

選択性の緩やかなPCR法を用いた細菌の型別

はじめに

昨年5月以降、腸管出血性大腸菌O157による感染症が全国で発生し、この病原菌に対する検査、診断、予防対策或いは治療等に関する各方面の問題点が露呈された。この中で、検査の面では適当な増菌培地が開発されていないこと、ペロ毒素の確認に日数を要すること、血清型の決定にはさらに長時間が必要であること、そしてより詳細な型別の必要性等の問題がある。この問題を多少なりとも解決したのがペロ毒素産生遺伝子を検出できるPCR法の活用であった。ペロ毒素遺伝子の検出に際して、威力を発揮したPCR法は、コレラ菌のコレラ毒素遺伝子の検出を始め、他の病原細菌に対しても広く応用されており、今後さらにこの方面のPCR法の利用が期待されている。

感染症の発生時には、菌の診断に加えて汚染源や感染源の追求を行って、予防対策を確立することが重要である。そのために、分離されてきた原因菌について各種の詳細な検討を行うが、とりわけ分離菌の型別が不可欠となる。型別の方法としては以前から血清型別、ファージ型別等が用いられてきたが、これだけでは的確な疫学調査に対処できない場合が多い。近年になってDNAの各種検査手法が確立するにつれて、DNA型別法が次第に取り入れられるようになってきた。今回の腸管出血性大腸菌の場合にもパルスフィールド電気泳動法や選択性の緩やかなPCR法を用いた型別法であるRAPD法(RAPD PCR: random amplified polymorphic DNA PCR)が採用され、疫学調査に用いられた。このうち、RAPD法は1990年にWilliamsらによって発表された比較的新しい手法である。また、RAPD法と類似した考えのもとに実施されている型別法にAP PCR(arbitrarily primed PCR)という型別法もあるが、今回はRAPD法について解説する。

RAPD法の原理

我々がやっている一般のPCR法では、染色体等の遺伝子の中の特定の1箇所を増幅するために、鋳型のDN

Aと相補的な2本のプライマーを使って実施している。このときに用いるプライマーは、一般的には20~25塩基数のものが多く、この長さのプライマーを使えば、プライマーが目的としない箇所のDNAに合致し、増幅を開始するようなことはないと考えられている。このようにして、プライマーの大きさや適当な塩基配列の箇所を選ぶことによって疑反応の出現を防止し、さらには、PCR法の反応条件を選択して疑反応の出現を抑えているわけである。一般のPCR法の場合、表1に示したような反応条件で行っているが、ここに示した反応条件のうち、疑反応の出現はアニーリング温度の高低に依存する場合が大きい。疑反応の出現を抑えるためには、単純にいえば、アニーリング温度を高くして遺伝子の増幅を行うとよい。

表1 PCR反応条件の一例

種別	反応
熱変性	95℃, 1分間
アニーリング	55℃, 1分間
伸張反応	72℃, 1分間

RAPD法では、このような一般のPCR法とは異なり、プライマーの塩基数を少なくしてアニーリングの温度を低くして実施される。この条件下でRAPD法を行うと、鋳型の染色体DNAの数箇所と同時に増幅が開始されることになる。

プライマーについて

RAPD法の場合は1本のプライマーのみを用いて試験する。プライマーは10個或いは10数個の塩基数のものをを用いるが、一般のPCR法とは異なり、この塩基配列は鋳型のDNAとは全く関係のないものでよい。RAPD法によって作製されるPCR産物は、一般のPCR

法のように目的とするような特定のものではない。従って、RAPD法を実施してみて初めてPCR産物が判明する。PCR産物は理論的には小さなものから非常に大きなものまで種々のものができる。しかしながら、Taq DNAポリメラーゼは無限的に塩基配列が合成できるものではないので、大きいものでも2~3Kbase程度のもとなる。プライマーは特定の塩基配列のものではなく無作為に作成されたものであるため、このプライマーは細菌の種類に関係なく応用できるはずであるが、実際には細菌の種類に応じての予備実験が必要である。良好な条件下でRAPD法を実施すると、10個前後のPCR産物が得られ、細菌の型別については疫学調査に応用が可能であるといわれている。

作製されるPCR産物の良否は、作製されるDNAの数と電気泳動されたときのDNAバンドの鮮明さにあるが、これはプライマーのGC%に大きく影響される。一般的にはGC50%を中心に40~60%のものが用いられる。GC%が小さくなるとPCR産物の数は少なく、大きくなると多くなる傾向がある。RAPD法はゆるやかな条件下での反応であるから、プライマーの純度によって産生されたDNAパターンが変化してしまう場合があるので、純度の高いプライマーを用いる必要がある。

