

イタリアワイン農薬混入事件

日本ではワインと言うと、「ボージョレ・ヌーボ」に代表されるフランスワインと、甘口で日本人に好まれるドイツワインが有名である。しかし、ワインの原料であるブドウの生産量は、1988年のデータでイタリア 983万ト、フランス 742万ト、旧ソ連 560万ト、米国 511万ト、スペイン 370万ト、ドイツ 145万トと、イタリアは世界一の生産量を誇っており、ドイツに比べると約7倍の生産量である。

ワインの生産量(1986年)も、イタリア 731万ト、フランス 709万ト、スペイン 381万ト、旧ソ連 200万ト、アルゼンチン 191万ト、アメリカ 168万トとイタリアは第1位であり、その20%を世界の各地に輸出している。日本で有名なドイツワインはかなり下位となっている。

南北に長いイタリアでは、気候条件や風土の違いから、赤用、白用合わせて300種以上の品種のブドウが栽培され、変化に富んだワインが作られている。さらに、国の厳しい管理下で生産され、需給関係が常に安定しているため、品質と価格のバランスが良く、これらがイタリアワインの好まれる原因であると言われている。

ワインの品質として、

- ①統制保証原産地呼称(DOCC)ワイン、
- ②統制原産地呼称(DOC)ワインの二つが上級ワインとして位置付けられている。

ラベルの表示には、①色調: bianco (白)、rosato (ロゼ)、rosso (赤) など ②甘辛: secco (辛口)、abboccato (中辛口)、amabile (中甘口)、dolce (甘口) ③醸造: classico (特定の古くからあるブドウ畑のブドウで作ったもの)、riserva (法で定めた最低熟成期間を超えたもの)、superiore (ワインごとに定められたアルコール濃度の規格に達したもの) 等がある。

昨年度のワインの総輸入量は「ボージョレ・

ヌーボ」ブームの1989年をピークに落込んではいないが、約4万6千ト輸入されており、トップはフランスの2万6百ト、ドイツ1万1千3百ト、米国5千3百ト、第4位のイタリアは3千7百トで約8%のシェアである。フランスワイン等の落込みにもかかわらず4年前の3倍の輸入量とイタリアワインは順調な拡大を続けてきたその矢先の今回の事件であった。

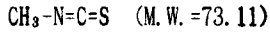
今回の事件の発端:

イタリア北東部ヴェネト地方のワイナリーで、ワインへの使用が許可されていないメチルイソチオシアネート(MITC)をワインに添加していたことが今年1月に発覚し、約3千トのワインが押収された。メチルイソチオシアネートは、日本では農薬として使用されているが、ワインの醸酵を止める目的では使用出来ない化学物質である。

今回問題となったワインが主に生産されたのは、イタリア北部のヴェネト州である。ヴェネト州は、水の都ヴェネツィアを州都にもち、ポー川の流れるパダノ=ベネタ平野にあり、北緯45度附近で日本でいえば稚内附近に当る。しかし、夏期に降雨もあり地中海性気候の影響も弱く、又アルプスの壁により北方からの寒波が防げるため、冬季も温和である。年平均気温は約13℃で稚内の年平均気温 6.4℃と比べると、かなり温暖であり(ちなみに名古屋15.1℃)、ブドウ栽培、ワイン製造には適した場所である。シェークスピアの作品で良く知られた「ロミオとジュリエット」の舞台となった町(実際の心中事件を題材としているとのこと)としても有名なヴェローナ市周辺では、大量のワインが生産されており、赤ワインの産地として有名である。白ワインでは辛口で後味のさっぱりしたソアーヴェが有名である。

今回問題となったメチルイソチオシアネートは、日本では劇物で次の様な農薬である。

用途：土壌くん蒸剤（殺虫剤）



一般名：methyl isothiocyanate

商品名：トバックス、ネレート、フィ・トバックス等

物性：無色結晶、ニンニク臭、mp=35℃、bp=117~119℃、水に0.76%溶け、有機溶媒に易溶。酸アルカリに安定。揮発しやすく水にやや溶け、反応性に富んでいる（アンモニアやアミンと反応）ので土壌消毒剤として、野菜の線虫や各種の病害防除に用いられている。

