

でシールし、Optical Adhesive Cover (ABI)で覆った。PCR 条件は、Realtime PCR Master Mix(東洋紡)の場合は、95°C 1 分の熱変性ステップの後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 40 サイクル行い、QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen GmbH)の場合は、始めの熱変性を 95°C 15 分行い、95°C 1 分、60°C 1 分を 40 サイクル行った。

リアルタイム PCR 装置は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (ABI)を使用し、添付のプロトコールに従い PCR およびデータ解析を行なった。

#### 7. プライマーおよびプローブの有用性と特異性の検討

設計したプライマー・プローブ(表4・5)についてリアルタイム PCR における有効性を、 $T_m$  値、増幅産物サイズ、 $C_t$  値などから検討し、さらにマルチプレックス反応において各プライマーやプローブが相互に反応しないかを確認した。後者については、単一のテンプレートを供した際に片方の遺伝子の増幅反応がみられないかを確認し、さらに検討を要するものについてはプライマーとプローブの組み合わせを交差させて相互反応の有無を確認した。その後、表 1 に示した菌株を対象とするリアルタイム PCR を行い、通常の PCR による結果と比較して特異性を確認した。

#### 8. リアルタイム PCR の感度

マルチプレックス・リアルタイム PCR の感度を、以下の点について検討した。

・マルチプレックス・リアルタイム PCR の条件下で、単一の遺伝子を増幅させ測定した場合と 2-3 種の遺伝子を同時に増幅(マルチプレックス反応)させ測定した

場合での定量性能の比較

・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場合(以下、競合と表記する)の定量性能の比較

定量試験では、各病原遺伝子陽性株のテンプレート DNA を 10 倍段階希釈して、1 濃度につき 3 対(競合試験は 1 点のみ)リアルタイム PCR で測定した。初期鋳型濃度と  $C_t$  値から検量線を作成し、各濃度における  $C_t$  値を比較した。PCR 増幅効率は次の計算式により算出した。

$E=10^{[-1/\text{slope}]} - 1$  (X 軸に初期鋳型濃度 ( $\text{Log}_{10}$ )を Y 軸に  $C_t$  値を取った場合)

また、PCR に供した菌液の濃度(cfu/ml)から、各条件下での最小検出濃度(検出限界)を算出し比較を行なった。リアルタイム PCR の感度については、プライマーおよびプローブの濃度を変えて検討し、最適濃度を設定した。

#### C. 研究結果

##### 1. プライマーおよびプローブの有用性と特異性の検討

表 1 に示した菌株についてリアルタイム PCR を行い、通常の PCR の結果と比較した。*stx1* 陽性 16 株 (*Shigella dysenteriae* 1 株を含む)、*stx2* 陽性 20 株、*eae* 陽性 35 株、*est* (STp)陽性 4 株、*est* (STh)陽性 6 株、*elt* 陽性 5 株、*aggR* 陽性 14 株、*astA* 陽性 23 株、*afaB* 陽性 6 株、*virB* 陽性 2 株については PCR 結果と一致した。また、*elt* と塩基配列が似ているとされるコレラ毒素遺伝子 *ctx* 陽性株 (*Vibrio cholerae*) 2 株はリアルタイム PCR では検出されないことを確認した。一方、*stx2* 陽性株である EC7222 はアガロース電気泳動法でリアルタイム PCR 用プライマー (H・Stx2-f/r) に

よる遺伝子の増幅は認められたが、リアルタイムPCRでは検出されず、プローブ(*Stx2-pro*)には反応を示さなかった。また、1株(05-71-3)について、PCRでは*astA*陰性だったがリアルタイムPCRでは陽性となった。

## 2. リアルタイム PCR の感度

マルチプレックス・リアルタイム PCR の至適条件を検討し、確定した(表6)。各マルチプレックス・リアルタイム PCR の検量線は、すべての遺伝子において決定係数( $R^2$ ) 0.99 以上となった(図1)。増幅効率は 78-108%であった。また、マルチプレックス反応(鋳型量の割合は 1:1)で増幅させ測定した場合においても単一の遺伝子を増幅させ測定した場合と同程度に検出および定量された(図2)。さらに競合条件下(各病原遺伝子陽性株のテンプレートを 1:1- $10^5$ :1 または  $10^6$ :1 の割合で混合)においても、すべての遺伝子について、1:1 のマルチプレックス反応と同程度に検出および定量された(図3)。検出限界値は  $3.7 \times 10^2 - 1.2 \times 10^4$  cfu/ml となり、上記のいずれの条件においても同程度の感度で検出された(表7)。

## D. 考察

純培養菌液から抽出を行なったテンプレート DNA を用いたマルチプレックス・リアルタイム PCR 法では、すべての組み合わせにおいて高い特異性と検出感度が示された。

インチミン遺伝子(*eae*)や EAST1 遺伝子(*astA*)、志賀毒素遺伝子 2 型(*stx2*)は遺伝子内にいくつかの変異型が報告されている<sup>17, 18)</sup>。*eae* や *astA*、*stx2* の各プライ

