

平成28年度 衛生環境研究所セミナー プログラム

- ・日時 平成29年2月24日（金） 午後2時00分～午後4時40分
- ・場所 京都市衛生環境研究所 本館1階 会議室

開会のあいさつ	川上 雅弘 所長
---------	----------

京都市におけるマダニの生息調査について	微生物部門	長谷 昌巳
人囀法の時間経過と採集数の変化について	微生物部門	土佐 祐輔
重金属分析の前処理における固相抽出法の検討	環境部門	宮尻 久美
* 環境大気中および水道水中ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドのLC/MS/MSによる分析条件の検討	生活衛生部門	伴 創一郎
* DNPH誘導体化による繊維製品中のホルムアルデヒド分析法の検討	生活衛生部門	伴 創一郎
下痢性貝毒機器分析法に関する検討及び妥当性評価	生活衛生部門 第一検査室	高尾 恭平
*マイクロウェーブ分解装置を用いた魚介類水銀分析の妥当性評価	生活衛生部門	並河 幹夫
*魚介類中のメチル水銀測定法（通知法）について	生活衛生部門	伴埜 行則
京都市と畜場で発生した急性型豚丹毒について（症例報告）	食肉検査部門	浜田 絢也
関節炎型豚丹毒を疑い保留した豚からの菌検出率と抗体価及びリンパ節重量の相関関係について	食肉検査部門	谷 祐毅

総括と講評	川上 雅弘 所長
-------	----------

* 短報に掲載

京都市におけるマダニの生息調査について

微生物部門

○長谷 昌巳, 土佐 祐輔 (動物園), 今江 清朝

1 目的

マダニは、クモ綱ダニ目に属する。通常、山林の下草や地表に生息しており、哺乳類や鳥類、爬虫類等さまざまな動物を宿主とする吸血動物である。マダニは、吸血による刺咬被害だけでなく、吸血の際にさまざまな病原体を媒介しうる感染症媒介動物として注目されている。国内では、ダニ媒介性感染症として、従来からリケッチア感染症の日本紅斑熱やつつがむし病、ボレリアによるライム病、ウイルス感染症のダニ媒介性脳炎等が知られてきた。さらに、平成25年1月に、以前より中国から報告されていた新しいウイルス感染症「重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)」に感染した患者が国内で初めて報告されたことから、マダニに対する関心が集まっている。

平成23年度以降、刺咬被害や感染症を引き起こすマダニの京都市内における生息状況を調査しており、北部、東部、西部周辺の山間地域及び山際の人が通る場所において、多種多数のマダニが生息していることを確認している。

マダニ自身はあまり移動しないが、宿主である野生動物の移動により寄生するマダニが遠距離に運ばれる場合もある。近年、京都市中心部を流れる鴨川周辺に、市北部の八瀬や宝ヶ池に近い山から餌を求めて複数のシカが鴨川の下草をたどって南下しているとの情報があり、平成28年4月には三条大橋及び七条大橋の鴨川沿いで野生のシカ2頭が目撃されている。シカやイノシシ等の大型の哺乳動物は、マダニの繁殖や維持に必要な吸血源として主要な野生動物であるため、これらの野生動物が南下することによって、市周辺部に生息するマダニが市内を流れる河川に沿って生息範囲を拡大する可能性は十分に考えられる。そこで、京都市内を北部から南部にかけて流れる主要な河川(高野川、鴨川、桂川)の河川敷を調査した。

また、平成26年度から、野生シカの目撃情報がある宝ヶ池公園近くの山中へ月一回採集に出向き、マダニの年間消長を観察しており、季節によるマダニの優占種の変化をみた。

2 方法

(1) マダニの採集と同定

フランネル布を用いた flagging 法 (旗づり法) によって植生上のマダニを採集した。採集したマダニは、外部形態により種の同定を行い集計した。

(2) 採集場所

- ① 桂川流域 (松尾橋～淀水垂)
- ② 高野川流域 (宝ヶ池公園～鴨川合流点)
- ③ 鴨川上流域 (北区上賀茂中嶋河原地内～賀茂大橋)
- ④ 鴨川中流・下流域 (賀茂大橋～鳥羽大橋)
- ⑤ 宝ヶ池公園近くの山中

3 結果と考察

今回調査を実施した桂川、高野川及び鴨川の河川敷では、マダニは採集されなかった。河川の上流部付近では植生が多くみられていたが、数年前から河川の護岸整備工事が行われており、マダニの移動に影響を与えている可能性が考えられた。

宝ヶ池公園近くの山中で採集できたマダニは、キチマダニ 402 個体、フタトゲチマダニ 221 個体、タネガタマダニ 1 個体の計 624 個体であった。調査期間を通じてキチマダニが全体採集の 64.9% を占めており、優先種となっているものと考えられた。これらマダニの季節的な消長をみると、フタトゲチマダニは、4月～8月にかけて多く採取できたが、9月以降は採集数が減少し、10月～2月の冬季の間はほとんど採取されなかった。一方、キチマダニは6月～8月

にかけては全く採取されず、10月～4月にかけて多く採取された。

フタトゲチマダニの若虫は、3月～4月にかけて大きなピークがあり、その後、成虫が現れた。6月～7月にかけて成虫の発生ピークがみられた後、秋頃に再び若虫が採取されたが、11月以降の冬季は若虫及び成虫ともにほとんど採集されなかった。成虫の活動は、4月～9月に観察され、夏型の季節消長を示した。

キチマダニは、若虫及び成虫ともに6月～8月までは全く採取されず、11月頃から若虫の捕集数が増加し、発生ピークは12月であった。成虫は秋から冬にかけてやや多くみられたが、6月～8月は全く採集されなかった。

4 まとめ

今回の調査では、京都市内を流れる主要な河川の河川敷でマダニは確認できなかったが、マダニは動物を吸血している間に運ばれて移動するため、山地だけでなく、集落周辺の草地や住居の庭等、身近な場所の植生上でみられる可能性は十分にある。

また、今回確認できたマダニについては、ほぼ年間を通じて生息活動していること、採集される時期によってフタトゲチマダニとキチマダニの優先種が異なることが明らかとなった。これらのマダニは、SFTS 及び日本紅斑熱を媒介する可能性が示唆されていることから、マダニに咬まれないよう注意する必要がある。

