

「食中毒」原因細菌は、厚生省(当時)により、昭和27年にチフス、パラチフスA以外のサルモネラと黄色ブドウ球菌が指定されて以降、4回に渡り追加指定されてきた。最近では、平成11年に6菌種追加され、合計21菌種/菌群によるものが報告すべき疾病として指定されている¹⁾。

現在、「食中毒」事例発生時に行われている原因物質究明調査は培養法が主である。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(表1)。

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サイクル毎に蛍光を測定しPCR反応をモニターするリアルタイム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、SG-PCR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。

福島ら²⁾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。その後、real-time PCR機器を用いた方法³⁾を検討し改良を行った。その結果、平成19-21年度厚生労働科学研究費助成金(地域健康危機管理)研究事業「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」の成果として、Rapid Foodborne Bacteria Screening 24(以下、RFBS24)が作成された⁴⁾(ver.3)。以後、当研究班で改良を加えてきたが、平成22年度にはRFBS24IV(ver.4)が作成され、それを用いて感度の検討を

行った。その結果、一部増幅しない遺伝子があったことから、更に改良を加えることが必要であると判明した。

各地方衛生研究所等において配備されているリアルタイムPCR機器を用いた試験検査を行うためにも、検出感度の良い試薬キットが求められることから、RFBS24V(ver.5)を作成することとした。

また、近年、real-time PCR機器が保健所等にも配備されつつある。これらの機器を有効に使用するために、検査現場における迅速検査の必要性を勘案し、特定の遺伝子群のみをmultiplexで安価に実施する方法を検討した。

B. 研究方法

つぎの研究を行った。

(1) RFBS24の改良と精度管理

- SG-PCR法感度向上のため、増幅サイクルを30から35サイクルに変更する。
- 上記の変更に伴い、必要なプライマーの再設計ならびにプライマーセットの再検討。
- 精度管理を実施するためのコピー数既知のDNA試料の作成。
- 競合型内部標準の検討と導入。
- multiplex real-time SG-PCR法の機種ごとの検証。

(2) multiplex real-time SG-PCR法を用いた小規模検出系の検討

- RFBS-STEC(仮称)の検討。

RFBS24の概説

RFBS24は、試料DNA中の病原遺伝子24種を同時に検査できるシステムをキット化したものである。Fukushima *et al.*⁴⁾が考案した。基本構成はSYBR Greenを用いたintercalator multiplex real-time PCRである。

96ウェルプレートを使用し、1試料は1列

のセットで検査する。病原遺伝子3種ならびにPCR増幅確認用内部標準(Internal Amplification Control: IAC)用primer計4組を1ウェルにセットし1列8ウェル、計24種の対象遺伝子を同時に検査できる。基本列は第1列から5列である。第1列は陰性対照の、第2列はIAC対照の、第3～5列は陽性対照の試験系を検証する。試料DNAは第6列目から第12列目まで7列使用することが可能である(図1)。すなわち、7試料について24種の病原遺伝子を同時に網羅的に検出することができる。機器により異なるが、通常PCR過程は1時間～1時間50分で終了し、サイクル毎に遺伝子増幅の有無を確認することができる。

材料

1. 対象とする24菌株

使用した細菌菌株は、各地方衛生研究所に保存する標準株ならびに野生株を用いた。これらの菌種は *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Bacillus cereus*, emetic toxin producing *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *astA* positive *Escherichia coli*, entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), entero-toxigenic *Escherichia coli* (ETEC), enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), deffusively adhesive *Escherichia coli* (DAEC), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Providencia alcalifaciens*の24菌株であった。使用した菌株およびその由来を表2に示した。

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 7000 (Applied Biosystems: 以下, ABI7000)
- Mx3000P Real Time QPCR System (STRATAGENE:以下, Mx3000P)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems: 以下, 7500FAST)
- Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 (タカラバイオ株式会社:以下, TP800)
- 7900HT Fast Real time PCR system (Applied Biosystems: 以下, ABI7900)

3. PCR試薬

次の試薬を使用した。試薬は同一ロットのものを使用した。

- SYBR® Premix Dimererazer® (タカラバイオ株式会社)

4. 共同試験用DNA

表2に示した菌株から抽出したDNAを用いた。得られたDNAの標的配列部位の上下流域を増幅するプライマーを用いてDNAを増幅し、Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific社)でDNA濃度を測定し、コピー数を換算した。さらにコピー数を調整し (1×10^{10} copies/ μ L), これを今年度の共同試料原液とした。各施設に送付した後、滅菌蒸留水により希釈し、すべてのDNA試料を $10^0 \sim 10^3$ copies/wellとなるように調整したあと試験に供した。プライマーセットを2ロット作成し (LOT1 & LOT2), ロット毎に、それぞれの希釈について3回ずつ測定し、蛍光強度が確認できる最低コピー濃度 (検出限界値)を確認した。

5. プライマーの再設計

共通試料による検討に用いたプライマーセットを表3に示した^{2,4~13}。プライマーセットは今回四回目の改変を行った。検出限界向上のための増幅サイクルの増加 (30→35サイクル)を導入し、ほぼ半数のプライマーについて再設計を行った。また、プライマーの再設計によるTm値の変化ならびにプライマー同士のconfliction防止のために、6プライ

マーセットについて、プライマーの組み直しを行った。

検査を効率的に行うために、陽性対照は平成22年度に導入した、1列毎の混合陽性対照とした。

6. 競合型内部標準の作成

RFBS24IVまで使用した非競合型内部標準 (internal amplification control: IAC) では、1ウェル当たり使用するprimer setsが4組 (対象遺伝子用3組+IAC用1組) になる。primer同士のconflictionはプライマー数の増加とともに発生しやすくなることから、競合型IACの導入を図った。それぞれのprimer setによる増幅産物に基づくTm値から、A～FセットまでとG・Hセット (図1) についてTm値の異なるIACが必要であった。各セットの代表プライマーを選定し、Tm値の高いIAC (A～Fセット用) は*Aeromonas* spp.がもつAHH1領域の一部をスペーサーとし、それぞれのプライマーでサンドウィッチしたものとし、Tm値が低いIAC (G・Hセット用) は、それぞれのプライマーを挟んだものとし、それらが一連となったものを合成した (図2)。

7. Rapid Foodborne Bacteria Screening 24Vの作成と検証

RFBS24Vの作成は1箇所の施設で作成し、各施設に配布した。

各施設では、「5. DNA抽出」の項で作成したDNA試料について、 10^0 copies/wellまで希釈した試料溶液を鋳型として、multiplex real-time SG-PCRを実施した。24種プライマーによる8セットの結果は、Ct値ならびに融解曲線解析により、それぞれの標的遺伝子検出限界を確認した。対象遺伝子検出最小コピー数は、Tm値ならびにIACが示す蛍光強度の半分のピーク以上のものとして判定した。

8. multiplex SG-PCR法を用いた小規模検出系

RFBS24は、24種の食水系感染症原因細菌の特異遺伝子を網羅的に調べることは可能であるが、志賀毒素産生性大腸菌の遺伝子の検討等あらかじめ検査すべき内容が限定されている場合は、24種の遺伝子すべてを検討する必要はない。そこで、少ないプライマーセットで効率的に検出できる系を検討した。対象遺伝子は、*stx1*, *stx2*, *eae*の3種とした。RFBS24Vで使用されるプライマーを用い、非競合型のIAC (RFBS24IVまで使用したもの) を用いたものを作成した (RFBS-STECS)。感染症や食中毒事例で分離したSTECSの野生株を用いて、このキットの性能を検討した。

