

表1-5 ほうれんそうにおける複数機関による共同試験結果

番号 最終案	解析結果	溶媒標準液による結果				伊藤班	マトリックス標準液による結果				伊藤班	厚労省
	農薬名	平均	RSD _r	RSD _R	HorRat	判定	平均	RSD _r	RSD _R	HorRat	判定	判定
3	1-ナフタレン酢酸	0.0	—	—	0.0	C	0.0	—	—	0.0	C	
34	アセキノシル	30.6	7.9	173.2	7.9	C	31.6	6.8	173.3	7.9	C	
34	アセキノシルヒドロキシ体	0.0	—	—	0.0	C	0.0	—	—	0.0	C	
35	アセタミプリド	93.5	3.8	2.3	0.1	A	93.6	3.7	1.6	0.1	A	
63	イソウロン	92.9	3.8	0.7	0.0	A	90.8	3.8	1.6	0.1	A	
82	イマザリル	66.3	3.8	14.1	0.6	B2	65.5	3.4	9.2	0.4	B2	A
84	イミダクロプリド	91.5	5.0	3.0	0.1	A	91.3	5.6	3.0	0.1	A	A
87	イミベンコナゾール	89.8	5.1	3.7	0.2	A	88.3	5.1	6.3	0.3	A	
87	イミベンコナゾール脱ベンジル体	96.7	4.4	6.4	0.3	A	99.9	4.0	10.1	0.5	A	
97	エトキシキン	23.5	43.4	89.6	4.1	C	24.7	41.0	83.9	3.8	C	
199	クロルフルアスロン	83.6	5.3	19.5	0.9	A	87.4	5.3	17.5	0.8	A	B2
227	ジウロン	92.4	2.0	4.5	0.2	A	91.8	2.0	4.8	0.2	A	A
276	ジフルベンスロン	91.2	6.6	4.1	0.2	A	86.5	6.4	9.2	0.4	A	A
298	スピノシン D	88.2	3.8	7.3	0.3	A	95.4	4.7	14.0	0.6	A	A
329	セトキシジム	39.8	14.1	38.6	1.8	C	39.9	14.0	41.5	1.9	C	B2
350	チアベンダゾール	85.1	2.6	2.3	0.1	A	84.2	2.6	1.3	0.1	A	A
350	チアベンダゾール代謝産物	0.0	—	—	0.0	C	0.0	—	—	0.0	C	
376	テフルベンスロン	97.0	4.3	4.0	0.2	A	88.6	4.0	15.0	0.7	A	A
407	トリベヌロンメチル	0.0	—	—	0.0	C	0.0	—	—	0.0	C	
448	ハミトチオン	77.6	3.4	6.2	0.3	A	80.9	3.5	9.4	0.4	A	
478	ピメロジン	31.8	3.8	8.6	0.4	C	32.8	3.4	4.4	0.2	C	
483	ピラゾリネート	79.0	14.2	10.6	0.5	A	79.9	13.4	13.9	0.6	A	A
546	フルアジナム	79.4	11.3	15.0	0.7	A	76.4	11.2	13.5	0.6	A	
563	フルフェノクスロン	91.9	6.8	12.1	0.5	A	86.1	6.9	8.9	0.4	A	A
585	プロパモカルブ	31.5	4.7	17.4	0.8	C	32.7	5.2	13.7	0.6	C	
621	ペンシクロン	94.8	3.2	3.6	0.2	A	93.4	3.2	5.9	0.3	A	A
627	ベンゾピシクロン	73.4	7.7	4.9	0.2	A	73.7	7.1	4.5	0.2	A	B2
669	メタベンスチアスロン	92.6	3.2	1.6	0.1	A	90.3	3.2	2.6	0.1	A	A
670	メタミトホス	44.2	4.0	17.4	0.8	C	42.3	3.9	15.6	0.7	C	
710	ルフェヌロン	93.7	7.1	3.3	0.2	A	84.2	7.3	18.8	0.9	A	A
現5	イナベンフィド	84.9	3.7	3.0	0.1	A	83.6	3.7	8.4	0.4	A	B2
現28	ダイムロン	93.2	3.6	0.4	0.0	A	93.5	3.4	7.0	0.3	A	A
現34	トリシクラゾール	84.6	1.6	4.2	0.2	A	87.5	1.8	4.4	0.2	A	
現49	フェントラザミド	90.8	9.5	10.0	0.5	A	97.5	9.5	17.3	0.8	A	

表1-6 りんごにおける複数機関による共同試験結果

番号	解析結果	溶媒標準液による結果				伊藤班	マトリックス標準液による結果				伊藤班	厚労省
最終案	農薬名	平均	RSD _r	RSD _R	HorRat	判定	平均	RSD _r	RSD _R	HorRat	判定	判定
3	1-ナフタレン酢酸	0.0	—	—	0.0	C	0.0	0.0	—	0.0	C	
34	アセキノシル	0.0	—	—	0.0	C	0.0	0.0	—	0.0	C	
34	アセキノシルヒドロキシ体	0.0	—	—	0.0	C	0.0	0.0	—	0.0	C	
35	アセタムプリド	93.3	6.3	2.5	0.1	A	94.6	4.1	0.8	0.0	A	
63	イソウロン	92.5	3.6	8.3	0.4	A	101.3	3.5	10.8	0.5	A	
82	イマザリル	84.8	4.0	12.1	0.5	A	81.3	3.0	9.4	0.4	A	A
84	イミダクロフリド	101.9	5.2	7.0	0.3	A	100.2	4.8	10.0	0.5	A	A
87	イミベンコナゾール	91.4	7.8	10.3	0.5	A	90.3	8.0	1.8	0.1	A	
87	イミベンコナゾール脱ベンジル体	94.7	10.2	13.6	0.6	A	89.9	10.1	18.1	0.8	A	
97	エトキシキン	0.0	—	—	0.0	C	0.0	—	—	0.0	C	
199	クロルフルアスロン	67.3	7.0	12.0	0.5	B2	65.7	7.4	4.8	0.2	B2	B2
227	ジウロン	97.6	5.2	5.8	0.3	A	94.9	6.5	13.0	0.6	A	A
276	ジフルベンスロン	95.1	4.1	5.5	0.3	A	96.0	3.5	8.7	0.4	A	A
298	スピノシン D	84.3	7.3	20.1	0.9	A	92.5	7.0	13.1	0.6	A	A
329	セトキシジム	62.8	8.6	26.0	1.2	B2	65.2	17.2	29.5	1.3	B2	B2
350	チアベンダゾール	70.5	10.0	12.6	0.6	A	67.7	9.1	13.1	0.6	B2	A
350	チアベンダゾール代謝産物	0.0	—	—	0.0	C	0.0	—	—	0.0	C	
376	テフルベンスロン	114.0	3.1	16.3	0.7	A	96.9	3.0	5.0	0.2	A	A
407	トリバヌロンメチル	0.0	—	—	0.0	C	0.0	—	—	0.0	C	
448	ハミトチオン	89.8	6.0	6.9	0.3	A	85.8	4.9	2.2	0.1	A	
478	ピメトロジン	9.0	7.7	173.2	7.9	C	9.5	9.3	173.2	7.9	C	
483	ピラゾリネート	81.2	11.9	25.4	1.2	A	85.9	11.5	13.3	0.6	A	A
546	フルアジナム	89.2	3.6	13.5	0.6	A	84.9	3.3	11.3	0.5	A	
563	フルフェノクスロン	101.9	3.4	2.1	0.1	A	96.2	3.2	3.9	0.2	A	A
585	プロパモカルブ	24.3	14.1	46.6	2.1	C	24.0	18.1	58.6	2.7	C	
621	ペンシクロン	95.6	3.8	5.9	0.3	A	96.0	2.6	8.0	0.4	A	A
627	ペンソピシクロン	70.0	12.5	20.4	0.9	A	69.5	11.2	19.1	0.9	B2	B2
669	メタベンスチアスロン	91.8	8.4	7.1	0.3	A	89.7	9.2	12.9	0.6	A	A
670	メタミホス	39.7	4.8	5.1	0.2	C	40.3	3.8	2.6	0.1	C	
710	ルフェヌロン	100.6	6.3	16.4	0.7	A	95.5	6.0	8.7	0.4	A	A
現5	イナベンフィド	41.5	35.5	71.3	3.2	C	43.3	13.9	44.6	2.0	C	B2
現28	ダイムロン	96.7	5.4	9.1	0.4	A	98.3	4.8	4.6	0.2	A	A
現34	トリシクラゾール	78.5	9.2	19.3	0.9	A	80.8	6.4	11.1	0.5	A	
現49	フェントラザミド	96.3	6.3	7.3	0.3	A	102.2	6.4	8.9	0.4	A	

