



# 横須賀市健康安全科学センター一年報

第 15 号

平成 24 年度（2012 年度）

横須賀市健康安全科学センター

## はじめに

横須賀市健康安全科学センターは、市民の健康と環境を守る中核検査機関として、食の安全、感染症のまん延防止、生活環境の保全そして飲用水の安全確保のための試験検査・調査研究に取り組んでまいりました。近年は健康や安全への関心の高まりを背景に、積極的に新規項目の検査体制を整備し、新たな検査技術を導入する一方で、厳密な検査精度の追求による検査の信頼性確保にも努めています。

平成 24 年度は検査の多様化、高度化の傾向がより顕著になりました。感染症関連では、前年度からの麻疹の排除に向けた取組みに続いて、後半は MERS、鳥インフルエンザ A(H7N9)、SFTS の侵淫に備えた検査体制の整備、そして風疹の流行と、一部は年度をまたいで多様な感染症への対応に追われました。またインフルエンザウイルス薬剤耐性調査では、当該シーズンの抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス (IASR) 報告に登載のとおり、AH1pdm09 2 株から H275Y 変異を検出しました。理化学検査では、質量分析計による微量分析の比重が高まる中で、畜産物中の残留動物用医薬品調査を継続し、さらに農薬検査の妥当性評価にも着手しました。いずれの取組みにおいても設備・予算の厳しい制約の中で一定の成果を得ています。業務の概要を本年報にまとめましたので忌たんのないご意見ご批評をお寄せください。

厚生労働省は、平成24年4月改正の地域保健対策の推進に関する基本的指針の中で、地方衛生研究所を地域保健対策に関する技術的中核機関と位置づけ、検査機能の一層の充実強化の必要性を指摘しました。当センターは、旧衛生試験所業務を引き継いで平成18年に開設して以来、市民・行政の多様な要請に応じてまいりましたが、その基盤となる高度な検査体制を将来にわたって維持、強化していくためには、今後、検査機器の更新と検査機能の向上を遅滞なく進めていかなければなりません。皆様からの一層のご指導とご支援をお願い致します。

平成 25 年 12 月

横須賀市健康安全科学センター所長 村田省平

# 目 次

I	概 要	
i	健康安全科学センターの概要	
1	沿革	1
2	施設	2
3	組織	3
4	職員構成	4
5	平成 24 年度、歳入、歳出決算額	4
6	主要備品の整備状況	5
II	試験検査実施状況及び事業概要	
i	試験検査実施状況	
1	微生物学的検査	7
2	臨床検査	9
3	食品、家庭用品等検査	10
4	大気、水質、廃棄物等の検査	11
5	精度管理	12
6	調査研究	12
ii	感染症検査業務	
1	予防検査	13
2	感染症病原体検査	14
3	食中毒(疑)、有症苦情検査	15
4	結核菌(抗酸菌)	15
5	感染症発生動向調査	15
iii	臨床検査業務	
1	血液検査	17
iv	食品、家庭用品等検査業務	
1	食品微生物検査	18
2	食品理化学検査	22
3	家庭用品試買検査	27
v	大気、水質、廃棄物等検査業務	
1	飲用水、利用水等水質検査	29
2	環境・公害関係検査	31
III	精度管理の実施状況	
i	精度管理実施状況	37
IV	調査研究	
・	市内に流通している畜産物中の残留動物用医薬品調査(第 2 報)	39
・	インフルエンザウイルス薬剤耐性調査	51
V	資料	
・	腸管出血性大腸菌の検査方法 検討結果	63
・	クラジミア遺伝子検査法について	69
・	横須賀市における HIV 等の検査状況について	75
・	横須賀市におけるインフルエンザウイルス検出状況(平成 24 年度)	77
・	ランタン-アリザリンコンプレキソン吸光光度法による ふっ素化合物試験における遊離塩素の生成について	79

# I 概 要

## i 健康安全科学センターの概要

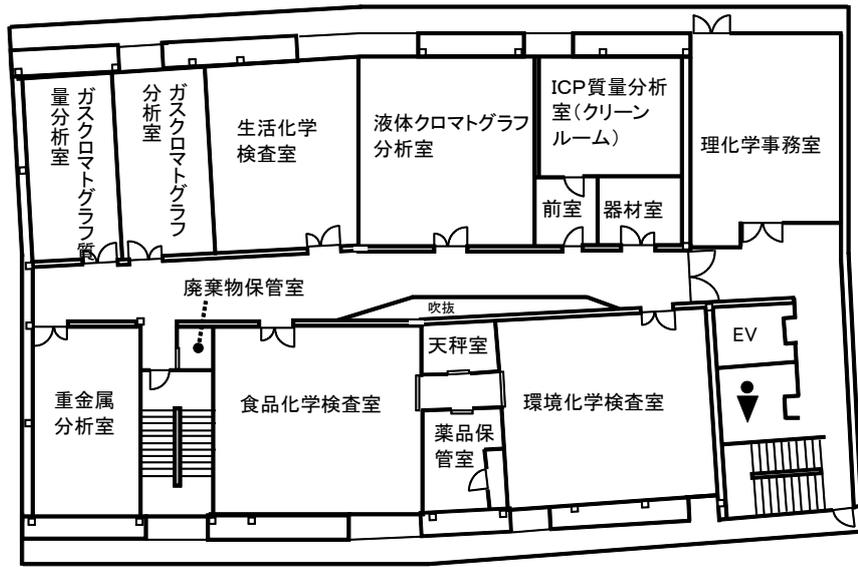
### 1 沿革

昭和 41 年 4 月	中央保健所と日の出診療所の検査部門を統合して衛生試験所を開設する。
昭和 49 年 9 月	中央保健所、衛生試験所合同庁舎新築により横須賀市米が浜通 2-7 に移転する。
昭和 52 年 4 月	事務分掌規則の改正により検査係が廃止となり、化学検査係と細菌検査係の二係となる。
昭和 62 年 4 月	衛生試験所条例施行規則の一部を改正し、手数料を全面改定する。
平成 7 年 4 月	水道法の改正に伴い、衛生試験所条例施行規則の一部を改正する。
平成 10 年 4 月	機構改革により主査制が導入され、環境検査・庶務担当と感染症・臨床・食品検査担当の二体制となる。
平成 12 年 4 月	手数料の条例化に伴い、衛生試験所条例及び施行規則の一部を改正する。
平成 13 年 1 月	保健所のウェルシティ市民プラザへの移転により、衛生試験所の単独施設となる。
平成 13 年 4 月	総務・管理担当、理化学検査担当、微生物・臨床検査担当の三体制となる。
平成 18 年 2 月	横須賀市日の出町 2-14 に新築移転。名称が「健康安全科学センター」となる。
平成 23 年 4 月	総務・管理担当、精度管理担当、理化学検査担当、微生物・臨床検査担当の四体制となる。

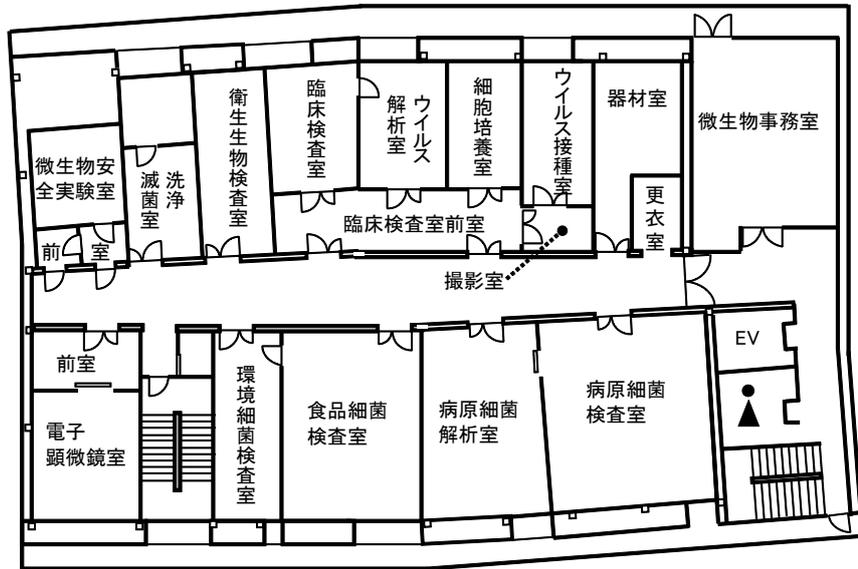
### 2 施設

所在地	〒238-0006 神奈川県横須賀市日の出町 2 丁目 14 番地 TEL 046 (822) 4057 (直通) FAX 046 (822) 5540	
敷地	敷地面積	1,460.12 m <sup>2</sup>
	総延床面積	2,349.71 m <sup>2</sup>
建物	鉄骨造（一部鉄筋コンクリート造 3 階建）免震装置付	

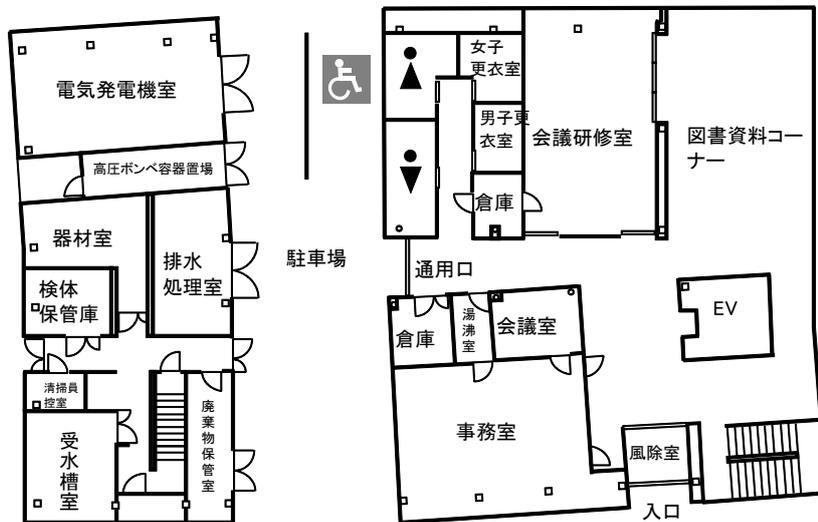
# 健康安全科学センター平面図



3階

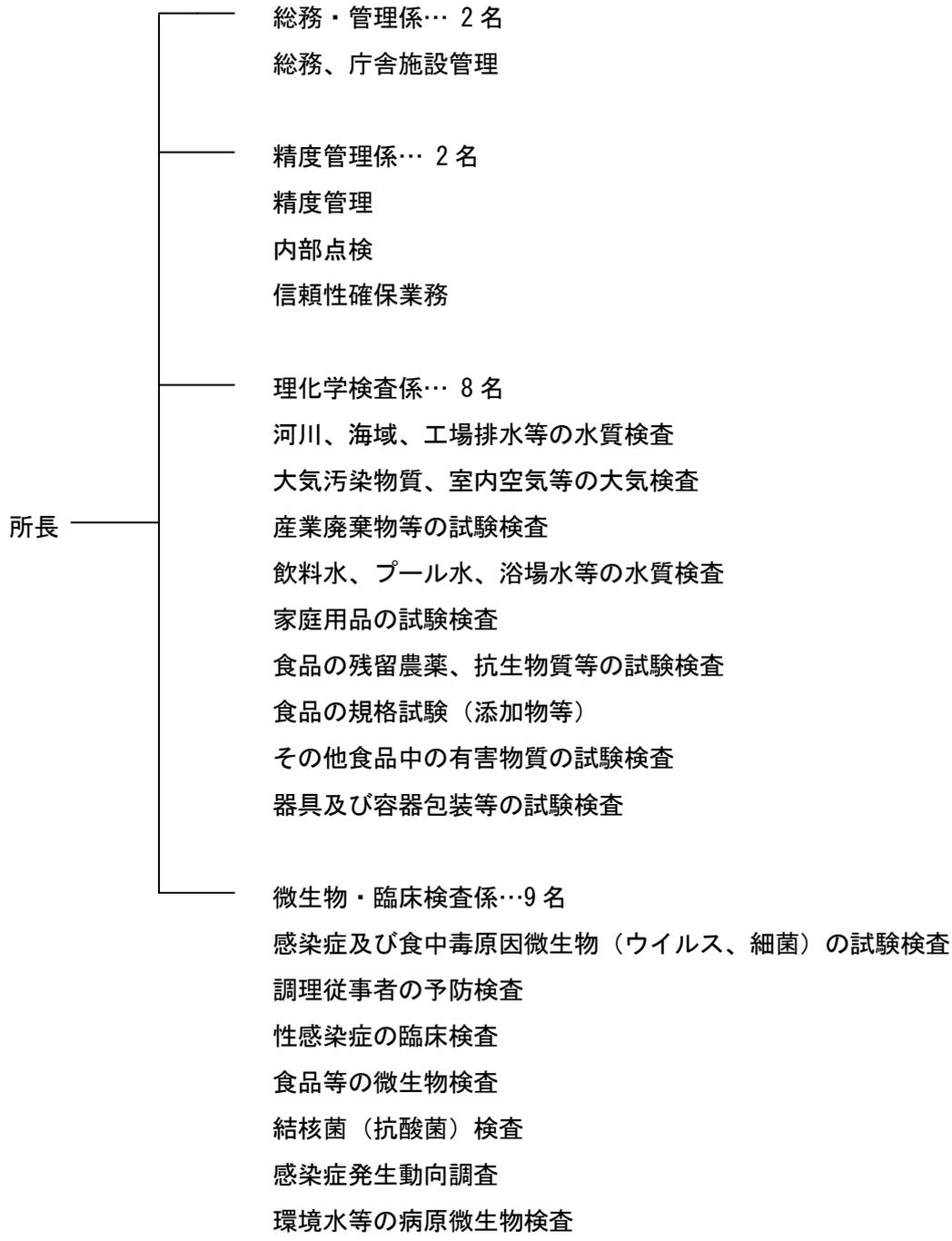
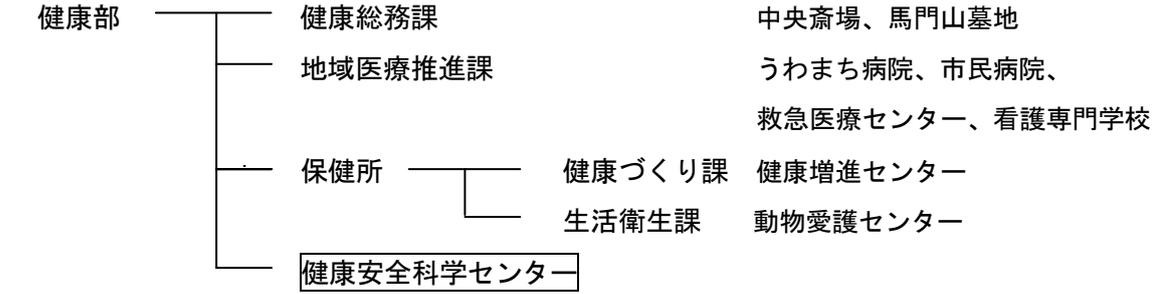


2階



1階

3 組織（平成 25 年 4 月 1 日現在）



#### 4 職員構成

平成 25 年 4 月 1 日現在

区 分	事務職	技 術 職			合 計
	一般事務	臨床検査技師	化学技術	看護師 准看護師	
所 長			1		1
総務管理 部 門	2				2
精度管理 部 門		2			2
理 化 学 検 査 部 門		2	5	1	8
微 生 物 臨 床 検 査 部 門		8		1	9
小 計	2	12	6	2	22

#### 5 平成 24 年度 歳入、歳出決算額

##### (1) 歳 入

(単位：円)

		予 算 現 額	決 算 額
健康安全科学センター手数料		7,367,000	7,185,500
内 訳	一 般 依 頼	7,367,000	7,185,500

##### (2) 歳 出

(単位：円)

節区分	内 訳	予 算 現 額	決 算 額
給	料	90,182,000	89,992,347
職 員 手 当 等		56,420,000	55,053,398
共 済 費		30,178,000	29,979,024
旅 費		277,000	234,250
需 用 費		35,141,368	34,819,792
役 務 費		607,000	542,166
委 託 料		33,016,000	32,807,341
使 用 料 及 び 賃 借 料		2,851,400	2,642,079
備 品 購 入 費		1,443,232	1,441,199
負 担 金 、 補 助 及 び 交 付 金		316,000	279,553
公 課 費		0	0
合 計		250,432,000	247,791,149

## 6 主要備品の整備状況

主要備品（100万円以上）

健康安全科学センター所管

平成 25 年 4 月現在

購入年度	品名	メーカー・規格	数量
S61	分光光度計	島津 UV-160	1
S63	マイクロプレートリーダー	東ソー MRP-A4	1
S63	オートダイリユーター	三光 SPR-2	1
H5	高速液体クロマトグラフ	日本分光ガリバーシリーズ	1
H5	顕微鏡（落射蛍光）	オリンパス BHS-RFC	1
H5	オートダイリユーター	三光 SJ101-24A	1
H7	増幅インキュベーター一式	日本ロシュ PCR-2400	1
H8	ポストカラム蛍光検出反応ユニット	日本分光	1
H8	有機溶媒回収用濃縮装置	柴田科学 B179	1
H9	微量高速遠心器	日立 Cr-22F	1
H9	テーハー式CO2培養器	平沢 CPD-1702	1
H9	滅菌器（高圧）GLP用	池田理化 MC-40	1
H10	高速液体クロマトグラフ	日本分光ガリバーシリーズ	1
H11	生物顕微鏡	オリンパス BX-40-33	1
H12	カンピロ・インキュベーター	ヒラサワ HZC-3	1
H12	炭酸ガス培養器	ヒラサワ CPD-1702	1
H12	炭酸ガス培養器	ヒラサワ CPD-1702	1
H12	組織顕微鏡	オリンパス IX70-22PM	1
H12	安全キャビネット	日本エアーテック BHC-1303 II A/B3 型	1
H12	GPC クリーンアップシステム	島津 LC-10AVP GPC システム	1
H13	パルスフィールド電気泳動装置	日本バイオラッドラボラトリー （株）CHEF MAPPER 他	1
H14	高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ 2695 システム	1
H15	振とう器	（株）杉山元医理器 VS-L	1
H15	水分活性測定装置	スイスアクセル社 THF100 型	1
H15	マイクロプレートリーダー	日本バイオラッド社モデル 680	1
H16	全有機炭素測定装置（TOC）	島津製作所 TOC-VCSH	1
H17	ガスクロマトグラフ	島津製作所 GC-2010	1
H17	液体クロマトグラフ質量分析計	日本ウォーターズ LC-MS/MS Quattro micro	1
H17	原子吸光光度計（水素化物発生装置付）	島津製作所 AA-6300	1
H17	蒸留装置	杉山元 P-521-1ELC	1
H17	赤外分光光度計	島津製作所 FTIR-8400	1
H17	イオンクロマトグラフ	ダイオネクス ICS2000, ICS1500	1
H17	マイクロウェーブ分解装置	理学 Multiwave3000	1
H17	Sep-pak コンセントレータープラス	日本ウォーターズ	2
H17	ガスブロー式濃縮ラック	GLサイエンス	1
H17	ロータリーエバポレーター	柴田科学 R-205V-5	1
H17	超純水製造装置	ミリポア EQE-3S	1
H17	誘導結合プラズマ質量分析計	アジレント AGILENT 7500CE	1

主要備品（100万円以上）の続き

購入年度	品名	メーカー・規格	数量
H17	ガスクロマトグラフ質量分析計（PT付）	アジレント GC-MS5973N	1
H17	ガスクロマトグラフ質量分析計（MS/MS）	バリアン 1200	1
H17	マウスゲージ	ヤマト科学 KN-734-A	1
H17	冷凍冷蔵庫	三洋バイオメディカ MDF-U72V	1
H17	恒温器	日本ビオメリュー バクテアラート 3D60	1
H17	クリーンベンチ	三洋バイオメディカ MCV-B131F	1
H17	超純水製造装置	日本ミリポア GPA-3S	1
H17	遠心沈殿器（冷却）	久保田商事 3-16K	1
H17	超高速遠心分離器	日立工機 CP-80WX	1
H17	遺伝子増幅装置（定量）	ABI 7900HT4	1
H18	ガスクロマトグラフ	島津製作所 GC-2010	2
H18	分光光度計	島津製作所 UV2550	1
H18	電子顕微鏡	日立ハイテクノロジーズ H-7650	1
H19	水銀分析装置	日本インスツルメンツ	1
H19	位相差機能付微分干渉顕微鏡	オリンパス BX51N-34DICT	1
H23	遺伝子解析装置（リース対応）	ベックマン・コールター GenomeLab GeXP Basic	1
H24	安全キャビネット	日本エアーテック BHC-1306 II A2	1

## Ⅱ 試験検査実施状況及び事業概要

# i 試験検査実施状況

## 1 微生物学的検査

表 1 微生物学的検査実施状況

		依頼によるもの						検体数 総合計	検 査 内 容	
		保 健 所		庁内各部署		その他（学校、 事業所等）				
		検体数	項目数	検体数	項目数	検体数	項目数		項 目 名	項目数
細 菌 検 査	分離・同定・検出	38	58	10,746	32,238			10,784	1. 大腸菌	10,787
									腸管出血性大腸菌 (EHEC)	10,784
									毒素原性大腸菌 (ETEC)	1
									組織侵入性大腸菌 (EIEC)	1
									腸管病原性大腸菌 (EPEC)	1
									2. 赤痢菌	10,747
									3. 腸チフス菌	1
									4. パラチフスA菌	1
									5. その他のサルモネラ属菌	10,747
									6. コレラ菌 01・0139 (CT+)	1
									7. コレラ菌 01・0139 (CT-)	1
									8. コレラ菌 (01・0139以外)	1
									9. 腸炎ビブリオ	1
									10. ビブリオフルビアールス	1
									11. ビブリオ・ミミカス	1
									12. エロモナス属菌	1
									13. プレジオモナスシゲロイデス	1
									14. カンピロバクター属菌	1
									15. エルシニア・エンテロコリチカ	1
									16. 黄色ブドウ球菌	1
									17. セレウス菌	1
									18. ウェルシュ菌	1
									19. ジフテリア菌	0
									20. A群溶血性レンサ球菌	0
21. A群以外の溶血性レンサ球菌	0									
22. 百日咳菌	0									
23. レジオネラ菌	0									
24. その他の細菌	0									
* 核酸検査 (PCR) ※	(122)									
* 核酸検査 (PFGE) ※	(2)									
結核	分離・同定・検出	4	8					4	1. 結核菌	4
									2. 非結核性抗酸菌	3
									3. 薬剤感受性検査	1
									* 核酸検査 (PCR) ※	(4)
									* 核酸検査 (VNTR) ※	(0)

※ 核酸検査のうち、項目数が他の検査と重複するものは数値を括弧書きとした（項目数に含まず）。

表2 微生物学的検査実施状況

			依頼によるもの						検体数 総合計	検査内容	
			保健所		庁内各部等		その他(学校、 事業所等)				
			検体数	項目数	検体数	項目数	検体数	項目数		項目名	項目数
ウイルス等検査	分離・ 同定・ 検出	ウイルス	169	624					169	1.細胞培養法	130
										2.血球凝集阻止試験	34
										3.イムノクロマト法	0
										4.中和試験	7
										5.薬剤耐性株検査	4
										6.蛍光抗体法	0
										5.EIA法	0
										8.核酸検査	449
										*核酸検査(DNAシークス)※	(5)
										10.その他	0
原虫 寄生 虫等	原虫	虫						0	1.アメーバ赤痢	0	
									2.クリプトスポリジウム	0	
									3.ジアルジア	0	
									4.その他	0	
	寄生虫	生虫							0	1.アライグマ回中卵	0
										2.その他	0
	そ族・節足動物							0		0	
	真菌・その他							0		0	
食 中 毒	病原 微生物 検査	細菌	38	798					38	1.大腸菌	152
										腸管出血性大腸菌(EHEC)	38
										毒素原性大腸菌(ETEC)	38
										組織侵入性大腸菌(EIEC)	38
										腸管病原性大腸菌(EPEC)	38
										2.赤痢菌	38
										3.腸チフス菌	38
										4.パラチフスA菌	38
										5.その他のサルモネラ属菌	38
										6.コレラ菌 01・0139 (CT+)	38
										7.コレラ菌 01・0139 (CT-)	38
										8.コレラ菌 (01・0139以外)	38
										9.腸炎ビブリオ	38
										10.ビブリオフルビアーリス	38
										11.ビブリオ・ミミカス	38
										12.エロモナス属菌	38
										13.ブレジオモナスシゲロイデス	38
										14.カンピロバクター属菌	38
										15.エルシニア・エンテロコリチカ	38
										16.黄色ブドウ球菌	38
	17.セレウス菌	38									
	18.ウェルシュ菌	38									
	19.その他の細菌	0									
	*核酸検査(PCR)※	(38)									
	*核酸検査(PFGE)※	(0)									
	ウイルス	95	148						95	1.ノロウイルス	95
										2.アデノウイルス	16
3.ロタウイルス										16	
4.その他のウイルス										21	
*核酸検査(PCR)※										(116)	
*核酸検査(DNAシークス)※	(14)										
									5.電子顕微鏡検査	0	
	理化学的検査							0		0	
	その他							0		0	
平成24年度		344	1,636	10,746	32,238	—	—	11,090		33,874	
平成23年度		624	3,348	10,882	32,644	—	—	11,506		35,992	
平成22年度		548	2,440	11,124	33,372	—	—	11,672		35,812	
平成21年度		710	3,631	11,131	33,393	—	—	11,841		37,024	
平成20年度		727	2,876	11,171	33,513	—	—	11,898		36,389	

