

# 9

# 調査研究

---

## (1) 報 文

---

- 1) LC/MS/MSによる動物用医薬品の簡易一斉分析法検討 ..... 39
- 2) 大分県における浴用水中のレジオネラ属菌の検出状況（2010～2012年度） ..... 46

## LC/MS/MSによる動物用医薬品の簡易一斉分析法検討

林 由美、橋口 祥子、衛藤 加奈子、森崎 澄江、岡本 盛義、長谷川 昭生

### Study on rapid simultaneous analysis of Veterinary drugs by LC/MS/MS

Yumi Hayashi, Syoko Hashiguchi, Kanako Eto, Sumie Morisaki, Moriyoshi Okamoto and Akio Hasegawa

Key word : 動物用医薬品 Veterinary drugs, 一斉分析 simultaneous analysis,  
LC/MS/MS (高速液体クロマトグラフ / タンデム四重極型質量分析法)

#### 要 旨

当センターで測定している動物用医薬品の成分について、簡易に一斉分析する方法をLC/MS/MSにより検討した。

抽出には、QuEChERS法で用いられるバッチ精製<sup>1)</sup>を応用し、至適な抽出条件を検討することで、試験工程の短縮を試みた。

牛肉、豚肉、鶏肉、およびエビで添加回収試験(添加濃度:0.02 $\mu\text{g}/\text{g}$ )を実施したところ、114成分中、測定可能であったものは約80成分と良好な結果を得た。よって、本分析法は広範囲の物性を持つ残留動物用医薬品を迅速かつ簡易にスクリーニングする方法として有用であると考えられた。

#### は じ め に

近年、畜水産物に対する病気の予防や治療の目的で様々な動物用医薬品が使用されているが、人体への影響が危惧されていることから、食品中での基準が定められている。当センターでは、厚生労働省通知の畜水産物を対象とした動物用医薬品一斉試験法<sup>2)</sup>のうち、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法I(畜水産物)」(以下、公定法I)を用いて収去検査等を実施している。しかし、使用頻度の高いテトラサイクリン系抗生物質(以下、TC系)や $\beta$ -ラクタム系抗生物質の一部は公定法Iの測定対象項目に入っておらず、それらには個別試験法が示されているが多大な時間を要するものがほとんどである。また、公定法Iは90物質が分析対象になっているが、これら全ての化合物の一斉分析を保障したのではなく、公定法Iに示される方法では、測定不能なものが多い。

そこで、公定法Iでは分析対象とされていないが使用頻度の高い薬剤や、公定法Iに分析対象として挙げられているが測定できていない項目を含めて、LC/MS/MSによる迅速一斉スクリーニング法を検討した。

#### 材料および方法

##### 1 試料および試薬

試料は、牛、豚、鶏、エビ、ブリの5種類を用いた。標準品、標準原液は、食品分析用、残留物質試験用または生化学用の純度表記のあるものを用いた。標準原液は、それぞれの溶解性に応じた溶媒を用いて100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製した。混合標準原液の調製は、アセトニトリルを使用し1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を調整後、検量線用標準溶液にはアセトニトリルと超純水(2:8)の混液を用いて希釈した。作成した混合標準溶液には114成分を含む。(Table1, 2参照)

抽出溶媒は、アセトニトリル、メタノール及び0.25%ギ酸(5:3:1, v/v)混液を用時調製して用いた。

また、有機溶媒は残農用、ギ酸はLC/MS用、その他の試薬については特級品を用いた。

##### 2 方法

###### 2.1 装置と測定条件

測定機器はAgilent Technologies社製1200 series及び6460のタンデム型質量分析計付高速液体クロマトグラフ(LC-MS/MS)を用いた。

測定条件において、カラムはL-column HB (2.1mm

i.d. × 150mm, 5 $\mu$ m, 化学物質評価研究機構製) を用い、カラム温度は40°Cで測定した。移動相の溶離液はA液に0.05%ギ酸、B液にアセトニトリルを用い、流速は0.2mL/min、試料注入量は10  $\mu$  L、イオン化法はESI+、ESI-、キャピラリー-電圧はそれぞれ4000V (+)、3500V (-) とした。

超純水はMilli-RX 45により製造したものを使用した。

また、精製に使用したSep-Pac Plus PS2 カートリッジはWaters社製、フィルター DISMIC-13HPはMillipore社製を使用した。

## 2.2 検量線の作成

検量線用標準溶液は、最終濃度0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.03 $\mu$ g/mLとなるよう調製した。HPLC注入プログラムにより、対象動物用医薬品を含有していないことを確認済みの試料を、各濃度の標準溶液に等量混合する方法で、マトリックス検量

線を作成した。

## 2.3 試料溶液の調製

NAKAJIMAら<sup>3)</sup>の方法を参考に、フードプロセッサーにより細切、均一化した試料5.0gを50mL遠沈管に量り、抽出溶媒20mLを添加し、2分間ホモジナイズした後、硫酸マグネシウム4.0g、クエン酸二ナトリウムセスキ水和物0.5g、クエン酸三ナトリウム二水和物1.0g、塩化ナトリウム1.0gを加え、1分間激しく振とうし、3000rpm、5分で遠心分離した。上清を分取し、超純水で20mLに定容希釈した後、0.2 $\mu$ mフィルター (PTFE) によりろ過を行い、試験溶液とした。(Fig.1参照)

また、定量用の試験法として上記の試験法に加え、定容後に固相カートリッジを使用し、濃縮後2.5mLのアセトニトリル：超純水 (2：8) に溶解したものを試験溶液とした。(Fig.2参照)

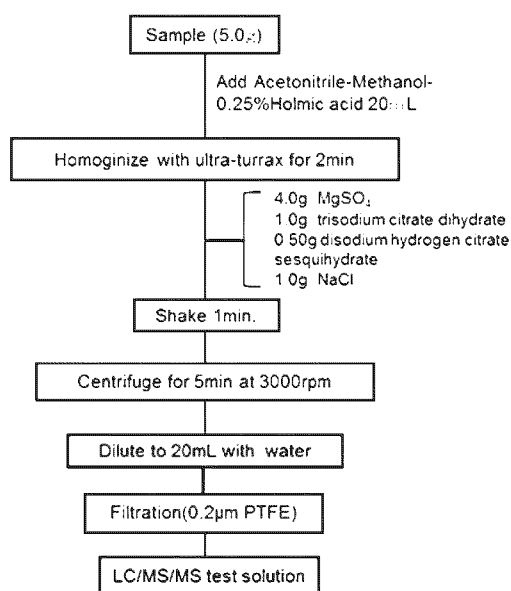


Fig.1 extraction procedure schematical

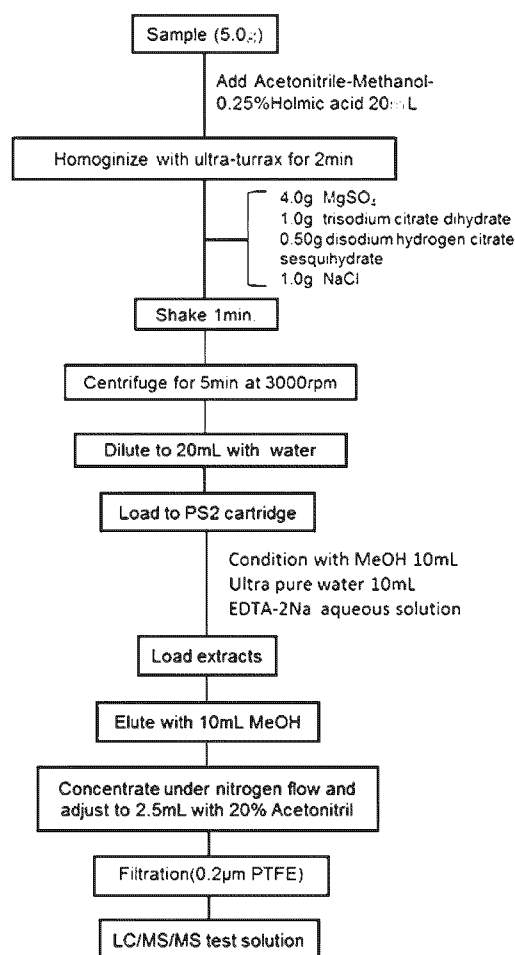


Fig.2 extraction procedure schematical

## 結果と考察

## 1 結果

## 1.1 抽出溶媒の検討

TC系薬剤やニューキノロン剤の回収率向上の目的で抽出溶媒に着目し、0.25%ギ酸含有アセトニトリルと水、メタノールを加えて抽出を行った。3種それぞれの溶媒の比を変えて抽出を試みたところ、3つの溶媒の比を5:3:1にすると回収率はTC系及び他の薬剤共に良好であった。以後、この抽出溶媒を用いることとした。

## 1.2 LC/MS/MS条件の検討

動物用医薬品114成分それぞれについてMS2スキャン測定により、プリカーサーイオンの決定およびフラグメンター電圧の検討を行った。移動相Aは水系溶媒としてギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウムを、移動相Bは有機溶媒としてアセトニトリル、メタノールを用いて検討し、流速は0.2mLのグラジエント分析とした。移動相に0.05～0.1%ギ酸とアセトニトリルを用いると多くの物質で最も強いイオン強度が得られたことから、以後は水系移動相に0.05%ギ酸水溶液を用いた場合のMS条件を使用することとした。

## 1.3 検量線及び定量下限値

マトリックス検量線は、0.001ppm～0.03ppmの範囲で、対象114成分について決定係数は0.990以上であった。また、定量下限値として一律基準である0.01ppm<sup>1)</sup>を目標値とし、各項目の標準溶液のクロマトグラムがS/N $\geq$ 10となる濃度を確認した。その結果、定量下限値は0.004～0.008ppmの範囲にあり、今回対象とした試料における分析は可能であった。

## 1.4 添加回収試験

対象成分を含有していないことを確認したそれぞれの試料に対し、試料中の最終濃度が0.02 $\mu$ g/gとなるように標準液を添加し、Fig.1に示した方法で添加回収試験を行った。その結果、測定可能であったのは、114成分中、牛肉77成分、豚肉85成分、鶏肉81成分、えび72成分であった。

## 1.5 固相カートリッジの使用

試験溶液の更なるクリーンアップを目指し、定容後の試験液（鶏肉）をSep Pac PS2カートリッジに通水し、メタノールで溶出した液を濃縮・乾固した後、20%アセトニトリルで溶解したところ、62成分に適応可能であった。(Fig2、Table1参照)