マダニ媒介性感染症は、蚊が媒介する感染症ほど派手な流行を起こすことはないが、さらに感染地域が広がっていくものと予想される。今後も継続して京都市におけるマダニの生息状況を調査するとともに、マダニの刺咬被害について市民啓発を行うことが重要であると思われる。

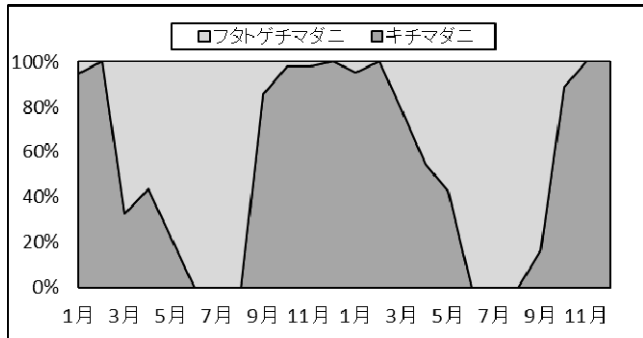


図1: 採集数全体に占める割合

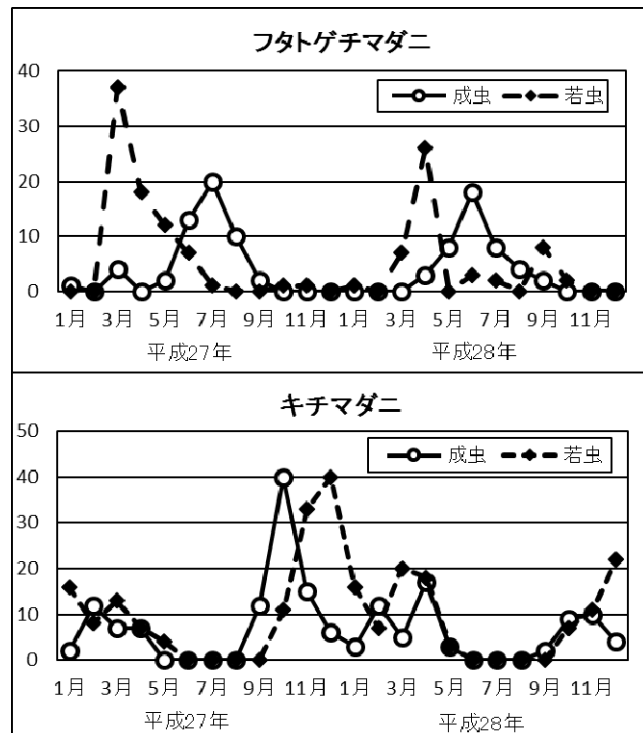


図2: 主要なマダニの月別採集個体数

人囮法の時間経過と採集数の変化について

微生物部門 ○土佐祐輔 (動物園), 長谷昌巳, 今江清朝

1 諸言

デング熱は、デングウイルスの感染によって発症する蚊媒介性感染症である。この疾病は、日本国内においてはヒトスジシマカにより媒介される¹⁻³⁾。

デング熱の国内感染が発生した場合、患者の発生時期が、蚊の増加期であるか減少期であるかによって対応が異なる⁴⁾。このために、毎年サーベイランスを行い、平時の発生状況を正しく把握しておくことが重要である⁴⁾。

国立感染症研究所によれば、ヒトスジシマカの成虫の生息調査は8分間人囮法で行うことが望ましい²⁾とされている。この採集時間は、採集者の労力を考えて設定されている^{2, 5)}。一方、これまでの人囮法を用いたヒトスジシマカの調査は、5分⁶⁾、10-15分⁷⁾、30個体採集時点⁷⁾など様々な条件で実施されてきた。

そこで本研究では、8分間人囮法がヒトスジシマカメス成虫の採集に適切であるかを検討する。これを明らかにすることにより、今後蚊の生息調査を行う際の条件設定の根拠とすることができる。

2 方法

本調査では、2016年4月-2017年1月まで、1週間に2回の割合で人囮法によるヒトスジシマカメス成虫の採集調査を行った。調査地は京都市中京区に所在する京都市衛生環境研究所の植え込み内で行った。時間は4,8,12,16,20,24分で区切り、4分毎に網を交換した。

採集した蚊は直後に冷凍庫内で1時間冷却し、実体顕微鏡下で形態学的分類法^{8, 9)}に従い鑑別・集計した。

得られたデータを、以下の(1)から(3)の検討に供した。

- (1) 8分間人囮法で蚊の生息密度を決定してよいか
ヒトスジシマカメス成虫が採集された日のデータについて採取時間ごとに平均を求め、その前後の採集数平均との差をWilcoxon検定で調べた。
- (2) 8分間毎の移動で採集効率率は最大となるか
ヒトスジシマカメス成虫が採集された日のデータについて、各々の日の24分時点で採集された総数に対する採集率を求めた。採集時間ごとにその平均を求め、1分当たり採集効率を求めた。採集地点間の移動及び処理時間は2.5分として計算した⁵⁾。
- (3) 8分間は蚊の年間消長調査を行うに充分であるか
採集時間ごとに年間消長を作成し、8分間人囮法の結果

から求められる蚊発生のピークと差があるか調べた。

3 結果

ヒトスジシマカのメスが採集された調査日は2016年5月9日から2016年11月21日までの間の57日であった。

(1) 8分間人囮法で蚊の生息密度を決定してよいか

0-4分での平均採集数は 12.28 ± 1.67 個体、4-8分での平均採集数は 3.58 ± 0.82 個体、8-12分での平均採集数は 2.72 ± 0.43 個体、12-16分での平均採集数は 1.49 ± 0.26 個体、16-20分での平均採集数は 1.18 ± 0.22 個体、20-24分での平均採集数は 1.21 ± 0.31 個体であった。0-4分の平均採集数と4-8分の平均採集数、8-12分の平均採集数と12-16分の平均採集数の間には各々有意な差($P < 0.01$)があった(図1)。