表 1-7 溶媒標準溶液による複数機関の共同試験結果一覧

番号	農産物	オレンジ			玄米			トマト			にんじん			ほうれんそう			りんご			Median (%)	RSD _R (%)	HorRat	測定限界 S/N=10.(ng)	伊藤班 判定	厚労省 判定
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3						
暫定	農薬名																								
3	1-ナフチレン酢酸	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.174	C		
34	アセキジナル	0.0	100.1	71.3	0.0	117.2	0.0	0.0	58.6	0.0	0.0	104.4	0.0	0.0	91.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	150.7	6.9	0.209	C	
34	アセキジナルピロキシホ	0.0	113.6	0.0	0.0	93.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	99.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	231.0	10.5	0.003	C	
35	アセタミプリド	96.3	131.3	91.2	89.5	148.5	88.5	97.9	96.5	94.0	97.6	88.4	122.3	94.6	91.1	94.9	90.6	94.4	94.8	94.7	16.5	0.7	0.002	A	
63	イソウロン	97.0	74.8	86.9	93.5	96.4	90.7	94.3	98.8	116.3	98.9	88.5	89.2	93.5	92.2	93.1	89.8	101.1	86.4	93.3	8.9	0.4	0.003	A	
82	イマザリル	52.1	106.9	87.1	73.3	100.4	78.6	84.2	88.5	66.6	60.0	87.1	80.7	62.2	76.9	59.6	90.9	90.6	73.0	79.7	18.8	0.9	0.008	A	A
84	イミダクロプリド	115.9	82.0	97.8	89.6	102.6	87.3	95.3	101.5	87.1	98.0	91.6	115.4	94.5	90.4	89.4	98.7	110.1	97.0	96.2	9.8	0.4	0.010	A	A
87	イミベンコナゾール	100.9	92.3	93.0	99.3	99.9	80.5	93.6	91.6	86.9	100.7	89.6	88.5	92.1	91.4	86.0	89.4	101.6	83.1	91.8	6.8	0.3	0.004	A	
87	イミベンコナゾール脱ベンジル体	99.4	176.5	86.9	93.8	108.6	100.0	97.9	91.7	112.5	96.2	111.5	98.9	91.0	103.3	95.7	106.2	97.1	80.8	98.4	19.6	0.9	0.012	A	
97	エトキシジ	0.0	19.8	73.3	0.0	37.0	0.0	0.0	38.3	15.3	0.0	0.0	50.5	6.6	16.9	47.1	0.0	0.0	0.0	3.3	134.2	6.1	0.044	C	
199	クロルフルアスロン	60.8	102.9	74.4	61.6	90.8	53.5	70.3	54.7	74.1	80.4	23.2	101.3	82.6	100.5	67.9	76.6	62.8	62.5	72.2	27.4	1.2	0.002	A	B2
227	ジウロン	101.9	60.0	91.9	91.4	70.6	69.5	95.2	96.5	95.9	99.6	83.3	83.3	94.1	87.7	95.4	92.2	103.4	97.3	93.1	13.3	0.6	0.003	A	A
276	ジフルベンズロン	111.4	102.5	91.3	88.8	131.0	83.0	95.6	98.3	92.5	96.9	94.0	91.4	88.0	95.3	90.4	94.0	100.7	90.4	94.0	11.1	0.5	0.002	A	A
298	スピリジン D	92.0	21.9	90.4	62.2	74.1	71.4	90.0	92.1	84.6	94.5	92.7	79.7	80.8	91.4	92.5	92.4	95.7	64.8	90.2	22.3	1.0	0.003	A	A
329	セトキシジ	59.3	81.5	83.9	77.1	71.7	46.0	49.9	67.1	70.0	64.0	80.3	91.0	22.1	47.5	49.9	80.7	59.0	48.7	65.5	27.6	1.3	0.003	B2	B2
350	チアベンダゾール	75.8	90.8	86.1	82.1	127.3	76.0	90.0	92.4	86.2	83.4	45.3	101.6	83.3	87.1	84.9	78.0	72.8	60.7	84.1	19.9	0.9	0.002	A	A
350	チアベンダゾール代謝産物	0.0	14.0	0.0	2.5	26.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	53.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	258.3	11.7	0.004	C	
376	テフルベンズロン	99.5	138.4	94.3	94.9	110.8	99.5	98.5	95.9	90.3	89.4	149.0	89.8	92.7	100.1	98.3	135.2	106.8	100.1	99.0	16.9	0.8	0.002	A	A
407	トリハクシロメチル	0.0	0.0	0.0	2.2	8.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	341.1	15.5	0.013	C	
448	バミダチオン	91.6	107.6	93.9	92.8	128.9	83.5	92.4	87.3	84.6	90.6	81.9	98.2	76.3	73.5	82.9	83.9	96.3	89.3	90.0	13.7	0.6	0.001	A	
478	ピロキシホ	0.0	26.9	31.9	32.8	38.9	24.0	0.0	39.9	28.3	38.2	33.6	56.9	34.9	29.5	31.1	26.9	0.0	0.0	30.3	61.3	2.8	0.004	C	
483	ピラジリネート	83.5	70.3	90.2	77.6	70.7	46.5	82.9	79.4	42.8	82.3	107.9	84.7	88.6	73.4	75.1	100.0	84.3	59.2	80.9	21.0	1.0	0.003	A	A
546	フルアジナ	99.3	120.2	81.1	62.8	103.5	83.0	88.3	87.7	82.2	74.6	110.7	101.4	90.9	80.1	67.1	102.6	85.8	79.4	86.7	16.8	0.8	0.0005	A	
563	フルフェキサスロン	100.4	95.6	110.4	95.0	100.0	96.3	103.0	90.0	98.1	95.0	90.2	88.5	88.1	104.4	83.2	101.2	104.3	100.3	97.2	7.2	0.3	0.001	A	A
585	プロパモカルブ	13.5	31.4	35.5	35.6	33.2	23.3	15.6	35.3	34.9	34.7	33.7	26.5	30.7	26.5	37.4	29.4	11.3	32.3	31.8	27.8	1.3	0.003	C	
621	ベンジクロ	97.6	95.4	90.9	92.5	99.5	87.0	103.1	93.5	93.8	96.9	94.3	95.0	92.1	98.7	93.7	98.0	99.7	89.2	94.7	4.2	0.2	0.002	A	A
627	ベンジピシクロ	67.1	69.3	61.1	74.1	96.0	63.2	69.5	79.8	61.6	75.8	73.4	91.4	75.7	75.3	69.3	80.0	76.4	53.6	73.8	14.2	0.6	0.003	A	B2
669	メタベンズチアスロン	95.1	134.4	90.8	92.2	147.7	71.1	97.5	92.2	100.1	100.7	86.3	107.0	92.9	90.9	93.9	92.7	97.7	84.8	93.4	17.8	0.8	0.002	A	A
670	メタドホス	41.3	42.0	51.9	41.0	56.2	37.2	43.0	49.5	29.8	44.3	40.4	27.5	38.0	41.9	52.8	40.2	41.5	37.5	41.4	17.4	0.8	0.008	C	
710	ルフェキサ	111.1	118.5	88.9	95.7	104.3	88.5	90.4	96.9	95.1	90.3	115.1	93.8	91.3	97.3	92.7	118.6	97.0	86.2	95.4	10.7	0.5	0.002	A	A
現5	イナベンフイト	91.4	74.1	88.1	70.2	88.1	66.2	59.3	79.7	70.3	78.8	23.9	83.1	84.2	87.7	82.7	61.4	55.6	7.5	76.4	32.3	1.5	0.006	A	B2
現28	タイムロン	82.7	114.8	23.6	92.8	118.3	91.9	99.5	91.3	81.9	98.5	87.4	111.6	93.5	92.7	93.4	90.5	106.8	93.0	92.9	21.7	1.0	0.004	A	A
現34	トリクラゾール	93.6	84.0	89.9	85.7	100.1	87.7	87.1	91.0	78.2	90.9	79.7	107.3	85.5	80.8	87.7	83.6	90.4	61.4	87.4	10.9	0.5	0.003	A	
現49	フェントラミド	90.4	59.2	119.9	97.0	83.8	88.2	84.9	114.5	98.8	89.0	100.9	83.2	91.9	99.3	81.2	94.3	104.1	90.4	91.1	14.4	0.7	0.009	A	