マー・プローブは様々な変異型に対応できるように、また *stx* (*Stx1*, *Stx2*)や *est* (*STp*, *STh*)についても各型を識別できるように設計されていることが望まれる。そこで、表1に示す総計 100 株の DEC を含む大腸菌およびその他の細菌についてリアルタイム PCR を行い、各プライマーおよびプローブの特異性を検討した。

*stx2* 陽性株(EC7222)はリアルタイム PCR 用プライマーには反応したものの、プローブには反応を示さなかった。他の *stx2* 陽性株がすべてリアルタイム PCR で検出可能であったことから、EC7222 の *stx2* では、プローブ *Stx2-pro* が結合する位置の塩基配列に変異が生じているものと考えられる。*Stx2* は部分的な配列の差異から *Stx2c*、*Stx2d*、*Stx2e*、*Stx2f* などのタイプに分けられ<sup>19-23)</sup>、*Stx2c* はもともとヒトからの分離が多い型である。また、*Stx2d* と分類される *Stx2<sub>vha</sub>* と *Stx2<sub>vhb</sub>* はヒトの腸粘液により毒性が増すとの報告もある<sup>24)</sup>。これらの変異型をすべてカバーできるかどうかを検討するため、De Baets らが遺伝子配列解析による系統樹作成に使用した *Stx2* の変異型(*Stx2*、*Stx2c*、*Stx2<sub>vhc</sub>*、*Stx<sub>OX3a</sub>*、*Stx<sub>OX3b</sub>*、*Stx2<sub>O111</sub>*、*Stx2<sub>O48</sub>*、*Stx2<sub>O118</sub>*)の各遺伝子について<sup>18)</sup>、本研究で作製したプライマーおよびプローブの位置に変異が含まれているかを検索したところ、すべての型において一致した。*Stx2<sub>vha</sub>* と *Stx2<sub>vhb</sub>* の塩基配列は検索できなかったが、彼らの系統樹によるとどちらも *Stx2<sub>vhc</sub>* と非常に近い系統に位置していたことから、配列の相同性も高いと推察される。実際、O157 菌株(No.01009、No.02005、No.03021)など *Stx2<sub>vha</sub>* 遺伝子のみを保有する株がリアルタイム PCR に反応を示しており、今回作製したプライマーと

プローブの有効性を確認できた。以上の成績は今回設計したプライマーおよびプローブの汎用性を支持するものであるが、De Baets らの解析では新しい型の Stx2 が見つかっており、今後出現する変異型については常に情報収集に努め、本法との適合性を検証していくことが必要である。

*astA* については、菌株 05-71-3 が PCR では陰性だったがリアルタイム PCR では陽性となった。*astA* プライマーの検索時には Yamamoto ら<sup>25)</sup>の *astA* 配列の比較を参考に、さらに GenBank から集めた *astA* 配列 (L11241, S81691, AF160995, AF160998, AF161000, AF411067, AY502963) を GENETYX-WIN によってホモロジー検索をかけ変異の箇所を特定し、変異箇所をできる限り避けて(特にプライマーの 3' 末端側に変異箇所が重ならないよう注意して)リアルタイム PCR 用のプライマー設計を行なった。通常の PCR で使用したプライマー(EAST11a, EAST11b)を変異箇所と照らし合わせてみたところ、一部の *astA* に対して forward プライマーの 3' 末端に 1 塩基の変異が見つかった(図4)。シークエンスを特定していないため、05-71-3 がそれらと同タイプの配列を有するか否かは不明だが、いずれかの変異により通常の PCR で使用しているプライマーでは検出できなかったものであり、*astA* の欠失によるものではないと判断できる。

マルチプレックス・リアルタイム PCR を可能にするため、各プライマーおよびプローブの濃度を検討した。マルチプレックス反応時に、いずれかの遺伝子増幅反応が弱かった場合にプライマーおよびプローブ濃度を高めるなどの工夫を施したところ、表6に示す濃度が最適と判断されたので、以

後のマルチプレックス・リアルタイム PCR はこの濃度条件で実施された。

これらのプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックス・リアルタイム PCR では、単一遺伝子の増幅あるいは複数遺伝子の同時増幅など、いずれの場合においても定量が可能であった。遺伝子の種類により異なるが、最低  $3.7 \times 10^2 - 1.2 \times 10^4$  cfu/ml まで検出および定量が可能であった。大腸菌検出にリアルタイム PCR を用いた過去の報告でも、培養液から直接 DNA 抽出を行なった場合では  $10^3 - 10^4$  cfu/ml が検出限界とされており<sup>26, 27)</sup>、本実験で得られた検出感度も良好なものと判断できる。また、混在する遺伝子の濃度に差のある競合的な条件においても、濃度差の無い条件下のマルチプレックス反応と同程度に検出および定量されることを確認した。マルチプレックス PCR では鋳型量やプライマー量、またはプライマーのプライミング性能に偏りが生じると、一方の遺伝子の PCR 反応に酵素反応が集中し、単一の遺伝子の増幅時に比べ DNA 増幅量が低下する場合がある。QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen GmbH)は、この点を克服する製品として開発されており、本研究でもこのキットの使用により精度の高い定量が可能となった。これまでのところ、細菌のマルチプレックス・リアルタイム PCR による定量検出では、競合条件下での検出には注意が払われていない。しかしながら、食品や糞便を検体とするとき、複数の標的となる菌がそれぞれ異なる数存在している可能性は十分に考えられ、それらとともに検出できる方法が重要であると考えられる。その意味からも、今回開発したリアルタイム PCR 条件は、実用性の高いものと期

