物および魚肉練り製品中の保存料(ソルビン酸)定量検査

#### (1) 試料および試薬

県内に流通するソルビン酸の使用基準が設定されている食品のうち、県内産を中心に漬物 1 検体および魚肉練り製品 19 検体の計 20 検体(ソルビン酸使用表示あり: 11 検体、なし: 9 検体)を試料とした。

標準品に関しては、関東化学株式会社製のものを使用した。

試薬に関しては、メタノールは関東化学株式会社製の LC/MS 用を使用し、その他の試薬は特級品以上のものを使用した。

#### (2) 検査方法

検査は、食品中のソルビン酸について、均質化試料を水蒸気蒸留装置(宮本理研工業株式会社製 型式: STC-5D)を用いて蒸留することにより、試験溶液を得た。これを高速液体クロマトグラフ装置(アジレント・テクノロジー株式会社製 型式: Agilent 1260 Infinity

LC)を用いて、絶対検量線法により定量した。装置の測定条件を表 1 に示した<sup>1-2)</sup>。

表 1 高速液体クロマトグラフ装置条件

カラム	Inertsil ODS-3V, 4.6 mmID × 150 mm (ジーエルサイエンス社製)
ガードカラム	Inertsil ODS-3, 4.6 mmID × 150 mm (ジーエルサイエンス社製)
移動相	メタノール-水-0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 4.0) (36:59:5)
流速	1.0 mL/min
カラム温度	40°C
測定波長	230 nm

### 2 魚肉練り製品中の大腸菌群検査

#### (1) 試料および試薬

県内産を中心に魚肉練り製品 14 検体を試料とした。なお、検体は保存料(ソルビン酸)定量検査を実施したものと同一である。

試薬に関しては、ペプトンはベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー製、塩化ナトリウムは富士フィルム和光純薬株式会社製の特級品、菌の培養には日本製薬株式会社製の BGLB 培地、EMB 培地、乳糖ブイヨン培地を使用した。

#### (2) 検査方法

検査は、検体を細切して滅菌ペプトン加生理食塩水を加えた 10 倍希釈液を試料液とした。試料液を倍濃度 BGLB 発酵管に接種し、35°C 48 時間培養後に



ガス発生の有無を確認した。ガス発生を認める場合には EMB 培地 (確定試験)、乳糖ブイヨン発酵管 (完全試験) を用いて追加で培養を実施し、完全試験でガスの発生を認めるものを「大腸菌群陽性」と判定した<sup>3-4)</sup>。

### 3 即席めん類の規格基準試験 (酸価、過酸化物価)

#### (1) 試料および試薬

県内に流通する即席めん類のうち、揚げ麺について県内産を中心に 14 検体を試料とした。

試薬に関しては、ジエチルエーテルは関東化学株式会社製の油脂試験用、0.1 mol/L エタノール性水酸化カリウム溶液及び 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液は富士フィルム和光純薬株式会社製の容量分析用、フェノールフタレイン溶液は関東化学株式会社製の滴定用指示薬、でんぷん (溶性) は関東化学株式会社製の鹿一級を使用し、その他の試薬は特級品以上のものを使用した。

#### (2) 検査方法

検査は、試料より石油エーテルで抽出した油脂を用いて行った。抽出した油脂をエタノール・ジエチルエーテル混液に溶解後、1%フェノールフタレイン溶液を指示薬とし、0.1 mol/L エタノール性水酸化カリウム溶液で滴定して酸価を、また、抽出した油脂をイソオクタン・酢酸混液に溶解後、でんぷん溶液を添加し、0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定して過酸化物価を求めた<sup>5-7)</sup>。

#### 規格基準<sup>8)</sup>

##### 1 ソルビン酸の使用基準

- (1) 漬物 : 1.0 g/kg 以下
  - (2) 魚肉練り製品 : 2.0 g/kg 以下
- なお、定量下限は 0.01 g/kg である。

##### 2 魚肉練り製品の成分規格

大腸菌群陰性であること。

### 3 即席めん類 (酸価、過酸化物価)

即席めん類 (めんを油脂で処理したものに限り) の成分規格基準は、含有油脂の酸価が 3 以下、かつ過酸化物価が 30 以下である。

#### 検査結果

##### 1 漬物および魚肉練り製品中の保存料 (ソルビン酸) 定量検査

原材料表示に保存料 (ソルビン酸) の記載が無い 9 検体のうち、2 検体からソルビン酸が検出された。

ソルビン酸の表示が有る 11 検体については、いずれも使用基準の範囲内であった。

##### 2 魚肉練り製品中の大腸菌群検査

全て陰性であった。

##### 3 即席めん類の規格基準試験 (酸価、過酸化物価)

検査した試料は全て規格基準に適合していた。

#### 参考文献

- 1) 薬生食基発 0628 第 1 号 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長通知及び薬生食監発 0628 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長通知:「食品中の食品添加物分析法」の改正について, (2019 年 6 月 28 日).
- 2) 日本食品衛生協会編: 食品衛生検査指針 (食品添加物編) 追補 2020.
- 3) 厚生省告示第 73 号 食品、添加物等の規格基準の一部改正について, (1993 年 3 月 17 日).
- 4) 日本食品衛生協会編: 食品衛生検査指針 (微生物編) 2018.
- 5) 食安発 0328 第 1 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知:「食品、添加物等の規格基準の一部改正する件について」, (2011 年 3 月 28 日).
- 6) 日本食品衛生協会編 食品衛生検査指針 (理化学編) 2015.
- 7) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 2015.
- 8) 厚生省告示第 370 号 食品、添加物等の規格基準, (1959 年 12 月 28 日).