Table 1. Recoveries of veterinary drugs

(n=5)

Analyte	Bovine muscle		Swine muscle		Shrimp		Chicken muscle		
	Rec. (%)	Repeat-ability (%)	Rec. (%)	Repeat-ability (%)	Rec. (%)	Repeat-ability (%)	Rec. (%)	Repeat-ability (%)	Scheme of Fig2 Rec. (%)
2-Quinoxalinecarboxylicacid	125.0	26.9	74.0	12.0	122.0	58.2	78.0	25.1	0.0
5-Hydroxy-thiabendazole	62.0	6.0	52.8	5.7	58.5	7.6	51.2	5.2	65.8
Albendazole metabolite	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.3
Allothrin	34.8	76.0	65.2	7.1	67.0	15.1	4.0	223.6	0.0
Altrenogest	64.8	10.8	69.6	3.7	72.5	4.1	59.6	7.3	103.3
Ampicillin	60.0	23.2	71.2	7.6	86.3	4.1	66.8	10.1	30.0
Amprolium	75.6	10.3	61.2	34.2	84.5	5.9	71.6	3.6	31.7
Azaperone	76.0	6.2	73.6	2.3	74.0	5.4	66.8	3.4	45.0
Benzylpenicillin	68.8	4.4	49.2	12.4	64.5	11.1	52.0	10.5	63.3
Carbadox	64.8	8.9	62.0	5.6	74.5	7.1	58.4	8.2	50.8
Cefalexin	69.6	11.7	38.8	36.9	52.5	47.7	43.2	19.8	30.8
Cefalonium	56.0	10.4	46.8	7.2	50.0	32.2	48.0	5.9	5.8
Cefapirin	39.6	6.6	38.4	4.4	38.0	6.1	29.6	5.7	12.5
Cefazolin	54.0	13.1	50.8	9.1	51.0	22.8	41.2	43.1	0.0
Chlortetracycline	135.6	5.2	144.4	6.1	94.5	10.8	68.4	3.8	33.3
Ciprofloxacin	124.8	6.9	117.2	3.5	106.0	8.0	86.8	2.6	97.5
Clenbuterol	72.4	4.5	71.6	1.2	73.5	4.6	63.2	3.6	76.7
Clopidol	72.4	6.6	63.6	4.1	67.0	1.7	60.8	2.9	60.0
Cloxacillin	60.4	15.8	47.2	14.9	55.5	15.1	59.2	10.3	22.5
Cyromazine	68.8	19.6	70.0	15.6	82.0	8.7	72.4	26.7	0.0
Danofloxacin	142.4	3.0	145.6	2.6	139.0	2.5	119.6	3.2	130.8
Dexamethasone	71.2	6.5	71.2	11.2	71.0	9.6	57.2	8.8	133.3
Diaveridine	69.2	7.8	61.6	1.5	67.0	1.7	61.6	4.2	0.0
Dicloxacillin	48.8	14.4	48.0	5.1	63.0	3.2	48.8	20.0	0.0
Difloxacin	97.6	6.4	98.0	4.1	85.0	7.3	92.8	7.7	52.5
Difurazon	74.4	7.5	66.4	6.2	60.0	16.3	46.8	7.8	13.3
Emamectin B1a	85.6	7.3	77.6	2.8	85.5	2.9	75.6	3.9	0.0
Enoxacin	127.2	5.8	137.2	2.8	125.0	2.1	101.6	2.6	88.3
Enrofloxacin	98.4	4.4	96.8	3.1	102.5	2.5	96.0	3.3	82.5
Epoxiconazole	65.6	11.3	66.0	2.1	69.5	6.4	56.0	6.7	310.8
Erythromycin A	70.0	5.3	62.8	1.7	75.0	5.6	65.6	5.0	120.0
Ethopabate	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ethoxyquin	119.2	2.8	92.4	2.8	120.5	4.4	107.6	2.4	0.0
Famphur	62.4	19.3	61.2	6.8	58.5	7.0	58.4	9.5	100.0
Fenobucarb	70.8	9.3	66.8	6.2	65.5	13.3	61.6	4.8	171.7
Flubendazole	72.8	8.1	60.8	3.8	63.0	9.2	58.4	6.1	196.7

Analyte	Bovine muscle		Swine muscle		Shrimp		Chicken muscle		
	Rec. (%)	Repeat-ability (%)	Rec. (%)	Repeat-ability (%)	Rec. (%)	Repeat-ability (%)	Rec. (%)	Repeat-ability (%)	Scheme of Fig2 Rec. (%)
Flumequine	62.8	7.0	60.0	5.3	66.0	2.5	56.4	6.8	91.7
Furazolidone	70.0	14.7	79.6	3.7	77.0	10.9	66.0	2.1	108.3
Leuco malachite	53.2	8.7	57.2	5.3	48.0	27.4	24.0	45.3	0.0
Levamisole	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	82.5
Lincomycin	57.6	8.3	50.4	3.3	51.0	3.9	50.4	1.8	20.0
Malachite	52.8	5.1	50.4	3.3	50.5	5.0	50.0	2.8	108.3
Marbofloxacin	94.4	6.4	86.8	4.8	90.5	2.8	78.8	4.2	31.7
Melengestrol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Meloxicam	59.6	7.3	63.6	1.4	75.5	1.3	54.0	5.2	46.7
Metoclopramide	75.2	5.2	72.0	2.0	76.0	5.7	67.2	3.4	67.5
Metronidazole	60.8	15.9	63.2	16.2	49.5	34.0	65.6	11.9	78.3
Miloxacin	72.8	7.9	68.4	2.4	74.5	1.3	61.6	6.2	49.2
Monensin	56.4	19.0	71.2	1.5	69.5	14.0	55.6	10.0	0.0
Morantel	95.2	4.4	73.6	3.0	89.5	3.8	76.4	4.3	41.7
Nalidixic acid	60.0	7.8	60.4	2.8	68.0	2.4	49.2	6.8	145.0
Nafcillin	60.8	6.0	50.4	1.8	77.5	6.5	54.4	4.8	45.0
Neospiramycin	83.6	3.5	72.8	4.2	79.5	3.8	53.2	5.7	120.0
Norfloracin	134.0	6.4	137.2	4.3	122.5	3.1	100.0	2.8	108.3
Ofloxacin	100.4	5.5	109.2	3.6	104.0	6.1	102.0	3.9	70.8
Olaquinox	66.4	5.4	74.8	11.7	61.0	3.3	52.0	9.8	26.7
Oleandomycin	76.4	4.3	72.8	3.1	73.0	6.5	66.0	3.0	0.0
Orbifloxacin	72.4	6.3	64.1	4.6	69.0	1.7	58.4	5.6	3.3
Ormetoprim	72.0	9.4	70.4	1.3	73.5	2.6	62.8	6.2	79.2
Oxacillin	68.8	15.3	50.4	1.8	76.0	30.2	56.8	22.8	32.5
Oxolinic acid	62.8	7.3	58.8	6.6	64.0	5.1	56.4	6.3	91.7
Oxybendazole	70.4	4.7	72.0	2.8	70.0	9.3	61.2	5.0	139.2
Oxytetracycline	126.0	10.0	117.2	3.5	91.5	8.4	66.0	4.8	25.0
Piromidic Acid	63.2	7.9	58.8	3.0	65.0	4.0	51.6	5.1	101.7
Prednisolone	72.4	21.3	66.8	11.5	62.5	18.4	52.4	17.4	31.7
Pyrimethamine	70.4	4.7	69.6	2.4	71.0	5.9	61.6	3.6	99.2
Salinomycin	69.2	15.9	70.0	6.7	73.5	9.0	59.2	4.5	0.0
Sarafloxacin	86.0	7.4	84.4	3.1	77.5	5.7	74.0	2.7	75.8
Spiramycin I	76.8	4.7	82.4	2.0	73.5	15.5	81.2	4.8	62.5
Sulfabenzamide	67.2	9.3	60.0	5.3	60.0	10.9	45.6	12.2	79.2
Sulfacetamide	60.4	14.3	38.4	38.5	45.5	47.1	52.8	19.8	0.0
Sulfachlorpyridazine	65.2	8.3	57.2	7.3	67.5	15.7	49.6	3.4	70.0
Sulfadiazine	70.8	5.9	64.8	3.5	57.0	27.9	56.8	5.3	64.2
Sulfadimethoxine	71.6	8.2	63.6	1.4	68.5	6.5	53.2	7.8	84.2
Sulfadimidine	62.4	7.3	62.8	2.8	65.0	10.2	52.8	9.5	77.5
Sulfadoxine	67.2	7.8	64.4	2.6	67.0	11.6	55.6	6.4	75.8
Sulfaguanidine	30.0	13.3	23.6	90.8	22.5	13.3	37.6	13.8	0.0
Sulfamerazine	63.2	6.9	65.2	4.7	75.0	6.3	54.4	8.8	68.3
Sulfamethoxazole	63.6	13.4	59.2	4.5	63.0	22.2	58.4	15.2	85.0
Sulfamethoxypyridazine	62.4	7.3	62.4	5.3	61.5	12.0	49.2	10.2	67.5
Sulfamonomethoxine	64.8	8.6	58.0	2.4	61.0	17.2	56.8	5.3	68.3
Sulfanilamide	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sulfapyridine	69.2	6.0	66.4	8.9	71.5	9.5	58.4	2.9	72.5
Sulfathiazole	63.2	13.5	69.2	3.9	66.5	19.4	67.2	10.4	55.0
Sulfisomazine	46.0	10.6	54.0	5.2	53.0	2.2	50.8	5.3	57.5
Sulfisozole	65.2	6.7	72.8	3.1	75.0	13.2	59.6	7.3	74.2
Sulfinoxalin	65.6	12.8	54.4	4.8	66.5	10.2	55.6	10.3	51.7
Triclabendazole	55.2	13.7	60.0	3.3	46.5	16.2	58.4	6.6	384.2
Tempos	57.2	55.5	62.8	11.4	67.0	15.9	66.4	16.7	0.0
Tetracycline	144.4	7.0	144.8	3.9	104.5	6.9	72.8	3.7	30.0
Thiabendazole	0.0	0.0	74.0	10.3	0.0	0.0	0.0	0.0	163.3
Tiamulin	78.0	6.0	73.6	3.0	77.0	3.4	68.8	3.3	10.0
Tilmicosin	130.8	2.8	106.8	4.3	144.5	9.8	120.4	3.2	150.8
Trenbolone (a)	104.3	7.3	73.0	20.1	0.0	0.0	64.0	3.9	116.7
Trenbolone (b)	103.7	6.0	79.5	16.8	0.0	0.0	70.0	6.7	131.7
Trichlorfon	0.0	0.0	46.0	51.5	113.0	8.2	75.2	1.5	83.3
Trimethoprim	66.4	5.4	68.0	2.1	73.0	3.5	65.6	4.5	71.7
Triproclennamine	77.2	5.7	74.0	1.9	74.5	4.0	68.0	2.9	115.8
Tylosin	68.8	4.4	62.0	4.0	57.0	10.9	49.2	2.2	0.0
Xylazine	87.2	3.1	80.8	1.4	86.5	2.2	68.4	3.8	87.5
2-Acetyl-5-nitro-n	24.4	27.3	-	-	-	-	53.6	29.9	71.8
Ceftioxon	20	2.8	152.0	58.9	182.0	9.9	58.4	33.4	33.0
Clorsulon-n	20.4	4.3	58.7	26.6	92.7	13.0	-	-	98.0
Chloramphenicol-n	22	4.7	95.3	28.0	110.7	14.7	55.6	21.9	0.0
Diclazuril-n	106.8	35.2	-	-	-	-	56.8	25.5	191.0
Florfenicol-n	24	12.0	-	-	187.3	70.8	57.2	16.1	64.5
Nicarbazin-n	25.6	15.3	28.7	25.8	91.3	20.2	66.8	3.4	94.0
Phenoxymethylpenicillin-n	19.6	2.9	80.0	8.7	84.7	34.4	120.4	8.3	75.8
Phenethicillin-n	19.2	2.9	133.3	73.0	-	-	121.2	8.9	70.0
sulfantran-n	29.2	26.7	38.0	16.4	44.7	1.2	80.4	9.2	147.3
Thiabendazole-M-n	24.8	8.2	71.3	12.2	90.0	22.3	75.2	12.8	109.3
Toltrazuril-n	23.6	9.1	14.8	52.0	21.3	37.0	64.0	11.0	206.5
Thiamphenicol-n	20.4	3.3	195.3	9.0	54.0	33.0	92.4	11.7	97.3
Zeranol-n	28.4	5.5	-	-	-	-	74.4	8.4	88.5

