

表3 地衛研が作成した検査マニュアル中の代表的な鉛の分析手法の概要

都道府県名	札幌市	岩手県	横須賀市	和歌山市	福岡市	集計
簡易テスト法	簡易キット	なし	なし	なし	なし	1
操作概要	ロジノン酸による比色					ロジノン酸比色:1
検出系	イオン試験紙					
特徴						
スクリーニング試験	なし	なし	あり	あり	あり	6
操作概要			試料に水を加え混和後ろ過	試料を希硝酸で抽出し、ICP-MS測定	非分解	
検出系			原子吸光	ICP-MS	原子吸光	原子吸光:3 蛍光X線:2 ICP-AES:2 ICP-MS:2
特徴			実質前処理無し。2名で6時間	半定量の位置づけ	4時間	
確認・定量試験	あり	あり	あり	あり	なし	18
操作概要	湿式灰化、溶媒(DDTC-MIBK)抽出、原子吸光	マイクロウェーブ抽出後ICP-AES分析	水抽出液を湿式灰化	試料をマイクロウェーブで灰化後、ICP-MS測定	酸分解	
検出系	フレイムレス原子吸光	ICP-AES	原子吸光	ICP-MS	原子吸光 ICP	原子吸光:11 ICP-AES:6 ICP-MS:9
特徴	所用時間:3日				1~2日	
付帯情報		金属類(ICP/発光)として記載	重金属として記載			

表4 地衛研が作成した検査マニュアル中の代表的なカドミウムの分析手法の概要

都道府県名	岩手県	横須賀市	京都府	和歌山市	福岡市	集計
簡易テスト法	なし	なし	なし	なし	なし	2
操作概要						
検出系						
特徴						
スクリーニング試験	なし	あり	あり	あり	あり	6
操作概要		試料に水を加え混和後ろ過	蛍光X線分析法、湿式灰化後ICP/ICP-	試料を希硝酸で抽出し、ICP-MS測定	非分解	
検出系		原子吸光	蛍光X線、ICP-AES/ICP-MS	ICP-MS	原子吸光	フレイムレス原子吸光:1 原子吸光:3 蛍光X線:2 ICP-AES:2 ICP-MS:2
特徴		実質前処理無し 2名で6時間	蛍光X線分析法は定性的だが、前処理が簡単	半定量の位置づけ	操作時間4時間	
確認・定量試験	あり	あり	あり	あり	なし	18
操作概要	マイクロエーブ抽出後ICP-AES分析	水抽出液を湿式灰化	試料を湿式灰化後溶媒抽出し原子吸光分析	試料をマイクロエーブで灰化後、ICP-MS	酸分解	
検出系	ICP-AES	原子吸光	フレイム原子吸光	ICP-MS	原子吸光 ICP	フレイムレス原子吸光:3 原子吸光:11 ICP-AES:6 ICP-MS:8
特徴					2-3日	
付帯情報	金属類(ICP/発光)として記載	重金属として記載		特定の金属に特化していない		

表 5 ICP/MS の測定条件

キャリアガス流量		0.85L/min
メイクアップガス流量		0.20L/min
リアクションガス流量		5.5mL/min
測定質量数	As	75
	Cd	111
	Pb	208

表6 地方衛生研究所の検査マニュアル等に記載された生体試料中の無機物の測定法

都道府県名	福岡県保健環境 研究所	同左	同左	熊本県保健環境 科学研究所
測定試料	胃吸引物	血液・胆汁	尿	胃内容物、尿、 血液、茶
測定項目	7ジ ⁺ 化ナトリウム	7ジ ⁺ 化ナトリウム	ヒ素	7ジ ⁺ 化ナトリウム
簡易 テスト	操作 概要			
	付帯 情報	胃吸引物ろ過液に 塩化第二鉄を加え ると、7ジ ⁺ 化鉄の赤 色沈殿が生成。		
確認 定量 試験	操作 概要	結晶が多量に得ら れれば、赤外吸収ス ペクトロメトリで同定で きる。		
	検出 系		7ジ ⁺ 化ナトリウムの3,5-ニ トロベンゾイルクロライド誘 導体をHPLCで分離 測定。	試料にメタール水 (1:1)を加え、超音 波抽出、 HPLC-ICP-MS
	検出 下限		HPLC, 紫外吸収	7アンチフルオロベンゾニルプロ ピト誘導体後、GC-MS
	付帯 情報		記載無し	記載無し
		W. E. Lambert ら、 J. Analytical Toxicology, vol. 19, 261-264, 19 95	角田紀子、ファルマシフ. 34, 1237, 1998	

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法 (1)