表 1-8 マトリックス標準溶液による複数機関の共同試験結果一覧

番号	農産物	オレンジ			玄米			トマト			にんじん			ほうれんそう			りんご			Median (%)	RSD _R (%)	HorFlat	伊藤班 判定	厚労省 判定
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					
暫定	農薬名																							
3	1-ナフレン酢酸	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0	C	
34	アセキシル	0.0	81.7	60.6	0.0	109.0	0.0	0.0	44.0	0.0	0.0	84.3	0.0	0.0	94.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	153.3	7.0	C	
34	アセキシルヒドロキシ体	0.0	126.2	0.0	0.0	104.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	84.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	233.6	10.6	C	
35	アセタミド	90.4	99.7	88.0	86.2	91.8	88.7	94.4	96.2	89.6	97.5	89.9	104.1	93.2	92.3	95.2	94.0	95.4	94.5	93.6	4.7	0.2	A	
63	イソクロン	93.5	128.7	94.6	90.4	116.0	88.6	91.3	93.0	145.0	99.5	89.8	98.3	90.8	92.3	89.4	92.8	97.4	113.7	93.2	15.5	0.7	A	
82	イマザリル	57.1	138.7	90.7	70.9	100.6	78.5	80.0	101.1	64.5	60.6	86.9	114.0	61.3	72.4	62.7	89.8	79.3	74.9	78.9	25.6	1.2	A	A
84	イミダクロリド	109.1	126.7	94.0	84.3	98.7	85.1	110.3	92.7	90.0	94.9	89.6	141.0	94.4	90.3	89.2	93.6	111.7	95.1	94.2	15.0	0.7	A	A
87	イメノコナール	93.7	102.1	89.3	98.5	100.5	77.5	86.8	101.8	83.8	100.7	89.5	107.0	89.1	93.5	82.4	89.6	92.2	89.1	90.9	8.5	0.4	A	
87	イメノコナール脱ベンジル体	97.7	110.1	80.0	88.4	98.5	80.1	107.3	88.7	100.4	92.1	96.9	73.0	93.1	95.0	111.5	101.2	97.4	71.3	95.9	12.4	0.6	A	
97	イトキシキ	0.0	33.6	73.6	0.0	35.5	0.0	0.0	36.9	3.6	0.0	0.0	35.3	8.3	17.9	48.0	0.0	0.0	0.0	1.8	136.4	6.2	C	
199	クロルフルアズロン	65.1	111.7	78.0	61.2	98.4	56.4	71.4	46.1	71.1	80.2	8.0	63.6	78.9	105.0	78.2	67.9	62.1	67.0	69.5	32.4	1.5	B2	B2
227	ジクロン	95.6	122.9	86.5	90.0	92.1	84.6	99.1	97.8	97.0	93.8	91.9	103.0	87.5	91.7	96.4	94.4	107.5	82.9	94.1	9.8	0.4	A	A
276	ジフルベンスロン	106.0	112.5	99.0	84.8	108.4	93.5	97.5	94.6	94.3	97.1	94.2	103.6	84.2	95.4	80.0	94.0	105.1	88.8	95.0	9.0	0.4	A	A
298	スピリジン D	87.6	151.8	92.4	55.4	94.6	65.1	91.8	89.6	87.6	92.0	93.2	104.8	84.5	110.3	91.4	94.1	103.7	79.6	91.9	21.1	1.0	A	A
329	セトキシジム	58.1	77.6	78.7	76.7	59.4	42.4	48.2	69.4	68.9	63.0	81.2	81.9	20.9	47.9	51.0	79.2	73.2	43.3	66.0	27.5	1.3	B2	B2
350	チアベンダゾール	80.8	136.6	84.7	78.0	100.6	73.6	84.9	92.0	82.2	83.4	45.5	80.7	83.0	84.8	84.9	76.7	67.5	58.9	82.6	22.2	1.0	A	A
350	チアベンダゾール代謝産物	0.0	40.7	0.0	2.5	42.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	69.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	235.0	10.7	C	
376	テフルベンスロン	95.8	92.8	91.8	95.8	74.8	93.5	97.1	94.1	83.8	89.1	107.4	72.2	92.3	99.7	73.8	102.4	94.8	93.4	93.4	10.5	0.5	A	A
407	トリハズロンナサル	0.0	0.0	0.0	2.1	6.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	260.9	11.9	C	
448	ハミドチオン	91.9	112.5	88.2	89.0	101.0	79.9	84.4	82.6	83.2	89.8	87.7	78.4	76.0	77.1	89.7	86.1	87.5	83.7	86.8	10.0	0.5	A	
478	ヒメクロシン	0.0	29.6	31.4	31.0	28.4	23.3	0.0	37.4	27.3	37.7	36.2	51.3	34.5	31.7	32.3	28.5	0.0	0.0	30.3	59.5	2.7	C	
483	ヒラゾリネート	86.3	108.2	81.9	77.0	125.4	84.1	81.6	81.7	59.0	73.4	119.8	126.3	92.7	74.6	72.5	98.9	80.7	77.9	81.8	21.6	1.0	A	A
546	フルアジナム	85.8	104.4	81.7	62.0	102.6	82.3	88.2	86.4	82.2	69.9	98.7	94.3	87.0	75.9	66.3	96.0	79.2	79.5	84.1	14.0	0.6	A	
563	フルフェリクスロン	100.1	106.1	94.2	93.9	106.6	91.6	101.7	82.1	96.6	95.0	92.4	108.0	84.4	94.4	79.4	92.6	100.1	95.8	94.7	8.3	0.4	A	A
585	フロハモカルブ	11.4	39.8	38.1	33.5	41.9	24.5	8.6	34.8	34.7	34.0	33.6	26.9	31.7	28.8	37.6	28.7	8.2	35.0	33.5	34.8	1.6	C	
621	ベンジクロン	100.9	102.3	88.6	90.6	117.4	83.0	102.1	92.6	93.2	97.5	90.6	124.5	87.1	96.7	96.6	93.2	104.8	90.2	94.9	10.7	0.5	A	A
627	ベンジベンジクロン	75.0	104.4	74.7	72.7	95.3	80.1	64.8	78.4	71.7	74.3	74.4	105.2	72.0	77.6	71.7	79.6	74.4	54.5	74.6	16.1	0.7	A	B2
669	メハンスチアズロン	99.2	107.1	87.8	91.0	95.9	77.3	98.7	88.1	77.3	105.2	89.4	55.8	87.6	91.4	92.0	94.0	98.5	76.6	91.2	13.5	0.6	A	A
670	メタミドホス	38.5	30.9	52.2	39.9	52.9	36.5	35.9	48.5	29.9	44.7	41.9	45.4	37.9	39.1	49.9	40.9	40.9	39.1	40.4	15.8	0.7	C	
710	ルフェエロン	104.2	99.3	89.9	94.8	112.8	89.7	99.8	86.2	92.4	88.1	97.3	58.2	85.7	99.3	67.7	101.9	98.6	86.1	93.6	14.0	0.6	A	A
現5	イナベンブイト	88.0	102.2	82.8	68.6	101.6	69.9	59.3	80.4	64.4	78.1	22.0	90.6	79.2	91.7	79.9	60.6	46.9	22.5	78.7	32.3	1.5	A	B2
現28	タイルムン	93.1	116.2	81.9	91.3	117.0	99.4	100.4	86.3	82.8	97.2	92.3	94.1	88.2	91.5	100.9	94.8	103.4	96.7	94.5	10.0	0.5	A	A
現34	トリシクテリール	85.8	127.2	92.9	83.4	108.8	83.8	94.1	89.9	83.9	88.5	85.5	106.4	83.2	88.5	90.8	83.2	88.3	70.9	88.4	13.7	0.6	A	
現49	フェントラサミド	112.5	118.0	67.8	96.5	104.5	90.7	78.4	69.5	91.6	89.6	94.2	139.9	87.6	117.0	87.9	97.9	112.6	96.0	95.1	18.4	0.8	A	