(2) 8分間毎の移動で採集効率率は最大となるか

採集時間4, 8, 12, 16, 20, 及び24分での1分当たり採集効率は各々、7.8, 6.5, 5.6, 4.7, 4.2, 及び3.8%となった(図2及び表1)。

(3) 8分間は蚊の年間消長調査を行うに充分であるか

4分間採集のピークは2016年9月23日であり、8-24分採集のピークである2016年9月9日とは異なった(図3, 4)。

4 考察

0-4分をピークに採集数の再増加が見られなかったことから、8分間の採集の結果は地域の生息密度を正しく反映すると考えられた。なお、24分間でその地域の蚊をすべて採集できたと仮定した場合、採集総数に対する8分間人囮法の採集率は68.0%であり、調査地域の約7割の蚊を採集できると考えられる。

蚊の採集効率を検討したところ、4分間人囮法を繰り返す方が、8分間人囮法を繰り返すよりも効率が良いと考えられた。採集効率は、各採集時間を短くするほど良くなると考えられた。

8-24分の人囮法で蚊の季節消長を比較したところ、4分間人囮法のみ他と異なるピークを示した。このため4分間人囮法では蚊の増加期と減少期のピークを見誤る可能性が考えられた。季節消長を求めるためには、8分間以上の採集を行う必要があると思われる。

5 結論及び評価

以上のことから、蚊の生息調査を行うためには8分間以上の人囀法が適切であると考えられた。より多くの場所で採集を実施するため、また調査者の労力を短縮するためには可能な限り採集時間が短いほうが良いので、8分間人囀法が最適であろう。一方、蚊媒介感染症の国内感染が発生した場合など、緊急に大量の蚊を採集する必要がある場合には、4分で採集地点を変更することも検討すべきと考えられた。

6 文献

- (1) 津田良夫. デング熱媒介蚊の生態(東南アジアを例として). IASR Vol.25:34-35, 2004
- (2) 国立感染症研究所. デング熱・チクングニア熱等蚊媒介感染症の対応・対策の手引き 地方公共団体向け, 2016
- (3) 関なおみ, 岩下裕子 他. 東京都におけるデング熱国内感染事例の発生について. 日本公衛誌. 238-249, 2015
- (4) 国立感染症研究所昆虫医科学部. 感染症媒介蚊対策に関する実技検討会資料. [http:// www.nih.go.jp/niid/images/ent/PDF/dengue2014.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/ent/PDF/dengue2014.pdf), 2014
- (5) 津田良夫. 蚊の観察と生態調査. 北隆館, 2013
- (6) 厚生労働省. ウエストナイル熱媒介化対策に関するガイドライン. http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaaku-kansenshou18/pdf/05-07_3.pdf, 2003
- (7) 岐阜県保健衛生環境研究所. 感染症媒介蚊生息実態調査. http://www.health.rd.pref.gifu.lg.jp/seikatu/PDF/mos_2.pdf, 2016
- (8) 佐々学, 栗原毅, 上村清. 蚊の科学. 北隆館, 1976
- (9) 田中和夫. カ科. 新訂 原色昆虫大図鑑Ⅲ(平嶋義宏・森本桂 監修). 北隆館, 2008

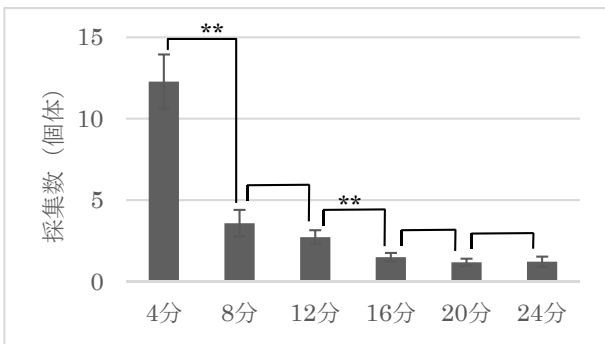


図1: 採集時間毎の平均採集数±標準誤差 (個体), Wilcoxon 検定, n=57, **P<0.01

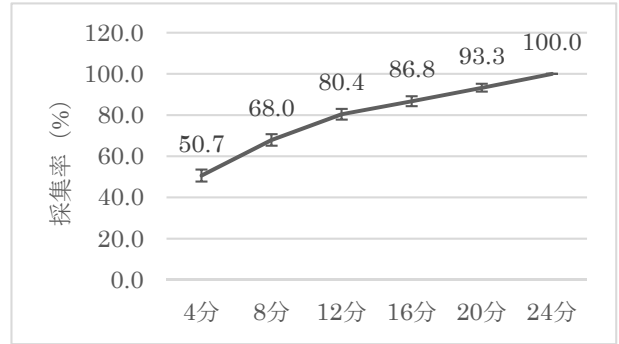


図2: 採集時間毎の採集率±標準誤差 (%), n=57

採集時間 (分)	4	8	12	16	20	24
24分時点での総採集数に対する採集率 (%)	50.7	68.0	80.4	86.8	93.3	100.0
1分当たり採集率 (%)	7.8	6.5	5.6	4.7	4.2	3.8

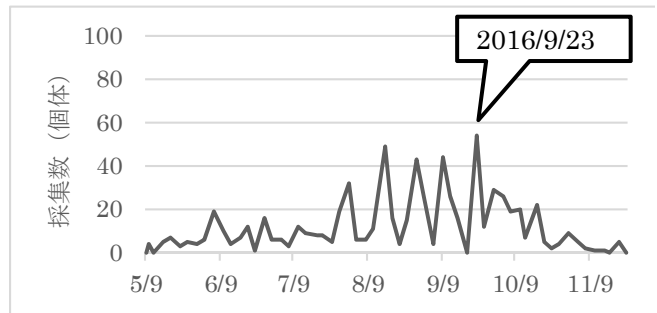


図3: 各採集時間データに基づく年間消長 (4分)

