

うちの5株はVT2陽性、VT1陰性、血清型OUTであった。

7. 検体番号 K3

増菌培養液の 10^{-4} 希釈液はLAMP法によるVT検出結果が陽性であり、 10^{-5} 希釈液を塗抹し培養したRX-026寒天培地で生育したうちの3コロニーを選択したところ3コロニーがLAMP陽性であった。この分離株はVT1陽性、VT2陰性、血清型0128であった。

8. 検体番号 K4

増菌培養液をRX-026寒天培地に画線した。培養後、大腸菌と思われるコロニーが多く出現し、そのうちの5株はVT2陽性、VT1陰性、血清型OUTであった。

9. 検体番号 K5

増菌培養液をCT-SMACに画線した。培養後、大腸菌と思われるコロニーが多く出現し、そのうちの6株はVT2陽性、VT1陰性、血清型OUTであった。

D. 考察

本研究での結果、国内の輸入牛肉439検体中9検体(2.1%)から腸管出血性大腸菌が検出された。検体数が最も多かった原産国はオーストラリアであり、253検体中8検体(3.2%)から検出された。次いで検体数が多かったアメリカでは、72検体中1検体(1.4%)から検出された。この2国由来の牛肉が検体の主であるが、日本の牛肉の輸入が両国に偏っているため必然的であった。オーストラリアおよびアメリカ以外の原産国由来の114検体からは検出されなかったが、いずれも試験検体数が少ないため検出に至らなかったことが考え

られ、今後のデータの蓄積が必要と思われる。

分離株については、9検体中2検体(22.2%)がVT1産生、6検体(66.7%)がVT2産生、1検体(11.1%)がVT1&2産生であった。また、9検体中7検体(77.8%)が血清型OUTであり、その他08:H19および0128がそれぞれ1検体(11.1%)ずつ分離された。

オーストラリアでの牛における腸管出血性大腸菌の調査において、血清型05、08、026、0113、0157、OUTなどが主な血清型であり、汚染率は2002年に2.1%であったことが示されている。しかし、オーストラリアが特に牛の保菌率が高いのではなく、世界的に牛の保菌率が知られて日本でも37.5%の保菌の報告がある。このため、日本での流通牛肉全体の汚染率や菌株の解析等の汚染調査が必要である。また、国内の腸管出血性大腸菌による感染の主要は0157、026、0111であるが、今回陽性であった9検体中7検体から分離されたOUTによる感染も毎年報告されている。このため、牛肉を汚染しているOUTが感染を引き起こしている可能性が考えられる。これまで血清型0157については食品からの検出方法が確立され行われているが、026、0111も含め他血清型については効果的な方法が確立されていない。本研究で用いたような方法(図1)によって、確実に検出できれば汚染率や主要な血清型など汚染実態が把握でき衛生管理の必要な対象を効果的に明らかにできるものと思われる。

E. 結論

迅速で検出感度の高い検査方法が多く
の試験で求められているが、腸管出血性大
腸菌の検出法については、血清型に関わら
ず病原因子であるベロ毒素を検出するこ
とによるより適切な検出ができると考え
られ、腸管出血性大腸菌食中毒防止の推進
に役立つものと思われる。今年度は、16
年度に確立した方法を応用し国内の輸入
牛肉を対象に検出を試みた。その結果、439
検体中9検体(2.1%)から腸管出血性大腸
菌が検出された。検体数が最も多かった原
産国はオーストラリアであり、253検体中
8検体(3.2%)から検出された。次いで検
体数が多かったアメリカでは、72検体中
1検体(1.4%)から検出された。分離株に
ついては、9検体中2検体(22.2%)がVT1
産生、6検体(66.7%)がVT2産生、1検
体(11.1%)がVT1&2産生であった。また、
9検体中7検体(77.8%)が血清型OUTで
あり、その他08:H19および0128がそれぞ
れ1検体(11.1%)ずつ分離された。血清
型OUTの腸管出血性大腸菌の患者は国内
でも報告されている。今後さらに、日本で
の流通牛肉全体の汚染率や菌株の解析等
の汚染調査をする事によって食中毒防止
に役立てられると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Niizuma, J., Goto, I.,
Iizuka, S., Kamakura, K., Kaji, Y.,
Suzuki, S. and Takatori, K.
Procedures for isolation of
enterohemorrhagic *Escherichia*
coli, which is independent of

serotype, from beef naturally
contaminated with the pathogen. 投稿中.

2. 学会発表

工藤由起子. 食品における腸管出
血性大腸菌0157および026の検
査法に関する通知法への取り組
みについて. 第27回日本食品微生物
学会. 平成18年9月、大阪.

工藤由起子、瀬川優子、大塚佳代子、小
西典子、平松礼司、田中廣行、小
沼博隆、高鳥浩介. 食品からの腸管
出血性大腸菌検出のための各種ベロ
毒素遺伝子検出方法の比較. 第27回
日本食品微生物学会. 平成18年9月、
大阪.

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌食中
毒における畜産食品の重要性と
食品の新しい公定検査法の策定.
平成18年度農林水産省家畜衛
生研修会. 平成18年10月、つく
ば.

工藤由起子. 食品からの腸管出血性大腸
菌の検出法について最近の話題. 第
4回食の安全を確保するための微生物
検査協議会. 平成18年12月、東京.

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の最近の傾
向と新しい検査法について. 平成18年
度厚生労働省食肉衛生技術研修会. 平
成19年1月、東京.

工藤由起子. 「食品からの腸管出血性大腸
菌0157及び026の検査法」の背景につ
いて. 平成18年度食品衛生登録検査
協会微生物研修会. 平成19年1月、東

京.

