

表6.硫酸希釈法における平均
添加回収率(%) (n=5)
添加濃度 20 μ g/gの場合

試料	As
牛乳	90 \pm 8
そばめし	100 \pm 5
ハヤシライス	102 \pm 6
大粒肉焼売	106 \pm 4
五目春巻き	101 \pm 3
豚カルビ焼肉	74 \pm 9
ホワイトシチュー	96 \pm 6
ビーフシチュー	92 \pm 11
お好み焼き	92 \pm 6
餃子	71 \pm 8
中華丼の具	99 \pm 3
レトルトカレー	84 \pm 5

C-2. 水

1) ヒ素、カドミウム、鉛

① 検量線の直線性

標準溶液の測定により得られた各元素の検量線を図3に示した。いずれも0~20 μ g/Lの範囲において良好な直線性($R^2=0.999$ 以上)を示した。

② 回収率および再現性

平均回収率は、水道水では101~103%、河川水では97~113%と良好であった。変動係数は水道水では2.1~2.9%、河川水では1.9~2.2%であった(表7)。

2) 水銀

① 検量線の直線性

標準溶液の測定により得られた水銀の検量線を図3に示した。0~400ng/Lの範囲において良好な直線性($R^2=0.996$)を示した。しかし、水銀は他の3種の元素と比較すると、測定可能である濃度範囲(0~400ng/L)が低いため、イオン強度が相対的に低かった。このようなケースではバックグラウンドに影響されやすく、測定の安定性が失われやすい傾向がある。バックグラウンドの軽

減には、洗浄時間を長くする、硝酸濃度を上げる等の対策が有効であり、今回はこれらを行うことにより比較的安定な測定結果が得られた。

② 回収率および再現性

定量モード

添加回収試験の結果を表7に示す。平均回収率は水道水では123%、河川水では91%となった。変動係数は水道水では9.6%、河川水では12.3%と少し高い。

定性モード

本装置での定性モードの測定において表示される測定値は、装置内のデータベースに左右されるため、実測値とは多少異なるので、今回は測定値が濃度依存的に増加するかの確認を行った。結果を表8に示す。表示された測定値は、精製水、河川水、標準溶液200ng/L、添加試料(河川水+500ng/L)、標準液600ng/Lの順に上昇しており、濃度依存的であることがわかる。変動係数は1.9~5.1%と良好な結果であった。したがって、河川水に水銀が添加された試料を本装置の定性モードで測定した場合、短時間で確認が可能である。

図3. 各元素の検量線

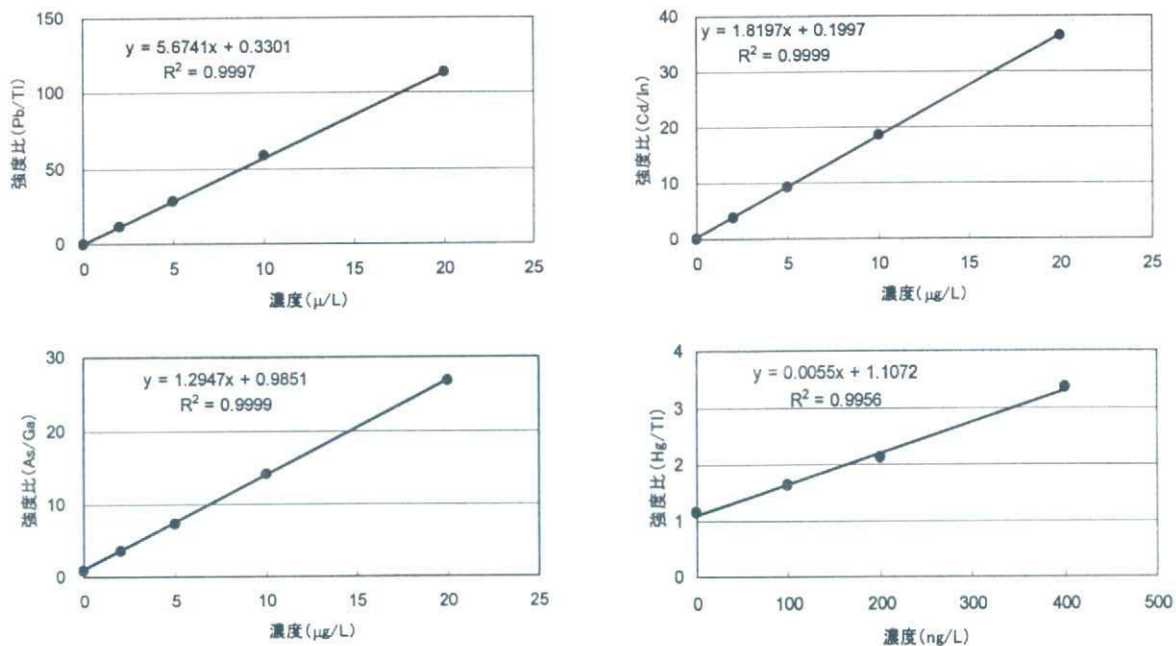


表7. 添加回収実験結果 (n=5)

		As	Cd	Pb	Hg
水道水	回収率(%)	101	102	103	123
	CV(%)	2.2	2.9	2.1	9.6
河川水	回収率(%)	113	97	100	91
	CV(%)	2.1	2.2	1.9	12.3

表8. 水銀の定性分析結果 (n=3)

	精製水	河川水	標準液 200ng/L	河川水 +500ng/L	標準液 600ng/L
表示濃度 (ng/L)	117	123	227	267	307
変動係数 (%)	4.9	4.7	5.1	4.3	1.9

C-3. 尿

1) ヒ素、カドミウム、鉛

① 検量線の直線性

標準溶液の測定により得られた各元素の検量線を図4に示した。いずれも0~100 $\mu\text{g/L}$ の濃度、すなわち、尿中濃度として2.4 mg/L以下において良好な直線性を示した。

② 健康人における尿中濃度

中毒的曝露のない健康人5名(被験者A~E)より尿を採取し、各元素の尿中濃度を分析した結果を表9に示した。5名における各元素濃度の平均値は、ヒ素180 $\mu\text{g/L}$ 、カドミウム4.8 $\mu\text{g/L}$ 、鉛1.8 $\mu\text{g/L}$ であった。健康人における一日あたりクレアチニン排泄量は0.5~1.5 gであり¹⁰⁾、一日に排泄される尿量を1~1.5 Lと仮定すると、得られた値は、過去に報告されている結果(ヒ素130

μg/g クレアチン⁶⁾、カドミウム 2.1 μg/g クレアチン⁷⁾、鉛 2.2 μg/g クレアチン⁸⁾ とほぼ一致した。ヒ素の尿中濃度レベルは鉛およびカドミウムに比較して高く、個人差も大きかった。健常人における尿中ヒ素の多くは魚貝類に含まれるアルセノベタインに由来すると推定され⁶⁾、ヒ素の尿中への排泄量に及ぼす食事の影響は大きいと考えられる。

③ 回収率および再現性

試験の結果を表 10 に示した。尿試料の定量値(添加試料-Blank 試料)より各元素の測定における回収率を算出したところ、各人の平均回収率はヒ素 79~107%、カドミウム 82~87%、鉛 96~105%であった。また、変動係数はヒ素 1.0~5.9%、カドミウム 1.0~3.6%、鉛 1.2~9.3%であった。ヒ素および鉛の回収率は、被験者 E のヒ素を除き 95%以上であり、健常時の 5~10 倍程度の尿中濃度レベルにおいて概ね正確な定量が可能であると考えられた。一方、尿中カドミウムの測定における回収率の平均値は 84%であった。回収率の被験者間における差異は小さい(82~87%)ため、回収率を 85%程度として概ね定量可能と考えられる。