※ 核酸検査のうち、項目数が他の検査と重複するものは数値を括弧書きとした(項目数に含まず)。

## 2 臨床検査

表3 臨床検査実施状況

			依 頼 に よ る も の						検体数 総合計	検 査 内 容	
			保 健 所		庁内各部等		その他（学校、 事業所等）				
			検体数	項目数	検体数	項目数	検体数	項目数		項 目 名	項目数
性病	梅毒		218	436					218	1. RPRテスト	218
										2. イムノクロマト	218
	その他								0	3. その他	0
ウイルス・ リケツチス・ 等検査	抗体検査 クラミジア		213	426					213	1. IgA抗体	213
										2. IgG抗体	213
臨床検査	血清等 検査	エイズ ( HIV ) 検査	253	255					253	1. 一次	253
		Q F T 検査	281	281					281	2. 二次	2
平成	24 年 度		965	1,398	—	—	—	—	965		1,398
平成	23 年 度		892	1,327	—	—	—	—	892		1,327
平成	22 年 度		1,215	1,862	—	—	—	—	1,215		1,862
平成	21 年 度		1,029	1,617	—	—	—	—	1,029		1,617
平成	20 年 度		1,418	2,514	—	—	—	—	1,418		2,514

### 3 食品、家庭用品等検査

表4 食品、家庭用品等検査実施状況

		依 頼 に よ る も の								検体数 総合計	検 査 内 容	
		住 民		保 健 所		庁内各部等		その他(学校、 事業所等)			項 目 名	項目数
		検体数	項目数	検体数	項目数	検体数	項目数	検体数	項目数			
食 品 等 検 査	微生物学的 検 査			706	2,189	449	1,060	7	7	1,162	1. 一般細菌数	1,039
											2. 大腸菌群	732
											3. 腸管出血性大腸菌0157	66
											4. 腸管出血性大腸菌026	8
											5. サルモネラ	294
											6. 腸炎ビブリオ	156
											7. カンピロバクター	35
											8. 黄色ブドウ球菌	531
											9. ウェルシュ菌	0
											10. ノロウイルス	24
											11. その他	371
											* 核酸検査(PCR) ※	(35)
											* 核酸検査(DNAソークス) ※	(2)
		理化学的検査			227	3,819	19	593			246	1. 保存料
											2. 漂白剤	11
											3. 発色剤	27
											4. 着色料	0
											5. 甘味料	8
											6. 品質保持剤	25
											7. 酸化防止剤	4
											8. 殺菌剤	15
											9. 添加物他	6
											10. 残留農薬	3,679
											11. 動物用医薬品	332
											12. 環境汚染物質	51
											13. 乳成分	179
											14. 苦情品等	30
家 庭 用 品 検 査				46	46					46	1. ホルムアルデヒド	46
											2. 有機水銀化合物	0
											3. ディルドリン	0
											4. トリフェニルスズ化合物	0
											5. トリブチルスズ化合物	0
											6. メタノール	0
											7. テトラクロロエチレン	0
											8. トリクロロエチレン	0
											9. 容器試験	0
平 成 24 年 度	—	—	979	6,054	468	1,653	7	7	1,454			7,714
平 成 23 年 度	—	—	1,108	7,582	475	1,533	9	13	1,592			9,128
平 成 22 年 度	—	—	1,036	12,303	520	2,207	1	1	1,557			14,511
平 成 21 年 度	—	—	1,171	12,731	540	1,488	4	4	1,715			14,223
平 成 20 年 度	—	—	1,407	10,201	541	1,724	1	2	1,949			11,927

※：核酸検査のうち、項目数が他の検査と重複するものは数値を括弧書きとした（項目数に含まず）。

#### 4 大気、水質、廃棄物等の検査

表5 大気、水質、廃棄物等の検査実施状況

			依 頼 に よ る も の								検体数 総合計	検 査 内 容	
			住 民		保 健 所		庁内各部等		その他（学校、 事業所等）				
			検体数	項目数	検体数	項目数	検体数	項目数	検体数	項目数		項 目 名	項目数
水道水等 水質検査	飲用水	総検査数	6	57	1	2			93	1,108	100		1,167
		細菌学的検査	6	12	1	2			92	154	99	1. 一般細菌	99
												2. 大腸菌	99
												3. その他の菌	0
	理化学的検査	5	45					93	924	98	1. 簡易項目	965	
											2. 特殊項目	4	
											3. 複雑項目	0	
	（ブール水等を含む）	総検査数			127	699	145	943	122	732	394		2,374
		細菌学的検査			127	327	145	290	122	244	394	1. 一般細菌数	382
												2. 大腸菌	322
											3. 大腸菌群	60	
理化学的検査			123	372	145	653	122	488	390	1. 基準項目	1,457		
										2. その他の項目	56		
廃棄物	一般廃棄物	総検査数				3	26			3		26	
		細菌学的検査									0	0	
	産業廃棄物	理化学的検査					1	24			1	1. 溶出試験	24
		細菌学的検査									0	0	
環境・公害関係 検査	大気検査	SO <sub>2</sub> ・NO <sub>2</sub> ・OX等									0	0	
		有害化学物質 重金属等					7	21			7	1. 大気汚染物質	21
		酸性雨									0	0	
		その他									0	0	
	水質検査	公共用水域					12	40			12	1. 健康項目	0
												2. 生活項目	23
												3. その他の項目	17
	工場・事業場 排水 廃棄物処理場 排水含む						110	2,779	69	499	179	1. 健康項目	1,932
												2. 生活項目	1,238
												3. その他の項目	108
	浄化槽放流水						6	54			6	1. 健康項目	12
												2. 生活項目	42
												3. その他の項目	0
	悪臭検査										0	1. 悪臭物質	0
											2. 官能試験	0	
土壌・底質検査										0	1. 有害残留物質	0	
環境 微生物 検査	藻類・プランクトン・魚介類										0	1. 有害残留物質	0
	その他					30	30			30	1. 腸管系病原菌	30	
一般室内環境										0	1. 有害化学物質	0	
平成24年度		6	57	128	701	313	3,893	284	2,339	731		6,990	
平成23年度		16	176	169	914	314	3,735	287	2,430	786		7,255	
平成22年度		7	77	208	1,163	323	4,344	244	2,197	782		7,781	
平成21年度		8	88	211	1,194	406	5,111	195	2,004	820		8,397	
平成20年度		12	133	236	1,435	394	4,625	257	2,598	899		8,791	

## 5 精度管理

表6 外部精度管理実施状況

精度管理名	区分	検体数	検査項目	検査項目数
日臨技臨床検査 精度管理	微生物検査	7	グラム染色・鏡検	1
			分離培養同定検査	2
			薬剤感受性検査	3
			フォトサーベイ	4
神奈川県臨床 検査精度管理	微生物検査	4	グラム染色・鏡検	1
			分離培養同定検査	2
			薬剤感受性検査	5
水道水質検査 精度管理	環境理化学検査	1	濁度	1
		1	ベンゼン	1
		1	1,2-ジクロロエチレン	1
環境測定分析 統一精度管理	環境理化学検査	1	カドミウム	1
		1	銅	1
食品衛生 精度管理	食品細菌検査	1	菌数測定	1
		2	細菌同定	2
	食品理化学検査	2	添加物	2
		1	重金属	1
		0	残留農薬	0
		0	動物用医薬品	0
平成24年度	20		29	
平成23年度	20		32	
平成22年度	17		31	
平成21年度	16		21	
平成20年度	12		20	

表7 内部精度管理実施状況

精度管理名	区分	検体数	検査項目	検査項目数
臨床検査 精度管理	微生物検査	44	グラム染色・鏡検	8
			分離培養同定検査	10
			薬剤感受性検査	19
			フォトサーベイ	24
食品衛生 精度管理	食品細菌検査	8	細菌同定	8
		0	添加物	0
	食品理化学 検査	2	環境汚染物質	2
		0	残留農薬	0
		0	動物用医薬品	0
平成24年度	54		71	
平成23年度	40		67	
平成22年度	20		20	
平成21年度	22		2,784	
平成20年度	21		2,498	

## 6 調査研究

表8 調査研究実施状況

調査名	検体名	検体数	調査項目	調査項目数
インフルエンザウイルス 薬剤耐性調査	インフルエンザ患者 の咽頭ぬぐい液	50	インフルエンザウイルス各亜型の 薬剤耐性遺伝子	50
残留動物用医薬品調査	畜産物	8	残留動物用医薬品	244
平成24年度		58		294
平成23年度		58		604
平成22年度		22		3,724
平成21年度		52		3,968
平成20年度		72		3,010

## ii 感染症検査業務

本検査業務は、感染症や食中毒の予防検査として行う食品取扱者や給食従事者等の健常者検便、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や食品衛生法に基づき行う患者等の病原細菌およびウイルス検査、感染症発生動向調査で実施する病原細菌およびウイルス検査である。

平成 24 年度の検査実施状況を表 1 に示した。

表1 感染症検査実施状況

検査区分	件数	項目数	依頼元	件数	項目数
予防検査	10,746	32,238	教育委員会学校教育部 学校保健課	9,221	27,663
			こども育成部保育課	1,507	4,521
			こども育成部児童相談所	12	36
			教育委員会学校教育部 支援教育課	6	18
			その他の行政依頼	0	0
			一般依頼	0	0
感染症病原体検査	71	166	保健所健康づくり課(細菌)	41	121
			保健所健康づくり課(ウイルス)	30	45
食中毒(疑)、 有症苦情検査	100	838	保健所生活衛生課(細菌)	35	735
			保健所生活衛生課(ウイルス)	65	103
結核菌(抗酸菌)検査	4	8	保健所健康づくり課	4	8
感染症発生動向調査	169	624	保健所健康づくり課 (感染症疫学センター) (細菌)	0	0
			保健所健康づくり課 (感染症疫学センター) (ウイルス)	151	570
			保健所健康づくり課 (ウエストナイル等)	18	54
合計				11,090	33,874

### 1 予防検査

予防検査の実施件数 10,746 件 32,238 項目の内、検出病原菌はサルモネラ属菌 5 株であり、赤痢菌、腸管出血性大腸菌 0157、026、0111 は検出されなかった。

検出されたサルモネラ属菌は表 2 に示した。

表2 サルモネラ属菌の血清型

血清型		検出数
O7群	S.Infantis	1
	S.Montevideo	1
O4群	S.Derby	2
	S.Schwarzengrund	1
合計		5

## 2 感染症病原体検査

### 1) 細菌

感染症病原体検査の実施件数 41 件(糞便：22 件、菌株：19 件)121 項目の内、検出病原菌は腸管出血性大腸菌 6 株、毒素原生大腸菌 2 株、*S. aureus* エンテロトキシン A 型産生株 1 株及び *S. aureus* エンテロトキシン B 型産生株 1 株の計 10 株であり、検出率は 24. 4%であった。検出された病原菌を表 3 に示した。

表3 感染症病原体検査の検出病原菌

種類	血清型	毒素型等	検出数
腸管出血性大腸菌	O157 : H7	VT1 (+) ; VT2 (+)	3
		VT1 (-) ; VT2 (+)	1
	OUT : HNM	VT1 (-) ; VT2 (+)	2
毒素原性大腸菌	O6 : HNM	ST (+) ; LT (+)	1
	O27 : H7	ST (+) ; LT (-)	1
<i>S. aureus</i>		A型	1
		B型	1
合 計			10

### 2) ウイルス

感染症病原体検査のウイルス検査は保健所健康づくり課から、集団事例が 3 事例 14 件、給食従事者ノロウイルス検査(陰性確認検査)7 事例 16 件の依頼があった。また、原因施設は高齢者福祉施設が 2 事例、医療施設 1 事例、不明が 7 事例であった。

検査項目はノロウイルス(30 項目)、ロタウイルス(6 項目)、アデノウイルス(6 項目)、サポウイルス(3 項目)で、ノロウイルスはリアルタイム PCR 法、ロタウイルス、アデノウイルスはイムノクロマト法、サポウイルスは RT-PCR 法にて検査を行った。ノロウイルス検査検出状況を表 4 に示した。

ノロウイルス検査の事例数、検査件数、陽性数は昨年度に比べ、集団事例は 2 事例減少したが、給食従事者ノロウイルス検査(陰性確認検査)は 6 事例増加し、検査件数は 9 件、陽性数は 4 件増加した。また、今年度は G II (20 件)だけでなく、G I (1 件)も検出した。

表4 ノロウイルス検査検出状況

事例種別	原因施設	検体材料	検査件数	陽性数	検出ウイルス
集団3事例	高齢者福祉施設	便	3	2	G II 2件
	医療施設	便	8	7	G II 7件
	高齢者福祉施設	便	3	2	G II 2件
給食従事者 ノロウイルス 検査(陰性確 認検査) 7事例	不明	便	2	1	G II 1件
	不明	便	3	2	G II 2件
	不明	便	1	0	
	不明	便	3	2	G II 2件
	不明	便	4	3	G II 3件
	不明	便	2	1	G II 1件
	不明	便	1	1	G I 1件
合計			30	21	G I 1件、G II 20件

### 3 食中毒（疑）、有症苦情検査

保健所生活衛生課から依頼された食中毒（疑）及び有症苦情検査の内、細菌検査の依頼は 35 件 735 項目であった。検査の内訳は有症苦情事例が 2 事例 26 件 546 項目、他都市依頼事例が 8 事例 9 件 189 項目であった。病原菌の検出状況は、有症苦情事例で *S. aureus* エンテロトキシン B 型産生株 1 株、*S. aureus* エンテロトキシン C 型産生株 2 株、*S. aureus* エンテロトキシン A+C 型産生株 1 株及び *S. aureus* エンテロトキシン A+D 型産生株 1 株検出され、他都市依頼事例で *C. jejuni* 2 株と *S. aureus* エンテロトキシン A 型産生株 1 株及び *B. cereus* 嘔吐毒産生株 1 株検出された。細菌が原因と推定された食中毒事例は発生しなかった。

ノロウイルス等検査依頼は、65 件 103 項目あった。検査の内訳は有症苦情事例が 5 事例 51 件 89 項目（有症苦情事例に係る給食従事者ノロウイルス検査（陰性確認検査）1 件 1 項目含む）、他都市依頼事例が 9 事例 14 件 14 項目であった。

検査項目はノロウイルス（65 項目）、ロタウイルス（10 項目）、アデノウイルス（10 項目）、サポウイルス（9 項目）、アストロウイルス（9 項目）で、ノロウイルスはリアルタイム PCR 法、ロタウイルス、アデノウイルスはイムノクロマト法、サポウイルス、アストロウイルスは RT-PCR 法にて検査を行った。事例別検出状況は、有症苦情事例の 4 事例 12 件（GⅡ 12 件）、他都市依頼事例の 5 事例 7 件（GⅡ 7 件）がノロウイルス陽性となった。

### 4 結核菌（抗酸菌）検査

結核菌検査は保健所健康づくり課からの検査依頼が 4 件あり、管理健診の喀痰が 3 件と菌株の薬剤感受性検査が 1 件であった。

### 5 感染症発生動向調査

#### 1) ウイルス

平成 24 年度はインフルエンザウイルス 125 件、無菌性髄膜炎 7 件、流行性角結膜炎 5 件、麻疹 14 件（うち 1 件麻疹も実施）、の検査依頼があった。

#### ① インフルエンザ

本調査は、市内の医療機関から提供された咽頭ぬぐい液 39 件、鼻腔ぬぐい液 81 件とインフルエンザ防疫対策実施要領に基づき含嗽水 5 件の合計 125 件について、PCR または細胞培養によってインフルエンザウイルスの検出を行ったものである。その結果は表 5 に示すとおりである。検出されたインフルエンザウイルスの内訳は AH1pdm09 が 4 件（AH3 型が 93 件（62.4%）であり、B 型は 43 件（28.9%）であった。2 月に 1 件、3 月に 1 件から AH3 型、B 型共にインフルエンザウイルスが検出された。

表 5 インフルエンザウイルス検出状況

	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
検査件数	0	0	0	0	0	0	0	0	6	51	42	26	125
AH1pdm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
AH3	0	0	0	0	0	0	0	0	6	42	35	17	100
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	10	17
陰性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0	6

② 無菌性髄膜炎

無菌性髄膜炎を疑う髄液7件(6月2件、7月1件、8月1件、9月2件、10月1件)の検査依頼があり、細胞培養によるウイルス分離を行った。結果は6月依頼の便検体1件よりコクサッキーウイルス B1 型、9月依頼の髄液2検体よりエンテロウイルス(型別不能)、10月依頼の髄液検体1件よりエコーウイルス7型が分離された。9月依頼の2検体は兄弟のものであった。

③ 麻疹

年間を通して5例14件の依頼があり、全て陰性であった。検査検体内訳は咽頭ぬぐい液5件、EDTA加血液5件、尿4件であり、当センターで麻しん検査を実施して2年であるが、地域の医療機関からの検体採取の協力が浸透したと思われる。

④ 風疹

平成25年3月中旬から麻疹検査陰性時の風疹検査を開始し、平成24年度は1事例3件(咽頭ぬぐい液1件、EDTA加血液1件、尿1件)実施し2件(咽頭ぬぐい液、尿)で陽性が確認された。

⑤ 流行性角結膜炎

8月から9月にかけて5件の依頼があった。細胞培養検査を実施して、CPEが認められた検体について中和試験、PCR法、ダイレクトシーケンス法を行った。結果はアデノウイルス4型1件、8型2件が同定された。

2) ウエストナイル熱等媒介蚊調査

ウエストナイル熱媒介蚊の調査として18件実施した。期間は平成24年6月より9月まで計4回、設置場所は三笠公園敷地内および動物愛護センター敷地内にて蚊を捕獲(ドライアイス併用CDC型ライトトラップ法)し、分類後、RT-PCR法によるウエストナイルウイルス遺伝子、デングウイルス遺伝子及びチクングニヤウイルス遺伝子検査を行った。結果は、表6に示すとおり捕獲した218匹の蚊(イエカ類19匹、ヤブカ類199匹)のウエストナイルウイルス遺伝子、デングウイルス遺伝子及びチクングニヤウイルス遺伝子は陰性であった。

表6 ウエストナイル熱等媒介蚊検査結果

設置回数		1	2	3	4	総計(匹)
設置月		6月	7月	8月	9月	
設置場所	三笠公園	9	20	25	66	120
	動物愛護センター	19	7	5	67	98
総計		28	27	30	133	218
内訳	イエカ類	2	6	10	1	19
	ヤブカ類	26	21	20	132	199
ウエストナイルウイルス遺伝子検査結果		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
デングウイルス遺伝子検査結果		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
チクングニヤウイルス遺伝子検査結果		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

### iii 臨床検査業務

本検査業務は、保健所健康づくり課で行う各種事業の血液検体を対象とした臨床検査である。

#### 1 血液検査

保健所健康づくり課で行う感染症予防対策事業による梅毒検査、クラミジア抗体検査、エイズ対策事業による HIV 検査を実施した。また、結核対策事業による結核の接触者健診としてクオンティフェロン検査を実施した。

平成 24 年度の検査実施状況を表 1 に示した。

表1 血液検査件数

区 分	件数	項目数	陽 性 数
梅毒検査	218	436	TP法 1
クラミジア抗体検査	213	426	IgA抗体21 IgG抗体24
HIV検査	253	255	HIV-I型 1
クオンティフェロン検査	281	281	45
合 計	965	1,398	

梅毒検査 218 件中、陽性は TP 法 1 件であった。

クラミジア抗体検査 213 件中、陽性は IgA 抗体 21 件 (9.9%)、IgG 抗体 24 件 (11.3%) であった。また、IgA 抗体、IgG 抗体ともに陽性は 12 件 (5.6%) であった。

HIV 検査 253 件中、陽性は 1 件 (HIV-I 型) であった。

HIV 即日検査は HIV 検査のみ年間 4 回 (6、9、12、3 月) 29 件 (内数) 実施し、すべて陰性であった。また、針刺し事故に係る検査 2 件 (内数) について HIV 抗体検査、梅毒検査を実施し、すべて陰性であった。

クオンティフェロン検査 281 件 281 項目の内、陽性 45 件 (16.0%)、判定保留 28 件 (10.0%)、陰性 206 件 (73.3%)、判定不可 2 件 (0.7%) であった。また、接触者健診の優先度による陽性件数を比較すると、最優先接触者 226 件中 38 件 (16.8%)、優先接触者 51 件中 7 件 (13.7%)、低優先接触者 4 件中 0 件 (0.0%) であった。

## iv 食品、家庭用品等検査業務

本検査業務は、健康部、教育委員会等庁内各部課からの行政依頼及び市民、事業所等からの一般依頼による試験検査である。検査業務の内容は、食品衛生法に基づく食品等の微生物及び理化学検査、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く検査等である。

平成 24 年度の検査実施状況を表 1 に示した。

表 1 食品、家庭用品試験検査等実施状況

検査区分	件数	項目数	区分	件数	項目数	依頼元	内 訳	件数	項目数
食品微生物検査	1,162	3,256	行政依頼	1,155	3,249	保健所生活衛生課	収去検査	647	1,982
							食中毒・苦情品等検査	51	155
							おしぼり検査	8	52
						教育委員会学校教育課 学校保健課	食材検査	16	53
							食器器具検査	353	706
			手指検査	80	301				
一般依頼	7	7	事業者	食品検査	7	7			
食品等理化学検査	246	4,412	行政依頼	246	4,412	保健所生活衛生課	収去検査	227	3,819
							苦情品等検査	0	0
						教育委員会学校教育課 学校保健課	食材検査	4	563
							食器器具検査	15	30
家庭用品等検査	46	46	行政依頼	46	46	保健所生活衛生課	繊維製品等検査	41	41
							化学製品検査	5	5
合 計								1,592	9,128

### 1 食品微生物検査

#### 1) 収去検査

保健所生活衛生課より依頼された収去検査を 647 検体、1,982 項目行った。食品分類別検査項目数を表 2 に示した。

このうち、成分規格に係る検査は 337 項目行い、すべて基準に適合していた。衛生規範に係る検査は 1,128 項目行い、不適合な食品が 5 件（5 項目）あった。その内訳は菓子類 2 件（大腸菌群）、弁当 1 件（細菌数）、そうざい 2 件（E. coli）である。

県の指導基準に係る検査は 368 項目行い、不適合な食品が 7 件（8 項目）あった。その内訳は菓子類 4 件（細菌数 3 件、大腸菌群 2 件）、豆腐及びその加工品 2 件（大腸菌群）、弁当 1 件（細菌数）であった。

表2 食品微生物食品分類別検査項目数

		細菌数	大腸菌群	大腸菌 (E.coli)	腸管出血性大腸菌 O157	腸管出血性大腸菌 O26	腸管出血性大腸菌 O111	黄色ブドウ球菌	サルモネラ属菌	腸炎ヒブリオ	カンピロバクター	乳酸菌数	リステリア	クロストリジウム属菌	残留抗菌性物質	ノロウイルス	合計	
01 魚介類		6		6						45							57	
魚介類 加工品	02 魚肉練り製品		9														9	
	03 その他	14	9							16							39	
04 食肉		20	20		20	8	8	20			20						116	
05 食肉製品及び食肉加工品				25				25	25				1				76	
06 卵及びその加工品		5		5				5	15						4		34	
乳	07 生乳																	
	08 牛乳	35	35														70	
	09 部分脱脂乳																	
	加工乳	10 乳脂肪分3%以上	2	2														4
		11 乳脂肪分3%未満	5	5														10
12 その他の乳																		
13 アイスクリーム類・氷菓 (*ソフトクリームを除く)		6	6														12	
14 ソフトクリーム																		
15 乳製品		8	35									27	3				73	
16 乳類加工品(アイスクリーム類を除きマーガリンを含む)																		
17 穀類 (豆類を除く)																		
18 めん類		40	15	25				40									120	
19 もち																		
20 菓子類		65	64					65	63								257	
21 上記以外の穀類加工品																		
22 生野菜(豆類含む)及び果物																		
23 野菜果物乾燥品及び加工品																		
24 豆腐及びその加工品		12	12														24	
25 漬物				2						2							4	
26 そうざい及びその半製品		139		125	7			139	68	35							513	
27 上記以外の野菜・果物加工品		9															9	
弁当類	28 弁当	125		89	6			125	63	33							441	
	29 調理パン	20		13	4			20	18	1							76	
冷凍食品	30 無加熱摂取	18	18														36	
	31 凍結前加熱加熱後摂取																	
	32 凍結前未加熱加熱後摂取																	
	33 生食用冷凍鮮魚介類																	
34 かん詰・びん詰食品																		
35 清涼飲料水																		
36 酒精飲料																		
37 氷雪		1	1														2	
38 水																		
39 調味料																		
40 その他の食品																		
合計		530	231	290	37	8	8	419	272	132	20	27	4		4		1982	

## 2) 食中毒・苦情品等検査

保健所生活衛生課より依頼された苦情品等検査を51件155項目(ノロウイルス検査24項目を含む)行った。食中毒・苦情品等検査結果を表3に示した。なお、本年度食中毒事例はなかったが苦情品等検査は8事例51検体であった。苦情品等検査結果の詳細を表4に示した。

表3 食中毒・苦情品等検査結果

区分	検体	検体数	項目数	検査結果
食中毒事例		0	0	
苦情品等8事例	食品、ふきとり	51	155	詳細は表4参照

表4 苦情品等検査結果

事例	月日	苦情品	検体数	苦情内容	検査結果
1	6月1日	マグロ	1	下痢、嘔吐	細菌数： $2.8 \times 10^3$ 、大腸菌群：陽性、黄色ブドウ球菌：陰性、腸炎ビブリオ：陰性
2	10月9日	マロンケーキ他	7	下痢	大腸菌群：陽性(3)、黄色ブドウ球菌：陰性(7)、サルモネラ：陰性(7)
3	10月24日	米	1	カビ	真菌： <i>Eurotium</i> 属、 <i>Aspergillus sydowii</i> 、 <i>Penicillium pusillum</i>
4	11月12日	フィナンシェ	1	カビ	真菌： <i>Gladosporium sphaerospermum</i> 、 <i>Wallemia sebi</i>
5	11月22日	トマトジュース	1	異味異臭 期限切れ	細菌数：300未満
6	12月4日	ふきとり まな板(1階)他	16	下痢	大腸菌群：陽性(3)、ノロウイルス：陰性(16)
7	1月22日	ふきとり まな板他	8	下痢、嘔吐 発熱	大腸菌群：陽性(6)、ノロウイルス：陰性(8)
8	2月4日	ふきとり まな板(すし)他	16	嘔吐、発熱	大腸菌群：陽性(3)、黄色ブドウ球菌：陰性(16)