工藤由起子. 食品からの腸管出血性大腸菌
検出のための新しい公定法. 平成 18 年
度地域保健総合推進事業地方衛生研究
所と東海北陸ブロック微生物部門研修
会、平成 19 年 1 月、愛知.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

表 1. 供試検体における検出結果

原産国	試験検体数	VT 陽性検体数 (%)
オーストラリア	253	8 (3.2%)
アメリカ合衆国	72	1 (1.4%)
ニュージーランド	59	0
カナダ	42	0
メキシコ	7	0
中国	3	0
ヴァヌアツ	3	0
合計	439	9 (2.1%)

表 2. 分離株の血清型および VT 産生性

検体番号	原産国	血清型	VT 型
Y5	オーストラリア	08:H19	VT2
Y6	オーストラリア	OUT	VT1
Y7	オーストラリア	OUT	VT1&2
Y8	アメリカ合衆国	OUT	VT2
Y9	オーストラリア	OUT	VT2
K2	オーストラリア	OUT	VT2
K3	オーストラリア	0128	VT1
K4	オーストラリア	OUT	VT2
K5	オーストラリア	OUT	VT2

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
細菌性食中毒の予防に関する研究
主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用の食肉及び野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌及び
サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

0157 以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究
(2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

要旨

腸管出血性大腸菌の検出法について、血清型 0157 だけではなく 0157 に次ぎ日本での主要な血清型である 026 及び 0111 を対象に含め検討した。昨年度までの結果から、選択増菌培養後に培養液中のペロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で 1～2 時間以内に検出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であると考え、本年度は、多種類の食品について各種遺伝子検出法の応用及び検体からの効果的な DNA 抽出方法の検討を行った。また、増菌培養については、血清型によって適切な方法が異なることが考えられるため、検討し妥当な方法を確認した。その結果、多種の食品で遺伝子検出が可能であることが確かめられたが、再現性が乏しいものも有った。また、血清型 0157、026 に加え 0111 を検査対象に含める場合はさらに検討が必要であるものの mEC での 42℃増菌培養が優れていた。以上の結果をもとに、腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の検出法として迅速で高感度な方法が示された。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所	工藤由起子、瀬川優子
埼玉衛生研究所	大塚佳代子
愛知県衛生研究所	平松礼司
東京都健康安全研究センター	甲斐明美、小西典子
日本食品分析センター	田中廣行、土屋 禎
東海大学海洋学部	小沼博隆

A. 研究目的
腸管出血性大腸菌による食中毒は血清型 0157 によるものが多いが、日本では毎年血清型 026 及び 0111 による患者も多く
報告されている。血清型 0157 については世界的にも患者が多く検査法の開発が進み複数機関で有効であることが評価された方法が示されている。しかし、血清型 026

及び O111 については適切な方法が開発されておらず、食品検査、食中毒調査などにおいて適切な行政措置をとることが難しい。このため、食品検査や食中毒調査において感度と特異性に優れた検査方法を開発する必要がある。昨年度、本研究ではノボビオシン加 mEC 培地での選択増菌培養後に培養液中のベロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で 1-2 時間以内に検出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であるとの結論を得た。本年度は、これを軸にさらに増菌方法及び遺伝子検出法の検討を中心に行った。遺伝子検出法は、特に迅速で感度が比較的高いことから各種手法が開発されており、腸管出血性大腸菌においては、その特徴であるベロ毒素を検出対象に LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法、リアルタイム PCR 法などが普及し始めている。しかし、今回対象として含まれる血清型 O26 及び O111 については、報告が少ない。本研究では、昨年に引き続きこれら血清型にも対応することも含め多種類の食品検体を用いて検討した。また、増菌培養についても検討を行った。

B. 研究方法

1. 各種 DNA 抽出法の検討

各種 DNA 抽出方法の比較を行った。血清型 O157 (No. 212 : VT1& 2 産生)、血清型 O26 (No. BFR 26015 : VT1& 2 産生) 及び血清型 O111 (No. ESC4 : VT1& 2 産生) の複数株を TSB にて 37°C 18 時間培養し、こ

れを PBS で 10^{-7} まで 10 段階希釈した。各種食品 (牛挽肉、カイワレ大根、30%牛脂加牛挽肉、牛レバー、卵、チーズ、キュウリの浅漬け、鶏手羽) のノボビオシン加 mEC 培地 (NmEC) での 42°C 増菌液 900 μ l に、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 希釈菌液 0.1 ml を添加し、これをサンプルとした (予想菌濃度 : 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 cfu/ml)。

DNA 抽出は以下の 6 種類の方法を行った。

① アルカリ熱抽出

サンプル 100 μ l を 10,000 Xg 10 分間遠心し、上清を除いた。50 mM NaOH を 100 μ l 添加して再浮遊させ、ヒートブロックで 100°C 10 分間加熱し、処理液 50 μ l を 1 M Tri-HCl (pH 7.0) 8 μ l で中和してプレートとした。

② PrepMan (ABI)

参考まで : サンプル 1 ml をねじ口チューブに採り、室温で 16,000 Xg 3 分間遠心し、上清を除いた。PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent を 200 μ l 添加し、再浮遊させ、ヒートブロックで 100°C 10 分間加熱した。加熱したサンプルを室温まで冷却し、16,000 Xg 3 分間遠心した上清 50 μ l を新たなチューブに移し、滅菌水を 200 μ l 添加して 5 倍希釈し、プレートとした。

③ DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)

サンプル 200 μ l を 1.5 ml 容マイクロチューブに採り、10,000 Xg 5 分間遠心して上清を除いた。Buffer ATL を 180 μ l に再浮遊させ、Proteinase K を 20 μ l 添加し、混和後、ヒートブロックで 56°C 1 時間加温した。Buffer AL を 200 μ l 添加し、ボルテックスで 15 秒間混和後ヒートブロックで 70°C 10

分間加温した。96~100%エタノールを 200 μ l 添加し、ボルテックスで15秒間混和後、Collection Tube に装着された Spin Column に全量を移した。6,000Xg 1分間遠心し、Spin Column を新たな Collection Tube に装着した。Buffer AW1 を 500 μ l 添加し、6,000Xg 1分間遠心して Spin Column を新たな Collection Tube に装着した。Buffer AW2 を 500 μ l 添加し、20,000Xg 3分間遠心して Spin Column を 1.5 ml 容マイクロチューブに装着した。Buffer AE を 200 μ l 添加し、室温に 1分間置いた。6,000Xg 1分間遠心したフロースルーをテンプレートとした。