# 畜水産食品中の残留動物用医薬品の検査結果(2020年度)

松尾 広伸, 川野みどり, 田栗 利紹, 辻村 和也

## Survey Report of Veterinary Drug Residues in Livestock Products and Sea foods (2020)

Hironobu MATSUO, Midori KAWANO, Toshitsugu TAGURI  
and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: 畜水産食品、動物用医薬品、高速液体クロマトグラフ - タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)

Key words: Livestock products and Sea foods, veterinary drug residues, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

### はじめに

2020年度厚生労働省畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の一環として、県内産の畜水産食品(養殖魚介類、乳)中の抗生物質、合成抗菌剤、内寄生虫用剤の検査を行ったので報告する。

### 調査方法

#### 1 試料及び試薬

検査に供した試料は、表1に示す。

標準品に関しては、富士フィルム和光純薬(株)のものを使用した。

試薬に関しては、アセトニトリル及びメタノールは関東化学(株)製のLC/MS用を、ギ酸は富士フィルム和光純薬(株)製のLC/MS用を使用した。その他の試薬は、残留農薬用及び特級品以上のものを使用した。

#### 2 検査項目及び残留基準

検査項目及び残留基準は、表2に示す。

#### 3 検査方法

##### (1) 抗生物質の微生物学的検査

1994年7月1日付け衛乳第107号「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改定)別添2」及び食品衛生検査指針(理化学編)、ペーパーディスク法(IDF standard)[関連法規:1951年12月27日付け厚生省令第52号「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」]に準じた。

##### (2) 抗生物質、合成抗菌剤及び内寄生虫用剤の理化学検査

厚生労働省通知試験法 HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法(畜水産物)及び文献2)を参考に、分析法を検討し、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(2007年11月15日付け食安発第1115001号)及び「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(2010年12月24日付け食安発1224第1号)に従い、試験法妥当性を評価し、標準操作手順書を作成し、その方法を適用した。その概要を以下に示す。

当該前処理は、均質化検体から0.3%ギ酸メタノール/アセトニトリル(7/3)混液及び0.2M EDTA-2Na水溶液で対象成分を2回粉碎抽出し、さらに残渣にEDTA含有クエン酸緩衝液を加えて粉碎抽出を行う。それらの上清を合わせたものを定容後、0.22µmフィルターでろ過し、試験溶液とした。分析装置は、高速液体クロマトグラフ - タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)として、アジレントテクノロジー株式会社製1290 Infinity LC/6460を使用した。

### 検査結果及び考察

養殖魚介類15検体、乳9検体の検査を行った。結果、抗生物質、合成抗菌剤、内寄生虫用剤について基準値を超える検体は無かった。

**参 考 文 献**

- 1) 厚生労働省ホームページ：畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査結果.
- 2) 松本理世、他：LC/MS/MS を用いた畜水産物中動物用医薬品等の迅速一斉分析法の検討(第3報), 熊本県保健環境科学研究所報, 44, 28-37, (2014).
- 3) 食安発第 1115001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(2007年11月15日).
- 4) 食安発 1224 号第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(2010年12月24日).

表1 試 料

搬入機関	養 殖 魚 介 類		乳
	ぶり (はまち)	まだい	
西彼保健所	1		1 8
県央保健所			
県南保健所	3	2	
県北保健所	1	2	
五島保健所	1	1	
上五島保健所		1	
対馬保健所	2		
壱岐保健所		1	
合 計	8	7	9

表2 検査項目及び残留基準 (単位: ppm)

検査項目	養殖魚介類		乳
	ぶり (はまち)	まだい	
(抗生物質)			
テトラサイクリン類	0.2 <sup>*1</sup>	0.2 <sup>*1</sup>	0.1 <sup>*2</sup>
スピラマイシン類 <sup>*3</sup>	0.2	0.2	0.2 <sup>*2</sup>
ベンジルペニシリン (合成抗菌剤)			0.004
スルファメラジン	0.01	0.01	
スルファジミジン	0.01	0.01	0.025
スルファモノメキシン	0.1	0.1	
スルファジメキシン	0.1	0.1	
スルファキノキサリン	0.01	0.01	
オキソリン酸	0.06	0.06	
チアンフェニコール	0.02	0.02	
(内寄生虫用剤)			
チアベンダゾール類 <sup>*4</sup>			0.10

\*1: 魚介類におけるオキシテトラサイクリンのみの値を記載。

検査においてテトラサイクリン、クルテトラサイクリンに、一律基準(0.01 ppm)を適用した。

\*2: オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、クルテトラサイクリンの和

\*3: スピラマイシン、ネオスピラマイシンの和

\*4: チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾールの和

\*5: 残留基準の設定されていないものは、一律基準を記載

# 繊維製品中のホルムアルデヒドの検査結果(2020年度)

山口 恵里果, 谷口 香織, 辻村 和也

## Survey Report of Formaldehyde in Textile Goods (2020)

Erika YAMAGUCHI, Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: ホルムアルデヒド、繊維製品