## 3) おしぼり検査

保健所生活衛生課より依頼された市内2業者の貸しおしぼり8検体について、変色及び異臭、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、一般細菌数(1枚当たり)、pH、異物混入の検査を行った。

結果、衛生基準である一般細菌数(1枚当たり)について1業者2検体が不適合であった。また、別業者2検体に異物混入があった。他の検査結果はすべて衛生基準に適合していた。

## 4) 小学校等給食施設検査

教育委員会学校教育部学校保健課より依頼された小学校等給食施設検査を449件1,060項目行った。検体は小学校等で使用する給食食材、食器器具ふきとり及び調理従事者手指ふきとりで、検査項目は細菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌O157であった。小学校等給食施設検査結果を表5に示した。

給食食材 6 検体と食器器具ふきとり 1 検体から大腸菌群が検出された。また、調理従事者手指ふきとり 7 検体から大腸菌群、5 検体から黄色ブドウ球菌が検出された。サルモネラ、腸炎ビブリオ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌 O157 については検出されなかった。

表 5 小学校等給食施設検査結果

区 分	検 体	検体数	項目数	検 査 結 果
食材	給食食材	16	53	大腸菌群 (6 検体)
食器器具	食器器具ふきとり	353	706	大腸菌群 (1 検体)
手指	調理従事者手指ふきとり	80	301	大腸菌群 (7 検体) 黄色ブドウ球菌 (5 検体)
合 計		449	1,060	

5) 一般依頼食品検査

市内業者より依頼された一般依頼食品検査を 7 件 7 項目行った。検査項目は細菌数(3 項目)、大腸菌群 (4 項目) であった。

## 2 食品理化学検査

保健所生活衛生課及び教育委員会学校教育課からの依頼による食品中の添加物、残留農薬等の試験検査を 246 件、4,412 項目実施した。

表 6 に食品理化学試験検査状況を示した。

表 6 食品理化学試験検査実施状況

検査区分	保健所		教育委員会		合計	
	検体数	項目数	検体数	項目数	検体数	項目数
食品添加物等	91	141			91	141
残留農薬	32	3,116	4	563	36	3,679
魚介類	24	51			24	51
抗菌性物質等	14	332			14	332
乳製品	66	179			66	179
その他			15	30	15	30
合計	227	3,819	19	593	246	4,412

### 1) 食品添加物等検査

保健所生活衛生課及び教育委員会学校教育課からの依頼により、市内で製造又は流通している食品中の食品添加物使用基準検査及び成分規格検査を 91 件、141 項目実施した。結果は全て基準、成分規格共に適合していた。表 7 に食品添加物等検査状況を示した。

表 7 食品添加物等検査実施状況

項目名		区分					合計
		魚介類加工品	食肉製品	めん類	菓子類	野菜果物加工品	
検体数		12	25	40		14	91
保存料	ソルビン酸	10	25			10	45
漂白剤	二酸化硫黄					11	11
漂白剤	過酸化水素			15			15
発色剤	亜硝酸根	2	25				27
着色料	合成着色料						0
甘味料	サッカリンナトリウム	8					8
品質保持剤	プロピレングリコール			25			25
酸化防止剤	BHA、BHT	4					4
成分規格	シアン（生あん等）					6	6
成分規格	水分活性						
合計		24	50	40		27	141

### 2) 残留農薬検査

保健所生活衛生課からの依頼（収去検査）による市内産農産物 21 件（トマト 3 件、なす 3 件、きゅうり 3 件、大根 3 件、キャベツ 3 件、みかん 3 件、いちご 3 件）、輸入柑橘類 5 件（オレンジ 2 件、レモン 1 件、グレープフルーツ 2 件）、輸入果実類 6 件（バナナ、マンゴー、パイナップル各 2 件）及び教育委員会学校教育課からの依頼による学校給食食材 4 件（トマト 1 件、きゅうり 2 件、キャベツ 1 件）計 36 件について残留農薬検査を行った結果、基準を超えた項目はなかった。残留農薬検査実施状況を表 8、9、検出した農薬を表 10、11 に示した。

表 8 残留農薬検査実施状況（収去検査）

検体名	検体数	項目数	検体名	検体数	項目数
トマト	3	360	オレンジ	2	50
なす	3	306	レモン	1	29
きゅうり	3	390	グレープフルーツ	2	44
大根	3	198	バナナ	2	238
キャベツ	3	354	マンゴー	2	224
みかん	3	360	パパイヤ	2	230
いちご	3	333			

表 9 残留農薬検査実施状況（学校給食食材）

検体名	検体数	項目数
トマト	1	134
きゅうり	2	291
キャベツ	1	138

表 10 検出した農薬（収去検査）

農産物名	農薬名	検出数	検出値 (ppm)
バナナ	クロルフェナピル	1	0.014
オレンジ	イマザリル	2	0.085~0.22
	チアベンダゾール	2	0.11~0.43
グレープフルーツ	イマザリル	2	0.13~0.63
	チアベンダゾール	2	0.17~0.20
	オルトフェニルフェノール	2	0.2~1.2
レモン	イマザリル	1	0.95
	チアベンダゾール	1	0.38
トマト	アセタミプリド	1	0.026
マンゴー	イミダクロプリド	2	0.002~0.003
いちご	アセタミプリド	1	0.82
	アゾキシストロビン	2	0.13~0.99
	シフルフェナミド	2	0.026~0.033

表 11 検出した農薬（学校給食食材）

農産物名	農薬名	検出数	検出値 (ppm)
トマト	アセタミプリド	1	0.007
	アゾキシストロビン	1	0.006
	ボスカリド	1	0.016
キャベツ	ボスカリド	1	0.007

3) 魚介類中の有害物質検査

魚介類収去検査として18件、試買検査として6件、計24件についてPCB及び総水銀検査を実施した結果、暫定的規制値を超える検体はなかった。

表12に魚介類中の有害物質試験検査実施状況を示した。

表12 魚介類中の有害物質試験検査実施状況 (単位：ppm)

番号	魚介類名	検査名	PCB	総水銀
1	メジナ*	収去	0.03	0.02
2	カタクチイワシ*	収去	0.04	0.03
3	イナダ*	収去	0.09	0.14
4	クロダイ*	収去	0.05	0.14
5	スズキ*	収去	0.11	0.27
6	サザエ*	試買	定量下限値未満	定量下限値未満
7	マコガレイ*	試買	0.02	定量下限値未満
8	アナゴ*	試買	0.04	定量下限値未満
9	ウルメイワシ☆	収去	0.03	定量下限値未満
10	マダイ*	収去	0.03	0.14
11	ヒラメ*	収去	0.02	0.10
12	コチ*	収去	0.05	0.33
13	ウルメイワシ☆	収去	0.03	定量下限値未満
14	アオアジ*	収去	0.03	定量下限値未満
15	マトウダイ*	収去	0.01	0.12
16	イナダ*	収去	0.06	定量下限値未満
17	スズキ*	収去	0.11	0.14
18	スズキ*	試買	0.08	0.08
19	メバル*	試買	0.04	0.11
20	スズキ*	収去	0.07	0.20
21	マコガレイ*	収去	定量下限値未満	0.03
22	メバル*	収去	0.02	0.09
23	ウルメイワシ☆	収去	0.11	0.02
24	アサリ*	試買	定量下限値未満	定量下限値未満
検出範囲			定量下限値未満～0.11	定量下限値未満～0.33
定量下限値(注)			0.01	0.02
暫定的規制値			遠洋沖合魚介類 0.5 内海内湾魚介類 3	0.4

☆：遠洋沖合魚介類 \*：内海内湾魚介類

注：検査実施標準作業書の改定による定量下限値の変更。

アサリ1検体について重金属類含有量検査を実施した結果、カドミウムは0.028ppm(定量下限値：0.013ppm)、鉛は0.058ppm(定量下限値：0.005ppm)、クロムは定量下限値未満(定量下限値：0.14ppm)であった。

これらの項目は魚介類についての基準値は設定されていないが、他の食品の基準値(\*注)と比較すると低濃度であった。

(\*注)他の食品の残留基準値(鉛：5.0 μg/g(りんご))

4) 畜水産物中の残留抗菌性物質等の検査

保健所生活衛生課からの依頼による残留抗菌性物質等の検査を、市内養鶏場の鶏卵4件、牛肉5件、及び養殖エビ5件について実施した。検査結果は、全て定量下限値未満であった。

表13に残留抗菌性物質等検査状況を示した。

表13 残留抗菌性物質等検査実施状況

区 分	鶏 卵	牛 肉	養殖エビ
検 体 数	4	5	5
オキシテトラサイクリン		5	5
テトラサイクリン		5	5
クロルテトラサイクリン		5	
フルベンダゾール	4	5	5
スルファジミジン	4	5	5
スルファメラジン	4	5	5
スルファモノメトキシ	4	5	5
スルファジメトキシ	4	5	5
スルファキノキサリン	4	5	5
オキソリニック酸	4	5	5
チアンフェニコール	4	5	5
オルメトプリム	4	5	5
トリメトプリム	4	5	5
ピリメタミン	4	5	5
チアベンダゾール	4	4	5
5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	4	5	5
ナイカルバジン			
レバミゾール	4	5	5
エンロフロキサシン	4	5	5
ジクラズリル	4	1	
ダノフロキサシン	4	5	5
オフロキサシン	4	5	5
サラフロキサシン	4	5	5
ジフロキサシン	4	5	5
ナリジクス酸	4	5	5
ピロミド酸	4	5	5
クロピドール	4		5
合 計	92	120	120

5) 乳及び乳製品の成分規格検査

保健所生活衛生課からの依頼による乳及び乳製品について、比重、酸度、乳脂肪分、無脂乳固形分等の成分規格検査を 66 件 179 項目実施した。検査結果は、全て基準に適合していた。

表 14 に乳及び乳製品の成分規格検査状況を示した。

表 14 乳及び乳製品の成分規格検査実施状況

区 分		牛 乳	加工乳	発酵乳	アイスcream類	合 計
検 体 数		35	7	23	1	66
検査項目	比 重	35				35
	酸 度	35	7			42
	乳 脂 肪 分	35			1	36
	無 脂 乳 固 形 分	35	7	23		65
	乳 固 形 分				1	1
合 計		140	14	23	2	179

6) 磁器製食器検査

教育委員会学校保健課の依頼により、学校給食用磁器食器 6 件について鉛及びカドミウム検査、学校給食用合成樹脂食器 9 件について鉛及び過マンガン酸カリウム消費量検査を実施した結果、全て基準に適合していた。

### 3 家庭用品試買検査

保健所生活衛生課より依頼された家庭用品試買検査等を 46 件、46 項目実施した。結果は、すべて基準に適合していた。表 15 に家庭用品の試買検査等状況を示した。

表 15 家庭用品の試買検査等状況

検査区分	織 維 製 品											合計	
	おしめ	おしめカバー	よだれ掛け	下着	中衣	外衣	靴下	衛生パンツ	寝衣	寝具	手袋		帽子
試買件数		1	2	13	4	3	3		3	1	2		32
検査件数		1	5	17	5	3	3		4	1	2		41
ホルムアルデヒド <sup>*</sup> 乳幼児用		1	5	5	5	3	2		3	1	1		26
ホルムアルデヒド <sup>*</sup> 乳幼児以外				12			1		1		1		15
ディルドリン													
有機水銀化合物													
トリブチルスズ <sup>*</sup> 化合物													
トリフェニルスズ <sup>*</sup> 化合物													
項目数計		1	5	17	5	3	3		4	1	2		41

検査区分	家 庭 用 化 学 製 品							合計		
	家庭用接着剤	かつら等の接着剤	家庭用塗料	家庭用ワックス	靴墨靴クリーム	家庭用エアゾル製品	住宅用洗浄剤		家庭用洗浄剤	クレオソート油
試買件数		5								5
検査件数		5								5
ホルムアルデヒド		5								5
有機水銀化合物										
トリブチルスズ <sup>*</sup> 化合物										
トリフェニルスズ <sup>*</sup> 化合物										
メタノール										
トリクロロエチレン										
テトラクロロエチレン										
酸消費量										
アルカリ消費量										
落下試験・漏水試験										
耐酸耐アルカリ試験										
圧縮変形試験										
塩化ビニル										
ジベンゾ[a,h]アントラセン										
ベンゾ[a]アントラセン										
ベンゾ[a]ピレン										
項目数計		5								5

## Ⅴ 大気、水質、廃棄物等検査業務

本検査業務は、健康部、環境政策部、資源循環部、教育委員会、消防局等庁内各部課からの行政依頼及び市民、事業所等からの一般依頼による試験検査である。検査業務の内容は、飲用水、利用水等の水質検査並びに大気検査、工場・事業所排水、環境生物検査等の環境・公害関係検査である。

平成 24 年度の検査実施状況を表 1 に示した。

表 1 平成 24 年度の検査実施状況

検査区分	件数	項目数		件数	項目数	依頼元	件数	項目数
飲料水水質検査	100	1,167	行政検査	1	2	保健所生活衛生課	1	2
			一般依頼	99	1,165	市民、事業所等(井戸水等)	9	90
						市民、事業所等(貯水槽水等)	74	886
						市民、事業所等(船舶水)	16	189
海水浴場水質検査	12	51	行政検査	12	51	保健所生活衛生課	12	51
プール水質検査	322	1,961	行政検査	200	1,229	保健所生活衛生課	55	286
						教育委員会学校教育部スポーツ課	105	683
						環境政策部緑地管理課	40	260
			一般依頼	122	732	事業所	122	732
公衆浴場水質検査	60	362	行政検査	60	362	保健所生活衛生課	60	362
公共用水域水質検査	12	40	行政検査	12	40	環境政策部環境管理課	12	40
工場・事業所水質検査	179	3,278	行政検査	110	2,779	環境政策部環境管理課	44	1,271
						資源循環部資源循環施設課	41	896
						資源循環部資源循環推進課	12	246
						健康安全科学センター	13	366
			一般依頼	69	499	事業所	69	499
浄化槽水質検査	6	54	行政検査	6	54	環境政策部環境管理課	6	54
大気検査	7	21	行政検査	7	21	環境政策部環境管理課	7	21
廃棄物関係検査	3	26	行政検査	3	26	資源循環部資源循環施設課	1	24
						消防局予防課	2	2
環境生物検査 (腸管系病原菌調査)			一般検査	30	30	事業所		
合計	701	6,960					701	6,960

## 1 飲用水、利用水等水質検査

行政依頼及び一般依頼による飲用水（貯水槽水等、船舶水、井戸水等）、利用水等（プール水、海水浴場海水等、公衆浴場等浴槽水等）の試験検査を実施した。

表 2 に飲用水・利用水等の検体別検査状況を示した。

表 2 飲用水・利用水等の検体別検査状況

	検体区分	行政依頼		一般依頼		合計	
		件数	項目数	件数	項目数	件数	項目数
飲用水	貯水槽水等	1	2	74	886	75	888
	船舶水	0	0	16	189	16	189
	井戸水等	0	0	9	90	9	90
	その他	0	0	0	0	0	0
	計	1	2	99	1165	100	1,167
利用水等	プール水	200	1,229	122	732	322	1,961
	海水浴場海水等	12	51	0	0	12	51
	公衆浴場等浴槽水	60	362	0	0	60	362
	計	272	1,642	122	732	394	2,374

### 1) 飲用水水質検査

飲用水検査は計 100 件実施し、内訳は貯水槽水等 75 件、船舶水 16 件、井戸水等 9 件であった。その内、金属（鉄、鉛、銅、亜鉛）は 1 件実施した。

水質基準不適合は、全体で 7 件 (7%) であり、内訳は一般依頼の井戸水等 6 件及び船舶水 1 件であった。不適項目は一般細菌、大腸菌の他、硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素、臭気、色度、濁度等であった。

過去 3 年間の検体区分別水質基準不適合項目の件数を図 1-1 から図 1-3 に示した。

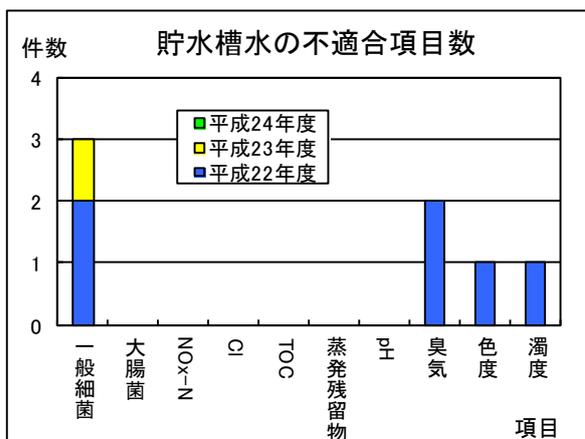


図 1-1 貯水槽水の不適合項目数 (過去 3 年間)

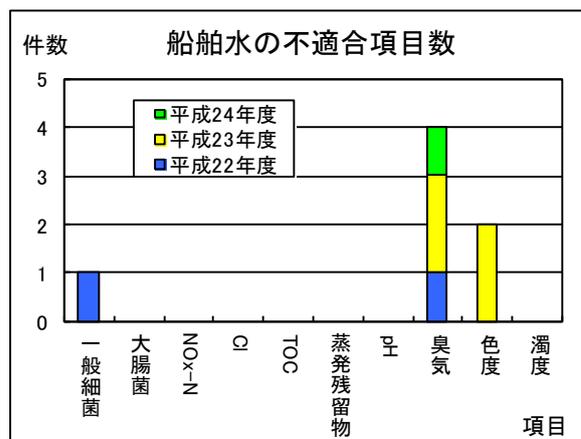


図 1-2 船舶水の不適合項目数 (過去 3 年間)

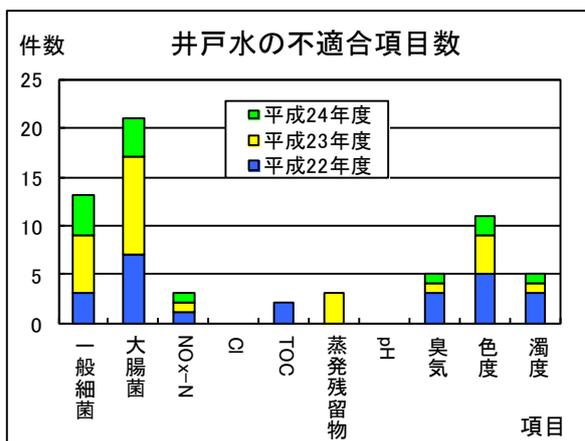


図 1-3 井戸水の不適合項目数 (過去3年間)

船舶水では基準不適合項目数が昨年比で減少しており、臭気1件であった。

また、井戸水等の基準不適合項目数も昨年比で減少しており、一般細菌4件、大腸菌4件、硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素1件、臭気1件、色度2件、濁度1件であった。

## 2) 利用水等水質検査

利用水等水質検査は計394件実施し、プール水検査は322件、海水浴場海水等検査は12件、公衆浴場等浴槽水検査は60件であった。

プール水検査322件の内訳は、行政依頼が保健所生活衛生課55件、教育委員会スポーツ課105件、環境政策部緑地管理課40件、一般依頼が122件であった。

過去3年間の水質基準不適合項目の件数を図2に示した。

プール水の基準不適合項目は、遊離残留塩素が12件(不適合率4.5%)であった。

学校プールにおいては、学校環境衛生基準により「遊離残留塩素は0.4mg/L以上であること。また、1.0mg/L以下であることが望ましい。」とされている。学校プール105件中、遊離残留塩素0.4mg/L未满是9件、1.0mg/Lを超えた検体は62件あり、その中で2.0mg/Lを超えた検体は30件あった。特に気温が上昇する8月の検査では8.2mg/Lという高濃度の検体もあった。

高濃度の遊離残留塩素は総トリハロメタン生成能増大の一因となるため、塩素系消毒剤の過剰な使用を避けたり、適切な換水を行う必要がある。

その他、プール水の不適合項目は、一般細菌が3件、過マンガン酸カリウム消費量が2件、pH値が9件、濁度が2件であった。

総トリハロメタン(以下総THM)は、学校プールにおいては平成14年度より学校環境衛生の

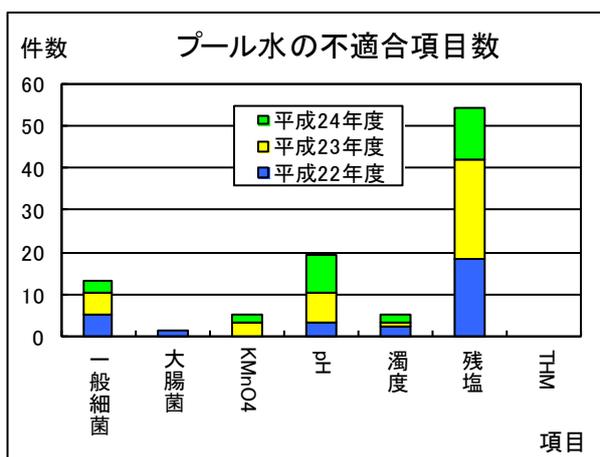


図 2 プール水の不適合項目数 (過去3年間)

基準（平成 21 年度以降は学校環境衛生基準）として「0.2mg/L 以下であることが望ましい。」とされているが、0.2mg/L を超えるものは全くなかった。

なお、市営プールにおいては県条例が適用されるため総 THM の基準はないが、学校の授業において使用することがあるので総 THM の測定を行っている。

保健所生活衛生課の依頼により、海水浴場海水等検査は 3 ヶ所について、遊泳前、遊泳中の計 12 件の検査を実施した。結果は良好であった。

あわせて、腸管出血性大腸菌 O157 の検査を 3 件実施したが、すべて陰性であった。

公衆浴場等浴槽水検査は計 60 件実施した。一部の浴槽水において遊離残留塩素が 2mg/L を超える高濃度で検出された。消毒剤を過剰に入れており、浴槽水中の遊離残留塩素を頻繁に測定し管理する必要があると思われた。

また、保健所生活衛生課の依頼により、公衆浴場等浴槽水、プール水等及びその他の計 109 件について、レジオネラ属菌検査を実施した。

表 3 にレジオネラ属菌検査結果を示した。

公衆浴場等浴槽水は 95 件中 14 件（14.7%）、プール水等は 10 件中 4 件（40.0%）が基準値（10 未満）を超え、管理不適切とされる結果であった。

表 3 レジオネラ属菌検査結果

検査区分	施設区分	検体区分	検査 件数	レジオネラ属菌数 (CFU/100ml)				血 清 群 別										
				10 未 満	10 以 上 100 未 満	100 以 上 1000 未 満	1000 以 上	<i>L. pneumophila</i>										レジ オネ ラ属 菌UT
								SG1	SG2	SG3	SG5	SG6	SG8	SG9	SG10			
公衆浴場等	一般公衆 浴場	内湯	48	44	4	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	1	0	
		露天風呂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	その他の 公衆浴場	内湯	33	27	4	2	0	3	1	2	1	0	0	2	0	0	0	
		露天風呂	7	4	1	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	老人福祉 施設	内湯	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
旅館等	内湯	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
プール水等	プール	プール水	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		ジャグジー	8	4	3	1	0	1	0	0	2	1	2	0	0	0	0	
その他(感染事例調査:シャワー水)			4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
合 計			109	91	13	3	2	7	1	5	4	1	2	2	1	1		

## 2 環境・公害関係検査

行政依頼による水質、大気、廃棄物、環境生物、一般依頼による工場・事業所排水の試験を実施した。

表 4 に環境・公害関係検査の検査状況を示した。

表 4 環境・公害関係検査の検査状況

	検体区分	行政依頼		一般依頼		合計	
		件数	項目数	件数	項目数	件数	項目数
水質	浄化槽放流水	6	54	0	0	6	54
	工場・事業場排水	110	2,779	69	499	179	3,278
	公共用水域	12	40	0	0	12	40
	計	128	2,873	69	499	197	3,372
大気	有害化学物質	7	21	0	0	7	21
廃棄物	産業廃棄物	3	26	0	0	3	26
環境生物	環境微生物	0	0	30	30	30	30

1) 水質検査

表 5 に水質検査の検体別検査状況を示した。

浄化槽放流水検査は、行政依頼として環境政策部環境管理課から 6 件（501 人槽以上）、54 項目の検査を実施した。

事業場排水検査は、行政依頼として環境政策部環境管理課から 44 件、資源循環部資源循環施設課から 41 件、同資源循環推進課から 12 件、当健康安全科学センターが 13 件、一般依頼として 69 件、合計 179 件 3,278 項目の検査を実施した。行政検査 110 件 2,779 項目の内訳は、規制対象事業場排水調査 37 件、主要工場夜間排水調査 5 件、廃棄物処理場排水調査 41 件、ゴルフ場農薬 2 件、その他の排水調査 25 件である。結果は、基準値を超えるものはなかった。

また、公共用水域検査は、環境政策部環境管理課から 12 件 40 項目の検査を実施した。内容は、中小河川水質事故の調査 4 件、河川の水質調査 3 件及び地下水の水質調査 5 件である。