1.6 妥当性評価

妥当性評価ガイドライン<sup>5)</sup>に従って、Fig.1に示した方法の妥当性評価を豚肉、鶏肉およびブリについて実施した。添加量を一律基準である0.01μg/g、基準値の平均的濃度として0.1μg/gと決定し評価した結果、低濃度における真度70%以上120%以下、RSD（併行精度）25%以下、RSD（室内精度）30%

以下の動物用医薬品は豚肉で46成分、鶏肉で38成分、ぶりで41成分であった。（Table2参照）また、高濃度における真度70%以上120%以下、RSD（併行精度）15%以下、RSD（室内精度）20%以下であった動物用医薬品は豚肉で45成分、鶏肉で47成分、ブリで64成分であった。（Table2参照）。

Table2.Validation results

Analyte	Swine muscle				Chicken muscle				Yellowtail			
	Fortification level ( $\mu\text{g/g}$ )	Accuracy (%)	Repeat ability (%)	Within laboratory reproducibility (%)	Fortification level ( $\mu\text{g/g}$ )	Accuracy (%)	Repeat ability (%)	Within laboratory reproducibility (%)	Fortification level ( $\mu\text{g/g}$ )	Accuracy (%)	Repeat ability (%)	Within laboratory reproducibility (%)
2-Quinoxalinecarboxylic acid	0.01	89.3	24.9	29.4	0.01	96.7	17.1	29.0	0.01	103.3	70.6	68.3
5-Hydroxy-thiabendazole	0.01	94.7	20.8	23.7	0.01	71.3	11.5	18.8	0.01	36.0	2.8	7.9
Albendazole metabolite	0.01	74.0	16.0	25.1	0.01	68.7	4.2	6.1	0.01	82.0	19.6	26.1
Allethrin	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-
Altrenogest	0.01	48.7	11.0	22.6	0.01	39.3	13.3	33.9	0.01	107.3	26.6	24.7
Ampicillin	0.01	92.0	17.3	21.4	0.01	63.3	20.4	32.3	0.01	90.7	22.8	28.2
Amprolium	0.01	61.3	15.9	19.4	0.01	78.0	33.0	42.4	0.01	51.3	26.9	52.3
Azaparone	0.01	82.0	6.1	10.0	0.01	72.7	18.6	25.6	0.01	64.0	5.3	8.3
Benzylpenicillin	0.01	52.7	1.2	2.2	0.01	42.7	10.3	24.1	0.01	70.0	21.9	24.1
Carbadox	0.01	39.3	18.6	47.2	0.01	46.0	9.2	19.9	0.01	83.3	55.5	66.6
Cefalexin	0.01	28.0	14.1	50.5	0.01	62.0	44.7	72.1	0.01	94.0	36.8	39.1
Cefalonium	0.01	69.0	1.4	2.0	0.01	24.0	28.3	117.9	0.01	94.7	80.8	85.3
Cefapirin	0.01	171.0	12.7	7.4	0.01	44.7	6.1	13.7	0.01	158.0	14.1	9.0
Cefazolin	0.01	78.0	21.6	27.7	0.01	102.0	44.0	43.1	0.01	87.3	32.3	37.0
Chlortetracycline	0.01	111.3	24.3	26.0	0.01	134.0	138.6	59.2	0.01	110.0	24.3	29.4
Ciprofloxacin	0.01	119.3	24.5	27.6	0.01	90.0	15.4	21.6	0.01	93.3	8.1	8.7
Clenbuterol	0.01	56.0	7.2	12.9	0.01	74.7	12.2	16.4	0.01	66.7	16.0	24.1
Clopidol	0.01	91.3	16.2	20.6	0.01	71.3	9.2	15.1	0.01	90.7	18.0	23.0
Cloxacillin	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-
Cyromazine	0.01	64.5	74.8	116.0	0.01	61.5	75.4	122.6	0.01	-	-	-
Danofloxacin	0.01	159.3	173.8	109.1	0.01	133.3	121.8	91.4	0.01	106.0	73.0	68.9
Dexamethasone	0.01	66.0	15.1	22.9	0.01	59.3	7.6	12.8	0.01	108.7	41.2	37.9
Diavercidine	0.01	88.0	15.6	17.8	0.01	80.7	7.6	9.4	0.01	72.7	20.2	25.3
Dicloxacillin	0.01	41.3	13.0	31.5	0.01	67.3	7.0	10.4	0.01	60.0	32.9	54.9
Difloxacin	0.01	88.0	17.0	23.4	0.01	79.3	23.9	29.0	0.01	90.7	15.6	21.3
Difurazon	0.01	58.0	17.8	30.6	0.01	44.7	16.0	35.9	0.01	94.0	29.9	31.8
Emamectin B1a	0.01	65.3	4.2	6.4	0.01	72.0	13.9	19.2	0.01	80.7	10.3	12.7
Enoxacin	0.01	170.0	95.3	56.1	0.01	113.3	14.5	12.8	0.01	182.7	88.0	48.2
Enrofloxacin	0.01	97.3	21.8	27.2	0.01	80.0	23.3	26.6	0.01	72.0	21.6	29.0
Epoxiconazole	0.01	45.3	15.1	33.4	0.01	53.3	4.2	7.8	0.01	90.0	19.5	22.7
Erythromycin A	0.01	50.7	17.9	35.4	0.01	64.0	12.5	19.5	0.01	62.7	24.4	39.0
Ethopabate	0.01	74.0	4.0	7.4	0.01	53.3	1.2	2.2	0.01	69.3	20.8	30.0
Ethoxyquin	0.01	59.3	13.0	21.9	0.01	79.3	6.4	8.1	0.01	68.0	2.8	4.2
Famphur	0.01	41.3	1.2	2.8	0.01	61.3	9.9	16.1	0.01	88.0	15.1	21.2
Fenobucarb	0.01	51.3	22.7	44.3	0.01	48.0	5.3	11.0	0.01	99.3	18.1	28.3
Flubendazole	0.01	75.3	6.0	13.6	0.01	73.3	11.7	22.0	0.01	82.0	18.4	24.6
Flumequine	0.01	44.0	5.0	9.1	0.01	55.3	6.4	11.6	0.01	62.0	23.6	38.0
Furazolidone	0.01	79.3	4.2	5.2	0.01	66.7	1.2	1.7	0.01	102.0	24.2	23.8
Leuco malachite	0.01	40.0	10.4	26.0	0.01	46.7	1.2	2.5	0.01	-	-	-
Levamisole	0.01	78.7	16.2	20.5	0.01	71.3	5.0	7.1	0.01	82.0	20.9	25.5
Lincomycin	0.01	109.3	17.5	24.3	0.01	100.7	7.6	7.5	0.01	117.3	50.3	42.9
Malachite	0.01	47.3	6.4	13.6	0.01	53.3	16.7	31.2	0.01	50.0	8.7	17.4
Marbofloxacin	0.01	74.0	6.0	8.1	0.01	90.7	4.2	4.6	0.01	96.7	15.2	26.0
Melengestrol	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-
Meloxicam	0.01	82.7	8.1	15.3	0.01	55.3	6.4	11.6	0.01	34.0	20.3	59.7
Metoclopramide	0.01	58.0	2.0	3.4	0.01	76.0	12.5	16.4	0.01	63.3	7.0	11.1
Metronidazole	0.01	132.0	65.9	50.0	0.01	90.7	15.4	22.2	0.01	151.3	75.6	50.0
Miloxacin	0.01	54.0	9.2	17.0	0.01	53.3	8.1	15.2	0.01	66.0	14.4	21.9
Monensin	0.01	80.7	18.6	23.0	0.01	54.0	3.5	6.4	0.01	17.3	8.1	46.6
Morantel	0.01	57.3	14.0	24.5	0.01	48.7	9.0	18.5	0.01	58.7	2.3	3.9
Nalidixic acid	0.01	51.3	7.0	13.7	0.01	52.7	5.0	9.6	0.01	62.7	20.0	32.0
Nafcillin	0.01	71.3	15.1	21.2	0.01	66.7	11.5	17.3	0.01	61.3	11.5	18.8
Neospiramycin	0.01	70.7	60.2	85.2	0.01	59.3	5.8	9.7	0.01	93.3	19.7	21.8
Norfloxacin	0.01	119.3	16.2	13.5	0.01	97.3	16.3	27.3	0.01	140.7	18.6	13.2
Ofloxacin	0.01	88.7	12.2	13.8	0.01	97.3	13.3	13.7	0.01	110.0	16.2	23.8
Olaquinox	0.01	67.3	23.4	34.7	0.01	40.7	31.1	76.6	0.01	48.7	15.0	30.8
Oleandomycin	0.01	74.0	7.2	9.7	0.01	81.3	6.4	7.9	0.01	76.7	21.0	27.4
Orbifloxacin	0.01	60.7	15.1	25.0	0.01	74.7	28.0	37.5	0.01	65.3	13.3	20.4
Ormetoprim	0.01	50.7	2.3	4.6	0.01	68.0	10.6	15.6	0.01	56.7	10.3	18.1
Oxacillin	0.01	50.7	4.6	9.1	0.01	63.3	20.5	32.4	0.01	76.0	16.9	21.7
Oxolinic acid	0.01	67.3	2.3	3.4	0.01	72.0	15.6	21.7	0.01	62.0	19.0	16.1
Oxybendazole	0.01	74.7	7.6	11.7	0.01	72.0	7.2	10.0	0.01	78.7	23.2	29.5
Oxytetracycline	0.01	117.3	16.0	24.2	0.01	128.7	8.1	3.5	0.01	123.3	609.7	97.8
Pirimidic Acid	0.01	52.7	9.5	17.9	0.01	53.3	6.4	12.1	0.01	56.7	19.6	34.6
Prednisolone	0.01	62.0	4.0	6.5	0.01	58.7	18.9	32.2	0.01	69.3	27.2	39.2
Pyrimethamine	0.01	70.0	8.0	11.4	0.01	74.0	9.2	12.4	0.01	78.7	19.2	24.4
Salinomycin	0.01	51.3	1.2	2.2	0.01	53.3	12.1	22.6	0.01	68.7	27.3	39.8
Sarafloxacin	0.01	78.0	23.8	28.9	0.01	75.3	18.1	24.1	0.01	114.0	18.9	22.9
Spiramycin I	0.01	75.3	37.9	76.8	0.01	82.7	41.1	49.7	0.01	95.3	18.9	20.8
Sulfabenzamide	0.01	72.7	21.6	41.0	0.01	42.7	7.6	17.7	0.01	72.0	23.9	26.9
Sulfacetamide	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-	0.01	80.0	76.1	95.1
Sulfachlorpyridazine	0.01	77.0	14.0	24.8	0.01	76.0	8.0	14.3	0.01	114.7	53.9	47.0
Sulfadiazine	0.01	81.3	18.6	45.0	0.01	39.3	14.5	36.8	0.01	75.3	42.8	56.8
Sulfadimethoxine	0.01	70.0	12.2	24.3	0.01	74.7	7.0	12.8	0.01	74.7	23.7	25.2
Sulfadimidine	0.01	74.7	7.6	13.9	0.01	85.3	2.3	3.5	0.01	84.0	16.7	23.7
Sulfadoxine	0.01	82.0	8.7	16.8	0.01	74.7	7.0	12.8	0.01	80.7	23.4	29.1
Sulfaguandine	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-	0.01	93.3	58.0	62.1
Sulfamerazine	0.01	36.0	17.3	48.1	0.01	60.0	10.6	17.6	0.01	68.0	30.8	45.3
Sulfamethoxazole	0.01	78.0	24.3	28.7	0.01	70.7	6.1	10.1	0.01	102.0	49.2	48.2
Sulfamethoxyipyridazine	0.01	76.0	8.7	19.0	0.01	72.7	7.0	11.2	0.01	86.0	44.2	51.4
Sulfamonomethoxine	0.01	78.7	23.1	27.5	0.01	82.7	5.8	9.2	0.01	153.3	121.4	79.2
Sulfanilamide	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-
Sulfapyridine	0.01	40.0	15.6	39.1	0.01	44.0	13.1	29.8	0.01	55.3	28.0	50.6
Sulfathiazole	0.01	37.3	18.5	49.5	0.01	53.3	5.0	9.4	0.01	44.7	20.0	44.9
Sulfisomazine	0.01	112.7	20.8	25.1	0.01	102.0	45.2	44.3	0.01	108.0	52.0	48.1
Sulfisozole	0.01	75.3	13.3	20.4	0.01	74.0	2.0	3.7	0.01	112.0	9.7	13.3
Sulfinoxalin	0.01	72.7	24.8	28.2	0.01	45.3	7.0	15.5	0.01	63.3	34.4	54.4
Triclabendazole	0.01	33.3	17.2	51.7	0.01	52.0	8.7	16.8	0.01	84.7	8.9	15.9
Templos	0.01	46.7	13.6	29.2	0.01	70.0	10.0	14.3	0.01	126.0	43.3	34.3
Tetracycline	0.01	110.0	24.7	27.3	0.01	142.0	60.1	24.8	0.01	384.7	55.2	14.4
Thiabendazole	0.01	49.3	7.6	15.3	0.01	56.0	22.5	40.2	0.01	56.0	8.0	14.3
Tianulin	0.01	72.0	3.5	4.8	0.01	89.3	18.1	20.3	0.01	75.3	9.0	12.0
Timicosin	0.01	122.7	89.5	73.0	0.01	113.3	19.9	21.7	0.01	120.0	8.6	12.2
Trenbolone (a)	0.01	80.7	7.6	14.9	0.01	58.7	6.4	11.0	0.01	84.0	4.1	10.6
Trenbolone (b)	0.01	74.7	12.9	23.5	0.01	57.3	4.2	7.3	0.01	74.7	7.2	16.5
Trichlorfon	0.01	72.0	29.5	40.9	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-