VT 遺伝子増幅は以下の4つの方法で行った。

① LAMP 法

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を使用した。腸管出血性大腸菌 VT スクリーニングキット (栄研化学) を用いマニュアルに従いリアクションを行った。Loopamp リアルタイム濁度測定装置にて 65°C で 60分間反応を行った。

「判定」:陰性;濁度の上昇なし, 陽性;濁度の上昇

② TaqMan プローブ法

Nielsen ら (J. Clin. Microbiol. 41:2884-93, 2003) の Primer 及び Probe を合成・調整し、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI Cat. No. 4304437) を使用して ABI PRISM 7700 にて反応させた。

③ サイクリング・プローブ法

CycleleavePCR 0-157(VT1/VT2) Detection Kit Ver. 2.0 (タカラバイオ) を用いて Smart Cycler II (タカラバイオ) にて反応させた。

④ ハイブリダイゼーションプローブ法

Bellin ら (J. Clin. Microbiol. 39:370-374, 2001) の Primer 及び Probe を合成・調整し、LightCycler FastStart DNA Master HybProbe を使用して LightCycler Ver. 2.0 にて反応させた。

2. 血清型による増菌培養条件の比較

検体には牛挽肉、カイワレ大根およびアルファルファを使用した。これらの一般生菌数および大腸菌群数の確認には標準寒天培地および DESO 培地にて混釈培養にて行った。

0157 (No. 212)、026 (No. 26015)、0111 (No. 97353) の各菌株を TSB 10 ml にて 35-37°C 18時間培養し、PBS または生理食塩水で 10^{-6} 希釈 (約 500cfu/ml) 及び 10^{-7} 希釈 (約 50cfu/ml) した。 10^{-7} 希釈液 0.2 ml (約 10 cfu) を接種菌液とし、ただちにストマッカー袋に分配した各検体 25g に接種した。袋の外から手で良く菌液と検体を馴染ませた。N-mEC 培地を加え、培養を開始した。TSA 10 枚に 10^{-7} 希釈液 0.2 ml ずつ塗抹し接種菌数を確認した。

検体に NmEC 培地 (Merck) または mEC 培地 (BD) 225ml を加え、1分間のストマッカー処理を行い、42 \pm 1°C または 37 \pm 1°C にて 20時間培養した。

培養液 0.05ml をネジロマイクロチューブに移し、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法に供した。また、1ml ずつ 2本のマイクロチューブに移し、1本は免疫磁気ビーズ、1本は直接塗抹用に供した。さらに、2ml を予備としてネジロマイクロチューブに移した。免疫磁気ビーズ (IMS) 法 (血清型 0157、026、0111) は、マ

ニュアル（デンカ生研）に従い免疫磁気ビーズ濃縮を行った。最終浮遊液 20 μ l ずつ画線した。分離培養は、腸管出血性大腸菌の血清型 0157、026 及び 0111 の各菌株について下記の分離平板培地にて培養し集落の形態を確認した上で実験に供試した。

- 血清型 0157：CT-SMAC, BCM0157, BD クロモアガー-0157, クロモアガー 0157TAM
- 血清型 026：CT-RMAC レインボーアガー, CT-RX026
- 血清型 0111：CT-SMAC, CT-RMAC, レインボーアガー, XMG, ソルボース加 MacConkey, DHL

直接分離法では、10 μ l を上記各平板 1 枚に画線した。

菌株の確認のため、各平板につき疑わしい集落を 5 個以上釣菌（もし、全て陰性ならさらに 10 個（最大 15 コロニー以上）した。血清（0157, 026, 0111）にて凝集反応を確認した。

C. 研究結果及び考察

1. 各種 DNA 抽出法の検討

昨年度の結果から熱抽出法（各サンプル 100 μ l をねじロチューブまたは PCR チューブに採り、10,000Xg 10 分間遠心し、上清を除く。TE 100 μ l を添加し、再浮遊させ、ヒートブロック、サーマルサイクラーなどで 100 $^{\circ}$ C 10 分間加熱する。加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000Xg 10 分間遠心した上清を新たなチューブに移し、テンプレートとする）は優れないことが明らかになったため、アルカリ試薬およびキット等を用いた抽出方法を検討した。

牛挽肉、カイワレ大根、30%牛脂加牛挽肉、牛レバー、卵、チーズ、キュウリの浅漬けおよびの NmEC 増菌液に 026 を接種し、アルカリ抽出法、PrepMan 法または DNeasy 法で DNA 抽出を行い、LAMP 法、TaqMan PCR 法、LightCycler 法および SmartCycler 法によって VT 遺伝子検出を行ったところ、牛挽肉では、LAMP 法では 10^2 cfu/ml 以上、TaqMan PCR 法、LightCycler 法、SmartCycler は 10^3 cfu/ml 以上で検出可能であった（表 1）。カイワレ大根では、LAMP 法、TaqMan PCR 法では 10^2 cfu/ml 以上、LightCycler 法および SmartCycler 法は 10^3 cfu/ml 以上で検出可能だった。30%牛脂加牛挽肉では、LAMP 法では 10^4 cfu/ml 以上、TaqMan PCR 法および LightCycler 法では 10^3 cfu/ml 以上、SmartCycler 法では 10^2 cfu/ml 以上で検出可能だった。牛レバーでは、SmartCycler 法では 10^2 cfu/ml 以上で検出可能であり、他の方法でも 10^3 cfu/ml 以上で検出可能であった。卵では、LAMP 法、TaqMan PCR 法、LightCycler 法では 10^3 cfu/ml 以上、SmartCycler 法では 10^2 cfu/ml 以上で検出可能であった。チーズでは、TaqMan PCR 法、SmartCycler 法は 10^3 cfu/ml 以上、LAMP 法、LightCycler 法は 10^2 cfu/ml 以上で検出可能であった。キュウリの浅漬けでは、LAMP 法で 10^2 cfu/ml 以上で、TaqMan PCR 法で 10^3 cfu/ml 以上で検出可能であった。また、鶏手羽ではアルカリ熱抽出および DNeasy のどちらでも LAMP 法および TaqMan PCR 法で 10^3 cfu/ml 以上で検出可能であった。

