

直接鏡検法におけるニューマン染色液ならびに ブロードハースト・パーレイ染色液の同等性の検証について

1. 目的

生乳の細菌数ならびに体細胞数を計測する直接鏡検法において用いられるニューマン染色液は、成分として含まれる1,1,2,2-テトラクロロエタンが発がん性物質として特定化学物質障害予防規則における特定化学物質の第2類物質「特別有機溶剤等」の中に位置づけられるとともに、特別管理物質に指定されている。そのため、使用に際しては従事者の健康障害防止の観点から有機溶剤中毒予防規則の準用など必要な措置が義務付けられている。そこで、より有害性の低い代替試薬の候補であるブロードハースト・パーレイ(以下、BHP)染色液への変更を検討するため、ニューマン染色液との同等性の検証を行ったので報告する。

2. 方法

(1) 染色液

ニューマン染色液の代替試薬として、過去に本会における個乳細菌数検査において使用実績があるBHP染色液を候補とした。BHP染色液は、本会の前身である(社)北海道生乳検査協会 昭和60年度生乳検査事業成績書「直接鏡検法におけるブロードハースト・パーレイ染色液の改良について」の方法に従って調製し、試験に供した。

(2) スライド標本の作成

細菌数検証用試料は、細菌数検査実施事業所である3事業所(札幌、根室、釧路)において、それぞれ2試料を用意し、生乳取扱技術必携(平成24年10月版)に記載された直接鏡検法の実施手順に従いスライドガラスに塗抹し乾燥した。塗抹乾燥した標本はニューマン染色液ならびにBHP染色液で染色した後、水洗し乾燥させた。染色時間はニューマン染色液が数秒間、BHP染色液は1分間とした。

体細胞数検証用試料については調査試験課において、事業所間クロスチェック試料(体細胞数用)を用いて、細菌数検証用試料と同様にスライド標本を作成した。

(3) 同等性の検証

1) 細菌数

スライド標本を作成した3事業所において、それぞれ全検査員で、同一視野を観察し、細菌の識別・計測の確認(目合わせ)を行った。

各検査員が各試料について16視野計測し、仮平均値を算出した。

仮平均値から、 $\pm 100\%$ の測定値を除外し、標本平均値を算出した。

標本平均値から 50% < の検査員については、再度目合わせを行った後、再計測を行った。

全事業所、全検査員の計測データを収集し、ニューマン染色液ならびに BHP 染色液の平均値の比較および、t 検定（等分散を仮定した 2 標本による検定）により同等性の検証を行った。

2) 体細胞数

調査試験課 2 名の試験者により、1 試料当り 288 視野（16 視野×9 回×2 名）計測し、ニューマン染色液ならびに BHP 染色液の平均値の比較および、t 検定（等分散を仮定した 2 標本による検定）により同等性の検証を行った。

3. 結果および考察

(1) 同等性の検証

1) 細菌数

細菌数の同等性の検証結果は、表 1 に示すとおりである。ニューマン染色液ならびに BHP 染色液の平均細菌数は、BHP 染色液の方が僅かに高い値を示したが、一方、t 検定（5%危険率）は、全試料について、ニューマン染色液と BHP 染色液の細菌数に有意差は認められなかった。

表1 細菌数の同等性の検証

実施事業所	試料種別	ニューマン	BHP	t-検定(5%危険率)		
		平均細菌数 万/ml	平均細菌数 万/ml	t値	t境界値	P値
札幌・道北・道南	A	258	255	0.16	2.06	0.87
	B	354	348	0.46	2.06	0.65
根室・道北・道南	A	283	302	-1.20	2.07	0.24
	B	602	697	-1.57	2.07	0.13
釧路・帯広	A	169	148	1.02	2.23	0.33
	B	297	270	1.13	2.23	0.28
全事業所		345	360			

1) 体細胞数

体細胞数の同等性の検証結果は、表 2 に示すとおりである。ニューマン染色液ならびに BHP 染色液の平均体細胞数は、3 試料ともほぼ一致する結果となった。

t 検定は 5%の危険率において、3 試料いずれについても、ニューマン染色液と BHP 染色液の体細胞数に有意差は認められなかった。

表2 体細胞数の同等性の検証

試料	測定値平均		t-検定(5%危険率)		
	ニューマン 万/ml	BHP 万/ml	t値	t境界値	P値
No.1	6.6	6.1	0.82		0.42
No.2	18.6	18.8	-0.19	2.03	0.85
No.3	30.8	28.7	0.92		0.37

以上のとおり、体細胞数ならびに細菌数いずれについても、ニューマン染色液と BHP 染色液には、統計的な有意差が認められず同等性が確認できたため、BHP 染色液はニューマン染色液の代替試薬として使用可能なものと考えられた。

(小坂英次郎、仁藤百合子)