なお、ヒ素はカドミウムおよび鉛に比較して装置内への残留性が高く、後の分析値に影響を及ぼしやすい。試料分析ごとに硝酸溶液による十分な洗浄が必要であると考えられた。

2) 水銀

① 検量線の直線性

水銀標準溶液の測定により得られた検量線を図 5 に示した。0~400 ng/L の濃度、すなわち、尿中濃度として 24 μg/L 以下において良好な直線

性を示した。ただし、水銀を添加していない標準溶液(0 ng/L)からも若干量の水銀が検出された。この溶液を 5 本調製、分析し、測定値の平均値および標準偏差を算出した。標準偏差の 10 倍を定量下限値とすると概ね 100 ng/L であった。

② 健常人における尿中濃度

中毒的曝露のない健常人 5 名(被験者 A~E)より尿を採取し、尿中水銀濃度を分析したところ、いずれも定量下限以下の濃度(尿中濃度として 6 μg/L)であった。過去の調査において水銀の尿中排泄量は 1.5 μg/g クレアチンであることが報告されている⁹⁾。今回得られた結果は、この報告と矛盾しなかった。

③ 回収率および再現性

添加回収試験の結果を表 11 に示した。平均回収率は 67~1363%、変動係数は 11~55%であった。特に、被験者 A および D では測定値が著しく高く、尿中の他成分が測定に影響を及ぼしていると推察される。したがって、本法では、健常時の 10 倍程度の尿中水銀濃度レベルにおいて正確な定量は困難であると判断された。しかし、各人の標準添加尿の測定値は、いずれの被験者においても健常時の水銀排泄量よりも明らかに高かった。したがって、中毒の際、健常時の 10 倍程度の量の水銀が尿中に排泄されれば、中毒原因元素の特定は可能であると考えられる。

なお、水銀は装置内への残留性が著しく、後の分析値に影響を及ぼしやすい。このため、装置への導入濃度は 1 μg/L 以下であることが望ましい。また、数百 ng/L の濃度レベルの分析であっても試料測定ごとに 10%硝酸溶液による十分な洗浄が必要であると考えられた。

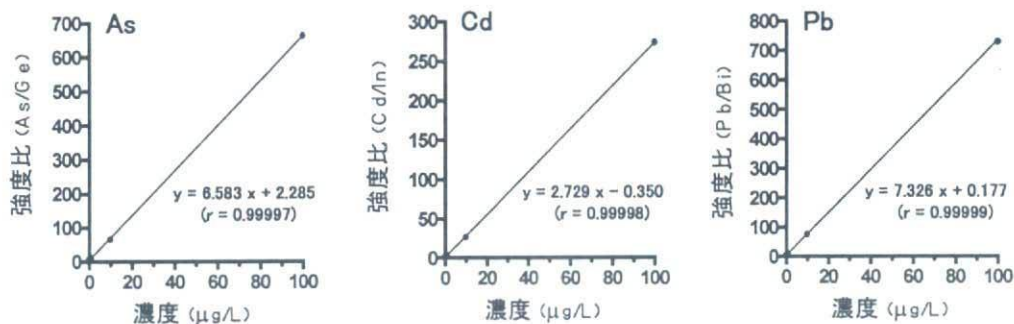


図4. ヒ素、カドミウムおよび鉛の検量線

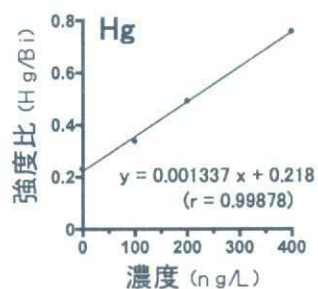


図5. 水銀の検量線

表9. 健康人における砒素、カドミウム、鉛の尿中濃度(μg/L)

被験者	As	Cd	Pb
A	46	4.9	3.2
B	365	5.3	1.5
C	151	5.2	1.3
D	96	4.2	1.2
E	240	4.1	1.7
平均	180	4.8	1.8
標準偏差	126	0.6	0.8

表10. 砒素、カドミウムおよび鉛の添加回収試験結果 (%) (n=5)

被験者	As		Cd		Pb	
	回収率	C.V.	回収率	C.V.	回収率	C.V.
A	100	2.2	84	1.5	96	2.3
B	102	3.3	82	1.5	99	1.2
C	104	2.4	82	3.6	101	4.3
D	107	1.0	87	1.0	99	1.7
E	79	5.9	84	1.2	105	9.3
平均	99	3.0	84	1.8	100	3.8

添加量:尿中濃度として2400 μg/L(ヒ素)および24 μg/L(カドミウム、鉛)

表11. 水銀の添加回収試験結果 (%) (n=5)

被験者	回収率	C.V.
A	1363	11.0
B	76	38.4
C	175	55.1
D	806	44.9
E	67	14.1
平均	497	32.7

添加量:尿中濃度として24 μg/L

D. まとめ

食品: 試料を硫酸で抽出、硝酸と水で希釈して誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)を用いて測定した。喫食量を50gと想定して、13食品について、ヒ素、カドミウム、鉛、水銀を添加し添加回収試験を行った結果、平均回収率は78~107%、変動係数は1~13%と良好な回収率が得られた。さらに、喫食量を200gと想定し、12食品について、ヒ素を添加した結果、平均回収率は71~106%、変動係数は3~11%と良好な回収

率が得られた。秤量から定量までの時間は、従来の乾式・湿式灰化の時は一日程度必要としたが、2時間に短縮できた。また、操作も簡便化できた。
水: 水道水と河川水を硝酸と水で希釈し、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を用いて測定した。ヒ素、カドミウム、鉛については平均回収率97~113%、変動係数1.9~2.9%と良好な結果が得られた。しかし水銀については、水道水における平均回収率は123%、河川水においては91%と比較的良好な結果も得られたが、変動係数がそ

れぞれ 9.6%、12.3%というやや高い値を示した。その原因としては、イオン化率が低い、同位体が複数個存在する、揮発しやすい、さらに測定可能である濃度範囲 (0~400ng/L) が低いため、相対強度が極端に低く、内部標準補正を行ってもバックグラウンドに影響される等が考えられる。また装置へのメモリーが多く、洗浄時間が長時間必要となるといった問題点もある。そこで、水銀について定性分析を行ったところ、1 試料あたり約 5 分という短時間で、未知試料における水銀の有無の確認が可能であることがわかった。

尿：ヒ素、カドミウム、鉛および水銀の中毒に際し、健常時の 10 倍程度の量が尿中に排泄されると想定して、ICP-MS による各元素の尿中からの検出、定量を試みた。ヒ素、カドミウムおよび鉛は尿を硝酸および水で 24 倍希釈し、水銀は尿を硝酸および水で 60 倍希釈した後、濾過して ICP-MS により分析した。ヒ素、カドミウムおよび鉛の平均回収率は 84~100%、変動係数は 1.8~3.8%であり、いずれも再現性よく正確に定量することができると考えられた。一方、水銀は、尿中からの検出は可能であるが、定量は困難であると判断された。ただし、高濃度の場合は確認できるため、健康危機管理時に対応可能と判断できた。

E. 研究発表

野村千枝、北川幹也、尾花裕孝：食品中に混入された重金属の迅速簡易分析法の開発。
第 96 回日本食品衛生学会学術講演会、神戸、2008

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 参考文献

- 1) 平成16年3月2日判決 和歌山地方裁判所
平成12年(ワ)第501号損害賠償請求事件
- 2) 平成14年12月12日判決 和歌山地方裁判所
平成12年(ワ)第502号損害賠償請求事件

- 3) 平成10年9月13日付 朝日新聞朝刊「なべのヒ素濃度に大きな差 合計で1000人相当の致死量」
- 4) 薬毒物試験法と注解 2006 日本薬学会編
東京化学同人
- 5) [http://www.epa.gov/nerlesd1/factsheets/mpt.pdf#search='mercury preservation techniques'](http://www.epa.gov/nerlesd1/factsheets/mpt.pdf#search='mercury%20preservation%20techniques') (Accessed Jan13,2009)
- 6) 山内博, 日衛誌 49: 973-983 (1995)
- 7) Ikeda M., et al. Toxicol Lett 108: 161-166 (1999)
- 8) Zhang ZW., et al. Int Arch Occup Environ Health 73: 91-97 (2000)
- 9) Yamamura Y., et al. Jpn J Ind Health 36: 66-69 (1994)
- 10) Medical Practice 編集委員会、臨床検査ガイド 2003~2004、文光堂、東京 (2003)

