

別紙 4

健康危機管理時における食品中の重金属迅速分析マニュアル

マイクロウェーブ分解法

(ヒ素、鉛、水銀、カドミウム)

I. 試薬類

1. 標準品

市販の ICP/MS 用重金属混合標準溶液 (SPEX 社製, XSTC-331, 10ppm 溶液等) または、単品の標準溶液 (JCSS 認定、和光純薬工業株式会社製等) を使用する。単品の標準溶液を用いる場合は、2%の硝酸を用いて 10ppm 混合溶液を作製する。水銀の分析には、水銀 100ppm 又は 1000ppm 溶液を使用する。ICP/MS 用の内部標準溶液にはインジウム (In) , 1000ppb (SPEX 社製等) を使用する。

(使用期限：容器に記載)

2. その他の試薬等

- 1) 濃硝酸：超微量分析用
- 2) 過酸化水素水：超高純度試薬
- 3) 水：純水製造装置により精製したもの
- 4) 硫酸：有害金属測定用
- 5) 塩化第一スズ (Ⅱ) 二水和物：有害金属測定用
塩化スズ (Ⅱ) 溶液 (水銀分析に使用)：塩化第一スズ (Ⅱ) 二水和物 10g に硫酸 (1+20) 60mL を加えて溶かし、水で 100mL にする。

II. 装置

- 1) 純水製造装置
- 2) 天秤
- 3) マイクロウェーブ試料前処理装置
- 4) ホットプレート
- 5) 還元気化水銀分析計
- 6) 誘導結合プラズマ・質量分析計 (ICP-MS)
- 7) マイクロピペット

III. 器具等

- 1) マイクロウェーブ用容器及びフタ
- 2) 100mL テフロンビーカー

- 3) 10mL 駒込ピペット
- 4) 2mL 駒込ピペット
- 5) 20mL メスフラスコ
- 6) 10mL メスフラスコ
- 7) 10-15mL PP 製サンプルチューブ
- 8) 5mL ホールピペット
- 9) 1mL メスピペット
- 10) 水銀発生瓶 (50mL 比色管)

IV. 試料溶液および標準液の調製

1. 試料溶液^{※1}

1) マイクロウェーブによる前処理

均一化した検体 0.5g を精秤し、マイクロウェーブ用の容器（テフロン、白）に入れる。濃硝酸 8mL を加えてフタをし、1 時間～1 晩放置する。同時に硝酸のみを入れたブランク試験も実施する。放置後、マイクロウェーブ試料前処理装置を用い、表のプログラムで分解を行う。容器を取り出してドラフト中でフタを開け、褐色の煙がなくなるまで放置する。玄米の場合は、さらに濃硝酸 2mL、過酸化水素水 0.5mL を加えて、もう一度マイクロウェーブ試料前処理装置で分解をおこなう（一回目と同じプログラム）。終了後、ドラフト中でフタを開け、褐色の煙が出なくなるまで放置する。試料液が淡黄色になっていれば、分解終了とする。試料液を濃硝酸で 20mL にメスアップする。

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 (℃)
1	2	1000	50
2	3	0	30
3	13	1000	185
4	1	0	155
5	4	1000	185
6	7	1000	185

2. 標準溶液

ICP/MS 用の検量線標準溶液は、10ppm 混合標準溶液を 2%硝酸で希釈し、1～100ppb (例 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100ppb) の範囲で標準溶液を作製する。水銀の標準溶液は標準液原液を 2%硝酸で希釈して 0.1ppm 溶液を作製する（一点検量線）。

V. 定性・定量

1) As、Pb、Cd の測定 (ICP-MS 法)

As、Pb、Cd を測定するために、その標準溶液および試料溶液を以下のように調製し、ICP-MS に導入する。

Ⅳ-1 で前処理をした試料液 10mL を正確にテフロンビーカーに取り、ドラフト中でホットプレート（170℃）上にのせて加熱する（濃硝酸を蒸発させる）。試料液が少なくなってきたら（0.5mL 程度）、ホットプレートからおろして煙が出なくなるまで放置する。2%硝酸を 2-3mL 程度加えて、よく溶かしながら再び加熱する。試料液が少なくなってきたら、再び 2%硝酸を 2-3mL 程度加えて残渣をよく溶かす。試料液を 10mL メスフラスコに移して、2%硝酸でメスアップする。調製したサンプルと検量線用の標準溶液を、それぞれホールピペットで 5mL ずつ PP 製サンプルチューブに取り（サンプル中の濃度が濃い場合は、希釈する）、内部標準溶液（インジウム In, 1000ppb）を 50uL ずつ添加する。これを ICP-MS 測定試料とする。標準溶液を測定し、それぞれの金属について検量線を作成する。試験溶液についても、同様にそれぞれの金属の強度を測定し、Ⅵの計算式より試料溶液中の金属の濃度を算出する。ICP-MS の測定条件例を以下に示す。