適用：キュウリ（ツル割病）、トマト、ナス（萎凋病）、イチゴ（萎黄病）、コンニャク（根腐病）、カーネーション（萎凋菌病）農薬登録保留基準：果実0.05ppm、野菜0.2ppm、茶0.1ppm、いも類0.5ppm

毒性：LD₅₀（ラット、経口）♂175 ♀72 mg/kg、（経皮）♂2780mg/kg、ラットに6ヶ月間30mg/kg/day投与したが毒性影響なし。皮膚、粘膜質膜の侵蝕及び炎症、胃障害、わずかな精子形成障害

事件の時間経過：

厚生省は4月15日米国食品医薬品局（FDA）で、イタリア産ワイン99検体を分析したところ、9検体から0.03~1.35ppmのメチルイソチオシアネートが検出されたとの情報を入手した。4月16日都道府県へ「ピノ・グリジョ（白）」「メルロ（赤）」「ソーヴェ」等8種類の販売・営業上の使用停止及び検査を通知するとともに、新聞等の報道発表をした。さらに、4月20日、厚生省はイタリア大使館等の情報に基づき、イタリアワイン製造者19社を前記通知に基づく措置の対象に追加し、報道発表した。検査の結果メチルイソチオシアネートが検出されたワインは食品衛生法第6条違反（不許可添加物）に該当するものとして措置するよう、都道府県に通知があった。そして、4月28日、厚生省は、今後の措置対象を21のワイン製造所とした旨を都道府県へ通知した。

当食品薬品部でも、17日（金）からワイン事件への対応を開始した。他府県の衛生研究所に電話連絡した結果、主だった他都府県でもメチルイソチオシアネートの標準品がまだ入手できていない、分析法の検討を始めたばかり、或いは分析機器の調整中等、殆どの地研でまだ分析を開始していない状況であった。国も分析法の検討中であった。我々も標準品を試薬メーカーに注文したが、翌週

の月曜日しか入荷しないとのことであり、標準品がなければ、分析法の検討も出来ず対応が遅れてしまう。幸い国立衛生試験所が標準品を保管しており、分与可能との返事を得たので、緊急時につきその日の内に食品獣医務課のスタッフに東京ま

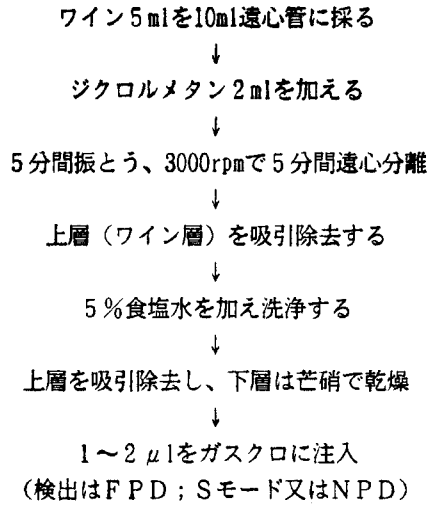


図1 ワイン中メチルイソチオシアネートの分析

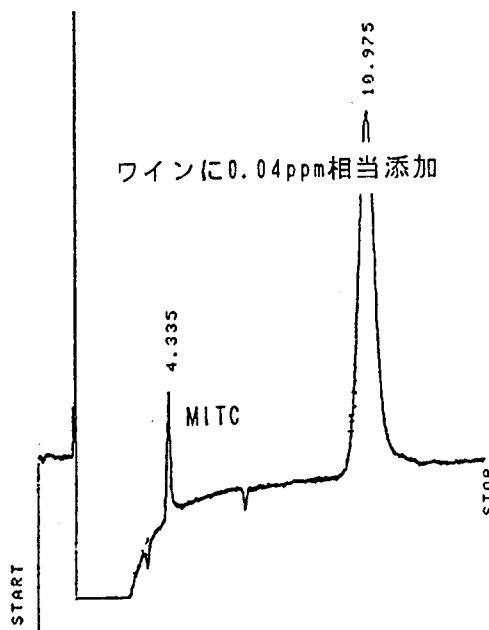


図2 ワイン中メチルイソチオシアネートのガスクロマトグラム例
(DB-WAX 0.53mm i.d. x 30m. column temp 90 °C, He 8ml/min)