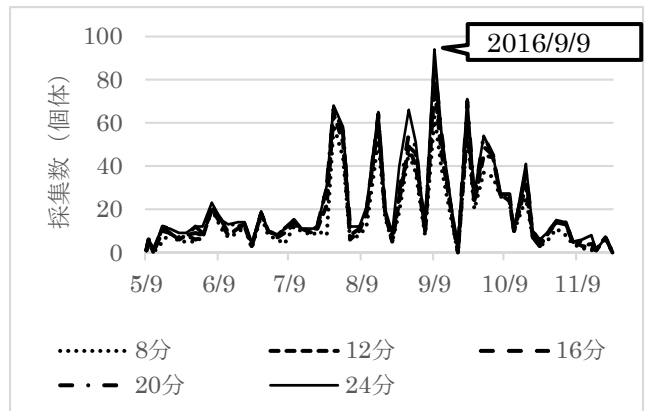


図4: 各採集時間データに基づく年間消長 (8-24分)

重金属分析の前処理における固相抽出法の検討

環境部門 宮尻久美（京都府保健環境研究所） 柴田さよ（医療衛生センター）

西村仁志 小林博恭 水谷聡之（廃棄物指導課）

I はじめに

海水、温泉、土壌等の天然試料中の微量金属を測定する際、マトリクスとして含まれる Na や Ca などアルカリ金属、アルカリ土類金属の干渉が問題となる。従来、溶媒抽出法やイオン交換樹脂法が行われてきたが、操作が煩雑であったり、有機溶媒使用量が多いなどの問題があった。近年、酸性条件下ではアルカリ金属、アルカリ土類金属を補足しないキレート樹脂を用いた固相抽出法が広く行われるようになり、環境基準項目の測定方法にも採用されている。当部門では、重金属分析の加熱分解後の前処理は、加熱濃縮及びろ過を行っているが、耐酸性・耐有機溶媒性を備えた自動固相抽出装置が導入されているので、その装置を使用してキレート樹脂を用いた固相抽出法の検討を行った。

II 実験方法

1 装置

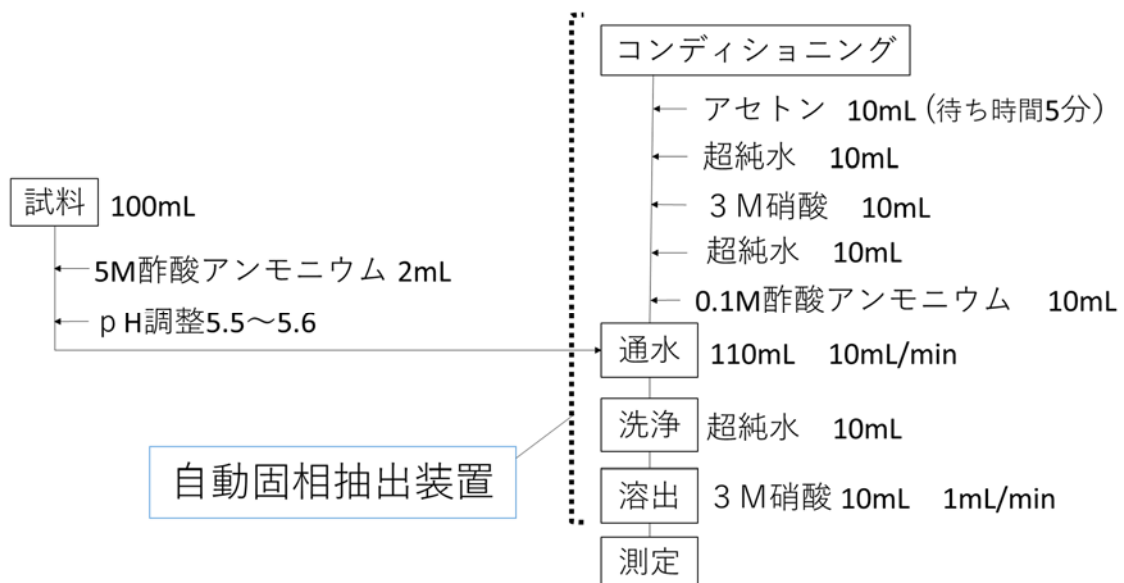
日立ハイテクノロジーズ製 自動固相抽出装置 SPE-100

日立ハイテクノロジーズ製 原子吸光光度計 Z-2010

日立ハイテクノロジーズ製 ICP 発光分析装置 P-4000 形（本検討の前半のみ使用）

2 試験方法

操作手順



添加回収試験の試料調整

各元素の測定法

Fe,Mn,Ni,Cu,Zn,Cr : フレーム原子吸光法

Pb,Cd : 電気加熱原子吸光法

III 結果

表1 各固相カートリッジによる各元素の回収率 (%)

	Fe	Mn	Ni	Cu	Zn	Cr	Pb	Cd
PA	53	79	118	111	107	3	99	95
PB	50	67	102	106	108	3	92	90
ME	40	105	102	112	98	1	91	94
EZ	44	97	94	101	99	1	85	88

PA : 日立ハイテクノロジーズ製 ノビアスキレート PA1

PB : 日立ハイテクノロジーズ製 ノビアスキレート PB1

ME : ジーエルサイエンス製 InertSep ME-1

EZ : スリーエム製エムボアディスクEZカートリッジキレート

Cr は、キレートに保持されない。

Fe,Mn は、pH や通液速度等の影響を受けやすいので最適化が必要である。

表2 ばいじん溶出液の銅の測定における固相抽出の効果(mg/L)

	加熱濃縮・ろ過	固相抽出
10倍濃縮	0.1270	0.0381
5倍	0.0096	0.0415
2倍	0.0208	0.0374
1倍	0.0216	0.0349

精度管理調査結果平均値 0.0324

IV 考察

自動固相抽出装置での回収率は安定せず、ほとんど回収できないことが多くあった。そこで、どこかで酸が混じってしまっていて流れ出るのではないかと考え検討した結果、カートリッジを酸洗浄した後、酸のラインを超純水に置換することで改善できた。

表1に、市販のイミノ二酢酸キレート樹脂を充填したカートリッジの各元素の回収率を示した。いずれのカートリッジも、超純水への添加回収では良好な結果であった。

表2に、平成28年度環境測定分析統一精度管理調査試料の測定結果を示した。ばいじんの溶出液であり、塩類濃度が高いので注意するようにとの記載が実施要領にあり、溶媒抽出や固相抽出による塩類除去が必要であった。長期保存した試料を再度測定してみた結果なので正確ではないが、固相抽出によるマトリックス除去の効果がうかがえる。