待できる。

以上、7グループの下痢原性大腸菌を同時に網羅的に検出するリアルタイムPCR法を確立した。今後は、本法を用いて食品や家畜あるいは環境の汚染実態調査を行い、その汚染源を探る予定である。

#### E. 謝辞

実験全般を担当した大阪市立大学大学院生活科学研究科修士2回生の日高あゆみ君、貴重な菌株を提供していただきました秋田県健康環境センター微生物班 八柳潤博士ならびに大阪市立環境科学研究所微生物保健課中村寛美博士に心から厚く御礼申し上げます。

#### F. 研究発表 学会発表

日高あゆみ、渡部裕美、河村麻紀、高島浩介、西川禎一. レタスの腸管出血性大腸菌O157汚染に対する各種殺菌料の効果と適用方法の検討 第26回日本食品微生物学会学術総会 平成17年11月 金沢

#### G. 文献

- 1) Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C., and Levine, M.M. (1991) Enteraggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model, *J. Clin. Invest.*, **87**, 1450-1455.
- 2) Nishikawa, Y., Ogasawara, J., Helander, A., and Haruki, K. (1999) An outbreak of gastroenteritis in Japan due to *Escherichia coli* O166, *Emerg. Infect. Dis.*, **5**, 300.
- 3) Nishikawa, Y., Zhou, Z., Hase, A., Ogasawara, J., Kitase, T., Abe, N., Nakamura, H., Wada, T., Ishii, E., Haruki, K., and team, S. (2002) Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **55**, 183-190.
- 4) Vila, J., Gene, A., Vargas, M., Gascon, J., Latorre, C., and Jimenez de Anta, M.T. (1998) A case-control study of diarrhoea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin (EAST-1), *J. Med. Microbiol.*, **47**, 889-891.
- 5) Jinneman, K.C., Yoshitomi, K.J., and Weagant, S.D. (2003) Multiplex real-time PCR method to identify Shiga toxin genes *stx1* and *stx2* and *Escherichia coli* O157:H7/H- serotype, *Appl Environ Microbiol*, **69**, 6327-6333.
- 6) Jothikumar, N., and Griffiths, M.W. (2002) Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays, *Appl Environ Microbiol*, **68**, 3169-3171.
- 7) Sharma, V.K. (2006) Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of *rfbE* and *eae* genes of *Escherichia coli* O157:H7, *Mol Cell Probes*, **20**,

- 298-306.
- 8) Notzon, A., Helmuth, R., and Bauer, J. (2006) Evaluation of an immunomagnetic separation-real-time PCR assay for the rapid detection of *Salmonella* in meat, *J Food Prot*, **69**, 2896-2901.
  - 9) Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., and Makino, S. (2005) Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real-time PCR, *J Vet Med Sci*, **67**, 1037-1041.
  - 10) Sharma, V.K. (2002) Detection and quantification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction, *J. Food. Prot.*, **65**, 1371-1380.
  - 11) Grant, M.A., Hu, J., and Jinneman, K.C. (2006) Multiplex real-time PCR detection of heat-labile and heat-stable toxin genes in enterotoxigenic *Escherichia coli*, *J Food Prot*, **69**, 412-416.
  - 12) Fukushima, H., Tsunomori, Y., and Seki, R. (2003) Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools, *J Clin Microbiol*, **41**, 5134-5146.
  - 13) Bischoff, C., Luthy, J., Altwegg, M., and Baggi, F. (2005) Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR, *J Microbiol Methods*, **61**, 335-341.
  - 14) Le Bouguenec, C., Lalioui, L., Du Merle, L., Jouve, M., Courcoux, P., Bouzari, S., Selvarangan, R., Nowicki, B.J., Germani, Y., Andremont, A., Gounon, P., and Garcia, M.I. (2001) Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of *afa* adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 1738-1745.
  - 15) Paton, A.W., and Paton, J.C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, and *rfb*<sub>O157</sub>, *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 598-602.
  - 16) 伊藤文明、荻布武雄、伊藤健一郎、渡辺治雄。(1992) 混合プライマーを用いたPCRによる下痢原性大腸菌の病原遺伝子の同時検出法, *日本臨床*, **50**, 343-347.
  - 17) Blanco, M., Schumacher, S., Tasara, T., Zweifel, C., Blanco, J.E., Dahbi, G., Blanco, J., and Stephan, R. (2005) Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-eta2*), *BMC Microbiol*, **5**, 23.
  - 18) De Baets, L., Van der Taelen, I., De Filette, M., Pierard, D., Allison, L., De Greve, H., Hernalsteens, J.P., and Imberechts, H. (2004) Genetic typing of shiga toxin 2 variants of *Escherichia coli* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, *Appl Environ*