著者	Zhang ZW., et al.	Zhang ZW., et al	Schutz A., et al	
測定試料	尿, 血液, 食品	食品, 血液	尿, 血液, 指骨	
測定項目	Pb, Cd	Pb, Cd	Pb	
測定方法	操作概要	①午前中のスポット尿 5ml をミネラル酸で加熱湿式分解 ②水で 10ml に希釈 ③ICP-MS により定量 (Zhang et al 1997 を引用)	①尿の処理に関する記述はなし ②ICP-MS により定量(内部標準に ^{89}Y , ^{205}Tl を用い、検量線法)	①尿 10ml に濃硝酸 0.2ml を加えて冷凍保存 ②水で 5 倍に希釈 ③ICP-MS により定量 (Schutz et al 1996, Bergdahl et al 1997 を引用)
	検出系	測定 m/z の記載なし	ICP-MS Pb m/z=208 Cd m/z=114	測定 m/z の記載なし
	検出下限	記載なし	尿中鉛に関する記述なし	記載なし
	特徴	高感度 多元素の同時測定が可能	正確性、精密製に優れる。 迅速、高感度、同時分析。 原子吸光法よりも 10~20% 低値になる。	
	付帯情報	尿中のクレアチニンの測定	ICP-MS のパラメーター記載	尿中のクレアチニンの測定。使用する尿採取用ポリ容器は予め 3M 硝酸で洗浄。
文献	雑誌	Sci Total Environ	Sci Total Environ	Int Arch Occup Environ Health
	発行年 ; 巻 : ページ	1999:226:65-74	1997:205:179-187	2005:78:35-43
	タイトル	Non-occupational lead and cadmium exposure of adult women in Bangkok, Thailand	Determination of lead and cadmium in food and blood by inductively coupled plasma mass spectrometry: a comparison with graphite furnace atomic absorption spectrometry.	Lead in finger bone, whole blood, plasma and urine in lead-smelter workers: extended exposure range

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法 (2)

著者	Djane NK., et al	Bergdahl IA., et al	Schutz A., et al	
測定試料	尿	尿, 血液	血液	
測定項目	Pb	Pb	Pb	
測定方法	操作概要	①尿を 2%硝酸液で酸性に調整 ②EDTA、トリトン X、アンモニアを含む溶液で 10 倍に希釈 ③ICP-MS により定量(Bi, Tl を内部標準)(Bergdahl IA et al 1997 を引用)	①血漿は ICP-MS で分析 ②血漿中鉛の分析方法は他(Schutz et al 1996)を引用 ③全血、尿は電気加熱原子吸光分析で測定	尿の処理に関する記述はない。(血漿:トリトン X100、EDTA を含むアンモニア溶液で 5 倍希釈、内部標準: ²⁰⁹ Pb)
	検出系	測定 m/z の記載なし	測定 m/z の記載なし	ICP-MS Pb m/z=206/207/208
	検出下限	記載なし	尿中鉛に関する記述なし。 血漿中鉛は 0.04μg/L	血漿中で 0.015μg/L
	特徴			簡易処理。 正確性、再現性が良好
	付帯情報		血漿はアンモニア、EDTA、トリトン X100 を含む溶液で 5 倍希釈後分析	ICP-MS パラメーター記載
文献	雑誌	Analyst	Scand J Work Environ Health	Occup Environ Med
	発行年 ; 巻 : ページ	1997:122:1073-1077	1997:23:359-363	1996:53:736-740
	タイトル	Supported liquid membrane enrichment combined with atomic absorption spectrometry for the determination of lead in urine	Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood	Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法 (3)

著者	Botta C., et al	Iarmarcovai G., et al	De Boer JLM., et al	
測定試料	尿, 血液	尿, 血液	尿, 血液	
測定項目	Al, Cd, Cr, Co, Pb, Mn, Ni, Zn	Al, Cd, Cr, Co, Pb, Mn, Ni, Zn	Pb, Cd, As など 56 種	
測定方法	操作概要	①スポット尿を滅菌したポリプロピレン容器に採取 ②尿 1ml を 1%硝酸液(内部標準 Sc, Ge, Y, Tb 含有)で 10 倍希釈 ③ICP-MS により定量(De Boer JL et al 2004 を引用)	①スポット尿 1ml を 1%硝酸液(内部標準 Sc, Ge, Y, Tb 含有)で 10 倍希釈 ②ICP-MS により定量(De Boer JL et al 2004 引用)	①尿は採取後-30℃で保存②尿を 1%硝酸で 5 倍に希釈 ③ICP-MS で分析(Online で内部標準を添加 <Pb と Cd 用 ¹⁸⁵ Re, ²⁰⁹ Bi: As 用 ⁷² Ge, ¹²⁵ Te>)
	検出系	ICP-MS Pb m/z=206/207/208 Cd m/z=111/114	ICP-MS Pb m/z=206/207/208 Cd m/z=111	ICP-MS Pb m/z=206/207/208 As m/z=75 Cd m/z=111/114
	検出下限	記載なし	Pb, Cd : 0.1µg/L(尿中)	尿中 Pb 1µg/L, Cd 0.15 µg/L
	特徴		高感度、迅速分析	迅速分析、簡易処理
	付帯情報	ICP-MS パラメーター記載。尿中クレアチニン濃度を測定。	尿中のクレアチニンの測定	ICP-MS のパラメーター記載
文献	雑誌	Environ Mol Mutagen	Mutagenesis	Anal Bioanal Chem
	発行年 ; 巻 : ページ	2006:47:284-295	2005:20:425-432	2004:379:872-880
	タイトル	Assessment of occupational exposure to welding fumes by inductively coupled plasma-mass spectroscopy and by the alkaline comet assay	Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms	Practical and quality-control aspects of multi-element analysis with quadrupole ICP-MS with special attention to urine and whole blood