菌株：血清型および*stx1*, *stx2*, *eae*遺伝子の保有状況が分かっている86株のSTECSを調査対象とした (表5)。

サンプル調製およびDNA抽出：86株は全て、(1) DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN社) を用いてDNA抽出を行った。また、O157:H7 (*stx1*, *stx2*, *eae*保有) のうち3株については、(2) TE煮沸法、(3) アルカリ熱抽出法によるDNA抽出も行い、更に、DNA抽出をせずにサンプルを直接PCRチューブに加える方法として、(4) 培養液 (トリプトソイブロスで37°C24時間培養)、(5) 培養液をTEで10倍希釈した菌液を用意した。

SG-PCR：TaKaRaのSYBR Premix Dimer Eraser (以下DE) 及びABIのPower SYBR Green PCR Master Mix (以下PSG)、SHIMADZUのAmpdirect Plus 酵素セット (以下ADP)、BIOLINEのBIOTAQ DNA Polymerase (以下BDP) を用意した。このうち、DEおよびPSGは添付のマニュアルに従って使用し、BDPはSYBR Green I (Invitrogen社) を最終濃度が2.5×になるよ

うに添加した上で添付のマニュアルに従って使用した。いずれの試薬でもプライマーミックス (stx1-ET-F, stx1-ET-R (各40uM), stx2-ET-F, stx2-ET-R, eae-F2, eae-R, yersH2-F, yersH2-R (各20uM)) とRFBS24IVのIAC (*Yersinia ruckeri*のDNA)を10分の1量になるように添加し、DNA 1 μ lを加え、合計20 μ lになるようにして real-time multiplex PCRを行った。ADPに関しては、2 \times Ampdirect plusを500 μ l、プライマーミックスを20 μ l、125 \times SYBR Green Iを20 μ l、IACを100 μ l、滅菌精製水360 μ lをよく混和し、試験原液とした。試験原液から必要量を取り、試験原液20 μ lあたりBIOTAQを0.1 μ l混和して反応液とし、それを20 μ lずつPCRチューブに分注し、DNAもしくは菌液を1 μ lずつ加えた。試験原液の残りは冷凍保存し、次回以降の検査のときに利用した。

なお、DEの場合、最初に95 $^{\circ}$ C30秒を1回行い、その後95 $^{\circ}$ C5秒、58 $^{\circ}$ C34秒、72 $^{\circ}$ C34秒を30サイクル行い、最後に融解曲線分析 (95 $^{\circ}$ C15秒、65 $^{\circ}$ C30秒、95 $^{\circ}$ C15秒)を行った。PSG, ADP, BDPの場合、最初に95 $^{\circ}$ C10分の反応を行い、その後はDEと同様に30サイクルおよび融解曲線分析を行った。

C. 研究結果および考察

1. RFBS24IVからRFBS24Vへの改良

RFBS24キットは過去3回の改変を行った。いずれも、検出限界を向上するべくプライマーの再設計、プライマーセットの調整を行ったものであった。RFBS24IV (ver. 4)における問題点、すなわち、検出限界の高さと検出できない遺伝子の存在は、今回、RFBS24V (ver. 5)で解消された。一箇所以上の施設で検出されなかった*sth*, *aggR*, *trh* 遺伝子を含めてプライマーの再設計を行った。*st* 遺伝子については*sth* 遺伝子用の

プライマーを加えて3本とした。また、*aggR* 遺伝子を含め、12組22本のプライマーについて再設計しRFBS24Vに組み込んだ。さらにT_m値からA~Fの6セットで構成プライマーセットを組み直した。

PCR増幅を35サイクルとし、競合型IACを用いたキットは良好な結果を示した。また、RFBS24IVと同様に、3本の陽性対照としたため、PCR mixture調整における時間短縮に寄与するものと考えられる。

2. RFBS24Vの精度管理

コピー数既知のDNAテンプレートを用いて、各施設にある機器を用いて検出限界ならびに検出精度を確認した。表4に機器毎の結果を示した。DNAの希釈列をLOT1およびLOT2のプライマーセットで3回試験を行い、発現した最小のコピー数の、10を底とする指数で表現し、その指数が確認された回数を表中の数字とした。表4では、機器毎、対象遺伝子毎に最も多く確認されたコピー数のカラムを着色した。

機器毎に評価すると、殆どの試験で対象遺伝子検出は10¹の差であったが、一部10²の差が認められた (表4-2 *sth*, 表4-3 *aggR*, それぞれ1機種)。

病原大腸菌の遺伝子の検出をみると、*stx1*ならびに*stx2*では機器により異なるものの、結果は機器毎に均質なデータとなっている (表4-1)。結果はいずれも 10¹~10²copies/wellの範囲に収まっているが、検出できた最低コピー数は機器毎に傾向を示していると考えられた。

すなわち、ABI7000およびABI7900では10² copies/well, ABI7500, TP800およびMX3000Pでは10¹ copies/wellが今回使用した試料では限界と考えられる。これはETECの*lt*にもその傾向がみられる (表4-2)。しかし、今回は、各々1台の機器を使用している

ところであり、これが、同種で他の機器に同様の結果を示すかは、今後の試験に待たれる。一方、*stx2f*については、今回実験に供した機種で、2ロットの試料を用いて合計30回の試験で 10^3 copies/wellが25回を示し、*stx1*、*stx2*に比べて、少なくとも 10^1 以上検出限界が高い（最低検出コピー数が大きい）ものと考えられた。*stx2f*と同様に、平均的に 10^3 copies/wellが検出限界と考えられるものは*S. aureus*の*femB*遺伝子であった。

機器を問わず、検出限界が一つの濃度に収束した試料はなかったが、検出限界が安定して同一濃度に出現する標的遺伝子は3種あった（嘔吐型*B. cereus*, *trh2* positive *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*）。全体を評価すると、今回使用したDNAテンプレートでは、どの機種も $10^1 \sim 10^2$ copies/wellが最も多い結果を示した。*stx2f*遺伝子および*femB*遺伝子を除いた26試料を5種の機器を用いて行った結果、 $10^1 \sim 10^2$ copies/wellに収束した試料数は767（98.3%）であった。このキットの検査限界は、試験に用いたDNAテンプレートはどの機器も $2\mu\text{L}/\text{well}$ を用いていることから、 $5 \times 10^3 \sim 10^4$ copies/mLであると考えられる。

3. multiplex SG-PCR法を用いた小規模検出系の検討

O157:NM (*stx1*, *stx2*, *eae*保有株)を含むSTEC 9株を用いて、PCR試薬の検討を行った。RFBS24Vで採用しているDEを用いた場合、いずれの株でも増幅が確認された（図3 a-1）。しかし、*stx1*の T_m 値のピークが極端に弱くなる傾向が認められた（図3 a-2）。PSGは今回設定した増幅条件では増幅の効率が悪く（図3 b-1）、*stx1*、*eae*の T_m 値のピークが弱くなる株があった（図3 b-2）。今回の反応条件のままでは、DE、PSG共に*stx1*や*eae*の判定が困難となる場合