で取りに行ってもらった。

同時にオンラインによる文献検索でメチルイソチオシアネートを検索したところ、分析法としては19件の文献がリストアップされた。中に、1件だけ「ワイン中発酵停止剤としてのメチルイソチオシアネートの分析」という1987年のイタリアの文献が見つかった。1987年においてメチルイソチオシアネートが、醸酵停止に使用されたとして記載されており、分析方法は、ワイン中からジクロロメタンで抽出してガスクロマトグラフィ（FPD, S-MOD）で測定、定量限界0.05ppm、回収率90%以上となっていた。我々も種々の方法を考えたが、今回は緊急時でもあり、ワインと振とうした場合、ジクロロメタンは下層となり水洗浄も容易で、かつ出来るだけ少量のサンプルから抽出できるため、図1の簡易迅速な方法で分析を行うこととした。

本法での定量限界は0.02ppmで、回収率は95%以上であり迅速に検査可能な方法であった。同時に、もしワイン中からメチルイソチオシアネートが検出された場合、構造的に確認するためにGC-MSでの分析方法の検討も行った。当初、ワイン中の様々な成分による妨害等も見られたが、分離カラムの選択やクリーンアップの検討等により、分析可能となり、準備万端整った。搬入されたワイン10検体の検査にかかり、幸いにも全てメチルイソチオシアネートは「検出せず」であった。

この時点での他都府県の分析状況はまだ検体の搬入中の所とか、分析法の検討をしているところが多く、どこも検査結果は持っていない状況であった。当所は非常に早い対応が出来たと確信している。18日午前中に国より分析法が送付されてきたので、この方法による検査も開始した。最終的には29件の分析を行い、全て「検出せず」であった。

東京都は128件収去分の内、34件分析した結果、メチルイソチオシアネート2件（0.75、0.57ppm）検出と発表。名古屋市が1件（0.22ppm）、他に大阪市等で発見された。他の全国の衛研等で数多く分析されたワイン中からはメチルイソチオシアネートは検出されていない。米国での検出率は約10%であったが、日本での検出率はかなり低いものと思われる。

メチルイソチオシアネートの健康への影響は、米国食品医薬品局（FDA）によると一日のワイ

ン消費量を1リットルと想定した場合、妊婦への許容量2ppm、その他の成人の許容量8ppmとされている。従って、問題となっているワインを飲酒しても、直ちに健康に影響を及ぼすものではないと考えられている。

1985年に起ったドイツワインにジエチレングリコールが混入していた事件を憶えておられる方も多いと思う。あの事件も、半年位前にオーストリアで高級ワインの味を出すために、不許可のジエチレングリコールが添加されていたというニュースがあり、大量に飲酒して死亡した人もいた。しばらくして日本国内であの大事件となり、毎日ワインの分析に明け暮れた記憶がある。今回のメチルイソチオシアネートは、ワインから溶媒で抽出することが出来たので、分析に関してはかなり楽であったように思われる。

今回の事件も、1月にイタリアでワインの発酵停止剤としてメチルイソチオシアネートの不正使用が摘発され、それに基づいて米国での調査が行われたという。世界中の多くの国からいろいろな食品を輸入している日本としては、食の安全を確保するという観点から世界各地で起きている食品に関連した（直接関係なくても汚染される可能性のあるものも含めて）事件、ニュースをいち早く収集して、その事件の程度、日本への波及等を速やかに調査し、危険性のある場合はそれに見合った検査を行う必要を今回も痛切に感じさせられた。

また、食品の安全にかかわるような緊急事件の時は、まずその物質に対する出来るだけ詳しいデータと、その検体からの分析方法と標準品が必要となる。これらの対応を、個々の衛研においてすみやかに行うことは、非常に困難であり、この対応方法として、初期の段階で、数箇所の衛研でグループ（予めそれぞれの得意な分野でチームを組んでおき、定期的に情報交換する）を作り、分析方法の検討、標準品の確保を早急に行うことで、国立衛試と共に情報のキーステーションとして機能し、より効率的かつ迅速な検査体制が出来るのではないかとと思われる。