健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制
の現状把握と検査等の精度管理体制に関する調査研究

分担研究報告書

バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理(II)

分担研究者 小倉 肇 岡山県環境保健センター所長

研究要旨:

今年度、電子顕微鏡的検査の精度管理参加は研究協力者の在籍する地研をのぞいて31地研であった。天然痘ウイルスによるバイオテロ疑い発生時の検体採取法を新たに加えた「電子顕微鏡的ウイルス診断のためのウイルス固定法及び染色法マニュアル 改訂版」を作成して、全地研にメール配布した。その後で、天然痘ワクチンウイルス、ヘルペスウイルス、SARSコロナウイルス、インフルエンザウイルスの固定標本および陰性コントロールを送付して精度管理を行った。正解率は、天然痘ワクチンウイルス(ポックスウイルス)51.6%、ヘルペスウイルス87.1%、SARSコロナウイルス51.6%、インフルエンザウイルス(オルソミクソウイルス)74.2%、陰性対照90.3%であった。これらの精度管理結果と我々の研究活動をまとめて、国際電子顕微鏡学会で発表し学問的評価を得た。本研究の目的は各検査者の評価、格付け等を行うことなく、行政から求められている健康危機発生時検査の信頼性及び精度の向上である。従って今回の精度管理参加者にとっては、またとない経験を積む良い機会となったと思われる。検体資料は再検査をするのに十分な量を送付してあるので、再検査や今後のレファレンス資料として保存するように指示を行った。また、厚生労働科学研究・地域保健総合推進事業(織田班)と連携して、中四国ブロックにおける微生物部門研修として電子顕微鏡検査を取り上げ、各地研担当者10名に対して講義、実習を行った。このような研修による検査機能強化により、地研の健康危機管理における技術的、科学的中核としての存在価値は高まることになる。

研究協力者

	左近直美	(大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課研究員)	
藤井理津志	(岡山県環境保健センター ウイルス科長)	宇田川悦子	(国立感染症研究所主任研究官)
大瀬戸光明	(愛媛県立衛生環境研究所 衛生研究課長)	後藤俊幸	(京都大学医学部保健学科助教授)
西村公志	(大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課主任研究員)	H. Gelderblom	(国立コッホ研究所教授、電子顕微鏡的ウイルス検査外部精度管理国際アドバイザー)

A. 研究目的

地方における健康危機の内でも、平成16年度に福山市の老健施設で発生したノロウイルス感染症は、死者を出す大きな社会問題となった。また、近年発生が特に危惧されているものとしてバイオテロと高病原性ウイルスによる広域感染症がある。

これらを検査する最前線として地方衛生研究所（地研）や国立感染症研究所が位置付けられている。

バイオテロの内でも最も危険性が高いとされているのは天然痘ウイルスによるものであり、また、広域感染症としては新型インフルエンザ、ウエストナイル病やSARSが上げられる。天然痘と水痘の様な水疱性疾患では、水疱液をネガティブ染色し電子顕微鏡的に観察すれば、ポックスウイルスかヘルペスウイルスかの鑑別は迅速簡易に出来る。インフルエンザウイルスやSARSコロナウイルスの電子顕微鏡的形態には特徴があり、訓練さえしておけば診断は容易である。このように、電子顕微鏡的診断法は高く評価されている。ただ、教育訓練と精度管理をしておかないと上記診断法も役には立たない。

当研究では、地研における電子顕微鏡的ウイルス診断の精度管理を通して、検査の信頼性及び精度の向上を目的とした。

B. 研究材料と方法

1. 材料 精度管理用試料として、天然痘ワクチン生ウイルス（ポックスウイルス）、SARSコロナウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルスを用いた。

天然痘ワクチン生ウイルス（LC16・チバ）はバイオテロ対策のために厚生労働省から各都道府県に配布されたもので、使用期限が終了したものを許可を得て使用した。SARSコロナウイルス（フランクフルト株）はVero-E6細胞で増