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法(4)

著者	Smith DR., et al	Woolard D., et al	Yantasee W., et al	
測定試料	尿, 血液	血液、骨、肝臓	尿, 血液	
測定項目	Pb	Pb	Pb	
測定方法	操作概要	①24時間の尿を採取 ②尿8mlをろ過後、ポリエチレン製容器にて冷凍保存 ③解凍後、16N硝酸でpH2以下に調整 ④magnetic sector-ICP-MSにより定量(Woolard D et al 1998を引用)	①尿の処理に関する記述はなし ②magnetic sector-ICP-MSにより定量	①尿2mlに濃塩酸(～200・l)を加え(1M)、攪拌、ろ過、遠心分離 ②上澄みをろ過し、20～100倍に2%硝酸で希釈 ③ICP-MSで分析
	検出系	ICP-MS Pb m/z=204/206/207/208	ICP-MS Pb m/z=204/206/207/208	ICP-MS Pb m/z=208
	検出下限	0.01ppb	尿中鉛に関する記述なし	記載なし
	特徴			
	付帯情報	クリーンベンチ内で処理する。	ICP-magnetic sector-MSのパラメーター記載	ICP-MSパラメーター記載
文献	雑誌	Toxicol Sci	J Anal At Spectrom	Anal Bioanal Chem
	発行年： 巻：ページ	2000:54:473-480	1998:13:1015-1019	2007:387:335-341
	タイトル	Succimer and the urinary excretion of essential elements in a primate model of childhood lead exposure	Inductively coupled plasma magnetic sector mass spectrometry method for stable lead isotope tracer studies	Microanalyzer for biomonitoring lead (Pb) in blood and urine

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法 (5)

著者	Schramel P., et al	White MA	Kresimon J., et al	
測定試料	尿	尿、血液	尿	
測定項目	Pb, Cd, Hg, Sn, W, Bi, Te, Tl, Pt, Pd, Sb	Al, Ca, Co, Ni, Cd	無機・有機の Hg, As	
測定方法	操作概要	<p>①尿に内部標準 (Sc, Y, In) を含む 1%硝酸を添加 (1:4)</p> <p>②標準を添加 (4段階 0-10・g/L)</p> <p>③ICP-MS で定量</p> <p>(注) クリーンルームで超純水を用いて処理</p> <p>(注) Pb はブランク値が高い</p>	<p>①尿 4ml に Seralpur water 4ml および塩酸 (3%) 1ml 添加</p> <p>②NaBH₄ (5%) を注入し、He ガスでA*プリク*</p> <p>③生じたガスを乾燥用チューブに通した後、液化窒素でトラップ*</p> <p>④試料ガスを ICP-MS につないだガススクロに導入</p>	
	検出系	ICP-MS Pb m/z=208 Cd m/z=111 Hg m/z=202	ICP-MS Cd m/z=114	GC-ICP-MS
	検出下限	Pb, Hg=0.03 µg/L, Cd=0.02 µg/L	Cd 0.1µg/L	なし
	特徴	高感度。Cd, Hg の測定値は、低濃度時に絶対検量線法では高値となる。	高感度 多元素の同時測定が可能 内部標準が必要	Hg, As, Se, Sb, Sn の有機化合物を分離測定
	付帯情報	ICP-MS パラメーター記載		
文献	雑誌	Int Arch Occup Environ Health	J Trace Elements Med Biol Fresenius J Anal Chem	
	発行年 ; 巻 ; ページ	1997:69:219-223	1999:13:93-101 2001:371:586-590	
	タイトル	The determination of metals (antimony, bismuth, lead, cadmium, mercury, palladium, platinum, tellurium, thallium, tin and tungsten) in urine samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry	A comparison of inductively coupled plasma mass spectrometry with electrothermal atomic absorption spectrophotometry for the determination of trace elements in blood and urine from non occupationally exposed populations	HG/LT-GC/ICP-MS coupling for identification of metal(loid) species in human urine after fish consumption