（食品薬品部 斎藤勲）

パルスフィールドゲル電気泳動法の原理と操作

はじめに

1984年、D. C. SchwartzとC. R. Cantorによってパルスフィールドゲル電気泳動法(pulsed-field gel electrophoresis: PFGE)が開発された。従来の電気泳動では、20kb以下のDNAしか分離できないのに対し、PFGEは、50kbから10Mbにおよぶ巨大DNAを分離できる。PFGEは、ヒトをはじめ多くの生物種の染色体遺伝子解析に用いられており、染色体マッピングや物理地図作製を迅速化している。

ここに、PFGEの概要および方法について述べる。

1、パルスフィールドゲル電気泳動法の概要および実際

(1) 原理と種類

従来の電気泳動では、一定方向の単一の電場をかけることによって、DNAは長く伸びた状態でアガロースゲル中を移動し、ゲルマトリックスの分子ふるい効果によって分離される。しかし、アガロースゲルのポアサイズより大きい20kb以上のDNAは、分離できない。これに対しPFGEは、異なる二

方向の電場を交互にかけるため、DNAは方向転換しなくてはならない。大きなDNAほど方向転換に要する時間は長くなるので、相対的に移動距離は短くなり、分離が可能となる(図1)。PFGEには、電場の方向を変えるために種々の方法が考案されたが、現在では、六角形に24個の電極が配置されたCHEF(contourclamped homogeneous electric field gel electrophoresis)が一般的に用いられている。CHEFは、均一な電場が120°の角度で交互に作用するためにストレートなバンドが得られ、分離もよくなっている(図2)。

(2) 方法と材料

巨大DNA分子は、大変こわれやすいためアガロースゲル中に完全な細胞を埋め込んだ状態で調整する。以下の項では、主に細菌の例を中心に紹介する。

図3に示したように、増殖させた細菌にクロラムフェニコールを加えて、複製点を同調させる。Petit IV溶液にて遠心洗浄する。菌液を低融点アガロースと混合後、インサートモールドへ分注し、冷却、固化する。ゲルブロックをEclysis溶液にて処理し、細胞壁を除く。次に、BSP溶液にて処理し、溶菌する。保存ゲルブロックをPMSFにて処理し、BSP溶液中のProteinase Kを不活化する。TE溶液にて洗浄後、制限酵素にて処理を行う。ゲルブロックをアガロースゲルのウェルに封入後、泳動