Analyte	Swine muscle				Chicken muscle				Yellowtail			
	Fortification level (μg/g)	Accuracy (%)	Repeat ability (%)	Within laboratory reproducibility (%)	Fortification level (μg/g)	Accuracy (%)	Repeat ability (%)	Within laboratory reproducibility (%)	Fortification level (μg/g)	Accuracy (%)	Repeat ability (%)	Within laboratory reproducibility (%)
Trimethoprim	0.01	58.0	3.5	6.0	0.01	66.7	17.0	25.5	0.01	62.7	11.4	18.1
Tripeleminamine	0.01	78.7	1.2	1.7	0.01	77.3	11.4	14.7	0.01	70.7	4.6	6.5
Tylosin	0.01	85.3	15.0	27.1	0.01	82.7	28.9	35.0	0.01	72.7	15.1	20.8
Xylazine	0.01	74.7	3.1	4.1	0.01	87.3	12.9	14.7	0.01	74.0	15.9	21.5
2-Acetyl-β-nitron	0.01	48.7	13.0	26.7	0.01	59.3	10.1	17.0	0.01	58.7	9.9	16.8
Cefturox-n	0.01	82.0	34.6	42.2	0.01	-	-	-	0.01	128.7	13.0	10.1
Clostron-n	0.01	57.3	8.3	14.5	0.01	56.7	5.0	8.9	0.01	68.7	11.0	16.0
Chloramphenicol-n	0.01	54.0	5.3	9.8	0.01	67.3	41.2	61.2	0.01	51.3	17.5	34.0
Diclazuril-n	0.01	194.0	77.2	39.8	0.01	244.0	74.8	30.7	0.01	184.7	79.6	43.1
Florfenicol-n	0.01	44.7	5.0	11.3	0.01	57.3	20.8	36.3	0.01	58.7	9.5	16.1
Nicarbazin-n	0.01	55.3	7.6	13.7	0.01	59.3	4.2	7.0	0.01	56.0	7.2	12.9
Phenoxyethylpenicillin-n	0.01	34.7	6.4	18.5	0.01	50.0	16.4	32.7	0.01	18.0	11.1	61.9
Phenothicillin-n	0.01	35.3	7.0	19.9	0.01	42.0	15.1	36.0	0.01	14.7	11.4	77.5
sulfantran-n	0.01	58.0	12.5	21.5	0.01	64.7	16.8	25.9	0.01	64.7	12.2	18.9
Thiabendazole-M-n	0.01	40.7	15.0	36.9	0.01	44.0	23.1	52.4	0.01	65.3	6.4	9.8
Toltrazuril-n	0.01	72.7	11.0	15.2	0.01	65.3	38.9	59.5	0.01	68.7	25.2	36.6
Thiamphenicol-n	0.01	50.7	13.3	26.3	0.01	40.0	19.1	47.7	0.01	80.7	15.9	24.4
Zeranol-n	0.01	57.3	7.0	12.3	0.01	58.7	8.1	13.8	0.01	79.3	12.2	15.4
2-Quinoxalinecarboxylic acid	0.1	91.3	5.6	9.0	0.1	81.7	9.5	16.1	0.1	114.7	12.0	15.3
5-Hydroxy-thiabendazole	0.1	99.3	8.2	8.5	0.1	79.9	8.7	13.3	0.1	32.9	48.9	148.6
Albendazole metabolite	0.1	81.7	8.8	13.0	0.1	59.6	3.9	6.6	0.1	89.0	5.1	18.2
Allothrin	0.1	-	-	-	0.1	-	-	-	0.1	-	-	-
Altrenogest	0.1	60.8	4.0	6.6	0.1	61.9	5.6	9.1	0.1	82.5	15.1	18.4
Ampicillin	0.1	95.9	7.1	8.7	0.1	75.9	5.6	13.7	0.1	94.6	47.8	50.5
Amprolium	0.1	60.5	8.5	14.1	0.1	67.3	16.7	24.9	0.1	46.5	22.5	48.5
Azaparone	0.1	71.5	4.1	5.7	0.1	73.6	8.1	10.9	0.1	82.3	10.6	12.9
Benzylpenicillin	0.1	58.9	8.2	14.0	0.1	71.5	10.4	18.5	0.1	78.9	8.0	15.5
Carbadox	0.1	59.0	0.3	0.6	0.1	65.5	5.0	7.7	0.1	106.6	15.1	42.3
Cefalexin	0.1	57.6	12.6	21.8	0.1	62.0	16.5	26.7	0.1	66.9	15.1	22.5
Cefalonium	0.1	69.5	27.9	40.1	0.1	82.1	5.5	13.3	0.1	102.0	5.4	10.3
Cefapirin	0.1	113.4	5.2	4.9	0.1	49.9	5.5	10.9	0.1	124.7	58.5	46.9
Cefazolin	0.1	71.3	6.5	13.2	0.1	109.6	5.1	7.6	0.1	82.8	5.4	10.7
Chlortetracycline	0.1	111.9	10.5	13.4	0.1	116.5	9.8	18.2	0.1	106.1	7.0	11.7
Ciprofloxacin	0.1	102.9	6.9	9.2	0.1	81.2	5.1	10.9	0.1	111.2	6.2	12.6
Clenbuterol	0.1	69.7	5.0	7.2	0.1	73.0	11.5	15.7	0.1	83.5	5.5	18.5
Clopidol	0.1	91.1	4.7	7.1	0.1	88.3	11.2	15.3	0.1	99.5	11.3	11.4
Cloxacillin	0.1	-	-	-	0.1	-	-	-	0.1	-	-	-
Cyromazine	0.1	29.3	33.8	115.7	0.1	64.2	81.0	126.2	0.1	-	-	-
Danofloxacin	0.1	148.4	145.4	97.9	0.1	105.7	10.9	17.7	0.1	153.1	129.7	81.7
Dexamethasone	0.1	70.3	7.2	10.3	0.1	73.4	14.0	19.1	0.1	124.5	53.7	43.1
Diaveridine	0.1	73.9	5.8	7.9	0.1	48.5	13.0	26.8	0.1	100.8	13.3	13.0
Dicloxacillin	0.1	58.3	10.1	17.3	0.1	67.6	13.0	19.2	0.1	59.3	13.2	22.3
Difloxacin	0.1	77.7	7.8	10.0	0.1	78.7	4.3	5.5	0.1	102.2	7.3	16.9
Difurazone	0.1	58.9	9.0	15.3	0.1	53.5	10.7	19.9	0.1	81.5	13.5	18.9
Emanectin B1a	0.1	74.3	3.8	5.1	0.1	64.5	4.6	7.1	0.1	92.6	10.4	12.0
Enoxacin	0.1	156.9	72.7	46.4	0.1	104.7	6.0	14.4	0.1	177.5	77.8	43.8
Enrofloxacin	0.1	71.1	8.3	15.8	0.1	74.3	6.1	8.2	0.1	81.5	9.8	12.0
Epoiconazole	0.1	65.3	3.1	4.7	0.1	67.6	9.5	14.1	0.1	88.0	8.7	11.2
Erythromycin A	0.1	53.1	20.5	38.5	0.1	59.7	29.4	49.3	0.1	71.7	7.3	8.1
Ethopabate	0.1	74.9	4.8	6.4	0.1	63.4	6.1	9.6	0.1	87.3	10.6	13.6
Ethoxyquin	0.1	51.7	3.5	6.8	0.1	55.7	6.7	11.9	0.1	32.5	48.3	148.3
Famphur	0.1	69.7	3.8	5.4	0.1	69.6	9.0	12.9	0.1	99.2	10.0	13.3
Fenobucarb	0.1	69.5	3.2	4.7	0.1	64.6	6.8	10.5	0.1	101.1	14.3	13.9
Flubendazole	0.1	74.2	5.7	7.6	0.1	73.2	9.9	13.5	0.1	101.6	13.6	13.2
Flumequine	0.1	65.3	4.6	7.1	0.1	66.2	9.6	14.5	0.1	83.1	8.1	11.8
Furazolidone	0.1	78.5	5.7	7.2	0.1	85.3	8.8	12.0	0.1	122.8	36.4	29.7
Leuco malachite	0.1	53.7	7.7	14.4	0.1	50.9	2.2	4.4	0.1	69.4	115.4	166.3
Levamisole	0.1	70.1	5.7	8.2	0.1	66.5	7.0	10.5	0.1	83.5	11.1	19.2
Lincomycin	0.1	105.7	7.6	15.6	0.1	96.1	12.4	13.7	0.1	126.1	54.4	43.1
Malachite	0.1	46.0	2.5	5.4	0.1	43.9	1.7	4.0	0.1	49.8	3.3	6.6
Marbofloxacin	0.1	88.5	10.1	11.4	0.1	77.9	11.8	15.2	0.1	102.9	13.7	18.0
Melengestrol	0.1	-	-	-	0.1	-	-	-	0.1	-	-	-
Meloxicam	0.1	70.6	2.6	4.3	0.1	71.4	5.2	7.3	0.1	38.7	10.5	27.2
Metoclopramide	0.1	67.2	2.8	4.2	0.1	71.9	8.2	11.4	0.1	74.6	7.5	10.0
Metronidazole	0.1	137.7	65.4	47.5	0.1	115.1	7.6	11.4	0.1	143.7	74.0	51.5
Miloxacin	0.1	63.5	3.1	4.9	0.1	62.0	10.6	17.2	0.1	79.3	14.5	18.3
Monensin	0.1	62.6	10.5	16.8	0.1	58.1	13.0	22.4	0.1	33.8	12.4	36.6
Morantel	0.1	55.9	3.8	6.8	0.1	55.6	12.2	22.0	0.1	68.3	9.8	14.4
Nalidixic acid	0.1	65.3	4.5	6.8	0.1	58.3	8.8	15.1	0.1	78.5	13.5	17.2
Naicillin	0.1	58.1	13.7	23.6	0.1	70.7	13.7	18.6	0.1	57.1	13.0	22.8
Neospiramycin	0.1	53.9	18.3	33.9	0.1	63.8	0.5	0.8	0.1	104.6	11.5	15.7
Norfloracin	0.1	144.3	58.6	40.6	0.1	113.5	5.9	12.9	0.1	168.3	55.1	32.7
Ofloxacin	0.1	69.7	19.9	28.6	0.1	84.9	3.4	4.0	0.1	79.9	9.1	11.4
Oflacindox	0.1	66.2	21.7	32.8	0.1	49.3	14.4	29.3	0.1	54.0	13.8	25.5
Oleandomycin	0.1	76.8	12.2	15.8	0.1	80.0	7.8	12.2	0.1	98.1	12.3	16.7
Orbifloxacin	0.1	64.1	2.8	4.3	0.1	65.8	7.0	10.6	0.1	80.7	14.4	17.8
Ormetoprim	0.1	62.8	3.8	6.1	0.1	67.1	7.1	10.6	0.1	69.7	7.9	11.4
Oxacillin	0.1	65.3	12.8	19.6	0.1	78.0	7.9	13.0	0.1	70.5	14.5	16.6
Oxolinic acid	0.1	65.8	5.2	7.9	0.1	63.6	11.8	18.6	0.1	84.9	10.8	14.5
Oxybendazole	0.1	75.3	7.2	9.6	0.1	76.3	5.8	10.6	0.1	97.9	6.5	7.1
Oxytetracycline	0.1	99.7	15.4	17.9	0.1	116.3	10.9	14.6	0.1	119.9	12.4	19.3
Piromidic Acid	0.1	66.3	7.4	11.2	0.1	65.5	9.1	13.9	0.1	80.9	9.2	13.7
Prednisolone	0.1	70.7	3.5	5.0	0.1	62.3	7.0	11.3	0.1	95.9	32.5	33.9
Pyrimethamine	0.1	72.5	7.3	10.1	0.1	74.5	14.9	19.1	0.1	89.2	9.3	11.7
Salinomycin	0.1	50.8	6.2	12.2	0.1	15.7	1.0	6.4	0.1	50.7	17.8	35.1
Sarafloxacin	0.1	76.5	12.8	16.7	0.1	74.4	3.0	4.1	0.1	105.0	7.5	7.1
Spiramycin I	0.1	52.1	7.4	14.2	0.1	61.8	7.6	12.3	0.1	95.6	2.7	2.9
Sulfabenzamide	0.1	69.8	4.4	6.3	0.1	67.1	7.7	11.5	0.1	98.0	13.7	14.3
Sulfacetamide	0.1	103.3	36.1	35.3	0.1	-	-	-	0.1	102.4	7.2	16.1
Sulfachlorpyridazine	0.1	78.0	7.5	9.7	0.1	71.1	4.9	11.0	0.1	131.5	68.4	52.0
Sulfadiazine	0.1	51.4	13.0	25.2	0.1	43.0	15.6	36.2	0.1	63.5	5.6	8.8
Sulfadimethoxine	0.1	72.7	4.5	6.2	0.1	68.7	11.5	16.8	0.1	94.7	11.4	13.2
Sulfadimidine	0.1	68.8	5.2	7.5	0.1	74.7	14.2	19.1	0.1	96.5	12.2	13.3
Sulfadoxine	0.1	72.3	5.0	6.9	0.1	71.0	9.5	13.3	0.1	96.5	8.9	19.9
Sulfaguanidine	0.1	102.1	38.4	37.6	0.1	-	-	-	0.1	91.3	13.6	19.7
Sulfamerazine	0.1	65.0	1.3	2.0	0.1	70.1	7.6	10.8	0.1	89.5	7.5	10.7
Sulfamethoxazole	0.1	73.3	4.9	6.7	0.1	73.1	14.2	19.4	0.1	116.0	10.0	14.5