表 5 水質検査の検体別検査状況

表 5-1

検査区分	浄化槽放流水	事業所排水		公共用水域	合計
	行政依頼	行政依頼	一般依頼	行政依頼	
件数	6	110	69	12	197
項目数計	54	2779	499	40	3,372
カドミウム		72	10		82
全シアン		59	4		63
有機りん農薬		50	4		54
鉛		72	16		88
6 価クロム		58	10		68

表 5-2

検査区分	浄化槽放流水	事業所排水		公共用水域	合計
	行政依頼	行政依頼	一般依頼	行政依頼	
四塩化炭素		70	8		78
1,2-ジクロロエタン		70	8		78
1,1-ジクロロエチレン		70	8		78
シス-1,2-ジクロロエチレン		70	8		78
1,1,1-トリクロロエタン		70	8		78
1,1,2-トリクロロエタン		70	8		78
1,3-ジクロロプロペン		70	8		78

表 5-3

検査区分	浄化槽 放流水	事業所 排水		公共用 水域	合計
	行政 依頼	行政 依頼	一般 依頼	行政 依頼	
ヒ素		55	8		63
全水銀		67	31		98
アルキル水銀		37			37
PCB		39	4		43
トリクロロエチレン		70	8		78
テトラクロロエチレン		70	8		78
ジクロロメタン		70	8		78
チウラム		43	8		51
シマジン		42	8		50
チオベンカルブ		42	8		50
ベンゼン		70	8		78
セレン		55	8		63
pH	6	75	29	8	118
COD	6	87	28	3	124
BOD	6	87	28	3	124
SS	6	87	26	3	122
ノルマルヘキサン 抽出物質		41	8		49
フェノール類		53	31		84
銅		71	16		87
亜鉛		71	16		87
溶解性鉄		71	16		87
溶解性マンガン		71	16		87
全クロム		58	10		68
フッ素		52	4		56
大腸菌群数	6	54	4		64

表 5-4

検査区分	浄化槽 放流水	事業所 排水		公共用 水域	合計
	行政 依頼	行政 依頼	一般 依頼	行政 依頼	
全窒素	6	76	16	3	101
全リン	6	76	16	3	101
ニッケル		71	16		87
溶存酸素				3	3
アンモニア性窒素	6	59			65
硝酸性窒素及び 亜硝酸性窒素	6	59			65
ほう素		45	4		49
アンモニア等			4		4
硝酸性窒素				5	5
亜硝酸性窒素				5	5
1,4-ジオキサン		33	4		37
塩化ビニルモノマー		1			1
イソプロチオラン		2			2
オキサジクロメホン		2			2
カフェンストロール		2			2
クロチアニジン		2			2
シメコナゾール		2			2
ダイアジノン		2			2
フルトラニル		2			2
ペンシクロン		2			2
メタラキシル及び メタラキシルM		2			2
メプロニル		2			2
油分定性				4	4

2) 大気検査

表 6 に有害化学物質の検査状況を示した。

有害化学物質検査は、行政依頼として環境政策部環境管理課から 7 件、21 項目の検査を実施した。結果は、各検査において、基準値を超えるものはなかった。

表 6 有害化学物質検査状況

検査区分	有害化学物質
件数	7
項目数計	21
トルエン	4
キシレン	4
ベンゼン	4
ジクロロメタン	3
トリクロロエチレン	3
テトラクロロエチレン	3

3) 廃棄物検査

表 7 に廃棄物の検査状況を示した。

廃棄物検査は、資源循環部資源循環施設課から 1 件 24 項目、消防局予防課から 2 件 2 項目の検査を実施した。内容は不燃ごみの溶出試験及び廃タンク内容物における油分の定性分析である。

表 7 廃棄物の検査状況

検査区分	溶出試験	TPH試験	合計
件数	1	2	3
項目数計	24	2	26
カドミウム	1		1
全シアン	1		1
有機りん化合物	1		1
鉛	1		1
6価クロム	1		1
ヒ素	1		1
全水銀	1		1
アルキル水銀化合物	1		1
PCB	1		1
トリクロロエチレン	1		1
テトラクロロエチレン	1		1
ジクロロメタン	1		1

検査区分	溶出試験	TPH試験	合計
四塩化炭素	1		1
1,2-ジクロロエタン	1		1
1,1-ジクロロエチレン	1		1
シス-1,2-ジクロロエチレン	1		1
1,1,1-トリクロロエタン	1		1
1,1,2-トリクロロエタン	1		1
1,3-ジクロロプロパン	1		1
チウラム	1		1
シマジン	1		1
チオベンカルブ	1		1
ベンゼン	1		1
セレン	1		1
油分定性		2	2

4) 環境生物検査

環境微生物の検査状況を表 8 に示した。

環境微生物検査は、一般依頼検査として上下水道局技術部水再生課から市内浄化センター4施設（下水処理 5 系統）の流入水、処理水、放流水計 30 件について 6 月（15 件）と 12 月（15 件）に腸管出血性大腸菌 0157 検査を実施した。すべての流入水、処理水、放流水計 30 件から腸管出血性大腸菌 0157 は検出されなかった。

表 8 環境微生物の検査状況

採取場所	検査区分	種別	採水月（件数）		合計 （件数）
			6月	12月	
市内浄化センター4施設 （下水処理5系統）	腸管出血性 大腸菌 0157	流入水	5	5	10
		処理水	5	5	10
		放流水	5	5	10
合 計			15	15	30

### Ⅲ 精度管理の実施状況

## i 精度管理実施状況

試験検査精度の維持向上を目的として、微生物学検査、食品細菌検査、食品理化学検査、環境細菌検査、環境理化学検査に関して、外部精度管理を延べ 20 件 29 項目、内部精度管理を延べ 54 件 71 項目実施した。

外部精度管理の実施状況を表 1 に、内部精度管理の実施状況を表 2 に示した。

表1 外部精度管理実施状況

精度管理名	区 分	件 名	検体数	検査項目数	検 査 項 目
日臨技臨床検査 精度管理	微生物学検査	細菌同定	7	10	染色、同定、薬剤感受性、 フォトサーベイ
神奈川県臨床検査 精度管理	微生物学検査	細菌同定	4	8	染色、同定、薬剤感受性
神奈川県水道水質 検査精度管理	環境理化学検査	水質基準 項目	1	1	濁度
			1	2	ベンゼン、 1,2-ジクロロエチレン
環境測定分析 統一精度管理	環境理化学検査	水質基準 項目	1	2	カドミウム、銅
食品衛生精度管理	食品細菌検査	菌数測定	1	1	一般細菌数
		細菌同定	2	2	E. coli
	食品理化学検査	食品添加物	2	2	合成着色料、ソルビン酸
		重金属	1	1	カドミウム
合 計			20	29	

表2 内部精度管理実施状況

精度管理名	区 分	件名	検体数	検査項目数	検 査 項 目
臨床検査精度管理	微生物学検査	細菌同定	44	61	染色、同定、薬剤感受性、 フォトサーベイ
食品衛生精度管理	食品細菌検査	細菌同定	8	8	腸管出血性大腸菌0157、黄色 ブドウ球菌、サルモネラ属 菌、腸炎ビブリオ
	食品理化学検査	環境汚染 物質	2	2	PCB、水銀化合物
合 計			54	71	



## IV 調 査 研 究

## 市内に流通している畜産物中の残留動物用医薬品調査（第 2 報）

加藤 秀樹

### I はじめに

近年、食品に残留した動物用医薬品の食品衛生法違反事例が発生している。輸入時の検査において、検疫所等での輸入食品検査は届出件数の約 8%<sup>1) 2)</sup> であり、全ての輸入食品の検査が行われるわけではなく、新たな動物用医薬品・農薬・食品添加物等の開発・使用・違反事例発生も考えられる。これらの背景を受け、平成 23 年度より食肉について、動物用医薬品の試験法検討と実態調査を実施してきたところである。平成 24 年度は試験法について「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」<sup>3) 4)</sup>（以下、「ガイドライン」という。）に基づき、妥当性評価試験を行ったので報告する。

### II 調査方法

#### 1 調査計画

調査期間は平成 23 年度から平成 27 年度までの 5 ヶ年とし、保健所収去検査で未実施かつ市民生活で消費量の多い食肉、肝臓及び食鳥卵を対象として、「市内に流通している畜産物中の残留動物用医薬品調査」を継続して実施する。

#### 2 調査対象（試買品）

当所において、これまでに検査未実施であった豚肉と鶏肉を中心に調査対象とする。畜産物は検査部位（筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、その他）により試験法及び基準値が異なる場合がある。

#### 調査計画（調査対象部位）

H23 年度	H24 年度	H25 年度	H26 年度	H27 年度
豚筋肉 ロース		豚筋肉 もも肉		牛筋肉 リブ
	フィレ	豚肝臓 レバー		もも肉
鶏筋肉 ササミ		鶏筋肉 もも肉		鶏卵
	胸肉	鶏肝臓 レバー		うずら卵

平成 24 年度は昨年度に引き続き、豚筋肉（ロース、フィレ各 2 検体）、鶏筋肉（ササミ、胸肉各 2 検体）の計 8 検体を調査対象とした。

### Ⅲ 試験方法

#### 1 試薬

動物用医薬品 67 分析対象化合物 (以下、「化合物」という。) を測定対象として検討を行った。

混合標準液 : 和光純薬 (株) 動物用医薬品混合標準液 PL-1-3 21 化合物

和光純薬 (株) 動物用医薬品混合標準液 PL-2-1 24 化合物

標準品 : 関東化学 (株)、和光純薬 (株)、林純薬 (株)、シグマアルドリッチジャパン (株) 及び Dr. Ehrenstorfer 22 化合物 (代謝物 5 化合物を含む)

標準原液 : 標準品をメタノール、アセトニトリル又はテトラヒドロフランを用いて 100  $\mu$ g/mL に調製した。

標準混合溶液 : 混合標準液と標準原液を混合し、40%アセトニトリルで希釈した。(1  $\mu$ g/mL) 添加回収用試験混合標準溶液は混合標準溶液を 40%アセトニトリルで希釈し、0.01、0.1  $\mu$ g/mL とし、同様に検量線作成用標準混合溶液は 0.025、0.05、0.1、0.25 及び 0.5  $\mu$ g/mL を調製した。

クリーンアップ用カートリッジカラム : GL サイエンス (株) InertSep PLS-2 265mg/20mL

#### 2 装置

LC/MS/MS: Waters 社製 2695 Quattro micro

ホモジナイザー : Kinematika 社製 ポリトロン PT3100

遠心機 : (株) 日立製作所製 CF7D2

#### 3 測定条件

##### 1) HPLC 条件

カラム : 関東化学 (株) Mightysil RP-18 GP 150-2.0 (3  $\mu$ m)

カラム温度 : 40°C

移動相 : A 液 0.1%ギ酸 B 液 0.1%ギ酸アセトニトリル

グラジエント条件 (分析時間 45 分)

A 液 95%—85% (2 分) —70% (10 分) —5% (15 分) —5% (30 分) —95% (30.1 分)

流速 : 0.2mL/min

注入量 : 10  $\mu$ L

##### 2) MS 条件

イオン化 : ESI+及び ESI-の MRM 測定

キャピラリー電圧 : 3.5kV

ソース温度 : 110°C

デゾルベーション温度 : 350°C

#### 4 分析方法

通知試験法<sup>5)</sup>及び既報<sup>6) 7)</sup>の方法を参考に検討を実施した。

##### 1) 一斉分析法

厚生労働省より通知された「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」（以下「一斉試験法Ⅰ」という。）及び既報の方法を参考に実施を検討した。操作の概要を図-1に示した。一斉試験法Ⅰでは試料 5g にアセトニトリル 30mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 20mL、無水硫酸ナトリウム 10g を加え抽出しアセトニトリル層を分離後、アセトニトリル 20mL で2回目の抽出を行うが、当所に整備されている遠心機の 50mL 遠沈管に試料を採取したため、抽出はアセトニトリル 20mL、15mL×2 回の 3 回抽出に変更した。試験溶液に濁りが生じる場合があったため、最後に 0.2 μm フィルターろ過を行った。その他の操作は通知法に従った。

## 2) オキシテトラサイクリン法

通知法「オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法」及び既報の方法を参考に実施を検討した。操作の概要を図-2 に示した。通知法「オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法」では試料 5g に抽出液 50mL を加えホモジナイズし、ヘキサンを加え振とう・遠心分離後、抽出液を全量回収してカラムによる精製を行うことになっているが、試料によってはヘキサンを加え振とう後にエマルジョンを生じるため、抽出液を全量分離することが困難な場合があった。このため、試料 10g、抽出液 100mL と 2 倍量にして抽出し、遠心分離後の抽出液を 50mL 分取してカラムによる精製を行った。その他の操作方法は通知法に従った。

## 5 妥当性評価試験

ガイドラインに基づき、4 1) 及び 2) の試験法について試料 1g につき、各標準品をそれぞれ 0.01、0.1 μg 添加した。また、妥当性評価試験を実施するにあたり、試料として使用する畜産物中に測定対象動物用医薬品が含まれていないブランク試料であることを確認した。

### 1) 併行精度

それぞれの濃度の試料について、5 併行の試験を実施した。

### 2) 室内精度

それぞれの濃度の試料について、1 日 1 回（2 併行）、5 日間の試験を実施した。

## IV 調査結果及び考察

### 1 イオン化最適条件

5 μg/mL に希釈した各標準品をシリンジポンプにより ESI プローブに注入し、ポジティブイオン化とネガティブイオン化の MRM 測定を行い、感度が最大となるようなコーン電圧及びコリジョン電圧等の条件を求めた。フロルフェニコール、クロルスロン、チアンフェニコール、スルファニトラン、ナイカルバジン及びジクラズリルはネガティブイオン化での感度が高い結果となった。前報の最適条件においてプレドニゾロンとフロルフェニコールの感度が低かったため、測定条件を見直したところ、改善を図ることができた。分析対象化合物 67 化合物（代謝物 5 化合物を含む）ごとの測定条件を表-1 に示した。

## 2 検量線

LC/MS/MSによる分析では、試料からの夾雑物の影響によるイオン化の促進・抑制といったマトリクス効果により定量を妨害されることが知られている。そのため、測定対象動物用医薬品を含まない試料を用いた試料抽出液に標準混合溶液を添加したマトリクス標準混合溶液を用いて検量線を作成した。

## 3 妥当性評価試験

### 1) 併行精度

一斉分析法とオキシテトラサイクリン法について、定量した結果より得られた回収率と変動係数を表-2に示した。67化合物（代謝物5化合物を含む）を測定対象として、ガイドラインに示されている回収率70から120%かつ濃度が0.01ppmの試料では変動係数25%未満、及び0.1ppmの試料では変動係数15%未満の条件を満たすことができた項目数は豚ロースで33化合物、豚フィレで28化合物、鶏ささみで48化合物及び鶏胸肉で42化合物となった。

### 2) 室内精度

鶏ささみを用いて、一斉分析法とオキシテトラサイクリン法について、定量した結果より得られた回収率と変動係数を表-3に示した。ガイドラインに示されている回収率70から120%かつ濃度が0.01ppmの試料では変動係数30%未満、及び0.1ppmの試料では変動係数20%未満の条件を満たすことができた数は40化合物であった。

## 4 試買調査結果

「市内に流通している畜産物中の残留動物用医薬品調査」として国内産の豚ロース、豚フィレ、鶏ささみ及び鶏胸肉各2検体計8検体を購入し、妥当性評価試験において、併行精度及び室内精度ともにガイドラインの目標値を満たした豚ロース25化合物、豚フィレ23化合物、鶏ささみ39化合物、及び鶏胸肉35化合物について調査を実施した。その結果、検出された動物用医薬品の項目はなかった。それぞれの結果を表-4に示した。

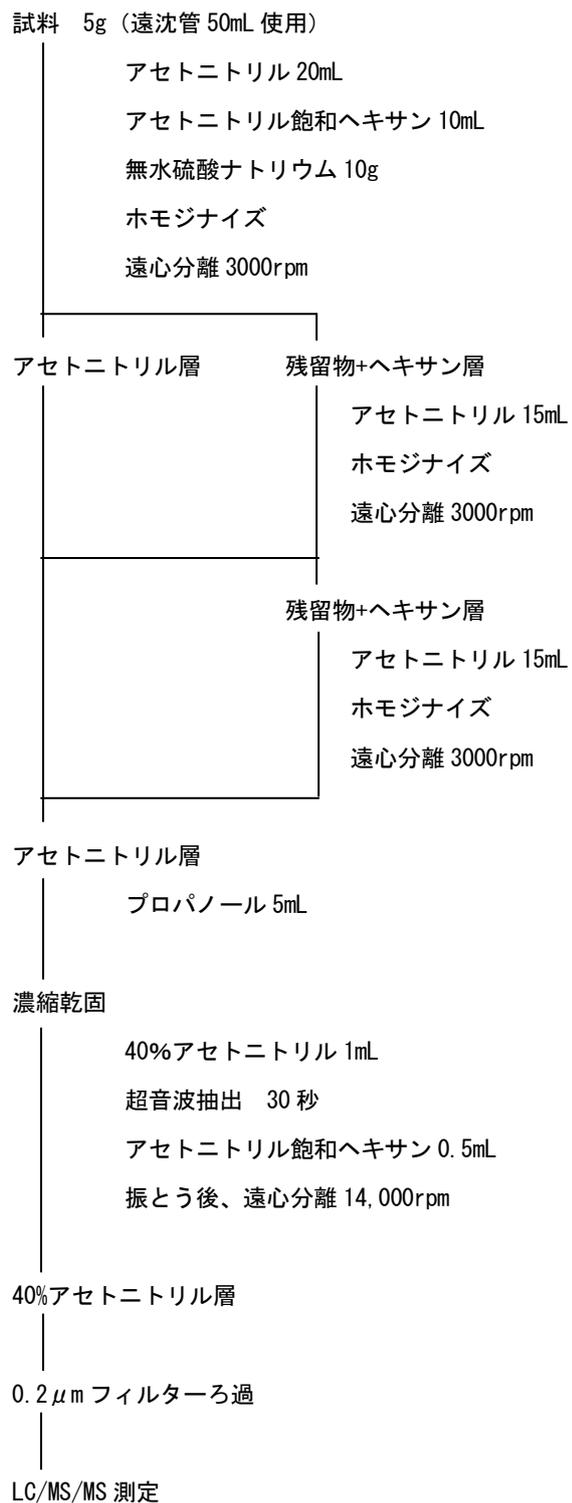


図-1 一斉分析法

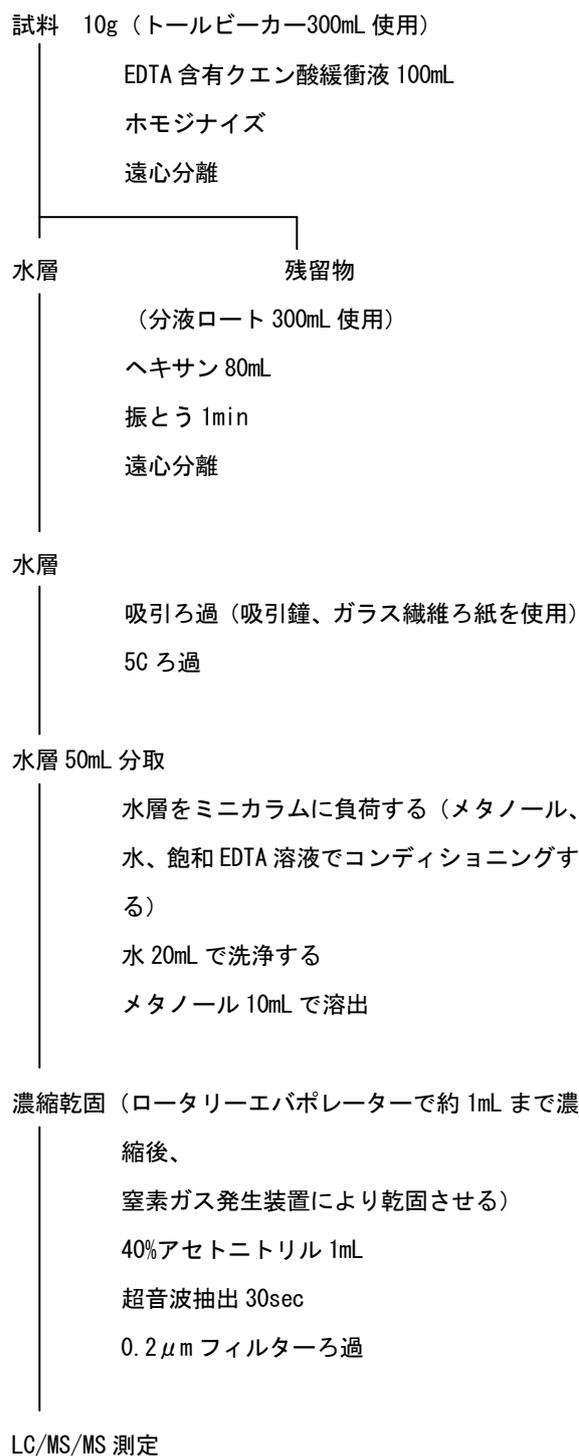


図-2 オキシテトラサイクリン分析法

表-1 分析対象化合物名とイオン化最適条件

No	分析対象化合物名	RT (min)	定量用イオン測定条件				確認用イオン測定条件				Q Trace
			アーカー (m/z)	ア外 (m/z)	CV(V)	CE(V)	アーカー (m/z)	ア外 (m/z)	CV(V)	CE(V)	
1	リンコマイシン	8.25	407	126	40	25	407	359	40	20	1
2	スルファセタミド	6.89	215	156	20	10	215	92	20	15	1
3	ダノフロキサシン	9.84	358	340	40	25	358	96	40	30	3
4	キシラジン	10.71	221	90	40	25	221	164	40	30	3
5	クレンブテロール	11.01	277	203	25	15	277	259	25	10	5
6	ピリメタミン	13.21	249	177	45	30	249	233	45	35	7
7	トリクロルホン	12.22	259	127	25	15	259	223	25	10	6
8	チルミコシン	14.76	870	174	55	45	870	88	55	50	8
9	チアムリン	16.98	494	192	35	25	494	119	35	30	10
10	ブレドニゾロン	16.95	361	343	25	10	361	325	25	15	10
11	ヒドロコルチゾン	17.16	363	121	35	25	363	327	35	20	10
12	デキサメタゾン	17.91	393	373	20	10	393	355	20	15	11
13	エマメクチンB1	18.76	886	158	50	35	886	82	50	40	12
14	ファミフル(ファンフル)	19.43	326	217	30	20	326	281	30	15	13
15	フェノプロカルブ	19.61	208	95	20	15	208	152	20	10	13
16	テメホス(アバテ)	21.54	467	419	35	25	467	143	35	30	14
17	アレスリン	21.94	303	107	20	20	303	93	20	15	14
18	モネンシン	24.65	679	465	55	55	679	447	55	50	15
19	フロルフェニコール	14.70	356	336	-30	-10	356	185	-30	-15	4
20	2-アセチルアミノ-5-エトキシベンゾール	14.32	188	146	20	10	188	100	20	15	8
21	クロルスロン	16.41	380	344	-25	-20	380	344	-25	-25	4
22	5-βピルソルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	8.11	240	133	40	25	240	198	40	20	1
23	レバミゾール	7.75	205	178	40	20	205	123	40	25	1
24	チアベンダゾール	8.29	202	175	45	25	202	131	45	30	1
25	トリメトプリム	8.97	291	230	40	25	291	123	40	30	2
26	スルファジアジン	8.04	251	156	30	15	251	108	30	20	1
27	オルメトプリム	9.59	275	123	40	25	275	81	40	30	2
28	スルファチアゾール	8.86	256	156	20	15	256	92	20	20	2
29	スルファピリジン	9.18	250	92	30	25	250	156	30	20	2
30	スルファメラジン	9.69	265	156	30	20	265	108	30	25	2
31	チアンフェニコール	10.56	354	185	-30	-25	354	79	-30	-25	4
32	スルファジミジン	11.01	279	124	30	20	279	92	30	25	5
33	スルファメトキシピリダジン	11.33	281	156	30	15	281	108	30	20	5
34	スルファモノメトキシ	12.65	281	156	35	20	281	92	35	25	6
35	スルファクロピリダジン	13.10	285	156	30	15	285	92	30	20	7
36	スルファメキサゾール	14.05	254	156	30	15	254	92	30	20	8
37	スルファドキシ	14.14	311	92	35	25	311	126	35	20	8
38	エトバベート	16.63	238	206	20	15	238	164	20	20	10
39	スルファキノキサリン	16.81	301	156	30	15	301	108	30	20	10
40	スルファジメトキシ	16.75	311	156	35	20	311	92	35	25	10
41	スルファニトラン	17.97	334	136	-50	-30	334	137	-50	-35	4
42	β-トレンボロン	18.40	271	199	35	25	271	107	35	30	12
43	α-トレンボロン	18.58	271	253	35	25	271	107	35	30	12
44	メレンゲストロールアセテート	20.71	397	337	30	15	397	279	30	20	14
45	ゼラノール	18.67	305	189	25	20	305	167	25	15	12
46	オキシテトラサイクリン	9.59	461	426	30	20	461	443	30	15	2
47	テトラサイクリン	10.11	445	410	25	20	445	427	25	15	3
48	クロルテトラサイクリン	12.78	479	444	30	20	479	462	30	15	6
49	フルベンダゾール	17.64	314	282	35	20	314	123	35	25	11
50	オキシリニック酸	15.78	262	244	30	20	262	216	30	25	9
51	ナイカルバジン	19.50	301	137	-25	-15	301.1	137	-25	-20	4
52	エンフロキサシン	10.30	360	316	35	20	360	245	35	25	3
53	ジクラズリル	20.04	405	334	-35	-20	405	335	-35	-20	4
54	オフロキサシン	9.39	362	318	35	20	362	261	35	25	2
55	サラフロキサシン	11.06	386	342	40	20	386	299	40	25	5
56	ジフロキサシン	11.18	400	299	40	30	400	356	40	25	5
57	ナリジクス酸	17.82	233	187	25	25	233	215	25	20	11
58	ピロミド酸	18.76	289	271	30	25	289	243	30	30	12
59	クロビドール	8.25	192	101	50	25	192	87	50	30	1
60	クロサンテル	23.52	663	264	45	30	663	150	45	25	15
61	ノフロキサシン	9.22	320	276	35	20	320	233	35	25	2
62	シフロフロキサシン	9.55	332	288	35	20	332	288	35	25	2
63	5-ヒドロキシチアベンダゾール	7.28	218	191	45	30	218	147	45	35	1
64	ピオアレスリン	21.73	303	135	15	10	303	93	15	15	14
65	89Z-エマメクチン安息香酸塩	18.78	887	158	45	30	887	82	45	35	12
66	スピラマイシン	12.26	422	101	20	20	422	145	20	15	6
67	ネオスピラマイシン	11.01	350	174	20	15	350	160	20	20	5