殖したもので山本直樹国立感染症研究所エイズ研究センター長より分与を受けた。インフルエンザウイルスワクチン株（A/Wyoming/03/2003）は発育鶏卵で培養したショウ尿膜液を粗遠心したものを使用した。ヘルペスウイルスHSV-1はネコ腎CRFK細胞で培養した。

2. ウイルス固定法・染色法マニュアル改訂

昨年度作成配布したマニュアルの改訂のために、メールによる協力者間での検討を重ねた。

H.Gelderblom教授から提供された、天然痘疑似事例が発生したときの患者からの検体採取法（写真入り）を追加する等の改訂版（別紙）を作成して全地研の代表メールアドレスへ送信した。

3. 固定剤 ウイルスの固定剤としてはパラフォルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、フォルマリンを使用し、マニュアル（別紙）通りに調整した。各々による固定の後、電子顕微鏡的ウイルス形態の比較をした。

4. 精度管理 固定したウイルス標本を、まず研究協力者（レファレンスセンター）に送付して診断してもらい、4施設の内3施設以上が正解としたものを精度管理に参加する地研宛にクール宅急便で送付した。なお、ウイルス診断の補助となりそうな検体に関する情報を検体送付時に加えた（表1）。1ヶ月の期限以内に回答を求め、結果を集計した。正解ウイルス名、正解率を模範的なウイルス電子顕微鏡写真像（図1）を添えてコメントと共に地研に還元した。

5. 学会発表 昨年度と今年度の精度管理結果および我々の研究活動をまとめて、札幌で開催された第16回国際電子顕微鏡学会で[Electron

microscopic diagnosis of viruses in Japan]として発表した。

6. ウイルスのネガティブ染色による電子顕微鏡技術研修 中四国ブロックでは、厚生労働科学研究地域保健総合推進事業織田班と連携して、今回の精度管理に使用したウイルス試料を用いて電子顕微鏡技術研修を行った。中四国から愛媛県立衛生環境研究所へ参集した10名の参加者に対して、厚生労働科学研究今井班分担班長の小倉が「バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査について」講演をし、研究協力者の西村が「ネガティブ染色によるウイルス粒子観察法」の講演の後、同じく研究協力者の大瀬戸、藤井が加わり技術研修を行った。

結果と考察

1. 固定剤による形態の変化

3種類の固定剤を用いた電子顕微鏡像の違いをまず調べた。ホルマリン、グルタルアルデヒドは調整が簡単であるが、ウイルス画像、特にSARSコロナウイルスの表面構造であるスパイクがはずれやすかった。その点、パラホルムアルデヒドは調整に手間がかかるものの、比較的SARSウイルスのスパイクがはずれにくく保存されていた。ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルスに関してはどの固定剤でもさほどの差は見られなかった。以上の結果より、精度管理用ウイルスは全てパラホルムアルデヒド固定して各地研へ送付した。

2. 精度管理の結果

表2に示すように、精度管理正解率はポックスウイルス51.6%(16/31)、SARSコロナウイ

ルス(コロナウイルス)51.6%(16/31)、インフルエンザウイルス(オルトミキソウイルス)74.2%(23/31)、ヘルペスウイルス87.1%(27/31)、陰性対照90.3%(28/31)であった。

約半数の地研でポックスウイルスとSARSコロナウイルスを正しく診断できなかった結果となった。従来、地研では胃腸炎ウイルスしか検査する機会には恵まれず、ウイルス映像を見たことがないため正しく判定できなかったであろうと思われる。ただ、ポックスウイルス検査で9地研はウイルスが見えなかったと回答した。ウイルス量が他の試料と比較して少なかったこともあり、再検査をお願いしてあったが、3地研よりポックスウイルスが検出できたと報告があった。3地研からは再検しなかったと報告があり、3地研からは回答がなかった。

陰性対照試料にウイルス様粒子が見えたとの回答が3地研よりあった。試料の取り違い、またはネガティブ染色中の汚染が考えられるために再検をお願いしてあったが、再検の結果ウイルス陰性が1地研、再検せずが1地研、回答なしが1地研であった。

3. 学会発表

当研究の学問的評価を問うために、国際電子顕微鏡学会で発表した(学会発表1参照)。

座長を務めたDr. H. Gelderblomから良い仕事であるとの評価を得た。

4. ウイルスのネガティブ染色による電子顕微鏡技術研修

今回の精度管理に使用した固定ウイルス試料を用いての電子顕微鏡技術研修には、中四国各県より10名の参加者があった。電子顕微鏡研修としては適当な参加者数であった。2日間の研修の成果は大きく、参加者の電子顕微鏡検査

技術は向上し好評であった。

D. 結論

1. 電子顕微鏡的ウイルス診断のための固定法及び染色法マニュアルを改訂し、全地研に配布した。

2. 電子顕微鏡的ウイルス検査に使用する固定剤はパラフォルムアルデヒドが最適であった。

3. 31地研に対して、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、SARSコロナウイルス、インフルエンザウイルスおよび陰性対照標本を用いて検査の精度管理を行った。

4. ウイルス検査の精度管理の結果、ポックスウイルスとSARSコロナウイルスは約半数の地研で正解が出せなかった。これは経験不足による正しい判定が出来なかったことが原因と思えたが、今回の貴重な経験を通じて経験を広め、技術習得に大いに役立ったと思われる。陰性対照試料にウイルス様粒子が見えたとする回答が3件あったが、精度管理上試料の取り違い、染色中の汚染には特に注意する必要がある。

5. 中四国ブロックのみではあったが、電子顕微鏡技術研修が開催でき、参加した電子顕微鏡担当者に好評で、技術習得が出来たことは大変良かった。研修をすることで、地研の健康危機管理における技術的、科学的中核としての存在価値が出てくる。

6. 当研究は国際学会でも学問的評価を得ることが出来た。

電子顕微鏡による検査は迅速性においても優れており、視覚で確認できるので地研においてぜひ併用されるべきである。今後、精度管理への参加による更なる訓練と実践経験により、地研のウイルス検査機能が向上することを期待したい。

E. 健康危機情報

該当なし

F. 研究発表

著書

1. 宮道慎二、奥田徹、井上勲、後藤俊幸ら編：「微生物の世界」pp.230、筑波出版会、つくば、2006.