V まとめ

- 1 キレート樹脂による固相抽出を、自動固相抽出装置を用いて試みたが、良好な回収率が得られた。
- 2 塩類濃度の高い試料について、固相抽出によるマトリックス除去が有効であることが分かった。

下痢性貝毒機器分析法に関する検討及び妥当性評価

生活衛生部門 第一検査室

岩崎 真行, ○高尾 恭平 (健康安全課), 中川 大輔, 須藤 悠悟

1 はじめに

ホタテガイやカキなどの二枚貝は、有毒プランクトンを摂食することで毒素を一時的に蓄積し、これを喫食することにより食中毒が引き起こされることがある。この毒素は貝毒と総称され、日本では主に麻痺性貝毒と下痢性貝毒の二種類が知られている。これらの貝毒によって毒化した二枚貝の取り扱いについては、「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて」（昭和 55 年 7 月 1 日付け環乳第 29 号）に基づき、規制値（麻痺性貝毒については可食部 1g あたり 4 マウスユニット、下痢性貝毒については、可食部 1g あたり 0.05 マウスユニット）を超えるものについては、流通規制処置が取られている。当検査室においても、食の安全・安心を担保するため京都市中央卸売市場内（以下、市場）に流通している二枚貝を収去し、貝毒の検査をマウス毒性試験法により行ってきた。しかし、マウス毒性試験法は、精度や感度の悪さ、特異性の低さ、動物実験という倫理面等の様々な問題が指摘されているため、下痢性貝毒であるオカダ酸群（OA, DTX-1, DTX-2）については、分析機器による定量法が EU では 2011 年に、米国では 2012 年に導入されている。本邦でも「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取り扱いについて」（平成 27 年 3 月 6 日付け食安発 0306 第 1 号）及び「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」（平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発 0306 第 4 号、食安監発 0306 第 2 号）により、下痢性貝毒の新たな規制値（オカダ酸群に対して 0.16mg オカダ酸当量/kg）及び LC-MS/MS によるオカダ酸群機器分析法（以下、通知法）が通知された。平成 29 年 4 月には機器分析法に完全移行し、マウス毒性試験法が廃止されるため、当検査室においても、検体種ごとに試験法の妥当性を評価し、通知の定める基準（表 1）を満たすことを確認する必要がある。通知法では、ホタテガイについては妥当性、アサリ及びイガイについては、真度と併行精度が基準を満たすことが確認されている。しかし、市場に流通しているその他の二枚貝についても妥当性評価を実施する必要がある。そこで今回、市場での流通頻度が高いアサリ、ホタテガイ、イガイ及びアカガイについて、通知法を一部変更し精度管理基準を満たすことができるよう条件の検討を行い、妥当性評価を実施したので報告する。

2 方法

(1) 試験溶液の調製

試料 2.0 g を量り採り、メタノール 9 mL を加え、ホモジナイズした後、室温で 9,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清をとった。沈殿に 90 %メタノール 9 mL を加えホモジナイズした後、同様に遠心分離した。得られた上清を合わせ、90 %メタノールを加えて正確に 20 mL とした。この内、2 mL を分取し、2.5 M 水酸化ナトリウム 0.25 mL を加え、

76℃で40分間加水分解した。放冷後、2.5 M 塩酸 0.25 mL を加えて中和し、n - ヘキサン 2.5 mL を加えて振り混ぜた後、4,200 rpm で3分間遠心分離し、n - ヘキサン層を除去した。再び n - ヘキサン 2.5 mL を加えて振り混ぜた後、4,200 rpm で3分間遠心分離し、エタノール・水層を分取した。蒸留水 2.5 mL を加えて良く混和したものを、予めメタノール 3 mL、蒸留水 3 mL でコンディショニングした ODS 精製カラムに負荷した後、容器を 40 %メタノール 2 mL で2回洗い込み、洗液もカラムに負荷した。カラムを水 3 mL、40 %メタノール 3 mL で順次洗浄した後、90 %メタノール 3 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で減圧濃縮後、窒素気流下で溶媒を完全に除去した。残留物をメタノール 2 mL に溶解し、これを DISMIC-13HP (PORE SIZE : 0.20 μm)に通じたものを試験溶液とした。

(2) 測定条件

- ア カラム : X-Bridge (Waters 社) 2.1 mm i.d. x 150 mm, 粒子径 3.5 μm
 イ 移動相 : 0.05 vol %アンモニア水 (A 液) 及びアセトニトリル (B 液)
 ウ 流速 : 0.2 mL/min
 エ カラム温度 : 40 °C
 オ グラジエント条件 (B 液) : 20%(0 min) → 20%(2.5 min) → 25%(5 min) → 25%(17.5 min) → 27%(20 min) → 27%(30 min) → 100%(30.01 min) → 100%(35 min) → 20%(35.01) → 20%(40 min)
 カ 注入量 : 3 μL
 キ イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法
 ク インターフェイス電圧 : - 3.5 kV (Negative mode)
 ケ ネブライザーガス流量 : 3.0 L/min
 コ ドライニングガス流量 : 15 L/min
 サ ヒートブロック温度 : 400 °C
 シ DL 温度 : 250 °C
 ス 検出条件

分析対象物質	ESI	プリカーサイオン	CE	プロダクトイオン
OA	-	803.5	54	255.2
			70	113.1
DTX1	-	817.5	68	113.1
			55	255.2
DTX2	-	803.5	70	113.1
			54	255.2

(3) 妥当性評価方法

通知に従い、アルカリ加水分解直前の抽出液に各標準溶液を各オカダ酸群につき 0.05mg/kg となるよう添加し、1名が1日1回 (2 併行) で5日間実施する枝分かれ実験

計画により、妥当性評価試験を行った。

事前に試料に含有されているオカダ酸群の測定を行った結果、アサリ及びホタテガイについてはオカダ酸群を含有していないことを確認し、ブランク試料として使用したが、アカガイ及びイガイについては、OA 及び DTX1 を低濃度含有していることが確認され、また、オカダ酸群を含有していない試料の入手が困難であったため、トレース試料(添加濃度に比べ影響を無視できる程度の濃度を含む試料)として使用した。

