

3 衛生環境研究所セミナー

令和元年度 衛生環境研究所セミナー プログラム

- ・日時 令和2年3月6日(金) 午後1時30分～午後4時30分
- ・場所 京都市衛生環境研究所 1階 大会議室

	開会のあいさつ	斉藤 泰樹 所長	
1	「より伝わる」啓発資料(ポスター)作成について	石田 由貴子	斉藤 泰樹
2	移設に伴う精度管理について	伴埜 行則	斉藤 泰樹
3	畜水産物中の残留動物用医薬品等の一斉試験法に関する検討及び妥当性評価について	須藤 悠悟	仲 俊典
4	※ 京都市内における家庭用品中のホルムアルデヒド検査結果(平成21年度～令和元年12月)について	藪下 小雪	仲 俊典
5	※ QuEChERS法と分散固相精製を用いたかんきつ類における防かび剤8種の一斉迅速分析法の検討	並河 幹夫	仲 俊典
6	一般食品からのノロウイルス検出法について	富田 陽子	仲井まなみ
7	京都市におけるマダニの生息調査	木澤 正人	仲井まなみ
8	※ 酸性雨の沢の池表層地質であるチャートへの影響に関する一考察	橋本 貴弘	大見 武夫
9	※ 京都市における大気粉じん中の重金属および六価クロム濃度について	伴 創一郎	大見 武夫
10	一農場で多発した豚サルモネラ症について	平岩 悟	小野寺 佳隆
	総括 と 講評	斉藤 泰樹 所長	

※ 報文又は短報に掲載

「より伝わる」啓発資料（ポスター）作成について

管理課 疫学情報担当

○石田 由貴子, 吉澤 徳一, 古川 寛, 伴埜 行則, 清水 英信

1. 目的

当課は感染症発生動向調査事業における京都市感染症情報センターとしての業務を担っており、医療機関や市民に対して感染症情報を提供している。その業務の一環として、未就学児を中心に流行する感染症の予防啓発を目的に、その子供の保護者を対象にしたポスター（A2サイズ）を毎月1回発行し、公営保育所等に配布している。ポスターという形態であるため、対象者の目に留まり、伝わるのが最も重要である。一方、保育所に送迎のために来所する保護者の注意は専ら子供に向けられ、ポスターに目を向けてもらうことは非常に困難である。これまで、ポスター制作に当たっては一目で情報が伝わるように、イラストを主とし、伝えたい情報を絞り、文字数を減らす等の工夫を行ってきた。しかしながら、情報発信に重要なことは「受け手側が必要としている情報を提供しているか」、「情報の受け手はどのように感じるか」等の受け手を主体とした観点である。そこで、上記工夫を行ってきた約2年間のポスターの有用性等について調査し、その結果を踏まえ、受け手に伝わるポスターの制作ポイントについて検討する。

2. 方法

本市公営保育所を所管する子ども若者はぐくみ局幼保総合支援室を通じて、市内21箇所公営保育所（乳児棟及び幼児棟を含む。）職員を対象に自記式調査票を用いて行った。調査項目はポスターの有用性、印象、症状や予防方法の分かりやすさとした。さらに、回答内容を参考に数箇所を抽出し、聞き取り調査及び施設におけるポスターの掲示状況調査を行った。

なお、本調査の対象は保育所の職員に限定した。ポスターの本来の対象である未就学児の保護者への調査を実施しなかったのは、多忙な保護者への負担

及び保護者へ調査依頼する保育所の職員への負担を考慮したためである。ポスターの配布先である保育所の職員も情報の受け手の一つであり、未就学児の保護者の認識に近い存在とみなせることから、本調査の対象とすることは、妥当であり、そこから得られた知見には一定の有用性があると考ええる。

3. 結果

全ての調査事項に回答している公営保育所は20箇所（有効回答率95.2%）であり、結果は各調査項目とも、概ね肯定的な評価であった。一方で、自由記載欄には「子供に人気のあるポスターは子供が親に見せることが多いから、親子への啓発に適している」、「A2サイズは大きいので、掲示場所に困る」、「文言に不快と感ずることがある」という旨の回答があった。そこで、記載内容の主旨を具体的に把握するために、これらの回答をした保育所を訪問し、施設長等から聞き取り及びポスターの掲示状況調査を行った。

その結果、ポスター制作のポイントとして、次の3つの知見を得た。（1）子供に人気のあるデザインは、迷路や「〇〇を探そう」のようなゲーム、動物や昆虫、鉄道、花等の写真である、（2）贈与を伴う行事（クリスマスやバレンタイン等）をイラストや文章の主題にすることは、様々な事情により、行事を実施できない保護者への心理的負担となり、不快感をもたらす可能性がある、（3）保育所は関係機関からポスター等が多数送付されるため、掲示物が多く、ポスターのサイズが大きいと、掲示場所が確保できず、人目につきにくい場所に掲示せざるを得ない施設もある、の3点であった。

4. 考察

今回の調査から得られた知見により、以下の2点が判明した。1つ目は、子供が興味を持つ、具体的

な意見をポスターに反映させるとともに、昨今の家庭事情にも配慮する必要がある。二つ目は、掲示場所によって目に留まりやすさが異なり、その状況は施設によって異なるため、配布先のニーズに合わせた柔軟な対応が必要である。

上記を踏まえ、令和2年2月から、迷路や動物の写真等を採用し、今まで以上に子ども目線の発想を加えた(図1及び図2)。

しかしながら、これにより、受け手が必要として

いる情報がどれだけ伝わっているかは未知数である。一定期間後、再度調査を行い、その効果について検証することが今後必要である。

5. 謝辞

本研究の調査にあたり、京都市子ども若者はぐくみ局幼保総合支援室並びに公営保育所の職員の皆様に多大な御協力いただき、厚くお礼申し上げます。



(図1) 令和2年1月号

色を2色に抑えつつ目立つ配色にし、さらに伝えたい内容が一目で分かるようにイラストを大きくしている。



(図2) 令和2年2月号

迷路をしながら、手洗手順を学べるようにした。また、4~5歳になると、ひらがなが読めるようになるため、できる限り、表記はひらがなとした。

移設に伴う精度管理について

○伴 埜 行 則 (管理課疫学情報)

1 はじめに

当所は、2019年10月京都府保健環境研究所との合築により移転した。移転先の移動距離は約10kmで、移動時間は平均30分程度となる。移設作業の内容は、業者が主体となる移設前点検、測定装置等を解体・梱包・運搬の後再構成及び移設後点検による動作確認までの一連の作業と、移設後の担当者による試験検査業務全般の確認作業がある。

そのため、約3箇月間(2019年9月～11月)試験検査業務を停止したが、関係各課との事前調整をする中で例年の年間検査計画の水準を極力維持するよう要請があった。そのため、結果として移設前後の試験検査が過密となり、移設に伴う環境変化が検査結果に影響しないかを検証するための実験計画を別枠で立てることは日程的に厳しい状況となった。

しかし、検査・研究機関にとって測定値の信頼性は、業務の根本的な柱であり、誰もが納得できる「ものさし」で評価する必要がある。そこで、移設作業の対応を振り返りながら、移設に伴う精度管理について、現実的で実行可能な方法を検討した。

2 方法

移設に伴う精度管理には、移設業者が行う移設前後の点検作業が含まれる。そこで、その内容について吟味し追加すべき項目を検討することとした。

(1) 移設時の点検作業

表 1 移設業務の作業区分

作業ランク	作業内容
Aランク	メーカーによる点検
Bランク	移設業者による一般点検
Cランク	移設業者による通電確認のみ
Dランク	移設業者による梱包のみ
Eランク	移設作業のみ
Fランク	冷凍・冷蔵関連

移設業務仕様書による移設物品・機器の移設作業

は、6つのランクに区分される(表1)。移設品は、どのランクに属するかを吟味し、移設業者と協議しながら、必要なユーティリティ(給排水、電源、供給ガス、設置環境等)を含めた一覧表を作成する。これらの作業区分のうちA、B、C及びFランクの移設品に関しては、移設前後の点検作業が実施され、機器ごとに移設業者による報告書(以下「報告書」という。)が提出された(表2)。

表 2 ランク別報告機器台数

作業ランク	報告機器台数
Aランク	76
Bランク	30
Cランク	237
Fランク	78
合計	421

(2) 点検作業及び追加点検作業に用いる標準品

報告書によると移設作業の点検作業は、あくまでも装置が適切に機能することを確認する内容となっており、点検に必要な標準物質、試薬類については使用者が用意することが原則とされた。

ただ、移設機器に求める性能は、試験検査の内容に応じて千差万別であり、点検作業だけでは直ちに試験検査を再開できない場合が多い。

個別の試験検査について、必要となる追加項目を検証することは、各担当者にゆだねるしかないが、移設に伴い設置環境が大きく変わり、測定結果にも影響を及ぼす恐れの大い精密機器類等については、事前に追加点検項目を検討し、「移設に係る精度管理用試薬」として別途用意した。