[ICP-MS 測定条件]

装 置：Agilent 7500cs

高周波出力：1.5 kW

ガ ス：

アルゴン

キャリアガス：0.85 L/min

メイクアップガス：0.20 L/min

ヘリウム

コリジョンガス：5.5 L/min

測定質量数：As：75, Pb：208, Cd：111

検量線範囲：1～100 ppb

2) Hg の測定（還元気化水銀分析法）

Hg を測定するために、その標準溶液および試料溶液を以下のように調製し、還元気化水銀分析で測定する。

Ⅳ-1 で前処理をした試料液 1～10mL と硫酸 1mL を水銀発生瓶（比色管）に入れ、全量で 20mL になるように水を加える。標準溶液として、水銀 0.1ppm 溶液、0.1mL(10ng)、水 18.9mL、硫酸 1mL を比色管に入れたものを用いて、1 点検量線を作製する。測定までフタをしておく。装置が安定化するまで 20 分程度要するので、立ち上げ（0.1N NaOH 溶液の注入、電源 ON）を行っておく。測定の直前に塩化スズ溶液 1mL を加えて通気することにより、水銀蒸気を発生させ、原子吸光法で検出・定量する。Ⅵの計算式より試料溶液中の水銀濃度を算出する。

[還元気化水銀分析計測定条件]

装置：日本インスツルメンツ社製のマーキュリー/RA-2A

測定波長：253.7nm

VI. 計算式

試料中の各元素の含有量 C (mg/kg, ppm) は、次式から求められる。

1) As, Pb, Cd

$$C \text{ (mg/kg, ppm)} = A \text{ (}\mu\text{g/mL, ppm)} \times 20 \text{ (mL)} \div W \text{ (g)}$$

A ：検量線から得られた試験溶液中の各元素の濃度 ($\mu\text{g/mL}$, ppm)

W ：試料採取量 (g)

2) Hg

$$C \text{ (mg/kg, ppm)} = A \text{ (ng)} \times 1/1000 \times 20 \text{ (mL)} \div V \text{ (mL)} \div W \text{ (g)}$$

A ：検量線から得られた試験溶液中の Hg の発生量 (ng)

W ：試料採取量 (g)

V ：試料液採取量 (mL)

VII. 判定

判定は以下の通りに行う。

定量下限値は試料中含有量として 0.02 mg/kg(ppm)となる。

VIII. 文献

- 1) 芦塚由紀, 岡本華菜, 山本重一, 中川礼子, マイクロウェーブ分解装置を用いた重金属の迅速分析法の検討, 福岡県保健環境研究所年報第 36 号

別紙5

健康危機管理時における生体試料中の重金属迅速分析マニュアル

マイクロウェーブ分解法

(ヒ素、鉛、水銀、カドミウム)

I. 試薬類

1. 標準品

市販の ICP/MS 用重金属混合標準溶液 (SPEX 社製, XSTC-331, 10ppm 溶液等) または、単品の標準溶液 (JCSS 認定、和光純薬工業株式会社製等) を使用する。単品の標準溶液を用いる場合は、2%の硝酸を用いて 10ppm 混合溶液を作製する。水銀の分析には、水銀 100ppm 又は 1000ppm 溶液を使用する。ICP/MS 用の内部標準溶液にはインジウム (In) , 1000ppb (SPEX 社製等) を使用する。

(使用期限：容器に記載)

2. その他の試薬等

- 1) 濃硝酸：超微量分析用
- 2) 過酸化水素水：超高純度試薬
- 3) 水：純水製造装置により精製したもの
- 4) 硫酸：有害金属測定用
- 5) 塩化第一スズ (II) 二水和物：有害金属測定用

塩化スズ (II) 溶液 (水銀分析に使用)：塩化第一スズ (II) 二水和物 10g に硫酸 (1+20) 60mL を加えて溶かし、水で 100mL にする。