Key words: formaldehyde, textile goods

### はじめに

例年、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づき県内の各地域において販売されている衣料品等の検査を行なっている。2020年度は県北地区において販売されている衣料品等に含まれるホルムアルデヒドの検査を実施したので報告する。

### 調査方法

#### 1 検体及び試薬

24月以内の乳幼児用の衣料品 15 検体、24 月を超えるもの 5 検体の検査を行なった(表 1)。

ホルムアルデヒド標準品は関東化学株式会社製、アセチルアセトン(2,4-ペンタンジオン)は富士フィルム和光純薬株式会社製のものを使用した。

吸光度計は日本分光株式会社製 V-730 を用いた。

表 1 検体一覧

	検体数
24月以内のもの	15 検体
中衣	1
よだれ掛け	3
寝衣	3
くつした	3
下着	5
24月を超えるもの	5 検体
下着	5
合計	20 検体

#### 2 分析方法

試験は、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に規定する方法に準じて行なった。

身体と接触する部分を細かく切り、24 月以内のもの

は 2.5 g、それ以外のものは 1 g を正確に量りとり、精製水 100 mL を正確に加えて 40°C で 1 時間抽出を行なった。これをガラスろ過器 G2 によりろ過し、試験溶液とした。この試験溶液 5 mL を正確にとり、アセチルアセトン試薬を 5 mL 加え、40°C で 30 分加熱後、30 分室温にて放置し、事前にスペクトルを測定し、波長 412~415 nm において、吸収の極大波長であった 412 nm で吸光度を測定した(A)。同様に試験溶液にアセチルアセトンの代わりに酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 5 mL を加えた対照サンプルを用意し、吸光度を測定した (Ao)。

### 検査結果

表 1 に示した全ての検体は基準値以下であり、ホルムアルデヒドは検出されなかった。

(家庭用品中のホルムアルデヒド基準値)

- 24 月以内の乳幼児用のもの  
A-Ao の値が 0.05 以下又は下式により計算する試料 1 g についてのホルムアルデヒド溶出量が 16 µg 以下でなければならない。
- 24 月を超えるもの  
下式により計算する試料 1 g についてのホルムアルデヒド溶出量は 75 µg 以下でなければならない。

ホルムアルデヒド溶出量(µg)

= C (µg/ml) × (A-Ao) / As × 100 × 1 / 試料採取量(g)

C: ホルムアルデヒド標準液の濃度

As: ホルムアルデヒド標準液の吸光度

### 参考文献

- 厚生労働省令第 34 号:「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行令」.(1974 年 9 月 26 日).
- 厚生労働省令第 124 号:「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則の一部を改正する省令」.(2015 年 7 月 9 日).

## 健康食品中の強壯用無承認無許可医薬品の検査結果(2020年度)

辻村 和也, 松尾 広伸

## Survey Report of Pharmaceuticals Illegally Added to Dietary Supplements for the Enhancement of Sexual Performance (2020)

Kazunari TSUJIMURA and Hironobu MATSUO

キーワード: 無承認無許可医薬品, 強壯効果, 健康食品, LC-QTOF/MS

Key words: Illegal Pharmaceuticals, Enhancement of Sexual Performance, Dietary Supplements, LC-QTOF/MS

## はじめに

近年、強壯効果を標榜している健康食品に無承認無許可医薬品が含まれている事例が相次いで報告されている<sup>1)</sup>。このため、これら無承認無許可医薬品による健康被害を未然に防ぐため、2003年度より県内で販売されている「いわゆる健康食品」(以下、健康食品)の医薬品成分検査を実施している。2020年度の健康食品の強壯系成分の検査結果について報告する。

## 調査方法

## 1 検体

2020年度は、県内雑貨量販店で販売されている無承認無許可医薬品にあたる強壯系成分の混入の可能性がある物品 5 製品 8 検体(錠剤 1、カプセル 7(1製品:3色カプセル(透明、白色、茶)、1製品(異ロット)。これらは別検体としてして検査実施)を購入し検体とした。

## 2 検査対象物質

強壯用医薬品であるシルデナフィル、ホンデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ヨヒンビン、リドカインの6種類をターゲット検査対象物質とした。

また、既知情報から整理した強壯系成分 58 成分をスクリーニング検査の対象物質とした。

## 3 試薬

シルデナフィル、ホンデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ヨヒンビン、リドカイン標準品は 10 mg をメタノールに溶解して 10 mL とし、標準原液(1000 ppm)とした。さらに各標準原液をアセトニトリル-メタノール(1:1)で希釈して、混合標準溶液を調製した。

前処理及び標準溶液調製及び移動相に用いたアセトニトリルは LC/MS 用を用いた。その他のメタノールは関東化学株式会社製の LC/MS 用、超純水及びギ酸は富士フィルム和光純薬株式会社製の LC/MS 用を用いた。