Analyte	Swine muscle				Chicken muscle				Yellowtail			
	Fortification level ( $\mu\text{g/g}$ )	Accuracy (%)	Repeat-ability (%)	Within laboratory reproducibility (%)	Fortification level ( $\mu\text{g/g}$ )	Accuracy (%)	Repeat-ability (%)	Within laboratory reproducibility (%)	Fortification level ( $\mu\text{g/g}$ )	Accuracy (%)	Repeat-ability (%)	Within laboratory reproducibility (%)
Sulfamethoxypyridazine	0.1	69.7	4.4	6.4	0.1	78.1	13.5	17.3	0.1	99.9	5.9	15.9
Sulfamonomethoxine	0.1	77.3	9.3	12.1	0.1	78.0	7.4	12.3	0.1	129.9	62.7	48.3
Sulfanilamide	0.1	-	-	-	0.1	-	-	-	0.1	-	-	-
Sulfapyridine	0.1	58.7	0.3	0.5	0.1	64.5	5.2	8.0	0.1	76.5	14.4	19.9
Sulfathiazole	0.1	48.3	8.0	16.6	0.1	46.6	8.5	18.3	0.1	58.9	8.6	14.5
Sulfisomazine	0.1	119.5	8.2	10.4	0.1	120.7	51.8	42.9	0.1	125.2	60.3	48.1
Sulfisozole	0.1	70.3	3.5	5.0	0.1	76.0	5.3	10.1	0.1	133.8	63.8	47.7
Sulfiquinoxalin	0.1	70.9	4.4	6.2	0.1	64.5	7.8	12.1	0.1	89.7	9.3	12.6
Triclabendazole	0.1	56.7	3.6	6.4	0.1	54.3	7.4	13.6	0.1	93.3	7.8	19.8
Temphos	0.1	54.2	8.4	15.5	0.1	51.6	6.8	13.2	0.1	384.4	480.5	125.0
Tetracycline	0.1	73.5	10.8	12.2	0.1	150.9	34.7	23.0	0.1	100.2	8.8	2.4
Thiabendazole	0.1	56.5	2.2	3.8	0.1	54.3	5.1	9.4	0.1	67.1	6.9	10.3
Tiamulin	0.1	75.1	8.2	11.0	0.1	72.7	5.4	11.2	0.1	84.4	13.2	15.7
Tilmicosin	0.1	108.8	10.3	16.2	0.1	105.7	6.6	15.7	0.1	133.1	38.8	29.2
Trenbolone (a)	0.1	70.5	5.7	8.1	0.1	63.1	6.6	10.4	0.1	96.6	11.7	12.8
Trenbolone (b)	0.1	76.3	2.8	4.2	0.1	64.4	8.0	12.4	0.1	109.2	13.9	19.4
Trichlorion	0.1	66.1	11.0	16.7	0.1	-	-	-	0.1	42.1	8.7	20.7
Trimethoprim	0.1	60.9	1.4	2.3	0.1	60.9	2.0	3.3	0.1	66.1	6.5	9.8
Tripeleennamine	0.1	72.3	3.5	4.8	0.1	75.8	10.7	14.2	0.1	80.9	9.2	11.4
Tylosin	0.1	53.1	10.1	19.0	0.1	63.3	15.7	24.8	0.1	86.7	14.9	18.4
Xylazine	0.1	70.7	4.6	6.5	0.1	71.9	9.7	13.5	0.1	72.9	14.8	19.3
2-Acetyl-5-nitro-n	0.1	66.2	3.0	4.5	0.1	69.3	8.6	12.5	0.1	79.6	9.4	11.8
Cefturox-n	0.1	72.8	14.7	20.2	0.1	-	-	-	0.1	80.8	15.2	18.8
Clorsulon-n	0.1	65.6	1.8	2.8	0.1	64.0	2.9	4.6	0.1	69.3	3.3	4.7
Chloramphenicol-n	0.1	62.1	5.0	8.1	0.1	67.7	8.6	12.7	0.1	65.7	8.5	12.9
Diclazuril-n	0.1	133.0	65.1	48.9	0.1	154.2	71.7	46.5	0.1	147.1	86.8	59.0
Florfenicol-n	0.1	67.3	0.6	0.9	0.1	71.8	8.1	11.3	0.1	72.3	4.6	6.4
Nicarbazin-n	0.1	63.1	2.1	3.3	0.1	65.3	5.7	8.7	0.1	77.1	4.4	5.7
Phenoxyethylpenicillin-n	0.1	50.3	2.1	4.1	0.1	60.1	3.8	6.3	0.1	32.4	6.5	20.1
Phenaceticillin-n	0.1	53.8	0.3	0.6	0.1	62.9	3.3	5.2	0.1	26.9	12.8	47.5
sulfantran-n	0.1	64.5	6.3	9.7	0.1	79.1	9.7	12.2	0.1	70.7	6.4	9.1
Thiabendazole-M-n	0.1	60.3	1.8	3.0	0.1	71.8	8.3	11.5	0.1	86.1	12.4	14.4
Toltrazuril-n	0.1	68.1	14.5	21.3	0.1	99.7	21.1	21.2	0.1	81.1	21.6	26.7
Thiamphenicol-n	0.1	60.7	2.6	4.2	0.1	69.9	2.7	3.9	0.1	68.2	4.0	5.9
Zeranol-n	0.1	64.1	2.6	4.1	0.1	57.6	2.6	4.5	0.1	91.4	14.2	15.5