第2部. マイクロウェーブ分解法

A. 研究目的

重金属を測定する際の試料の前処理法の一つとして硝酸や硫酸等を用いて試料成分を分解する酸分解法がある。従来からのケルダールフラスコを用いた湿式分解法では、分解完了までに1~2日と非常に長時間を要する。そこで、今回はマイクロウェーブ分解装置を用いた前処理法を検討した。マイクロウェーブ分解装置は重金属等の化学物質を分析する際の試料前処理装置として開発された装置であり、主に環境分析の試料（土壌、焼却灰、排水など）に多く使用されている。食品試料への応用はまだ少ないが、堅い固形試料も短時間で分解が可能であるため、食品分析においても有用性が期待できる装置であると考えられる。今回は、代表的な食品試料として玄米と清涼飲料水を、生体試料として頭髪を用いてマイクロウェーブ分解の条件を検討した後、予め濃度が定められている認証値付きの標準試料の分析と試料への添加回収試験によって分析法の検証を行った。

B. 研究方法

B-1. 実験材料

食品試料として玄米と清涼飲料水を、人体試料として頭髪を用いることとした。玄米と頭髪は重金属の濃度が既に認証値として明らかな環境標準試料（国立環境研究所, NIES CRM No.10 玄米粉末、及び NIES CRM No.13 頭髪）を使用した。清涼飲料水は標準試料が入手できなかったため市販品を用いた。

B-2. 試薬及び器具

重金属測定用の標準溶液は、SPEX 社製の誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）用重金属混合標準溶液 XSTC-331(29 元素混合 10ppm 溶液)及び和光純薬工業株式会社製の水銀標準液（1000mg/L）を

用いた。濃硝酸は和光純薬工業株式会社製の超微量分析用を使用した。内部標準溶液には、SPEX 社製のインジウム標準液(1000mg/L)を用いた。使用するガラス器具類及びテフロン製の容器類は予め10%硝酸に浸し、蒸留水で洗浄したものをを用いた。

B-3. 装置

マイクロウェーブ分解装置はマイルストーンゼネラル社製 ETHOS TC を使用した。重金属の測定は誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）及び還元気化水銀分析装置を用いて行った。ICP-MS は Agilent 社製の 7500cs（写真1）を、高感度還元気化水銀分析装置は日本インスツルメンツ社製のマーキュリー-RA-2A（写真2）を使用した。超純水製造装置はミリポア社の miliQ SP UF を使用した。

B-4. 測定条件

1) ICP-MS（写真1）

測定元素及び質量数：

カドミウム(111)、鉛(208)、ヒ素(75)

ガス流量：キャリアガス：0.85L/min

メイクアップガス：0.20L/min

ヘリウムガス：5.5mL/min

2) 水銀分析装置（写真2）

測定波長：253.7nm

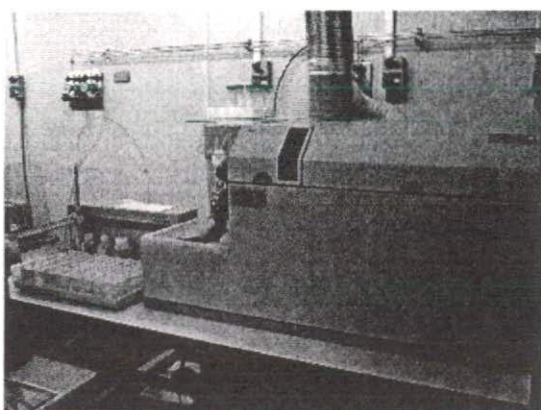


写真1 誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS)



写真2 高感度還元気化水銀分析装置

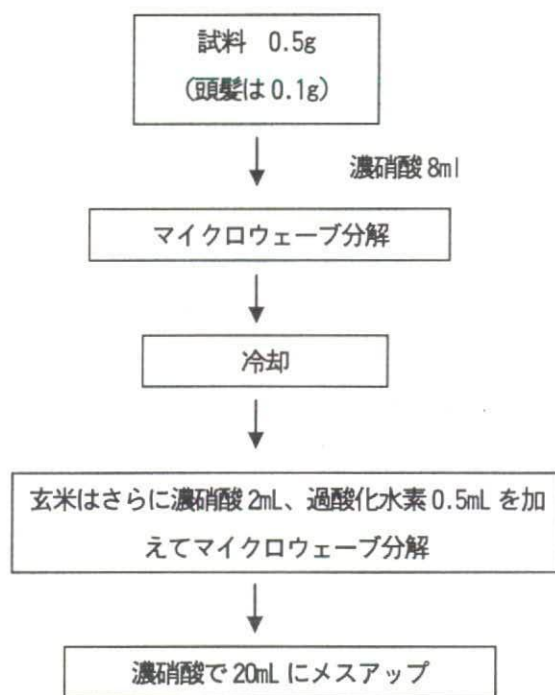


図6 マイクロウェーブ分解を用いた試料の前処理法

B-5. 試料の前処理 (図6)

マイクロウェーブ分解用容器 (写真3) に試料約 0.5g (頭髪は 0.1g) を精秤し、これに濃硝酸 8mL を加えた。しばらく放置した後、カバーを取り付け、表 12 に示す条件でマイクロウェーブ分解を行った (写真4、5)。30分冷却した後、ドラフト内で容器のフタを開け、褐色の煙が出なくなるまで放置した。玄米の場合は、さらに濃硝酸 2mL と過酸化水素 0.5mL を加え、再びマイクロウェーブ分解を行い 30分冷却した。分解液を 20mL メスフラスコに入れ、濃硝酸で洗い込みながらメスアップした。

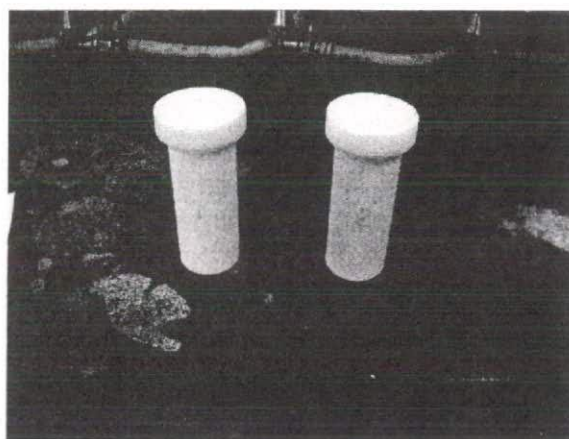


写真3 マイクロウェーブ分解用容器 (テフロン製)

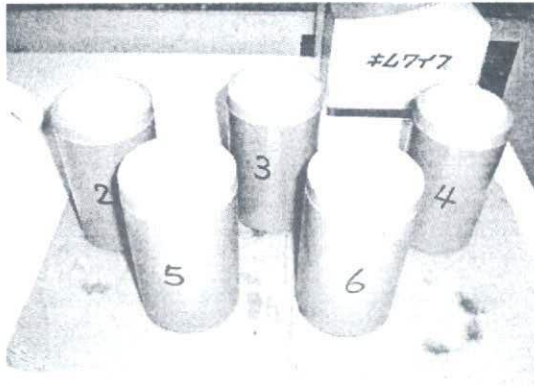


写真4 カバーの取り付け

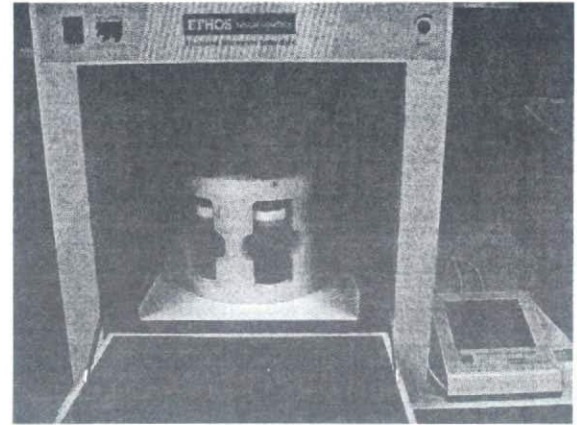


写真5 マイクロウェーブ分解装置

B-6. 重金属の測定 (図7)