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法 (6)

著者	Rodushkin I., et al	Bonnie Mei Wah Fong., et al	Gouille JP., et al	
測定試料	尿	血液、尿	全血、血漿、尿、毛髪	
測定項目	Hg, Pb, Cd, Cr, Tl 他	Hg	Hg, Pb, As, Cd, Tl 他	
測定方法	操作概要	①希釈液は2%塩酸・5% tert-ブタノール液に重クロム酸カリウム ②標準液、全血、尿、それぞれ100・1に希釈液1.7mlおよび内部標準液(Ge 2・g/L)200・1を加え混和、測定 ③内部標準として、In, Luを添加	①尿0.4mlを0.65%硝酸3.6mlで希釈 ②測定物質により、1:10または1:5に、0.5%ブタノール、0.65%硝酸、0.01%トリトン、内部標準Rh(1ppb)で希釈	
	検出系	二重収束 ICP-MS	ICP-MS, ネブライザによる直接導入 Hg 202とGe 72の比	
	検出下限	Hg:0.14mg/L	0.01μg/L	Hg:0.29μg/L、As:0.03μg/L、 Cd:0.007μg/L、 Pb:0.017μg/L
	特徴	四重極MSに比べスペクトラル干渉が少ない。マトリックスの影響が小。	高感度、高精度	高感度 サンプルが少量でよい 緊急事例有り
	付帯情報		設定条件 希釈液の洗浄効果の検討 精度、回収率	各元素の全血・血漿・尿・毛髪 の reference value 法医学・臨床ケース
その他	雑誌名	Journal of Trace Elements in Medicine and Biology	Journal of Analytical Toxicology	Forensic Science International
	発行年：巻：ページ	2001:14:241-247	2007:31:281-287	2005:153:39-44
	タイトル	Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for elemental analysis of urine	Determination of Mercury in whole blood and urine by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair Reference values

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法 (7)

著者	Ramaswami K., et al	White MA., et al	Wang RY., et al	
測定試料	尿、血液	尿、血液	尿、魚	
測定項目	Hg	尿中 Hg, As, Cd, Cr, Pb, Tl, Al, Co, Cu, Mn, Ni, Se 血中 Hg, Pb, Cd, Tl, Cr, Se, Mn	As, Se 化合物	
測定方法	操作概要	①標準液は2% HClで調製。 ②Calibratorは水、添加血液または尿で作製。 ③標準液、全血、尿、各100 μ lを希釈液1.7ml、内部標準液200 \cdot L(Ge, 2 \cdot g/L)と混和。 希釈液は60mg/L 重クロム酸カリ(2% HCl), 5%tert-butanol	①尿を1%硝酸で希釈(1:4) ②内部標準および標準添加法を使用。	①尿を移動層溶液で20倍に希釈 ②200 \cdot Lを注入。
	検出系	ICP-MS Hg m/z 200	ICP-MS	IC-ICP-MS m/z As 75, Se 78, 80
	検出下限	Hg:0.03 μ g/L, Pb:0.03 μ g/L, Cd:0.02 μ g/L, Tl:0.005 μ g/L	0.5 μ g/L	AsIII:0.01 μ g/L, AsV:0.002 μ g/L, DMA:0.004 μ g/L, MMA:0.003 μ g/L, AsB:0.003 μ g/L
	特徴	very sensitive		魚肉からの高周波抽出
	付帯情報	機器パラメーター 再現性・回収率 検量線法と標準添加法比較	イギリス3地域のホランテリウム値 元法は全血、血清測定。	
その他	雑誌名	Int Arch Occup Environ Health	Science of the Total Environment	ANALYTICA CHIMICA ACTA
	発行年 ; 巻 : ページ	1997:69:219-223	1998:216:253-270	2007:590:239-244
	タイトル	The determination of metals(antimony, bismuth, lead, cadmium, mercury, palladium, platinum, tellurium, tin and tungsten) in urine samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry	Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union. X. A study of 13 elements in blood and urine of a United Kingdom population	Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法(8)