標準品は、RM(標準物質)とCRM(認証標準物質)の2種類ある¹⁾。

・RM:一つ以上の指定された特性について、十分均質かつ安定であり、測定プロセスでの使用目的に適するように作製された物質。

・ CRM：一つ以上の指定された特性について、計量学的に妥当な手順によって値付けされ、指定された特性の値及びその不確かさ、並びに計量学的トレーサビリティを記述した認証書が付いている標準物質。

今回の移設に伴う精度管理を行うにあたり、分析の信頼性を国際的な「ものさし」で測ることができる CRM が必須のアイテムといえる。そこで、標準物質に関しては、極力 CRM を選択し、点検、追加点検の確認作業に使用した。

先の「(1) 移設時の点検作業」に要するものと合わせて用意した主な標準品等は以下のとおりである。

- ・ GCMS の校正用標準試薬 (PFBTA)
- ・ LCMSMS の校正用標準試薬
- ・ PCB (GC-ECD)
- ・ VOC (GC/MS) 標準混液及び内部標準
- ・ シマジン・チオベンカルブ測定用標準及び内部標準
- ・ チウラム測定用標準及び内部標準
- ・ イオンクロマトグラフィ用標準
- ・ ホルムアルデヒド分析用標準
- ・ 悪臭規制物測定用標準
- ・ 揮発性有機化合物分析用標準
- ・ 金属類 (ICP-MS 用標準)
- ・ 鉍物油同定 (GC-FID) 用標準
- ・ 残留農薬測定用標準
- ・ 水銀分析用標準
- ・ pH 計校正用標準液
- ・ 放射能校正用体積線源
- ・ 有害汚染物質モニタリング用標準品
- ・ 有機燐 (GC-MS/MS) 測定用標準及び内部標準

(3) 検査の「質」向上のための追加点検項目

試料別の試験検査の精度管理のためには、認証標準試料の利用が有益である。しかし、認証標準試料は、高価なものが多く^{2), 3)}、日常的に精度管理に使用することは困難である。

しかし、今回は「移設に係る精度管理用試薬」として以下の認証標準試料を用意することができた。

- ・ カドミウム分析用認証試料
- ・ 残留農薬測定用認証試料

- ・ 水銀分析用認証試料
- ・ 特定原材料測定用管理試料と測定キット
- ・ 放射能認証試料

3 結果

(1) 移設業者による確認結果の検証

作業区分別移設品の点検報告結果によると、報告のあった機器 413 台中 29 台について、移設前点検の段階で何らかの不具合を認めた (表 3)。

表 3 移設品の報告台数と不具合件数

作業ランク	台数	移設前点検の不良
Aランク	76	17
Bランク	30	1
Cランク	236	10
Fランク	71	1
合計	413	29

不具合が見つかった場合は、その程度に応じそのまま移設するか、作業ランクを見直すか、または移設そのものを断念するかを移設業者と協議する。

報告書によると、不具合を理由に廃棄処分とした機器は無かった。不具合の内容は、外観の一部に錆の発生、外装の一部のへこみ・傷、ガラス製部品の一部破損、UV ランプの断線等で、修理対応可能な機器は、全て作業ランクの変更をせず移設とした。

修理不能で機能の一部が制約されるが使用可能とした機器として、デガッサーとオートサンプラーが不良でマニュアル注入に限定すれば使用できる HPLC が 1 台あった。

また、PC が起動しない GC/MS が 1 台あったが、たまたま同型の PC が付属した廃棄備品があり、代替機として転用することが出来た。

移設直前まで工事・ドラフト、実験台の設置作業等が続いたため、必要なユーティリティが設置機器の仕様を満足しているかの確認作業が移設後にも断続的に繰り返し必要な事態となった。正常な使用に支障が生じる場合は、追加工事となった。

移設・装置の再構成・ユーティリティの接続等が完成した後は、業者による各機器の移設後点検が実施さ

れた。移設後点検時に天秤の分銅加除カバー破損のため異常音がした事例が1件（修理対応後点検実施）、超冷凍庫で移設後起動せず再起動後に正常復帰した事例が1件あった。

結果として、報告書の移設前後の性能評価では、担当者合意の上すべての機器について合格とされた。

(2) Aランクの機器の追加点検項目の検証

主なAランクの機器は、表4に示す。

表4 主なAランクの機器一覧

品名	n	品名	n
GC, 硫黄定量装置	8	赤外分光光度計	1
GC/MS, GC/MS/MS	7	色濁度計	1
HPLC	6	固相抽出装置	9
ICP, ICP-MS	2	自動雨水採水器	1
LCMS, LC/MS/MS	4	Ge半導体検出器	1
TOC計	1	NaIサーベイメーター	1
イオンクロマトグラフ	5	自動細菌同定検査装置	1
キャニスタークリーナー	1	リアルタイムPCR	3
原子吸光度計	2	超遠心機	1
水銀分析装置	3	核酸抽出精製装置	2
マイクロウェーブ分解装置	2	シーケンサー	2
低温灰化装置	1	クリーンベンチ	1
分光光度計	1	安全キャビネット	9

これらの機器のうち「移設に係る精度管理用試薬」を用意した機器を中心に、移設前後の点検項目に追加すべき点検項目について検討した。

ア 放射能検査の性能評価

食品中の放射性物質測定検査は、分解能・相対効率性能検査については、業者所有のCo-60線源を用いて点検された。

計数効率率は、 γ 線のエネルギーと測定容器の形状に依存する。そのため使用する容器のすべての種類毎にピーク効率校正を行う。体積線源には、9種の核種が配合され、11種のエネルギーが得られるが、半減期の短い核種もあり時間の経過とともに検出できない核種も出てくるため（表5）、ピーク効率校正を行う際には新たに体積線源を用意する必要がある。今回、新たにU8容器、0.2L筒型容器、0.5Lマ

リネリ容器、0.7Lマリネリ容器及び2Lマリネリ容器の9核種標準体積線源を日本アイソトープ協会より入手し（校正日2019/7/31）、ピーク効率校正を行った。

表5 9核種の半減期とエネルギー

混合核種	半減期	エネルギー keV
Cd-109	462.6 日	88.03
Co-57	271.79 日	122.06
Ce-139	137.640 日	165.85
Cr-51	27.702 日	320.11
Sr-85	64.84 日	514.00
Cs-137	30.07 年	661.65
Mn-54	312.3 日	834.83
Y-88	106.65 日	898.03
		1836.00
Co-60	5.2714 年	1173.21
		1332.47

また、Ge半導体検出器を設置する測定室の理想的な条件⁴⁾には以下のような項目がある。

- ・ 空調が適切である（温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度50～60%で安定している。）
- ・ 放射能汚染に対する配慮（汚染の恐れがない、清掃が容易等）
- ・ 管理（入退室に際しスリッパに履き替える。測定試料調製は別室で行う。紙バック掃除機でゴミを回収・灰化し汚染を確認。）
- ・ バックグラウンドが低い（ラドンガス濃度が低い。）
- ・ 構造が適切（大きな床荷重に耐えられる。）
- ・ 雑音が低い等

今回の移設により、空調設備の性能が向上したため、理想的な測定室の条件にかなり近づいた。

しかし、地下空間は、放射性物質であるラドン等が滞留しやすく^{5),6)}バックグラウンドに影響を及ぼす恐れがあった。

そこで移設前後のバックグラウンドデータを比較したところ（表6）、しゃへい体由来のピーク等以外は観察されず問題なく測定できることが確認され

た。

表 3 移設前後のバックグラウンド

核種	エネルギー (keV)	移設後	移設前
Pb-210	46.50	○	○
Th-234	63.29	○	○
Th-234	92.80	○	○
U-235	185.72	○	○
Pb-212	238.63	○	○
Pb-214	351.99	-	○
An-511	511.00	○	○
Tl-208	583.14	○	○
Bi-214	609.31	-	○
Pa-234m	1001.30	○	○
K-40	1460.75	○	○
Bi-214	1764.50	○	○

* 容器マリネリ：0.7L，母材：空気，測定時間 24 時間

* 「○」：ピークを検出した核種，

* 「-」：検出しなかった核種

イ GC/MS 等の性能評価

業者による点検作業は，GC 部と MS 部について，それぞれの基本的な性能を確認するものであった。

一般的な GC/MS の確認事項⁷⁾は以下のとおりである。

- ・ 真空度，圧力表示数値の安定性，バックグラウンドの異常な上昇の有無，ブリードの異常な増大，ベースラインのドリフト等の情報でリークの有無を確認する。
- ・ 校正用標準物質（ペルフルオロケルセン等）を用いた質量電荷比（m/z）目盛の調整
- ・ 分解能
- ・ 感度（ステアリン酸メチル等を用いて所定の感度が得られるようレンズ，検出器を調整する。）
- ・ 単一成分の標準溶液を用いたリテンションタイムの再現性，ピーク形状，面積再現性等が確認項目となる。