2 まとめ

合成抗菌剤や抗生物質及び寄生虫駆除剤等の動物用医薬品114種について牛肉、豚肉、鶏肉、エビおよびブリを用いて簡易で迅速な試験法を検討したところ、アセトニトリル、メタノール、ギ酸水溶液 (5:3:1, v/v) の混合液を抽出溶媒として使用することにより、検討した5種の検体は、多くの項目において回収率が50～150%の範囲に入り、良好な結果であった。また、この試験法における妥当性評価(添加濃度: 0.1 $\mu\text{g/g}$ , 0.01 $\mu\text{g/g}$ )を豚肉、鶏肉およびブリで行ったところ、いずれの食品群についても約45成分程度において妥当性評価ガイドラインの条件を満たしていた。

おわりに

畜水産物に残留する動物用医薬品の一斉分析法について検討した結果、抽出・精製操作は公定法Iの1/3の時間で終了し、分析の迅速、簡便化を図ることができた。また、違反事例のある薬剤や、TC系薬剤を始めとした使用頻度が高いが公定法Iにおいても適応可能となっていない動物用医薬品についても適応可能であったため、今回検討した試験法は畜水産食品中に含まれる幅広い動物用医薬品のスクリーニング法として有用であると考えられた。

添加回収試験の結果、多くの項目において回収率が50～150%の範囲であったため、緊急時のスクリーニング法としては適用可能であると考えられる。しかし、定量する場合は目的物質に合わせた固相カートリッジを選定し、処理時間とコストは増大するが、Fig.2に示すような更なるクリーンアップを行うことが望ましいと考えられた。

参考文献

- 1) S.J.Lehotay, K. Mastovska, A.R.Lifhtfield, J. AOAC88 (2005) 615-629
- 2) 厚生労働省食安監発第0214001号 “畜水産食品の残留物質対策について” 平成19年2月14日
- 3) T. Nakajima, I.Takano, Food Hyg.Saf.Sci. Vol.53, No.5 (2012) 243-253
- 4) 平成17年厚生労働省告示第497号、498号、499号。2005.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(平成22年12月24日付け食安発1224第2号)



## 大分県における浴用水中のレジオネラ属菌の検出状況 (2010-2012)

緒方 喜久代、佐々木 麻里、成松 浩志

### Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Oita Prefecture, 2010-2012

Ogata Kikuyo, Sasaki Mari, Narimatsu Hiroshi

Key words : レジオネラ属菌 *Legionella* sp. 浴用水 Public Bath Water, LAMP 法

#### 要 旨

2010年度～2012年度の3年間、県下（大分市保健所管内を除く）の公衆浴場浴用水等161検体を対象に、レジオネラ属菌による生息状況等について調査した。調査した161検体のうち87検体（54%）からレジオネラ属菌が検出され、浴槽の種類別では、掛け流し浴槽水68検体のうち44検体（65%）から、循環式浴槽水19検体のうち11検体（58%）からレジオネラ属菌が検出された。分離されたレジオネラ属菌の血清群は、*L.pneumophila* SG1、SG3、SG5、SG6、SG型別不能などであった。

#### はじめに

宮崎県の集団感染事例<sup>1,2)</sup>を契機に、2003年4月1日、大分県公衆浴場法施行条例及旅館業法施行条例を改正し、レジオネラ属菌の自費による検査（以下、自主検査）を含む、入浴施設管理者の自主衛生管理の強化を図ってきた。県は、入浴施設管理者の自主管理体制の効果を高め、衛生管理のより一層の徹底を図るため、行政検査（県保健所が採水し、搬入）を実施し、入浴施設の安全確保に努めてきた。

浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として広く用いられている培養法は結果を得るまでに7日から10日の長い時間を要する。患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時やレジオネラ属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中のレジオネラ属菌の存在あるいは菌数を速やかに把握する必要がある場合は、監視現場からより迅速で、かつ正確な検査が求められている。そこで、行政検査として搬入された様々な泉質を有する温泉水等の検体を対象に、正確・簡便・迅速な培養結果を得る方法としての斜光法<sup>3)</sup>を導入し、培養法の迅速かつ効率化を図った。また、搬入から短時間で結果が得られる手法として汎用されている遺伝子増幅を利用したLAMP法についても検討した。加えて、公衆浴場等において簡便な施設管理

を行う手段<sup>4)</sup>としてのATP測定の有用性についても検討したので、併せて報告する。

#### 材料及び方法

##### 1. 材料

原則、公衆浴場業又は旅館業の許可を受けている営業施設内にある入浴施設とし、平成2010年5月から2012年11月の間、県保健所環境監視員が採水し、搬入した浴槽水および湯口水161検体を調査対象とした。内訳は、2010年度が58検体、2011年度が56検体、2012年度が47検体であった。採水には高圧滅菌処理をしたポリプロピレン製ボトル（2L容器）を用い、約2000mlを採取した。また、採取時に残留塩素が認められた検体についてはチオ硫酸ナトリウムによる処理を直ちに施し、採水当日あるいは翌日に当所へ搬入され、検査に供するまでは冷蔵保存とした。なお、レジオネラ属菌が基準値以上検出された場合、レジオネラ属菌汚染源の推定に役立つため湯口水を浴槽水と同時に採水し、検査に供した。

##### 2. レジオネラ属菌の検出

検査法は新版レジオネラ症防止指針<sup>5)</sup>に準じて実施した。すなわち、検水1200mlをメンブランフィルター（直径47mm、φ0.2μm、ADVANTEC社

POLYCARBONATE)で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 12ml入りの滅菌コニカルビーカー (100ml容量)に移し、ボルテックスミキサーにて5分間攪拌してフィルター捕捉物を再懸濁させた。ろ過濃縮後、濃縮検体 (未加熱と表記)と50℃ 20分加熱後、急冷した濃縮検体 (加熱処理と表記)をそれぞれ濃縮試料 (100倍濃縮)とした (図1)。一部浴槽水については、雑菌処理として酸処理を行った。