著者	Milstein LS., et al	Hata A., et al	Apostoli P., et al	
測定試料	尿	尿	尿	
測定項目	As化合物	As化合物	As化合物	
測定方法	操作概要	①尿を遠心 (3,000rpm, 10')。 ②上清を超純水で10倍に希釈し測定。	①種類別は弱陰イオン交換樹脂を用いた HPLC-MS。	
	検出系	IC(イオンクロマト)-ICP-MS m/z 75	HPLC-ICP-MS 測定 m/z の記載なし	
	検出下限	AsIII : 0.2µg/L, As V : 2µg/L	As : 0.1µg/L	iAs : 0.5µg/L
	特徴	6As化合物+ISの分離、短時間測定(30分以内)。	7As化合物の分離測定(6化合物+トリメチルアールソキント)	Total iAs=As3+As5+MMA+DMA
	付帯情報	陰イオン・陽イオンカラムを使用	陽イオン交換カラム。日本人210人の測定。 ・ICP-MS条件は Inoue et alの方法	工業ガラス製造作業員51名(男)。 ・元法: Apostoli(1997)
その他	雑誌名	Environmental Health Perspectives	Journal of Occupational Health	Occup Environ Med
	発行年 ; 巻 : ページ	2003;111:3	2007;49:217-223	1999;56:825-832
	タイトル	Development and Application of a Robust Speciation Method for Determination of Six Arsenic Compounds Present in Human Urine	HPLC-ICP-MS Speciation Analysis of Arsenic in Urine of Japanese Subjects without Occupational Exposure	Biological monitoring of occupational exposure to inorganic arsenic

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法 (9)

著者	Chen YC., et al	Morton J., et al	Lindemann T., et al	
測定試料	尿	尿	尿、水、魚、土	
測定項目	As化合物	As化合物	As, Se, Sb, Te	
測定方法	操作概要	①尿を10倍希釈 ②遠心し、3000G/30'、ろ過(0.45・m)する	①尿を純水で1:2に希釈する	①水で希釈(1+4)
	検出系	HPLC-ICP-MS with cross-flow nebulizer m/z 75, IS Te 128	HPLC-ICP-MS anion exchange column m/z 75	anion-exchange column HPLC/ICP-MS 測定 m/z の記載なし
	検出下限	AsIII : 0.32µg/L, AsV : 0.25ug/L, MMA : 0.10µg/L, DMA : 0.29µg/L, AsB : 0.10µg/L	各元素 : 0.8・g/L	AsIII : 0.36ug/L, AsV : 0.34µg/L, MMA : 0.26µg/L, DMA : 0.48µg/L
	特徴	各化学種の保存性	再現性あり ルーチン分析に使用	スタンダード尿の保存性
	付帯情報		暴露者・非暴露者の尿中分析他	
その他	雑誌名	Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention	Journal of Analytical Toxicology	Fresenius J Anal Chem
	発行年 ; 巻 : ページ	2002:11:1427-1433	2006:30:293-301	200:368:214-220
	タイトル	Stability of Arsenic Species and Insoluble Arsenic in Human Urine	Speciation of Arsenic Compounds in Urine from Occupationally Unexposed and Exposed Persons in the U.K. Using a Routine LC-ICP-MS Method	Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS

表7 文献に記載された尿中の鉛、カドミウム、水銀、砒素の測定法 (10)

著者		Brima El., et al
測定試料		尿、毛髪、爪
測定項目		As 化合物
測定方法	操作概要	①尿をろ過 (ミボ [®] 7、0.45・m) ②化学種に応じて5倍まで希釈。総ヒ素用は2%硝酸で5倍に希釈。
	検出系	HPLC-ICP-MS m/z 75, 77
	検出下限	total As : 0.05µg/L
	特徴	人種間の尿中ヒ素化合物、他
	付帯情報	元法 : Francesconi (2002)
その他	雑誌名	Toxicology and Applied Pharmacology
	発行年 : 巻 : ページ	2006:216:122-130
	タイトル	Understanding arsenic metabolism through a comparative study of arsenic level in the urine, hair and fingernails of healthy volunteers from three unexposed ethnic groups in the United Kingdom

試料 1g ← ST添加 各100 μg ← 1% HNO_3		迅速分析法開発のための予備的添加回収試験			
		添加金属の回収率 (% ; n=1)			
		ヒ素	水銀	鉛	ヨドミウム
抽出: ホモジナイザー		96	92	99	99
10 mL定容		96	63	95	98
ろ過、遠心		101	114	100	101
100倍希釈 (0.1ppm)		89	57	95	95
		94	92	101	101
		0.025	0.10	0.025	0.025
ICP/AES測定		($\mu\text{g/g}$)			

図 1 予備的添加回収試験の概略と回収結果

地域における健康危機に対応するための地方衛生研究所機能強化に関する研究
—リアルタイム PCR 法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法の検討—

分担研究者 澤田幸治 北海道立衛生研究所

研究要旨 インターカレーター法による食水系感染症原因菌の迅速検査法について、リアルタイム PCR 機器を用いて網羅的検査を実施するための検査法の確立を目指し、複数の地方衛生研究所において実証試験を実施した。検査対象菌種はサルモネラを主とし、一部の機関では腸炎ビブリオ、セレウスも検討した。純培養菌について2系統の試験系により評価した。サルモネラについては2系統の試験法を実施し32血清型について標的 DNA の検出が可能であった。腸炎ビブリオ及びセレウスは1系統の試験法で検討し標的 DNA の検出が可能であった。また、10倍段階希釈したサルモネラ菌株添加糞便模擬試料について試験した結果、糞便中にサルモネラが 10^5 cfu/g 存在すれば確実に検出できた。