II. 装置

- 1) 純水製造装置
- 2) 天秤
- 3) マイクロウェーブ試料前処理装置
- 4) ホットプレート
- 5) 還元気化水銀分析計
- 6) 誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS)
- 7) マイクロピペット

III. 器具等

- 1) マイクロウェーブ用容器及びフタ
- 2) 100mL テフロンビーカー

- 3) 10mL 駒込ピペット
- 4) 2mL 駒込ピペット
- 5) 20mL メスフラスコ
- 6) 10mL メスフラスコ
- 7) 10-15mL PP 製サンプルチューブ
- 8) 5mL ホールピペット
- 9) 1mL メスピペット
- 10) 水銀発生瓶 (50mL 比色管)

IV. 試料溶液および標準液の調製

1. 試料溶液^{※1}

1) マイクロウェーブによる前処理

均一化した検体 0.1g を精秤し、マイクロウェーブ用の容器（テフロン、白）に入れる。濃硝酸 8mL を加えてフタをし、1時間～1晩放置する。同時に硝酸のみを入れたブランク試験も実施する。放置後、マイクロウェーブ試料前処理装置を用い、表のプログラムで分解を行う。容器を取り出してドラフト中でフタを開け、褐色の煙がなくなるまで放置する。終了後、ドラフト中でフタを開け、褐色の煙が出なくなるまで放置する。試料液が淡黄色になっていれば、分解終了とする。試料液を濃硝酸で 20mL にメスアップする。

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	7	1000	185

2. 標準溶液

ICP/MS 用の検量線標準溶液は、10ppm 混合標準溶液を 2%硝酸で希釈し、1～100ppb (例 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100ppb) の範囲で標準溶液を作製する。水銀の標準溶液は標準液原液を 2%硝酸で希釈して 0.1ppm 溶液を作製する (一点検量線)。

V. 定性・定量

1) As、Pb、Cd の測定 (ICP-MS 法)

As、Pb、Cd を測定するために、その標準溶液および試料溶液を以下のように調製し、ICP-MS に導入する。

IV-1 で前処理をした試料液 10mL を正確にテフロンビーカーに取り、ドラ

フト中でホットプレート（170℃）上に乗せて加熱する（濃硝酸を蒸発させる）。試料液が少なくなってきたら（0.5mL程度）、ホットプレートからおろして煙が出なくなるまで放置する。2%硝酸を2-3mL程度加えて、よく溶かしながら再び加熱する。試料液が少なくなってきたら、再び2%硝酸を2-3mL程度加えて残渣をよく溶かす。試料液を10mLメスフラスコに移して、2%硝酸でメスアップする。調製したサンプルと検量線用の標準溶液を、それぞれホールピペットで5mLずつPP製サンプルチューブに取り（サンプル中の濃度が濃い場合は、希釈する）、内部標準溶液（インジウム In, 1000ppb）を50uLずつ添加する。これをICP-MS測定試料とする。標準溶液を測定し、それぞれの金属について検量線を作成する。試験溶液についても、同様にそれぞれの金属の強度を測定し、Ⅵの計算式より試料溶液中の金属の濃度を算出する。ICP-MSの測定条件例を以下に示す。

[ICP-MS 測定条件例]

装置：Agilent 7500cs

高周波出力：1.5 kW

ガス：

アルゴン

キャリアガス：0.85 L/min

メイクアップガス：0.20 L/min

ヘリウム

コリジョンガス：5.5 L/min

測定質量数：As：75, Pb：208, Cd：111

検量線範囲：1～100 ppb

2) Hg の測定（還元気化水銀分析法）

Hg を測定するために、その標準溶液および試料溶液を以下のように調製し、還元気化水銀分析で測定する。

Ⅳ-1 で前処理をした試料液 1～10mL と硫酸 1mL を水銀発生瓶（比色管）に入れ、全量で 20mL になるように水を加える。標準溶液として、水銀 0.1ppm 溶液、0.1mL(10ng)、水 18.9mL、硫酸 1mL を比色管に入れたものを用いて、1点検量線を作製する。測定までフタをしておく。装置が安定化するまで 20分程度要するので、立ち上げ（0.1N NaOH 溶液の注入、電源 ON）を行っておく。測定の直前に塩化スズ溶液 1mL を加えて通気することにより、水銀蒸気を発生させ、原子吸光法で検出・定量する。Ⅵの計算式より試料溶液中の水銀濃度を算出する。