前処理後の試料を一部採取し、水銀は高感度還元気化水銀装置で、その他の金属(Pb、Cd、As)は ICP-MS で測定した。

1) 水銀の測定 (還元気化水銀分析装置)

測定はサンプル前処理分解後すぐに行った。20mL にメスアップした各試料から 0.8mL を専用の発生瓶に採取した。これに、蒸留水 18.2mL と硫酸 1mL を入れて軽く振り混ぜた。測定の直前に塩化第一スズ溶液 1mL を加えた後、通気することにより、水銀蒸気を生じさせ、原子吸光法で検出・定量した。

2) カドミウム、鉛、ヒ素の測定 (ICP/MS)

100mL テフロンビーカーに分解後の試料を 10mL 正確に採取し、硝酸を蒸発させるために 170℃ のホットプレート上で加熱した。液量が 1mL 以下まで蒸発させた後、2%硝酸を 3mL 加えてよく溶解させた後、再び加熱した。この操作を 2~3 回繰り返した後、2%硝酸を 3mL 加えてよく溶解させ、10mL メスフラスコに移した。2%硝酸で洗い込みながらメスアップした。メスアップした試料液を 15mL のポリプロ

ピレン製の容器に 5mL 採取した (金属濃度が高い試料は希釈した)。また、検量線用標準溶液 (1、2、5、10、20、50、100ppb の 7 点の濃度で調製したもの) も同様に 5mL 採取した。採取した各標準溶液及び試料溶液に 1000ppb に調製した内標準のインジウム標準溶液を 50 μL ずつ加えてよく混合した後、ICP-MS で測定を行った。

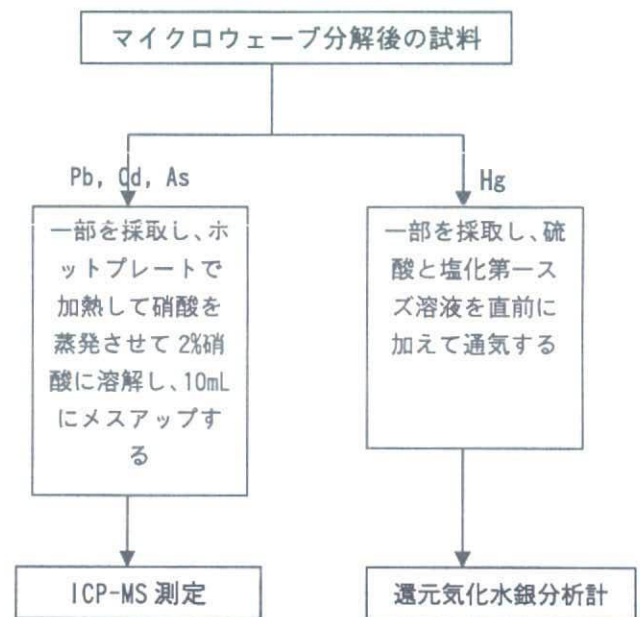


図7 試料液の重金属測定

C. 研究結果

C-1. ICP-MS における検量線の作成と定量下限値の確認

ICP-MS において、Pb、Cd、As について、1-100ppb の範囲で7点の濃度の標準溶液を測定し、検量線を作成した。いずれの元素についても、1-100ppb の濃度範囲で検量線に良好な直線性が得られた。水銀は還元気化水銀分析計を用いて、波長 253.7nm で測定を行った。また、実験に使用する水（蒸留水及び超純水）における Pb、Cd、As、Hg のブランク値を測定した結果、いずれも 0.2ppb 以下であり、健康被害発生時の食品等の検査に問題なく使用可能であると考えられた。各元素の試料における定量下限値は、玄米及び清涼飲料水で 0.04ppm、頭髮で 0.2ppm であった。

C-2. マイクロウェーブ分解装置の分解条件の検討

マイクロウェーブ分解装置を用いて、代表的な3種類の試料（食品の固形試料として玄米、液体試料として清涼飲料水、生体試料として頭髮）の前処理を試みた。それぞれの試料を分解するためのマイクロウェーブ分解装置の条件（昇温プログラム）検討では、分解前に加える硝酸の量は 8mL とし、表 12 に示すプログラムで試料の分解を行った。清涼飲料水及び頭髮は、いずれの試料も1回の分解で無色透明な分解液が得られた。しかしながら、玄米は1回の分解では分解液がまだ暗緑色を呈し、有機物がかなり残存することを示していたため、さらに過酸化水素 0.5mL と硝酸 2mL を加えて再び同じプログラムで分解を行った。2回目の分解後は淡黄色の分解液を得ることができたことから、玄米試料はマイクロウェーブの分解を2回行うこととした。分析に用いる試料の量は玄米及び清

涼飲料水は 0.5g とし、頭髮については 0.1g とした。

表 12 マイクロウェーブ試料前処理装置の条件

ステップ	時間 (分)	出力 (w)	温度 (°C)
1	2	1000	50
2	3	0	30
3	13	1000	185
4	1	0	155
5	4	1000	185
6	17	1000	185

C-3. 標準試料の分析及び添加回収試験による分析法の検証

1) 玄米試料における結果

予め濃度が値付けされている認証値付きの玄米の環境標準試料を用いて、マイクロウェーブ分解を用いた迅速分析法の検証を行った。マイクロウェーブ分解装置で環境標準試料を前処理した後、ICP/MS 及び水銀分析計で測定し、定量値と認証値を比較した。各元素の値を表 13 に示す。また、認証値と定量した値がどのくらい一致しているかを定量値と認証値の比を算出して示した。その結果、As、Cd の定量値は認証値と近い値であった。Hg は環境標準試料中に極微量にしか含まれておらず、検出下限値以下であった。また、Pb は認証値がなかったため比較できなかった。

次に、試料に標準液を添加し、n=5 で添加回収試験を行った。その結果を表 14 に示す。いずれの元素においても回収率の平均値は 80～120% の範囲で良好な回収率が得られた。Pb については値のばらつきを示す RSD の値が 20%

を超えたことから、若干ばらつきがあると思われる。

表 13 環境標準試料（玄米）の定量値及び認証値

元素	認証値 ($\mu\text{g/g}$)	定量値 ($\mu\text{g/g}$)	定量値/認証 値
As	0.11	0.084	0.76
Cd	0.32	0.31	0.96

表 14 玄米試料における各元素の添加回収率
(n=5)

元素	平均値 (%)	RSD (%)
As	91.3	4.6
Cd	99.4	2.1
Pb	118.7	21.9
Hg	95.3	7.2

2) 清涼飲料水における結果

清涼飲料水については認証値のついた標準試料が入手できなかったため、市販の清涼飲料水に標準液を添加して、添加回収試験のみを行った。その結果、表 15 に示すようにいずれの元素も 80~120%の範囲で良好な回収率が得られた。RSD についても 15%以内の良好な値が得られた。

表 15 清涼飲料水における各元素の
添加回収率 (n=5)

元素	平均値 (%)	RSD (%)
As	81.6	4.3
Cd	84.2	2.6
Pb	109.3	14.8
Hg	87.4	7.6

3) 頭髪試料における結果

頭髪試料もマイクロウェーブ分解で前処理を行い、玄米及び清涼飲料水と同様の方法で測定を行った。環境標準試料の定量値及び認証値を表 16 に示す。Cd、Hg については認証値との比が 0.8~1.2 の範囲にあり、良好な結果が得られた。As と Pb については認証値よりも高めの値であった。原因としては ICP-MS 測定における試料中のマトリックスの影響等が考えられる。