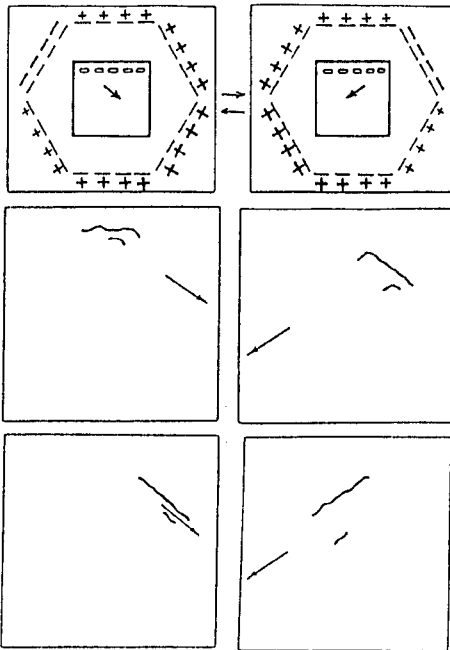


図1 パルスフィールドゲル電気泳動の原理

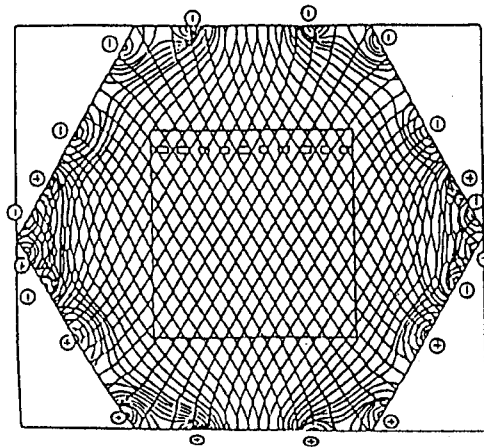


図2 パルスフィールドゲル電気泳動の電場

を行う。最後に、エチジウムブロマイド溶液にて染色したものを撮影する。

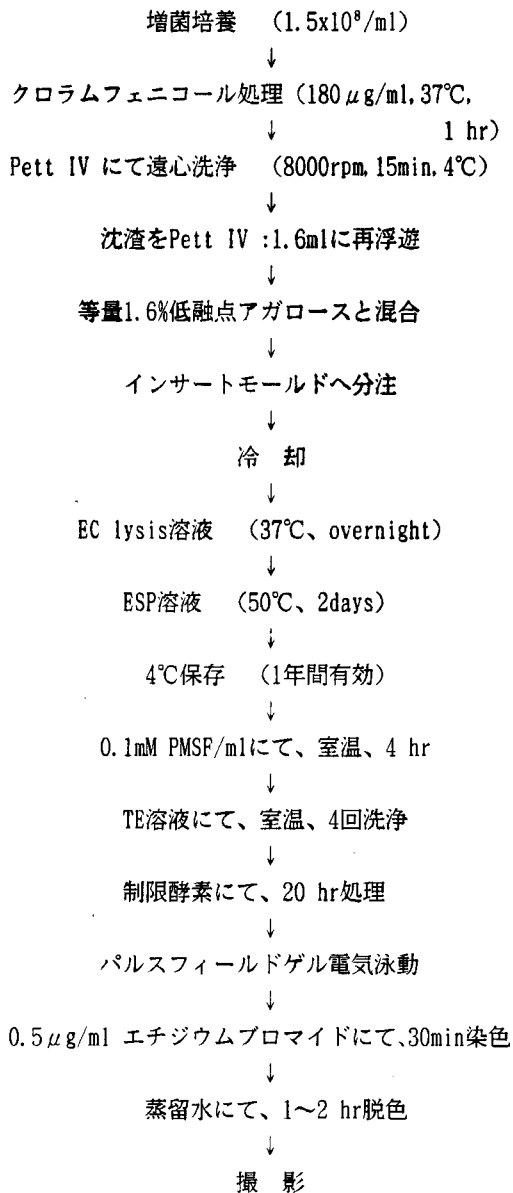


図3 パルスフィールドゲル電気泳動操作手順

(3) 泳動条件

分離したいDNAサイズによって泳動条件を選ぶ必要がある。DNAの泳動に影響を与える主なものは、以下の項目がある。

ア、アガロースゲル濃度：濃度が高いと分解能は高いが、泳動速度は、遅い。

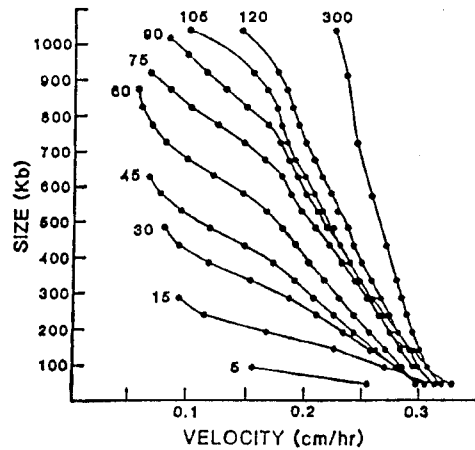


図4 遺伝子断片の分子量・移動度とパルスタイム(秒)の関係

イ、パルスタイム：長いと、大きいDNA断片を分離できるが、分解能は低下する(図4)。

ウ、電圧：上げると分離速度は上がるが、分解能は低下する。

エ、泳動時間：分離したいDNAのサイズが大きいほど、他の条件を分解能を上げるように設定しなくてはならない。従って、泳動時間は長くなる。