3 結果・考察

(1) LC 条件の検討

国の通知による LC 条件は移動相にギ酸を含有した酸性溶液を用いており、グラジエント条件は有機溶媒濃度 40 %を 2.5 分間維持し、40 ~ 100 %までの濃度勾配を 5 分間行うというものであるが、この条件を用いてオカダ酸群標準溶液の測定を行ったところ、通知の求める下限である 0.01 mg/kg 相当濃度(1 ng/mL)において定量に十分な S/N 比 10 以上のピークが観測されなかった。また、添加濃度相当(5 ng/ml)の溶媒希釈標準溶液と、ホタテガイ試験溶液を用いて作製したマトリックス添加標準溶液を比較したところ、OA では 0.960、DTX1 では 0.876 とマトリックス効果は見られなかったが、DTX2 で 1.854 と大きなマトリックス効果が見られた。そこで感度とマトリックス効果についての問題点を解決するため、LC 条件の検討を行った。

まず、感度に関してであるが、今回測定対象であるオカダ酸群は 3 種類ともカルボキシル基を持つため、ESI のネガティブモードによるプロトン脱離によりイオン化が起りやすい。一般にプロトン脱離によるイオン化は、イオン化時の pH が分析対象物の pKa より高い場合に効率よく起こるため、移動相を通知のギ酸含有の酸性条件から、水相に 0.05vol %アンモニア水、有機相にアセトニトリルを用いる塩基性条件に変更した。また、これに伴い、分析に用いるカラムも耐塩基性 ODS カラムに変更した。その結果、通知の求める下限である 0.01 mg/kg 相当濃度(1 ng/mL)においても S/N 比が 10 以上のピークが得られるようになった。

次に、マトリックス効果を改善するための検討を行った。通知法では 5 分間という短時間で 40 ~ 100 %までの濃度勾配を行っているが、今回の検討では分析対象物のオカダ酸群とマトリックスを効率よく分離するため、まず、塩基性条件下でそれぞれのオカダ酸群について、アイソクラティック分析条件を検討した。その結果、アセトニトリル濃度が 25 ~ 30 %程度のときに良好なピーク形状と適度な保持時間が得られた。そこで、3 成分同時分析にはアセトニトリル濃度 20 %を 2.5 分維持した後、2.5 分で 20 ~ 25 %の濃度勾配を行い、その後 25 %を 17.5 分まで維持し OA 及び DTX2 を検出後、2.5 分で 25 ~ 27%の濃度勾配を行い 27%とし、30 分まで維持し DTX1 を検出する条件としたところ、マトリックス効果は表 2 のように良好となった。

(2) 妥当性評価結果

ア 添加回収試験

アサリ、ホタテガイ、イガイ及びアカガイについて、マトリックス効果が軽減で

きたことを受け、溶媒標準検量線を用いて定量し、真度、併行精度(RSD%)及び室内精度(RSD%)を求めたところ、表3の示すとおり通知の求める基準を満たすことができた。

イ 選択性

アサリ及びホタテガイのブランク試料のOA, DTX1及びDTX2のエリア値について、それぞれ定量下限値のエリア値の1/10以下となり、性能基準を満たすことができた。イガイ及びアカガイについては、トレース試料を用いたため、OA及びDTX1の評価は困難なことから性能基準は満たしていると判断した。今後、ブランク入手でき次第、追加し検討を行う予定である。なお、DTX2については、性能基準を満たすことができた。

表1 通知の求める分析法の性能基準

性能基準	
選択性	妨害ピークの面積が、0.01mg/kgに相当するピーク的面積と比較し1/10未満であること
真度(%)	70 ~ 120
併行精度(RSD%)	15以下(自由度4以上)
室内精度(RSD%)	20以下(自由度4以上)
定量限界	0.01mg/kg以下

表2 検討法条件におけるアサリ、ホタテガイ、アカガイ及びイガイのマトリックス効果

	アサリ		ホタテガイ		アカガイ		イガイ	
	1 ng/mL	5 ng/mL	1 ng/mL	5 ng/mL	1 ng/mL	5 ng/mL	1 ng/mL	5 ng/mL
OA	0.882	0.915	1.021	0.915	0.902	0.914	0.932	0.968
DTX1	0.985	0.941	0.944	1.013	0.974	1.017	0.884	1.064
DTX2	0.920	0.912	0.950	0.976	1.001	1.030	0.931	1.010

表3 アサリ、ホタテガイ、アカガイ及びイガイの妥当性評価試験結果

	アサリ			ホタテガイ			アカガイ			イガイ		
	真度(%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)	真度(%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)	真度(%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)	真度(%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)
OA	80.6	6.1	15.8	75.5	9.3	12.6	87.4	3.8	5.4	91.1	3.2	5.4
DTX1	84.2	4.4	17.9	81.6	9.9	13.2	93.9	6.1	9.6	95.0	5.5	11.2
DTX2	81.5	4.0	15.5	79.8	10.5	10.6	77.0	2.4	10.3	80.7	7.1	15.1

4 まとめ

オカダ酸群の分析法として、移動相を通知法のギ酸含有の酸性条件からアンモニア含有の塩基性条件へ変更することにより感度が上昇し、下限値において十分なピークが得られるようになった。また、グラジエント条件を変更することでマトリックス効果の軽減が可能となった。この検討法でアサリ、ホタテガイ、イガイ及びアカガイについて、妥当性評価試験を実施しところ、通知の求める基準を満たすことができた。このことから、本検討における分析方法は今回検討した4種について行政検査に用いることが可能となった。

今後は、今回検討した4種以外の二枚貝の除去検査も想定されるため、その他の二枚貝についても妥当性評価試験を行っていく予定である。

京都市と畜場で発生した急性型豚丹毒について（症例報告）

食肉検査部門

○浜田 絢也, 谷 祐毅, 児玉 泰輔, 力身 覚 (微生物部門), 小野寺 佳隆, 川崎 成人

【背景・目的】

豚丹毒は豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) を起因菌とし家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定され、またと畜場法においても全部廃棄疾病に指定されている豚の感染症である。