実際の移設前後の点検項目は，装置によりばらつ

きがあったが基本的には正常起動の確認，リークチェック，質量分析計の感度チェック，試料導入装置（パージ&トラップ装置，ヘッドスペース装置等）との連結及び試料の液打ちによるピーク確認で，検量線作成等の項目は入っていなかった。

個別の試験検査実施時に，標準試薬を用いて検量線を作成し，選択性，直線性，キャリーオーバー，真度及び精度を確認する必要がある。

構成機器に質量分析計を有する機器（GC/MS，LC/MS，ICP/MS）共通の課題であるが，新施設では真空ポンプのオイルミストトラップ部の出口を吸引し，スクラバーで処理している。ところが，一部の部屋で吸引が強すぎるためオイルミストを吸引してしまい，真空ポンプのオイルの減りが早まるという現象が生じた。後日風量調整をして対応したが，ある程度経過しないと確認できない事例である。

ウ LC/MS 等の性能評価

高速液体クロマトグラフの動作確認の後，質量分析計の起動と確認作業となる。基本的に GC/MS と同じ以下の項目となる。

- ・ 校正用標準物質（カフェイン，PEG 混合物，レセルピン等）を用いた質量電荷比（m/z）目盛の調整
- ・ 分解能（一般的に FWHM(Full Width Half Maximum，半値幅)法で算出する。
- ・ 感度

年間に数回作成した標準混液の検量線について GC/MS と LC/MS のリテンションタイムの変動を比較したデータによると，GC/MS はすべての品目について 2%以内の変動幅に収まるのに対し，LC/MS については 10%~50%と品目により大きく変動すると報告している⁸⁾。変動の原因としては，移動相調製時の組成比の微妙な違いの影響が大きいと思われるが，設置環境の室温・湿度の変動も無視できない。今回の移設により，設置場所の空調は 24 時間作動し，装置自体に加え溶離液の温度変化が少ない環境となり，JIS K00136⁹⁾の求める望ましい設置環境に近づいた。

個別の試験検査実施時に、標準試薬を用いて検量線を作成し、選択性、直線性、キャリーオーバー、真度及び精度等を確認する必要がある。

エ イオンクロマトグラフの性能評価

測定対象がほぼアニオン（リン酸イオン、硫酸イオン、亜硝酸イオン、臭化物イオン、硝酸イオン、フッ化物イオン、塩化物イオン）、カチオン（カルシウムイオン、カリウムイオン、アンモニウムイオン、マグネシウムイオン、ナトリウムイオン、リチウムイオン）に限定されるため、複数の濃度点による検量線作成までが業者による点検項目に入り実施された。

ただし、水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン質疑応答集^{10), 11)}によると、『検査室を移転した場合は、妥当性評価を再度行う必要があるか。との問いに対し、原則としてSOPに変更がなくとも妥当性評価を再度実施する必要があるが、検査結果に影響を与えるおそれがない場合に限り省略することができる。』と回答されている。

水質検査でイオンクロマトグラフを用いて測定する項目の中で亜硝酸イオンは、けた違いに低レベルの基準が設定されており、ブランク水の影響を大きく受ける。使用水（超純水）の採水時に泡立てただけで亜硝酸イオン混入が認められる事例¹²⁾、人を介した塩素イオンの混入事例¹³⁾等が報告されている。また、亜硝酸イオンの定量値は、リテンションタイムの近い塩素イオンの妨害を受ける¹⁴⁾。そこで、ブランク水のクロマトグラフを確認したところ、移設前と変わらず影響はなかったことを確認した。

しかしながら、実際の検査実施前には、水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインに基づく再評価が必要と思われる。

オ ICP、ICP/MSの性能評価

ICPの点検は波長正確さ、検出限界等、ICP/MSの点検は、真空度、ガス漏れ、プラズマ点灯及びバリデーション校正が実施された。

ICP/MSは、pptレベルの金属分析を可能とする高

感度な測定機器であるため、使用する超純水、試薬からの汚染、環境雰囲気からの汚染の影響を受けやすい。使用する容器・秤量器具の選択、洗浄にも留意する必要がある¹⁵⁾、洗浄水の水質も無視できない。

ICP及びICP/MSについても個別の試験検査実施時に、標準試薬を用いて検量線を作成し、選択性、直線性、キャリーオーバー、真度及び精度を確認する必要がある。特にICP/MSについては、選択性（ブランク水の測定）に留意する必要がある。

カ TOC計の性能評価

当所のTOC計の測定方式は、燃焼酸化非分散赤外線吸収方式でNPOC法（不揮発性有機炭素）を採用している。TOC計の点検作業には検量線の作成が含まれていた。

移設前の検量線の0点の平均面積は1.273で移設後は0.7665であった。TOC計については問題なく測定できることが確認できた。

ただし、「エ イオンクロマトグラフ」と同様、水道水質検査に使用する場合は、水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインに基づく再評価が必要と思われる。

キ 超純水製造装置

超純水製造装置で得られた水の水質は、GC/MS、LC/MS、ICP/MS、イオンクロマトグラフ等の測定に大きな影響を及ぼす^{16), 17)}。そのため、超純水製造装置はCランクではあるが、測定結果への影響が大きいのので取り上げた。

超純水製造装置には、リアルタイムモニタリングが採用され、残存TOCが測定されている。不純物が全く含まれない理論純水は、25℃で約18.24MΩcmの抵抗率、0.05478μS/cmの電気伝導率を示す¹⁸⁾。

また、JIS K 0557 用水・排水の分析に用いる水において微量分析にはA4グレード（0.1μS/cm以下→10MΩcm以上）を推奨している。

移設の超純水製造装置は2台あり、どちらも移設前後の抵抗率が18.2MΩcmとGC/MS、LC/MS、ICP/MS、イオンクロマトグラフのブランク水に問題

なく使用できることを確認した。

ク 安全キャビネット・クリーンベンチ

感染症法により病原体の取り扱う施設基準が設定されており、安全キャビネット等の設置が義務付けられている¹⁹⁾。設置する安全キャビネットに求められる機能を確認するための塵埃リーク試験・清浄度測定（パーティクルカウンターによる塵埃数測定）、風速試験、密閉度試験（安全キャビネットのみ、500Paに加圧保持し、漏れの有無を確認）等について移設前後で確認された。

安全キャビネット9台及びクリーンベンチ1台についてすべて基準をクリアしていた。

ケ 冷蔵庫・冷凍庫

多くの冷蔵庫、冷凍庫について保冷剤を隙間に入れる等の措置をした後、中身を入れたままの移動となった。

電源 OFF から ON までの所要時間は平均 3.29 時間であった。

温度の確認は、移設後に通電確認をした後、1 時間後及び 2 時間後の温度を測定し、設定温度に近づいていることが確認された。ほとんどの冷蔵庫・冷凍庫の庫内温度は、1 時間後には移設前温度にほぼ復帰した。

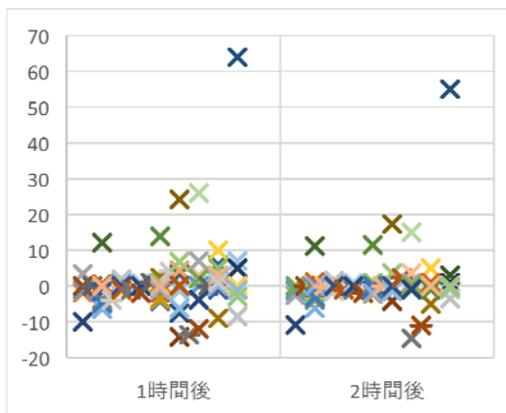


図 1 移設前庫内温度と 1 時間・2 時間後の温度差

温度差が 10°C を超えている冷蔵庫・冷凍庫については、「中身を別にして移設のみを行った」、「霜取り中であった」及び「点検時に起動せず移設後に再起動した超冷凍庫」等個々の原因が判明している。

F ランクの機器については、装置の性能確認よりも中身の試薬等の保存状態が適切に保たれていたことが重要である。最新の冷蔵庫・冷凍庫は、省エネ効果を追求するため、優れた断熱材を使用しており²⁰⁾、移設時と同様の保冷剤を入れることで 2 時間程度は冷気の損失がないとの報告もある²¹⁾。

したがって、温度計測結果の結果と合わせ、庫内の温度は維持され、試薬類は適切に保存されていたものと推測できる。

(3) 認証標準物質を用いた試験検査の検証

認証標準物質は、複数の分析機関による分析値が「認証値」として付記されており、測定結果の平均値と比較する。

認証標準物質を用いた繰り返し実験を実施する場合の繰り返し測定回数 (n) は、標準作業書または操作手順書に定められた試料量と市販の認証標準物質の制約の中で適宜決まってくるが、その際の独立な繰り返し回数 (全手順を繰り返す。) は 10 回を下回らないことが望ましいとされている。