添加回収試験の結果を表 17 に示す。Pb と Hg については添加前の試料中含有量が高かったため、回収率を算出できなかった。As、Cd は回収率の平均値、RSD とともに良好な値であった。

表 16 環境標準試料（頭髪）の定量値
及び認証値

元素	認証値 ($\mu\text{g/g}$)	定量値 ($\mu\text{g/g}$)	定量値/認証 値
As	0.10	0.15	1.48
Cd	0.23	0.28	1.20
Pb	4.6	7.43	1.62
Hg	4.42	5.09	1.15

表 17 頭髮試料における各元素の添加回収率
(n=4)

元素	平均値 (%)	RSD (%)
As	91.6	2.8
Cd	95.6	2.0

D. 考察

今回、迅速な試料の前処理法としてマイクロウェーブ分解法の検討を行った。これまで主に酸分解による試料前処理法として用いられてきた湿式分解法と、今回検討を行ったマイクロウェーブ法の比較を表 18 に示した。湿式分解法は、ガラス容器に試料を採取し、酸を加えてバーナーで加熱分解する従来からの方法である。この方法では試料の分解が終わるまでに非常に時間がかかり、約 1 日半程度を要した。試料によっては 2 日以上かかるものもある。また、強酸等の試薬の使用量も多く、玄米を分解する場合で 1 検体あたり 50-100ml の硝酸を使用することとなる。そして分解は開放系で行うため、環境負荷が大きく、危険性を伴う。また、火力を用いるため、分解中は常に見張りが必要であ

る。しかしながら、この方法は従来から公定法として採用されている方法であり、特別な装置等は必要なく、消耗品コストも安価であることから、現在もよく用いられている方法である。一方、マイクロウェーブ分解法は分解容器内部の試薬を直接加熱することができる非常に効率の良い分解法である。マイクロウェーブ分解は、1 検体に使用する酸の量が 20ml 以下と少なく、分解時間は 1-2 時間程度 (冷却に 30 分) である。さらに湿式分解法との大きな相違点として、閉鎖系で分解を行うという点がある。そのため、環境負荷が小さく、危険が少ない。また、試料をセットして、昇温プログラムを設定することにより自動で分解できるため、労力が節約できる。しかしながら昨年度の調査で地方衛生研究所における導入割合は 26 機関中 4 機関のみで、普及度が低いのが難点である。導入率の低さのため、緊急時における標準的な分析法としてはまだ採用できる段階ではないが、今後、あらゆる試料に対応できる非常に有用な分析方法として期待できるものと考えられる。

表 19 に重金属類の測定機器である ICP-MS と原子吸光分析の比較を示す。原子吸光分析は

表 18 湿式分解及びマイクロウェーブ分解の比較

	湿式分解法	マイクロウェーブ分解法
分解時間	一日半	2-4 時間
使用する硝酸の量	50~100ml	8~15ml
機器	特に必要なし	高額
コスト	低	高
危険性	大	小
環境負荷	開放系で行うため、大きい	閉鎖系で行うため、小さい

表 19 ICP-MS と原子吸光分析の比較

	ICP-MS	原子吸光分析
利点	<ul style="list-style-type: none"> ・多元素同時分析が可能 ・1 検体数分程度で測定可能 (10 元素測定) ・感度が良い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ランニングコストが安い
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ・機器及びランニングコストが高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・単元素測定 ・元素ごとにランプを取り換えて安定させるのに時間がかかる。

ICP-MS に比べて、ランニングコストが安いという利点はあるが、単元素ずつの測定となるため、多種類の元素を測定する場合は非常に時間がかかる。日常業務で決められた元素のみを測定する場合は操作も簡便で使いやすいが、スクリーニング検査には不向きである。一方、ICP-MS は多元素を同時に測定可能で、多元素測定を行っても 1 検体あたりの測定時間は数分以内と短い。健康危機発生時など、網羅的に調べる必要がある場合に有用と考えられる。検出感度は非常に良好で、環境試料の分析では非常によく用いられている。食品分析においても最近よく活用されているが、マトリックス成分の多い食品試料では前処理も含めた事前の検討を十分に行うことが重要と思われる。実際の健康被害の発生時に、原因物質として重金属が疑われる場合、検査現場では網羅的なスクリーニング分析をいかに迅速に行うかが重要である。図 8 に今回検討したマイクロウェーブ分解/ICP-MS 及び水銀分析計を用いた方法と従来法（湿式分解/原子吸光法）での重金属の分析の流れを示した。検体が搬入され、検査を開始してから結果が出るまでに要する時間を比較すると、従来法

である湿式分解/原子吸光法では、玄米試料 5 検体で、前処理に 1 日半、測定に 1 日程かかり、試料の採取から測定まで約 2 日半（約 20 時間）かかると算出された。一方、マイクロウェーブ/ICP-MS では、前処理が 4 時間、測定が 2 時間、計 6 時間で検査が可能で、1 日以内で結果を出すことができると推定され、検体搬入からの検査時間が、これまでの半分以下になると考えられた。

E. 結論

食品試料及び生体試料の迅速な前処理装置として、マイクロウェーブを用いた方法の検討を行った。代表的な食品試料として玄米と清涼飲料水を、生体試料として頭髪を用い、マイクロウェーブ分解装置における分解条件を検討した後、環境標準試料（認証値付き試料）の定量及び添加回収試験を行い、分析法の検証を行った。その結果、頭髪中のヒ素、鉛については認証値付きの試料においてやや高めの値であったが、その他は良好な結果であった。検査時間については、これまでの湿式分解/原子吸光法の半分以下の時間で検査が可能であり、一日で結果を出すことが可能