## 4 分析装置及び条件

高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS-DAD)として、ウォータース株式会社製 Waters ACQUITY UPLC I-CLASS / Xevo G2-XS QTOF を使用した。分析カラムはウォータース株式会社製 Waters UPLC HSS C<sub>18</sub>(2.1 mm i.d. × 100 mm、粒子径 1.8 μm)を用いた。カラム温度は 45°C とし、移動相には 3 mM ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.9)(A液)及び 0.1% ギ酸-アセトニトリル(B液)を表 1 に示すグラジエント溶離条件で用いた。また、流速は 0.3 mL/min とし、試料の注入量は 1 μL とした<sup>2)</sup>。

表 1 グラジエント溶離条件

Time, min	A 液, %	B 液, %
0 - 2.1	80	20
6.5	60	40
9.5 - 11.0	40	60
11.3 - 12.8	5	95
13.0	80	20
15.0	80	20

また、QTOF/MS 分析は、Scan 範囲: m/z: 50-1000、測定モードは、MS<sup>E</sup>(Resolution)、Cone Energy を 40 V とした。また、Collision Energy は、Low (0 V)、High (Ramp: 15-40 V) とした。

ターゲット検査対象物質の名称、組成式及び精密質量数を表 2 に示す。

表 2 ターゲット検査対象物質

物質名	組成式	精密質量数
シルデナフィル	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	474.2049
ホンデナフィル	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	466.2692
タダラフィル	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	389.1376
バルデナフィル	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	488.2206
ヨヒンビン	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	354.1943
リドカイン	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	234.1732

#### 5 分析検体の前処理

錠剤は乳鉢で粉末にし、カプセル剤はミル及び乳鉢で粉砕した。飲料水及び錠剤検体は、約 0.2 g を採取し、アセトニトリル-メタノール(1:1) 10 mL を加えて 1 分間攪拌した後、10 分間超音波抽出した<sup>3)</sup>。また、カプセル剤については 1 カプセル(約 0.3 g)について同様の処理を行った。これらを 3000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清 2 mL を分取し、アセトニトリル-メタノール(1:1)で 10 mL に定容した。その溶液を 0.2 μm 遠

心式フィルターユニットでろ過し、試験溶液とした。

#### 検査結果

今回調査した健康食品からは全ての検体においてターゲット検査対象物質は未検出だった(表 3)。また、ターゲット検査対象物質以外の強壮系成分(58 成分)についても精密質量数によるターゲットスクリーニング検査で含有が疑われる検体は無かった。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局監視指導課・麻薬対策課 報道発表資料:平成 23 年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について。(2012 年 6 月 22 日).
- 2) Waters Application Note:「UPLC/MS/MS for the Screening, Confirmation, and Quantification of Drugs Illegally Added to Herbal/Dietary Supplements for the Enhancement of Male Sexual Performance」, (2012).
- 3) 西川徹、他; LC/MS/MS を用いた痩身及び強壮用医薬品の一斉分析法の検討, 長崎県衛生公害研究所報、51, 23-28 (2005)

表 3 健康食品中強壮用無承認無許可医薬品検査結果(2020)

検査項目	強壮成分検出 数/検体数	備考	
ターゲット検査対象物質	シルデナフィル	0/8	
	ホンデナフィル	0/8	
	タダラフィル	0/8	錠剤
	バルデナフィル	0/8	1 検体(1 製品)
	ヨヒンビン	0/8	
	リドカイン	0/8	
カプセル剤	7 検体(4 製品)		
スクリーニング対象物質	以外の既報強壮系成分	0/8	

## 指定薬物の検査結果(2020年度)

吉村 裕紀, 辻村 和也

### Survey Report of Designated Substances Controlled by the Pharmaceuticals and Medical Devices Act, for Luxury Goods (2020)

Hiroki YOSHIMURA and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: 指定薬物, 医薬品医療機器等法, LC-QTOF/MS, GC-MS

Key words: Designated Substances, PMD Act, LC-QTOF/MS, GC-MS

#### はじめに

近年、危険ドラッグの乱用による事件事故が大きな社会問題となっている。危険ドラッグ中の成分は主に「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律(医薬品医療機器等法)」で指定薬物として規制される成分であり、その危険性は麻薬や覚醒剤をしのぐものもある。現在 2,300 成分を超える化学物質が指定薬物とされている。国は、包括指定制度導入、認定手続きの簡素化、単純所持禁止等の対応を行い、規制の強化及び迅速化に取り組んでいる。

長崎県でも 2014 年度より危険ドラッグ及びその含有が疑われる嗜好品等を買上し、指定薬物の混入検査を開始した。本年度は、指定薬物成分の混入の可能性があるハーブおよび電子タバコ用リキッドについて検査を実施した。その結果について報告する。

#### 調査方法

##### 1 検体

指定薬物成分の混入の可能性のある物品として電子タバコ用リキッド 9 製品及びハーブ 1 製品をインターネット通販で購入し、計 10 製品を検体とした。

##### 2 前処理

検体 25 mg をマイクロチューブに量り取り、メタノール 1 mL を加え、ボルテックス攪拌 30 秒及び 5 分間超音波照射による抽出後、0.2 μm 遠心式フィルターユニット(メルクミリポア)でろ過し、試験溶液とした。試験溶液は、必要に応じ適宜メタノールで希釈した。