また豚丹毒は病型により急性の敗血症型、亜急性の蕁麻疹型、慢性の心内膜炎型および関節炎型に分類される。従来京都市と畜場において認められる豚丹毒はほとんどが関節炎型であり稀に蕁麻疹型および心内膜炎型が散見されていたが、今回、京都市と畜場において急性敗血症型豚丹毒事例が発生したためその概要を報告する。

【材料・方法】

平成28年5月、前日に京都府外のA農場より搬入された豚30頭中2頭の死亡を生体検査時に確認した。死亡した豚はいずれも腹部および耳介に著しいチアノーゼ様暗赤色班が確認された。死亡豚以外にもチアノーゼを呈し起立不能である個体(No.1)を確認した。その後解体検査においてチアノーゼや臓器のうっ血が認められた個体(No.2, No.3)および生体検査でチアノーゼを呈していた個体(No.1)を疑敗血症として保留にし、精密検査を行った。

精密検査の検査材料は、筋肉(横隔膜)、脾臓、腎臓、肝臓および肺を用いた。菌分離は血液寒天培地(好気)、変法GAM血液寒天培地(嫌気)、Tween80加トリプトソイブイオン(好気)、ラパポート培地(好気)およびトリプトソイブイオン(好気・嫌気)を用い、37°Cで24時間培養を行った。分離菌はグラム染色にて菌性状を確認し、カタラーゼテスト、PCR検査を行い判定した。

【成績】

No.1およびNo.3はすべての臓器から、またNo.2は肺を除く臓器のスタンプからカタラーゼテスト陰性のグラム陽性桿菌が分離され、豚丹毒菌の23S rRNAを標的としたPCR検査で陽性であった(表1)。

【考察】

これらの結果より、No.1, No.2およびNo.3を急性敗血症型豚丹毒と判定し、豚丹毒として全部廃棄処分とした。またA農場を管理する管理獣医師に電話にて報告および聞き取りを行ったところ、A農場は不活化ワクチンを2度接種しているが、通常ならば6か月齢で出荷するところを肥育期間を延長し9か月で出荷しているためワクチンの効果が低減あるいは消失し発症に至った可能性が考えられるため今後はワクチンプログラムを見直し改善するということであった。その後はA農場の豚について続発して急死事例、敗血症事例は発生していない。

豚丹毒は平成18年に豚コレラ・豚丹毒混合生ワクチンの接種が全面的に中止されるとともにワクチン接種率が低下しており、全国的にも発生が増加傾向にある(図1)ため、今後も今回のような事例に遭遇する機会も増える可能性がある。その際は同じくチアノーゼを呈する急性感染症の豚コレラとの鑑別が必要となるため検査員全員が豚丹毒および豚コレラの知識を身に付け迅速な対応ができる体制を整えるのが今後の課題である。

表1 保留豚の生体検査，解体後検査および細菌検査の結果

	性別	生体検査・解体後検査所見	細菌検査所見	行政処分
No.1	去勢	起立不能，チアノーゼ 脾臓，腎臓，肝臓にうっ血	筋肉，脾臓，腎臓，肝臓，肺のスタンプにてグラム陽性桿菌 →カタラーゼテスト陰性，PCR 陽性	全部廃棄 (豚丹毒)
No.2	去勢	チアノーゼ 脾臓，腎臓，肝臓にうっ血	筋肉，脾臓，腎臓，肝臓のスタンプにてグラム陽性桿菌 →カタラーゼテスト陰性，PCR 陽性	全部廃棄 (豚丹毒)
No.3	去勢	チアノーゼ 脾臓，腎臓，肝臓にうっ血	筋肉，脾臓，腎臓，肝臓，肺のスタンプにてグラム陽性桿菌 →カタラーゼテスト陰性，PCR 陽性	全部廃棄 (豚丹毒)