研究協力者

須釜久美子	福島県衛生研究所 専門医療技師
山口敬治	北海道立衛生研究所 微生物部主任研究員
池田徹也	北海道立衛生研究所微生物部 細菌科研究職員

を調整・準備し検査を実施している。そのため、食中毒事例が発生すると、膨大な量と種類の培地が消費され、また人的浪費も大きい。

近年、各種病原細菌に特有の遺伝子配列が解明され、PCR 等遺伝子増幅法が感染症の原因解明に広く利用されている。リアルタイム PCR 法は、インターカレーター法、蛍光プローブ法、サイクリングプローブ法があり、標的遺伝子部位の増幅に伴い変化した発光強度を増幅サイクル毎に測定するため、標的遺伝子増幅の迅速な検出や定量解析が可能である。

SYBR Green を用いたインターカレーター法は、DNA 複製時に試薬が取り込まれ蛍光を発するため菌種毎のプローブを必要とせず、TaqMan Assay 等プローブを用いる方法より安価に実施できる利点を持っている。また、福島¹⁾はインターカレーター法による食中毒細菌特異遺伝子部位検出法を開発した。

そこで、食中毒発生時の細菌検査に応用するため、インターカレーター法を用いたリアルタイム PCR 法の導入が、各地方衛生研究所におい

A. 研究目的

感染症を惹起する微生物は、創傷感染、呼吸器感染、消化器感染、性感染等様々な感染経路により人体に侵入する。消化器感染症は食品や水を介して感染が起きると食中毒の様相を呈することが多く、感染拡大防止など公衆衛生の観点から、早急な原因物質ならびに原因食品等の究明が必要である。

細菌性食中毒発生時に現在行われている原因物質究明調査は培養法が主である。過去には、食中毒発生時の各種疫学調査により想定された細菌を検出する培地を選択して培養を実施したが、現在は全ての食中毒細菌を対象として培地

て配備されているリアルタイム PCR 機器を用いて実施できるか実証試験を行った。原法は Light Cycler を用いて開発されたものである。インターカレーター法によるリアルタイム PCR 法に関する機種毎の導入方法について検討した。

B. 研究方法

対象とする細菌は、近年食中毒事例が最も多い原因である、腸管出血性大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ、セレウス、腸炎ピブリオ、*astA* 保有大腸菌、ウェルシュ菌、カンピロバクターの 8 種を選択した。今回使用した菌株は、サルモネラ、セレウス、腸炎ピブリオであった。

(1) サルモネラ純培養試料

使用したサルモネラは、現在、チフス、パラチフス A 以外のサルモネラ症で日本において普遍的に発生している *Salmonella* Enteritidis (以下、SE) を 17 株、SE 以外の血清型について 32 血清型 45 株を使用した。使用した血清型は次のとおりであった(亜種 I は血清型名のみ)。

亜種 1 (*Salmonella enterica enterica*)

O2 群: Paratyphi A

O4 群: Agona, Chester, Derby, Heidelberg, Schleissheim, Schwarzengrund, Stanley, Typhimurium, O4:i:-

O7 群: Braenderup, Choleraesuis, Infantis, Livingstone, Mbandaka, Montevideo, Oranienburg, Richmond, Rissen, Singapore, Tennessee, Thompson, Virchow

O8 群: Kentucky, Kottbus

O9 群: Typhi

O16 群: Hvittingfoss

O3,10 群: Anatum, Weltevreden

O11 群: Abaetetuba

亜種 1 以外: *Salmonella enterica salamae* serovar Sofia, *Salmonella enterica diarizonae*

ゴシックで記した血清型名は 2004・2005 年人から分離されたなかで上位 15 位以内のサルモ

ネラ血清型であった³⁾。

(地研 A) 2000-2006 年に北海道において発生した 9 事例からの分離株を含め 16 株の SE を対象とした (表 1 参照)。また SE 以外の血清型について、表 2-a のとおり 22 血清型 24 株を使用した。分離株の単コロニーを 0.6% 酵母エキス添加トリプティックソイブロス (以下、TSYEB) に接種し、37℃で 24 時間培養した。培養液 1mL から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて、使用説明書に従い DNA を抽出した。抽出 DNA を滅菌蒸留水で 10^3 - 10^7 希釈し、DNA 鋳型として使用した。

(地研 B) 表 2-b のとおり、SE を含む 22 血清型 22 株を使用した。単コロニーから得た菌苔を milliQ 水 200 μ L に McFahland 1.0 になるよう調整浮遊した。DNA は QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて使用説明書に従い DNA を抽出した。抽出した DNA は原液から TE buffer による 10^7 希釈まで 10 倍段階希釈の試料を作成した。