##### 3 分析装置

(1) ガスクロマトグラフ - 質量分析装置 (GC-MS)  
アジレントテクノロジー株式会社製 7890A/5975C GC/MSD を使用した。

(2) 高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS-DAD)

ウォータース株式会社製 Waters ACQUITY UPLC I-CLASS / Xevo G2-XS QTOF を使用した。

##### 4 分析条件

指定薬物の GC-MS 分析条件は、「指定薬物の分析法について」(2007 年 5 月 21 日付け薬食監麻発第 0521002 号監視指導・麻薬対策課通知)に準じて行った。また、LC-MS 分析条件は、平成 27 年度指定薬物分析研究会議の資料を参考にした。GC-MS 条件(表 1)及び LC-QTOF/MS-DAD 条件(表 2)に示す。

##### 5 スクリーニング検査

GC-MS スキャン分析で取得したデータを対象に、AMDIS プログラム(NIST)を用い、Deconvolution 処理を行った。処理されたピークについて、当センターで作成した「指定薬物 GC-MS ライブラリー」、国衛研「違法ドラッグ閲覧データシステム」、「SWGDRUG Mass Spectral Library」及び「Cayman Spectral Library」を用い、各検体に含まれる指定薬物及び類似体のスクリーニングを行った。

LC-QTOF/MS スキャン分析(MS<sup>E</sup> モード)では、取得したデータを対象に当センターで作成した「指定薬物精密質量数データベース」を用いた検索を行った。



表 1 GC-MS 分析条件

【条件 1】	【条件 2】(合成カンナビノイド用)
カラム: HP-1MS (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 製)	カラム: HP-1MS (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 製)
キャリアーガス: He, 0.7 mL/min	キャリアーガス: He, 1.1 mL/min
(リテンションタイムロッキング: MDPPP: 27.8 min)	(リテンションタイムロッキング: MDPPP: 4.96 min)
注入口温度: 200°C、スプリットス	注入口温度: 250°C、スプリットス
検出器温度: 280°C	検出器温度: 280°C
イオン化法: EI	イオン化法: EI
カラム温度: 80°C (1 min) -5°C/min-190°C (15 min) -10°C/min -310°C (10 min)	カラム温度: 200°C (1 min) -5°C/min-310°C (7 min)
スキャン: m/z: 40-550	スキャン: m/z: 40-550

表 2 LC-QTOF/MS-DAD 分析条件

【条件 1】	【条件 2】(合成カンナビノイド用)
カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm, Waters 製)	カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm, Waters 製)
ガードカラム: Van Guard column (2.1 mm×5 mm, 1.8 μm, Waters 製)	ガードカラム: Van Guard column (2.1 mm×5 mm, 1.8 μm, Waters 製)
移動相 A: 0.1% ギ酸	移動相 A: 0.1% ギ酸
移動相 B: 0.1% ギ酸アセトニトリル	移動相 B: 0.1% ギ酸アセトニトリル
グラジエント条件: A(%)/B(%) = 95/5(0 min) -80/20(20 min) -20/80(30 min, 10 min Fold)	グラジエント条件: A(%)/B(%) = 65/35(4 min fold) -35/65 to 25/75 (4-16 min) -10/90(16-17 min, 6 min fold)
流速: 0.3 mL/min	流速: 0.3 mL/min
カラム温度: 約 40°C	カラム温度: 約 40°C
イオン化法: ESI	イオン化法: ESI
DAD スキャン範囲: 210-450 nm	DAD スキャン範囲: 210-450 nm
MS スキャン: m/z 100-1000	MS スキャン: m/z 100-1000

### 検査結果

2020 年度指定薬物の検査において、医薬品医療機器等法第 2 条第 15 項に規定する指定薬物を含有する製品は確認されなかった。

### 参考文献

- 1) 薬食監麻発 0521002 号 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知: 「指定薬物の分析法について。」(2007 年 5 月 21 日)。

- 2) 野澤真里奈他; 違法ドラッグ試買検査の実施について (2011), 京都府保環研年報, 57, 56 ~ 63 (2012)
- 3) 高橋市長、他; 千葉県における違法ドラッグ試験検査について(平成 21 年度), 千葉県衛生研究所年報, 58, 51 ~ 54 (2009).
- 4) 武田章弘、他; 平成 23・24 年度の違法ドラッグ買上調査について. 大阪府立公衛研所報, 51, 23 ~ 27 (2013)
- 5) 内山菜穂子; 平成 27 年度指定薬物分析研究会議資料「危険ドラッグ製品の分析及び成分の同定について」(2015).