- Microbiol, **70**, 6309–6314.
- 19) Paton, A.W., Bourne, A.J., Manning, P.A., and Paton, J.C. (1995) Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons, *Infect. Immun.*, **63**, 2450–2458.
- 20) Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., and Lauwers, S. (1998) Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates, *J Clin Microbiol*, **36**, 3317–3322.
- 21) Schmitt, C.K., McKee, M.L., and O'Brien, A.D. (1991) Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H negative strain E32511, *Infection And Immunity*, **59**, 1065–1073.
- 22) Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., and Karch, H. (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons, *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1205–1208.
- 23) Weinstein, D.L., Jackson, M.P., Samuel, J.E., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D. (1988) Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine, *J Bacteriol*, **170**, 4223–4230.
- 24) Melton Celsa, A.R., Darnell, S.C., and O'Brien, A.D. (1996) Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice, *Infect Immun*, **64**, 1569–1576.
- 25) Yamamoto, T., Wakisaka, N., Sato, F., and Kato, A. (1997) Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **147**, 89–95.
- 26) Ibekwe, A.M., Watt, P.M., Grieve, C.M., Sharma, V.K., and Lyons, S.R. (2002) Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands, *Appl Environ Microbiol*, **68**, 4853–4862.
- 27) Hsu, C.F., Tsai, T.Y., and Pan, T.M. (2005) Use of the duplex TaqMan PCR system for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157, *J Clin Microbiol*, **43**, 2668–2673.

表1. 使用菌株

菌種	グループ	菌株	血清型	保有病原遺伝子
<sup>a</sup> 1 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	E2348/69	O127:H6	<i>eae</i>
2 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	V- 121	O55:H7	<i>eae</i>
3 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	V- 139	O63:HUT	<i>eae</i>
4 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	V- 145	OUT:HUT	<i>eae</i>
5 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	V- 146	O119:H2	<i>eae</i>
6 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	V- 148	O153:H7	<i>eae</i>
7 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	V- 189	OUT:HUT	<i>eae</i>
8 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	V- 241	O119:HUT	<i>eae</i>
9 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	51- 4	O153:H19	<i>eae</i>
10 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	62R 530	O157	<i>eae</i>
11 <i>Escherichia coli</i>	EPEC	V- 228	O153:HUT	<i>eae</i>
<sup>a</sup> 12 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	99- 140- A (99- 26)	O111	<i>stx1, eae</i>
<sup>a</sup> 13 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	V- 831	O157	<i>stx2, eae</i>
14 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	E54617/1	O111ac	<i>stx1, eae</i>
15 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	E45035	O111:H-	<i>stx1, eae</i>
16 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	E28333	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae</i>
17 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	E32511	O157	<i>stx2, stx2vha, eae</i>
18 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	E33910	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae</i>
19 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	E78141	O157	<i>stx2, eae</i>
20 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	62R 535	O157	<i>stx2, eae</i>
21 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	V- 59	O111:H-	<i>stx1, eae</i>
22 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	V- 122	O26:H11	<i>stx1, eae</i>
23 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	V- 131	OUT:HUT	<i>stx2, eae</i>
24 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	V- 785	O157	<i>stx2, eae</i>
25 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	V- 687 · 1	O157	<i>stx1, stx2, eae</i>
26 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	V- 438	O157	<i>stx1, stx2, eae</i>
27 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	V- 424	O157	<i>stx1, stx2, eae</i>
28 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	STEC No.9	O157	<i>stx2, eae</i>
29 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	STEC No.14	O157	<i>stx2, eae</i>
30 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	STEC No.21	O157	<i>stx2, eae</i>
31 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	96- 98- 83 (sakai)	O157	<i>stx1, stx2, eae</i>
32 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	No.0001	O157	<i>stx1, stx2vha, eae</i>
33 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	No.01009	O157	<i>stx2vha, eae</i>
34 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	No.02005	O157:H7	<i>stx2vha, eae</i>
35 <i>Escherichia coli</i>	EHEC	No.03021	O157:H7	<i>stx2vha, eae</i>
<sup>b</sup> 36 <i>Escherichia coli</i>	STEC	EC7222	O8:H19	<i>stx2</i>
<sup>ab</sup> 37 <i>Escherichia coli</i>	STEC	EC7225	O91:HUT	<i>stx1</i>
<sup>b</sup> 38 <i>Escherichia coli</i>	STEC	EC8158	O112ac	<i>stx1, stx2</i>
<sup>b</sup> 39 <i>Escherichia coli</i>	STEC	EC8211	O74:H52	<i>stx1</i>
<sup>ab</sup> 40 <i>Escherichia coli</i>	STEC	EC8212	O48:H45	<i>stx2</i>
41 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	H10407	O78:H11	<i>est (STp), elt</i>
<sup>c</sup> 42 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	05- 71- 3	O159	<i>est (STh)</i>
<sup>c</sup> 43 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	05- 71- 1	O169:H41	<i>est (STp)</i>
<sup>a</sup> 44 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	E7476	O166:H27	<i>est (STh)</i>
<sup>ac</sup> 45 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	97- 245- 244	O27	<i>est (STp)</i>
<sup>a</sup> 46 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	E5798	O7:H18	<i>elt</i>
47 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	V- 27	O6:H16	<i>est (STh), elt</i>
48 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	V- 80	O6:H16	<i>est (STh), elt</i>
49 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	V- 96	O25:H-	<i>est (STh)</i>
<sup>c</sup> 50 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	00- 69- 1	O169	<i>est (STp)</i>