があり、この multiplex real-time PCRには適さないことが分かった。一方、ADPでは増幅効率もよく（図3 c-1）、*stx1*、*stx2*、*eae*全てを保有する株においても、それぞれの T_m 値のピークがはっきりと確認できた（図3 c-2）。ADPと同じBIOTAQを用いるBDPでは、IACを含め増幅が確認されなかった（図3 d-1）。ADPで非常に良い結果が得られたのは、少なくともBIOTAQ単独の効果ではなく、Ampdirect plus使用による効果と考えられる。Ampdirect plusはPCR阻害物質の中和作用を持つPCR bufferであるが、今回の3種類の遺伝子を検出する multiplex real-time PCRに利用しても有効であることが分かった。STECの中にはこれら3種類の遺伝子を全て保有する株も多いことから、multiplex real-time PCR試薬にはADPを使用することにした。

前述の9株を含む86株のSTECに対し、既存のPCRとの比較を試みた。これらの菌株の多くは既に*stx1*、*stx2*、*eae*について調べていたが¹⁴⁾、一部の菌株については、既報の論文に従ってPCRを行った¹⁵⁻¹⁹⁾。これら86株に対し、ADPを用いたreal-time multiplex PCRを行ったところ、PCRの結果と一致した（表6、図4）。また、RFBS24Vで新たに導入された*stx2*-ET-F、*stx2*-ET-Rプライマーは*stx2f*が検出できるように設計されている。しかも、このプライマーによる*stx2f*の増幅産物はその他の*stx2*の増幅産物と比べ T_m 値が低くなるため、他の*stx2*と容易に区別することが出来た（図5）。一方で、血清型が異なっても、遺伝子型が同一の場合、融解曲線はほぼ一致することが分かった（図4）。以上のことから、ADPを用いたSTEC用の multiplex real-time PCRは実際に多くのSTECで利用可能であると分かった。増幅産物の T_m 値は、同じPCR産物であって

も、諸条件により多少の変動がみられる。そこで、O157:H7 (*stx1*, *stx2*, *eae*保有) 3株について、DNA抽出法による影響を調査した。(1) DNeasy Blood & Tissue kitで抽出されたDNA、(2) TE煮沸法で抽出されたDNA、(5) 培養液をTEで10倍希釈した菌液に対する multiplex real-time PCRではいずれもT_m値に大きな変化は認められなかった(図4a)。DNeasy Blood & Tissue kitで抽出されたDNAを陽性対照として利用するのであれば、これらの方法でのDNA抽出や菌液などをサンプルとして利用できることが分かった。一方で、(3) アルカリ熱抽出によるDNAや(4) 培養液に対する multiplex real-time PCRでは、(1) DNeasy Blood & Tissue kitで抽出されたDNAと比較して、T_m値が約0.5~1°C近く上昇した(図6b)。この差によって、判定が困難となる場合が想定されるため、このようなDNAや菌液をサンプルにするときには、同一の方法で抽出したDNAもしくは菌液を陽性対照として用いる必要があることが分かった。

既報のSTECを対象とした multiplex real-time PCR^{20, 21)}とは異なり、今回考案した multiplex real-time PCRにはIAC検出系が含まれているため、PCR反応の失敗による偽陰性を検出することが出来る。これを更に発展させ、IAC加TEを用いたTE煮沸法を導入すれば、サンプルのPCR反応液への入れ忘れによる偽陰性を防げると期待される。

Real-time PCRにおいて、SYBR Green Iを用いたインターカレーター法はプローブ法に比べ、マルチプレックス化が困難である。しかし、マルチプレックス化を目的に設計されているRFBS24Vのプライマーを採用することにより、STEC検査用のreal-time PCRを簡便にマルチプレックス化することに成功した。インターカレーター法かつマルチプレッ

クスであることから、ランニングコストを下げることができ、導入しやすいreal-time PCRだと考えられる。今後は、ADP以外の試薬(特にSYBR Green Iが最初から添加されている試薬)においても、同様の結果が得られるかを検討していく予定である。

D. 結論

24種の病原遺伝子を網羅的に検出する Rapid Foodborne Bacteria Screening 24の感度をあげるために、PCR増幅回数を30から35回に上げ、それに伴いプライマーの再設計、競合型内部標準の作成を行った。その結果、RFBS24 ver.5 (RFBS24V) キットを完成させた。

RFBS24V の性能評価のため、コピー数既知のDNAテンプレートを作成し、複数の施設においてそれぞれの機器を用いて試験を実施した。2種の対象遺伝子の増幅が低いものの、全体として検出限界は $5 \times 10^3 \sim 10^4$ copies/mLであることがわかった。

数種類の対象遺伝子を増幅することを目的に、RFBS24を利用したキットを作成した(仮称: RFBS-STEC)。 *stx1*, *stx2*, *eae* 遺伝子を同時に増幅するもので、Ampdirect plusを使用し、増菌菌液から直接real-time PCRを行うことが可能であった。迅速検査の観点から、DNA調整手技の検討も重要であることがわかった。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 文献

- 1) 熊谷進: モダンメディア, 47(7), 181-187, 2001
- 2) Fukushima, H., Tsunomori, Y., and Seki, R.: Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food- or Waterborne Pathogens in Stools, *J. Clinical Microbiol.*, 41, 5134-5146, 2003
- 3) 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, *感染症学雑誌*, 79, 644-655, 2005
- 4) 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, *Inter. J. Microbiol.*, volume 2010, article ID864817, 18 pages, 2010
- 5) Furrer, B., Candrian, U., Luethy, J.: Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment, *Lett. Appl. Microbiol.*, 10(1), 31-34, 1990
- 6) Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J., Akiba, Y.: Comprehensive and rapid real-time PCR analysis of 21 foodborne outbreaks, *Intl. J. Microbiology*, volume 2009, article ID917623, 13 pages, 2009
- 7) Gubala, A.J. & Prohl, D.E.: Molecular-beacon multiplex real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*, *App. Environ. Microbiol.*, 72(9), 6424-6428, 2006
- 8) Hough, A.J., Harbison, S.-A., Savill, M.G., Melton, L.D., Fletcher, G.: Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction, *J. Food Protect.*, 65(8), 1329-1332, 2002
- 9) Nielsen, E.M., Andersen, M.T.: Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay, *J Clin Microbiol*, 41, 2884-2893, 2003
- 10) Yang, I.-C., Shih, D.Y.-C., Wang, J.-Y., Pan, T.-M.: Development of rapid real-time PCR and most-probable-number real-time PCR assays to quantify enterotoxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group, *J. Food Protect.*, 70(12), 2774-2781, 2007
- 11) Price, E.P., Huygens, F., Giffard, P.M.: Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* by using resolution-optimized binary gene targets derived from comparative genome hybridization studies, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12), 7793-7803, 2006
- 12) 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
- 13) Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K.-I., Enomoto, K.: Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks, *J. Clinical Microbiol.*, 40(1), 294-297, 2002
- 14) 山口敬治, 池田徹也, 森本洋: 北海道においてまれに分離される血清型の志賀毒素産生性大腸菌の性状, *北海道衛研所報*, 58, 43-46, 2008
- 15) Pollard, D.R., Johnson, W.N., Lior, H., Tyler, D., Rozee, K.R.: Rapid and Specific Detection of Verotoxin Genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction, *J. Clinical Microbiol.*, 28(3), 540-545, 1990
- 16) Paton, A.W., Paton, J.C., Goldwater, P.N., Manning, P.A.: Direct Detection of *Escherichia coli* Shiga-Like Toxin Genes in Primary Fecal Cultures by Polymerase Chain Reaction, *J. Clinical Microbiol.*, 31(11), 3063-3067, 1993
- 17) Piérard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., Lauwers, S.: Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates, *J. Clinical Microbiol.*, 36(11), 3317-3322, 1998