# 食品中のアレルゲン検査結果(2020年度)

松尾 広伸, 辻村 和也

## Survey Report of Allergen in Food (2020)

Hironobu MATSUO and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: アレルゲン(特定原材料)、そば、酵素免疫測定法

Key words: allergen, buckwheat, ELISA method

### はじめに

アレルゲン(特定原材料)を含有する食品は、食物アレルギーによる健康被害を防止する目的で、2001年4月に特定原材料の表示が義務づけられ、2002年4月から本格的に施行された。特定原材料の検査法については、2002年11月の厚生労働省通知により、定量検査法(ELISA法)および確認検査法(PCR法・ウエスタンブロット法)が定められた<sup>1)</sup>。

当センターでは、2007年度から本格的にアレルゲンの検査を開始している。2020年度は、「そば」の検査を行ったので報告する。

### 調査方法

#### 1 試料

県内に流通する加工食品のうち、「そば」の使用、または混入が疑われるもので、使用原材料表示に「そば」が記載されていないもの12検体とした。(西彼保健所(3)・県央保健所(3)・県南保健所(3)・県北保健所(3))。

#### 2 試薬

定量検査法(ELISA法)として、株式会社森永生化学研究所製モリナガFASPEKエライザ そばおよび日本ハム株式会社中央研究所製FASTKITエライザVer. そばを使用した。

#### 3 機器

フードカッター: レッチェ社製 GM200, 恒温振とう機: 東京理科器機株式会社製 MMS-3011, 冷却遠心

機: クボタ商事株式会社製 3740, マイクロプレートリーダー: パイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社製 ImunoWash 1575 及び iMark を用いた。

### 4 検査方法

2014年3月26日消食表第36号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査法について」の一部改正について<sup>2)</sup>に準じて検査を行った。

### 規格基準

特定原材料等由来のタンパク質含量が、10 µg/g 未満でなければならない。

### 検査結果

2種類のELISA法による定量検査の結果、10 µg/g を超えてそば由来のタンパク質を含有する検体はなかった。そのため、PCR法による確認検査法は実施しなかった。

今後も表示違反食品の排除および表示適正化を行う目的で、県内に流通する食品中のアレルゲンの検査が必要と考えられる。

### 参考文献

- 1) 第0513003号 厚生労働省通知食案基発: 「アレルギー物質を含む食品の検査法について」, (2002年11月6日).
- 2) 消食表第36号 消費者庁次長通知: 「アレルギー物質を含む食品の検査法について」の一部改正について, (2014年3月26日).

## 健康危機事案を想定した模擬訓練結果(2020年度)

松永 尚子, 吉村 裕紀, 松尾 広伸, 山口 恵里果, 谷口 香織, 辻村 和也

### Training Results of Assuming Food Poisoning Outbreak (2020)

Naoko MATSUNAGA, Hiroki YOSHIMURA, Hironobu MATSUO, Erika YAMAGUCHI,  
Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード:健康危機管理、食中毒、リコリン、TLC、LC-QTOF/MS

Key words: health crisis management, food poisoning, lycorine, TLC, LC-QTOF/MS

#### はじめに

近年の健康危機は、健康食品事件や残留農薬の含まれた食品の流通、生物毒など多様で高度な対応を要するものに変容してきている。このような健康危機事案に的確に対応するため、地方衛生研究所の位置づけについては「地域保健対策の推進に関する基本的な指針(平成6年12月1日厚生省告示第374号)」の中で、「地方衛生研究所は、地域における健康危機管理の科学的・技術的中核となる機関として機能の充実強化を図ること、他地方衛生研究所等の関係機関と連携体制の構築を図ること」とされている。

こうした状況を踏まえて、地方衛生研究所全国協議会九州支部(以下、九地研と略)では、2006年2月に「九州ブロック地方衛生研究所広域連携マニュアル」を策定し、情報の共有、試験検査・技術研修の相互支援等広域連携を行い、地域保健総合推進事業の一環として九地研会員で毎年原因不明の健康危機事案を想定した毒性物質の定性・定量検査の模擬訓練を実施している。

当センター生活化学科でも本訓練に参加し健康危機管理における理化学検査体制の強化を図っている。本報告では、2020年度の実施内容と当センターの結果について報告する。

#### 実施方法

##### 1 実施期間

2020年11月2日～11月27日

##### 2 検体

事務局より送付された液体(豚汁)約50 g

##### 3 実施体制

模擬訓練の進行調整役として訓練責任者を配置し、実施要領に従い演習を行った。

##### 4 シナリオ概要

社宅自治会が、敷地内の大清掃(草刈り・農薬散布)後に中庭で昼食会を開いた。昼食会では、おにぎり、豚汁等を調理し、飲み物等も準備した。共通食である豚汁の食材のうち、ニンジン、タマネギ、ジャガイモ等は複数の知人から譲受したものであった。豚汁等を喫食した複数名が、喫食後30分程度から気分不良、吐き気、おう吐などの症状を呈し、病院を受診した。病院の医師が食中毒と判断し、保健所に通報し、保健所から地衛研に検査依頼がなされたという設定であった。また、原因物質のために必要と思われる情報については適宜質問し追加情報を入手した。

##### 5 原因物質の探索および特定

###### (1) 候補物質の選定

喫食状況、患者症状、発症時間などの健康被害の特徴と除草剤散布の状況から、原因物質候補を選定し、その試験法等について情報収集を行った。

###### (2) 定性分析

(1)で選定した物質の含有を確認するために、薄層クロマトグラフィー(TLC)法、高速液体クロマトグ

ラフィ - 四重極飛行時間型質量分析 (LC/QTOF/MS)法およびガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)法による定性分析を実施した。また、選定された候補物質以外の物質についても、LC/QTOF/MS法およびGC/MS法を用いて探索した。高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置として、ウォーターズ株式会社製 Waters ACQUITY UPLC I-CLASS / Xevo G2-XS QTOF、ガスクロマトグラフ - 質量分析装置としてアジレントテクノロジー株式会社製 7890A/5975C GC/MSDを使用した。