オ、緩衝液濃度および温度：スタンダードの条件は0.5xTBE、14°Cである。温度が高いほどDNAの泳動速度は速くなる。

(4) 制限酵素

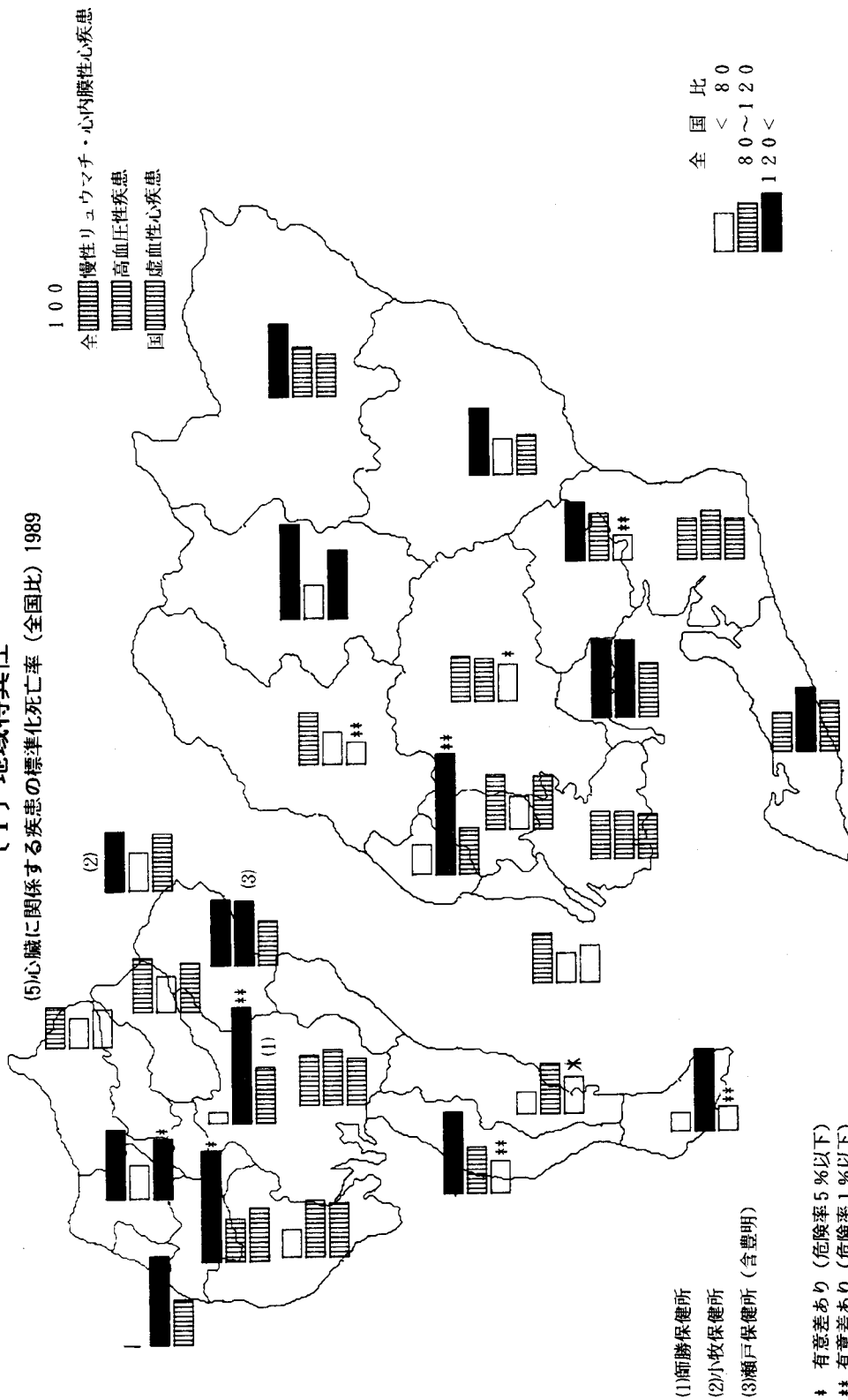
細菌の染色体DNAは、環状のため切断する必要がある。適当な数のバンドが得られる制限酵素を決めるのに、染色体DNAのGC含量がある程度の指標となる。

おわりに

以上、パルスフィールドゲル電気泳動法を用いて細菌の染色体遺伝子を解析する方法を紹介した。この方法を応用して、細菌、真菌および動物細胞等の核型の解析(細菌では、菌株の分類等)、遺伝子の染色体マッピング、YACクローンの解析、染色体制限酵素地図の作製、改変染色体の解析等が可能となった。さらに、細胞融合株の判定と解析、染色体異常の解析、遺伝子ライブラリーの効率よい作製等に利用できる。

(細菌部 鈴木康元)

〔I〕地域特異性
 (5)心臓に関する疾患の標準化死亡率 (全国比) 1989



(注) 人口データは1985年のものを使用した
 (厚生省地域保健医療計画支援システムより)
 (保健情報室)

この図を見てご意見・ご感想などありましたら、ご連絡下さい。