表-2 併行精度結果 (n=5)

No	分析対象化合物名	0.01ppm添加 回収率% (CV%)				0.1ppm添加 回収率% (CV%)			
		ロース	フィレ	ささみ	胸肉	ロース	フィレ	ささみ	胸肉
1	リンコマイシン	80.66(5.52)	114.09(5.68)	83.59(4.80)	77.99(4.30)	81.91(8.09)	101.67(16.68)	85.96(8.13)	91.67(3.77)
2	スルファセタミド	44.08(38.31)	22.28(23.52)	72.15(3.14)	70.89(8.43)	78.49(15.55)	49.16(9.95)	106.54(3.14)	108.85(4.08)
3	ダノフロキサシン	64.69(30.27)	31.44(44.05)	78.47(14.59)	81.56(34.62)	100.33(11.38)	65.02(29.03)	105.92(16.06)	116.51(29.14)
4	キシラジン	92.82(15.76)	93.27(14.87)	93.18(20.05)	120.90(6.12)	69.34(37.90)	111.13(61.55)	75.68(13.55)	115.47(2.56)
5	クレンブテロール	72.29(37.26)	84.10(19.54)	73.93(14.07)	84.79(9.76)	121.91(22.92)	106.75(1.90)	98.87(4.36)	110.51(3.84)
6	ピリメタミン	79.67(4.54)	58.16(4.77)	73.36(2.85)	70.40(7.66)	79.85(3.77)	78.09(1.90)	78.50(2.81)	77.85(3.42)
7	トリクロルホン	82.79(9.40)	81.00(13.28)	80.97(13.37)	89.14(2.46)	101.91(2.88)	90.77(3.14)	92.33(3.84)	93.09(2.85)
8	チルミコシン	104.45(5.98)	110.94(3.63)	117.57(3.28)	111.15(4.15)	92.23(2.16)	86.43(3.55)	104.13(2.28)	95.74(3.59)
9	チアムリン	92.51(10.53)	92.94(4.71)	100.53(3.41)	103.95(15.31)	89.69(9.50)	119.23(3.08)	96.87(2.84)	105.22(13.58)
10	ブレドニゾロン	80.08(15.01)	99.01(26.88)	98.92(7.89)	78.42(20.68)	101.87(8.56)	107.27(8.15)	97.90(9.54)	97.72(8.60)
11	ヒドロコルチゾン	117.67(15.99)	93.12(11.31)	64.07(19.57)	79.02(10.06)	69.20(21.95)	102.78(12.91)	87.26(17.93)	88.59(9.39)
12	デキサメタゾン	80.25(12.51)	84.72(5.14)	110.14(18.97)	99.35(16.59)	99.17(7.39)	93.95(4.38)	89.91(5.72)	78.93(11.85)
13	エマメクチンB1	80.91(4.42)	63.47(4.16)	73.1(6.87)	80.06(11.03)	89.01(9.83)	77.32(5.62)	71.62(5.53)	90.54(10.63)
14	ファムフル(ファンフル)	82.26(5.18)	61.23(24.55)	89.23(8.17)	27.28(73.12)	94.32(3.59)	87.69(24.97)	91.25(8.83)	99.64(34.76)
15	フェノバルブ	53.69(5.79)	43.43(1.58)	53.98(14.94)	68.54(15.92)	65.22(7.25)	54.67(27.13)	67.29(12.77)	77.68(26.71)
16	テモホス(アバテ)	2.68(29.02)	15.12(3.20)	3.22(49.64)	----	9.55(12.46)	3.60(54.54)	6.45(17.78)	9.04(17.71)
17	アレスリン	0.31(161.50)	3.63(26.50)	13.33(4.14)	----	2.45(8.95)	1.60(42.26)	4.37(5.25)	2.03(13.45)
18	モネンシン	11.58(52.84)	13.45(6.18)	16.73(12.06)	15.93(19.08)	16.60(5.52)	12.78(9.11)	19.41(8.72)	17.81(6.96)
19	フロルフェニコール	91.73(8.48)	94.52(6.82)	116.37(5.28)	100.33(11.25)	92.04(1.68)	103.16(2.29)	96.97(4.17)	105.71(5.35)
20	2-アセチルアミノ-5-トロアゾール	68.82(8.38)	54.14(5.61)	82.21(11.74)	59.85(7.92)	84.21(3.55)	79.49(7.23)	97.11(5.64)	85.22(7.38)
21	クロルスロン	98.67(10.30)	88.58(22.95)	79.33(18.80)	84.68(13.92)	75.03(7.16)	74.03(8.41)	60.26(29.73)	53.60(29.07)
22	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	70.63(5.21)	69.66(4.27)	83.29(2.27)	79.74(5.37)	81.81(8.76)	80.96(3.57)	89.35(2.53)	86.84(2.63)
23	レバミゾール	89.20(35.59)	77.63(3.33)	98.46(3.42)	80.27(3.32)	106.93(9.41)	113.65(4.59)	117.35(1.02)	108.58(2.69)
24	チアベンダゾール	63.41(52.05)	93.58(8.42)	89.14(5.89)	86.81(3.53)	140.24(22.62)	89.57(8.07)	84.71(3.76)	71.08(10.95)
25	トリメトプリム	71.32(7.73)	79.47(3.75)	79.48(12.41)	80.49(4.38)	100.74(9.55)	85.49(4.27)	94.81(8.92)	85.37(7.86)
26	スルファジアジン	72.46(1.51)	109.27(3.77)	81.38(4.89)	71.21(2.12)	84.12(10.47)	99.13(5.58)	101.75(4.96)	102.40(5.39)
27	オルメトプリム	76.71(36.21)	76.92(4.90)	80.04(17.03)	76.84(4.03)	89.91(6.13)	108.46(1.55)	97.80(3.64)	120.79(2.99)
28	スルファチアゾール	61.84(6.34)	68.18(9.46)	76.70(2.27)	75.27(5.61)	100.10(4.69)	91.19(14.43)	96.99(6.41)	94.58(4.91)
29	スルファピリジン	65.34(5.63)	38.22(14.04)	77.50(7.30)	70.48(3.76)	94.71(2.18)	57.69(7.46)	98.65(5.29)	87.48(3.98)
30	スルファメラジン	59.06(36.92)	83.37(7.87)	85.21(6.72)	70.50(3.39)	75.87(10.71)	96.19(3.32)	100.31(6.77)	105.16(5.18)
31	チアンフェニコール	77.11(36.46)	95.26(23.65)	100.64(16.94)	89.98(20.89)	73.04(14.69)	87.88(6.97)	80.29(11.16)	78.69(15.56)
32	スルファジミジン	75.27(10.52)	83.56(16.04)	79.32(1.22)	83.56(11.88)	85.49(2.57)	105.18(4.66)	99.65(5.02)	105.02(4.94)
33	スルファメトキシピリダジン	68.01(12.88)	40.21(17.79)	87.44(3.46)	75.43(2.95)	80.85(3.60)	49.37(9.71)	98.44(5.25)	97.50(3.81)
34	スルファモノトキシシン	67.08(15.06)	81.96(6.86)	90.04(3.33)	72.31(4.95)	76.63(6.07)	97.14(4.04)	97.37(6.10)	114.81(11.03)
35	スルファクロルピリダジン	65.03(13.51)	21.26(21.86)	88.47(3.97)	72.15(7.96)	76.45(2.99)	79.84(2.71)	93.29(4.71)	97.37(4.67)
36	スルファメトキサゾール	71.54(4.00)	77.68(9.40)	82.33(5.93)	78.07(5.93)	79.40(2.21)	95.20(2.71)	97.13(5.00)	91.73(4.21)
37	スルファドキシシン	70.33(4.34)	85.89(6.22)	84.10(3.19)	71.74(8.15)	82.18(2.30)	101.76(4.27)	97.97(4.08)	93.34(4.17)
38	エトバベート	100.01(5.84)	79.35(4.89)	94.57(2.86)	82.79(2.30)	91.65(2.41)	97.37(2.58)	97.48(2.43)	104.72(2.53)
39	スルファキノキサリン	62.43(18.24)	44.00(18.92)	82.61(19.70)	21.17(53.39)	64.05(24.09)	48.28(14.59)	89.11(3.96)	76.15(10.82)
40	スルファジメトキシシン	84.11(11.19)	45.75(18.87)	81.64(6.85)	70.95(10.22)	71.59(12.16)	72.74(13.35)	90.95(10.00)	90.69(7.75)
41	スルファニトラン	79.32(39.18)	93.28(31.62)	39.35(46.02)	81.21(32.89)	93.07(26.25)	132.91(5.35)	55.43(25.79)	88.42(14.87)
42	β-トレンボロン	83.89(5.54)	54.73(14.38)	66.49(12.01)	89.44(11.36)	87.87(2.02)	77.42(9.55)	84.07(6.34)	72.07(13.70)
43	α-トレンボロン	79.73(9.64)	63.10(16.91)	74.79(4.79)	81.30(6.69)	95.53(11.20)	92.62(5.85)	76.11(5.84)	78.51(9.79)
44	メレンゲストロールアセテート	56.94(2.85)	38.45(5.73)	54.14(9.25)	55.93(6.99)	63.19(2.58)	53.91(5.25)	68.90(5.76)	71.77(5.15)
45	ゼラノール	103.47(39.16)	90.46(18.86)	94.09(8.41)	45.17(75.25)	117.19(36.34)	127.13(7.89)	82.21(12.23)	176.1(25.69)
46	オキシテトラサイクリン	88.14(5.72)	73.33(9.98)	82.56(5.20)	92.45(7.20)	96.29(5.26)	71.02(4.16)	104.25(2.90)	96.32(3.82)
47	テトラサイクリン	71.78(12.33)	66.27(14.84)	81.11(4.99)	72.46(10.19)	88.60(5.99)	51.62(6.03)	97.52(3.17)	102.56(7.36)
48	クロルテトラサイクリン	58.09(11.87)	35.52(39.50)	76.43(5.23)	93.13(14.33)	70.48(9.61)	10.78(60.42)	99.61(4.63)	95.33(8.89)

表-2の続き

No	分析対象化合物名	0.01ppm添加 回収率%(CV%)				0.1ppm添加 回収率%(CV%)			
		ロース	フィレ	ささみ	胸肉	ロース	フィレ	ささみ	胸肉
49	フルベンダゾール	83.86(5.42)	72.65(20.83)	98.08(10.88)	93.11(8.38)	90.36(11.46)	86.21(12.02)	72.38(7.72)	74.38(16.08)
50	オキシリニック酸	96.45(9.48)	79.41(1.44)	95.35(5.95)	87.58(3.54)	93.89(4.01)	98.45(3.74)	99.75(6.15)	112.17(4.45)
51	ナイカルバジン	----	----	----	----	43.92(7.79)	33.89(6.91)	51.38(10.16)	47.88(11.14)
52	エンフロキサシン	72.64(20.32)	121.39(12.70)	81.08(7.20)	86.34(14.27)	126.95(29.15)	89.15(9.29)	79.47(13.99)	91.24(4.10)
53	ジクラズリル	31.55(21.23)	23.96(36.21)	27.89(31.42)	33.65(16.58)	58.99(1.91)	46.30(13.01)	56.58(5.02)	59.35(10.72)
54	オフロキサシン	72.11(14.58)	81.88(20.82)	80.17(11.31)	81.75(9.59)	73.55(10.20)	91.41(3.75)	75.80(2.69)	114.67(3.13)
55	サラフロキサシン	70.28(11.73)	24.86(34.29)	57.23(24.76)	74.23(13.02)	76.31(8.59)	73.13(14.02)	96.67(11.60)	70.71(9.63)
56	ジフロキサシン	101.75(6.61)	78.75(3.39)	94.70(2.40)	99.33(9.32)	99.64(9.58)	105.31(9.63)	103.28(2.26)	95.71(11.57)
57	ナリジクス酸	88.04(6.45)	90.62(17.35)	75.88(7.92)	86.91(14.27)	95.27(3.62)	119.68(2.50)	96.45(4.29)	104.41(13.04)
58	ピロミド酸	71.43(14.04)	62.24(42.48)	75.77(6.52)	93.31(27.83)	80.88(8.56)	88.08(3.54)	83.57(5.85)	110.37(29.54)
59	クロビドール	84.08(25.55)	75.69(4.93)	91.11(9.23)	83.24(7.44)	101.23(6.37)	96.65(4.11)	100.39(3.70)	99.29(1.88)
60	クロサンテル	----	5.48(21.21)	5.22(10.00)	----	4.46(8.25)	4.08(26.26)	4.66(20.54)	3.34(18.21)
61	ノルフロキサシン	10.01(136.14)	30.07(11.08)	56.51(5.15)	47.40(15.26)	63.99(23.58)	92.01(8.50)	60.32(13.11)	94.83(3.86)
62	シブフロキサシン	10.63(126.77)	30.64(11.60)	37.89(5.97)	29.41(21.33)	63.73(7.57)	93.25(11.97)	64.94(7.49)	86.62(4.14)
63	5-ヒドロキシチアベンダゾール	90.54(17.40)	58.22(8.30)	77.25(4.58)	80.19(3.67)	91.70(12.48)	48.32(49.50)	106.43(5.77)	100.41(3.05)
64	ピオアレシリン	2.17(25.21)	1.46(22.62)	15.55(2.28)	----	2.00(11.10)	2.24(12.68)	4.65(4.72)	1.70(14.10)
65	89Z-エマメクチン安息香酸塩	78.39(5.24)	60.57(2.53)	70.48(10.04)	72.96(13.61)	73.77(8.66)	74.59(6.78)	67.10(4.80)	84.30(3.13)
66	スピラマイシン	104.30(3.95)	77.51(8.69)	84.19(4.02)	71.00(21.76)	74.73(9.09)	70.20(14.90)	72.56(10.06)	61.69(4.03)
67	ネオスピラマイシン	75.72(3.37)	72.54(6.22)	57.06(3.10)	73.23(21.23)	46.54(7.27)	28.28(12.46)	70.19(8.69)	40.73(6.03)

表-3 室内精度結果 (n=2 5日間)

No	分析対象化合物名	0.01ppm添加 回収率%(CV%) ささみ	0.1ppm添加 回収率%(CV%) ささみ
1	リンコマイシン	76.09(10.47)	87.08(14.11)
2	スルファセタミド	68.89(14.08)	113.10(17.63)
3	ダノフロキサシン	53.32(35.80)	69.39(36.47)
4	キシラジン	93.52(12.47)	79.14(17.05)
5	クレンブテロール	94.21(11.93)	90.04(10.96)
6	ピリメタミン	68.03(10.79)	79.91(7.79)
7	トリクロルホン	89.22(9.38)	92.82(13.04)
8	チルミコシン	97.41(8.43)	96.08(5.36)
9	チアムリン	83.11(15.68)	96.69(10.96)
10	プレドニゾロン	86.98(15.76)	85.46(13.43)
11	ヒドロコルチゾン	71.44(29.18)	81.89(15.03)
12	デキサメタゾン	76.32(22.25)	88.67(16.69)
13	エマメクチンB1	72.15(11.13)	70.61(6.54)
14	ファミフル(ファンフル)	72.01(6.93)	87.73(13.00)
15	フェノブカルブ	50.38(14.20)	59.63(14.48)
16	テメホス(アバテ)	10.35(111.08)	7.47(48.77)
17	アレスリン	3.14(64.09)	1.70(41.23)
18	モネンシン	14.29(29.56)	11.54(7.78)
19	フロルフェニコール	81.49(26.06)	98.32(9.76)
20	2-アセチルアミノ-5-ニコチンアゾール	60.02(13.30)	73.70(5.07)
21	クロルスロン	57.32(16.58)	38.26(50.53)
22	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	80.49(6.65)	91.02(13.05)
23	レバミゾール	84.17(9.04)	94.59(14.11)
24	チアベンダゾール	69.95(32.08)	80.99(7.79)
25	トリメプリム	83.20(10.58)	96.40(9.74)
26	スルファジアジン	74.06(11.32)	97.76(18.83)
27	オルメトプリム	78.63(16.08)	97.34(11.04)
28	スルファチアゾール	71.80(15.39)	95.72(16.83)
29	スルファピリジン	70.87(12.05)	84.99(16.77)
30	スルファメラジン	71.95(13.07)	98.07(18.67)
31	チアンフェニコール	105.13(51.84)	81.58(17.03)
32	スルファジミジン	74.38(9.88)	95.25(8.65)
33	スルファメキシピリダジン	72.60(12.68)	94.52(12.73)
34	スルファモノメキシシン	75.13(11.88)	90.59(10.80)
35	スルファクロルピリダジン	68.87(15.23)	86.88(13.40)
36	スルファメキサゾール	74.20(11.40)	90.05(12.71)
37	スルファドキシシン	72.56(7.22)	99.07(3.53)
38	エトバベート	86.91(8.63)	97.48(6.87)
39	スルファキノキサリン	71.96(23.58)	76.08(13.38)
40	スルファジメキシシン	81.57(19.09)	86.27(10.68)
41	スルファニトラン	58.47(38.06)	87.22(15.12)
42	$\beta$ -トレンボロン	71.28(17.02)	78.24(11.11)
43	$\alpha$ -トレンボロン	69.38(21.95)	73.74(13.76)
44	メレンゲストロールアセテート	62.93(20.08)	55.95(13.18)
45	ゼラノール	86.05(26.88)	84.30(11.15)
46	オキシテトラサイクリン	80.11(9.28)	98.72(5.00)
47	テトラサイクリン	76.59(6.49)	98.05(3.47)
48	クロルテトラサイクリン	75.97(16.46)	93.60(10.87)

表-3の続き

No	分析対象化合物名	0.01ppm添加 回収率%(CV%) ささみ	0.1ppm添加 回収率%(CV%) ささみ
49	フルベンダゾール	56.97(29.31)	63.82(15.99)
50	オキシリニック酸	82.75(9.44)	97.79(4.57)
51	ナイカルバジン	----	35.26(46.07)
52	エンロフロキサシン	95.89(12.58)	87.22(13.47)
53	ジクラズリル	38.75(25.11)	48.47(14.92)
54	オフロキサシン	75.72(8.77)	89.30(17.77)
55	サラフロキサシン	63.18(11.88)	70.17(14.00)
56	ジフロキサシン	85.76(8.61)	98.70(5.58)
57	ナリジクス酸	80.69(11.78)	80.69(14.98)
58	ピロミド酸	74.69(29.16)	80.22(21.08)
59	クロビドール	83.22(6.25)	103.40(15.03)
60	クロサンテル	0.92(225.79)	1.38(63.41)
61	ノルフロキサシン	64.86(26.83)	85.65(18.89)
62	シプロフロキサシン	58.92(11.23)	71.52(5.26)
63	5-ヒドロキシチアベンダゾール	66.60(11.36)	94.50(19.25)
64	ビオアレスリン	3.17(83.97)	1.86(22.37)
65	89Z-エマメクチン安息香酸塩	71.47(12.98)	70.64(5.60)
66	スピラマイシン	72.27(11.11)	64.55(12.90)
67	ネオスピラマイシン	70.99(13.32)	63.93(18.91)

表-4 試買調査結果

No	分析対象化合物名	A店舗購入品				B店舗購入品			
		ロース	フィレ	ささみ	胸肉	ロース	フィレ	ささみ	胸肉
1	リンコマイシン	不検出	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出
2	スルファセタミド	----	----	----	----	----	----	----	----
3	ダノフロキサシン	----	----	----	----	----	----	----	----
4	キシラジン	----	----	不検出	----	----	----	不検出	----
5	クレンプテロール	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出	不検出
6	ピリメタミン	----	----	----	----	----	----	----	----
7	トリコロホン	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
8	チルミコシン	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
9	チアムリン	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
10	ブレドニゾロン	不検出	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出
11	ヒドロコルチゾン	----	不検出	----	不検出	----	不検出	----	不検出
12	デキサメタゾン	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
13	エマメクチンB1	不検出	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出
14	ファムフル(ファンフル)	不検出	----	不検出	----	不検出	----	不検出	----
15	フェノバルブ	----	----	----	----	----	----	----	----
16	テメホス(アバテ)	----	----	----	----	----	----	----	----
17	アレスリン	----	----	----	----	----	----	----	----
18	モネンジン	----	----	----	----	----	----	----	----
19	フルフェニコール	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
20	2-アセチルアミノ-5-クロチアゾール	----	----	----	----	----	----	----	----
21	クロルスロン	----	----	----	----	----	----	----	----
22	5-フルロルホルホル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	不検出	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出
23	レバミゾール	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
24	チアベンダゾール	----	----	----	----	----	----	----	----
25	トリメプリム	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
26	スルファジアジン	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
27	オルメプリム	----	不検出	不検出	----	----	不検出	不検出	----
28	スルファチアゾール	----	----	不検出	不検出	----	----	不検出	不検出
29	スルファピリジン	----	----	不検出	不検出	----	----	不検出	不検出
30	スルファミラジン	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出	不検出
31	チアンフェニコール	----	----	----	----	----	----	----	----
32	スルファジミジン	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
33	スルファトキシピリダジン	----	----	不検出	不検出	----	----	不検出	不検出
34	スルファモノトキシ	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出	不検出
35	スルファクロピリダジン	----	----	----	----	----	----	----	----
36	スルファトキサゾール	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
37	スルファドキシ	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
38	エトバベート	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
39	スルファキノキサリン	----	----	不検出	----	----	----	不検出	----
40	スルファジトキシ	不検出	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出
41	スルファニトラン	----	----	----	----	----	----	----	----
42	β-トレンボロン	不検出	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出
43	α-トレンボロン	----	----	----	----	----	----	----	----
44	メレンゲストロールアセテート	----	----	----	----	----	----	----	----
45	ゼラノール	----	----	不検出	----	----	----	不検出	----
46	オキシテトラサイクリン	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
47	テトラサイクリン	不検出	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出
48	クロルテトラサイクリン	----	----	不検出	不検出	----	----	不検出	不検出
49	フルベンダゾール	----	----	----	----	----	----	----	----
50	オキシリニク酸	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
51	ナイカルバジン	----	----	----	----	----	----	----	----
52	エンロフロキサシン	----	----	不検出	不検出	----	----	不検出	不検出
53	ジクラズリル	----	----	----	----	----	----	----	----
54	オフロキサシン	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
55	サラフロキサシン	----	----	----	----	----	----	----	----
56	ジフロキサシン	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
57	ナリジクス酸	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
58	ピロミド酸	----	----	----	----	----	----	----	----
59	クロビドール	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出	不検出
60	クロサンテル	----	----	----	----	----	----	----	----
61	ルフロキサシン	----	----	----	----	----	----	----	----
62	シフロフロキサシン	----	----	----	----	----	----	----	----
63	5-ヒドロキシチアベンダゾール	----	----	----	----	----	----	----	----
64	ピオアレスリン	----	----	----	----	----	----	----	----
65	89Z-エマメクチン安息香酸塩	不検出	----	不検出	不検出	不検出	----	不検出	不検出
66	スピラマイシン	----	----	----	----	----	----	----	----
67	ネオスピラマイシン	----	----	----	----	----	----	----	----

表中の「-----」は妥当性評価確認にてガイドラインの目標値を満たすことのできなかった化合物を表す。

## V まとめ

- 1) LC/MS/MS を用いた一斉分析法及びオキシテトラサイクリン法により、豚筋肉及び鶏筋肉を対象品として動物用医薬品 67 化合物（代謝物 5 化合物を含む）を各 0.01ppm、及び各 0.1ppm 添加し併行精度の確認を実施した結果、豚ロースで 33 化合物、豚フィレで 28 化合物、鶏ささみで 48 化合物及び鶏胸肉で 42 化合物がガイドラインに示されている回収率 70~120%かつ変動係数 15%未満 (0.1ppm) または 25%未満 (0.01ppm) の条件を満たすことができた。また、同様に鶏ささみを対象品として室内精度の確認を実施した結果、40 化合物でガイドラインに示されている回収率 70~120%かつ変動係数 20%未満 (0.1ppm) または 30%未満 (0.01ppm) の条件を満たすことができた。
- 2) 市内に流通している国内産の豚ロース、豚フィレ、鶏ささみ及び鶏胸肉各 2 検体計 8 検体を購入し、動物用医薬品調査を実施した。妥当性評価試験において、併行精度及び鶏ささみを用いた室内精度ともにガイドラインの目標値を満たした化合物について、検出された動物用医薬品は無かった。