[還元気化水銀分析計測定条件]

装置：日本インスツルメンツ社製のマーキュリー/RA-2A

測定波長：253.7nm

VI. 計算式

試料中の各元素の含有量 C (mg/kg, ppm) は、次式から求められる。

1) As, Pb, Cd

$$C \text{ (mg/kg, ppm)} = A \text{ (}\mu\text{g/mL, ppm)} \times 20 \text{ (mL)} \div W \text{ (g)}$$

A : 検量線から得られた試験溶液中の各元素の濃度 ($\mu\text{g/mL}$, ppm)

W : 試料採取量 (g)

2) Hg

$$C \text{ (mg/kg, ppm)} = A \text{ (ng)} \times 1/1000 \times 20 \text{ (mL)} \div V \text{ (mL)} \div W \text{ (g)}$$

A : 検量線から得られた試験溶液中の Hg の発生量 (ng)

W : 試料採取量 (g)

V : 試料液採取量 (mL)

VII. 判定

判定は以下の通りに行う。

定量下限値は試料中含有量として 0.1 mg/kg(ppm)となる。

VIII. 文献

- 1) 芦塚由紀, 岡本華菜, 山本重一, 中川礼子, マイクロウェーブ分解装置を用いた重金属の迅速分析法の検討, 福岡県保健環境研究所年報第 36 号

<参考資料1> マイクロウェーブ分解装置を用いた迅速分析法の検討結果

1. 食品試料 (参考として As,Pb,Cd,Hg 以外の元素についても示した。)

清涼飲料水の添加回収率 (n=5)

金属	回収率(%)	RSD(%)
Cr	112.2	23.8
Mn	81.3	7.1
Co	106.3	2.6
Ni	66.8	8.9
Cu	89.2	14.7
As	90.2	4.3
Se	90.3	4.2
Cd	92.7	2.3
Tl	99.5	2.4
Pb	102.0	15.9
Hg	87.4	8.7
Zn*	125.2	22.8

玄米の添加回収率 (n=5)

金属	回収率(%)	RSD(%)
Cr	98.3	5.2
Co	88.6	4.6
Cu	97.3	10.6
As	91.3	4.6
Se	85.3	6.7
Cd	99.4	2.0
Tl	112.0	2.4
Pb	118.6	21.9
Hg	95.3	7.2
Ni*	99.2	23.6
Mn*	171.0	41.4
Zn*	422.8	134.1

環境標準試料（NIES CRM No.10 玄米粉末）の保証値及び参考値との比較

金属	認証値 (ppm)	定量値 (n=3)	平均値 / 認証値
		平均値(ppm)	
Cr	0.22 *	0.17	0.8
Mn	31.5	28.7	0.9
Co	0.02 *	0.04	1.8
Ni	0.39	1.13	2.9
Cu	3.3	3.15	1.0
Zn	22.3	22.9	1.0
As	0.11 *	0.08	0.8
Se	0.02 *	-	-
Cd	0.32	0.31	1.0

環境標準試料は独立行政法人 国立環境研究所より入手した。 * は参考値

2. 生体試料（参考として As, Pb, Cd, Hg 以外の元素についても示した。）

頭髮の添加回収率 (n=4)

金属	回収率(%)	RSD(%)
Cr	58.7	10.9
Mn	—	—
Co	97.1	1.8
Ni	38.5	81.4
Cu	—	—
As	91.6	2.8
Se	114.1	4.0
Cd	95.6	2.0
Tl	127.4	2.1
Pb	—	—
Hg	—	—
Zn*	—	—

環境標準試料（NIES CRM No.13 頭髪）の保証値及び参考値との比較

金属	認証値 (ppm)	定量値 (n=3)	平均値 / 認証値
		平均値(ppm)	
Cr		0.82	0.76
Mn	3.9	3.3	0.9
Co	0.07	ND	1.75
Ni		1.66	2.88
Cu	15.3	12.7	0.95
Zn	172	106	1.02
As	0.1	0.15	0.76
Se	1.79	1.78	—
Cd	0.23	0.28	0.96
Tl		ND	—
Pb	4.6	7.4	—
Hg	4.42	4.98	—