内部品質管理のために認証標準物質を利用する場合、以下の式で判定する。

μ : 認証値

X_{mean} : 測定の平均値

$U_{95\%}$: 拡張不確かさ

U_{means} : 測定の不確かさ = $\frac{\text{測定の標準偏差}}{\sqrt{n}}$

$$|\mu - X_{\text{mean}}| \leq 2 \sqrt{\left(\frac{U_{95\%}}{2}\right)^2 + U_{\text{means}}^2}$$

上記式が成り立てば、平均測定値と認証値に有意差はないと判定する²²⁾。

「はじめに」でも述べたが、実際の認証標準物質を用いた検査は、日程的に厳しい状況の中一部未実施であり、本報告からは割愛する。

4 考察

大部分の測定機器・周辺装置・試薬・資材等は、旧施設のものをもそのまま移設したため、結果として実験環境

が少々変わっただけであり、測定結果に及ぼす影響は、少なくとも複数の検査所の共同実験で得られる室間再現精度よりも小さい標準偏差で収まるものと予想出来る。

しかし、この予想が正しいとして移設前後で同じ試料を用いた繰り返し実験を行い、「測定結果に移設の影響はない」ことを証明できるのであろうか。

そもそも、測定装置を含めた測定値に影響を与える多くの要素に対して、移設に伴い大きく変化した作業環境・施設・周辺環境が与える影響は、複雑に絡み合い長期的に観察しないと見えてこないものも多い²³⁾。

正しい対応としては、一つ一つの試験検査に対して絶え間なく信頼性確保のための精度管理を繰り返し継続していくことであると考え。おりしも、食品衛生法改正による ISO/IEC17025 の業務管理導入が令和2年度にも予定されており²⁴⁾、従来の業務管理要領には無い「不確かさ」の確認等も検討する必要性が生じている。試験検査施設としての精度管理に取り組む姿勢と検査のより高度な「質」を問う社会的背景も生じているのである^{25), 26)}。

5 文献

- 1) 上野博子, 四角目和弘 JCSS 標準物質と CERI の取組 THE CHEMICAL TIMES p13-17,
https://www.kanto.co.jp/dcms_media/other/backno8_pdf28.pdf
- 2) JIS Q 0033 : 2002, 認証標準物質の使い方
- 3) 飯塚幸三 標準物質の課題と将来 計測と制御 623-627, 第32巻 第8号 1993
- 4) 環境放射線モニタリング技術検討チーム第11回会合資料2, 「ゲルマニウム半導体検出器によるγ線スペクトロメトリー」改訂原案
- 5) 小村和久 低レベル・超低レベル放射能測定の基礎 RADIOISOTOPES, 233-243, 55(2006)
- 6) 左合勉, 五十楼泰人 ゲルマニウム半導体スペクトロメータのγ線バックグラウンドスペクトルに対する空气中ラドンの影響とその低減方法 RADIOISOTOPE, 70-73, 36(1987)
- 7) ガスクロマトグラフィー質量分析通則, JIS K 0123 : 2006
- 8) 伴埜行則 残留農薬の一斉分析におけるデータ解析の客観性確保について 京都市衛生公害研究所所報 Vol. 76(2009)
- 9) 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則, JIS K 0136 : 2004
- 10) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン, 平成29年10月18日薬生水発 1018 第1号
- 11) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン質疑応答集 (Q&A), 平成30年3月27日
- 12) 黒木祥文 超純水の使用例にみる微量分析における汚染要因とその対策 BUNSEKI KAGAKU 85-93, Vol. 59, No. 2(2010)
- 13) 井上達也 化学分析における基礎技術の重要性 (3) 微量分析における汚染源の特定とその対策 THE CHEMICAL TIMES 17-21, Vol. 197, No. 3(2005)
- 14) 上原智加他, イオンクロマトグラフィーによる亜硝酸態窒素分析における塩化物イオンの影響, 山口県環境保健センター所報, p72-74, 第57号 (平成26年度)
- 15) 北嶋俊朗, 久保崎範行 ICP 分析装置の高度化利用について 27-31, 大分県産業科学技術センター 平成29年度研究報告
- 16) 吉田知香, 野村有弘, 遠藤睦子 超純水中の超微量成分の分析における諸問題 BUNSEKI KAGAKU , 349-356, Vol. 59, No. 5(2010)
- 17) 黒木祥文 超純水の水質が微量有機物分析に与える影響 75-83, CHROMATOGRAPHY, Vol. 33, No. 2(2012)
- 18) 山中弘次 徹底的に pure な水-超純水 504-509, 表面化学, Vol. 35, No. 9(2014)
- 19) 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 法律第百十四号
- 20) 瀧勝彦 すすんだ冷蔵庫 科学と教育 630-634, 第38巻, 第6号(1990)
- 21) 計画停電における食品等の温度管理について <https://www.city.kitakyushu.lg.jp/hokuhuku/18400085.html>
- 22) ERM-Application Note 1: Comparison of a measurement result with the certified value <https://crm.jrc.ec.europa.eu/e/132/User-support->

Application-Notes

- 23) 伴埜行則 府市合築の経緯と「共同化」の具体化（移設作業等の協力）に向けて 京都市衛生環境研究所
- 24) 渡辺卓穂 食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究 文献番号 201823010A
2018, 201723024A 2017
- 25) 安井明美 食品の分析データの信頼性確保システムの確立 356-361, 日本食品科学工学会誌, 第54巻 第7号 2007
- 26) 城野克広 試験所間比較における同等性評価についての調査研究 77-96, 産総研計量標準報告, vol8, No. 1
2010

畜水産物中の残留動物用医薬品等の一斉試験法に関する検討及び妥当性評価について

生活衛生部門 第一検査室

○須藤 悠悟, 岩崎 真行, 中山 岳明, 山田 早希, 福田 光治, 仲 俊典

1 はじめに

動物用医薬品は、畜水産動物の疾病の予防や治療などの目的で使用され、畜水産食品の安定供給に欠かせないものとなっている。しかし、医薬品成分が食品中に残留したことによる人体への影響が危惧されることから、これら動物用医薬品には残留基準値が設定されている。また、動物用医薬品の残留分析については、厚生労働省通知「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」（以下、「ガイドライン」という。）¹⁾に基づき実施することとされており、その試験法の妥当性を評価することが求められている。

動物用医薬品には物性の異なる様々なものが使用されており、これらを迅速かつ一斉に分析する必要性は高く、その分析法として LC/MS/MS を用いた方法が数多く報告されている。近年では、検査工程の簡便化を目的として、アセトニトリル抽出、塩析、脱水を同時に行う QuEChERS 法を動物用医薬品の残留分析に応用した方法が報告されており^{2) 3)}、当検査室においてもこの方法を昨年度に検討、改良した後、新たな試験法（以下、「改良法」という。）として導入することに成功した。現在、牛の筋肉については試験法の妥当性を評価しているが、他の検体種（畜水産物の種類・部位等）における妥当性評価は未だ実施できていない。そこで、改良法の充実を図ることを目的とし、妥当性評価が終了した牛の筋肉に加え、その他の検体種について新たに妥当性評価を実施したので以下に報告する。

2 方法

(1) 試料

牛の腎臓、豚の筋肉、豚の腎臓

(2) 試料溶液の調製

試料 5.0 g を量り採り、蒸留水 2 mL およびアセトニトリル 11 mL を加え、1 分間ホモジナイズ後、無水硫酸マグネシウム 4 g、無水塩化ナトリウム 1 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を加え、1 分間振とうした。これを遠心分離 (3,500 rpm, 5 分間) し、アセトニトリル層を採取した。残渣に 5 %ギ酸含有アセトニトリル溶液 11 mL を加え、1 分間ホモジナイズ後、遠心分離 (3,500 rpm, 5 分間) した。アセトニトリル層を先のアセトニトリル層と合わせ、25 mL に定容し抽出液とした。抽出液のうち 10 mL を蒸留水 2 mL と合わせ、予め 0.1 %ギ酸含有[アセトニトリル及び水 (85:15)]混液 10 mL でコンディショニングした Bond Elut C18 カラムに負荷し、溶出液を採取した。さらにカラムに 0.1 %ギ酸含有[アセトニトリル及び水 (85:15)]混液 10 mL を負荷し、得られた溶出液を先の溶出液と合わせ、1-プロパノール 10 mL を加えて、40°C 以下で減圧濃縮した後、窒素気流下で溶媒を完全に除去した。残留物を 0.1 %ギ酸含有[アセトニトリル及び水 (1:9)]混液 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。

(3) 測定条件

- ア カラム : Shim-pack HR-ODS (Shimadzu 社製), 3.0 mm i.d. x 150 mm, 粒子径 3 μm
 イ 移動相 : 0.1 %ギ酸水溶液 (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) : 1% (0 min) → 100% (25 min) → 100% (30 min) → 1% (30.01 min) → 1% (40 min)
 カ 注入量 : 10 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 : + 4.5 kV (Positive mode), - 3.5 kV (Negative mode)
 ケ ネブライザーガス流量 : 1.5 L/min
 コ ドライングガス流量 : 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