## VI 参考文献等

- 1) 厚生労働省ホームページ 輸入食品の安全を守るために  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/tp0130-1.html>
- 2) 厚生労働省ホームページ 食品安全情報  
平成 9~18 年度 畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査結果  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/monitorring/index.html>
- 3) 「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」  
(厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 平成 19 年 11 月 15 日 食安発第 1115001 号)
- 4) 「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」  
(厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 平成 22 年 12 月 24 日 食安発第 1224 第 1 号)
- 5) 「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」  
(厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 平成 17 年 11 月 29 日 食安発第 1129002 号)
- 6) 佐藤浩他：横須賀市健康安全科学センター年報 第 9 号 (2006) ~ 第 13 号 (2010)  
「市内に流通している養殖魚介類中の残留有害物質調査」
- 7) 加藤秀樹：横須賀市健康安全科学センター年報 第 14 号 (2011)  
「市内に流通している畜産物中の残留動物用医薬品調査」

## インフルエンザウイルス薬剤耐性調査

沼田和也、竹内恵美

### I はじめに

インフルエンザウイルスはオルトミクソウイルス科に属し、ウイルス粒子内部に存在する核蛋白質(NP)及びマトリックス蛋白質(M1)の抗原性の違いからA、B、Cの3つの型に分けられる。また、A型及びB型インフルエンザウイルス粒子表面には宿主細胞表面のレセプターに結合する赤血球凝集素(HA)と出芽時にウイルス粒子を細胞外に遊離させる作用をもつノイラミニダーゼ(NA)の2種類の糖蛋白質が存在する。A型インフルエンザウイルスは抗原性の違いから、HAは16亜型、NAは9亜型に分けられ、カモ等の水禽には全ての亜型が存在する。

日本国内のインフルエンザの治療では、主にウイルスNA蛋白を標的とするオセルタミビル、ザナミビル等のNA阻害剤が使用されているので、国内で検出・分離培養されたインフルエンザウイルスについて薬剤耐性株の検出状況を把握し、情報提供を行うことは公衆衛生上重要である。

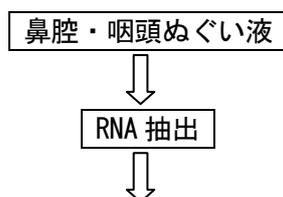
今回、当センターで検出されたインフルエンザウイルスについて、NA遺伝子領域の一部の塩基配列を確認、解析し、薬剤耐性遺伝子の保有調査を実施したので報告する。

### II 調査材料

2012年12月から2013年3月までに感染症発生動向調査で市内病原体定点(医療機関)等から採取された鼻腔・咽頭ぬぐい液について、リアルタイムRT-PCR法により検出されたインフルエンザウイルスAH1pdm09(4検体)、AH3亜型(39検体)、B型(7検体)計50検体を調査材料とした。

### III 調査方法

インフルエンザ診断マニュアル(第2版)(平成24年3月、国立感染症研究所)に従い、鼻腔・咽頭ぬぐい液から市販のRNA抽出キットを用い、RNAを抽出する。抽出したインフルエンザウイルスRNAから、AH1pdm09についてはAllele-specific RT-PCR法によりH275Y変異を検出し、AH3亜型、B型についてはOne Step RT-PCR法、2ndPCR法を行い、2ndPCR産物を確認、精製し、ダイレクトシーケンス法により、NA遺伝子領域の一部の塩基配列を確認する。(図1)



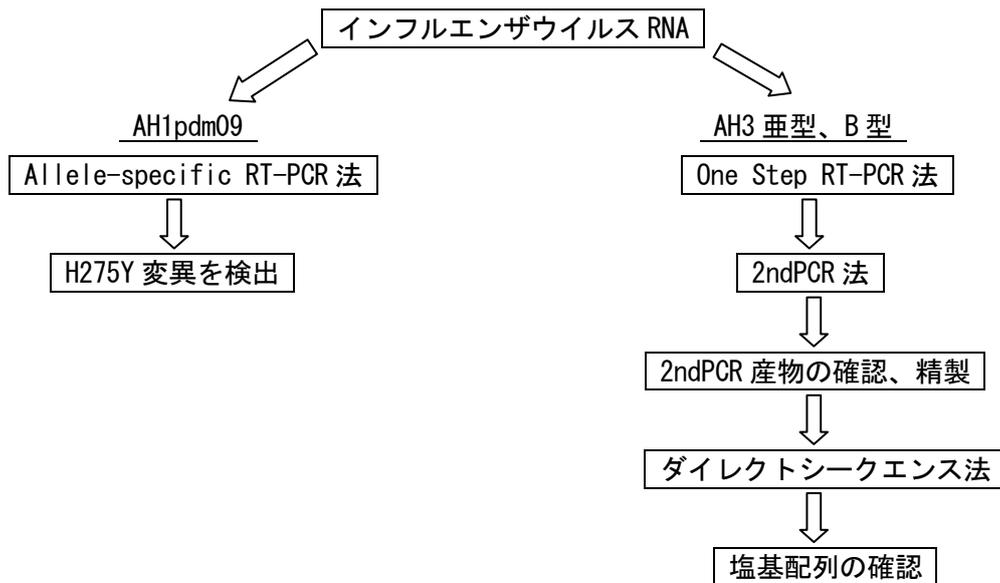


図1 調査方法のフロー

- 1 RNA 抽出(市販の RNA 抽出キット : スピンプロトコール、AH1pdm09、 AH3 亜型、B 型共通)  
RNA 抽出は以下の通りとする。(図 2)

鼻腔・咽頭ぬぐい液 140  $\mu$ l

↓

Buffer AVL carrierRNA 560  $\mu$ l に添加、混和、室温で 10 分間インキュベート

↓

エタノール(99.5%)560  $\mu$ l を添加、混和、遠心(10,000rpm、5min)

↓

スピncラムに上清 630  $\mu$ l をアプライ、遠心(8,000rpm、1min)

↓

スピncラムに Buffer AW1 500  $\mu$ l を添加、遠心(8,000rpm、1min)

↓

スピncラムに Buffer AW2 500  $\mu$ l を添加、遠心(14,000rpm、3min)

↓

新しい 1.5ml マイクロ遠心チューブにスピncラムをセットし、Buffer AVE 60  $\mu$ l を添加、遠心(8,000rpm、1min)、回収

↓

インフルエンザ RNA (抽出)

図2 RNA 抽出のフロー

- 2 Allele-specific RT-PCR 法による H275Y 変異の検出(AH1pdm09)

- 1) Primer Probe set

Primer Probe set は以下の通りとする。(表 1)

表1 H275Y 変異検出用 Primer Probe set

RT-PCR Primer set	Forward:H1N1NA-F690-719	5' -ATGTGCATGTGTAATGTTCTTGCTTTAC-3'
	Reverse:H1N1NA-R847-872	5' -ACACATGTGATTTACTAGAATCAGG-3'
耐性株検出用	FAM-274Ya-swH1N1-F823-835	5' -(FAM) TACTATGAGGAAT (MGB) -3'
感受性株検出用	VIC-H274a-swH1N1-F823-835	5' -(VIC) CACTATGAGGAAT (MGB) -3'

- 2) QuantiTect Virus kit を用いた反応液の作成方法、反応条件  
 反応液の作成方法と反応条件は以下の通りとする。(表2、3)

表2 反応液の作成方法 (20 $\mu$ l系)

試薬	容量	最終濃度
5 $\times$ QuantiTect Virus NR Master Mix	4.0 $\mu$ l	1 $\times$
40 $\times$ プライマー+プローブMix	0.5 $\mu$ l	0.6 $\mu$ M Forward primer 0.6 $\mu$ M Reverse primer 0.1 $\mu$ M FAM-Probe 0.1 $\mu$ M VIC-Probe
QuantiTect Virus RT Mix	0.2 $\mu$ l	
RNase free Water	13.3 $\mu$ l	
Template (RNA)	2.0 $\mu$ l	
Total 容量	20.0 $\mu$ l	

表3 反応条件

Pre-read	60 $^{\circ}$ C	1min	
Amplification	50 $^{\circ}$ C	20min	} $\times$ 40 cycles
	↓		
	95 $^{\circ}$ C	5min	
	↓		
	95 $^{\circ}$ C	15sec	
	56 $^{\circ}$ C	45sec (Data Collection)	
Post-read	60 $^{\circ}$ C	1min	

反応がプラトーに達すると各陽性コントロールを結んだ線が直線状にならず、結果判定が行いにくくなるのでサイクル数を40に設定する。

3) Allelic Discrimination 解析

Allelic Discrimination 解析では、PCR 反応終了後(エンドポイント)の各サンプルの蛍光強度を利用して判定を行う。検査結果の判定は、Allelic Discrimination の図で以下の2つの条件が満たされた場合に有効とする。

- ① H275 陽性コントロールおよびY275 陽性コントロールを結んだ線がそれぞれ直線状になる。
- ② 陰性コントロールが、両陽性コントロールの直線との交点付近にある。

3 One Step RT-PCR 法(AH3 亜型、B 型)

1) Primer set

Primer set は以下の通りとする。(表 4)

表 4 One Step RT-PCR 法(AH3 亜型、B 型) Primer set

AH3亜型	Forward : H3N2-F1	5' -AGCAAAAGCAGGAGT-3'
	Reverse : H3N2-R1413	5' -AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT-3'
B型	Forward : BNA-F5v2	5' -TCAAAACTGAAGCAAATAGGCCA-3'
	Reverse : BNA-R1498-1472	5' -AATAGGAACAAGGGTTTAGAACAGA-3'

2) 反応液の作成方法、反応条件

反応液の作成方法と反応条件は以下の通りとする。(表 5、6)

表 5 反応液の作成方法 (25 μl 系)

試 薬	容 量
RNase-free滅菌蒸留水	9.5 μl
5×QIAGEN One-Step RT-PCR Buffer	5.0 μl
dNTP混合液(containing 10mM of each dNTP)	1.0 μl
Forward primer (10 μM)	1.5 μl
Reverse primer (10 μM)	1.5 μl
QIAGEN One-Step RT-PCR Enzyme Mix (5U/μl)	1.0 μl
RNase Inhibitor (20U/μl)	0.5 μl
Template (RNA)	5.0 μl
Total 容量	25.0 μl

表6 反応条件

Reverse Transcription	50°C	30min	
Amplification	95°C	15min	× 40 cycles
	↓		
	94°C	30sec	
	50°C	30sec	
	72°C	90sec	
	↓		
	72°C	10min	
Hold	4°C	∞	

4 2ndPCR 法 (AH3 亜型、B 型)

1) Primer set

Primer set は以下の通りとする。(表 7)

表 7 2ndPCR 法 (AH3 亜型、B 型) Primer set

AH3亜型	Forward : N2-F387	5' -CATGCGATCCTGACAAGTGTATC-3'
	Reverse : N2-AN2D2R	5' -CAAAGGCCAGCCTTTCACT-3'
B型	Forward : BNA-F355	5' -AAACTCAGCTCCCTTGAT-3'
	Reverse : BNA-R1092	5' -ACAAATCCTCCCTTGAT-3'

2) 反応液の作成、反応条件

DNA templateのRT-PCR 産物は市販のDNA精製キットで精製してから、2ndPCR法を行う。反応液の作成方法と反応条件は以下の通りとする。(表8、9)

表8 反応液の作成方法 (50 μl系)

試 薬	容 量
DNase-free滅菌蒸留水	22.0 μl
PerfectShot Ex Taq	25.0 μl
Forward primer (20 μM)	1.0 μl
Reverse primer (20 μM)	1.0 μl
DNA template (RT-PCR 産物 (精製済))	1.0 μl
Total 容量	50.0 μl

表9 反応条件

Amplification	95°C	3min	} × 40 cycles
	↓		
	94°C	30sec	
	50°C	30sec	
	72°C	90sec	
	↓		
	72°C	10min	
Hold	4°C	∞	

3) 2ndPCR 産物の確認

- ① One Step RT-PCR法、2ndPCR法にて増幅後、6×Gel loading dye 1μl とPCR増幅液5 μl をよく混合（ピペッティング）し、1.5%に調製したアガロースゲルのウェルに混合液を6 μl 入れる。他のウェルに分子量マーカー（100 or 200bp DNA Ladder）を入れる。
- ② 電気泳動装置で100V、30~40 分間、電気泳動する。
- ③ 泳動後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド染色液に入れ、15~30 分間染色する。染色後、アガロースゲルを5~10 分間水洗し、UV 照射装置にセットし、UV を照射して目的の位置にバンドを確認する。（AH3亜型：約700bp、B型：約740bp）

5 ダイレクトシーケンス法(AH3 亜型、B 型)

1) Primer set

2ndPCR法と同じPrimer setを使用する。（表7）

2) 反応液の作成、反応条件

反応液の作成方法と反応条件は以下の通りとする。（表 10、11）

表10 反応液の作成方法 (20 μl系)

試 薬	容 量
DNase-free滅菌蒸留水	9.5 μl
Master Mix	8.0 μl
Forward primer (1.6 μM) or Reverse primer (1.6 μM)	2.0 μl
DNA template (2ndPCR 産物(精製済))	0.5 μl
Total 容量	20.0 μl

DNA template の2ndPCR 産物は市販のDNA 精製キットで精製してから、ダイレクトシーケンス法を行う。DNA template の量は0.5~2.0 μl で最適量を供し、DNase-free 滅菌蒸留水で調節し、Total 容量は20.0 μl とする。

表11 反応条件

Sequence reaction	96°C	2min	} × 30 cycles
	↓		
	96°C	20sec	
	50°C	20sec	
	60°C	4min	
Hold	4°C	∞	

3) エタノール沈殿法

Stop Solution の作成方法とエタノール沈殿法は以下の通りとする。(表 12、図 3)

表 12 Stop Solution の作成方法

Stop Solution / 1sample (用時調製)	
3M-NaOAc	2 μL
100mM Na <sub>2</sub> -EDTA	2 μL
20mg/mL-Glycogen (DTCS キット付属)	1 μL

遠心用チューブに上記のストップソリューション (5 μL) を分注

↓

市販のDNA精製キットで精製したシーケンス反応液 (全量) を加え攪拌

↓

99.5%エタノール (60 μL) を加え攪拌、遠心(14,000rpm、15min)

↓

上清を除き、70% エタノール (200 μL) でペレットを2回リンス

↓

ペレットの中のエタノールを揮発

↓

ペレットをサンプルローディングソリューション[SLS] (40 μL) に溶解

↓

SLS に溶解したサンプルを全量 CEQ サンプルプレートにアプライ

↓

ミネラルオイル (DTCS キット付属) を各ウエルに1滴ずつ滴下

↓

遺伝子解析装置で測定 (シーケンス解析)、塩基配列の確認

図 3 エタノール沈殿法のフロー

#### IV 調査結果及び考察

リアルタイム RT-PCR 法により検出されたインフルエンザウイルス AH1pdm09 (4 検体)、AH3 亜型 (39 検体)、B 型 (7 検体) 計 50 検体について、NA 遺伝子領域の一部の塩基配列を確認、解析し、薬剤耐性遺伝子の保有調査を実施した。調査結果については以下の通りであった。

##### 1 インフルエンザウイルス AH1pdm09

インフルエンザウイルス AH1pdm09 を Allele-specific RT-PCR 法により調査を実施したところ、4 検体中 2 検体から H275Y 変異を検出した。(表 13、図 4)

表 13 Allele-specific RT-PCR 法の結果とリアルタイム RT-PCR 法の Ct 値

検体 No.	Allele-specific RT-PCR 法		リアルタイム RT-PCR 法 インフルエンザウイルス AH1pdm09		
	Call	結果	Detector	Threshold	Ct 値
1	Y275	耐性	TypeA	0.10	18.81
2	Y275	耐性	TypeA	0.10	20.68
3	H275	感受性	TypeA	0.10	17.40
4	H275	感受性	TypeA	0.10	29.15

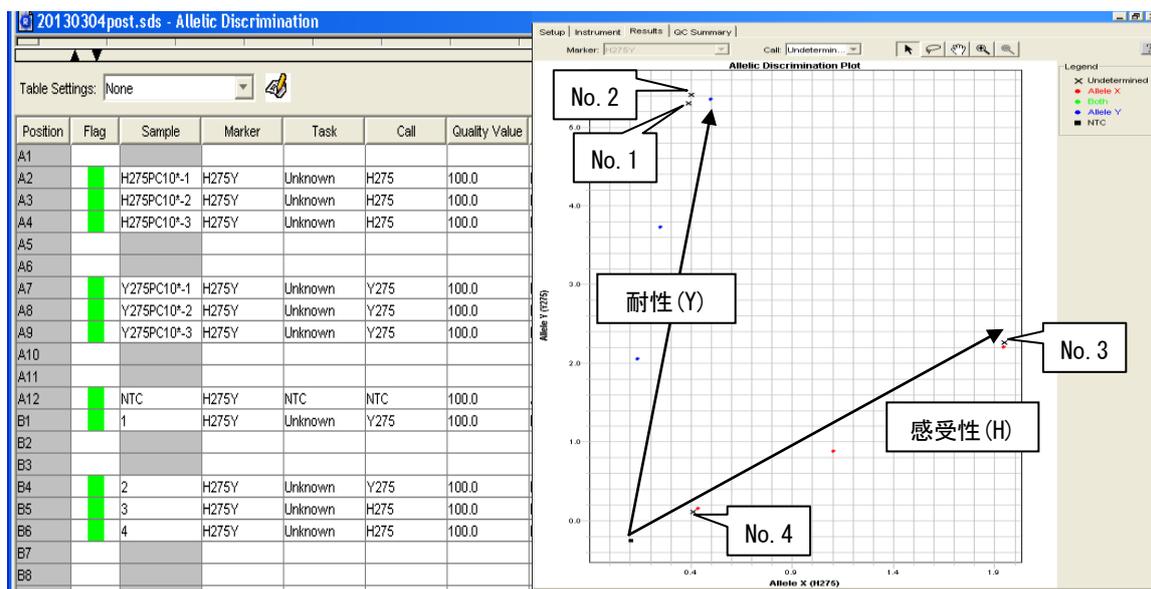


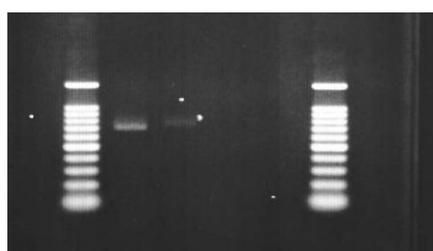
図 4 Allelic Discrimination 解析結果

2010/11 シーズンから国立感染症研究所では全国の地方衛生研究所等と連携し、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル及びラニナミビルの 4 薬剤に対する耐性株サーベイランスを実施している。そのサーベイランスにおいて検体 No. 1 と No. 2 について、国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター第 1 室が抗インフルエンザ薬剤感受性試験を実施した結果、2 検体ともにオセルタミビル及びペラミビルに対して感受性が著しく低下していたが、ザナミビル及びラニナミビルに対しては感受性を保持していたと報告があった。これら 2 検体は市内の

同じ保育園に通う園児たちから、また、同じ医療機関から検体採取され（No. 1 は1月下旬、No. 2 は2月上旬に採取）、2検体ともに抗インフルエンザ薬の服薬歴、今シーズンのインフルエンザ既往歴はなかったが、疫学情報等の詳細は不明であった。2012/13 シーズン、当センターが検出したインフルエンザウイルス検体数は AH1pdm09 が4検体（3.3%）、AH3 亜型が100検体（82.6%）、B型が17検体（14.1%）であったため、AH1pdm09 の調査実施数としては少ないが、薬剤耐性株の地域への広がりには確認されていない。また、病原微生物検出情報（IASR、国立感染症研究所感染症疫学センター）の2012/13 シーズン 抗インフルエンザ薬耐性株検出情報によると、国内で分離された A(H1N1)pdm09 149 株中の耐性株検出数は2株で、2株ともにオセルタミビルとペラミビルについて耐性であり、NA 蛋白に H275Y 変異を持ち、当センターから検出された株であった。（2013年7月8日現在）

## 2 インフルエンザウイルス AH3 亜型

インフルエンザウイルス AH3 亜型は2ndPCR 産物の確認後（約700bp）（図5）、ダイレクトシーケンス法により、NA 遺伝子領域の一部の塩基（アミノ酸）配列（R292K、N294S）について調査を実施したところ、39 検体すべて変異がなかった。（表14、図6）



- ① インフルエンザウイルス AH3 亜型（検体 No. 5）
  - ② インフルエンザウイルス B 型（検体 No. 44）
  - ③ NC（陰性コントロール）
- 100bp DNA Ladder

① ② ③

図5 インフルエンザウイルス AH3 亜型と B 型の電気泳動像

表14 ダイレクトシーケンス法の結果とリアルタイム RT-PCR 法の Ct 値

検体 No.	ダイレクトシーケンス法		リアルタイム RT-PCR 法 インフルエンザウイルス AH3 亜型		
	Amino Acid substitution (R292K、N294S)	結果	Detector	Threshold	Ct 値
5	R292、N294	変異なし	TypeA	0.10	13.54
2					27.51
43					27.51

```

835 tcttgctatcctcgatatcctgggtgtcagatgtgtctgcagagacaactggaaaggctcc 894
279 S C Y P R Y P G V R C V C R D N W K G S 298
                                292   294
  
```

図6 検体 No. 5 のアミノ酸配列（一部抜粋）

インフルエンザウイルス薬剤耐性株の NA 遺伝子領域のアミノ酸変異については WHO（世界保健機関）薬剤耐性株サーベイランスのウェブサイト（[http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/antiviral\\_susceptibility/nai\\_overview/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/nai_overview/en/)）に示されている。この中で培養細胞を用いた薬剤感受性試験において感受性の低下が認められている R292K、N294S 変異株の調査を実施したが、薬剤耐性遺伝子の保有は確認できなかった。また、病原微生物検出情報（前述）によると、国内で分離された A(H3N2) 型 4,936 株について薬剤感受性試験を実施した結果、すべての株がオセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル及びラニナミビルに対し感受性を保持していた。（2013 年 7 月 8 日現在）

### 3 インフルエンザウイルス B 型

インフルエンザウイルス B 型は 2ndPCR 産物の確認後（約 740bp）（図 5）、ダイレクトシーケンス法により、NA 遺伝子領域の一部の塩基（アミノ酸）配列（R150K、D197E、D197N）について調査を実施したところ、7 検体すべて変異がなかった。（表 15、図 7）

表 15 ダイレクトシーケンス法の結果とリアルタイム RT-PCR 法の Ct 値

検体 No.	ダイレクトシーケンス法		リアルタイム RT-PCR 法 インフルエンザウイルス B 型		
	Amino Acid substitution (R150K、D197E、D197N)	結果	Detector	Threshold	Ct 値
44	R150、D197	変異なし	TypeB	0.10	19.03
49					24.75
50					

```

427 tacaatggaacaagagaagacagaaacaagctgaggcatctaatttcagtcaaattgggc
143 Y N G T R E D R N K L R H L I S V K L G
                               150
aaaatcccaacagtagaaaactccattttccacatggcagcttggagcgggtccgcatgc
K I P T V E N S I F H M A A W S G S A C
catgatggtaaagaatggacatatatcggagttgatggccccgacagtaatgcattgctc 606
H D G K E W T Y I G V D G P D S N A L L 202
                               197

```

図 7 検体 No. 44 のアミノ酸配列（一部抜粋）

薬剤耐性株サーベイランスのウェブサイト（前述）に示されている、培養細胞を用いた薬剤感受性試験において感受性の低下が認められる R150K、D197E、D197N 変異株の調査を実施したが、薬剤耐性遺伝子の保有は確認できなかった。また、病原微生物検出情報（前述）によると、

国内で分離された B 型 1,348 株（当センターの分離株、検体 No. 44、46、48、49 含）について薬剤感受性試験を実施した結果、すべての株が A(H3N2) 型と同様の 4 薬剤に対し感受性を保持していた。（2013 年 7 月 8 日現在）

NA 阻害薬耐性ウイルスは、世界規模のサーベイランスにおける基準として、「NA 遺伝子に特徴的な変異をもち、 $IC_{50}$  値の著しい上昇を示す」と定義されている。NA 遺伝子における耐性変異は Allele-specific RT-PCR 法やシーケンス法により検出され、ウイルスの  $IC_{50}$  値は NA 阻害薬に対する薬剤感受性試験により算出される。今回は NA 遺伝子領域の一部の塩基配列を確認、解析し、薬剤耐性遺伝子の保有調査を実施した。また、一部の検体（AH1pdm09 2 検体、B 型 4 検体）については国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターで抗インフルエンザ薬剤感受性試験を実施した。

当センターは今後も国立感染症研究所と連携して薬剤耐性株の検出状況を把握し、行政、医療機関、市民に情報提供を行って、治療や予防投与に寄与するとともに、薬剤耐性株のヒト-ヒト感染の流行等の動向に注意を払うことが重要となる。

## V まとめ

- 1 インフルエンザウイルス AH1pdm09 4 検体中 2 検体から H275Y 変異を検出した。国立感染症研究所が抗インフルエンザ薬剤感受性試験を実施した結果、2 検体ともにオセルタミビル及びペラミビルに対して感受性が著しく低下していたが、ザナミビル及びラニナミビルに対しては感受性を保持していた。
- 2 インフルエンザウイルス AH3 亜型 39 検体すべて R292K、N294S 変異はなかった。
- 3 インフルエンザウイルス B 型 7 検体すべて R150K、D197E、D197N 変異はなかった。
- 4 薬剤耐性株の検出状況を把握し、情報提供を行うことが公衆衛生上重要である。

## VI 参考文献等

- 1 インフルエンザ診断マニュアル（第 2 版）（平成 24 年 3 月）、国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
- 2 H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法 実験プロトコール（2010 年 11 月 ver. 1）、国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
- 3 病原微生物検出情報（IASR）Vol. 34 No. 5（No. 399）、2013 年 5 月、国立感染症研究所感染症疫学センター
- 4 病原微生物検出情報（IASR）Vol. 33 No. 11（No. 393）、2012 年 11 月、国立感染症研究所感染症情報センター
- 5 病原微生物検出情報（IASR）Vol. 32 No. 11（No. 381）、2011 年 11 月、国立感染症研究所感染症情報センター