- 18) Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., Karch, H. : A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons, *Applied Environ. Microbiol.*, **66**(3), 1205-1208, 2000
- 19) 小林一寛, 瀬戸和子, 八柳潤, 齋藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎貢, 林賢一, 松根渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田亨, 伊藤健一郎 : 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察, *感染症学雑誌*, **76** (11) , 911-920, 2002
- 20) Chassagne, L., Pradel, N., Robin, F., Livrelli, V. : Detection of Stx1, Stx2, and eae Genes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Using SYBR Green in a Real-time Polymerase Chain Reaction, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **64**, 98-101, 2009
- 21) Jothikumar, N. and Griffiths, M.W. : Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with Multiplex Real-time PCR Assays, *Applied Environ. Microbiol.*, **68**(6), 3169-3171, 2002
- 22) Linda, N., Ward, L.N. & Gej, A.K.: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish by Use of Multiplexed Real-Time PCR with TaqMan Fluorescent Probes, *Applied Environ. Microbiol.*, **72**(3), 2031-2042, 2006
- 23) 調恒明: 厚生労働科学研究費助成金健康安全・危機管理対策総合研究事業 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究 平成22年度総括・分担研究報告書, 2011

表1 我が国における細菌性食中毒の発生状況

菌種	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	428	447	491	558	645	416	335	509	345	361
<i>Salmonella</i> spp.	361	465	350	225	144	124	89	99	67	73
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	307	229	108	205	113	71	28	17	14	36
<i>Staphylococcus aureus</i>	92	72	59	55	63	61	43	58	41	33
<i>Clostridium perfringens</i>	22	37	34	28	27	35	20	34	20	24
<i>Bacillus cereus</i>	9	7	12	25	16	18	5	21	13	15
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	24	13	12	18	24	24	18	17	26	27
その他の <i>Escherichia coli</i>	199	83	35	27	25	19	9	12	10	8
<i>Clostridium botulinum</i>		1				1	1			1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4	8		1						
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1	1	2	2					1		
<i>Vibrio cholerae</i>	1	2						3		
<i>Shigella</i> spp.	3	2	1	1		1		3		1
その他の細菌	18	9	6	9	8	4	5	4		1
総事例数	1,469	1,377	1,110	1,152	1,065	774	553	778	536	580

表2 使用した菌種

菌種	対象遺伝子	菌株由来
1 <i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	ATCC12915
2 <i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	wild
3 Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>	wild Sakai O157
4 Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	<i>stx2f, eae, astA</i>	wild 07E033
5 <i>Campylobacter jejuni</i>	specific	ATCC33560
6 TRH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (TRH1)	<i>trh1</i>	AQ4037
7 TRH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (TRH2)	<i>trh2</i>	AT4
8 Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (LT)	<i>lt, stp</i>	wild
9 Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	wild
10 <i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>	wild O1/ΔJ11
11 <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	wild
12 Enterotoxigenic <i>B. cereus</i>	<i>nheB</i>	wild
13 <i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	JCM2529(ATCC335391)
14 Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	<i>aggR</i>	wild O111
15 <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	ATCC25923
16 Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ST)	<i>sth</i>	wild
17 TDH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	RIMD2210633
18 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	ATCC14029
19 Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	<i>ipaH</i>	RIMD05091045
20 <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	wild
21 <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	wild HP09008
22 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>	wild SP2536
23 <i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	wild
24 Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i>	<i>daaD</i>	wild KI2214

表3 今回使用したprimer sets

v. 5 set	菌種	対象遺伝子	primer	配列	文献
A	<i>Clostridium perfringens</i>	cpe	CPE-Et-F	TAATAGATAAAGGAGATGGTTGGAT	今回
			CPE-Et-R	AAATCCATATTCTACAGATGCTTG	
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	gyrB	PAG38-F	TCTGCACGGTGTGGGTGTT	2
			PAG110-R	ACCGTCACGGCGGATTACT	
	EHEC stx2	stx2	stx2-ET-F	CATGACAACGGACAGCAGTTAT	今回
			stx2-ET-R	AACTCCATTAACGCCAGATATGA	
B	EHEC Stx1	stx1	stx1-ET-F	CATTACAGACTATTTTCATCAGGAGGT	今回
			stx1-ET-R	CAAATTATCCCCTGAGCCACTA	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific	AB-F2	GATACCTTAAGTGCAGCCTGTGA	今回
			AB-R2	ACGCCTAAACCTATAGCTCCTTC	
C	TRH <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	trh	F-trh82	CCATCMATACCTTTTCCTTCTCC	22
			R-trh-287	ACYGTCATATAGCGCGTTAAC	
	ETEC LT	lt	LT-F2	AGCCATTGAAAGGATGAAGGA	今回
		LT-2	GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC	5	
C	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	ces	ces-TM-F	GATGTTTGCAGCATGCAA	6
			ces-TM-R	CTTTCGGCGTGATACCCATT	
	<i>Vibrio cholerae</i>	ompW	ompW-F	AACATCCGTGGATTTGGCATCTG	7
		ompW-R	GCTGGTTCCTCAACGCTTCTG		
D	<i>Listeria monocytogenes</i>	hly	Lm-hly-F	GGGAAATCTGTCTCAGGTCATGA	8
			Lm-hly-R-kai1	GTAAATTACGGCTTTGAAGGAAGA	今回
	EHEC EPEC eae	eae	eae-F2	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	9
			eae-R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA	
E	Enterotoxigenic <i>Bacillus cereus</i>	nheB	SG-F3	GCACTTATGGCAGTATTTGCAGC	10
			SG-R3	GCATCTTTTAAGCCTTCTGGTC	
	<i>Campylobacter coli</i>	ceuE	ceuE-For	CAAGTACTGCAATAAAAACTAGCACTACG	11
		ceuE-Rev	AGCTATCACCCCTCATCACTCATACTAATAG		
E	EAEC	aggR	aggRks1-kai1	GTATACACAAAAGAAGGAAGCAATA	今回
			aggRKas2-kai1	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	femB	FemB-fw	AATTAACGAAATGGCGAGAAACA	12
		FemB-rv	TGCGCAACACCCTGAACTT		
F	EHEC ST	st	STa-Et-F2	CTGTATTATCTTTCCCCTCTTTTAGTC	今回
			STa-Et-R	AGGATTACAACACAGTTCACAGCAG	
		sth	Stb-Et-F	CGCTCAGGATGCTAAACCAG	
F	TDH <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	tdh	tdh-F2	ATGAGATATTGTTTGTGTTGAGAGA	今回
			tdh-R2	TCACAGTCATGTAGGATGTCA	
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	gyrB	PSG-F64	TTAACGCCCTGTCCGATAAG	4
		PSG-R149	TACCGGCTCACCCAGATG	今回	
G	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (EAEC)	astA	EAST-1-S	GCCATCAACACAGTATATCC	13
			EAST-AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	
	EIEC <i>Shigella</i> spp.	ipaH	ipaH1631-F	CAGGCAGAAGAGCAGAAGTATGA	今回
		ipaH1771-R	CTGTTCACTCTCACGCATCAC		
G	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ahhI	AHH1-1062--F	CCAGGATTACCGGTCGAAC	今回
			AHH1-1241-R	GGCACGAACCCCTTGTAGC	
H	<i>Yersinia enterocolitica</i>	yadA	yadA-F1757	ACGAGTTGACAAAGTTTAGCC	4
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		yadA-R1885X	GAACCAACCGCTAATGCCTGA	
	<i>Salmonella</i> spp.	invA	invA386-F	CGTTCGGGCAATTCGTTAT	23
		invA662-R	ATAAATTCATCGCACCGTCA		
H	DAEC	daaD	daaD-F31	GTCACCTGCGGGATGTTACT	4
			daaD-R263	AGCTCATGACGACCATCCTT	