続・表1.

菌種	グループ	菌株	血清型	保有病原遺伝子
51 <i>Escherichia coli</i>	ETEC	ETEC1	O6:H16	<i>est</i> (STh), <i>elt</i>
52 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	14- 24		<i>aggR</i>
53 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	90- 8- 12		<i>aggR</i>
54 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	No.661		<i>aggR</i>
55 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	No.186		<i>aggR</i>
<sup>a</sup> 56 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	E59152	O92:H33	<i>aggR</i>
57 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	E58595	O92:H33	<i>aggR</i>
58 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	E59149		<i>aggR</i>
59 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	E60725	O92:H33	<i>aggR</i>
60 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	E62243		<i>aggR</i>
61 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	V- 196	OUT:HUT	<i>aggR</i>
62 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	V- 343	O126	<i>aggR</i>
63 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	V- 88	O126:HUT	<i>aggR</i>
64 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	V- 546	OUT	<i>aggR</i>
65 <i>Escherichia coli</i>	EAggEC	V- 635B	O15	<i>aggR</i>
66 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	V- 255	O166	<i>astA</i>
67 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	V- 471	O166	<i>astA</i>
68 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	EAST1EC No.17	OUT	<i>astA</i>
69 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	EAST1EC No.21	OUT	<i>astA</i>
70 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	EAST1EC No.42	OUT	<i>astA</i>
71 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	EAST1EC No.49	O8	<i>astA</i>
<sup>a</sup> 72 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	96- 127- 23	O166:H15	<i>astA</i>
73 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	00- 39- 102	OUT	<i>astA</i>
74 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	00- 39- 129	O143	<i>astA</i>
75 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	00- 39- 131	O143	<i>astA</i>
76 <i>Escherichia coli</i>	EAST1EC	54- 2	O28:H21	<i>astA</i>
77 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 1	OUT:H4	<i>afa/Dr+</i>
78 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 3	OUT:H-	
79 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 226	OUT	
80 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 338	O126	
<sup>a</sup> 81 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 64	O1:H4	<i>afa/Dr+</i>
82 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 19	OHT:H4	<i>afa/Dr+</i>
83 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 36	OUT:H18	<i>afa/Dr+</i>
84 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 205	O143:H4	<i>afa/Dr-</i>
85 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 242	OUT	<i>afa/Dr+</i>
86 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 289	OUT	<i>afa/Dr+</i>
87 <i>Escherichia coli</i>	DAEC	V- 9	O18:H-	
<sup>a</sup> 88 <i>Escherichia coli</i>	EIEC	E35990	O143:H-	<i>invE</i>
89 <i>Escherichia coli</i>	Unknown	V- 17		
90 <i>Escherichia coli</i>	Unknown	64- 3	O1	
91 <i>Escherichia coli</i>	Unknown	34- 4	O44:H11	
92 <i>Escherichia coli</i>	Unknown	63- 2	O20:H41	
93 <i>Escherichia coli</i>	Unknown	V- 44		
94 <i>Escherichia coli</i>	Unknown	V- 45		
95 <i>Escherichia coli</i>	Unknown	V- 46		
96 <i>Escherichia coli</i>	Unknown	HN1	OUT	
97 non- <i>E. coli</i>		V- 119		
<sup>c</sup> 98 <i>Shigella dysenteriae</i>		05030063	1	<i>stx1</i>
<sup>c</sup> 99 <i>Vibrio cholerae</i>		#481328	Ogawa	<i>ctx</i>
<sup>c</sup> 100 <i>Vibrio cholerae</i>		97- VC	Ogawa	<i>ctx</i>