論文発表

1. Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nishijima, M. and Ogura, H. Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005. J. Clin. Microbiol., in press, 2006
2. Gelderblom, H.R., Bannert, N., Muss, W., Madeley, C.R. Routine, rapid, non-invasive diagnosis of viral skin exanthems. Brit. J. Derm. 154, 158-560, 2006
3. Gelderblom, H.R., Bannert, N., Pauli, G. (2006) Disinfection in diagnostic electron microscopy prior to preparation? J. Infect. in press 2006
4. Schroeder, J.A., Gelderblom, H.R., Hauroeder, B., Schmetz, Ch., Milios, J., Hofstaedter, F. Microwave-assisted tissue processing for same-day EM-diagnosis of potential bioterrorism and pathological samples. Micron 37, 577-590, 2006
5. Okada, M., Tanaka, T., Oseto, M., Takeda, N., Shinozaki, K. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. Arch.Virol.151, 1635-1641, 2006

6. 小倉肇、Gelderblom, H., 藤井理津志、大瀬戸光明、西村公志、左近直美、宇田川悦子、後藤俊幸 バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理
平成17年度厚生労働科学研究 健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制の現状把握と検査等の精度管理体制に関する調査研究報告書27-53 (2006)
7. 左近直美 季節を問わず発生するノロウイルス感染症と食中毒
食品衛生研究 56, 17-24, 2006
8. 左近直美、山崎謙治、依田知子、大竹徹、塚本定三 大阪府におけるC群ロタウイルスによる集団胃腸炎の発生
病原微生物検出情報 27, 14-15, 2006
4. Goto T, Budgell B, Fukui T, Sano K
Localization and configuration of nucleic acid in virus particle by electron microscopy.
XVI International AIDS Conference, Toronto, Canada 2006
5. 藤井理津志、葛谷光隆、濱野雅子、小倉肇
電子顕微鏡法をスクリーニングとして用いた散発性胃腸炎原因ウイルスの検索
第47回臨床ウイルス学会、東京、2006
6. 濱野雅子、藤井理津志、葛谷光隆、小倉肇、金谷誠久
岡山市における小児の感染性胃腸炎散発例からのNorovirus, Sapovirus及びAstrovirusの検出状況 (2004-2006)
西日本感染症学会、岡山、2006

学会発表

1. Ogura H., Fujii R., Oseto M., Nishimura H., Sakon N., Utagawa E. and Goto T.
Electron microscopic diagnosis of viruses in Japan
第16回国際電子顕微鏡学会 (IMC16)
札幌 2006
2. Gelderblom H.R.
Rapid diagnostic electron microscopy in infectious diseases emergencies : Update 2006
第16回国際電子顕微鏡学会 (IMC16)
札幌、2006
3. Goto T, Kido T, Daikoku E, Sano K
PCR-in situ hybridization at electron microscopic level of adenovirus-infected cells.
第16回国際電子顕微鏡学会 (IMC16)
札幌、2006
7. 豊嶋千俊、近藤玲子、大瀬戸光明、井上博雄、山下育孝：愛媛県内の高齢者入所施設における感染性胃腸炎の集団発生とノロウイルスの消毒について。
平成18年度全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会、東京、2006

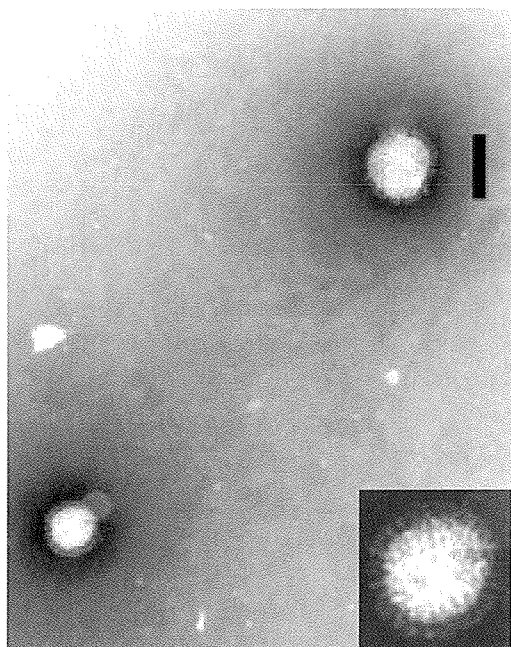
表 1

	ウイルス名(有無)	検体の情報	観察状態	サンプルに対するコメント	親水化法
A		咽頭拭い液の鶏卵培養液			
B		水疱液の細胞培養液			
C		水疱液の細胞培養液			
D		咽頭拭い液の鶏卵培養液			
E		水疱液の細胞培養液			

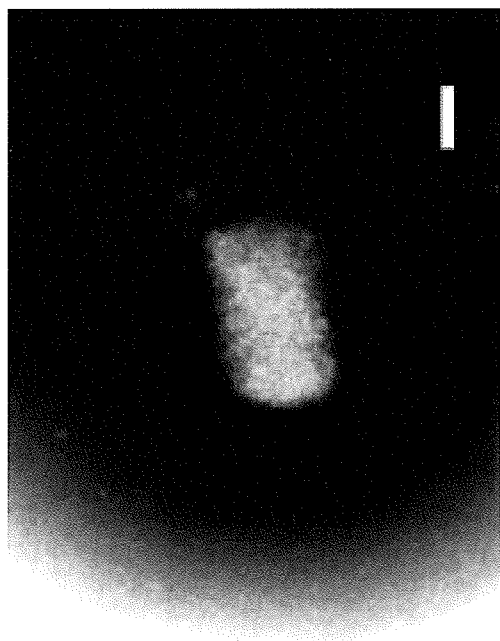
表 2

検体	ウイルス	正解率	
A	インフルエンザウイルス	23/31	(74.2%)
B	ポックスウイルス	16/31	(51.6%)
C	陰性対照	28/31	(90.3%)
D	SARS コロナウイルス	16/31	(51.6%)
E	ヘルペスウイルス	27/31	(87.1%)