反応条件について

RAPD法においても、一般のPCR法と同様に熱変性、アニーリング、伸張反応を行ってPCR産物が増幅される。このうちで重要なのは、アニーリング温度の選択で、アニーリング温度は36~38℃前後の緩やかな条件を用いる。これによって、鋳型のDNAに対して完全に相補的ではない場合にもアニーリングを起こす。この反応を40~45回繰り返して、PCR産物を作製していくことになる。RAPD法を行う場合、疫学調査に用いられるような目的に合う良い結果を得る必要があるが、良い結果は、前述のように、プライマーとアニーリング温度の組合せで決まり、この組合せは菌の種類によって検討しなければならない。

腸管出血性大腸菌O157のRAPD法については当所でも実施してきている。当所では、表2及び表3に示すような反応条件でRAPD法を行っている。RAPD法の終了後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、写真撮影後にPCR産物のパターンを解析し、疫学調査に応用する。

基質DNAについて

一般のPCR法では病原菌の特異的なDNAを検出するのが目的であるため、他の菌のDNAや細菌以外の雑多のDNAが混入していても支障のない場合がある。し

表2 反応液

10 × Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.1 % Triton-100)	2.5 μℓ
3 mM MgCl ₂	3
250 μM each of 4dNTP mixture	0.3
20 pmoles primer	0.5
20 ng of genomic DNA	1
1 unit of Taq DNA polymerase	0.3
H ₂ O	17.4
total	25

表3 PCR反応

熱変性	94℃、5分
アニーリング	36℃、5分
伸張反応 (4サイクル)	72℃、5分
次いで	
熱変性	94℃、1分
アニーリング	36℃、1分
伸張反応 (30~35サイクル)	72℃、2分

かしながら、RAPD法の場合は他の異なるDNAが混入していると、プライマーはこのDNAにも反応し、パターンに影響がでる。そのために、単一コロニーからDNAを抽出・精製した染色体DNAを用いなければならない。一般的には細菌の染色体を抽出し、一定量のDNAを用いて実施する。

パターンの判定

RAPD法のPCRが終了した後、PCR産物をアガロースゲルの電気泳動を行うとRAPD法によるDNAパターンを観察することができる。供試菌株が同じDNAパターンとして観察されれば、それらの菌は近縁の菌である可能性が高いと考えられるし、違ったパターンの場合には由来等の異なった菌である可能性を示している。

細菌のDNAは遺伝子の挿入や欠失といった、何らかの変異を引き起こす場合がある。このような細菌のDNAを用いると、増幅されたRAPD法のDNAパターンは元の細菌の増幅パターンとは異なり、大きいものになったり、小さいものになったりする。また、一本のバンドが出現したり、欠失したりする場合がある。このよう

な挿入や欠失に伴うパターンの変動はRAPD法特有のもので、パルスフィールド電気泳動では観察することは難しいと考えられる。

RAPD法の利点と欠点

感染症の発生時には原因菌の決定と、汚染源や感染源の特定のために型別法が研究されてきたが、近年になって染色体DNAを用いたパルスフィールド電気泳動法が開発され、応用されてきているのでこの方法との比較を中心に、RAPD法の特徴を述べてみたい。

RAPD法の利点として次の点があげられる。

- ・パルスフィールド電気泳動法は特殊な電気泳動装置を用いて行うが、泳動の前に目的に合った制限酵素を用いて多量のコピー数のDNAを切断しておく必要がある。従って、かなりの経費がかかる。これに対してRAPD法は、装置としてはPCR法の遺伝子増幅装置があればどこでも実験が可能であり、用いるDNA量は増幅法であることから少なくても良い。

- ・RAPD法はパルスフィールド電気泳動法に比較して、一度により多数の検体を処理することが出来るうえに、一日で結果を出すことが出来る。

- ・パルスフィールド電気泳動もRAPD法も共に出現したDNAパターンを読み取る必要があるが、RAPD法は出現するDNAバンドの数が少なく読み易い点が考えられる。