<sup>a</sup> 検量線用陽性対照

<sup>b</sup> 秋田県健康環境センター 微生物班 八柳潤先生より分与

<sup>c</sup> 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課 中村寛美先生より分与

表2. マルチプレックスPCR用プライマー

標的遺伝子	プライマー	塩基配列 (5' - - - 3')	Tm値 <sup>a</sup>	アンプリコンサイズ (bp)	参考文献
<i>invE</i>	ECMix <i>invE</i> - f	ATATCTCTATTTTCCAATCGCGT	53.6	382	(25)
	ECMix <i>invE</i> - r	GATGGCGAGAAATATATCCCG	58.5		
	ECMix <i>Stx</i> - f	TTTACGATAGACTTCTCGAC	45.9		
<i>stx</i>	ECMix <i>Stx</i> - r	CACATATAAATTTATTCGCTC	46.3	228	(25)
	ECMix <i>LT</i> - f	AGCAGGTTTCCACCAGGATCACCA	70.1		
<i>elt</i>	ECMix <i>LT</i> - r	GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	53.3	132	(25)
	ECMix <i>ST</i> - f	TTTATTTCTGTATTTGCTTTT	40.7		
<i>est</i>	ECMix <i>ST</i> - r	ATTACAACACAGTTTCACAG	41.6	171	(25)
	eaeAF	GACCCGGCACAAAGCATAAGC	62.4		
<i>eaeA</i>	eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	60.4	384	(47)
	<i>aggRks</i> - 1 (eaggRF)	GTATACACAAAAGGAAAGC	47.5		
<i>aggR</i>	<i>aggRKas2</i> (eaggRR)	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	55.0	254	(31)
	<i>afa</i> - f	CGGCTTTTCTGCTGAACCTGGCAGG	71.1		
<i>afaC</i>	<i>afa</i> - r	CCGTCAGCCCCACCGCAGACC	74.2	672	(33)
	<i>astA</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA	52.2		
	EAST11 - b	GGTCGGAGTGACGGCTTTGT	69.3	111	(70)

<sup>a</sup> Tm値は最近接塩基対法により算出した。

表3. EC mix

プライマーおよび試薬	使用量	最終濃度
<i>invE</i> -f, <i>invE</i> -r, <i>stx</i> -f, <i>stx</i> -r, <i>ST</i> -r	各 2 $\mu$ l	2.5 $\mu$ M
<i>ST</i> -f	8 $\mu$ l	10 $\mu$ M
<i>LT</i> -f, <i>LT</i> -r	各 1 $\mu$ l	1.25 $\mu$ M
TE	20 $\mu$ l	
計	40 $\mu$ l	

表4. リアルタイムPCR用プライマー

標的遺伝子	プライマー	塩基配列 (5' - - - 3')	Tm 値 <sup>a</sup>	アムプライコンサイズ (bp)	GenBank ID No.
<i>stx1</i>	Stx1-414f	ACTTCTCGACTGCAAAAGACGTATG	58.6	132	M16625
	Stx1-545r	ACAAAATTATCCCTGAGCCACTATC	59.6		
<i>stx2</i>	H·Stx2-f	CCACAATCGGTGCTGTTATTAACC	58.4	93	X07865
	H·Stx2-r	GGTCAAAAACGCGCTGATAG	59.3		
<i>eae</i>	eae-f	CCGATTCCTCTGTGACGA	58.2	105	AF200363
	eae-r	CCACGGTATTATCAAACTGATAACG	58.5		
<i>est (STp)</i>	STp-f	CTTCCCTCTTTTGTAGTCAACT	58.5	137	M25607
	STp-r	GCAGTAAAATGTGTTGTTTCATATTTTCTG	59.4		
<i>est (STh)</i>	STh-f	CCYTCGCTCAGGATGCTAAAC	59.0	128	AY342058
	STh-r	CAGTAATTGCTACTATTTCATGCTTTCAG	57.9		
<i>elt</i>	H·LT-f	TTCCACCGGATCACC	59.2	62	V00275
	H·LT-r	CAACCTGTGGTGCATGATGA	59.0		
<i>aggR</i>	aggR333-f	CAGCGATACATTAAGACGCCAAAG	59.4	116	Z18751
	aggR448-r	CGTCAGCATCAGCTACAATTATTCC	60.0		
<i>astA</i>	astA61-f	ATGCCATCAACACAGTATATCCG	57.5	111	L11241
	astA171-r	CGCGAGTGACGGCTTTGTA	59.6		
<i>virB</i>	virB-f	GGATTTGTGCAACGACITGTTAAG	58.8	109	AF283289
	virB-r	GAGGAATCTTGGCTTTGATAAAGG	58.4		
<i>afaB</i>	afaB49-f	GTCCTCCTGAATGTACAGCTTTCA	58.4	112	AF329316
	afaB160-r	CCCTCTGCCACTCCACCTT	58.7		