(2) サルモネラ添加糞便試料 (模擬試料)

Salmonella Infantis を菌株とした。単コロニーから TSYEB を用いて 37℃で 24 時間培養を 3 代以上繰り返し、添加菌原液とした。添加用菌原液を滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈し添加用菌液とした。糞便はあらかじめサルモネラ陰性の糞便を選択し、10 倍量の滅菌蒸留水を添加し、vortex により十分混和し試料用糞汁とした。試料用糞汁に 10 分の 1 量の添加用菌液を加え vortex により十分混和し模擬試料液とした。模擬試料液は QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて、使用説明書に従い DNA を抽出した。また試料用糞汁に代えて滅菌生理食塩水を用いて、10 分の 1 量の添加用菌液を加え vortex により十分混和し対照菌液とした。模擬試料液と同様に DNA を抽出した。

添加菌原液は 10 倍段階希釈し、1mL をシャーレに移し、トリプティックソイ寒天培地に混和、37℃で 24 時間培養して菌数を測定した。

(3) 腸炎ピブリオ純培養試料

食中毒事例等で分離した 13 株について試験を行った。耐熱性溶血毒(TDH)産生株 12 株と TDH 非産生株 1 株を用いた。血清型等については表 3 に示した。分離株の単コロニーを 2% NaCl 添加 TSYEb に接種し、37°C で 24 時間培養した。培養液 1mL から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて、使用説明書に従い DNA を抽出した。抽出 DNA を滅菌蒸留水で 10^3 ~ 10^5 希釈し、DNA 鋳型として使用した。

(4) セレウス菌純培養試料

食中毒事例等で分離した嘔吐毒産生株 6 株、エンテロトキシン産生株 5 株の計 11 株について実施した(表 4 参照)。分離株の単コロニーを TSYEb に接種し、37°C で 24 時間培養した。培養液 1mL から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて、使用説明書に従い DNA を抽出した。抽出 DNA を滅菌蒸留水で 10^3 ~ 10^5 希釈し、DNA 鋳型として使用した。

(5) リアルタイム PCR 用プライマー

サルモネラには Hoorfar *et al*²⁾ による *invA* 領域を増幅するプライマーを使用した。塩基配列はつぎのとおりである。

StyinvA-JHO-2-right (20mer)

5' -TCGTCATTCCATTACCTACC-3'

StyinvA-JHO-3-left (20mer)

5' -AAACGTTGAAAACTGAGGA-3'

腸炎ピブリオには西淵光昭ら⁴⁾による *tdh* を増幅するプライマーを使用した。塩基配列は次のとおりである。

Tdh 199-F (20MER)

5' -GGTACTAAATGGCTGACATC-3'

Tdh 199-R (20MER)

5' -CCACTACCACTCTCATATGC-3'

セレウスには福島(未発表)による *ces* 領域を増幅するプライマーを使用した。塩基配列は次のとおりである。

ces-TM-F (19mer)

5' -gATgTTTgCgACgATgCAA-3'

ces-TM-R (20mer)

5' -CTTTCggCgTgATACCCATT-3'

(6) リアルタイム PCR 試薬

(地研 A) リアルタイム PCR には、SYBR PREMIX Ex Taq™ II (TaKaRa) を用いた。試験試薬量、サーマルサイクル条件については、メーカーの使用説明書に従った。PCR mixture は 20 μ L の系で実施した。

(地研 B) リアルタイム PCR 試薬は、SYBR PREMIX Ex Taq™ (TaKaRa) を用いた。試験の試薬量、サーマルサイクル条件については、メーカーの使用説明書に従った。PCR mixture は 20 μ L 及び 50 μ L の 2 つの系で実施した。

(7) 使用機器

(地研 A) PCR 機器は ABI 7700 (Applied Biosystems: 以下 ABI) を用いた。機器を駆動させるソフトウェアは MacOS 8.6 上で駆動する Sequence Detection System ver 1.9.1 (ABI) を用いた。また、T_m 値を求めるために Dissociation Curves ver 1.1 (ABI) を用いた。

(地研 B) PCR 機器は ABI 7000 (ABI) を用いた。

C 研究結果

(1) *Salmonella* Enteritidis

地研 A では抽出 DNA 原液ならびに 10^5 ~ 10^7 希釈の DNA を鋳型として用いた。抽出 DNA 原液では非特異な増幅が観察されたが、 10^5 ~ 10^7 希釈の試料はいずれも、良好な増幅を示した。融解曲線から得た T_m 値は 80.0~81.5°C の間であった。地研 B は抽出 DNA の原液から 10^7 希釈の DNA を鋳型として用いた。抽出 DNA の原液から 10^2 希釈までは非特異増幅が見られ、 10^6 ~ 10^7 希釈では primer dimer がみられた。 10^3 ~ 10^5 希釈については、T_m 値が目的とする位置にみられ *Salmonella* spp. の確認ができた。繰り返し試験ならびに複数の試験を行い T_m 値に 1°C 前後の変動があった。地研 A と地研 B とで標的遺伝子増幅が認められた希釈が異なるが、検出初期菌量および DNA 抽出法の差ならびに使用