No.	薬物名	ESI	前駆イオン (m/z)	測定イオン (m/z)	No.	薬物名	ESI	前駆イオン (m/z)	測定イオン (m/z)
1	thiabendazole deriv	+	217.80	190.95	31	sulfamethoxypyridazine	+	281.10	156.05
2	lincomycin	+	407.20	126.15	32	sulfadimidine	+	279.10	92.15
3	levamisole	+	205.10	178.00	33	josamycin	+	828.20	109.10
4	albendazole	+	240.10	133.10	34	sulfamonomethoxine	+	281.10	156.05
5	diaveridine	+	261.20	123.25	35	sulfisozole	+	240.10	156.20
6	trimethoprim	+	291.10	123.15	36	sulfachlorpyridazine	+	284.70	156.00
7	marbofloxacin	+	363.20	72.35	37	sulfadoxine	+	311.10	156.00
8	pyrantel	+	207.10	150.10	38	sulfamethoxazole	+	254.10	155.95
9	ofloxacin	+	362.20	318.30	39	sulfisoxazole	+	268.10	156.00
10	ormethoprim	+	275.20	123.15	40	oxolinic_acid	+	262.20	244.20
11	ciprofloxacin	+	332.20	314.25	41	ethopabate	+	238.20	136.00
12	sulfisomidin	+	279.10	124.10	42	sulfadimethoxine	+	311.10	156.00
13	danofloxacin	+	358.20	340.20	43	sulfabenzamide	+	277.10	156.15
14	TBZ	+	202.10	175.00	44	sulfaquinoxaline	+	301.00	156.05
15	enrofloxacin	+	360.30	342.35	45	bromacil	+	261.00	204.95
16	orbifloxacin	+	395.90	295.05	46	flubendazole	+	314.00	282.05
17	xylazine	+	221.10	90.10	47	nalidixic_acid	+	233.20	215.20
18	morantel	+	221.00	122.95	48	flumequine	+	261.80	244.00
19	difloxacin	+	399.90	382.10	49	menbutone	+	259.00	241.00
20	tripelennamine	+	256.20	211.10	50	praziquantel	+	313.20	203.15
21	clopidol	+	192.00	101.10	51	ketoprofen	+	255.10	105.10
22	pyrimethamine	+	249.10	177.00	52	warfarin	+	309.10	163.00
23	sulfacetamide	+	215.10	92.05	53	rifaximin	+	786.50	754.40
24	carazolol	+	299.10	116.20	54	coumatetralyl	+	293.10	175.00
25	sulfathiazole	+	256.00	156.00	55	2-acetylamino-5-nitrothiazole	-	185.90	139.00
26	sulfadiazine	+	251.10	156.00					
27	sulfapyridine	+	250.00	156.00					
28	oxibendazole	+	250.20	218.25					
29	sulfamerazine	+	265.10	92.10					
30	tiamulin	+	494.30	192.10					

(4) 妥当性評価の方法

各物質の混合標準溶液を作製し、1日1回(2併行)、5日間実施する枝分かれ実験計画により、妥当性評価試験を実施した。添加濃度は一律基準の0.01 ppm及びその10倍の0.1 ppmとした。これにより得られたデータを基に、表1のガイドラインの基準に従い評価を行った。

表1 ガイドラインにおける妥当性評価試験の評価基準

(1) 選択性

定量限界と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲
定量限界 \leq 基準値1/3	<基準値濃度に相当するピークの1/10
定量限界 $>$ 基準値1/3	<定量限界濃度に相当するピークの1/3
不検出	<定量限界濃度に相当するピークの1/3

(2) 真度(回収率)及び精度

濃度 (ppm)	真度(回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤ 0.001	70~120	30 >	35 >
0.001 < ~ ≤ 0.01	70~120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤ 0.1	70~120	15 >	20 >
0.1 <	70~120	10 >	15 >

(3) 定量限界

基準値が定量限界と一致している場合あるいは「不検出」の場合

①添加試料の試験結果に基づく真度、併行精度及び室内精度が(2)の表の目標値を満足していること。

②クロマトグラフィーによる測定では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピークは、S/N比 ≥ 10 であること。

ただし、豚の筋肉及び腎臓についてはガイドラインに基づき、妥当性評価された試験法を類似の食品に適用する場合とし、添加濃度0.01 ppm及び0.1 ppmについて1日に5併行実施する方法で行った。得られた結果から、選択性、真度及び定量限界を評価した。

3 結果及び考察

(1) 検査の効率化について

従来法では分液ロートを用いてアセトニトリル及びヘキサンによる液液分配を行っており、さらに減圧濃縮があることで操作が煩雑かつ工程が長くなり、時間を要していた。一方、前処理の抽出部分に QuEChERS 法を導入した改良法では、抽出液にアセトニトリルを用いて4種類の塩を混ぜるという簡便な工程で抽出を行っており、迅速に液液分配ができるため、検査時間は、例えば検体数を15検体とした場合、約6時間から約4時間半に短縮することが可能となった。

(2) 妥当性評価について

牛の腎臓、豚の筋肉及び豚の腎臓について妥当性評価を実施したところ、表2に示す結果となった。従来法と改良法でガイドラインの基準を満たした動物用医薬品の総数を比較すると、牛の腎臓で従来法37物質から改良法47物質に、豚の筋肉では従来法23物質から31物質、豚の腎臓では従来法24物質から37物質といずれも検査可能な動物用医薬品の総数を増やすことができた。これは主にキノロン系薬剤の回収率の向上が一因と考えられる。キノロン系薬剤はガラス器具への吸着によって回収率が減少することが知られているが、この吸着はギ酸の添加によって防ぐことができるとの報告があり⁴⁾、改良法ではこの報告を参考に標準溶媒及び最終検液にギ酸を添加している。その結果、キノロン系薬剤の回収率が向上し、ガイドラインの評価基準を満たす物質を増やすことができたと考えられる。

一方、従来法でガイドラインの評価基準を満たしていた物質が改良法に変更することで、評価基準に適合しなくなった物質がいくつかあるが、ガイドラインの真度の目標値70~120%をわずかに外れた物質も多かったことから、今後、改良法の精度管理データの蓄積及びそのデータの見直しを行うことで、分析可能な物質を増やしていくことが期待できる。

表2 妥当性評価試験の結果

No.	薬物名	牛の腎臓		豚の筋肉		豚の腎臓	
		従来法	改良法	従来法	改良法	従来法	改良法
1	thiabendazole deriv	0	0	X	0	X	0
2	lincomycin	0	0	X	X	X	X
3	levamisole	0	0	0	0	0	0
4	albendazole	0	0	0	0	0	0
5	diaveridine	0	0	0	0	X	0
6	trimethoprim	0	0	X	0	0	0
7	marbofloxacin	X	0	X	0	X	0
8	pyrantel	0	0	0	X	X	0
9	ofloxacin	X	0	X	0	X	0
10	ormethoprim	0	0	0	0	0	0
11	ciprofloxacin	X	X	X	X	X	X
12	sulfisomidin	0	0	0	X	X	X
13	danofloxacin	X	0	X	0	X	X
14	TBZ	0	0	X	0	X	0
15	enrofloxacin	X	0	X	0	X	0
16	orbifloxacin	0	0	X	0	X	0
17	xylazine	0	0	X	X	0	0
18	morantel	0	0	X	0	0	0
19	difloxacin	X	0	X	0	X	0
20	tripeleppamine	X	0	X	0	X	0
21	clopidol	0	0	0	X	X	0
22	pyrimethamine	0	0	X	0	X	0
23	sulfacetamide	0	0	0	0	0	0
24	carazolol	0	0	X	X	0	0
25	sulfathiazole	0	0	X	0	X	0
26	sulfadiazine	0	0	0	0	0	0
27	sulfapyridine	0	0	0	X	X	0
28	oxibendazole	X	0	X	0	X	X
29	sulfamerazine	0	0	0	X	X	0
30	tiamulin	0	0	X	0	X	0
31	sulfamethoxypridazine	X	0	X	X	0	0
32	sulfadimidine	0	0	0	0	X	0
33	josamycin	X	X	X	X	X	X
34	sulfamonomethoxine	0	0	0	X	0	0
35	sulfisozole	0	0	0	0	0	0
36	sulfachlorpyridazine	0	0	0	X	0	0
37	sulfadoxine	0	0	0	0	0	0
38	sulfamethoxazole	0	0	0	0	0	0
39	sulfisoxazole	0	0	0	X	0	0
40	oxolinic_acid	X	X	X	X	0	X
41	ethopabate	0	X	0	X	0	X
42	sulfadimethoxine	0	0	X	X	X	0
43	sulfabenzamide	0	0	0	0	0	0
44	sulfaquinoxaline	0	0	0	X	0	X
45	bromacil	0	0	X	0	0	X
46	flubendazole	X	0	X	X	X	X
47	nalidixic_acid	0	0	0	0	0	0
48	flumequine	0	X	X	0	0	X
49	menbutone	X	0	X	0	X	X
50	praziquantel	X	X	X	X	X	X
51	ketoprofen	X	0	X	0	X	X
52	warfarin	X	0	X	X	X	X
53	rifaximin	X	X	X	X	X	X
54	coumatetralyl	X	X	X	X	X	X
55	2-acetylamino-5-nitrothiazole	0	0	0	X	0	0