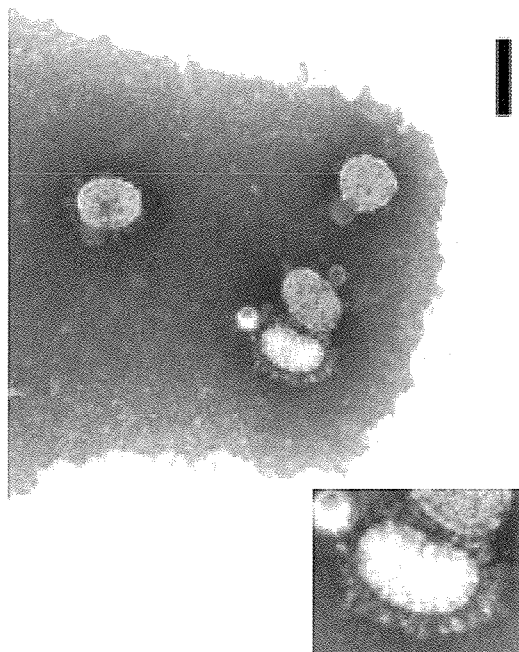
図1 精度管理標本ウイルス



インフルエンザウイルス



ポックスウイルス



SARS コロナウイルス



ヘルペスウイルス

別紙

平成18年度厚生労働科学研究小倉分担班
「バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理」

電子顕微鏡的ウイルス診断のためのウイルス
固定法及び染色法マニュアル（改訂版）

電子顕微鏡的ウイルス診断のためのウイルス固定法及びネガティブ染色法

I. 膜張りグリッドの用意

支持膜の作り方は種々の方法があるが、例として湿式法コロジオン膜と乾式法ホルムバル膜の作製法を示す。

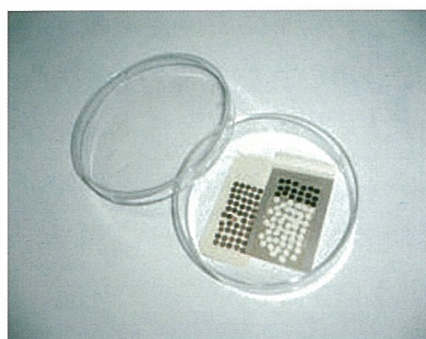
1. コロジオン支持膜（湿式法）の作製

- 1) Grid (VECO 400mesh Cu / オランダ製) を用意
- 2) バイアルに上記グリッドを移し、アセトンで3回洗浄
- 3) ドラフトで濾紙上に広げ、乾燥
- 4) グリッドを1枚ずつピンセットで掴み、2% コロジオン/酢酸アミル or 0.5% ネオプレンW/トルエンに浸けて濾紙上に叩きつけコーティング（接着剤を必ずしも使用しなくても可）
- 5) ドラフトでそのまま乾燥
- 6) 市販のコロジオン膜張器（日新 EM 650）にステンレスの網板を沈める
- 7) 約 40℃の蒸留水を満たす
- 8) ステンレス網板の上に 400 メッシュの銅製グリッドの表を上に向け 50 枚程度並べる
- 9) 2%コロジオン液（酢酸アミル溶液）（日新 EM 601）をパスツールピペットで1滴静かに滴下
- 10) 10分程度静置し酢酸アミルが揮発するのを待つ
- 11) 膜張器の下のコックを緩め、静かに水を抜いて水位を下げ、銅製グリッドにコロジオン膜を張り付かせる
- 12) ステンレス網板ごと取り出し、濾紙上で水切りした後、乾燥
- 13) カーボン蒸着してコロジオン膜を補強する。カーボンの蒸着量は、銅製グリッドの側に置いた濾紙が薄く着色する程度が良い
（応研商事の真空蒸着膜比較版セットの 100-160A の厚み）

コロジオン膜の厚さは、滴下する水面の面積、水温、溶液の濃度、滴下量によって決まる。作製条件や使用する器具は一定にし、膜の厚さは滴下量で調整するのがよい。適当な口径のピペットを選び常に同じものを使用するようにする。

2. ホルムバール支持膜（乾式法）の作製

- 1) Grid (VECO 400mesh Cu / オランダ製) を用意
- 2) バイアルに上記グリッドを移し、アセトンで3回洗浄
- 3) ドラフトで濾紙上に広げ、乾燥
- 4) グリッドを1枚ずつピンセットで掴み、2% コロジオン/酢酸アミル or 0.5% ネオプレンW/トルエンに浸けて濾紙上に叩きつけコーティング（接着剤を必ずしも使用しなくても可）
- 5) ドラフトでそのまま乾燥
- 6) 市販のホルムバール膜張器（日新 EM 652）に新しい清浄なスライドグラスを入れる（古いスライドグラスは不可）
- 7) 0.5-1% Formbal/1,2-dichloroethane の液面を上げて下げることでスライドグラスをホルムバール液で濡らせる（日新 EM 602）
- 8) スライドグラスの1,2-dichloroethane が揮発するのを待つ
- 9) スライドグラスのホルムバール膜の四辺にカミソリで切れ目を入れる
- 10) 清浄なビーカー（500ml）に蒸留水を9分目程度入れる
- 11) 切れ目を入れたスライドグラスを斜めにして水に沈めホルムバール膜をはがし水面に浮かせる
- 12) ホルムバール膜に洗浄コーティング済み400メッシュの銅製グリッドを表を下に向け50枚程度、静かに載せる
- 13) 清浄なケント紙の片側下面を膜面にあて、垂直に沈めホルムバール膜をケント紙に張り付ける
- 14) 水滴を吸い取りシャーレに入れ、37℃ふらん器内で乾燥
- 15) カーボン蒸着でホルムバール膜を補強。
カーボンの蒸着量は、銅製グリッドの台紙が薄く着色する程度が良い
（応研商事の真空蒸着膜比較版セットの 150-200A の厚み）



- 16) デシケータ保存

支持膜張り・カーボンコーティング済みグリッドの入手

市販のカーボンコーティング済の膜張りグリッドとして、日本電子データの 400mesh (カタログ上には 200mesh までしかないが、400mesh を特注可能) や日立製品等を利用可能。当研究班で試用してみたところ、膜の強度に関してロットによるばらつきがあった。

II. 膜張りグリッドの親水処理法 (特に固定ウイルスサンプルの場合は必要

(親水化の効果は 1-2 日でなくなるので出来るだけ早く使う。数日後使用する場合は再処理)

1. Ion sputter AC 500V 5mA 15~20sec



2. Ion sputter のない場合は UV ランプ処理でも良い

(6~10cm 離して 20 min 以上照射、overnight しても良い)

3. さらなる親水処理法として Alucianblue (SERVA) 液を用いる方法

stock solution 2% 水溶液 (使用時には再蒸留水で 1% とすると 4℃ で一ヶ月は安定している)

a) パラフィルム上に Alucianblue 液 1 滴をつくり、グリッドを 5~10 min 浮かべる。

b) パラフィルム上に再蒸留水を 5 滴つくり、グリッドをピンセットでつかみ Alucianblue を洗うように順次浸す (少し青みがある程度まで)。濾紙片で残りの液を吸い取る (少しはぬれている程度まで)

c) 素速くサンプルをグリッドに乗せて、適当な時間吸着させる。

4. 牛血清アルブミン (BSA) をウイルスサンプルないし染色液に最終濃度 0.005~0.05% になるように加える。

III. ウイルスサンプル固定法

1. 試料

- 1) 培養細胞液(そのまま、または濃縮、場合により固定してから濃縮)
- 2) 糞便材料 (超遠心濃縮精製した Gastroenteritis virus)
- 3) 水疱液 (天然痘疑い等の場合)

2. 固定法

1) サンプルを液の状態で固定する方法

a) 3%パラフォルムアルデヒド (Paraformaldehyde) で 20min 以上固定。

Paraformaldehyde (応研 TAAB Paraformaldehyde EM Grade)を購入。

12% になるように 0.05M Hepes buffer (pH7.2) 20ml に入れて 60～70℃ に保ち 10N NaOH 液を透明になるまで滴入する(約 300ul)。

冷却濾過後、 1N HCL で pH7.2 に合わせる (約 1ml)。

1ml ずつ サンプルチューブに分注し、－20℃に保存する。

使用時には室温で(ウイルス材料 3 ml : Paraformaldehyde 液 1 ml) に混じ

20分固定する。最終濃度 3% Paraformaldehyde Virus 液 4ml が出る。

b) 3%のホルムアルデヒド (Formaldehyde) で 20min 以上固定

1ml の試料に Formalin(和光純薬 064-00406、37%ホルムアルデヒド、新しい物を使用)を 88ul 加えると 3% になる。

c) 3%グルタルアルデヒド (Glutaraldehyde) で 20min 以上固定

1ml の試料に 20% Glutaraldehyde (和光純薬 072-02262) を 176ul 加えると 3% になる。

2) グリッド上のサンプルを固定する方法

ウイルス液をグリッドにのせて空気乾燥させた場合は、1%グルタルアルデヒド 液中で 10 分固定し、再蒸留水で 2 回洗浄し、染色する。

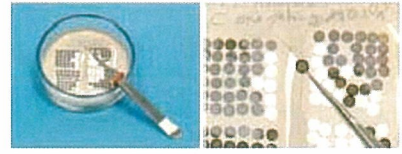
天然痘疑い水泡液の固定法（ベッドサイドで行う4方法）



①



②③



④

(Dr. G. Gelderblom 原図、出典 Gelderblom, H.R., Bannert, N. (2005) Diagnostic electron microscopy in infectious diseases emergencies and bioterrorism. European Microscopy Society, Yearbook 2005, (ISSN 1609-1191), Editor: Peter Hawkes, pp 47-54)