一部浴槽水について、従属栄養細菌数とATP測定を実施した。

### 3. 分離培養法

レジオネラ属菌の分離培地としてWYO  $\alpha$  寒天平板 (栄研化学)、GVPC寒天平板 (日研生物)、MWY寒天平板 (自家製; Oxoid)を用い、非濃縮処理の検水および各濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、その200  $\mu$ Lを各分離平板 1枚にコンラージ棒で塗布し、これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36℃で培養した。

培養3日目に、2方向から光を照射し、実体顕微鏡下で各分離培地を観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYE  $\alpha$  寒天培地 (自家製) 及び血液寒天培地 (ウマ血, 自家製) に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、PCR法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は36℃で10日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、同様の同定検査を行った。分離培地上にレジオネラ属菌の発育を認めない場合、レジオネラ属菌数は10cfu/100ml未満とし、最終的に同定されたコロニー数をもって検水100mlあたりのレジオネラ属菌数に換算した。分離した菌株は、Legionella Latex Test Kit (OXOID) 及びレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

L-システインの要求性からレジオネラ属菌が疑われたにもかかわらず、*mip* および5S rRNA を標的としたPCR法で既知の生成物が得られなかった分離株あるいはスライド凝集に反応しなかった分離株については、

F: 5'-GTAAAGCACTTTCAGTGGGGAG-3', R: 5'-GGTCAACTTATCGCGTTTGCT-3' あるいは、ユニバーサル プライマー

(MicroSeq-F:5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', MicroSeq-500R: 5'-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3') を用いた16S シークエンス解析により詳細な同定を行った。

### 4. 従属栄養細菌数とATP測定

従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地 (関東化学) を用い、混積寒天培養法にて、42℃、7日間培養し、菌数測定を行った。

ATPは、ルシパックワイド (キッコーマンバイオケミファ) を用いて測定した。測定対象は、濃縮検体とした。

### 5. LAMP法

濃縮検体について、Legionella Detection Kit E (栄研化学) を用い、Loopampリアルタイム濁度測定装置LA320-Cで1検体につき3回繰り返し測定を行った。

加えて、培養 (+) LAMP (-) の濃縮検体について、阻害回避試薬を用いた検討およびDNA抽出法の検討を行った。

## 結 果

### 1. レジオネラ属菌の検出状況

培養結果の概要を表1に示した。161検体中87検体 (54%) からレジオネラ属菌が検出された。うち、基準値違反は78検体 (48%) であった。内訳は「掛け流し施設」では浴槽水68検体中44検体 (65%)、湯口水56検体中24検体 (43%) で、「循環式施設」では浴槽水19検体中11検体 (58%)、湯口水18検体中8検体 (44%) であった。

浴槽水と湯口水ともにレジオネラ属菌が検出された施設は23施設であった。浴槽水 (+) 湯口水 (-) となった施設は22施設、浴槽水 (-) 湯口水 (+) となった施設は9施設であった (表2)。同一施設の浴槽水と湯口水から検出されたレジオネラ属菌の血清群は、おおむね一致していた。

レジオネラ属菌が検出された87検体について分離培地の検出感度を比較した結果を表3に示した。濃縮未加熱検体では、使用した3種類の分離培地全てから分離されたものが44検体、WYO  $\alpha$  + GVPCからの分離が4検体、WYO  $\alpha$  + MWYからの分離が3検体、GVPC + MWYからの分離が4検体、WYO  $\alpha$  のみからの分離が10検体、GVPCのみからの分離が4検体、MWYのみから分離が5

検体であった。濃縮加熱検体では、3種類の分離培地全てから分離されたものが48検体、WYO  $\alpha$  + GVPC からの分離が6検体、WYO  $\alpha$  + MWY からの分離が6検体、GVPC + MWY からの分離が2検体、WYO  $\alpha$  のみからの分離が4検体、GVPC のみからの分離が4検体、MWY のみから分離が9検体であった。

斜光法は培養3日目を判定日とし、特徴あるモザイク状のコロニーについて確認検査を行った。その結果、レジオネラ属菌が検出された87検体のうち82検体は斜光法で確認することができたが、5検体は継続培養後にレジオネラ属菌が確認された(表4)。継続培養で陽性となった5検体から分離されたレジオネラ属菌は、4検体は *L. pneumophila*、1検体は *L. anisa* であった。

分離菌株の血清群の結果を図2に示した。SG3、SG6、SG1、SG5の順に多く型別された。分離菌株の5分の4は型別されたが、5分の1(22%)は型別不能であった。

L-システインの要求性からレジオネラ属菌が疑われたにもかかわらず、同定ができなかった分離株について16S rRNAあるいはユニバーサルプライマーを用い、シーケンスによる同定を試みた。その結果、5S rRNAプライマーに反応し、スライド凝集に反応しなかった分離株は *L. anisa* と同定された。5S rRNAプライマーに反応せず、16S rRNAプライマーに反応した分離株は *L. taurinensis*、*L. longbeachae*、*L. oakridgenensis* と同定され、16S rRNAプライマーに反応しなかった分離株はユニバーサルプライマーを用いたPCRで *Mycobacterium sp.*、*Roseomomas*、*Pedobacter saltans*、*Soil bacterium* と同定された。

## 2. 従属栄養細菌数とATP測定

従属栄養細菌数とATP測定値をlog対数で比較した(図3)。併せて、レジオネラ属菌数とATP測定値もlog対数で比較した(図4)。従属栄養細菌数とATP値においては相関が認められたが、レジオネラ属菌数とATP値には相関は認められなかった。また、100倍濃縮液のATP値が50RLU未満では、レジオネラの検出率は20%(1/5)であったが、ATP値がそれ以上では77%(23/30)に上昇した。

## 3. LAMP法と培養法の比較

濃縮検体1検体につき3回繰り返し測定を行い、

1回でも陽性となった場合は、その結果を採用した(表5)。培養(+)-LAMP法(-)の濃縮検体について、阻害回避処理試薬を用い、再度測定を行ったが、得られた結果は同じであった。

2011年に、レジオネラ属菌数が2000cfu/100ml検出されたにもかかわらず、LAMP法(-)となったサンプルBについて、DNA抽出法の検討を行った。カラム抽出法では、3回繰り返し測定の結果、一回もLAMP法陽性の結果は得られなかった。また、3回連続測定で陽性結果が得られたものの安定した結果とはならなかった添付試薬による抽出とキレックス抽出については、さらに3回繰り返し測定を行った。しかし、添付試薬による抽出は、3回とも陰性結果となり、比較的安定した結果が得られたのは、キレックス抽出法であった(表6)。なお、レジオネラ属菌16S rRNAを用いたPCR法により、いずれの抽出方法においても、DNAが抽出されていることを確認した。

## 考 察

本調査の結果、レジオネラ属菌の検出率(基準値違反)は48.4%で他の調査結果<sup>6,9)</sup>と同様の結果となった。

レジオネラ属菌が検出された87検体について、使用した分離培地のWYO  $\alpha$ 、GVPC、MWY各培地別に分離状況をみると、各分離培地でのレジオネラ属菌の分離は56検体から65検体となり、いずれの分離培地においても、単独使用では87検体陽性という結果は得られない。レジオネラ属菌を感度よく分離するためには、レジオネラ属菌の発育特性に配慮し、選択性の異なる培地を併用することが望ましい。また、未加熱の濃縮検体では74検体から、加熱処理では79検体からレジオネラ属菌が分離されたが、この場合においても、単独処理で87検体陽性という結果は得られないことから、未処理、熱処理、酸処理などの処理工程を併用することにより、効率よくレジオネラ属菌が検出されたと考えられる。さらに、レジオネラ属菌の検査をするうえで、菌数を予測できないため、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査することが望ましいとの報告<sup>4)</sup>があることから、濃縮検体と非濃縮検体から同時にレジオネラ属菌の検出を試みた結果、濃縮検体からレジオネラ属菌が検出されず、非濃縮検体からのみレジオネラ属菌が検出された検体があり、濃縮法のみでは

レジオネラ属菌を見逃す危険性がある。各種分離培地の併用や処理工程の併用など培養の機会を多くすることが検出率向上につながり、レジオネラ感染症の危険性を回避することに貢献できると考える。

培養7日以降で発育を認める検体もあったため、培養3日目で培養検査を打ち切ることはいけないものの、斜光法は、高価かつ特殊な機器を必要とせず、簡便で迅速な結果が得られる培養法として、非常に有用な方法である。今後は、LAMP法で得られた結果と斜光法での培養結果を合わせて迅速な行政対応を行い、10日間引き続き培養を継続し、最終結果として判断することが可能と考える。培養3日目の観察・同定後、最終判定日の10日目まで作業を中断することができることから、負担軽減にも功を奏し、また、検査を集中することにより検出確率が上昇する利点も考えられた。

従前より、環境水から検出される *L.pneumophila* の血清群には特徴があり、冷却塔からはSG1、浴槽水からはSG4~SG6が主に分離される<sup>6)</sup>とされてきたが、本調査の結果、SG1、SG3、SG5、SG6が約50%を占めており、その傾向は遠藤ら<sup>10)</sup>の報告と一致している。今回、結果としては示さなかったが、分離された *L.pneumophila* SG1の代表株についてPFGE法で遺伝子解析を行った結果、同時期の同一施設由来でも異なるPFGEパターンを示したことから、同一施設の同じ血清群であっても複数の遺伝子型が存在することが示唆された<sup>11)</sup>。2003年4月、レジオネラ症の診断に尿中抗原検出キットが保険適用になったことで検査件数そのものが増加し、以前は、原因不明の市中肺炎とされていた一部の肺炎患者がレジオネラ症と診断されるようになり、結果として、レジオネラ症は増加傾向に繋がっていると考えられる。しかし、感染源を特定し、感染防止対策を講じるうえでは、臨床検体からのレジオネラ属菌の分離・同定は不可欠で、医療機関との連携を図り、菌株確保に向けたより一層の努力が必要と考える<sup>12,13)</sup>。

LAMP法において、レジオネラ属菌数が少ない検体の場合等は、検査結果にバラツキが生じやすく、培養法(+)LAMP法(-)の不一致の一因として考えられた。さらに、温泉検体では、「菌数」だけではなく、検出される「菌種」や泉質などの様々な要因により、LAMP法で安定した結果が得られない場合が考えられ、測定時には注意を要する。