であると考えられた。健康被害発生時のスクリーニング検査法として非常に有用な方法と考えられた。

- 1. 論文発表
なし
- 2. 学会発表
なし

F. 研究危険情報

なし

H. 知的所有権の取得情報

なし

G. 研究発表

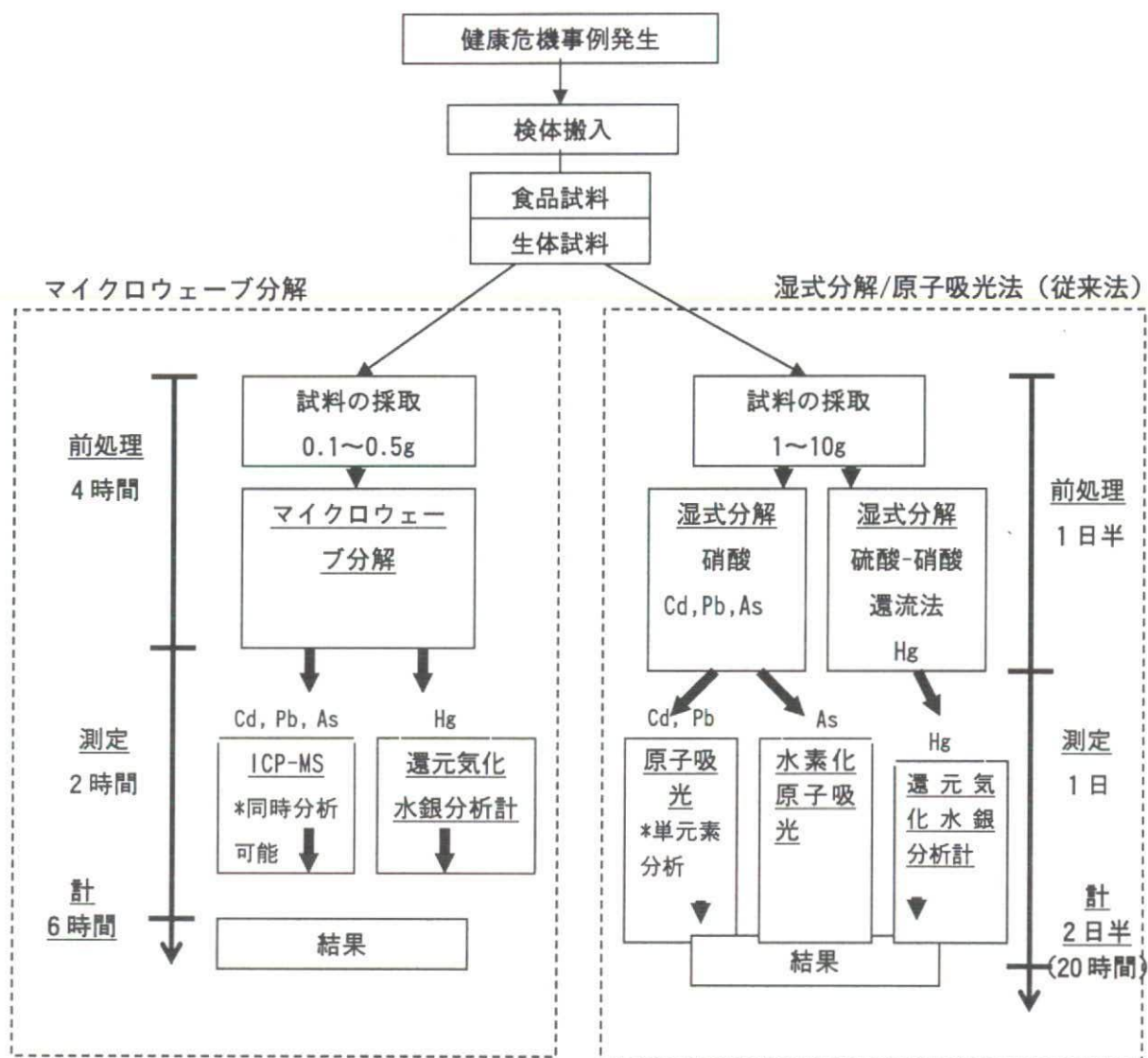


図8 マイクロウェーブ分解/ICP-MS 法と湿式分解/原子吸光法(従来法)を用いた場合の検査時間の比較(玄米5検体、4元素測定の場合)

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
ーリアルタイム 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ー

分担研究報告書

研究分担者 長井忠則 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、地方衛生研究所において実証試験を実施した。我が国で多くみられる細菌性食中毒原因菌であるカンピロバクター、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、TDH 産生腸炎ビブリオ、ウェルシュ菌、腸管出血性大腸菌、嘔吐毒産生性セレウス菌、*astA* 陽性大腸菌の 8 種をはじめ、腸管毒素原性大腸菌 (ST, LT)、腸管凝集接着性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、赤痢菌、プレシオモナス・シグロイデス、プロビデンシア・アルカリファシエンス、エルシニア菌、カンピロバクター・コリー、エロモナス・ヒドロフィラ、コレラ菌、TRH 産生腸炎ビブリオ、下痢毒産生性セレウス菌について検討した。リアルタイム PCR 並びに duplex リアルタイム PCR の 2 試験系により評価した。どの菌種も標的遺伝子の増幅が認められたが、使用機器により一部に試薬やサーマルサイクル条件を変更する必要があることが確認された。食中毒事例で採取された有症者や従事者便をはじめ、食材・食品についてインターカレーター法によるリアルタイム PCR を検証した結果、短時間で妥当な結果を得た。多種類の遺伝子を同時に検査するリアルタイム PCR は、食中毒事例等の食水系感染症の迅速診断に有効な方法であることが確認された。

研究協力者

福島 博	島根県環境衛生研究所微生物部
堀川和美	福岡県保健環境研究所
江藤良樹	福岡県保健環境研究所
中村祥子	福岡県保健環境研究所
村上光一	福岡県保健環境研究所
須釜久美子	福島県衛生研究所微生物課
菅野奈美	福島県衛生研究所微生物課
小黒祐子	福島県衛生研究所微生物課
山口敬治	北海道立衛生研究所微生物部
清水俊一	北海道立衛生研究所微生物部
森本 洋	北海道立衛生研究所微生物部

研究の背景ならびに梗概

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こり、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、現在は事例ごとに、全ての食中毒細菌を対象として培地を調整・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、原因菌決定までに培養のための長い時間が必要であり、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、福島ら(2005)はLight Cyclerを用いた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、食中毒等の食水系感染症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。インターカレーター法によるリアルタイムPCR法の導入方法における各種条件について検討し、事例から得た試料を用いて疫学的検証を行った。

研究発表実績

1. 論文発表

Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J. and Akiba, Y.: Comprehensive and Rapid Real-Time SYBR Green I PCR Detection of Food-borne Pathogens in Feces from 21 Bacterial Food Poisoning Cases in Shimane Prefecture, Japan. *Int. J. Microbiol.* 2009

<http://www.hindawi.com/journals/ijmb/aip.917623.html>

2. 学会発表

福島博:SYBR green リアルタイムPCR法による食中毒21事例からの原因菌の迅速スクリーニング, 第29回食品微生物学会学術総会, 広島, NOV 2008

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

—SYBR Green リアルタイム PCR 法による食中毒 21 事例からの原因菌の迅速スクリーニング—

分担研究者 長井忠則 北海道立衛生研究所

要旨 食中毒の急性期患者5名の糞便からQIAamp DNA Stool Mini kitを用いDNAを抽出し、duplex SYBR GreenリアルタイムPCRによる検査で食中毒菌の標的遺伝子22種類のうち8種類を2時間以内に、次いで他の8種類を45分以内に検出できる迅速スクリーニング法を開発した。本法を平成14年度から平成19年度に島根県で発生した食中毒21事例に応用し、ほとんどの事例で初回のスクリーニングPCRで食中毒原因菌の標的遺伝子が検出され、原因を迅速に推測することが可能となった。本法による急性期糞便からの食中毒菌の標的遺伝子の迅速な増幅と特異遺伝子の確実な検出は効率的かつ確実な細菌分離と食中毒の迅速診断を可能にした。

研究協力者

福島 博 島根県保健環境科学研究所
保健科学部長

A. 研究目的

食品、環境、臨床材料等からの食中毒原因菌の検出には TaqMan プローブなどの蛍光色素プローブを用いたリアルタイム PCR 法が多く報告されている。食中毒菌のスクリーニングには全ての原因菌のプライマー・プローブセットを備えておくことが望ましいが、蛍光色素プローブが高価なことから、報告の多くは主要食中毒菌の Single PCR に限られる。これらの制約は、二本鎖 DNA に結合して蛍光を発する簡単で安価な試薬 (SYBR Green I) の使用により克服することができる。この反応の特異性は融解曲線分析で確認できる。食中毒患者便の検査では常在菌との鑑別が重要であるが、10 倍希釈糞便液を QIAamp DNA stool Mini Kit で抽出した DNA を用いることにより、反応チューブ内の DNA 量は糞便中の約 $1/10^4$ に希釈され、大量菌のみをスクリーニングす

ることができる^{1,2)}。そこで、2002 年以後に発生した細菌性食中毒 21 事例に応用した Duplex SYBR Green リアルタイム PCR 法による原因菌の迅速スクリーニングの結果を検討し、本法の食中毒原因菌の迅速スクリーニング法としての有用性を検討した³⁾。

B. 研究方法

検査対象菌として、平成 19 年度の報告書に示した主要な食中毒原因菌 8 菌種:サルモネラ・エンテリティデス、カンピロバクター・ジェジュニ、腸管出血性大腸菌、TDH 産生性腸炎ビブリオ、*astA* 陽性大腸菌、ウェルシュ菌、嘔吐毒産生性セレウス菌、黄色ブドウ球菌の他に、腸管毒素原性大腸菌 (ST, LT)、腸管凝集接着性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、赤痢菌、プレシオモナス・シゲロイデス、プロピデンシア・アルカリファシエンス、エルシニア菌、カンピロバクター・コリー、エロモナス・ヒドロフィラ、コレラ菌、TRH 産生腸炎ビブリオ、下痢毒産生性セレウス菌を用いた。これらの食中毒原因菌の検出用プライマーを表 1 に示した。プライマーのほとんどは既論文で特異性と感度について検討されたものを選択した。嘔吐毒産生性セ