①光学顕微鏡用スライドグラス塗末標本を固定（数枚作成すること）

水泡をハサミかピンセットで開き、スライドグラスを注意しながら押しつけるか注射器に採取した水泡液を乗せる。プレパラートを空気乾燥後、容器内PBSまたはHEPES-buffer中の4%ホルムアルデヒドで5秒固定。中間にマッチ棒を挟んでこすれ合わないようサンドイッチ状として容器に入れ電顕室へ運ぶ。この塗末部に20ulのホルムアルデヒド緩衝液を乗せて懸濁し、グリッドに取る（浮遊させて）

②シリンジに固定液を入れておき水泡液を吸引採取

③エッペンドルフチューブにホルムアルデヒド固定液を入れておき、シリンジに吸引した水泡液を注入

④グリッドを水泡液または水泡病巣の基底部へ触れさせ、空気乾燥後ホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒド固定 （基底部にウイルスが一番多い）

Ⅳ. ネガティブ染色法

1. ネガティブ染色液

1) Phosphotungstic Acid (PTA) (日新 EM 3261)

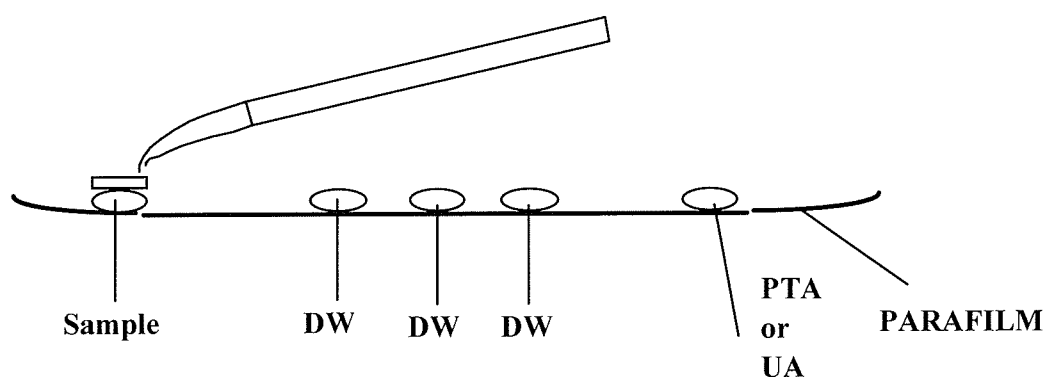
2% Phosphotungstic Acid (PH 7.1) 1N KOH または 1N NaOH で調整

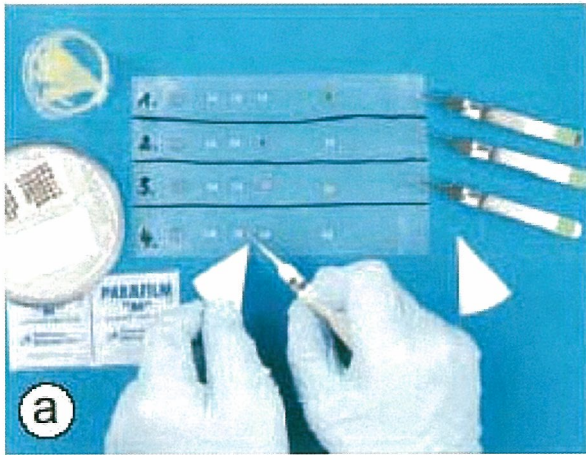
2) Uranyl acetate (UA) (ただし、「核原料物質、核燃料物質及び原子炉等の規制に関する法律」第61条の3第1項に基づき国際規制物資使用許可を受ける必要がある。)

1～2% Uranyl acetate 水溶液 (PH 調整不要)

2. ネガティブ染色操作

1) グリッド移動法 (フローティング法)





パラフィルムを用意し、その上に染色液滴を作り、グリッドのサンプル面を下にして浮かべることにより染色する。

(汚染 contamination を防ぐため、サンプルごとにピンセットを替えること)

a) ウイルス溶液 (10ul) をパラフィルムにのせ、グリッドのサンプル面を下にして浮かべ、静置 1min~10min

b) 小さく切った濾紙で吸い取り

c) 試料の塩類含量が多い場合は、試料を吸い取った後、直ちに蒸留水 1 滴 ~ 3 滴で洗浄してから染色すると良い。

d) PTA 溶液 または UA 溶液 (10ul)

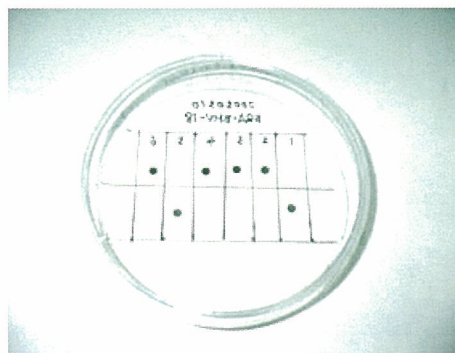
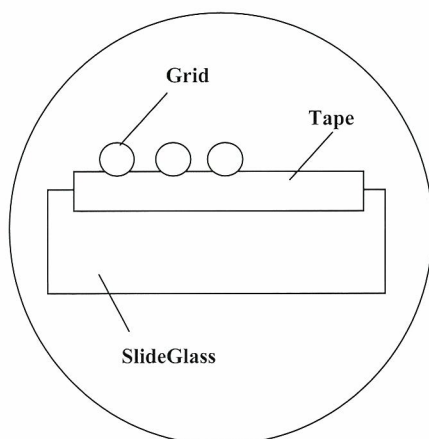
パラフィルムにのせ、グリッドのサンプル面を下にして浮かべ、静置 1min

e) 小さく切った濾紙で吸い取り (グリッド面が一様に濡れた状態)

f) 37~45℃ インキュベータで乾燥

g) 乾燥後、濾紙をひいたシャーレに移動する

2) グリッド固定法



- スライドグラスとメンディングテープを使ったグリッドクランプ (上図)を入れたシャーレを用意
- グリッドのサンプル面を上にしてグリッドクランプに接着
- ウイルス溶液 (5~10 ul)をグリッドにのせ静置 1~3~10min
- 裂いた濾紙で吸い取り (グリッド面が一様に濡れた状態がよい)
- PTA 溶液 または UA 溶液 (5~10 ul) (洗うときは2回) をグリッドにのせ静置 1min
- 裂いた濾紙で吸い取り (グリッド面が一様に濡れた状態がよい)
- 37~45℃ インキュベータで乾燥
- 乾燥後、濾紙をひいたシャーレに移動

V. 観察・撮影・プリント

- EM (Transmission Electron Microscope) 倍率 $\times 40,000$ で観察
試料の観察は常に同一倍率で行うのがよい (4 万倍を使用)
低倍で分散を確認・撮影し、高倍で 1 グリッドにつき少なくとも 5 スクエアは観察し・粒子の有無を判定する。
(試料の載りかたにより観察するスクエア数を調節)
- ウイルスを撮影し、フィルム現像
- フィルムスキャナーを用いてデジタル化または倍率 2 倍でプリント