環境標準試料は独立行政法人 国立環境研究所より入手した。 * は参考値

< 参考資料 2 >

迅速分析法の注意点

- 1) ICP-MS 測定用には一般的に硫酸は使用不可である。試料の前処理には濃硝酸のみで行うか、濃硝酸に少量の過酸化水素水を加えて行う。
- 2) ICP-MS 測定において、マトリックス成分の多い試料では共存物質による分子イオン干渉を受けやすいため、前処理を十分に行う必要がある。干渉するイオンの例としては、As (質量数 75) で ArCl がある。目的元素に複数の同位体が存在する場合は分子イオンの干渉の少ない質量数を選択すると有効な場合がある。
- 3) 水銀は揮発しやすいこと、機器に残りやすいことから、ICP-MS 測定には不向きと考えられる。
- 4) この迅速分析法の試料の希釈率は、食品が 40 倍で生体試料が 200 倍である。試料の種類や元素の濃度によっては、さらに希釈が必要な場合がある。
- 5) 試料の分析の際、試薬ブランク、操作ブランクを同時に行うこと。

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 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、複数の地方衛生研究所において実証試験を実施した。24 菌種を同時に検出できる系を開発しキット化を行うと共に、食中毒等の食水系感染症事例から得た試料について、疫学的検証を加えた。その結果、迅速で網羅的な検査法であることが疫学的に実証された。また、共通の 8 種の DNA 試料を用いて4箇所の施設のリアルタイム PCR 機器の結果を比較した。

研究協力者

山口敬治	北海道立衛生研究所
清水俊一	北海道立衛生研究所
森本 洋	北海道立衛生研究所
池田徹也	北海道立衛生研究所
須釜久美子	福島県衛生研究所
菅野奈美	福島県衛生研究所
小黑祐子	福島県衛生研究所
福島 博	島根県保健環境科学研究所
江藤良樹	福岡県保健環境研究所
市原祥子	福岡県保健環境研究所
村上光一	福岡県保健環境研究所
堀川和美	福岡県保健環境研究所

感染症は、伝播力の強い疾病(伝染病)と食中毒に分類された。いわゆる食中毒は食品中の「毒」で生体に影響を与えるが、日本における法制度上の「食中毒」は狭義の食中毒(Food intoxication)のほか、食品・施設を介する感染性胃腸炎の様相を呈することが多く、感染拡大防止や危害の未然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。

「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。現在、事例発生時は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、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究明に広く利用されている。現在は、1 サイクル毎に PCR 反応を測定するリアルタイム PCR が導入されつつある。リアルタイム PCR 法の中で、SYBR Green を用いたインターカレーター法(以下、SYBR 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、安価に実施できる利点を持っている。また、福島¹⁾は SYBR 法による

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を通じて人体に侵入する。人体侵入後、生体の反応と対応しながら特有の組織に定着し、生体反応の度合いにより緩解・増悪等の転帰をとる。

消化管感染症は食品や水を介して感染が起きるため、食水系感染症 (Food-borne infectious diseases)ともいわれる。日本の法制度上、食水系感

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、迅速で網羅的検査法を含めて SYBR 法が各地方衛生研究所に導入可能か検討した。

B. 研究方法

SYBR 法が複数の地方衛生研究所に配備されたリアルタイム 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。SYBR 法に関する機種毎の導入方法について保存菌株を用いて検討した。

共通試料を用いてリアルタイム PCR 法の精度を確認した。8 種の菌について菌数測定とともに DNA 抽出を行い、共通 DNA 試料をもとに、複数箇所においてそれぞれの機器を用いて検査をおこない、検査精度を比較した。

24 種のそれぞれの病原遺伝子部位を増幅するプライマーを用い、一度に検出する網羅的検査キットを開発した²⁾。保存菌株ならびに食中毒等食水系感染症事例における患者便試料から抽出した DNA を用いて、疫学的検証を実施した。

1. 対象菌種

使用した細菌菌株は、各地方衛生研究所に保存する野生株ならびに標準株を用いた。それらの菌種は *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Bacillus cereus*, emetic toxin producing *B. cereus*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *astA* positive *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffusively adhesive *E. coli* (DAEC), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Providencia alcalifaciens* であった。

2. サーマルサイクラー機器

使用した機器は次のとおりであった。

○ ABI PRISM 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems: 以下、ABI7500)

○ ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems: 以下、7500FAST)