レウス菌と腸管凝集接着性大腸菌、エルシニア菌、カンピロバクター・コリー検出用プライマーは表 1 に示す遺伝子を標的とし新たに設計した³⁾。

3) 食中毒事例の検査

平成 14 年度から平成 19 年度に島根県で発生した細菌性食中毒又は集団感染症事例 21 例の検査成績を表 2 に示す。初回 duplex SYBR Green PCR における 4 組のプライマーセットは、平成 14 年度から平成 18 年度の検査では当該食中毒の疫学的背景を考慮し選択した。感染型食中毒の場合はサルモネラ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌等を、毒素型食中毒の場合は黄色ブドウ球菌、嘔吐型セレウス菌等を中心に初回 PCR を実施した。2, 3 回目の PCR ではその他のプライマーを用い、混合感染の有無を確認した。平成 19 年度には表 1 に示す主要な食中毒菌 8 菌種検出用プライマーを用い初回 PCR を実施し、2, 3 回目の PCR では発生頻度の低い食中毒菌による混合感染の有無を確認した。

C. 研究結果

平成 14 年から平成 19 年に duplex リアルタイム PCR 法で食中毒原因菌をスクリーニングした 21 事例の疫学的概要と検査結果を表 2 に示す。平成 19 年 9 月までの事例については食中毒の発生状況、症状、疫学的背景等を考慮して、初回 duplex PCR 用のプライマーセットを工夫し実施したが、平成 19 年 12 月以降の検査では主要な食中毒原因菌 8 菌種検出用プライマーセットを用い検査した。本法では 1 回の検査で患者糞便 5 検体について 4 組の duplex リアルタイム PCR により 8 種類の食中毒原因菌の標的遺伝子をスクリーニングすることができるが、腸管出血性大腸菌 O26 感染が明らかになった後に検査した事例 10 を除いた 20 事例において、初回の検査で全ての事例において原因菌がスクリーニングされ、その検出率は 58.1%(54/93)であった。8 事例(事例 1, 2, 4, 7, 8, 11, 15, 19)においては初回検査で 1 検体からのみ原因菌が検出されたが、その後採集された全ての糞便についての単独 PCR によ

る最終検査では複数の検体から検出された。PCR による最終検査の検出率は 110/191 (57.6%)、培養検査の分離率は 162/292 (55.4%)とほぼ同率であった。

平成 17 年 1 月までの 10 事例については感染症学雑誌¹⁾に発表したもので、平成 17 年 9 月以降に検査した 11 事例について食中毒原因菌の標的遺伝子が検出された PCR 反応における増幅曲線と融解曲線分析の結果を図 1~11 に示す。

1) 事例 11 (図 1)

感染型食中毒菌を標的とした初回の duplex PCR でウェルシュ菌の *cpe* 遺伝子が有症者糞便 5 検体中 1 検体から検出された。2 回目のその他の食中毒菌を標的とした検査では全て陰性であり、本食中毒事例の原因菌を特定することができなかった。最終検査として 1, 2 回目に検査対象としなかった EAEC について *aggR* および *astA* 遺伝子を標的とした duplex PCR を有症者糞便 14 検体について実施したところ、*astA* 遺伝子が 14 検体全てから検出された。便培養により *astA* 陽性大腸菌が糞便 46 検体中 41 検体から分離された。

2) 事例 12 (図 2)

感染型食中毒菌を標的とした初回の duplex PCR のカンピロバクター・ジェジュニと *astA* 遺伝子の組合せで *astA* 遺伝子が 5 検体、カンピロバクター・ジェジュニが 1 検体から検出された。その他の反応系において 2 検体ずつからエロモナス・ヒドロフィラの *ahh1* 遺伝子、大腸菌の *eaeA* 遺伝子が検出された。2 回目検査で *Stx1, Stx2* 遺伝子が検出されなかったことから *eaeA* 遺伝子陽性検体には EPEC の存在が示唆された。培養検査によりカンピロバクター・ジェジュニのみが分離されたが、本事例は *astA* 陽性大腸菌と EPEC, エロモナス・ヒドロフィラ、カンピロバクター・ジェジュニの混合感染であったことが推測された。

3) 事例 13 (図 3)

嘔吐、下痢、腹痛を主症状としたため、セレウス菌と黄色ブドウ球菌の嘔吐型食中毒菌を含めた初回検査で黄色ブドウ球菌の種特異遺伝子が 2 検体から検出され、この 1 検体から *astA* 遺伝子

も検出された。培養検査により患者便 8 検体中 4 検体から黄色ブドウ球菌が分離された。

4) 事例 14 (図 4)

感染型食中毒菌を標的とした初回の duplex PCR で、ウェルシュ菌の *cpe* 遺伝子が 5 検体全てから検出され、2回目の検査を含め、他の食中毒菌の遺伝子は検出されなかった。培養検査により患者便 8 検体全てからウェルシュ菌が分離された。

5) 事例 15 (図 5)

一般食堂でチャーハンを喫食し、嘔吐、腹痛の毒素型食中毒の症状を呈し、病院での検査でセレウス菌を疑う菌の発育を確認したことから、セレウス菌の単独PCRを行い、患者糞便 4 検体中 1 検体から *ces* 遺伝子が検出され、培養検査で患者糞便 2 検体からセレウス菌が分離された。

6) 事例 16 (図 6)

感染型食中毒菌を標的とした初回の duplex PCR で、カンピロバクター・ジェジュニの種特異遺伝子と *astA* 遺伝子が 3 検体から、他の 1 検体からは *astA* 遺伝子が検出され、カンピロバクター・ジェジュニと *astA* 陽性大腸菌による混合感染が示唆された。エルシニア菌の *yadA* 遺伝子と *astA* 遺伝子の duplex PCR では融解曲線分析による T_m が近値であったため判別が困難であったが、単独 PCR により *yadA* 遺伝子の増幅が確認された。培養検査ではカンピロバクター・ジェジュニを患者糞便 14 検体中 9 検体から分離されたが、*astA* 陽性大腸菌は分離できなかった。

7) 事例 17 (図 7)

食中毒菌主要 8 菌種を標的とした duplex PCR で、TDH 産生腸炎ビブリオの *tdh* 遺伝子が 4 検体から検出され、2回目のその他の食中毒菌を標的とした検査では全て陰性であった。培養検査で患者糞便 6 検体中 4 検体から腸炎ビブリオ O1:K25 が分離された。

8) 事例 18 (図 8)

一般食堂で焼肉を喫食し腹痛と下痢を呈し発症した事例であったことから、カンピロバクター・ジェジュニの単独 PCR とその他の感染型食中毒菌

を標的とした duplex PCR により、カンピロバクター・ジェジュニの種特異遺伝子が 3 検体から検出された。その後の培養検査で患者糞便 10 検体中 4 検体からカンピロバクター・ジェジュニが分離された。

9) 事例 19 (図 9)

焼肉店で生牛レバーをはじめ焼肉料理を喫食し発症した事例で、発症 7 日目に採取された糞便 2 検体中 1 検体から duplex SG-PCR によりカンピロバクター・ジェジュニの種特異遺伝子が検出され、その後の培養検査により当該菌が分離された。

10) 事例 20 (図 10)

食中毒菌主要 8 菌種を標的とした duplex PCR で *eaeA* 遺伝子が 2 検体から検出され、2 回目の duplex SG-PCR でプレシオモナス・シグロイデスの *gyrB* 遺伝子が *eaeA* 遺伝子陽性の 1 検体と別の 1 検体の 2 検体から検出された。培養検査ではプレシオモナス・シグロイデスが PCR 陽性の 2 検体から分離された。*eaeA* 遺伝子陽性検体からは他の病原大腸菌の遺伝子は検出されず、EPEC が存在することが示唆されたが、*eaeA* 遺伝子保有株を分離することは出来なかった。

11) 事例 21 (図 11)