総じて、どの食品でも今回実施した VT 遺伝子検出法のいずれも 10^3 cfu/ml 以上の

腸管出血性大腸菌を含む食品培養液から確実に検出できることが明らかになった。しかし、チーズでは再現性が優れない場合があり、種類によって異なる可能性もあることからさらに検討が必要と考えられた。

2. 血清型による増菌培養条件の比較

血清型 0157 については、アルファルファにおいて 3 菌株とも mEC での 37 および 42°C 培養、NmEC での 42°C 培養の遺伝子検出法および培養法のいずれでも検出された (表 2 (1))。牛挽肉においては NmEC での 42°C 培養の全試験方法で検出されたが、mEC での 37°C 培養で検出されない塗抹方法があった。血清型 026 については、アルファルファおよび牛挽肉において供試した 4 株とも遺伝子検出法および培養法のいずれでも検出された (表 2 (2))。血清型 0111 については、牛挽肉にいて 1 菌株が mEC での 37°C 培養での培養法では陰性の塗抹方法もあった (表 2 (3))。カイワレ大根について牛挽肉で検出が優れなかった一株とは異なる株で、mEC での 37°C 培養で培養法では陰性の塗抹方法があり、さらに NmEC での 42°C 培養では LAMP 法および培養法で陰性であり増殖性が著しく優れなかった。

これらの 3 血清型を網羅する増菌培養法として、mEC での 42°C 培養が優れていたが、検体数や菌株数をさらに増やして検討す

る必要がある。また、いずれの条件を採用するのが最善かは対象食品や対象血清型など目的を踏まえて選択することも有用と考えられる。

D. 結論

腸管出血性大腸菌の検出法について、血清型 0157 だけではなく 0157 に次ぎ日本での主要な血清型である 026 及び 0111 を対象に含め検討した。昨年度までの結果から、選択増菌培養後に培養液中のペロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で 1-2 時間以内に検出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であると考え、本年度は、多種類の食品について各種遺伝子検出法の応用及び検体からの効果的な DNA 抽出方法の検討を行った。また、増菌培養については、血清型によって適切な方法が異なることが考えられるため、検討し妥当な方法を確認した。その結果、多種の食品で遺伝子検出が可能であることが確かめられたが、再現性が乏しいものも有った。また、血清型 0157、026 に加え 0111 を検査対象に含める場合はさらに検討が必要であるものの mEC での 42°C 増菌培養が優れていた。以上の結果をもとに、腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の検出法として迅速で高感度な方法が示された。

Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 and 026 in food by means of immunomagnetic separation methods in combination with a molecular method: a collaborative study. Int. J. Food

F. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Konishi, N. Otsuka, K., Hiramatsu, R. Tanaka, H., Tsuchiya, T., Konuma, H. and Takatori, K.

Microbiol. 投稿中.

Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K. Kojima T., Ikedo, M. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using Loop-mediated isothermal amplification. J. Med. Microbiol. J. Med. Microbiol. 56: 398-406, 2007.

Goto, M., Takahashi, H., Segawa, Y., Hayashidani, H., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. J. Food Prot. 70: 90-96, 2007.

Goto, M., Hayashidani, H., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harboring genes for four classical enterotoxins, SEA, SEB, SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay. Lett. Appl. Microbiol. In press.

2. 学会発表

平松礼司、土屋 禎、小西典子、大塚佳代子、田中廣行、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌 0157 及び 026 の検査法の策定におけるコラボレイティブ・スタディによる評価. 第 10 回 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム. 平成 18 年 9 月. 東京.

大塚佳代子、小西典子、平松礼司、土屋 禎、

田中廣行、工藤由起子、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌検出によるベロ毒素遺伝子検出法の検討. 第 10 回 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム. 平成 18 年 9 月. 東京.

小西典子、下島優香子、尾畑浩魅、門間千枝、仲真晶子、工藤由起子、甲斐明美、山田澄夫. 食品を対象とした腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の増菌培養法の比較検討. 第 10 回 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム. 平成 18 年 9 月. 東京.

土屋 禎、小西典子、森本 洋、畠山 敬、磯部順子、横山栄二、浅井良夫、川森文彦、塚本定三、田中 忍、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌血清型 0157 及び 026 の検出法に関するコラボレイティブ・スタディの実施概要について. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 18 年 9 月. 大阪.

平松礼司、大塚佳代子、竹田義弘、田中真弓、濱崎光宏、山崎省吾、八尋俊輔、新妻 淳、鎌倉和政、有馬和英、小澤一弘、工藤由起子、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌血清型 0157 及び 026 の検出法に関するコラボレイティブ・スタディの結果について. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 18 年 9 月. 大阪.

小西典子、大塚佳代子、田中廣行、平松礼司、矢野一好、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介. 血清型および

対象食品の違いによる腸管出血性大腸菌の検出方法に関する検討. 第27回日本食品微生物学会学術総会. 平成18年9月. 大阪.