- ・この他の利点としては一般のPCR法とは異なり標的となるDNAの遺伝子配列を知る必要がなく、プライマーは10～16塩基対のプライマーの1種類でよい。

RAPD法の欠点として次の点があげられる。

- ・RAPD法は目的とした細菌の種類が異なると、用いるプライマーやプログラムを代えて試験しなければならないといわれている。

- ・菌の比較を行う場合は同一の条件下で試験を行わなければならない。

- ・RAPD法は出現するDNAバンドの数が少なく読み易いが、逆に、それだけパターン化される数が少なく、疫学的考察が難しいことにもなる。

腸管出血性大腸菌感染症に対するRAPD法の応用

厚生省では続発する腸管出血性大腸菌感染症に対し、原因の究明、発生予防及び被害拡大防止のため、「腸管出血性大腸菌に関する研究班」を設置した。その中のひとつに、「病原菌のDNAパターンの分析等による菌株間の相同性に関する調査研究」班が結成された。

菌株間の相同性に関する研究班では、全国から集まった腸管出血性大腸菌O157について、次の作業を行った。

- ・パルスフィールド電気泳動によって、DNAパター

ンを比較解析する。

- ・RAPD法によって産生されるDNA断片のパターンを解析する。

- ・その他、ベロ毒素産生やプラスミドプロファイルによる解析を行う。

これらのDNA型別結果から、1996年5月から7月末までに発生したO157:H7は3つのグループに分けられることが判明した。この結果が疫学調査に役立てられたことは周知の通りであり、RAPD法の有用性も認められた。

愛知県で発生した腸管出血性大腸菌O157の型別

愛知県においても1996年6月に腸管出血性大腸菌O157による集団発生があり、それ以来11月まで、散発患者の発生が続いた。当所では、長期間にわたって発生しているO157の分離株の違いをみるために、RAPD法を用いて検討を行っている。6月に発生した集団発生の由来株3株と、散発2事例の由来株2株についてRAPD法を行った。GC%が42%、50%、58%の3本のプライマーを用いて比較すると、集団発生及び散発事例由来株のDNAパターンはプライマーの種類に関係なく全て一致した。

おわりに

細菌の型別法としては、生物学的性状、血清学的性状或いはDNAを用いた型別法と種々の方法が知られ、利用されている。その中で、RAPD法は近年新しく開発された方法であり、我国ではなじみが薄く、あまり利用される機会がなかった方法である。しかしながら、海外の研究者を中心にして各種の細菌への応用が研究され、有用性が報告されてきた。また、本方法は試験法の簡便さ等の各種の利点を有していることから、今後疫学調査へ利用され、食中毒や感染症の予防の一助となることが期待される。

また、同じような原理からなる型別法としてAP (arbitrarily primed)-PCRがある。AP-PCRでは30本前後のDNAバンドが得られるので、RAPD法より利用価値の高い場合もあると思われる。AP-PCRについては次の機会に紹介したい。

参考文献

- 1) 林健志, PCR法の最新技術, 羊土社, 1995
- 2) Williams, j. g. k. et al., Nucleic Acids Res., 18, 65-31-6535, 1990
- 3) Makino, S. et al., PCR-Based Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting of Yersinia pseudotuberculosis and Its Practical Applications: J. Clin. Microbiol., 65-69, 1994

(細菌部 齋藤 眞)

愛知県における水道原水の監視項目（無機物質・重金属）について

はじめに

河川や湖沼の富栄養化、地下水の各種化学物質による汚染は、水道水源の水質悪化を引き起こし、飲料水の水質への大きな社会問題となってきた。このような現状に対応して将来にわたって安全で信頼できるおいしい水を供給するため、厚生省生活衛生局水道環境部長通知（平成4年12月21日付衛水第264号）による水道法水質基準の大幅な改正が行われて、平成5年12月に施行された。この新基準の特徴は、水道法に基づく水質基準のほかに、水質基準を補完する項目として、「快適水質項目」13項目および「監視項目」26項目が設定された。

これらの項目の基本的な考え方として「快適水質項目」は、水道水に対する国民のニーズの高度化に対応して、おいしい水等より質の高い水道水を供給するための目標値を定めたものである。一方「監視項目」は、健康に関連するもののうち、現在の検出レベルは非常に低いので基準項目とする必要はないが、将来検出レベルが上がる懸念があるので安全を期すため全国的に監視することとして定められたものである。

愛知県でも水質基準の改正に伴い、水道事業者の依頼により、各水道事業者の水道水源および一部浄水について、平成6-7年にわたり監視項目の検査を実施した。

今回は、監視項目の中の無機物質・重金属（ニッケル、アンチモン、ほう素およびモリブデンの4項目）の結果についてまとめた。検査実施対象の水道水源は、地下水37地点（うち浅井戸3地点）、伏流水4地点および表流水8地点の49地点である。