食中毒菌主要 8 菌種を標的とした duplex PCR で 3 検体からカンピロバクター・ジェジュニの種特異遺伝子が検出され、うち 1 検体ではカンピロバクター・ジェジュニの種特異遺伝子と *astA* 遺伝子が同時に検出された。2回目の *aggR* 遺伝子を含むその他の食中毒菌を標的とした検査では全て陰性であった。糞便 8 検体の培養検査で 4 検体からカンピロバクター・ジェジュニ、1 検体から *astA* 陽性大腸菌が分離された。

D. 考 察

食品および水を媒介し感染する細菌感染症の原因菌 14 菌種とその菌型またはグループを規定する遺伝子を標的とした 22 種類のプライマーを用いた duplex SG リアルタイム PCR による網羅的迅速検査法を開発し、島根県で平成 14 年から平成 19 年に発生した細菌性食中毒又は集団感染

症21事例に応用した。ほとんどの事例でduplex SG リアルタイムPCRの初回検査で原因菌が検出され、食中毒発生時における原因菌の網羅的迅速スクリーニング法として本法が極めて有用であることが確認された。特に、初回の試験に食中毒菌8菌種(サルモネラ、カンピロバクター・ジェジュニ、腸管出血性大腸菌、TDH産生性腸炎ピブリオ、*astA*陽性大腸菌、ウェルシュ菌、嘔吐毒産生性セレウス菌、黄色ブドウ球菌)の検出プライマーを採用し、その感度を向上させることにより確実なスクリーニングが可能となった。

また、7事例の初回又は2回目のduplex PCR検査で2~4種類の食中毒原因菌による混合感染が確認された。ノロウイルス感染の2事例においては細菌による混合感染症を迅速に確認することができた。混合感染は通常の培養検査では分離することが困難な*astA*陽性大腸菌や腸管病原性大腸菌による事例が多く、リアルタイムPCRを導入することにより初めてその感染を察知できた事例がほとんどであった。さらに、事例12や20では、エロモナス・ヒドロフィラやプレシオモナス・シゲロイデスが検出され、事例20の患者糞便2検体からはPCR検査結果に基づきプレシオモナス・シゲロイデスを分離することができた。初回検査での主要食中毒原因菌のスクリーニングの後に、エロモナス・ヒドロフィラやプレシオモナス・シゲロイデス、エルシニア菌、プロビデンシア・アルカリファシエンス等のように発生頻度が極めて低く培養する機会およびその経験の少ない食中毒原因菌のスクリーニングは、検査精度の向上に極めて有用な手段であることが確認された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J. and Akiba, Y.: Comprehensive and rapid Real-Time PCR Analysis of 21 Food-borne Outbreaks. Int. J. Microbiol. 2009 (in press)

2. 学会発表

福島博:SYBR Green リアルタイム PCR 法による

食中毒 21 事例からの原因菌の迅速スクリーニング、第 29 回食品微生物学会学術総会
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 法による食中毒菌の迅速スクリーニングの検討 感染症学雑誌、79:644-655, 2005
- 2) Fukushima, H., Tsunomori, Y. and Seki, R.: Duplex real-time SYBR Green assays for detection of 17 species of food-or waterborne pathogens in stools. J Clin Microbiol. 41: 5134-46. 2003
- 3) Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J. and Akiba, Y.: Comprehensive and rapid Real-Time PCR Analysis of 21 Food-borne Outbreaks. Int. J. Microbiol. 2009.
<http://www.hindawi.com/journals/ijmb/aip.917623.html>

表1 対象とした食中毒原因菌とリアルタイムPCRのための食中毒原因菌検出用プライマー (文献 3)

Duple x PCR の プライ マー セット	食中毒菌	標的遺伝 子	PCR プライマー			増幅 産物 の大き さ	Tm 値 (平均値 ±標準偏 差値)	
			名称	Forward or revers	遺伝子配列 (5' - 3')			
1 回目	腸管病原性大腸菌 腸管出血性大腸菌	<i>eaeA</i>	eae	F2	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	106	83.2±0.2	
				R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA			
	黄色ブドウ球菌	<i>femB</i>	FemB	fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	93	80.8±0.3	
				rv	TGCGCAACACCCTGAACCTT			
	2	カンピロバクター・ジェ ジュニ 腸管凝集接着性大腸 菌	specific DNA	AB	F	CTGAATTTGATACCTTAAGTGCAGC	86	79.1±0.4
					R	AGGCACGCCTAAACCTATAGCT		
				EAST-1	S	GCCATCAACACAGTATATCC		
	3	TDH産生腸炎ビブリ オ	<i>tdh</i>	Tdh199	F	GGTACTAAATGGCTGACATC	251	81.6±0.3
					R	CCACTACCACTCTCATATGC		
	4	サルモネラ ウエルシュ菌	<i>invA</i>	StyinvA	JHO-2-r	TCGTCAATCCATTACCTACC	119	81.3±0.4
				JHO-3-l	AAACGTTGAAAACTGAGGA			
		<i>cpe</i>	GAP	11	GGTTCATTAATTGAAACTGGTG	154	78.3±0.4	
				12	AACGCCAATCATATAAATTACAGC			
2, 3 回目	腸管毒素原性大腸菌 (ST)	<i>ST</i>	STa-F	F	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA	190	78.5±0.2	
				R	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA			
	プレシオモナス・シゲ ロイデス	<i>gyrB</i>	PSG	237-F	TTCCAGTACGAGATCCTGGCTAA	68	83.1±0.2	
				304-R	TGAATCGACACGCCAGAGTTC			
	6	腸管凝集接着性大腸 菌	<i>aggR</i>	aggR-Z	F	CAGAATCGTCAGCATCAGCTACA	97	79.5±0.3
					R	GATGCCCTGATGATAATATACGGAA		
	腸管侵入性大腸菌 赤痢菌	<i>virA</i>	virA-F	F	CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACA	215	82.4±0.3	
				R	TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC			
	7	エロモナス・ヒドロフィ ラ	<i>ahh1</i>	AHH1	F	GCCGAGCGCCAGAAAGGTGAGTT	133	89.8±0.4
					R	GAGCGGCTGGATGCGGTTGT		
腸管毒素原性大腸菌 (LT)	<i>LT</i>	LT	1	AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA	132	82.0±0.3		
			2	GTGCTCAGATTCTGGGTCTC				
8	プロビデンシア・アル カリファシエンス 下痢型セレウス菌	<i>gyrB</i>	PAG	38F	TCTGCACGGTGTGGGTGTT	73	81.0±0.2	
				110R	ACCGTCACGGCGGATTACT			
9	エルシニア菌 カンピロバクター・コ リー	<i>nheB</i>	SG	F3	GCACTTATGGCAGTATTTGCAGC	152	82.7±0.4	
				R3	GCATCTTTTAAGCCTTCTGGTC			
		<i>yadA</i>	yadA-X	F	CCAGAACCAATTGCAATGCCT	100	81.6±0.2	
				R	CTTTAAACAGCTTGTTCAGCCA			
		<i>ceuE</i>	CCceuE	825F	ACGCGCACAAAGGCATACTT	91	77.6±0.3	
				915R	CCAGTATTCAGGATCAAGATAAATGATTT			
10	コレラ菌	<i>hlyA</i>	hlyA	2272-F	AGCAGCGTGTGGGACAAGA	71	82.4±0.1	
				2272-F	GCGGACCCTAATGCATCAAT			
	TRH産生腸炎ビブリオ	<i>trh</i>	Trh	250-F	GGCTCAAAATGGTTAAGCG	250	81.1±0.1	
				251-R	CATTTCCGCTCTCATATGC			
単 独	腸管病原性大腸菌 (Stx 1)	<i>Stx1</i>	JMS1	F	GTCACAGTAACAAACCGTAACA	95	81.1±1.0	
				R	TCGTTGACTACTTCTTATCTGGA			
	腸管病原性大腸菌 (Stx 2)	<i>Stx2</i>	JMS2F	F	CGACCCCTCTTGAACATA	108	81.7±0.3	
			R	GATAGACATCAAGCCCTCGT				