4 まとめ

改良法による妥当性評価を実施した結果、測定した動物用医薬品 55 物質のうち、牛の腎臓で 47 物質、豚の筋肉で 31 物質、豚の腎臓で 37 物質の薬物がガイドラインの妥当性評価基準を満たすことができた。また、改良法は従来法と比較して、より多くの薬物を測定可能にしたことに加え、検査工程の簡便化によって検査時間が短縮でき、効率よく検査を行うことができた。

今後は、改良法の精度管理データの蓄積及びそのデータの見直しを行うことで、今回妥当性評価基準を満たすことができなかった薬物についても基準を満たすことができるよう検討するとともに、鶏や魚介類等、他の検体種についても改良法の妥当性評価を実施していく予定である。

5 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局；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
- 2) 西村一彦ほか；LC/MS/MS による動物用医薬品の迅速一斉分析法の改良と妥当性評価. 道衛研年報. 2013, 57-63.
- 3) 島三記絵ほか；STQ 法と LC/MS/MS を組み合わせた食肉中の動物用医薬品高速一斉分析（前処理編）. 第 114 回（公社）日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集. 2018, 124.
- 4) 松本直之ほか；動物用医薬品分析におけるバイアルの違いによる吸着性の検証. 平成 30 年日本食品衛生学会近畿地区勉強会抄録. 2018, 6.

一般食品からのノロウイルス検査法について

京都市衛生環境研究所 微生物部門

○富田 陽子, 金地 真世, 原田 裕子
松本 剛芳, 仲井 まなみ

1 はじめに

平成 30 年度の食中毒統計によると、全国で 1,330 例の食中毒事件が発生し、そのうち約 2 割となる 256 例がノロウイルス（以下、NoV）によるものである。同様に全食中毒患者数 17,282 名中、過半数にあたる 8,876 名が NoV の感染によるものであり、NoV は食中毒原因物質として重要な位置にある。しかし、次の 3 つの理由によりカキ以外の食品の NoV を検査することは一般的に難しい。1 つ目は、NoV は一般食品中で増殖しないためにウイルス量が少ない場合が多く、さらに検体を緩衝液に懸濁するため、減量濃縮を行わなければ検出できない、2 つ目は、食品検体は患者便のように一部を代表検体として間引き検査することができず、検体数が多くなる、3 つ目は、炭水化物や脂質を多く含む食品の場合、RNA 抽出や PCR の過程で問題が起こる場合があるためである。

現在、食中毒疑い事例に係る一般食品からの NoV 検査は超遠心法で実施している。しかし、超遠心法は 1 回で遠心できる検体数に限りがあり、遠心時間も長いため、多検体の場合は時間を要する。また、本研究所の移転によって一部の機器が管理区域外に設置されるため、検体を持ち出せない、脂質を多く含む食品では分離がうまくいかない場合があるという問題も抱えている。

平成 25 年に一般食品からのウイルス濃縮法として通知¹⁾されたパンソルビン・トラップ法（以下、パントラ法）は、対応可能な食品の範囲が広く、長時間の遠心が無いため、多検体の場合は本法が有用と考えられる。そこで、今後、本法も食中毒検査で用いることができるよう検討した。

2 目的

一般食品から NoV を検出する方法の一つとして、パントラ法を検討する。

3 材料と方法

(1) 材料

実験に用いるモデル食品としては、炭水化物の多いものとしておにぎりを、脂質の多いものとしてかつとじを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、2019年4月に当部門で検出した NoV（遺伝子型別：G II.2）を含む糞便を用いた。

(2) 方法及び試薬類

平成 25 年 10 月 22 日付け食安監発 1022 第 1 号の通知に基づき、実施した。

なお、 α -アミラーゼは粉末に含まれる賦形剤の影響を除くため、事前に液化調製したものを使用した²⁾。また、非特異反応抑制のための DNase 処理には DNase I を用いた。逆転写反応の条件等は表 1 のとおりである。

表 1 逆転写反応の条件および反応液の組成

	反応条件		反応液の組成 (A・B 共通)	
A	42°C, 15 分	d H2O		4 μ L
	85°C, 5 秒	5xPrimeScript Buffer		4 μ L
	4°C, 保存	PrimeScript RT Enzyme Mix I		1 μ L
B	50°C, 15 分	2 μ M G2Mix Primer		1 μ L
	85°C, 5 秒	RNA		10 μ L
	4°C, 保存			(計 20 μ L)

(3) 装置

逆転写反応にはタカラバイオ社製 Thermal Cycler Dice Model TP600 を、また、Real-time PCR には、Thermo Fisher Scientific 社製 ABI 7500 Real-Time PCR System を用いた。

4 結果

(1) パンソルビン・トラップ法によるウイルス濃縮効果の確認

NoV 添加液 (40,934 コピー/140 μ L) を食品洗じょう液 45mL に加え、そのまま RNA を抽出したもの (濃縮前) と、パンソルビン・トラップ法で濃縮してから RNA を抽出したもの (濃縮後) を、表 1 の条件 A で逆転写反応を行い、リアルタイム PCR で定量した。結果は図 1 のとおりである。濃縮前の Ct 値 (増幅が指数関数的に起こる領域で、増幅産物が一定量に達するまでのサイクル数) が 34.70 (105 コピー) であったのに対し、パンソルビン・トラップ法による濃縮後は 28.66 (5,592 コピー) であり、濃縮効果を確認できた。

(2) 逆転写反応の条件検討

逆転写反応の条件 A は、逆転写酵素 (PrimeScript) のメーカーが Gene Specific Primer を使用する場合に推奨している条件である。しかし、パンソルビン・トラップ法で抽出した NoV の RNA を PrimeScript で逆転写すると、試薬 (黄色ブドウ球菌) 由来の RNA (16s リボソーム) による非特異的反応が起こり、反応効率が下がるとの報告がある²⁾。そこで、非特異的反応の改善を目的として、逆転写温度を 50°C に設定した条件 B について検討した。

高濃度 (約 4×10^4 コピー/140 μ L) NoV 添加・パンソルビン・トラップ抽出物を条件 A (42°C) および条件 B (50°C) で逆転写したところ、Ct 値はそれぞれ 28.66 および 27.91 であった (図 2 上)。また、低濃度 (約 1×10^3

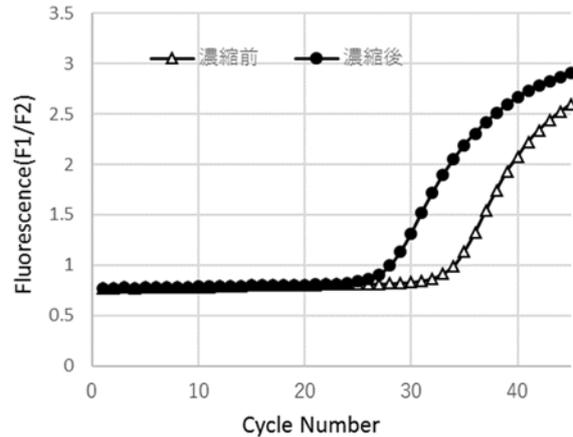


図 1 濃縮効果の確認

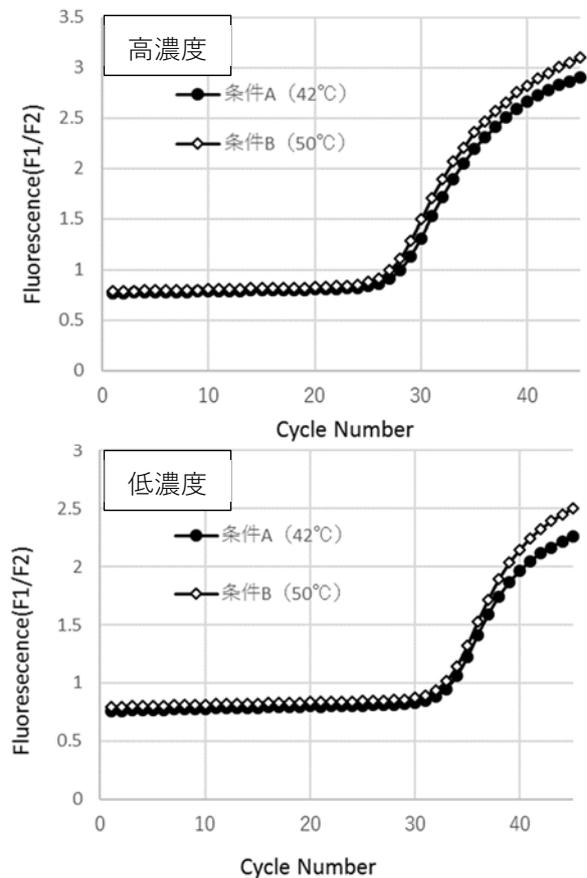


図 2 逆転写反応条件による違い

コピー/140 μ L) NoV 添加-パンソルビン・トラップ抽出物を条件 A (42°C) および条件 B (50°C) で逆転写したところ、Ct 値はそれぞれ 31.60 および 31.38 であった (図 2 下)。どちらの条件でも大きな差はなかったが、繰り返し試験を実施したところ、条件 B では結果にばらつきが見られたため、条件 A を採用することとした。