1. ニッケル(Ni)

存在：Niは自然界に遊離状態では見られないが、火成岩に多く、鉱石としては硫鉄ニッケル鉱、硅ニッケル鉱、硫砒ニッケル鉱等が知られており、また多くの塩類として存在する金属元素である。地球上部の元素存在度を示すクラーク数は0.01%（第24位）、平均地殻存在量は75mg/kgである。日本の土壌には、平均4-55mg/kg存在する。

概要：Niおよびその化合物は、特殊鋼、電熱線、メッキ工場など広く利用されている。健康への影響として、可溶性塩の経口摂取で吐き気、下痢を起こす。生物にとって必須金属であるが、金属ニッケルや可溶性ニッケル塩は接触性皮膚炎や過敏症を起こすことがある。

汚染源として、メッキ工場や各種の機械製造・加工工場等の排水の河川への放流による水汚染が問題となる。

環境水中の濃度：海水には0.1-0.5ppm、河川水では5-

20ppb程度とされている。アメリカの主要な河川水の調査では、検出された平均が3-56ppb、検出されない例が平均84%もあり、検出頻度を考慮する必要性を指摘している。また大都市(100)の公共浄水で平均1.1ppb(0.8-1.3ppb)との測定結果が報告されており、地表水や地下水における標準以上のNiの存在は、その殆どが人間活動に由来するものであると結論している。日本における河川水では、例えば1979-84年の多摩川の支流浅川水系や山梨県笛吹川水系の調査で、浅川下流の下水処理場下で16-27ppb、笛吹川の支流の一つ濁川の金属工場放流水は48-248ppb、その下流で1-24ppbと比較的高濃度(10ppb以上)のNiが検出されているが、人為汚染の少ない地点では殆どが検出限界未満から数ppb程度である。

地下水については、神奈川県は平成6年飲料水として利用している地下水の無機物質に関する調査で、Niは38件中20件が定量下限値の0.6ppb以下、検出された18件は0.7-17ppb(平均3.1ppb)と報告している。また大分県の平成6年度の調査では、68件中1ppb以上が7件(最高値5ppb)と報告している。

本県の検査では、42地点のうち2年間の平均値で1ppb以上検出されたのは11地点で最高値9ppb、平均2.3ppbであり、全て指針値10ppb以下であった。しかし最高値9ppbと指針値10ppbに近いレベルの地点があったこと、神奈川県では17ppbと指針値10ppbを超える地点がみられたことなど、Niはメッキ工場、製造加工工場など身近な生活圏に存在するため、監視項目設定の趣旨からも一層の詳しい調査が望まれる。

2. アンチモン(Sb)

存在：Sbは、自然界では金属、酸化物、硫化物などで存在し、資源としては輝安鉱(Sb_2S_3)が最も重要である。クラーク数 $5 \times 10^{-5}\%$ （第61位）、比較的希少な元素で地殻中の存在量は0.2mg/kgである。

概要：Sbは、ホウロウ、塗料、顔料、鉛蓄電池、電極、ベアリング、金属パイプ等幅広く使われている。

Sb金属自体の毒性は強く、可溶性塩の毒性も強い。急性毒性として、嘔吐、下痢、粘膜壊死、体温低下、呼吸数低下が続く。慢性毒性では、タンパク尿や黄疸のほか、心臓、肝臓や腎臓に障害を起こす。

環境汚染の例として、1970年代初頭に滋賀県にあるSb精錬工場が問題となり、同県は大気中および排水中への基準を設定し、0.05ppmを排水中のSb含有率規制基準値とした。

環境水中の濃度：海水には0.2ppb程度ある。河川中に1ppb以下の濃度で存在すると言われている。我が国での測定例はあまり報告されていないが、1974年の多摩川上流の水源地帯では、火成岩流域の沢では平均0.013ppb、堆積岩流域での沢では0.21ppbのSb濃度が報告されている。地下水では武蔵野地域で、平均0.035ppbとの報告がなされ、神戸市上水道千川水源池、東條湖周辺の有馬流紋岩層群の浅層地下水では0.007-0.13ppb(幾何平均0.031ppb)の報告例がある。また上記の多摩川の水源地帯での調査では、都市に近い沢ほどSb濃度が高くなる傾向を示しており、大気などを介して水源中にSbが混入する可能性も指摘されている。