大塚佳代子、小西典子、平松礼司、田中廣行、土屋 禎、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介. 腸管出血性大腸菌の遺伝子検査法における検出感度の確保を目的とした食品培養液からのDNA抽出法の検討. 第27回日本食品微生物学会学術総会. 平成18年9月. 大阪.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

表1 各種食品における遺伝子検出法による検出感度

食品	血清型	抽出方法	検出方法	食品培養液中の菌濃度(cfu/ml)		
				10 ⁴	10 ³	10 ²
牛挽肉	O157, O26, O111	PrepMan	LAMP	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (8/8)
			TaqMan	100% (9/9)	100% (9/9)	88.9% (8/9)
			LightCycler	100% (5/5)	100% (5/5)	88.9% (8/9)
			SmartCycler	100% (6/6)	100% (6/6)	50.0% (4/8)
カイワレ大根	O157, O26, O111	PrepMan	LAMP	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (8/8)
			TaqMan	100% (9/9)	100% (9/9)	100% (9/9)
			LightCycler	100% (3/3)	100% (6/6)	88.9% (8/9)
			SmartCycler	100% (6/6)	100% (6/6)	37.5% (3/8)
牛挽肉 (30%牛脂加)	O26	アルカリ熱	LAMP	100% (2/2)	50.0% (1/2)	50.0% (1/2)
			TaqMan	100% (2/2)	100% (2/2)	50.0% (1/2)
			LightCycler	100% (2/2)	100% (2/2)	0 (0/2)
			SmartCycler	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
牛レバー	O26	アルカリ熱	LAMP	100% (2/2)	100% (2/2)	0 (0/2)
			TaqMan	100% (2/2)	100% (2/2)	0 (0/2)
			LightCycler	100% (2/2)	100% (2/2)	0 (0/2)
			SmartCycler	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
卵	O26	アルカリ熱	LAMP	100% (2/2)	100% (2/2)	0 (0/2)
			TaqMan	100% (2/2)	100% (2/2)	0 (0/2)
			LightCycler	100% (2/2)	100% (2/2)	0 (0/2)
			SmartCycler	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
チーズ	O26	アルカリ熱	LAMP	87.5% (7/8)	62.5% (5/8)	12.5% (1/8)
			TaqMan	100% (12/12)	100% (12/12)	58.3% (7/12)
			LightCycler	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
			SmartCycler	100% (2/2)	100% (2/2)	50.0% (1/2)
キュウリの 浅漬け	O157, O26	アルカリ熱	LAMP	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
			TaqMan	100% (4/4)	100% (4/4)	25% (1/4)
		DNeasy	LAMP	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
			TaqMan	100% (4/4)	100% (4/4)	75% (3/4)
鶏手羽	O157, O26	アルカリ熱	LAMP	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
			TaqMan	100% (4/4)	100% (4/4)	25% (1/4)
		DNeasy	LAMP	100% (4/4)	100% (4/4)	75% (3/4)
			TaqMan	100% (4/4)	100% (4/4)	25% (1/4)

表2.血清型による増菌培養条件の比較

(2)血清型O26

①アルファルフ

菌株	26015			26016			26001			26002		
	mEC 37°C	mEC 42°C	NmEC 42°C	mEC 37°C	mEC 42°C	NmEC 42°C	mEC 37°C	mEC 42°C	NmEC 42°C	mEC 37°C	mEC 42°C	NmEC 42°C
検体												
一般生菌数(cfu/g)		6.9×10 ⁷			6.9×10 ⁷			9.4×10 ⁷		9.4×10 ⁷		9.4×10 ⁷
大腸菌群数 (cfu/g)		4.4×10 ⁵			4.4×10 ⁵			1.7×10 ⁷		1.7×10 ⁷		1.7×10 ⁷
接種菌数 (cfu/25g)		8.4			18.9			15.8		15.8		12.8
遺伝子検出法	LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
培養法	Direct (CT-SMAC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Direct (CT-RXO26)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IMS (CT-SMAC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IMS (CT-RXO26)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

②牛挽肉

菌株	26016			26001			26002		
	mEC 37°C	NmEC 42°C	mEC 42°C	mEC 37°C	NmEC 42°C	mEC 42°C	mEC 37°C	NmEC 42°C	mEC 42°C
検体									
一般生菌数(cfu/g)		1.0×10 ⁶			6.2×10 ⁴			6.2×10 ⁴	
大腸菌群数 (cfu/g)		1.8×10 ³			3.0×10 ²			3.0×10 ²	
接種菌数 (cfu/25g)		8.7			6.3			5.1	
遺伝子検出法	LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+
培養法	Direct (CT-SMAC)	+	+	+	+	+	+	+	+
	Direct (CT-RXO26)	+	+	+	+	+	+	+	+
	IMS (CT-SMAC)	+	+	+	+	+	+	+	+
	IMS (CT-RXO26)	+	+	+	+	+	+	+	+

表2. 血清型による増菌培養条件の比較

(1) 血清型O157

①アルファアラブア

菌株	No. 212			No. 1			ATCC43890
	mEC 37°C	mEC 42°C	NmEC 42°C	mEC 37°C	NmEC 42°C	mEC 37°C	
培養条件							
検体		一般生菌数(cfu/g)	6.9×10 ⁷		8.0×10 ⁷		8.0×10 ⁷
		大腸菌群数 (cfu/g)	4.4×10 ⁵		9.1×10 ⁶		9.1×10 ⁶
接種菌数 (cfu/25g)			11.5		12.3		10.3
遺伝子検出法	LAMP	+	+	+	+	+	+
培養法	Direct (CT-SMAC)	+	+	+	+	+	+
	Direct (TAM)	+	+	+	+	+	+
	IMS (CT-SMAC)	+	+	+	+	+	+
	IMS (TAM)	+	+	+	+	+	+

②牛挽肉

菌株	No. 1			ATCC43890		
	mEC 37°C	NmEC 42°C	mEC 42°C	mEC 37°C	NmEC 42°C	NmEC 42°C
培養条件						
検体		一般生菌数(cfu/g)	1.0×10 ⁶		1.0×10 ⁶	
		大腸菌群数 (cfu/g)	1.8×10 ³		1.8×10 ³	
接種菌数 (cfu/25g)			4.9		4.1	
遺伝子検出法	LAMP	+	+	+	+	+
培養法	Direct (CT-SMAC)	-	+	+	+	+
	Direct (TAM)	+	+	+	+	+
	IMS (CT-SMAC)	+	+	+	+	+
	IMS (TAM)	+	+	+	+	+