機種により検出感度が異なるものと思われる。模擬糞便試料を用いた共同実験を通じて、各種の検査精度が確認できるものと思われる。

また、実験に供した PCR mixture 量は 20 μ L、50 μ L とともに結果に差はみられなかった。

(2) SE 以外のサルモネラ

検査に供した 32 種全ての血清型について 10^3 ~ 10^5 希釈の DNA では、いずれも良好な増幅を示した。TM 値は 80.1 ~ 80.6 $^{\circ}$ C の間であった。

また、実験に供した PCR mixture 量は 20 μ L でも 50 μ L とともに結果に差はみられなかった。

(3) サルモネラ添加糞便試料

模擬試料液からは添加したサルモネラ菌液 10^1 ~ 10^4 希釈まで検出された。添加菌原液の菌濃度は 6.0×10^8 cfu/mL であったため、標的遺伝子は 6.0×10^3 cfu/mL まで検出されたことになる。複数回の試験を実施したところ 6.0×10^4 cfu/mL まで確実に検出された。10 倍希釈糞便を試験に供することから、糞便中のサルモネラが 6.0×10^5 cfu/g 以上であれば確実に検出できることになる。生理食塩水溶液に添加したサルモネラ試料も同様の結果を示し、使用した DNA 抽出キットは糞便・生理食塩水ともに、同様の回収率を示すことがわかった。

(4) サルモネラ以外の菌

腸炎ピブリオ菌株は 10^3 ~ 10^5 希釈の DNA を用いた。いずれも、良好な増幅を示した。TM 値は 81.1 ~ 81.8 $^{\circ}$ C の間であった。また、セレウス菌株は 10^3 ~ 10^5 希釈の DNA を用いた。いずれも、良好な増幅を示した。TM 値は 80.6 ~ 80.7 $^{\circ}$ C の間であった。

(5) TM 値の変動

複数回の試験ならびに複数の菌種の DNA による試験を実施した結果、TM 値に変動が生じるウェルに特徴があった。機器の光学系には問題は見られず、特定のウェルに変動が発生したため、PCR 用プレートならびにキャップについてロットの異なるものを使用したところ、変動は最小化した。しかし、温度変化がウェルにより固定化しているため、ブロックの

温度管理の問題、ブロックと PCR プレートの形態的マッチング等安定な結果を得るためには器具の選択や機器の使用についての詳細な検討が必要である。

SYBR Green を用いたインターカラー法を実施する場合は、primer dimer による非特異増幅が避けられないが、増幅産物の Tm 値を求めておくことにより標的 DNA の増幅が確認でき、スクリーニングとしての有用性は高いと考えられる。現在汎用されている PCR-電気泳動法に比べ、試験に要する時間も短縮され、増幅結果も Tm 値という数値として確認できるため、より客観的な判断ができると考えられる。

D. 結論

サルモネラ血清型 32 種 45 株、*Salmonella* Enteritidis 17 株は全て標的遺伝子が増幅された。

Salmonella Infantis 株を添加した糞便模擬試料では 6.0×10^5 cfu/g 以上で標的遺伝子が確実に増幅された。

腸炎ピブリオ TDH 陽性株 12 株は標的遺伝子が増幅されたが、TDH 陰性株 1 株は標的遺伝子が増幅されなかった。

セレウスでは嘔吐毒産生株 6 株は標的遺伝子が増幅されたが、エンテロトキシン産生株 5 株は標的遺伝子が増幅されなかった。

精度管理は、各所のリアルタイム PCR 機器の特徴を把握し、事前に検査法を整備しておく必要があると考えられた。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 文献

1) 福島博、角森ヨシエ：リアルタイムPCR法による食中毒細菌の迅速スクリーニングの検討。感染症誌，79：644-655，2005

2) Hoorfar, J., Ahrens, P., and Rådström, P.: Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. J Clin Microbiol, 38: 3429-3435, 2000

3) 感染症情報センター(国立感染症研究所): Salmonellosis in Japan as of June 2006. IASR, 27, 191-192, 2006

4) 西淵光昭, 竹田美文, 多田淳, 大橋鉄雄, 西村直行, 尾崎博子, 他: PCR による腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒遺伝子および類似毒素遺伝子の検出法. 日本臨床1992;50 特別号:348-52.