○ Mx3000P Real Time QPCR System (STRATAGENE: 以下、Mx3000P)

○ Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 (Takara Bio: 以下 TP800)

3. PCR 試薬

PCR 試薬はつぎのものを使用し、製造会社の使用法に従い PCR mixture を作成し PCR を行った。

○ SYBR® Premix Dimererazer® (Takara Bio)

4. DNA 抽出

次に記す市販の DNA 抽出試薬を用いた。抽出試薬は製造会社の使用マニュアルに従って使用した。

○ DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN)

○ DNeasy Stool Mini Kit (QIAGEN)

○ DNeasy DNA Mini Kit (QIAGEN)

5. コロニーカウント

代表 8 菌種についてコロニーカウントを行った。*Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, emetic toxin producing *B. cereus*, *eae* gene positive *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *astA* gene positive *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.

それぞれの菌液について、0.1%ペプトン加生理食塩水で 10 倍段階希釈し、それをトリプトソイ寒天培地並びにそれぞれの分離培地上に 100 μL 滴下し、適切な培養条件で 24 時間培養した (Miles & Misra 法³⁾)。すなわち、*Clostridium perfringens* にはカナマイシン含有 CW 寒天培地を、*Campylobacter jejuni* には mCCDA 培地を、emetic toxin producing *B. cereus* には *B. cereus* 培地を、*eae* gene positive *Escherichia coli* ならびに *astA* gene positive *E. coli* には Tricolor 寒天培地を、*Staphylococcus aureus* はベアードパーカー寒天培地を、*Vibrio parahaemolyticus* には TCBS 寒天培地を、*Salmonella* spp. には DHL 寒天培地を使用した。

なお、非選択培地としてトリプティックソイ寒天培地を選択培地と併用して同様の試験を実施した。なお、*Vibrio parahaemolyticus* の培養にはトリプトソイ寒天培地中の NaCl 濃度は 2% に調整した。

カナマイシン含有 CW 寒天培地は嫌気状態にして 35℃ 培養を、mCCDA 培地は 42℃ で 24 時間微好気培養を、その他の培地は 35℃ で 24 時間好気培養を行った。mCCDA 培地は 48 時間まで培養して最終判定を行った。

6. 共通試料を使用したリアルタイム PCR

一箇所で作成した DNA 試料と primer セットを用いて、4 箇所の協力機関において、それぞれのリアルタイム PCR 機器を用いて試験を実施した。使用した菌株は表 1 のとおりである。

「5. コロニーカウント」の項目で作成した菌液について、DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、抽出キット添付の AE buffer を用いて 10 倍段階希釈した。希釈は 10 の 6 乗希釈まで実施し、 10^1 から 10^6 希釈を送付した。Primer は表 2 に示すものを作成し、4 箇所の地研に送付した。なお、*Clostridium perfringens* のプライマーについて、GAP-12 の塩基配列に 1 塩基欠落があったため、GAP-12b として作成した(表 2)。

7. 食中毒事例で採取された便からの DNA 抽出とリアルタイム PCR

食中毒(疑いを含む)事例で採取された糞便試料について QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。便は約 200mg を分取し、製造会社の検査法に従い DNA を抽出した。試料は、網羅的検査キット(Rapid Foodborne Bacteria Screening 24: 以下、RFBS24)を用いて 24 遺伝子の検出を行い、培養法との比較をおこなった。

C. 研究結果および考察

1. 共通試料を用いたリアルタイム PCR

(1) 同一機種による複数機関における試験

調査に参加した 4 機関に整備されていた 4 種 5

台のリアルタイム PCR 機器を用いた。

その中で同型機種が 2 台あった(7500FAST)ので、結果を図 1-1~8 に示す。同じ PCR 試薬を使用した結果は、増幅曲線の形態、蛍光強度ともに、ほぼ同一のグラフが描かれた。各菌種の希釈濃度別増幅サイクル数(増幅曲線の蛍光強度が確認できる最も少ないサイクル数)を機種毎に表 3-1 および表 3-2 に示した。試験に供した DNA では、0~2 サイクルの差であり、また、検出できる最低希釈についても 1 菌種を除いて同じ結果を示した。これらの結果は、この機種を使用する場合、DNA および primer を共通にするとはほぼ同様の結果が得られることを示している。