<sup>a</sup> Tm 値は最近接塩基対法により算出した。

表5. リアルタイムPCR用プローブ

標的遺伝子	プローブ	塩基配列 (5' - - - 3')	リポーター	クエンチャー	T <sub>m</sub> 値 <sup>a</sup>	GenBank ID No.	
<i>stx1</i>	H-Stx1-pro	2plex	TGAATGTCATTCGCTCTGCAATAGGTACTCC	FAM	TAMRA	68	M16625
<i>stx2</i>	Stx2-pro <sup>b</sup>	2plex	CAGTTATTTTGCTGTGGATATAACGAGGGCTTG	VIC	TAMRA	68	X07865
<i>stx1</i>	Stx1 MGB-pro	3plex	CTCTGCAATAGGTACTCCA	VIC	MGB-NFQ	68	M16625
<i>stx2</i>	Stx2 MGB-pro	3plex	TTGCTGTGGATATACGAGG	VIC	MGB-NFQ	69	X07865
<i>eae</i>	<i>eae</i> -pro	3plex	CGTCATGTTACGGGTAA	FAM	MGB-NFQ	69	AF200363
<i>est</i> (STp)	STp-pro	2,3plex	TGACTCTTCAAAAAGAGAAAA	FAM	MGB-NFQ	69	M25607
<i>est</i> (STh)	STh2-pro	2plex	CACTAGAATCAAAAAAATGTAAC	VIC	MGB-NFQ	69	AY342058
<i>est</i> (STh)	STh FAM-pro	3plex	CACTAGAATCAAAAAAATGTAAC	FAM	MGB-NFQ	69	AY342058
<i>elt</i>	LT-pro	3plex	CTTGGAGAGAAGAACCCCT	VIC	MGB-NFQ	70	V00275
<i>aggR</i>	<i>aggR</i> -pro	2plex	CTTGCAGTTGTCCGAATT	FAM	MGB-NFQ	70	Z18751
<i>astA</i>	<i>astA</i> -pro	2plex	CATCCAGTTATGCATCGTG	VIC	MGB-NFQ	69	L11241
<i>virB</i>	<i>virB</i> -pro	2plex	CACTCCATTCCTGGTAATAA	FAM	MGB-NFQ	69	AF283289
<i>afaB</i>	<i>afaB</i> -pro	2plex	TCAAGCTGTTTGTTCGTC	VIC	MGB-NFQ	69	AF329316

<sup>a</sup> T<sub>m</sub>値は最近接塩基対法により算出した (MGBプローブを除く)。

<sup>b</sup> 参考文献(21), 他はすべて本研究で設計した。

表6. マルチプレックス・リアルタイムPCRのプライマーおよびプローブの濃度条件

	プライマー	使用量 (μl)	最終濃度 (μM)	プローブ	使用量 (μl)	最終濃度 (μM)
Stx/Intimin	stx1 414- f/545- r	0.2	0.2	Stx1MGB- pro	2.5	0.1
	H · stx2- f/r	0.2	0.2	Stx2MGB- pro	2.5	0.1
	H · eae- f/r	0.2	0.2	eae- pro	2.5	0.1
Stx1/Stx2	stx1 414- f/545- r	0.2	0.2	H · Stx1- pro	2.5	0.1
	H · stx2- f/r	0.5	0.5	Stx2- pro	5	0.2
ST/LT	STp- f/r	0.4	0.4	STp- pro	3	0.12
	STh- f/r	0.5	0.5	STh FAM- pro	2.5	0.1
	LT- f/r	0.1	0.1	LT- pro	2.5	0.1
STp/STh	STp- f/r	0.1	0.1	STp- pro	2.5	0.1
	STh- f/r	0.5	0.5	STh2- pro	2.5	0.1
aggR/astA	aggR333- f/448- r	0.3	0.3	aggR- pro	2	0.08
	astA61- f/171- r	0.4	0.4	astA- pro	5	0.2
virB/afaB	virB- f/r	0.3	0.3	virB- pro	2	0.08
	afaB49- f/160- r	0.4	0.4	afaB- pro	5	0.2

表7. PCR (a)およびリアルタイムPCR (b)における各条件下での検出限界値

(a)

		PCR (cfu/ml) <sup>a</sup>									
		<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	<i>sggR</i>	<i>astA</i>	<i>invE</i>	<i>afaC</i>		
単一プレート	4.0- 8.5_10 <sup>6</sup>	1.2- 1.6_10 <sup>5</sup>	4.0- 8.5_10 <sup>5</sup>	4.0- 8.5_10 <sup>5</sup>	4.0- 8.5_10 <sup>5</sup>	1.2- 1.6_9.2_10 <sup>1</sup> -	4.0- 8.5_9.2_10 <sup>5</sup> -	4.0- 8.5_10 <sup>5</sup>	4.0- 8.5_9.2_10 <sup>5</sup> -	1.7_10 <sup>6</sup>	1.7_10 <sup>6</sup>
競合条件下	3.2- 6.8_10 <sup>6</sup>	9.6_10 <sup>6</sup> - 1.3_10 <sup>7</sup>	3.2- 6.8_10 <sup>6</sup>	3.2- 6.8_10 <sup>6</sup>	1.6- 3.4_1.9- 2.6_2.9- 5.4_3.2- 6.8_3.7- 6.8_10 <sup>7</sup> -	1.6- 3.4_1.9- 2.6_2.9- 5.4_3.2- 6.8_3.7- 6.8_10 <sup>7</sup> -	1.6- 3.4_1.9- 2.6_2.9- 5.4_3.2- 6.8_3.7- 6.8_10 <sup>7</sup> -	1.6- 3.4_1.9- 2.6_2.9- 5.4_3.2- 6.8_3.7- 6.8_10 <sup>7</sup> -	1.6- 3.4_1.9- 2.6_2.9- 5.4_3.2- 6.8_3.7- 6.8_10 <sup>7</sup> -	1.6- 3.4_1.9- 2.6_2.9- 5.4_3.2- 6.8_3.7- 6.8_10 <sup>7</sup> -	1.6- 3.4_1.9- 2.6_2.9- 5.4_3.2- 6.8_3.7- 6.8_10 <sup>7</sup> -