浴槽水(+)湯口水(-)となった施設は、浴槽

や床の清掃不足や入浴客の不適切な利用方法などが原因と考えられ、衛生管理指導の強化が望まれる。現在までの厚生労働省からの通知では、塩素消毒などの薬剤を用いた管理手法が中心となっているが、塩素管理下では *L.pneumophila* SG1が浴槽水中で優性化しているとの報告<sup>7)</sup>もあることから、塩素消毒に頼らない管理手法の早期確立が望まれる。衛生管理状態の簡便な把握手段として、ATP測定法が注目されており、今回の結果からも、従属栄養細菌数とATP値においては良い相関が認められ、ATP値を清掃の日安として、現場検査に用いることは有用な手段と考えられた。上木ら<sup>14)</sup>の報告によると、ATP値が25RLU未満である場合、レジオネラ属菌検出率は0.3%と非常に低く、ATP値を25RLU未満に維持管理することが推奨されている。しかし、今回の結果においては、従属栄養細菌数とATP値においては良い相関が認められたものの、レジオネラ属菌数とATP値には相関が認められず、ATPの数値が低いことが、即、レジオネラ属菌陰性とはならないので、注意を要する。

レジオネラ属菌の検査を実施している民間検査機関は、従来、環境検査を主とした中に、レジオネラ属菌の検査を取り入れたところも多く、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは取り組む経緯や成り立ちが異なる場合も多い。そのような場合、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは異なり、微生物検査の技術を習得し、熟練した検査員が在籍しない場合も多々ある。民間検査機関を含めたレジオネラ属菌検査にかかわる全ての検査機関の質の良い検査精度を確保するため、研修及び精度管理は今後の重要な課題と考える。

## 謝 辞

本調査を実施するにあたり、検体採取にご協力いただきました浴用施設および各保健所ならびに食品安全・衛生課の関係各位に深謝します。

## 参 考 文 献

- 1) 宮崎県福祉保健部：日向サンパーク温泉「お船出の湯」におけるレジオネラ症集団発生事例報告書，2003。
- 2) 岡田美香，河野喜美子，倉文明，前川純子，渡辺治雄，八木田健司，遠藤卓郎，鈴木泉：循環

- 式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発症状況と環境調査, 感染症学雑誌, 79, 365-374
- 3) 森本 洋: 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 環境感染誌, 2010. 25 (1): 8-14
  - 4) 「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業、研究代表者 倉 文明、H21 年度総括研究報告
  - 5) 新版 レジオネラ症防止指針, 財団法人ビル管理教育センター
  - 6) 楠木くみ子、岩谷美枝、花岡 暉、石上 武、矢野一好: 多摩地域における入浴施設水のレジオネラ属菌汚染緊急調査とその対策事例 (平成13年度), 東京衛研年報, 53, 14-19
  - 7) 鈴木敦子、市瀬正之、松江隆之、天野祐次、寺山 武、泉山信司、遠藤卓郎: 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況 - 1996年4月から2000年11月まで -, 感染症学雑誌, 76, 703-710
  - 8) 笹原武志、菊野理津子、奥田舜治、関口朋子、佐藤義則、高山陽子、青木正人、井上松久: 温泉水における Legionella 属菌汚染と泉質に関する調査・研究, 感染症学雑誌, 78, 545-55
  - 9) 磯部順子、綿引正則、清水美和子、嶋 智子、木全恵子、倉田 毅: 富山県における浴用水中の Legionella 属菌の分離状況, 富山衛研年報, 30, 110-114
  - 10) 遠藤卓郎: 厚生労働省科学研究費補助金 (健康科学総合研究事業) 循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究 平成17年度 総括・分担研究報告書, 2006.
  - 11) 寺嶋 淳: 厚生労働省科学研究費補助金 (新興・再興感染症事業) 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 平成18年度 総括・分担研究報告書, 2007.
  - 12) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報; 28: 144-145
  - 13) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報; 29: 193-194
  - 14) 「ATP測定法を用いた公衆浴場等における管理マニュアル」平成22年度 地域保健総合推進事業、分担事業者 東京都多摩立川保健所 上木隆人

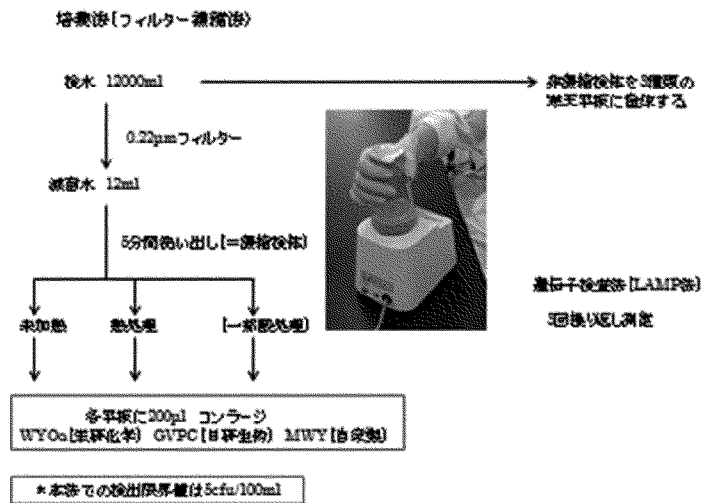


図1 検査法プロトコール

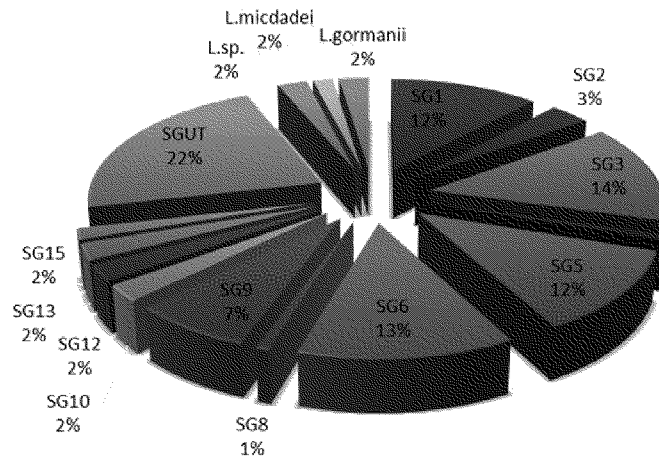


図2 分離菌株の血清群別

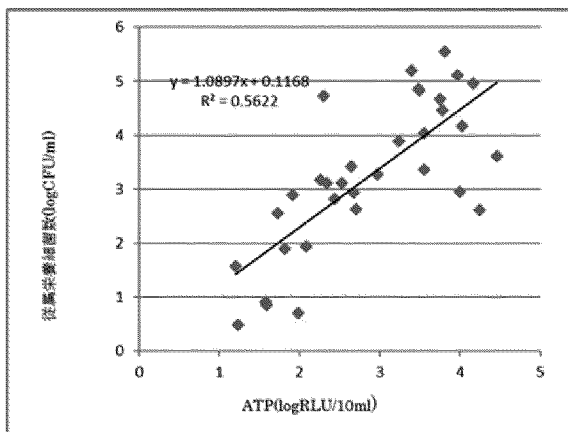


図3 従属栄養細菌数と ATP 値

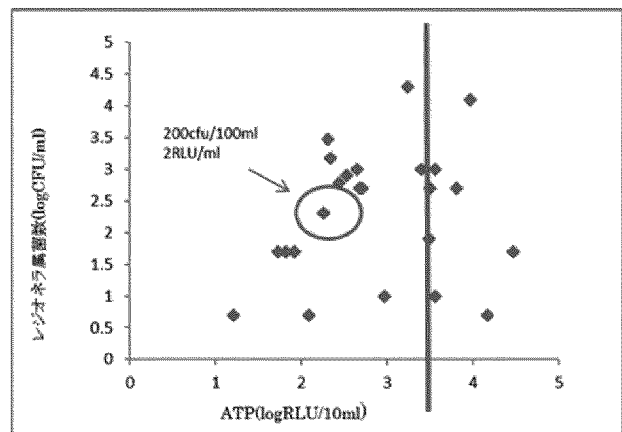


図4 レジオネラ属菌数と ATP 値  
(ATP 値 log RLU/10ml の数値 3.4 (縦線) が 25RLU に換算される)

表1 培養法の結果 (n=161)

	採水箇所	検体数	検出数			
			基準値 <sup>a</sup>	不適率	基準値によらない <sup>b</sup>	検出率
非循環式	浴槽水	68	43	63%	44	65%
	湯口水	56	19	34%	24	43%
循環式	浴槽水	19	9	47%	11	58%
	湯口水	18	7	39%	8	44%
計		161	78	48%	87	54%

a : 10cfu/100ml以上

b : 10cfu/100mlによらない (定性)

表2 浴槽水と湯口水の検出状況 (n=74)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	23	9	32
	-	22	20	42
計		45	29	74

10cfu/100mlのよらない (定性)

表3-1 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=161)

	未加熱	加熱
WYO <sup>a</sup> (市販品)	61	64
GVPC (市販品)	56	60
MWY (自家製)	56	65

10cfu/100mlのよらない (定性)

表3 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=161)

			未加熱	加熱
WYO	GVPC	MWY	44	48
WYO	GVPC		4	6
WYO		MWY	3	6
	GVPC	MWY	4	2
WYO			10	4
	GVPC		4	4
		MWY	5	9
計			74	79

10cfu/100mlのよらない (定性)

表4 斜光法と従来法の比較<sup>a</sup>

斜光法で検出	従来法のみで検出	合計
82	5	89

a : 基準値 10cfu/100mlのよらない

表5 LAMP法と培養法の比較

		LAMP法		計
		+	-	
培養法	+	66	21	87
	-	26	48	74

10cfu/100mlのよらない (定性)

表6 DNA抽出法の検討

		測定回数	LAMP法測定結果 <sup>a</sup>
LAMP法添付試薬による抽出		1回目	2/3
		2回目	0/3
キレックスによる抽出		1回目	1/3
		2回目	2/3
タカラ	カラム抽出 <sup>b</sup>	1回目	0/3
キアゲン	カラム抽出 <sup>c</sup>	1回目	0/3

<sup>a</sup> 陽性回数 / 測定回数

<sup>b</sup> TaKaRa NucleoSpin Tissue

<sup>c</sup> QIAamp DNA Mini Kit