表 2. 血清型による増菌培養条件の比較

(3) 血清型O111

①牛挽肉

菌株	97353			ESC4			
	培養条件	mEC 37°C	mEC 42°C	NmEC 42°C	mEC 37°C	mEC 42°C	NmEC 42°C
検体	一般生菌数(cfu/g)		1.7 × 10 ⁶			1.7 × 10 ⁶	
	大腸菌群数 (cfu/g)		1.8 × 10 ³			1.8 × 10 ³	
接種菌数 (cfu/25g)			4.8			6.4	
遺伝子検出法	LAMP	+	+	+	+	+	+
培養法	Direct (CT-SMAC)	+	+	+	-	+	+
	IMS (CT-RXO26)	+	+	+	+	+	+
	IMS (DHL)	+	+	+	+	+	+

②カイワレ大根

菌株	97353			ESC4			
	培養条件	mEC 37°C	mEC 42°C	NmEC 42°C	mEC 37°C	mEC 42°C	NmEC 42°C
検体	一般生菌数(cfu/g)		7.6 × 10 ⁷			7.6 × 10 ⁷	
	大腸菌群数 (cfu/g)		1.6 × 10 ⁶			1.6 × 10 ⁶	
接種菌数 (cfu/25g)			9.6			7.6	
遺伝子検出法	LAMP	+	+	-	+	+	+
培養法	Direct (CT-SMAC)	+	+	-	+	+	+
	IMS (CT-RXO26)	+	+	-	+	+	+
	IMS (DHL)	-	+	-	+	+	+

平成18年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
細菌性食中毒の予防に関する研究

分担研究

生食用の食肉及び野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌及び
サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥浩介(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

協力研究報告書

腸管出血性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌に関する研究
マルチプレックス定量PCR法を用いた下痢原性大腸菌検出

研究要旨

食品中の下痢原性大腸菌(DEC)を迅速適確に検出するには、増菌後の培養液を試料とする効率的なスクリーニング方法を確立する必要がある。志賀毒素産生性大腸菌・腸管毒素原性大腸菌・腸管病原性大腸菌・腸管侵入性大腸菌・腸管凝集接着性大腸菌・分散接着性大腸菌・EAST1遺伝子保有大腸菌の8種類の病原遺伝子(*stx1*、*stx2*、*eae*、*est* (STp)、*est* (STh)、*elt*、*aggR*、*astA*、*virB*、*afaB*)を標的として、リアルタイム・マルチプレックスPCR法の応用を試みた。設計したプライマーおよびプローブは十分な特異性を示し、100株の大腸菌株およびその他の細菌株を用いた試験において、偽陰性を示したのは1株だけであった。純培養菌液を用いた各マルチプレックス・リアルタイムPCR法の検出限界は約 10^3 – 10^4 cfu/mlであり、良好な感度を示した。また、マルチプレックス反応時に遺伝子間で初期鋳型量に大きな差がある競合的な条件下(各病原遺伝子陽性株のテンプレートDNAの割合が 10^5 :1または 10^6 :1)でも、濃度差がない場合と同程度に検出および定量することが可能であった。本手法はDECの網羅的スクリーニングに極めて有効な手段になると期待される。

研究協力者

西川禎一 大阪市立大学

A. 研究目的

大腸菌(*Escherichia coli*:*E. coli*)の多くは腸管内においては無害であるが、中にはヒトに下痢症を引き起こすことから下痢原性大腸菌(Diarrheagenic *E. coli*:DEC)と呼ばれるものがある。DECは、その病原機構の違いにより以下の6グループに分類される。

- ① 腸管病原性大腸菌
(Enteropathogenic *E. coli*:EPEC)
- ② 志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *E. coli*:STEC)・腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *E. coli*:EHEC)
- ③ 腸管毒素原性大腸菌
(Enterotoxigenic *E. coli*:ETEC)
- ④ 腸管凝集接着性大腸菌
(Enteroaggregative *E. coli*:EAggEC)

⑤ 腸管組織侵入性大腸菌
(Enteroinvasive *E. coli* :EIEC)

⑥ 分散接着性大腸菌 (Diffusely
adherent *E. coli* :DAEC)

また、当研究室では、上記6グループに加えて EAggEC の耐熱性腸管毒素 (EAST1) 遺伝子 (*astA*) を保有する大腸菌を7番目の下痢原性大腸菌カテゴリーとして提唱している。

⑦ 腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素遺伝子保有大腸菌 (EAggEC
heat-stable enterotoxin 1
gene-possessing *E. coli* :EAST1EC)

EAST1 は1991年に EAggEC から発見されたが¹⁾、その後 EAggEC 以外の DEC からも *astA* が検出され、EAST1 が下痢症に関与していることを示唆する集団事例や散发例が報告されている²⁻⁴⁾。

EHEC については、これまでの数多くの研究から、牛がその保菌動物であることが知られているが、EHEC O157 以外の DEC は分離培養における識別が困難なことから、検査が行なわれることはほとんどなく、その汚染源・感染経路等は不明なままとなっており、その解明が求められている。

汚染経路の究明には鋭敏で特異性の高い検出法が不可欠である。リアルタイム PCR 法はサーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した装置を用いて、PCR (遺伝子増幅反応) での増幅産物の生成過程をリアルタイムにモニタリングし、解析する方法である。近年、リアルタイム PCR 技術を大腸菌 O157:H7⁵⁻⁷⁾、サルモネラ⁸⁾、黄色ブドウ球菌⁹⁾などの病原細菌の検出に用いる方法が報告されている。EHEC O157 以外の DEC についても EHEC¹⁰⁾、ETEC¹¹⁾に適用した報告や、検出試薬に

SYBR Green I を用いて DAEC を除く DEC 全般を検出する方法が報告されている^{12, 13)}。しかしながら、DAEC を含む DEC 全般を網羅的に検出する方法は未だ報告されていない。