(2) 異なる機種による試験

図 2-1~8 に菌種毎に機器別の増幅曲線のグラフを示した。7500FAST はほぼ同様の結果を示したので、1 箇所の結果のみを示した。使用した試料では、*Bacillus cereus* と *Salmonella* spp. を除いて 10~15 サイクル目で増幅曲線が立ち上がり、 10^3 ~ 10^4 希釈試料まで蛍光光度の指数増幅が確認された。*B. cereus* と *Salmonella* spp. では増幅曲線の立ち上がりが遅く、 10^2 ~ 10^3 希釈試料まで蛍光光度の指数増幅が確認された。DNA 試料の由来菌液のコロニーカウントは表 1 に示すとおり、 10^7 ~ 10^9 cfu/mL であった。これらから 5 台の機器全てでそれぞれの菌株の対象遺伝子陽性示すためには、換算菌濃度で 10^4 ~ 10^6 cfu/mL が必要であることがわかった(表 3-1 および表 3-2)。急性期の患者便には 10^6 cfu/g 以上の菌が含まれているといわれており¹⁾、今回の結果は、試料から抽出される DNA の抽出効率にもよるものの、使用した primer は、急性期便試料からほぼ検出できると考えられた。

一方、機種毎に結果をみると、TP800 を用いた *Vibrio parahaemolyticus* の測定で、検出最低換算濃度が他機に比較しやや高かった。すなわち、他機では 10^2 ~ 10^4 cfu/mL であるのに対して、TP800 では 10^5 cfu/mL であった。また、もっとも高い濃度の試料においても増幅曲線の立ち上がりが遅かった。他の菌種ではそのような傾向はみられなかったことから、*V. parahaemolyticus* 試料について TP800 では検査

感度が他機よりやや低いことが推測されるが、今後、試料数ならびに機器数を増やして検討したい。

2. RFBS24 法による網羅的検査法の検証

Fukushima *et al*²⁾ が開発した RFBS24 法を、実際の食中毒事例から得た糞便試料を用いて検査した。結果を表 4 に示した。試料番号 1 ならびに 4 はサルモネラ食中毒であったが、サルモネラの SYBR 法は検出感度が他の菌に比較し高くないことから、培養法の結果と整合しなかったものと考えられる。ウェルシュ食中毒の試料番号 6 ならびに黄色ブドウ球菌食中毒の試料番号 7 は PCR 法と同じ DNA を用いた結果であり、糞便試料は培養法で *C. perfringens* 陽性であった。特に、試料番号 6 のウェルシュ食中毒事例では、便から培養法でウェルシュ菌、食品からセレウス菌や黄色ブドウ球菌が検出されており、原因菌決定までに 1 週間を要した。糞便試料ならびに食品試料から抽出した DNA では、対象とする遺伝子部位が増幅され、疫学調査ならびに培養法により検討された結論と同じ結論を短時間に出せることが確認された。

表 4 を見る限り、サルモネラを除いて良好な結果を示したと考えられる。Fukushima *et al*²⁾ の結果を合算し、本研究事業で試験したものをすると、合計 34 事例検討し、SYBR 法と培養法と両方実施した試料は 193 試料であった。その中でどちらも陽性であったのは 107 試料、どちらも陰性であったのは 73 試料、計 180 試料であった(一致率 93.2%)(表 5 参照)。

表 5 では、培養法の方が陽性例の多い事例は 12 例と多く、SYBR 法の方が陽性例の多い事例は 1 例であった。しかし、SYBR 法と培養法が同じ結果を示した事例は 21 例であり、SYBR 法は培養法とほぼ同じ結果を示すものと考えられる。

以下結果は示さないが、行政的には原因が不明であった事例について *astA* 遺伝子が 89% の検体から検出された例があった。培養検査ではカンピロバクターのみ検出されたが、リアルタイム PCR により EPEC およびエロモナスも関与していると推察された例があった。リアルタイム PCR で原因菌の遺伝子が先行検出され、培養検査により同一原因菌が分

離された例があった。単一の原因と結論づけられたが、他の菌の関与が推定された例等があった。

これらの結果から、(1)食中毒発生時にリアルタイム PCR を用いることにより、迅速な結果が得られ、従来法の実施に関して効率的対応を可能にする、(2)迅速に複数の病原遺伝子を検出するため、原因物質の特定について重層的な解析を可能にし、原因究明に資することが可能となる、(3)原因不明の事例について網羅的に検査することにより、原因推定を可能にすることがあり、事例発生時に迅速網羅的検査が可能となると考えられる。

D. 結論

SYBR Green を用いたリアルタイム PCR は使用した機器で動作が確認され、これを業務に導入する意義は高いと考えられた。24 種の遺伝子を同時に検出する検査系を作出した。これを事例発生時に導入することは有用と考えられた。

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.*, epub article ID917623, 2009,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2775201/pdf/IJMB2009-917623.pdf>.

○Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N., Yamaguchi, K.:
Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-time SYBR Green PCR Analysis, in *Int. J. Medical Bact.*

2. 学会発表

○福島博: Multiplex Real-time SYBR Green PCR による食中毒原因菌 24 標的遺伝子の同時スクリーニング法の開発, 第 30 回日本食品微生物学会学術総会, 東京, 2009.

○福島博: Multiplex Real-time SYBR Green PCR による食中毒原因菌 24 標的遺伝子の同時スクリーニング法の開発, 平成 21 年度日本獣医公衆衛生学会、宮崎、2010.

○Multiplex Real-time SYBR Green PCR による食中毒原因菌 24 標的遺伝子の同時スクリーニング法の開発, 第 84 回日本感染症学会総会、東京、2010.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中

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) Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N., Yamaguchi, K.: Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-time SYBR Green PCR Analysis, in applying to Inter. J. Medical Bact.

3) 坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二: 新細菌培地学講座 -上-, 第二版, 182-192, 近代出版, 1986.

4) Kato, N., Kim, S-M., Kato, H., Tanaka, K., Watanabe, K., Ueno, K, Chong. Y.: Identification of ENterotoxin-Producing Clostridium perfringens by the Polymerase Chain Reaction (in Japanese with English summary), J. Jpn. Ass. Infect. Dis., **67**(8), 724-729, 1993.

5) Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A., Rudi, K.: Appl. Environ. Microbiol., **66**, 4029-4036, 2000.

6) Fukushima, H. et al.: Int. J. Microbiol., Article ID 917623, 13 (2009),

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

7) Nielsen, EM., Andersen, MT. : Detection and characterization of verocytotoxin-producing

Escherichia coli by automated 5' nuclease PCR assay, J Clin Microbiol, **41**, 2884-2893, 2003.

8) Klotz, M., Opper, S., Heeg, K., Zimmermann, S.: Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A to D by real-time fluorescence PCR assay, J Clin Microbiol, **41**, 4683-4687, 2003.

9) Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K., Enomoto, K.: J. Clinical Microbiol., **40**, 294-297 (2002).

10) Fey, A., Eichler, S., Flavier, S., Christen, R., Hoefle, M.G., Guzman, C.A.: Establishment of a Real-time PCR-based Approach for Accurate Quantification of Bacterial RNA Targets in Water, Using Salmonella as a Model Organism.: Appl. Environ. Microbiol., **70**, 3618-3623, 2004.

表 1 共通試料として使用した菌株および菌液濃度

菌種	菌株番号	由来等			コロニーカウント cfu/mL
		事例分類	事例番号	血清型等	
1 <i>Clostridium perfringens</i>	HIPH01324	食中毒事例	FP/01-53	Hobbs UT	5.0 × 10 ⁸
2 <i>Campylobacter jejuni</i>	HIPH01278	食中毒事例	FP/01-LG	Penner K	4.9 × 10 ⁸
3 Emetic toxin producing <i>Bacillus cereus</i>	HIPH06220	食中毒事例	FP/06-25		3.3 × 10 ⁷
4 <i>eae</i> 陽性 <i>Escherichia coli</i>	HIPH07066	感染症事例	sp/07-4	O157:H7	1.5 × 10 ⁹
5 <i>Staphylococcus aureus</i>	HIPH09416	食中毒事例	FP/09-LG	sea positive	1.4 × 10 ⁹
6 TDH-positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	HIPH06159	食中毒事例	FP/06-27	O3:K6	4.1 × 10 ⁸
7 <i>astA</i> 陽性 <i>Escherichia coli</i>	HIPH07162	感染症事例	HP/07-30	O153:HNM	1.1 × 10 ⁹
8 <i>Salmonella</i> spp. (<i>S. Enteritidis</i>)	HIPH05316	食中毒事例	FP/05-11	O9:g.m:-	6.3 × 10 ⁸