(3) 一般食品からの NoV 検査

おにぎり (O) またはかつとじ (K) に対し、高濃度 (H, 約 4×10^3 コピー/g・食品) または低濃度 (L, 約 4×10^2 コピー/g・食品) の NoV 添加液を加え、パンソルビン・トラップ法で検査したところ、全ての検体において検量線下限値 (ST100, 100 コピー) を超え、検出することができた (図 3)。

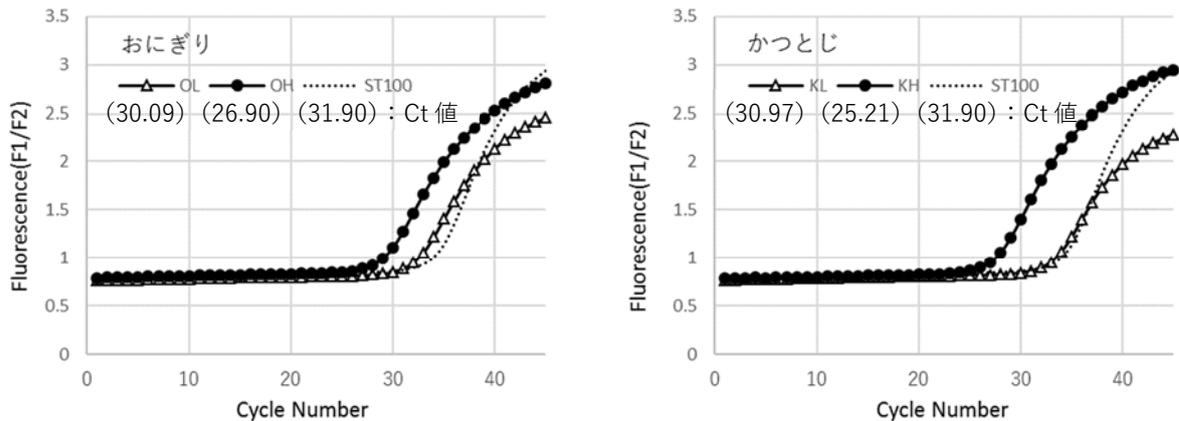


図 3 食品からの NoV 検出

* 点線で示した ST100 は検量線の下限值である 100 コピーを表す。

5 考察およびまとめ

パントラ法の基本原理は、NoV 食品乳剤中にウイルスに対する抗体を添加することにより、抗原抗体複合体を形成させ、それを黄色ブドウ球菌表面のプロテイン A に吸着させることで、菌体とともにウイルス粒子を沈殿・回収するものである。最大の長所は、食品乳剤が濁っても検出できるため、これまでに使われてきた PEG 沈殿法や超遠心法と比べて多種多様な食品からウイルスを検出できることである。また、高速冷却遠心器等の高価な機器を使わず、多検体を同時に検査できる利点もある。

本研究では、パントラ法による NoV 濃縮効果の確認と逆転写反応条件について検討を行った。さらに、モデル食品を用いた実試験を行い、今後、食中毒 (疑) 検査に用いることができることを確認した。NoV 濃縮効果の検討では、約 50 倍 (105 コピー→5,592 コピー) に濃縮され、少量のウイルスであっても検出できる可能性が高くなった。続いて、逆転写反応条件の検討では、42°C も 50°C も Ct 値に大きな差が見られなかったが、42°C のほうが安定した結果が出たため 42°C を採用した。増幅効率 (縦軸の値) については 50°C の方が高いことから、検出限界においては有利となると考えられる。これは非特異的反応が減るためであると考えられるが、高温になりすぎるとプライマーのアニーリング効果が下がることから、一長一短であると考えられる。また、一般食品からの NoV 検査の確認に際し、炭水化物は骨格が核酸と似ているため、プロセスの最後までウイルス RNA と共沈することで PCR に影響し、脂質は超遠心法で分離がうまくいかない場合があることから、モデル食

品として、炭水化物が約 4 割を占めるおにぎりや脂質が約 3 割を占めるかつとじを用いた。NoV 添加液は濃縮効果を確認した際に使ったものと、さらに 10 倍希釈したものを使用した。どちらも検量線下限値を上回り、陽性として検出することができた。以上のことから、食中毒（疑）検査にパントラ法を用いることができると考えられる。

パントラ法の導入によって、対応可能な食品の範囲が広がるだけでなく、長時間の遠心がなくなったことによって、以前の方法よりも多くの検体を処理できるようになった。また、NoV だけでなく、A 型肝炎ウイルスやヒトに感染する全 4 種のサポウイルス等についても用いることができる³⁾という報告があり、有用であると思われる。しかし、一部の遺伝子型の NoV に対して反応性が低いなどの欠点もあり、まだ検討の余地が残る。また、食品の種類についても、表面が平滑で NoV を抽出しやすい食品もあれば、表面汚染にとどまらない食品もあること等、実例を経験しなければ分からないこともあると予想される。今後もさらにノウハウを積み重ねたい。

(参考文献)

- 1) 平成 25 年 10 月 22 日付け厚生労働省医薬食安全部監視安全課長通知 食安発 1022 第 1 号：「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について
- 2) 斎藤博之，他：食品からのウイルス検出法としてのパンソルビン・トラップ法の精度向上に関する研究，秋田県健康環境センター年報，**10**，2014，37-58
- 3) 斎藤博之：食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発，日本食品微生物学会雑誌 Jpn. J. Food. Microbiol.，**29**(1)，32-37，2012

京都市内におけるマダニの生息調査について

微生物部門

○木澤 正人, 力身 覚, 仲井まなみ

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、ウイルス感染症のマダニ媒介性脳炎、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）等が知られてきた。SFTSについては平成 25 年 1 月に感染した患者が国内で初めて報告されてから現在では西日本を中心として 24 府県から患者が報告されている。

平成 23 年に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行く場所において、多種多数のマダニが生息しているのを確認している。

平成 26 年度からは、野生鹿の目撃情報がある宝ヶ池公園へ、月 1 回採集に出向き、マダニの生息実態を調査している。今年度は、更に山間部に位置する氷室地域でのマダニの生息調査とその年間消長を観察し、季節による優占種の変化をみた。また発生しているマダニの種別を詳しく調べた。

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) 採集場所と調査期間

宝ヶ池公園内（平成 31 年 1 月～12 月）

氷室地域内（平成 31 年 4 月～12 月）

3 結果と考察

宝ヶ池公園内で採集できたマダニは、フタトゲチマダニ 153 個体（成虫 49, 若虫 104）、キチマダニ 863 個体（成虫 146, 若虫 717）、計 1016 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 84.9% を占めており、優先種となっている。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、5 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た。一方、キチマダニは 7 月～8 月にかけてはほとんど採集されず、11 月、12 月に多く採集された。（図 1）

フタトゲチマダニは、夏のダニと言われており、春から夏に多く捕れ、それ以外の季節は少なかった。またキチマダニは、冬のダニと言われているが冬が多いものの夏以外の季節でも多く採集された。

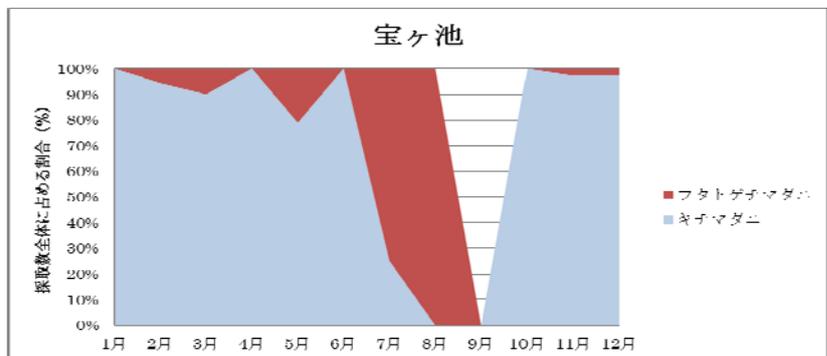


図 1：採集数全体に占める割合

氷室地域内で採集できたマダニは、フタトゲチマダニ 43 個体 (成虫 15, 若虫 28), キチマダニ 41 個体 (成虫 8, 若虫 33), ヒゲナガチマダニ 26 個体 (成虫 26), ヤマトマダニ 1 個体 (成虫 1), 計 111 個体であった。調査期間を通じてフタトゲチマダニが全体採集の 38.8%, キチマダニが同 36.9%であり, わずかにフタトゲチマダニが, 優先種となっている。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~7 月まで採集されたが 8 月以降は捕れなかった。キチマダニは 4 月~5 月にすこし採集され, 6 月~9 月は採集されず, 11 月, 12 月に多く採取された。ヒゲナガチマダニは 4 月~5 月にすこし採集され, 6~10 月は採集されず 12 月に多く採取された。ヤマトマダニは 4 月しか採集されなかった。(図 2)