# V 資 料

## 腸管出血性大腸菌の検査方法 検討結果

山口 純子

### I はじめに

平成24年5月15日付で厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長より、「腸管出血性大腸菌026、0111及び0157の検査法について」の通知が新たに出た。当センターにおいては収去検査において腸管出血性大腸菌の検査を実施しており、通知に基づいた検査を行うにあたり、検査実施標準作業書（SOP）を作成する必要があるため、使用する増菌培地、分離培地の若干の検討を行ったので報告する。

### II 検討内容

#### 1 増菌培地の検討

新通知では現行のノボジオシン加mEC培地から、ノボジオシン不含のmEC培地を使用することとなっている。しかし、食材中の腸管出血性大腸菌以外の多数の菌の増殖が腸管出血性大腸菌の増殖を妨げると考えられる場合は、ノボジオシン加mEC培地を用いる必要があるのか、汚染された食材を用いて各血清型（腸管出血性大腸菌026、0111、0157）の菌液をノボジオシン加mEC培地とノボジオシン不含のmEC培地に添加培養後、各々の選択分離培地に分離し、発育の違いを観察した。

#### 2 免疫磁気ビーズ法における026用酵素基質培地の検討

現行では026用酵素基質培地はCT-Vi RX 026寒天培地を使用しているが、クロモアガーSTEC培地に変更することにより、0111、0157と同様の培地を使用することができる。（通知P.10、その他、同等の大腸菌が鑑別できる培地も使用できる。との記載あり）そこで、026を含めた既知の細菌をCT-Vi RX 026寒天培地とクロモアガーSTEC培地に分離し、集落の違いを比較し確認した。

### III 使用培地等及び使用菌株

#### 1 汚染食材（A：肉 細菌数2400000/g、B：しょうが 細菌数3700000/g）

ノボジオシン加mEC培地、ノボジオシン不含mEC培地、セフィキシム・亜テルル酸カリウム添加ソルビトールマッコンキー（CT-SMAC）寒天培地、セフィキシム・亜テルル酸カリウム添加ラムノースマッコンキー（CT-RMAC）寒天培地、セフィキシム・亜テルル酸カリウム添加ソルボースマッコンキー（CT-SBMAC）寒天培地、クロモアガーSTEC培地（酵素基質培地）

表 1 使用菌株

番号	菌株番号	血清型
①	270-85	腸管出血性大腸菌 0157
②	96020	腸管出血性大腸菌 0157
③	010092	腸管出血性大腸菌 026
④	010096	腸管出血性大腸菌 026
⑤	040003	腸管出血性大腸菌 0111
⑥	99329	腸管出血性大腸菌 0111

2 CT-Vi RX 026 寒天培地、クロモアガー-STE C 培地 (酵素基質培地)

表 2

番号	菌種	番号	菌種
1	<i>E. harmani</i>	7	<i>C. freundii</i>
2	<i>K. pneumoniae</i>	8	<i>E. cloacae</i>
3	<i>K. oxytoca</i>	9	<i>E. coli</i>
4	<i>M. morgani</i>	10	腸管出血性大腸菌 026
5	<i>E. sakazaki</i>	11	腸管出血性大腸菌 026
6	<i>E. aerogenes</i>		

IV 方法

- 1) 1) ノボビオシン加mEC培地、ノボビオシン不含mEC培地を各々45mlずつ分注し、汚染食材 (A : 肉、B : しょうが) を5gずつ加えた。
- 2) マックファーランド 0.5 に調整した表 1 の各血清型の菌液を、1) の培地に 1ml ずつ加え 42°C で 22 時間培養した。
- 3) 026 は CT-RMAC 寒天培地とクロモアガー-STE C 培地へ、0111 は CT-SBMAC 寒天培地とクロモアガー-STE C 培地へ、0157 は CT-SMAC 寒天培地とクロモアガー-STE C 培地へそれぞれ分離し、発育の違いを観察した。
- 2) 表 2 の菌種をそれぞれ現行の CT-Vi RX 026 寒天培地とクロモアガー-STE C 培地に分離し、集落を観察した。

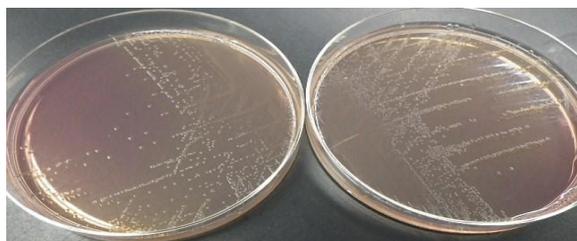
V 結果

- 1) 血清型 026、0111 については、汚染食材 A 肉、B しょうがのどちらに添加した場合でもノボビオシン加mEC培地、ノボビオシン不含mEC培地による発育に差は見られなかった。(写真 2, 3, 6, 7) 血清型 0157 においても汚染食材 A 肉に添加した場合、ノボビオシン加mEC培地、ノボビオシン不含mEC培地による発育に差は見られなかった。(写真 1) しかし、血清型 0157 (菌株番号②) を汚染食材 B のしょうがに添加した場合、写真 5 のように 0157 以外の細菌 (ピ

ンク色集落)の発育がノボビオシン加mEC培地で抑制されているが、写真4のように逆にノボビオシン加mEC培地で0157以外の細菌(ピンク色集落)が発育しているケースも見られた。これらの細菌は同定した結果 *E. cloacae* であった。もともとしょうがに存在していた細菌であると思われるが、ノボビオシンに耐性な株も存在しており写真4のように発育してきたと考えられる。ノボビオシン不含mEC培地に発育してこなかった理由としては、今回添加した血清型0157(菌株番号①)がノボビオシン不含の状態では *E. cloacae* より優位に発育することができたが、ノボビオシンを加えることにより若干発育が悪くなり、ノボビオシン耐性の *E. cloacae* が発育してきたと推定された。今回使用した血清型0157は2種類であるが、食品中に共存している細菌との組み合わせにより、ノボビオシンの有無による発育に違いが見られた。また、クロモアガーSTEC培地ではすべての場合において変化は見られなかった。

【汚染食材A：肉使用】

写真1 0157(菌株番号①)添加(CT-SMAC寒天培地)菌株番号②も同様の結果



変化なし

ノボビオシン不含mEC培地      ノボビオシン加mEC培地

写真2 026(菌株番号③)添加(CT-RMAC寒天培地)菌株番号④も同様の結果



変化なし

ノボビオシン不含mEC培地      ノボビオシン加mEC培地

写真3 0111(菌株番号⑤)添加(CT-SBMAC寒天培地)菌株番号⑥も同様の結果



変化なし

ノボビオシン不含mEC培地      ノボビオシン加mEC培地

【汚染食材 B : しょうが使用】

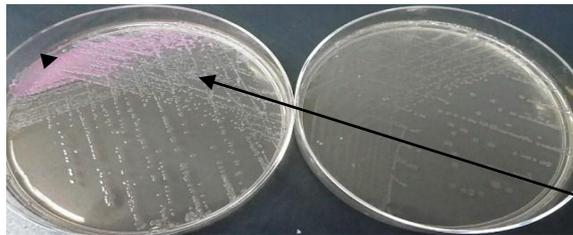
写真 4 0157 (菌株番号①) 添加 (CT-SMAC 寒天培地)



ノボビオシン加で発育あり

ノボビオシン不含mEC培地 ノボビオシン加mEC培地

写真 5 0157 (菌株番号②) 添加 (CT-SMAC 寒天培地)



ノボビオシン加で発育が抑制

ノボビオシン不含mEC培地 ノボビオシン加mEC培地

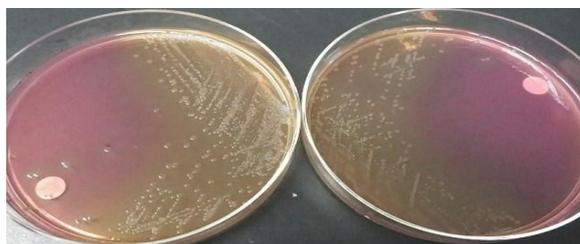
写真 6 026 (菌株番号③) 添加 (CT-RMAC 寒天培地) 菌株番号④も同様の結果



変化なし

ノボビオシン不含mEC培地 ノボビオシン加mEC培地

写真 7 0111 (菌株番号⑤) 添加 (CT-SBMAC 寒天培地) 菌株番号⑥も同様の結果



変化なし

ノボビオシン不含mEC培地 ノボビオシン加mEC培地

全ての培地において、透明な集落（糖非分解）が腸管出血性大腸菌 0157, 026, 0111 である。

- 2 血清型 026 は CT-Vi RX 026 寒天培地では青紫色、クロモアガー-STEC 培地では藤色の集落となる。(写真 8,9) 現行の CT-Vi RX 026 寒天培地では 血清型 026 以外の細菌 表 2 の 2 *K. pneumoniae*、3 *K. oxytoca*、5 *E. sakazaki*、6 *E. aerogenes*、7 *C. freundii*、8 *E. cloacae*

(写真10~15)においても血清型 026 同様の青紫色集落となり、026 の集落と区別がつかない。

しかし、クロモアガー-STEPC 培地では *K. pneumoniae*、*C. freundii* のように青色集落となるか、または *K. oxytoca*、*E. sakazaki*、*E. aerogenes*、*E. cloacae* のように発育が抑制された。

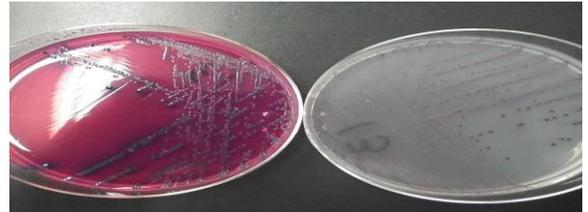
1 *E. harmanii*、4 *M. morgani*、9 *E. coli* においては血清型 026 との明確な違いは見られなかった。

写真 8 10 腸管出血性大腸菌 026



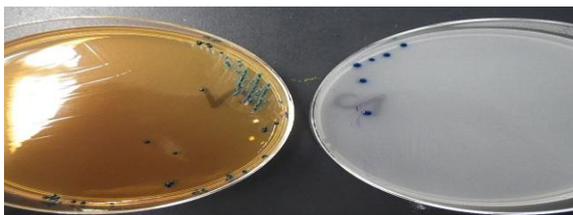
CT-Vi RX 026 寒天培地      クロモアガー-STEPC 培地

写真 9 11 腸管出血性大腸菌 026



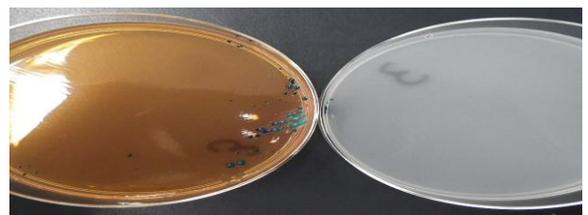
CT-Vi RX 026 寒天培地      クロモアガー-STEPC 培地

写真 10 2 *K. pneumoniae*



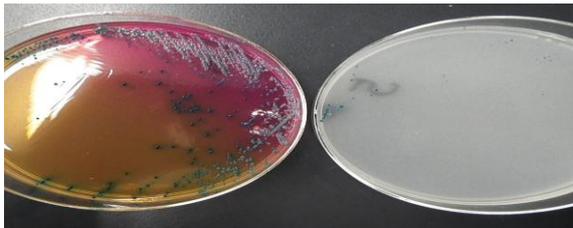
CT-Vi RX 026 寒天培地      クロモアガー-STEPC 培地

写真 11 3 *K. oxytoca*



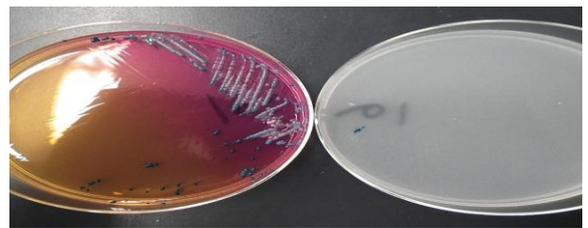
CT-Vi RX 026 寒天培地      クロモアガー-STEPC 培地

写真 12 5 *E. sakazaki*



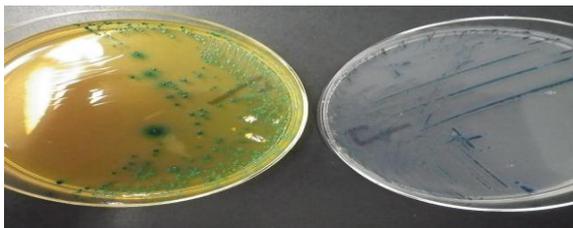
CT-Vi RX 026 寒天培地      クロモアガー-STEPC 培地

写真 13 6 *E. aerogenes*



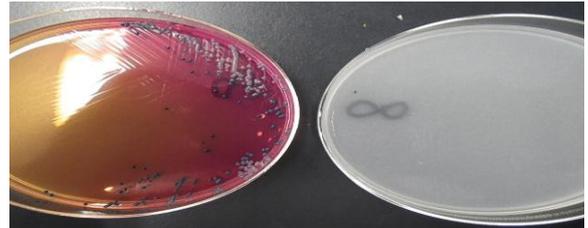
CT-Vi RX 026 寒天培地      クロモアガー-STEPC 培地

写真 14 7 *C. freundii*



CT-Vi RX 026 寒天培地      クロモアガー-STEPC 培地

写真 15 8 *E. cloacae*



CT-Vi RX 026 寒天培地      クロモアガー-STEPC 培地

## VI まとめ

- 1 今回の検討結果より、食材中に腸管出血性大腸菌以外の多数の菌の存在が考えられる場合において、共存する細菌との組み合わせによりノボビオシンの有無による発育に違いが見られた。ノボビオシンに対する耐性の程度（MIC）は、菌種が違う場合はもとより、同一菌種内でも菌株が違う場合には異なる。食材中に存在する腸管出血性大腸菌や共存する細菌のノボビオシンの耐性の程度があらかじめわかっていないため、ノボビオシン加mEC培地とノボビオシン不含mEC培地を比較してどちらが有効であるかは、いちがいには言えない。よって、作業効率等を考え全ての食材において原則的にノボビオシン不含のmEC培地を使用することとしたい。
- 2 今回の検討結果から、クロモアガーSTEC培地を使用することにより、釣菌の作業を軽減することができると思われた。また、クロモアガーSTEC培地は直接法でも使用することになっており、免疫磁気ビーズ法の0111、0157の検査でも使用するため共通の培地を用いることにより、作製する培地の種類が減りまた無駄なく使うことができる。よって、026用酵素基質培地をCT-Vi RX 026寒天培地から、クロモアガーSTEC培地に変更する。

## クラミジア遺伝子検査法について

沼田 和也

### I はじめに

クラミジアによって引き起こされる疾患は、内科、小児科、泌尿器科等各科で広く知られ、多彩な臨床症状を呈する。その中でもオウム病 (*C. psittaci*) は4類感染症、性器クラミジア感染症 (*C. trachomatis*) とクラミジア肺炎 (*C. pneumoniae*) は5類感染症 (定点把握) に指定されている。

分類についてはクラミジア研究者である Everett らにより、1999年に *Chlamydiaceae* 科として *Chlamydia* と *Chlamydophila* の二つの属に分けられ、*C. trachomatis* は *Chlamydia* 属、*C. psittaci* と *C. pneumoniae* は *Chlamydophila* 属に含むという提案があったが、いまだ定着していない。現在、当センターでは性器クラミジア感染症検査として血中 IgA、IgG 抗体検査を行っているが、病原体 (抗原) 検査としてのクラミジア検査は行っていない。今回、オウム病クラミジア検査実施の要望があり、様々な病原体 (抗原) 検査の1検出法であるクラミジア遺伝子検査法を検討したので報告する。

### II 使用する試薬、器材、機器

- 1 試薬 : QIAamp DNA Mini Kit、滅菌済 PBS、エタノール (99.5%)、10×PCR Gold Buffer (Taq に添付)、dNTP Mix (2mM each dNTP) (Taq に添付)、25mM MgCl<sub>2</sub> Solution (Taq に添付)、プライマー CM1 (40pmol/μl)、プライマー CM2 (40pmol/μl)、AmpliTaq Gold (5U/μl)、DW (PCR 用)、*A*luI (専用 buffer 付)、*Pvu*II (専用 buffer 付)、10×Loading Buffer (制限酵素に添付)、DNA Ladder、50×TAE、アガロース ME、EtBr、シーケンサー試薬等
- 2 器材 : 咽頭スワブ、1.5ml、2ml 遠心チューブ、マイクロピペット等 PCR 用器材
- 3 機器 : サーマルサイクラー (BIO-RAD)、遠心機、小型遠心機、クールスタット、クリーンベンチ等 PCR 用機器、シーケンサー

### III 検査材料

平成 21 年 12 月 24 日、国立感染症研究所ウイルス第一部第五室 (リッケチア・クラミジア室) より陽性コントロールとして分与されたもの (国立感染症研究所で細胞培養を行った *C. psittaci* ( $5 \times 10^8$ PFU/μl)、*C. trachomatis* ( $5 \times 10^8$ PFU/μl)、*C. pneumoniae* ( $1.79 \times 10^8$ PFU/μl) をホルマリンで不活化したものをそれぞれ 50 μl) を使用した。

咽頭スワブに *C. psittaci*、*C. pneumoniae*、尿に *C. trachomatis* を添加したものを検査材料とした。

陽性コントロールとして分与されたものは普段、冷蔵保存で保管し、陽性コントロールとして使用する時は抽出した DNA を 10 倍希釈したものを小分けして $-70^{\circ}\text{C}$ 以下に保存し、必要な本数だけ溶解し使用する。小分けした陽性コントロールは使い切りにする。また、取扱いは BSL1 検査室で行う。

#### IV 検査方法

##### 1 DNA 抽出 (QIAamp DNA Mini Kit を使用)

###### 1) *C. psittaci*, *C. pneumoniae*

咽頭スワブの入った 15ml 遠心チューブに滅菌済 PBS を 2ml 入れ、ボルテックス (15 秒) をしてから低速遠心 (1500rpm、5 分) し、その上清 400  $\mu\text{l}$  を 2ml 遠心チューブ (①) に移す。

(検体採取は咽頭を拭ったスワブを空の 15ml 遠心チューブに入れて、冷蔵で搬送されたものを PCR 検査に供する。咽頭を拭った 2 本のスワブに *C. psittaci* ( $5 \times 10^8$ PFU/ $\mu\text{l}$ )、*C. pneumoniae* ( $1.79 \times 10^8$ PFU/ $\mu\text{l}$ ) をそれぞれ 10  $\mu\text{l}$  添加したものを使用した。)

↓

(①) に ProteinaseK を 20  $\mu\text{l}$ 、BufferAL を 400  $\mu\text{l}$  添加し、ボルテックス (15 秒) をしてスピンドウン。(②)

↓

(②) をクールスタットで  $56^{\circ}\text{C}$ 10 分間インキュベートして、スピンドウン。(③)

↓

(③) にエタノール (99.5%) を 400  $\mu\text{l}$  添加し、ボルテックス (15 秒) をしてスピンドウン。(④)

↓

(④) の混合液 610  $\mu\text{l}$  をスピнкаラムチューブにアプライして遠心 (8000rpm、1 分) し、ろ液の入ったコレクションチューブは捨て新しいコレクションチューブをセットする。

↓

再度、上記の操作を繰り返す

↓

スピнкаラムチューブに Buffer AW1 を 500  $\mu\text{l}$  添加して遠心 (8000rpm、1 分) し、ろ液の入ったコレクションチューブは捨て新しいコレクションチューブをセットする。

↓

スピнкаラムチューブに Buffer AW2 を 500  $\mu\text{l}$  添加して遠心 (14000rpm、3 分) し、ろ液の入ったコレクションチューブは捨て新しいコレクションチューブをセットする。

↓

スピнкаラムチューブを再度、遠心 (14000rpm、1 分) する。

↓

コレクションチューブを捨て、新しい 1.5ml 遠心チューブをセットする。スピнкаラムチュ

ーブに Buffer AE を 150  $\mu$ l 添加し室温で 1 分間インキュベート後、遠心 (8000rpm、1 分) し DNA を溶出する。

2) *C. trachomatis*

尿の入った 15ml 遠心チューブをボルテックス (15 秒) してから低速遠心 (1500rpm、5 分) し、その上清 400  $\mu$ l を 2ml 遠心チューブ (①) に移す。子宮頸管スワブの場合は 1) と同じ操作を行う。

(女性では子宮頸管スワブ、男性では朝の初尿を検体とし、冷蔵で搬送されたものを PCR 検査に供する。今回は尿 2ml に *C. trachomatis* ( $5 \times 10^8$ PFU/ $\mu$ l) を 10  $\mu$ l 添加したものを使用した。)

以下、1) と同じ操作を行う。

2 PCR 反応 (クラミジア感染症検査マニュアル (平成 15 年) に準ずるが、下線部分は変更した。)

プライマー : CM1 CAGGACATCTTGCTGGCTT

CM2 CAAGGATCGCAAGGATCTCC

目的の PCR 産物は 261bp

PCR 反応液 (50  $\mu$ l/sample) :

10 $\times$ PCR Gold Buffer	5 $\mu$ l
dNTP Mix (2mM each dNTP)	5 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub> Solution	3 $\mu$ l
プライマー CM1 (40pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
プライマー CM2 (40pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
AmpliTaq Gold (5U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
DW (PCR 用)	30.75 $\mu$ l
Sample	5 $\mu$ l

サーマルサイクラー (BIO-RAD) Protocol name 「cm1 cm2」

95°C 10min

↓

95°C 20sec

55°C 20sec

72°C 30sec

) 40cycles

↓

72°C 10min

↓

4°C  $\infty$

### 3 制限酵素反応

PCR 産物と制限酵素を反応させる。(制限酵素 *Alu*I と *Pvu*II)

制限酵素反応液 (20  $\mu$ l/sample) :

制限酵素専用 buffer	2 $\mu$ l
制限酵素	1 $\mu$ l
DW (PCR 用)	7 $\mu$ l
PCR 産物	10 $\mu$ l

サーマルサイクラー (BIO-RAD) Protocol name 「Alu1 Pvu2」

37°C Over night

↓

4°C  $\infty$

CM1/2 にて増幅されたクラミジア 3 種の制限酵素切断サイズ

<i>Chlamydia</i> spp.	bp	<i>Alu</i> I (bp)	<i>Pvu</i> II (bp)
<i>C. trachomatis</i> L2	245	90, 89, 66	245
<i>C. psittaci</i> 6BC	259	190, 69	189, 70
<i>C. pneumoniae</i> TW-183	258	199, 59	258

### 4 電気泳動、染色 (判定)

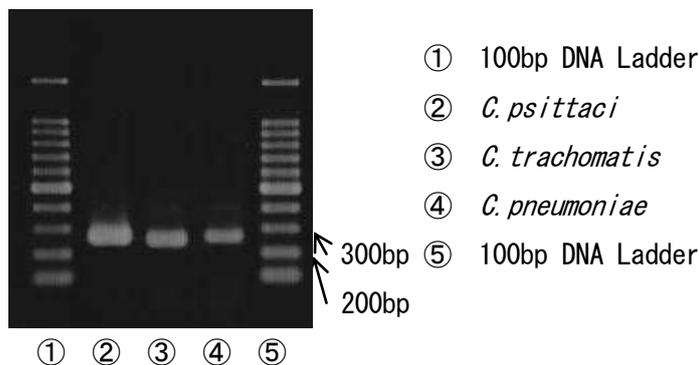
1.5% アガロース (アガロース ME) を作成し、10  $\times$  Loading Buffer 1  $\mu$ l、DNA Ladder 5  $\mu$ l、PCR 産物 10  $\mu$ l をアプライし、100mV で約 30 分電気泳動する。EtBr (15  $\mu$ l/300ml) で染色し、PCR 反応について 261bp のバンドが確認できればクラミジア遺伝子陽性と判定する。クラミジア遺伝子陽性の場合には PCR 産物を制限酵素で切断し、その切断パターンで種の特定制を行う。

### 5 シーケンス (参考)

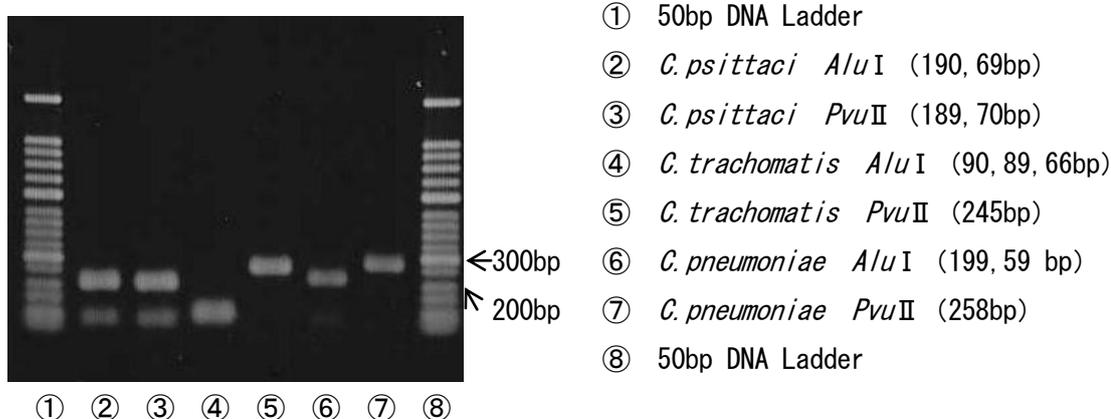
CM1/2 にて増幅されたクラミジア 3 種の DNA 遺伝子をダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、DDBJ の BLAST 検索により既知のクラミジア株の塩基配列と比較する。