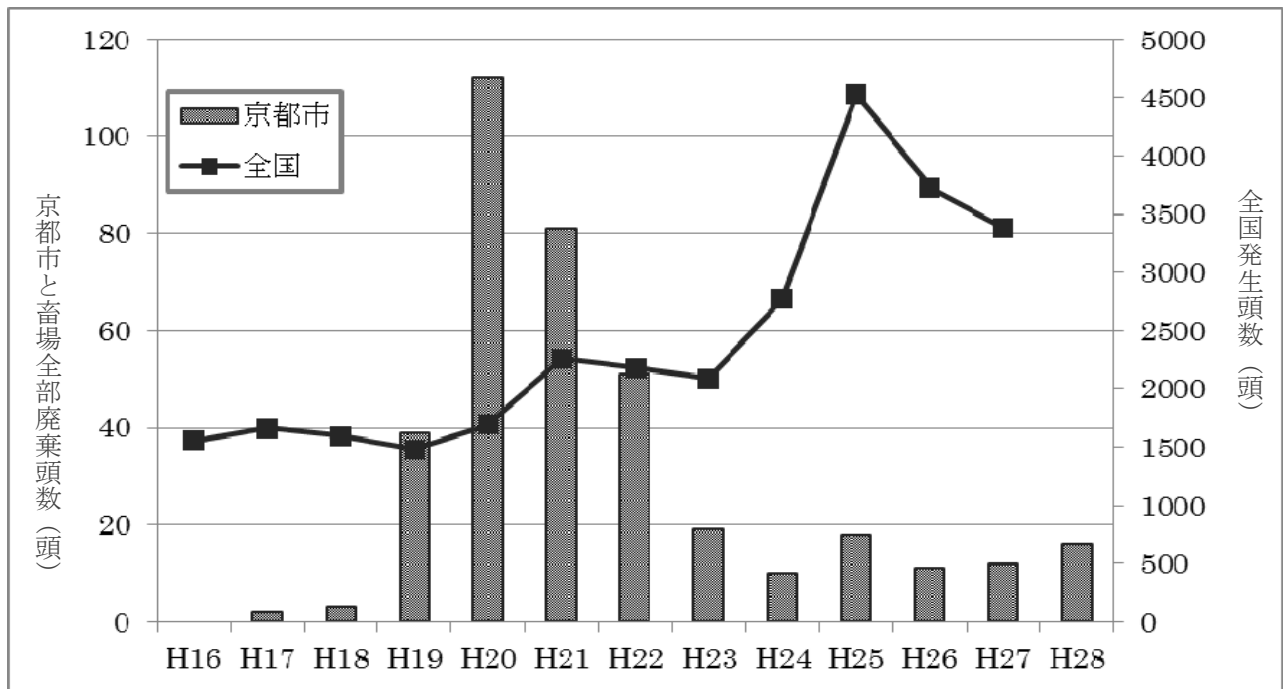


図1：豚丹毒の全国発生頭数と京都市と畜場での全部廃棄頭数の推移

関節炎型豚丹毒を疑い保留した豚からの菌検出率と抗体価及びリンパ節重量の相関関係について

食肉検査部門

○谷 祐毅, 力身 覚 (微生物部門), 小野寺 佳隆, 川崎 成人, 浜田 絢也

1 はじめに

豚丹毒は、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) を原因として引き起こされる豚の疾病で、病態から急性敗血症型、亜急性蕁麻疹型、慢性心内膜炎型、慢性関節炎型に分類されます。と畜検査において、豚丹毒が発見若しくは菌検出されれば全部廃棄となり、豚の全部廃棄される疾病で上位を占めています。平成27年度においては、本市と畜場で12例が豚丹毒により全部廃棄になっております。

慢性関節炎型については、明白な関節炎や破行などの臨床症状が必ずしも現れるとも限らず、と畜検査員の肉眼所見により発見されます。つまり、と畜検査（解体後検査）において内腸骨リンパ節の腫脹、関節液の貯留、絨毛の増生により感染を疑い、精密検査として細菌検出を行います。しかしながら、リンパ節の腫脹、関節炎については豚丹毒以外の要因でもみられ、細菌検出には日数を要します。そのため、精密検査後合格となる場合もあり、枝肉の品質低下等を踏まえると、確実かつ迅速な検査が求められます。

そこで、内腸骨リンパ節重量を関節炎型豚丹毒の一つの判断基準にできないかと検討を行ったので報告します。

2 検証対象

平成28年4月2日から平成29年1月までの間に京都市と畜場に搬入され、関節炎型豚丹毒疑いとして精密検査を実施した34検体。

3 方法

(1) 菌検出

採取した内腸骨リンパ節、関節液、絨毛をそれぞれ血液寒天培地にスタンプし培養する。また、それぞれを抗生剤*を加えた Tween80 添加トリプトソイオン液体培地に無菌的に37℃、24～48時間培養後、遠心分離 (12,000rpm, 1分) し、その沈渣を血液寒天培地に塗抹する。血液寒天培地上に豚丹毒菌を疑うコロニーのうち、グラム陽性小桿菌、カタラーゼ試験陰性を示すものについて豚丹毒菌に特異的なプライマー (ER1F, ER1R) を用いてPCRを行い、陽性となったものを豚丹毒菌と同定した。

*抗生剤

No	抗生剤
1	— (抗生剤フリー)
2	ゲンタマイシン (50 μg/ml), カナマイシン (500 μg/ml)
3	ネオマイシン (25 μg/ml), バシトラシン (0.4U/ml), バンコマイシン (25 μg/ml), カナマイシン (400 μg/ml), ゲンタマイシン (40 μg/ml), ノボビオシン (50 μg/ml)

村北らの報告2012による

(2) 抗体価の判定

採取した血清を用いてラテックス凝集試験（日生研アグテックSE）により抗体価を判定した。

4 結果

関節炎型豚丹毒疑いとして精密検査を実施した34検体中11検体（32.4%）から豚丹毒菌を検出した。抗体価及び内腸骨リンパ節重量は表1のとおり。

また、D農場においては抗体価が平均約80あり、7例が豚丹毒として廃棄となっている。

表1

No	農場	抗体価	リンパ節重量	行政処分	No	農場	抗体価	リンパ節重量	行政処分
1	F	64	17	合格	18	B	32	11	合格
2	F	64	22	合格	19	A	16	18	合格
3	D	64	19	合格	20	D	256	13	廃棄
4	F	128	20	合格	21	D	128	15	廃棄
5	F	32	18	合格	22	A	128	12	合格
6	G	256	—	廃棄	23	D	—	13	廃棄
7	D	64	30	合格	24	G	256	21	合格
8	G	32	17	合格	25	G	32	13	合格
9	D	128	27	廃棄	26	G	16	31	合格
10	B	128	21	廃棄	27	D	64	15	合格
11	D	32	18	合格	28	C	—	21	合格
12	D	16	11	合格	29	D	64	20	廃棄
13	F	32	11	合格	30	D	128	24	合格
14	E	32	14	合格	31	D	128	9	廃棄
15	G	64	11	廃棄	32	F	32	18	合格
16	D	32	11	廃棄	33	G	256	16	合格
17	D	4	16	合格	34	C	64	16	廃棄

※ 血清量が抗体価測定に不十分なものが2検体、リンパ節重量の未計測が1検体含まれる。

(1) 抗体価

全34検体の抗体価は平均86.6, 中央値64であり, 廃棄した11検体については, 抗体価は平均124.8, 中央値128, また, 合格した23検体については, 抗体価は平均69.3, 中央値32であった。

(2) 相関関係

菌検出率と抗体価の相関関係については, 有意水準5%で両側検定のT検定を行ったところ, $T(30) = 2.0$, $P = 0.05$ であり相関傾向にあるといえる。

菌検出率と内腸骨リンパ節重量の相関関係については, 有意水準5%で両側検定のT検定を行ったところ, $T(31) = 1.14$, $P = 0.26$ であり有意差はないといえる。

5 まとめ

と畜検査(解体後検査)において豚丹毒を疑うポイントとなるのは内腸骨リンパ節の腫脹であるが, 今回の検証において豚丹毒菌検出と内腸骨リンパ節重量との間に相関関係はみられなかった。したがって, 豚丹毒を疑う場合には, と畜検査員による本疾病に対する知識と確実な診断技術が求められる。

しかしながら豚丹毒の判断には迅速性及び正確性が求められるため, 引き続き豚丹毒を疑う判断基準の指標を模索していく必要があると考えられる。

また, 農場別に考察すると, D農場については14例中7例が豚丹毒により全部廃棄となっており, 廃棄事例の約64%を占めていることから, 今後も豚丹毒の汚染農場として注意が必要と考える。