表4 共通試料を用いた菌種別・機種別試験結果 -Ct値, Tm値, 融解曲線から得た最小発現コピー数-

表4-1 志賀毒素産生性大腸菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^X copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
Shiga toxin producing <i>Escherichia coli</i> (STEC)	<i>stx1</i>	A	ABI7000			3					3	
		B	TP800	2	1			2	1			
		C	ABI7500	2	1			3				
		D	MX3000P	3				1	2			
		E	ABI7900	1	2			2	1			
STEC	<i>stx2</i>	A	ABI7000	1	2			1	2			
		B	TP800	3				3				
		C	ABI7500	2	1			3				
		D	MX3000P	3				2	1			
		E	ABI7900	1	2			1	2			
STEC	<i>stx2f</i>	A	ABI7000				3					3
		B	TP800		1	2			1	2		
		C	ABI7500			3			2	1		
		D	MX3000P			3						3
		E	ABI7900			3			1	2		

表4-2 腸管毒素産生性大腸菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^X copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)	<i>lt</i>	A	ABI7000			3						3
		B	TP800	2	1			3				
		C	ABI7500	2	1			3				
		D	MX3000P			3				3		
		E	ABI7900			3				3		
ETEC	<i>stp</i>	A	ABI7000		2	1			3			
		B	TP800		3				3			
		C	ABI7500		1	2			2	1		
		D	MX3000P	1	2				2	1		
		E	ABI7900		2	1			3			
ETEC	<i>sth</i>	A	ABI7000	1	2			1	1	1		
		B	TP800		3				3			
		C	ABI7500		3				2	1		
		D	MX3000P		3				3			
		E	ABI7900		2	1			3			

表4-3 腸管病原性性大腸菌, 腸管侵入性大腸菌, 赤痢菌,
腸管凝集接着性大腸菌分散接着性大腸菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^X copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
EPEC/EHEC	<i>eae</i>	A	ABI7000		3						2	1
			B	TP800		2	1		1	2		
			C	ABI7500		2	1			3		
			D	MX3000P		3				2	1	
			E	ABI7900		1	2			2	1	
EPEC	<i>astA</i>	A	ABI7000		2	1				1	2	
			B	TP800		1	2			3		
			C	ABI7500		3				3		
			D	MX3000P		3				1	2	
			E	ABI7900		1	2			1	2	
EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>	A	ABI7000		2	1				1	2	
			B	TP800		2	1			2	1	
			C	ABI7500		1	2			3		
			D	MX3000P			3				3	
			E	ABI7900			3			1	2	
EAEC	<i>aggR</i>	A	ABI7000			3					3	
			B	TP800			3				3	
			C	ABI7500		1	2			1	1	1
			D	MX3000P		2	1			1	2	
			E	ABI7900			3				3	
DAEC	<i>daaD</i>	A	ABI7000		1	2				3		
			B	TP800		3				3		
			C	ABI7500		1	2			3		
			D	MX3000P		3				1	2	
			E	ABI7900		1	2			2	1	

表4-4 ウェルシュ菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	最低検出コピー数 (1×10 ^X copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>Cl. perfringens</i>	<i>cpe</i>	A	ABI7000		2	1					2	1
			B	TP800		3					3	
			C	ABI7500	1	2					3	
			D	MX3000P		3					2	1
			E	ABI7900		1	2				1	2

表4-5 腸炎ビブリオ

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^X copies)										
				LOT 1				LOT 2						
				X=	0	1	2	3	0	1	2	3		
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	A	ABI7000			3				1		2		
		B	TP800			3						3		
		C	ABI7500			3				1		2		
		D	MX3000P	1		2						3		
		E	ABI7900			1		2				2		1
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>trh1</i>	A	ABI7000			1		2			1		2	
		B	TP800			2		1			3			
		C	ABI7500			3					1		2	
		D	MX3000P			3					3			
		E	ABI7900			1		2						3
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>trh2</i>	A	ABI7000			3					3			
		B	TP800			3					3			
		C	ABI7500			3					3			
		D	MX3000P			3					2		1	
		E	ABI7900			3					3			

表4-6 コレラ

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^X copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X=	0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>V. cholerae</i>	<i>ompW</i>	A	ABI7000			2		1					3
		B	TP800						3			3	
		C	ABI7500			3					3		
		D	MX3000P			1		2			2		1
		E	ABI7900						3				

表4-7 エロモナス

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^X copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X=	0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>A. hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	A	ABI7000			2		1			2		1
		B	TP800			2		1			2		1
		C	ABI7500			2		1			2		1
		D	MX3000P			1		2					3
		E	ABI7900			2		1					

表4-8 プレシシオモナス

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^X copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X=	0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>Plesiomonas</i> spp.	<i>gyrB</i>	A	ABI7000			1		2				3	
		B	TP800			1		2					3
		C	ABI7500					3					3
		D	MX3000P			1		2					3
		E	ABI7900					3					

表4-9 カンピロバクター属菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^x copies)										
				X=	LOT 1				LOT 2					
					0	1	2	3	0	1	2	3		
<i>C. jejuni</i>	specific	A	ABI7000	1		2	1					3		
					B	TP800		1	2		3			
					C	ABI7500		3			3			
					D	MX3000P		2					3	
					E	ABI7900			3				3	
<i>C. coli</i>	ceuE	A	ABI7000	1			3			1	2			
					B	TP800		1	2		3			
					C	ABI7500		2	1		2	1		
					D	MX3000P		2	1		1	2		
					E	ABI7900			3			3		

表4-10 セレウス菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^x copies)									
				X=	LOT 1				LOT 2				
					0	1	2	3	0	1	2	3	
Emetic <i>B. cereus</i>	ces	A	ABI7000	1		1	2					3	
					B	TP800		1	2		1	2	
					C	ABI7500			3		1	2	
					D	MX3000P			3			3	
					E	ABI7900			3			3	
Enterotoxigenoc <i>B. cereus</i>	nheB	A	ABI7000	1		2				1	2		
					B	TP800		3			2	1	
					C	ABI7500		2	1		3		
					D	MX3000P		2			3		
					E	ABI7900			3		3		

表4-11 黄色ブドウ球菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^x copies)									
				X=	LOT 1				LOT 2				
					0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>S. aureus</i>	femB	A	ABI7000	1				3				3	
					B	TP800				3		2	1
					C	ABI7500		1	2		1	2	
					D	MX3000P			3			3	
					E	ABI7900			3			3	