監視項目に指定されたことにより、例えば神奈川県では飲料水として利用されている地下水の調査で、38件中33件が定量下限の0.2ppb未満、他は0.2-0.4ppbの結果を、大分県では、48件中42件が0.2ppb未満、6件が0.2ppbと報告している。

本県でも49地点中、定量下限値0.1ppb以上は3地点で0.1-0.6ppb検出され、いずれも表流水あるいは伏流水であった。調査結果は全て指針値2ppb以下であった。

3. ほう素 (B)

存在：単体として天然に存在することはないが、ほう酸またはその塩の形で広く存在する。クラーク数 $1 \times 10^{-3}\%$ (第41位) 土壌中には平均10mg/kg(2-100mg/kg)存在する。

概要：主な用途は、Bは原子炉の中性子吸収材、鉄合金などに、ほう酸、ほう砂はガラス、陶磁器の釉薬、顔料、染料等、また洗顔やうがいなどの消毒薬や木材防腐剤などに使用される。

健康への影響として、Bそのものにも毒性があるが、昔から消毒薬として広く使われてきたほう酸としての中毒事故が多い。また半導体製造過程のドーピングガス等として使用されるジボラン(B_2H_6)は、前胸部痛等の症状を起こす。

汚染源として、金属表面処理、ガラス、エナメル工場からの排水、火山地帯の地下水、温泉からの混入が考えられる。

環境水中の濃度：海水には4.5ppm、世界の主要な河川水は10ppb程度存在する。また1970年のスウェーデンとノルウェーの河川水355件の測定で、0-1516ppb、中央値12ppb、平均値31ppbの報告がある。

大分県における平成6年度の監視項目に関する水道事業体等からの原水の検査の結果、Bは、検査件数中73%が6-40ppbの範囲内であったことが報告されている。

本県では、全検査地点で指針値200ppb以下であり、49地点中2地点で30ppb、他は全て定量下限値20ppb以下

であった。

4. モリブデン (Mo)

存在：Moは、自然界では鉱石として硫化物(MoS_2)、鉛($PbMoO_4$)、鉄の化合物などで存在する。クラーク数 $1.3 \times 10^{-4}\%$ (第37位)、地殻には平均1.5mg/kg存在する。

概要：主な用途はステンレス鋼で、その他に耐火合金、触媒、耐熱性潤滑油、顔料、飼料添加剤等に使用される。健康への影響として、鉱山等で高濃度の暴露を受けると体重の減少、衰弱、頭痛、食欲不振、胃痛などの症状がおきる。慢性暴露により過尿酸血症、痛風の報告例がある。動植物にとって必須金属である。

環境水中の濃度：海水中に12-16ppb、天然水中で1-3ppb程度、またアメリカの大都市(100)の飲料水の調査では、最高値64ppb、中央値1.4ppbと報告されている。

最近の他県における調査結果から神奈川県の地下水では38件中18件が1ppb未満、検出例では1-4ppb(平均1.5ppb)、大分県は、68件中定量下限値1ppb以上が50件、最高値7.2ppbと報告されている。

本県の検査では、42地点のうち30地点が1ppb未満、検出例では1.1-4.9ppb(平均2.2ppb)であり、全て指針値70ppb以下であった。図に検査結果を示すが、尾張平野南西部の地下水、地質的には第四紀沖積層に検出され、また濃度は低いが三河平野南部でも検出されており、同じく沖積層でしかも伏流水であった。三河山間部の花崗岩地帯や設楽火山岩類には検出されにくいようである。

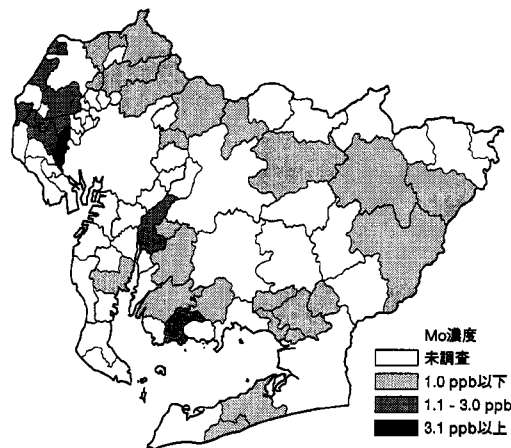


図 愛知県下の水道原水のMo濃度

まとめ

(1) 今回検査した水道水源の全ての地点で4項目(Ni, Sb, B, Mo)とも指針値を超えるものは無かった。

(2) 検査地点は一部の限られた地域だけではあるが、尾張、西三河、東三河と本県全域にわたっているため、本県における水道原水のバックグラウンド値として今後の水道水源管理上の貴重な基礎資料となろう。