本研究は、7グループの DEC すべてを網羅的に検出する目的で、STEC の志賀毒素遺伝子2種 (*stx1*, *stx2*)、EPEC や EHEC の細胞接着に関わるインチミン遺伝子 (*eae*)、ETEC の2種の耐熱性エンテロトキシン遺伝子 (*est* (STp), *est* (STh))、ETEC の易熱性エンテロトキシン遺伝子 (*elt*)、EAggEC の凝集接着性に関わる遺伝子 (*aggR*)、EAST1 遺伝子 (*astA*)、EIEC の侵入性に関わる遺伝子 (*virB*)、DAEC の非線毛性接着因子 (Afa/Dr+型) の遺伝子 (*afaB*) を標的とし、これらの遺伝子を組み合わせると同時に検出するマルチプレックス・リアルタイム PCR 法の確立を試みた。SYBR Green I は特別なプローブを設計する必要がなく、簡便で安価である一方、非特異的な反応をも検出してしまふ。それに対し、標的遺伝子と相補的な配列を持った TaqMan プローブやハイブリダイゼーションプローブなどは精度の高い方法として評価されている。そこで本研究では TaqMan プローブ法を用いることとした。

今回用いたリアルタイム PCR 装置 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (ABI; Applied Biosystems, California, USA) は、2つの蛍光を同時に検知し測定することができる。そこで、各下痢原性大腸菌グループの病原遺伝子を2種類同時に検出できるようにプライマーとプローブを組み合わせた (デュプレックス PCR)。また、*est* (STp) と *est* (STh) あるいは *stx1* と *stx2* のように、識別せずに *est* あるいは *stx* とし

て一括検出することが可能な場合は同一種の蛍光色素で標識した TaqMan プローブを各遺伝子に対して使用した。この方法により、計 3 種の遺伝子を同時に検出するトリプレックス PCR を試みた。これらの組み合わせで、マルチプレックス・リアルタイム PCR の特異性および感度を検討した。さらに、マルチプレックス反応が起こる際、片方の遺伝子が多量に存在する場合においても微量に混在する標的遺伝子を検出・定量できる反応条件の設定を試みた。

B. 研究方法

1. 使用菌株

各病原遺伝子陽性株として、以下の菌株を使用した。これらの菌株はリアルタイム PCR 法による各遺伝子の定量に際して使用する検量線の作成と測定時の陽性対照として用いた。[]内は標的病原遺伝子を表す。EPEC E2348/69 [*eae*]、EHEC 99-140-A [*stx1*, *eae*]、EHEC V-831 [*stx2*, *eae*]、STEC EC7225 [*stx1*]、STEC EC8212 [*stx2*]、ETEC 97-245-244 [*est* (STp)]、ETEC E7476 [*est* (STh)]、ETEC E5798 [*elt*]、EAggEC E59152 [*aggR*]、EIEC E35990 [*virB*]、DAEC V-64 [*afaB*]、EAST1EC 96-127-23 [*astA*]

陽性対照および陰性対照として用いたすべての株を表 1 に示す。

2. 培地

供試菌株の培養にはトリプトソーヤブイオン (TSB; Oxiod, Hampshire, UK)、トリプトソーヤ寒天平板 (TSA; Oxiod) を使用した。菌液中の生菌数は段階希釈後スパイラルプレート法で TSA に塗抹し、算出した。

3. 通常の PCR 法

4 種の遺伝子 (*invE*・*stx*・*est*・*elt*) を同時検出するテトラプレックス PCR、2 種の遺伝子 (*afaC*・*astA*) あるいは (*eae*・*aggR*) を同時検出するデュプレックス PCR 法を実施した。使用したプライマーを表 2 に示す。PCR で使用した *afaC* プライマーは、Afa/Dr+ と Afa/Dr- 両型の DAEC が持つ *afaC* を標的とし¹⁴⁾、*eae* プライマーは STEC と EPEC 両グループが持つ *eaeA* を標的とする¹⁵⁾。

PCR に供したテンプレートは、ボイル法を用いて以下の手順で作製した。TSB 培地で 37°C 18 時間培養後の培養液 (約 $10^8 - 10^9$ cfu/ml) を、1.5 ml マイクロチューブに 500 μ l とり、13,000 rpm (回転半径 81 mm、4°C) で 5 分間遠心した。上清を捨て、50 μ l の滅菌蒸留水を加え、ピペッティングにより混和した。沸騰温浴中に 10 分間置き、1 分間氷上で冷却した。13,000 rpm (回転半径 81 mm、4°C) で 5 分間遠心し、上清を PCR のテンプレートとした (10 倍濃縮)。培養菌液は段階希釈後スパイラルプレート法で TSA に塗抹し、生菌数を算出した。

PCR は以下の要領で行なった。

① *invE*・*stx*・*est*・*elt* テトラプレックス PCR

4 遺伝子を同時検出するテトラプレックス PCR は伊藤らの方法を改変し実施した¹⁶⁾。プライマーは 50 μ M になるよう TE に溶解したものを以下の割合で混合し、混合プライマー溶液 EC mix とした (表 3)。PCR 試薬は TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社、滋賀) を用いた。反応液は計 25 μ l とし、Takara Ex Taq (5U/ μ l) を 0.3 μ l (1.5U)、10× Ex Taq Buffer (20 mM Mg²⁺) を 2.5 μ l (Mg²⁺ 最終濃度 2 mM)、dNTP Mixture

(2.5mM)を2.0 μ l(最終濃度 200 μ M)、プライマー-EC mix 1.3 μ l 混合し、テンプレート DNA は 2 μ l 加えた。

PCR は 95°C10 分の熱変性の後、94°C 30 秒、47°C60 秒、72°C90 秒を 35 サイクル 行い、最終は 72°Cの伸長反応ステップを 5 分間行なった。