(3) 定量分析

(2)の定性分析で確認された物質について、LC/QTOF/MS法による定量分析を実施した。

(4) 毒性量の推定、検証

候補物質の毒性量について、定量分析の結果から算出した含有量と毒性に関する文献等の情報と比較検討した。

6 模擬訓練事業結果検討会

模擬訓練後に結果検討会がWEB開催され、他機関との結果比較や演習時の課題等情報の共有を行った。

結果と考察

1 原因物質の探索および特定

(1) 候補物質の選定

原因物質候補として、タマネギと誤食したスイセンの有毒成分であるリコリン、ガランタミン、ジャガイモの有毒成分であるソラニン、有機リン系除草剤のグリホサートを選定した。

(2) 定性分析

検体及びブランク試料として市販の豚汁(ホモジナイザーで均一化したもの)約0.5 g(GC/MS用は5 g)を採取しアセトニトリルもしくはメタノール20 mLを加えて振とう(300回/分、10分間)し、0.2 μm遠心分離用フィルターチューブで遠心分離(3500 rpm、5分間)後、ろ過した。上清を分取し必要に応じ窒素パーージ(GC/MS用は減圧濃縮)で濃縮し試料溶液とした。

リコリンのTLCによる分析は南谷らの報告<sup>1)</sup>に準じて表1の条件で行った。その結果、リコリン標準液(リコリン塩酸塩一水和物(東京化成工業株式会社製)をメタノールで適宜希釈して調製)と同一の位置に検出した(図1)。また、LC/QTOF/MSの低エネルギー

モードの測定結果、検体抽出液からリコリン標準液と同じ保持時間(約2.2分)にピークが確認され、そのピークにm/z:288.1234のスペクトルが検出された。これは理論上のリコリンのプロトン付加体の精密質量数と比較し質量精度2 ppm以下であった(図2、3)。また、高エネルギーモードで検出されたマススペクトルもリコリン標準液と一致していた。GC/MSによる測定およびライブラリー探索の結果においても、リコリン標準液のスペクトルパターンと酷似し、その保持時間はリコリン標準液と一致していることを確認した。

一方、その他の候補物質であるガランタミン、ソラニン、グリホサートおよびその他原因物質になりうる物質はいずれの分析でも含有が確認できなかった。

以上のことから、原因物質をリコリンと断定した。

表1 TLC測定条件

薄層板	HPTLC Silica gel 60F <sub>254</sub> 10 × 10 (メルク社製)
展開溶媒	酢酸エチル/メタノール/2%アンモニア水(17/2/1, v/v/v)
滴下量	各10 μL(25倍濃縮のものは20 μL)
検出波長	365 nm

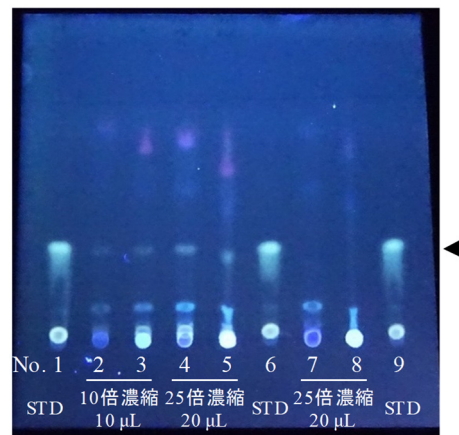


図1 リコリンのTLC結果

1,6,9: リコリン標準溶液(1000 ppm)10 μL、2,4: アセトニトリル抽出液、3,5: メタノール抽出液、7: ブランク(市販の豚汁、アセトニトリル抽出液)8: ブランク(市販の豚汁、メタノール抽出液)、NO.1,6,9: R<sub>f</sub>=0.39、No.2,3,4: R<sub>f</sub>=0.38、No.5: R<sub>f</sub>=0.35

(3) リコリンの定量分析

食品衛生検査指針<sup>2)</sup>の「リコリン」の試験法を参考に、定量用試料(n=3)、リコリン標準液添加試料(n=2、試料中濃度200 μg/g)、ブランク

試料として市販の豚汁を用いて図4のとおり各試料溶液を調製した。定量に用いたLC/QTOF/MS条件は表2に示す。定量には低エネルギーモードで取得したデータを用い、プロトン付加体 ( $m/z=288.1236$ )により解析した。検量線を図5に示す。0.1 ~ 100 ng/mLの範囲で決定係数0.9925 (相関係数0.9962) の良好な直線が得られた。定量の結果、検体抽出液中のリコリン濃度は49.7  $\mu\text{g/g}$ であった。添加回収率は95.4%であったことから前処理操作による損失はほとんどないと判断した。