表4-12 リステリア・モノサイトゲネス

菌種	対象遺伝子	施設	機器	最低検出コピー数 (1×10 ^x copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3		
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	A	ABI7000		2	1				3			
		B	TP800		1	2				3			
		C	ABI7500		1	2				2	1		
		D	MX3000P		1	2				2	1		
		E	ABI7900		1	2						3	

表4-13 サルモネラ属菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^x copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3		
Salmonellas	<i>invA</i>	A	ABI7000		1	2				3			
		B	TP800		1	2				3			
		C	ABI7500			2	1			2	1		
		D	MX3000P			3				3			
		E	ABI7900			2	1			2	1		

表4-14 エルシニア属菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 ^x copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3		
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	A	ABI7000			3					3		
		B	TP800			3					3		
		C	ABI7500		1	2			1	2			
		D	MX3000P		1	2				3			
		E	ABI7900			3					3		
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>	A	ABI7000			3					3		
		B	TP800			3			1	2			
		C	ABI7500			3			1	2			
		D	MX3000P		2	1					3		
		E	ABI7900			3					3		

表4-15 プロビデンシア・アルカリファシエンス

菌種	対象遺伝子	施設	機器	最低検出コピー数 (1×10 ^x copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3		
<i>P. alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	A	ABI7000			3					3		
		B	TP800		2	1			1	2			
		C	ABI7500			3			1	2			
		D	MX3000P		2	1					3		
		E	ABI7900			3			1	2			

表5 使用菌株の*stx1*, *stx2*, *eae*遺伝子保有状況

遺伝子型	株数	血清型
<i>stx1</i>	5	O91:NM (2), O91:HUT (2), O115:H10 (1)
<i>stx2</i>	13	O8:NM (2), O8:H19 (2), O28ac:NM ^{*c} (1), O142:HUT (1), O168:HUT (1), OUT:NM (3), OUT:H11 (1), OUT:H21 (1), OUT:HUT (1)
<i>stx1, eae</i>	29	O26:NM (2), O26:H11 (11), O103:H2 (4), O111:NM (2), O111:H21 (1), O111:HUT (1), O119:HUT (1), O157:NM (3), O157:H7 (2), OUT:H2 (1), OUT:H16 (1)
<i>stx2, eae</i>	11	O63:H6 ^{*f} (2), O121:H19 (1), O145:NM (2), O145:H34 ^{*f} (1), O157:NM (1), O157:H7 (2), O153:NM ^{*f} (2)
<i>stx1, stx2</i>	3	O74:HUT (1), O128:H2 ^{*d} (2)
<i>stx1, stx2, eae</i>	25	O111:HUT (1), O121:H19 (1), O157:NM (6), O157:H7 (15), O157:H7 ^{*c} (1), O157:HUT(1)

() 内は当該遺伝子型・血清型の使用菌株数

*c : *stx2c*遺伝子保有、*d : *stx2d*遺伝子保有、*f : *stx2f*遺伝子保有

表6 PCRによる遺伝子型とmultiplex real-time PCRによる遺伝子型の比較

	multiplex real-time PCR					
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1, eae</i>	<i>stx2, eae</i>	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>
<i>stx1</i>	5					
<i>stx2</i>		13				
<i>stx1, eae</i>			29			
<i>stx2, eae</i>				11		
<i>stx1, stx2</i>					3	
<i>stx1, stx2, eae</i>						25

カラム内の数字は菌株数

図1 RFBS24システム ウェルの配置

	第1列	第2列	第3列	第4列	第5列	第6列	第7列	第8列	第9列	第10列	第11列	第12列
	陰性対照	内部標準対象	陽性対照1	陽性対照2	陽性対照3	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7
A set			<i>Cl. Perfringens</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	EHEC(stx2)							
B set			EHEC(stx1)	<i>C. jejuni</i>	<i>trh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>							
C set			ETEC(LT)	emetic <i>B. cereus</i>	<i>V. cholerae</i>							
D set			<i>L. monocytogenes</i>	EPEC(<i>eae</i>)	enterotoxigenic <i>B. cereus</i>							
E set			<i>C. coli</i>	EAEC (<i>aggR</i>)	<i>S. aureus</i>							
F set			ETEC (ST)	<i>tdh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Pl. shigelloides</i>							
G set			EPEC (<i>astA</i>)	EIEC, <i>Shigella</i> spp.	<i>A. hydrophila</i>							
H set			<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Salmonella</i> spp.	DAEC (<i>daaD</i>)							

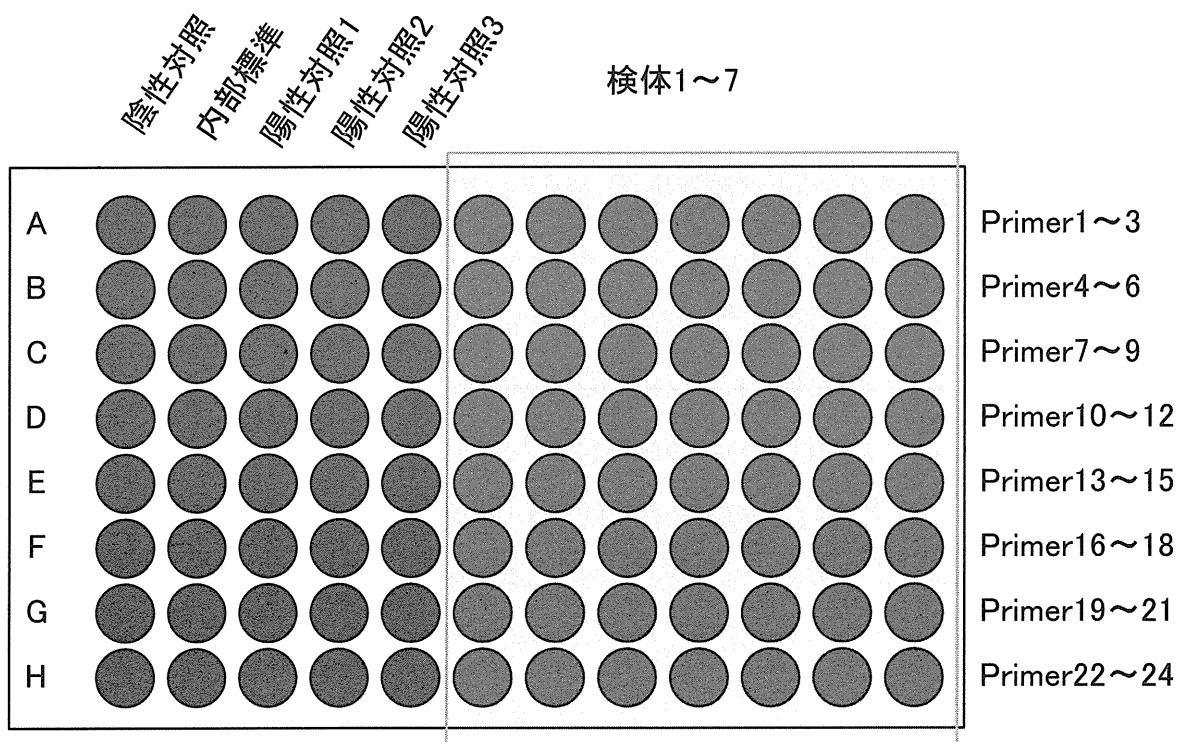


図2 競合型内部標準の概念図

set A	<i>cpe</i> primer	<i>Clostridium perfringens</i>
set B	<i>AB</i> primer	<i>Campylobacter jejuni</i>
set C	<i>ces</i> primer	emetic <i>Bacillus cereus</i>
set D	<i>eae</i> primer	EPEC (<i>eae</i>)
set E	<i>femB</i> primer	<i>Staphylococcus aureus</i>
set F	<i>tdh</i> primer	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (<i>tdh</i>)
set G	<i>astA</i> primer	EPEC (<i>astA</i>)
set H	<i>invA</i> primer	<i>Salmonella</i> spp.
spacer	<i>AHHI</i>	