② *afaC*・*astA* デュプレックス PCR

PCR 試薬は TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)を用いた。反応液は計 25 μ l とし、Takara Ex Taq (5U/ μ l)を 0.1 μ l(0.5U)、10×Ex Taq Buffer (Mg²⁺ Free)を 2.5 μ l、dNTP Mixture(2.5mM)を 2.0 μ l(最終濃度 200 μ M)、MgCl₂(25mM)を 2.5 μ l(最終濃度 2.5mM)、プライマーは 50 μ M になるよう TE に溶解したものを *afa-f*、*afa-r* は各 0.1 μ l、EAST11a、EAST11b は各 0.15 μ l 混合し、テンプレート DNA は 2 μ l 加えた。

PCR は 95°C10 分の熱変性の後、94°C 30 秒、60°C30 秒、72°C40 秒を 30 サイクル 行い、最終は 72°Cの伸長反応ステップを 5 分間行なった。

③ *eae*・*aggR* デュプレックス PCR

PCR 試薬は TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)を用いた。反応液は計 25 μ l とし、②と同量の試薬を混合し、プライマーは 50 μ M の *eaeAF*、*eaeAR* を各 0.1 μ l、*eaggRF*、*eaggRR* を各 0.2 μ l 添加した。テンプレート DNA は 2 μ l 加えた。

PCR 条件は、②と同一である。

④アガロースゲル電気泳動

PCR 産物 10 μ l はゲルローディングバッファー(6×Loading Dye; 東洋紡、大阪)2 μ l と混合し、2.5%アガロースゲルを用いて TBE 緩衝液中、100V で泳動した。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド水溶液で染色

し、紫外線照射下で PCR 産物の有無とサイズを観察した。サーマルサイクラーは Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)および TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL TP240 (タカラバイオ)、電気泳動装置は Gelmate (東洋紡)、ゲルの撮影は Electrophoresis documentation and analysis system 120 (Eastman Kodak DS, New York, USA)を用いた。

4. プライマーとプローブの設計

リアルタイム PCR に使用したプライマーおよびプローブは、Primer Express ver.2.0(ABI)を用いて、添付のガイドラインに従い設計した(表 3)。塩基配列は米国 生物学情報センター (NCBI; National Center for Biotechnology Information)の提供する GenBank から収集した。設計に用いた配列の ID ナンバーを表 4 に示す。また、プライマーの選出には『リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析(タカラバイオ)』に示されたプライマー設計パラメータを参考とした。遺伝子にいくつかの変異型がある場合は、塩基配列のホモロジー比較を GENETYX-WIN ver.4.0.3(ゼネティックス、東京)を用いて行い、プライマー設計箇所を特定して設計を行なった。設計後のプライマーおよびプローブ、アンプリコンは NCBI BLAST の Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)で、標的遺伝子への特異性を確認した。

TaqMan プローブおよび TaqMan MGB プローブは 5' 末端を FAM または VIC の蛍光物質にて修飾した。合成されたプライマー(グライナージャパン株式会社、東京)は 50 μ M になるよう TE に溶解した。プローブ

(ABI)は 10mM Tris-HCl [pH7.5]で 2 μ M に希釈した。

5. DNA 抽出

リアルタイム PCR 用は定量検出を目的とするため、そのテンプレート DNA は安定的に抽出される必要がある。そこで

PUREGENE Cell and Tissue DNA Isolation kit (Gentra Systems, Minnesota, USA)を用いて、添付のプロトコールを一部改変して以下の手順で行なった。抽出した DNA は、GeneQuant *pro* “S” RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, UK)により吸光度を測定し、純度の指標として吸光度比 260/280 を用いた。

- 1) 500 μ l の菌懸濁液 (TSB, 37°C 18 時間培養, 約 10⁹ cfu/ml) を 1.5ml マイクロチューブにとり、15,000 × g で 5 分間遠心し、上清を取り除いた。
- 2) 300 μ l の Cell Lysis Solution を加え、ピペッティングして沈殿とよく混合し 80°C 5 分インキュベートした。
- 3) さらに、ときどき転倒混和しながら 37°C で 30 分インキュベートした。1 分間氷上に置き室温に戻し、軽く遠心して壁に付着した試薬等を落とした。
- 4) 100 μ l の Protein Precipitation Solution を加え、ボルテックスでハイスピード 20 秒間激しく混和した。
- 5) タンパク質の沈殿を強固なペレットにするため、15,000 × g で 4 分間遠心した。
- 6) 上清を 300 μ l の 100% イソプロパノール (2-Propanol; 和光純薬工業) が入った新しい 1.5ml チューブに移し、穏やかに 50 回転倒混和した。
- 7) 15,000 × g で 1 分間遠心し、ペーパーの

上に上清を捨て、300 μ l の 70% エタノール (v/v) を加えて数回転倒させ DNA を洗浄した。

- 8) さらに 15,000 × g で 1 分間遠心し、エタノールを注意深く捨て、ペーパーの上にチューブを伏せてペレットを乾燥した。

- 9) 50 μ l の DNA Hydration Solution を加え、65°C 1 分間インキュベートまたは室温で一晩静置し、途中数回タッピングを行った。DNA は -20°C で保存した。

6. リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR は *stx*(*Stx1*・*Stx2*)・*eae* トリプレックス、*stx1*・*stx2* デュプレックス、*est*(*STp*・*STh*)・*elt* トリプレックス、*est*(*STp*)・*est*(*STh*) デュプレックス、*aggR*・*astA* デュプレックス、*virB*・*afaB* デュプレックスの組み合わせで行なった。

単一遺伝子の増幅時には Realtime PCR Master Mix (東洋紡) を、マルチプレックスの場合は QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を使用した。

添付のプロトコールに従い、反応液は計 50 μ l とし、2 × マスターミックスを 25 μ l 添加した。単一のプライマー・プローブを使用する際は、プライマー各 0.3 μ M、プローブ 0.1 μ M とした。マルチプレックス反応のプライマーおよびプローブ濃度は後に記す試験によって決定した。

PCR 反応液は 96 ウェルプレート (B-96-AB-RT; イナ・オプティカ、大阪) に分注し、テンプレート DNA 2 μ l を添加した。プレートは ThermalSeal RT film (50 μ m thick; EXCEL Scientific, California, USA)