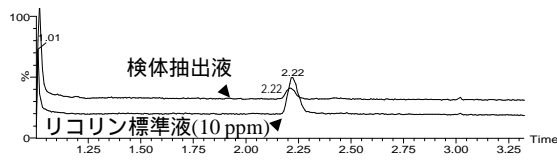


図2 リコリンの全イオンクロマトグラム

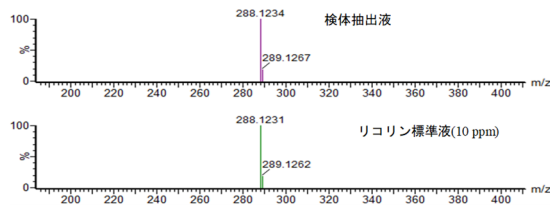


図3 リコリンのマスペクトル

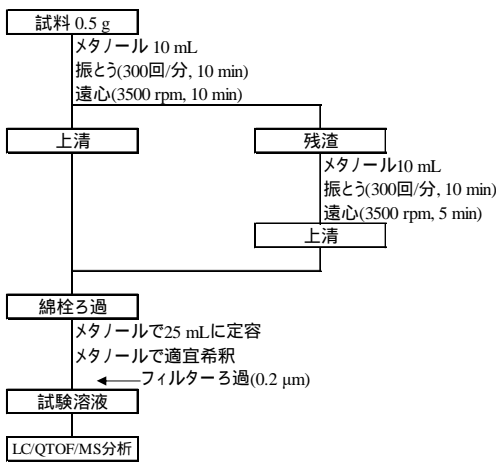


図4 試験溶液の調製法(定量分析)

表2 LC-QTOF/MS分析条件

LC条件	
機器	Waters ACQUITY UPLC I-Class
分析カラム	XBridge C <sub>18</sub> , 3.5 $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 150 mm(Waters)
移動相	A:B=40:60(アイソクラティック) A 5 mMギ酸アンモニウムメタノール溶液 B 5 mMギ酸アンモニウム水溶液
カラム温度	40

流速	0.2 mL/min
注入量	5 $\mu\text{L}$
QTOF/MS条件	
機器	Waters Xevo G2-XS QTof
イオン化法	ESIポジティブモード
測定モード	MS <sup>E</sup> (データ非依存型スキャン)
キャピラリー電圧	2 kV
サンプルコーン電圧	40 V
コリジョンエネルギー	低エネルギー0V 高エネルギー15-35V(Ramp)
ソース温度	120
脱溶媒ガス温度、流量	500、1000 L/h
コーンガス流量	50 L/h
ロックスプレー	ロイシンエンケファリン(556.2771 m/z)
質量数測定範囲	m/z:50-800
スキャン時間	0.2秒

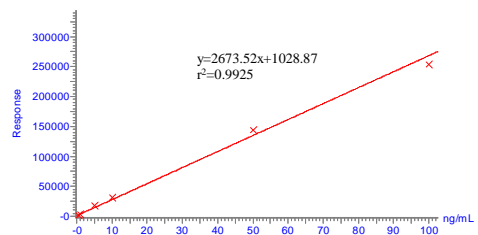


図5 リコリンの検量線(0.1 ~ 100 ng/mL)

#### (4) 毒性量の推定、検証

定量結果より、リコリンの有害量について検証した。豚汁100 gにスイセン根が16 g含まれると仮定すると、スイセン根のリコリン含有量は約310  $\mu\text{g/g}$ 、摂取量は4.97 mgと推定された。過去の食中毒事例におけるスイセン根のリコリンの含有量は約200  $\mu\text{g/g}$ との報告<sup>3,4)</sup>より値は妥当であると判断した。今回のリコリンの推定摂取量と健康被害の相関は、過去の食中毒事例において残品の濃度報告がないため判断できなかった。

#### (5) 模擬訓練事業結果検討会

結果検討会は、2021年2月25日にWEB開催された。模擬訓練事務局の結果報告書によると、食中毒の原因はスイセン鱗茎をタマネギと間違えたことによるものであり、原因物質はスイセンの毒成分であるリコリン、検体中のリコリン添加量は50  $\mu\text{g/g}$ であった。当センターの結果が原因物質としてリコリンと断定

し、定量結果の真度が99.4%であることから、定性、定量いずれにおいても分析の有効性が実証できた。

### まとめ

本訓練では、シナリオから原因物質を推定し情報収集、協議を繰り返しながら、複数の分析方法による定性、定量分析するという健康危機管理における検査体制を確認することができた。今後も幅広い視野を持って情報収集力と分析技術の向上に努め検査体制強化を図るとともに、九州ブロックの関係機関と連携・協力体制を維持していきたい。

### 参考文献

- 1) 南谷臣昭, 他: 誤食中毒における原因物質究明マニュアルに関する研究～食用ユリ近縁植物のアルカロイド(リコリン、ガランタミン、コルヒチン)分析～, 東海公衆衛生学会学術大会抄録集, 56, 41 (2010).
- 2) 食品衛生検査指針(理化学編) 2015, 928-931, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京 (2015).
- 3) 浦山豊弘, 他: LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討, 37, 125-128 (2013).
- 4) 茶屋真弓, 他: LC/MS/MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討, 19, 67-71 (2018).