(生活環境部 山田直樹)

愛知衛研技術情報 総目次 (Vol. 16~20)

平成4年から平成8年までの目次を整理いたしました。参考にしてください。

VOL.	No.	記事	執筆者名	頁	VOL.	No.	記事	執筆者名	頁		
16	1	◇輸入食品中の放射能	大沼章子	1	19	2	◇ラン藻の毒 (I)	近藤文雄	1		
		◇希少感染症 (I) Chlamydia pneumoniae感染症	小林慎一	4			◇平成米騒動	斎藤勲	4		
		◇[I] 地域特異性(4)		6			◇[I] 地域特異性(13, (14)		6		
	2	◇イタリアワイン農業混入事件	斎藤勲	1		3	◇国際化時代の梅毒	松井博範	1		
		◇パルスフィールドゲル電気泳動法の原理と操作	鈴木康元	4			◇水道水に今求められている課題	青山幹	4		
	3	◇固相抽出法とゴルフ場使用農薬の分析	山田直樹	1		4	◇[I] 地域特異性(15, (16)		6		
		◇海外輸入寄生虫感染症(1) 輸入寄生虫感染症の現況	山田靖治	4			◇銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムについて	猪飼誉友	1		
	4	◇希少感染症 (II) 紅斑熱リケッチア症	小林慎一	1		◇A型肝炎ウイルスの検査法と現況	山下照夫	4			
		◇腸管出血性大腸菌(EHEC)迅速検査法技術研修会の概要及び愛知県内におけるEHECの検出状況	松井昌門	4		◇[I] 地域特異性(17, (18)		6			
	17	1	◇海外輸入寄生虫感染症(2)原虫症	山田靖治		1	20	1	◇水道水とおいしい水-愛知県下の実態調査結果について-	富田伴一	1
			◇薄層クロマトグラフィー/高速原子衝撃質量分析法(TLC/FABMS) (1)食品残留抗生物質オキシテトラサイクリンの同定	岡尚男		3			◇ラン藻の毒 (I)	近藤文雄	4
			◇[I] 地域特異性(8)			6			◇地域特異性(1)		6
2		◇Salmonella Enteritidisの流行について	石原政光	1	2	◇峻厳マイクロオートハイブリダイゼーション法によるエンテロウイルスの遺伝子診断と分子疫学		栄賢司	1		
		◇水道水の変異原性試験	佐藤克彦	4		◇レジオネラ属菌について		荒川正一	4		
3		◇医薬品分析 -製剤分析を中心として-	三上栄一	1	◇地域特異性(2)			6			
		◇第2のエイズ原因ウイルス(HIV-2型)感染国内第1例の概要とHIV-2の現状	三宅恭司	3	◇海外輸入寄生虫感染症(3) 線虫-その1-	山田靖治		1			
4		◇水道水質基準の全面改定に伴う水質検査について	河村典久	1	◇家庭用品中に含まれる有害物質	三上栄一		4			
		◇免疫染色(酵素抗体)法について	奥村正直	4	◇地域特異性(3)			6			
18		1	◇ポリオの根絶について	石原佑弐	1	4		◇パルスフィールド電気泳動法による感染症の疫学的解析	鈴木康元	1	
			◇PCRによる病原細菌の診断	斎藤眞	4			◇日本薬局方にみる「水」	河村典久	4	
			◇[I] 地域特異性(12)		6			◇地域特異性(4)		8	
	2	◇食品中残留農薬分析の現状	斎藤勲	1	1	◇ウイルスと宿主細胞膜レセプター	佐藤克彦	4			
		◇地下水中のヒ素について	大沼章子	1		◇地域特異性(5)		6			
		◇生体と微量金属 (III)	松本浩	4		◇地下水中のヒ素について	大沼章子	1			
3	◇標準化死亡比(SMR)の検定法		6	2	◇オートシーケンサーを用いたPCR産物の遺伝子解析	森下高行	1				
	◇腸管出血性大腸菌による食中毒	斎藤眞	4		◇サンプル数の決定法(1)		6				
	◇クリプトスポリジウム症について	奥村正直	1		◇クリプトスポリジウム症について	奥村正直	1				
4	◇中央薬事審議会と日本薬局方	早川順子	4	3	◇小規模母集団の率の比較(1)		7				
	◇小規模母集団の率の比較(1)		7								