## V 結果

### 1 PCR 反応 (クラミジア遺伝子 261bp)



### 2 制限酵素反応



### 3 シークエンス (DDBJ の BLAST 検索結果)

#### 1) *C. psittaci*

>X56980|X56980.1 Chlamydia psittaci 6BC gene for major outer membrane protein (MOMP).  
Length = 1660、Score = 440 bits (222)、Expect = e-120  
Identities = 222/222 (100%)、Strand = Plus / Plus

#### 2) *C. trachomatis*

>X62919|X62919.1 C. trachomatis (D/B-185) omp1 gene for major outer membrane protein.  
Length = 1324、Score = 414 bits (209)、Expect = e-113  
Identities = 209/209 (100%)、Strand = Plus / Plus

#### 3) *C. pneumoniae*

>AE009440|AE009440.1 Chlamydophila pneumoniae TW-183, complete genome.  
Length = 1225935、Score = 420 bits (212)、Expect = e-114  
Identities = 212/212 (100%)、Strand = Plus / Plus

## VI 考察及びまとめ

今回、*C. psittaci*、*C. trachomatis*及び*C. pneumoniae*のクラミジア遺伝子検査法について検討した。PCR 反応では3種のクラミジアすべて、目的の位置にバンドを確認でき、それらのPCR産物を使用して制限酵素反応を行った結果、3種のクラミジアすべて、目的の位置にバンドを確認した。制限酵素反応では*AluI*と*PvuII*を使用しているが、クラミジア感染症検査マニュアル(平成15年)に反応時間の記載がないため、2時間で試みたがPCR産物は切断できなかった。そのため反応時間を長くしOver nightで試したところ、PCR産物を切断でき、目的の位置にバンドを確認した。

現在、国立感染症研究所では制限酵素反応で種の特特定を行わず、1stPCR産物の塩基配列をシーケンス解析し、種の特特定を行っているため、今回は参考としてシーケンス解析も行った。DDBJのBLAST検索を行った結果、3種のクラミジア遺伝子はすべて既知のもの一致した。(100%)オウム病クラミジア(*C. psittaci*)は人獣共通感染症で、主に感染鳥(インコ等)の排泄物中の*C. psittaci*を吸入するか、口移しの給餌等により感染する。感染例の多くは家庭の愛玩鳥からの事例であるが、飼育施設での集団感染が疑われる場合は感染者(ヒト)の咽頭スワブだけでなく、感染鳥の総排泄口スワブからもクラミジア遺伝子検査を実施したい。

性器クラミジア感染症(*C. trachomatis*)は近年、世界的にも最も頻度の高い性感染症として知られ、日本でもそのまん延が社会的な問題となっている。当センターでは性器クラミジア感染症検査として血中IgA、IgG抗体検査を行っているが、病原体(抗原)検査としてクラミジア遺伝子検査を行う場合は、女性では子宮頸管スワブを使用するため、検体採取の煩わしさがある。また、検査材料に血液が混入すると偽陰性を生じるため注意が必要である。

肺炎クラミジア(*C. pneumoniae*)はヒトを宿主として飛沫感染し、急性上気道炎、急性気管支炎、肺炎等の症状を引き起す。検査についてはELISA法による血中抗体検査は特異性が高く、保険適応の検査であるため、医療機関では一般的に普及している。また、感染症法に基づく届出に必要な検査となっているため、肺炎クラミジアについては遺伝子検査の必要性は特に高くないと思われる。

現在、随時病原体検出マニュアルの改訂が進んでいる。これを機にシーケンス解析による種の同定検査方法が掲載されることが望まれる。今後とも、クラミジアの発生状況等を注視しつつ、市民、医療機関等から要望があれば、新検査法の導入について柔軟に対応し、感染症対策に有益な検査情報を提供できるよう努めたい。

## VII 参考文献

国立感染症研究所：クラミジア感染症検査マニュアル(平成15年)

## 横須賀市における HIV 等の検査状況について

横須賀市健康安全科学センター  
環境政策部環境管理課

○沼田和也 竹内恵美  
宍戸みずほ

### I はじめに

後天性免疫不全症候群(HIV)、性器クラミジア感染症(*Chlamydia trachomatis*)、梅毒(*Treponema pallidum*)については、感染症法及び感染症法施行規則に定めのある特定感染症予防指針である「後天性免疫不全症候群に関する特定感染症予防指針」及び「性感染症に関する特定感染症予防指針」の中で、発生の予防及びまん延の防止のための取り組みとして、検査・相談体制の充実や検査の推奨と検査機会の提供等が示されている。

本市ではエイズ感染を防止するため、昭和61年4月からエイズ相談(対策)事業を開始し、昭和62年2月からHIV検査を実施した。また、現在は感染症対策事業としてクラミジア抗体検査、梅毒検査を併せて実施している。

今回、本市におけるHIV等の検査状況について報告する。

### II 検査材料と方法

エイズ相談においてHIV等の検査を希望した受検者等の血清を検査材料とした。検査方法について、HIV検査は1次(スクリーニング)検査としてイムノクロマト法、2次(追加、確認)検査としてPA法、ウエスタンブロット法、イムノブロット法、クラミジア抗体検査はELISA法、梅毒検査はRPR法、TP法を実施した。

### III 結果及びまとめ

HIV検査について、昭和63年度から平成23年度までの検査数は7,405件であり、平成19~23年度(5年間)の平均検査数は352件であった。また、平成14年度に当センターで初めてHIV抗体陽性例があり、それ以降、平成23年度までの陽性数は5件(すべてHIV-1型)であった。

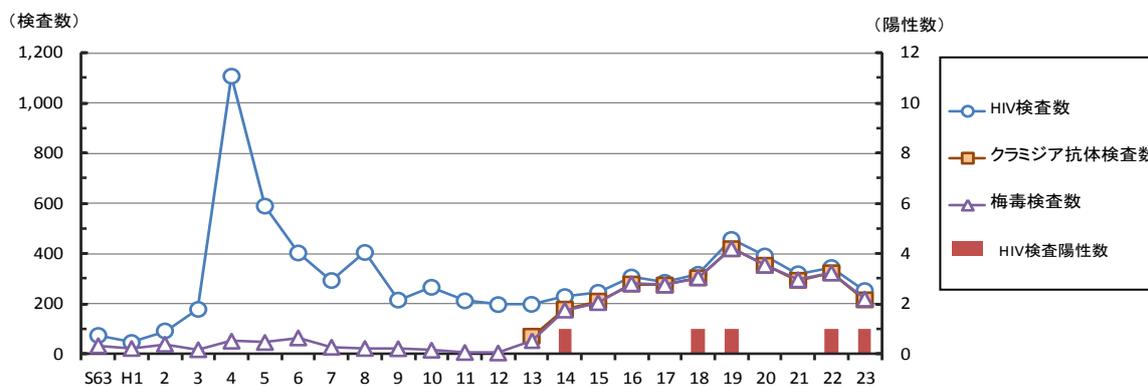


図 年度別のHIV等検査数(昭和63年度~平成23年度)

平成 23 年度の HIV 検査数は 252 件（針刺し事故に係る 2 件を含む）で、年齢別では 25～29 才の年齢層が最も多く 48 件（19.2%、針刺し事故に係る 2 件を除く）であった。また、男女別では 15～24 才の年齢層で女性が多かったが、25 才以上では男性が多く、全体では男性が 56.4%を占めた。クラミジア抗体検査の検査数は 215 件で、IgA 抗体陽性数は 23 件、IgG 抗体陽性数は 30 件であった。梅毒検査の検査数は 218 件（針刺し事故に係る 2 件を含む）で、RPR、TP 抗体陽性数は共に 3 件であった（図）。

「性感染症に関する特定感染症予防指針」は性器クラミジア感染症、梅毒だけでなく淋菌感染症、性器ヘルペス感染症、尖形コンジローマも対象疾患としている。また、平成 23 年度からは、HTLV-1 検査が特定感染症検査等事業における国庫補助の対象項目に追加された。今後、当センターにおいても、これらの感染症の発生の予防及びまん延の防止のため、検査項目の実施拡充を検討していかなければならない。

## 横須賀市におけるインフルエンザウイルス検出状況（平成24年度）

竹内 恵美

### I はじめに

平成24年度の横須賀市内におけるインフルエンザウイルスの流行は12月中旬から始まり3月下旬まで続いた。流行注意報が発令されたのは平成25年1月中旬であった。流行注意報が発令される前週には、防疫対策事業として、学級閉鎖の学生に含嗽水の提供を協力してもらい、インフルエンザウイルスの分離を試みた。また、市内定点病院から提出される検体について遺伝子検査および、一部検体について細胞培養を実施した。

### II 検査材料

鼻腔ぬぐい液79件、咽頭ぬぐい液41件、含嗽水5件の合計125件である。

### III 方法

インフルエンザ診断マニュアル（第2版）に従い実施した。

### IV 結果と考察

月別の検出状況については表1.に示すとおりであり、AH1pdm09が4件（3.2%）、AH3亜型が98件（78.4%）、B型が15件（12.0%）、AH3およびB型が共に陽性が2件（1.6%）であった。

2月に検査を実施した1件と3月に検査を実施した1件はAH3亜型、B型共にインフルエンザウイルスの遺伝子検査が陽性であり2月に検査した1件は培養でもAH3亜型、B型のインフルエンザウイルスが分離された。

表1. インフルエンザウイルス検出状況

月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
検査数									6	51	42	26	125
AH1pdm09											4		4
AH3									6	42	34	16	98
B										5	1	9	15
AH3+B											1	1	2

2月にAH1pdm09の遺伝子が確認された4件について、薬剤耐性検査をAllele-specific RT-PCR法にて実施した。結果は4件中2件についてオセルタミビル耐性株の可能性が示され、国立感染症研究所にて精査の結果オセルタミビル及びペラミビルに交差耐性が確認された。

ウイルス分離については、PCR検査陽性検体からCaco-2細胞、MDCK細胞を用いて12月以降に検出された45検体について実施した。結果の内訳はAH3亜型26検体、B型（山形系統）6検体、B

型(ヴィクトリア系統)1検体、AH1pdm09が2検体、不検出11検体であった。

平成22年から当センターで検査を実施しているインフルエンザ防疫対策の実施において、1月に市内インフルエンザ集団発生の初発校の5名の生徒の含嗽水から分離培養検査を実施したところ、1名の検体からAH3亜型を検出した。

## ランタン-アリザリンコンプレキソン吸光光度法による ふっ素化合物試験における遊離塩素の生成について

大家寿彦

### I はじめに

排水基準に係るふっ素化合物の試験方法には、ランタン-アリザリンコンプレキソン吸光光度法、イオン電極法及びイオンクロマトグラフ法がある。当所では、市販のアルフッソソを用いたランタン-アリザリンコンプレキソン吸光光度法により、ふっ素化合物の試験を行っている。

このふっ素化合物試験において、以前から事業場排水等を対象とした場合に定量時の吸光度が著しく負の値になる現象が認められていた。西堀らの報告<sup>1</sup>では、その原因を水蒸気蒸留の際に生成する遊離塩素であるとしているが、遊離塩素が生成する原因については明らかになっていなかった。

もとより塩化物イオンが遊離塩素の生成因子であると推測されるが、当所でふっ素化合物試験を実施している検体には、塩化物イオンが多量に含まれているにもかかわらず、遊離塩素が生成されないものもあった。そこで、生成因子が2つ以上あると仮定して、当所でふっ素化合物試験を実施している検体に関する測定データのうち、1つ目の生成因子である塩化物イオン、生成物質である遊離塩素（ふっ素化合物試験の際に測定している）に、2つ目の生成因子となり得るものとして陰イオン、陽イオン、金属イオン等のうちの1成分を加えた3成分の有無や多少についての関連性を確認したところ、硝酸イオンが遊離塩素の2つ目の生成因子として最も有力と考えられた。

今回、塩化物イオン及び硝酸イオンを遊離塩素の生成因子と仮定し、模擬試料により検討を行った結果を報告する。また、生成した遊離塩素による影響を回避する方法について、西堀らの報告<sup>1</sup>を参考に、アスコルビン酸添加により遊離塩素を除去する方法を、当所で扱っている検体に適用した結果についても併せて報告する。

### II 試薬

使用した試薬は JIS K 0102 に従った。その他の試薬については以下のとおりである。

#### 1 蒸留水

蒸留、イオン交換及び活性炭処理をしたもの

#### 2 塩化物イオン溶液(2,000mg/L)

塩化ナトリウムを600°Cで1時間加熱し、デシケーター中で放冷したもの3.297gをとり、蒸留水に溶かし1,000mlとしたもの

#### 3 硝酸イオン溶液(窒素として20mg/L)

硝酸カリウムを 105℃で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷したもの 0.144g をとり、蒸留水に溶かし 1,000ml としたもの

4 アスコルビン酸溶液 (5g/L)

L(+)-アスコルビン酸 5.0g を蒸留水に溶かし、1,000ml としたもの

5 ラピッド DPD 試薬 (関東化学株式会社)

### III 方法

試験の操作は JIS K 0102 に従った。概要のフローを図 1 に示す。

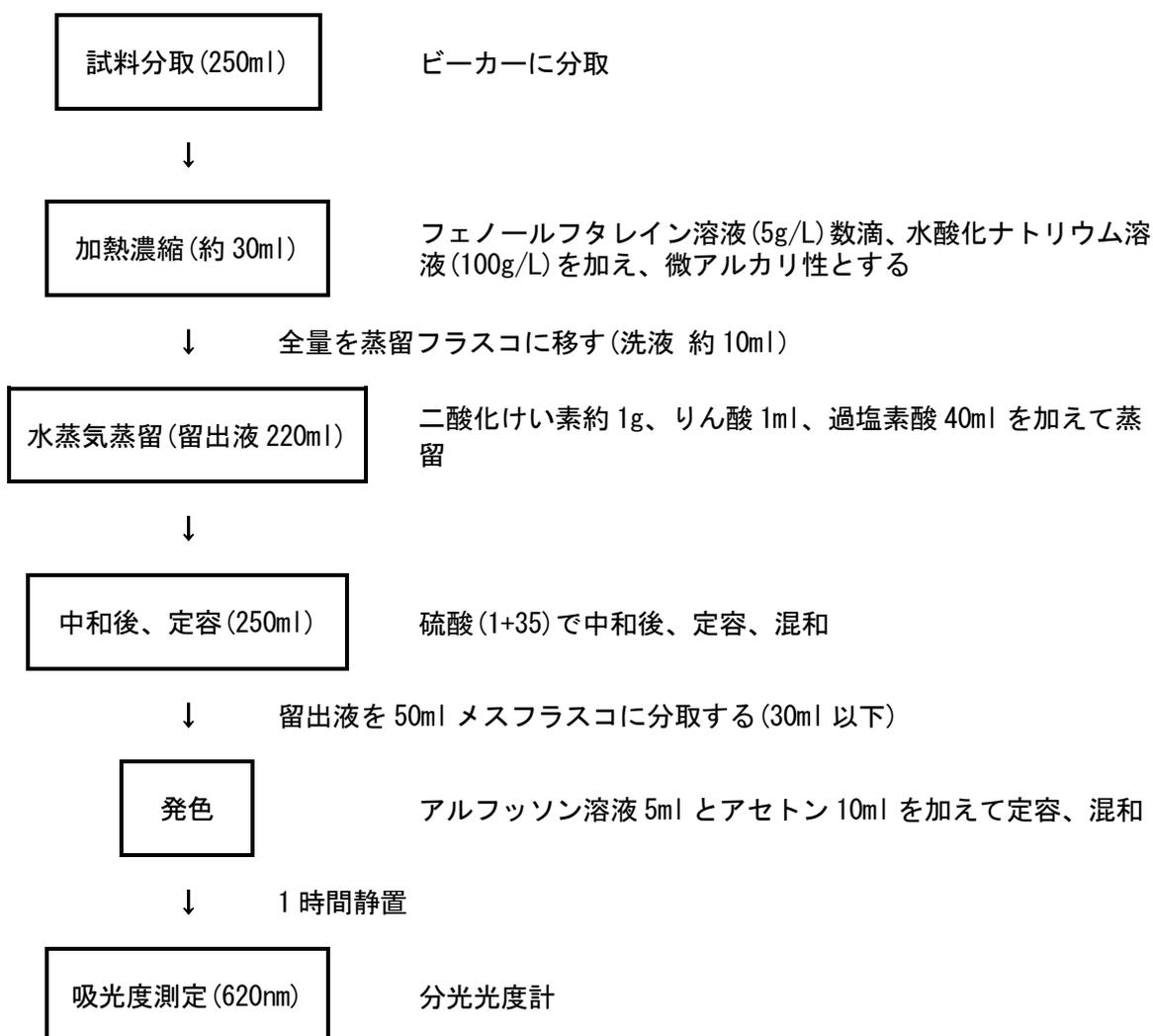


図 1 試験の操作フロー

#### 1 遊離塩素の生成因子の特定

試料として、蒸留水、蒸留水に塩化物イオンを加えたもの、蒸留水に硝酸イオンを加えたもの、蒸留水に塩化物イオン及び硝酸イオンの両方を加えたものの 4 種類を用いて図 1 の試験を行った。その際、留出液を中和後定容したものについて、DPD 法により遊離塩素濃度を測定し

た。DPD 法は、留出液を適当に蒸留水で希釈したもの 10ml に対し、ラピッド DPD 試薬を約 100mg 加え、比色列 (0.05~2.0mg/L) を用いて測定した。また西堀らの報告<sup>1</sup>を参考に、遊離塩素が生成したものは、発色操作の際にアスコルビン酸を必要量加えて除去したものについても吸光度を測定した。なお、アスコルビン酸と遊離塩素は等モル反応であるため、遊離塩素 1mg に対しアスコルビン酸の必要量は約 2.5mg となる。

## 2 アスコルビン酸処理による添加回収試験

試料として、遊離塩素を生成する実検体及び蒸留水、並びにそれぞれにふっ化物イオン標準液 (F:150  $\mu$ g 相当量) を添加したものについて試験を行い、その定量値の差から回収率を求めた。遊離塩素濃度の測定は、前記 1 と同様に DPD 法により行った。遊離塩素の除去についても前記 1 と同様であるが、ここではアスコルビン酸を過剰量 (必要量の 1.5~2 倍量程度) 加えた。

## IV 結果及び考察

### 1 遊離塩素の生成因子の特定

添加した塩化物イオン及び硝酸イオンの量並びに留出液の遊離塩素濃度、吸光度法による吸光度及びアスコルビン酸処理により遊離塩素を除去したものの吸光度、以上の結果を表 1 に示した。

表 1 塩化物イオンと硝酸イオンの存在下の測定結果

試料 (250ml)		蒸留水	蒸留水+Cl <sup>-</sup>	蒸留水+NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	蒸留水 +Cl <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
添加	塩化物イオン (mg)	—	60	—	60
	硝酸イオン (mg) ※1	—	—	0.6	0.6
測定値	遊離塩素 (mg/l)	不検出	不検出	不検出	160
	吸光度 (-)	0.000	0.000	-0.005	-0.143
	吸光度 (-) ※2	—	—	—	-0.016

※1 窒素としての量、※2 アスコルビン酸を添加したもの

遊離塩素は、塩化物イオン及び硝酸イオンの両方が存在する場合にのみ生成し、いずれか一方のみ存在する場合は生成しなかった。また、遊離塩素の存在は、発色後の吸光度に著しく大きな負の影響を与えるが、アスコルビン酸処理で遊離塩素を除去したものについては、その影響が低減されていることが認められた。アスコルビン酸処理でもわずかに負の影響が残っているが、これはアスコルビン酸の添加量を測定した遊離塩素濃度から導き出したため、実際にはわずかにアスコルビン酸が不足したことが理由だと推測される。以上のことから、塩化物イオン及び硝酸イオンの共存が、遊離塩素生成の因子の 1 つであると考えられる。この結果については、武田らの報告<sup>2</sup>にも同様の結論が出されている。

## 2 アスコルビン酸処理による添加回収試験

当所で試験を行っている検体のうち、遊離塩素を生成することが確認されている検体 A 及び検体 B について、アスコルビン酸処理による添加回収試験を行った。添加したふっ化物イオンの量及び留出液の遊離塩素濃度、定量値及び回収率並びにアスコルビン酸処理により遊離塩素を除去したものの定量値及び回収率、以上の結果を表 2 に示した。

表 2 添加回収試験の結果

試料 (250ml)		検体 A		検体 B		蒸留水	
ふっ化物イオン添加量 ( $\mu\text{g}$ )		—	150	—	150	—	150
遊離塩素 (mg/L)		120	100	130	120	不検出	不検出
定量値 ( $\mu\text{g}$ )		-95.8	-101.6	-124.9	-135.9	5.9	145.4
回収率 (%)		-3.9		-7.3		93.0	
アスコルビン酸 15mg 添加	定量値 ( $\mu\text{g}$ )	47.2	194.3	35.0	177.4	7.7	149.5
	回収率 (%)	98.1		94.9		94.5	

検体 A、検体 B とともに 100mg/L を超える遊離塩素が生成し、アスコルビン酸処理を行わない場合は定量値が負の値となっている。アスコルビン酸の添加により回収率が良好になったことから、実検体においてもアスコルビン酸処理による遊離塩素除去は、有効であると考えられる。

## 3 濃縮量の調整による遊離塩素生成の抑制

検討を進める中で、加熱濃縮後の濃縮量（濃縮量と洗液の量の合計）の違いによって生成する遊離塩素濃度に差があり、濃縮量が少ないほど遊離塩素濃度は高くなる傾向がみられた。これは、蒸留フラスコに移した濃縮物の塩化物イオン及び硝酸イオンの濃度が高くなるため、生成する遊離塩素の量が増加することが理由だと思われる。JIS K 0102 では濃縮量として約 30ml、洗液として約 10ml と規定されているため、必要以上にこの量（約 40ml）を少なくしないことが、遊離塩素の生成を抑制する 1 つの方法になると考えられる。

## V まとめ

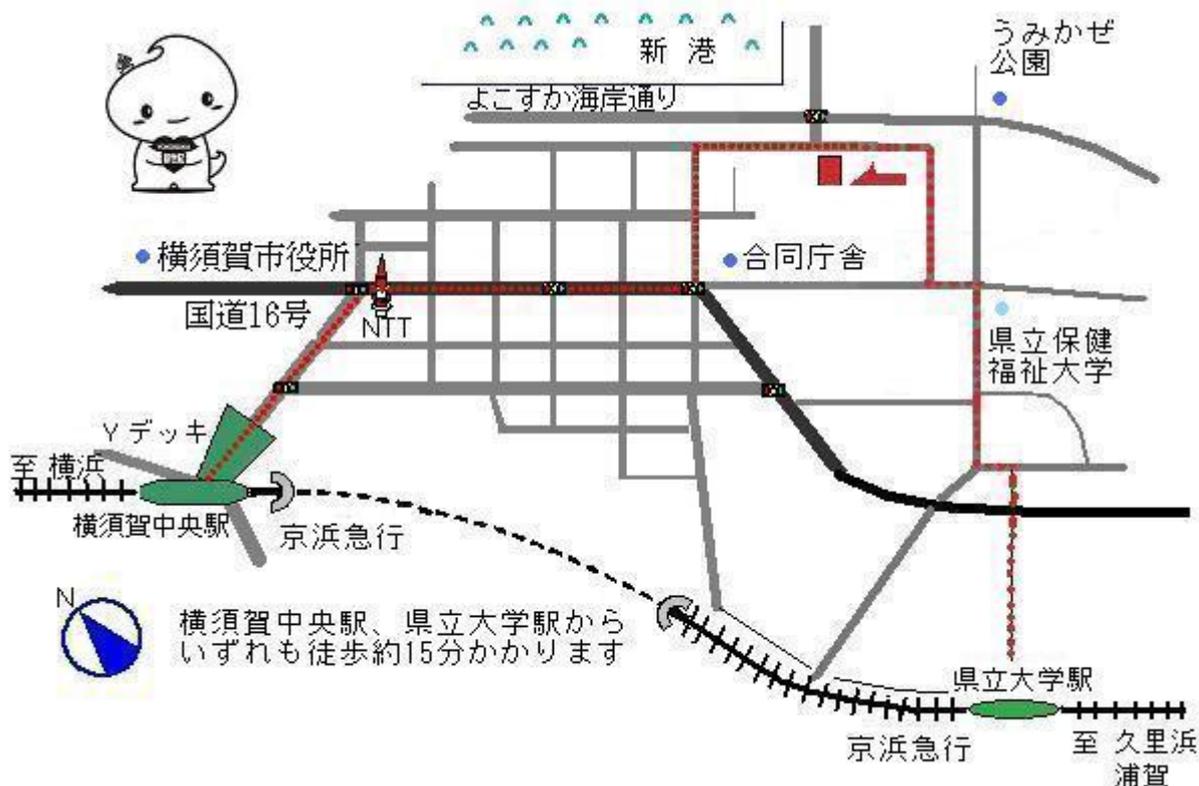
- 1 遊離塩素の生成因子の 1 つとして、塩化物イオン及び硝酸イオンの共存が特定された。
- 2 遊離塩素を生成する検体において、アスコルビン酸処理を用いることで良好な回収率が得られた。

## VI 参考文献

- 1 西堀一茂、大岩敏男：フッ素分析におけるアルフッソン退色現象とその対策について、山形県環境科学研究センター一年報 第 14 号、65-66 (2006)
- 2 武田圭右、西堀一茂、草苺裕樹、佐藤勉：フッ素分析におけるアルフッソン退色現象とその対策について（第二報）、山形県環境科学研究センター一年報 第 19 号、57-58 (2011)



# 健康安全科学センター案内図



横須賀市健康安全科学センター年報 第15号 2012

編集・発行・印刷

横須賀市健康安全科学センター

〒238-0006

神奈川県横須賀市日の出町2丁目14番地

TEL 046(822)4057

FAX 046(822)5540