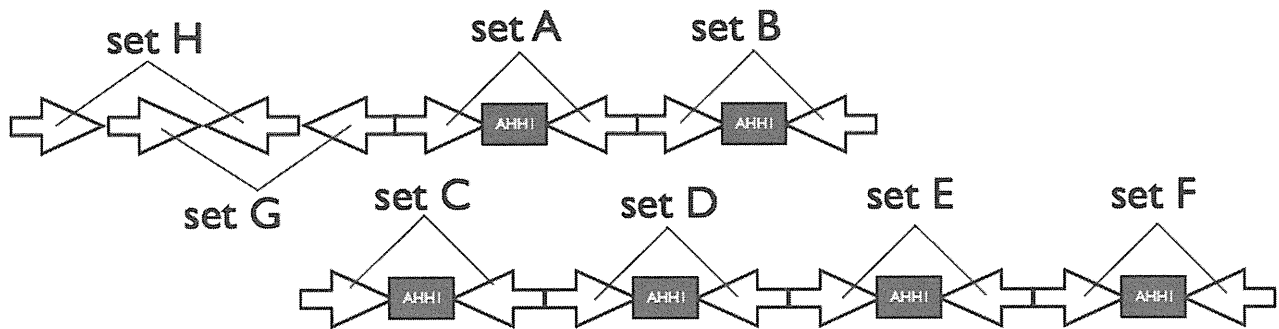
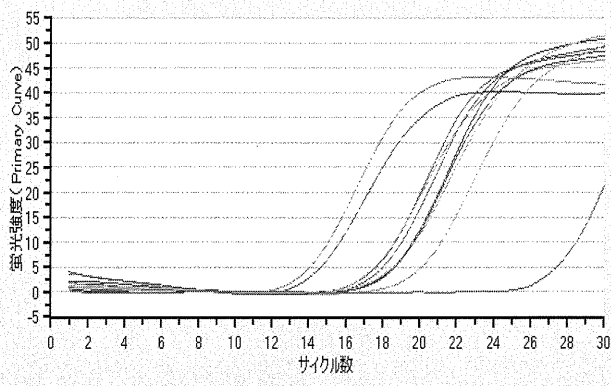
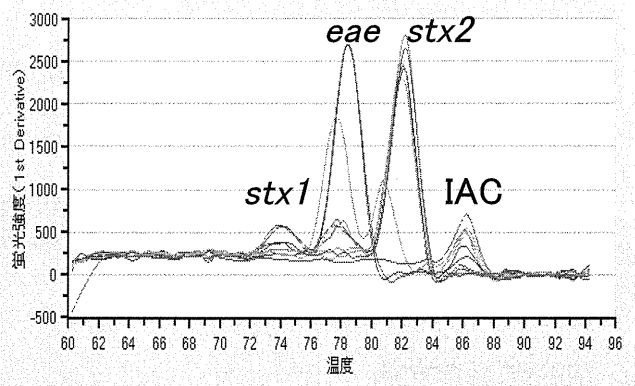