キチマダニとヒゲナガチマダニの季節消長が似ている

がヒゲナガチマダニは成虫だけ捕れ, 若虫が捕れないのは不思議である。

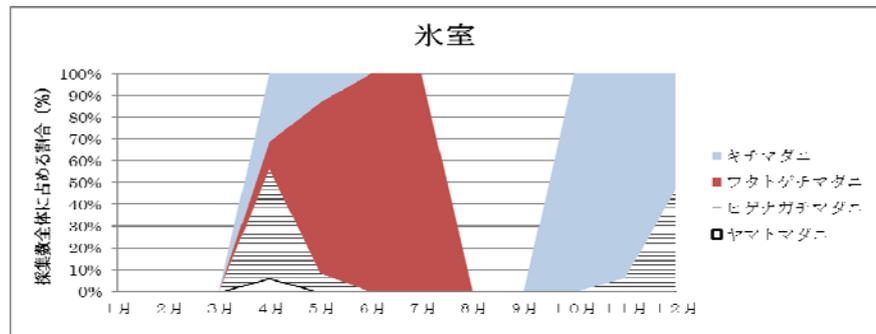


図 2 : 採集数全体に占める割合

宝ヶ池公園内と氷室地域内で採取されたマダニは 4 種類であり, 以下のような特徴がある。

フタトゲチマダニ (図 3) 体長 2~3.0mm, 背板は赤みがかった黄色, 肛門の後方に肛囲溝があり, 胴後縁に花彩を持っている。口器触肢第 3 節後縁は背腹ともに棘をもち第 2 節外縁が突出した後外角はやや強い。多数の大・中型野生哺乳類や鳥類にも少数ずつ見られ, ヒトの寄生例もある。

キチマダニ (図 4) 体長 2~3.0mm, 体は黄色, 肛門の後方に肛囲溝があり, 胴後縁に花彩を持っている。口器触肢第 2 節の後外角をもつ。成虫は多くの野生動物に寄生する。

ヒゲナガチマダニ (図 5) 体長 2~3.0mm, 体は茶褐色, 肛門の後方に肛囲溝があり, 胴後縁に花彩を持っている。雌雄とも口器触肢第 2 節が側方にほとんど突出しない。

ヤマトマダニ (図 6) 体長約 3.0mm, 体は黄褐色, 肛門の前方に肛囲溝があり, 胴後縁に花彩を欠く成虫はヒトを含む大型の哺乳類に寄生する。国内でのヒト寄生症例のもっとも多い種である。



図 3 フタトゲチマダニ (♀) 図 4 キチマダニ (♀) 図 5 ヒゲナガチマダニ (♀) 図 6 ヤマトマダニ (♀)

4 まとめ

平成 26 年度より宝ヶ池公園内で調査を行い, 概ねフタトゲチマダニ, キチマダニの 2 種類が採取された。また氷室地域で調査したところこの 2 種類以外にヒゲナガチマダニ, ヤマトマダニが採取された。宝ヶ池公園は, 自然豊かな公園に住宅地が隣接している。氷室地域は自然豊かな山地に住宅がまばらに点在している。植物層や動物層が違う 2 地域を単純に比較するのは難しいが京都市内においてマダニの分布に違いのあることがわかった。

今後も継続して京都市におけるマダニの分布や生息状況を調査するとともに, マダニの刺咬被害を防ぐよう市民啓発を行うことや環境改善を行うことが重要であると思われる。

一農場で多発した豚サルモネラ症について

食肉検査部門

○平岩 悟, 浜田 絢也, 森田 鮎子, 杢尾 慧以, 児玉 泰輔,
川見 明日香, 的場 教起, 小野寺 佳隆

1 背景

豚サルモネラ症は世界各国に分布し、わが国でも 1990 年台以降各地で多発している、敗血症や下痢症を主徴とする感染症である。*Salmonella enterica* subsp. *enterica* のうち、血清型 Choleraesuis (以下 SC) 及び血清型 Typhimurium が病原菌として分離頻度が高く、この 2 つの血清型は家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定されている。

昨年 7 月、A 農場から搬入された豚一頭を疑サルモネラ症として保留・精査した結果、肝臓、脾臓及び肺臓から SC を検出したため、豚サルモネラ症と判定し全部廃棄措置をとった。当部門における豚サルモネラ症の判定は平成 23 年度以来 8 年ぶりであり、その検査結果について報告する。

2 材料及び方法

解体後、内臓検査において肉眼所見によりサルモネラ症を疑い保留した豚から、筋肉、脾臓、腎臓、肝臓及び肺臓を採取し検体とした。

(1) 病理学的検査

肝臓、腎臓、脾臓を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋・薄切、HE 染色を実施した。

(2) 細菌学的検査

各検体について、ES サルモネラ寒天培地及び ES サルモネラ寒天培地 II (栄研化学；以下 ES 及び ES II) に新鮮創をスタンプして画線し、37°C、24 時間好気培養した。加えて、ラバポート培地 (栄研化学) 30 ml に対して検体約 3 g を無菌的に加え、37°C、24~48 時間好気培養、24 時間及び 48 時間培養後の培養液 1 白金耳を ES 及び ES II に画線、37°C、24 時間好気培養した。サルモネラ菌を疑うコロニーについて、当該コロニーを TSI 培地 (日水製薬)、SIM 培地、VP 半流動培地、LIM 培地及びシモンズクエン酸ナトリウム培地 (いずれも栄研化学) に接種し 37°C、24 時間 (シモンズクエン酸ナトリウム培地は最大 96 時間) 培養し生化学的性状を確認、さらに羊血液寒天培地 (栄研化学) に画線して純培養を行った。純培養で得られた菌体について、Api20E (バイオメリュー) を用いて菌種同定を、サルモネラ免疫血清「生研」及びサルモネラ相誘導用免疫血清「生研」(デシカ生研) を用いて抗原構造の検査を行った。

3 結果

(1) 病理学的検査

肝臓において、周辺帯及び小葉内における組織球、リンパ球及び肝細胞の壊死からなる小結節（チフス結節）が多数認められた。中心静脈付近では中心静脈の血管壁の肥厚、硝子血栓及び小出血を認め、洞様毛細血管の拡張、肝細胞索の乱れ、肝細胞の硝子滴変性及びマクロファージの滞留を認めた。腎臓において、肝臓と同様にマクロファージやリンパ球からなる小結節を認めた。脾臓ではリンパ性動脈周囲鞘（白脾髄）の発達を認め、この部位でマクロファージの集簇を認めた。

(2) 細菌学的検査

肝臓、脾臓及び肺臓のスタンプ及び増菌培養液を画線した ES に無色透明小コロニーを、ES II に桃色小コロニーを認めた。生化学的性状は TSI（高層部黄変・斜面部無変化）、インドール産生（-）、運動性（+）、IPA 反応（-）、硫化水素産生（-）、VP（-）、リシン脱炭酸（+）、クエン酸塩利用（-）、であった。抗原構造は 7:c:1,5（O 抗原：H 抗原 I 相：H 抗原 II 相）であった。これらの結果と Api20E の糖分解の結果から、硫化水素非産生 SC（*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis var Choleraesuis）と判定した。

4 まとめ

当部門において、8年ぶりに豚サルモネラ症を判定し、全部廃棄措置をとった。同 A 農場の豚において、今年度の実績として1月末の時点で計17頭を疑サルモネラ症として保留、14頭で SC を検出し全部廃棄している。SC は届出伝染病であり、単一臓器からの検出でも全部廃棄措置となるため、養豚業において大きな経済的損失をもたらす。この A 農場では罹患豚からの垂直・水平感染による伝搬や豚舎に菌が定着している可能性がある。SC は感染しても発病するとは限らず、不顕性感染の場合、豚の疾病としては問題にならないが、と畜場で豚肉を汚染することにより人の食中毒の原因となる危険性もあるため、公衆衛生上も大きな問題である。生産者や消費者の食の安全・安心のためにも、管轄の家畜保健衛生所との連携により、生産段階でのサルモネラの清浄化に寄与したい。