図3 試薬毎の増幅曲線と融解曲線

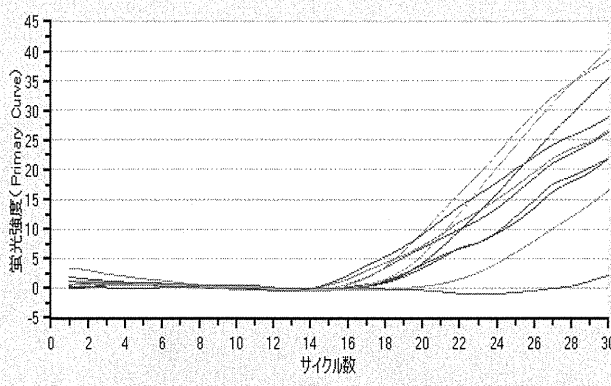
a-1: DE増幅曲線



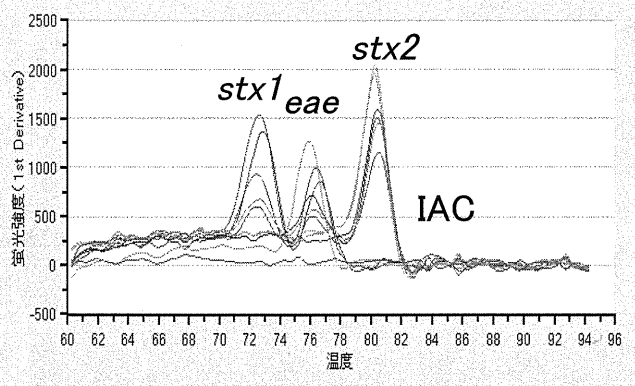
a-2: DE融解曲線



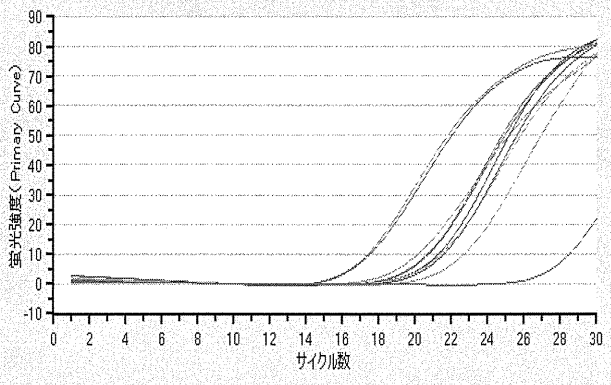
b-1: PSG増幅曲線



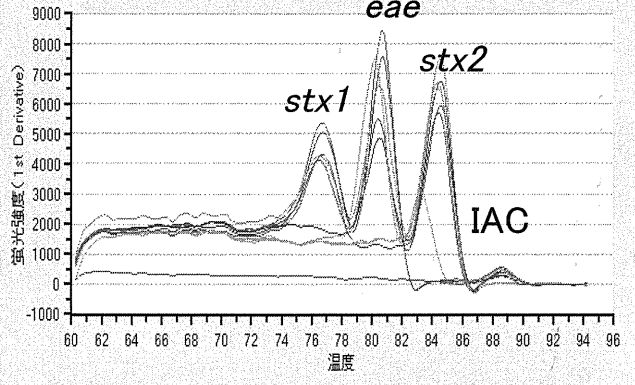
b-2: PSG融解曲線



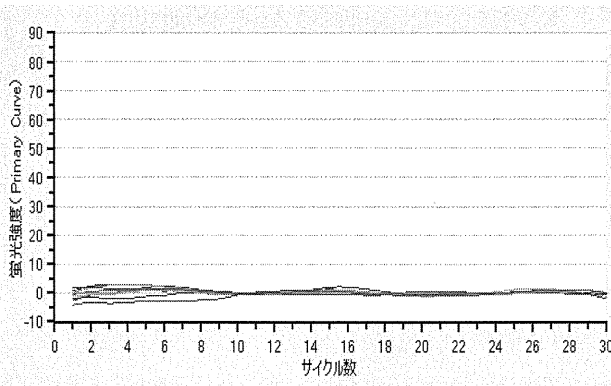
c-1: ADP増幅曲線



c-2: ADP融解曲線



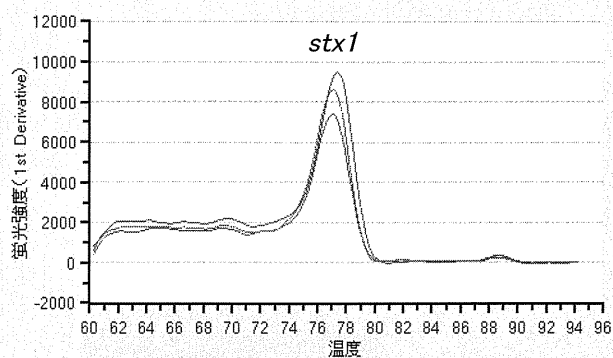
d-1: BDP融解曲線



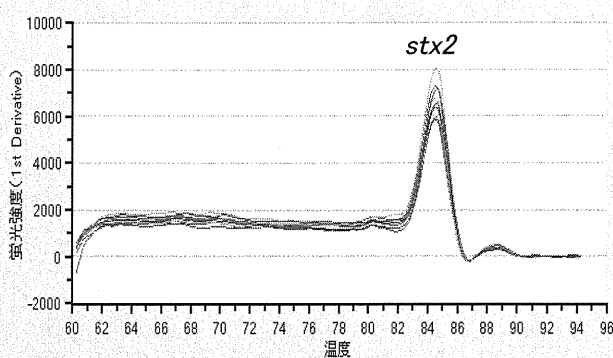
STEC 9株 (O119:HUT (*stx1*, *eeae*), O145:NM (*stx2*, *eeae*), O153:NM (*stx2f*, *eeae*), O157:NM (*stx1*, *stx2*, *eeae*), O168:HUT (*stx2*), OUT:H2 (*stx1*, *eeae*), OUT:NM (*stx2*), O157:H7 (*stx1*, *stx2c*, *eeae*), O128:H2 (*stx1*, *stx2d*)) のDNAを使用し, a)はDE, b)はPSG, c)はADP, d)はBDPを使用している. a-1, b-1, c-1, d-1は増幅曲線, a-2, b-2, c-2は融解曲線.

図4 multiplex real-time PCRによる各遺伝子型の融解曲線

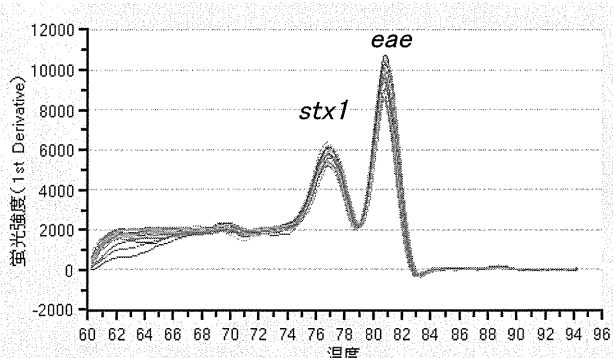
a) *stx1*保有株



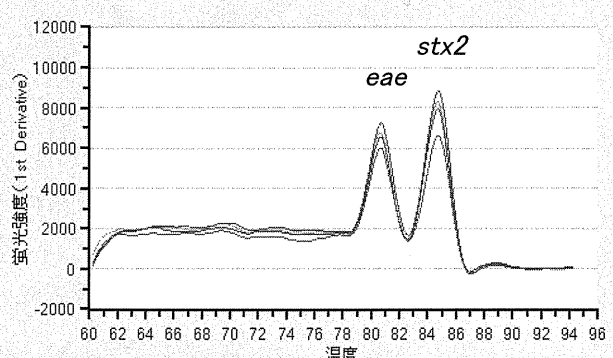
b) *stx2*保有株



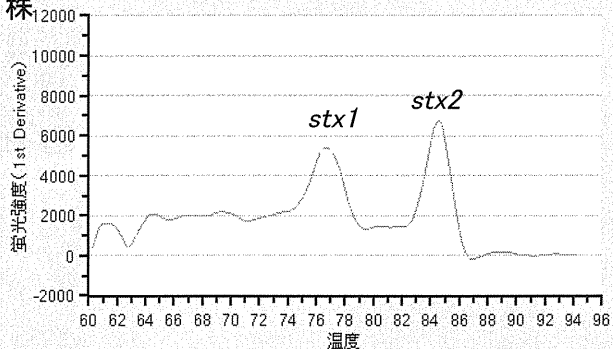
c) *stx1, eae*保有株



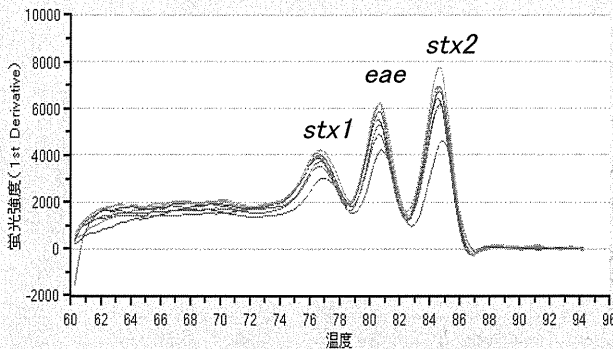
d) *stx2, eae*保有株



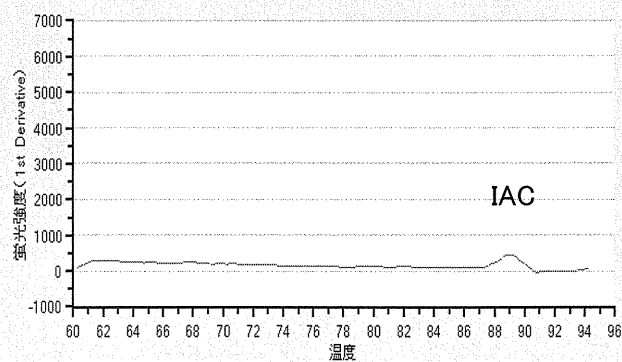
e) *stx1, stx2*保有株



f) *stx1, stx2, eae*保有株



g) Negative



a)はO91:NM (2), O91:HUT (1), b)はO8:NM (1), O142:HUT (1), O28ac:NM (1), O8:H19 (2), O8:NM (1), OUT:HUT (1), OUT:NM (2), c)は O103:H2 (3), O111:H21 (1), O111:HUT (1), O111:NM (2), O157:H7(2), O157:NM (3), O26:H11 (6), O26:NM (2), OUT:H16 (1), d)は O121:H19 (1), O145:NM (1), O157:H7(2), e)はO128:H2 (1), f)はO111:HUT (1), O121:H19 (1), O157:H7 (5), g)はNegative Control. Negative control以外ではIACはほとんど確認できない。()内は株数。