<sup>a</sup> cfu=colony forming unit

※法橋の卒業論文より転載

(b)

		リアルタイムPCR (cfu/ml) <sup>a</sup>									
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>est</i> (STP)	<i>est</i> (STH)	<i>elt</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>virB</i>	<i>afaB</i>
単一プレート (2plex)	1.1_10 <sup>4</sup> 1.0_10 <sup>4</sup> (1.6_10 <sup>3</sup> ) (1.8_10 <sup>3</sup> )	1.1_10 <sup>3</sup> (1.1_10 <sup>1</sup> ) (1.2_10 <sup>1</sup> )	1.1_10 <sup>3</sup> (1.1_10 <sup>1</sup> ) (1.2_10 <sup>1</sup> )	1.1_10 <sup>4</sup> 1.2_10 <sup>4</sup> (1.1_10 <sup>1</sup> ) (1.2_10 <sup>1</sup> )	1.1_10 <sup>4</sup> 1.2_10 <sup>4</sup> (1.1_10 <sup>1</sup> ) (1.2_10 <sup>1</sup> )	1.1_10 <sup>4</sup> 1.2_10 <sup>4</sup> (1.1_10 <sup>1</sup> ) (1.2_10 <sup>1</sup> )	1.1_10 <sup>4</sup> 1.2_10 <sup>4</sup> (1.1_10 <sup>1</sup> ) (1.2_10 <sup>1</sup> )	1.2_10 <sup>3</sup> 1.3_10 <sup>3</sup> (1.2_10 <sup>1</sup> ) (1.3_10 <sup>1</sup> )	1.3_10 <sup>3</sup> 1.3_10 <sup>3</sup> (1.3_10 <sup>1</sup> ) (1.3_10 <sup>1</sup> )	8.5_10 <sup>3</sup> 8.5_10 <sup>3</sup> (8.5_10 <sup>1</sup> ) (8.5_10 <sup>1</sup> )	7.3_10 <sup>2</sup> 7.3_10 <sup>2</sup> (7.3_10 <sup>1</sup> ) (7.3_10 <sup>1</sup> )
マルチプレックス反応 (2plex)	5.5_10 <sup>3</sup> 5.0_10 <sup>3</sup> (8.0_10 <sup>2</sup> ) (9.0_10 <sup>2</sup> )	5.5_10 <sup>2</sup> 5.5_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (5.5_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>2</sup> 5.5_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (5.5_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>3</sup> 6.0_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (6.0_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>3</sup> 6.0_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (6.0_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>3</sup> 6.0_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (6.0_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>3</sup> 6.0_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (6.0_10 <sup>1</sup> )	6.0_10 <sup>2</sup> 6.5_10 <sup>2</sup> (6.0_10 <sup>1</sup> ) (6.5_10 <sup>1</sup> )	6.5_10 <sup>2</sup> 6.5_10 <sup>2</sup> (6.5_10 <sup>1</sup> ) (6.5_10 <sup>1</sup> )	4.2_10 <sup>3</sup> 4.2_10 <sup>3</sup> (4.2_10 <sup>1</sup> ) (4.2_10 <sup>1</sup> )	3.7_10 <sup>2</sup> 3.7_10 <sup>2</sup> (3.7_10 <sup>1</sup> ) (3.7_10 <sup>1</sup> )
競合条件下	5.5_10 <sup>3</sup> 5.0_10 <sup>3</sup> 8.0_10 <sup>2</sup> 9.0_10 <sup>2</sup>	5.5_10 <sup>2</sup> 5.5_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (5.5_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>2</sup> 5.5_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (5.5_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>3</sup> 6.0_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (6.0_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>3</sup> 6.0_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (6.0_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>3</sup> 6.0_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (6.0_10 <sup>1</sup> )	5.5_10 <sup>3</sup> 6.0_10 <sup>3</sup> (5.5_10 <sup>1</sup> ) (6.0_10 <sup>1</sup> )	6.0_10 <sup>2</sup> 6.0_10 <sup>2</sup> (6.0_10 <sup>1</sup> ) (6.0_10 <sup>1</sup> )	6.5_10 <sup>2</sup> 6.5_10 <sup>2</sup> (6.5_10 <sup>1</sup> ) (6.5_10 <sup>1</sup> )	4.2_10 <sup>3</sup> 4.2_10 <sup>3</sup> (4.2_10 <sup>1</sup> ) (4.2_10 <sup>1</sup> )	3.7_10 <sup>2</sup> 3.7_10 <sup>2</sup> (3.7_10 <sup>1</sup> ) (3.7_10 <sup>1</sup> )

<sup>a</sup> cfu=colony forming unit

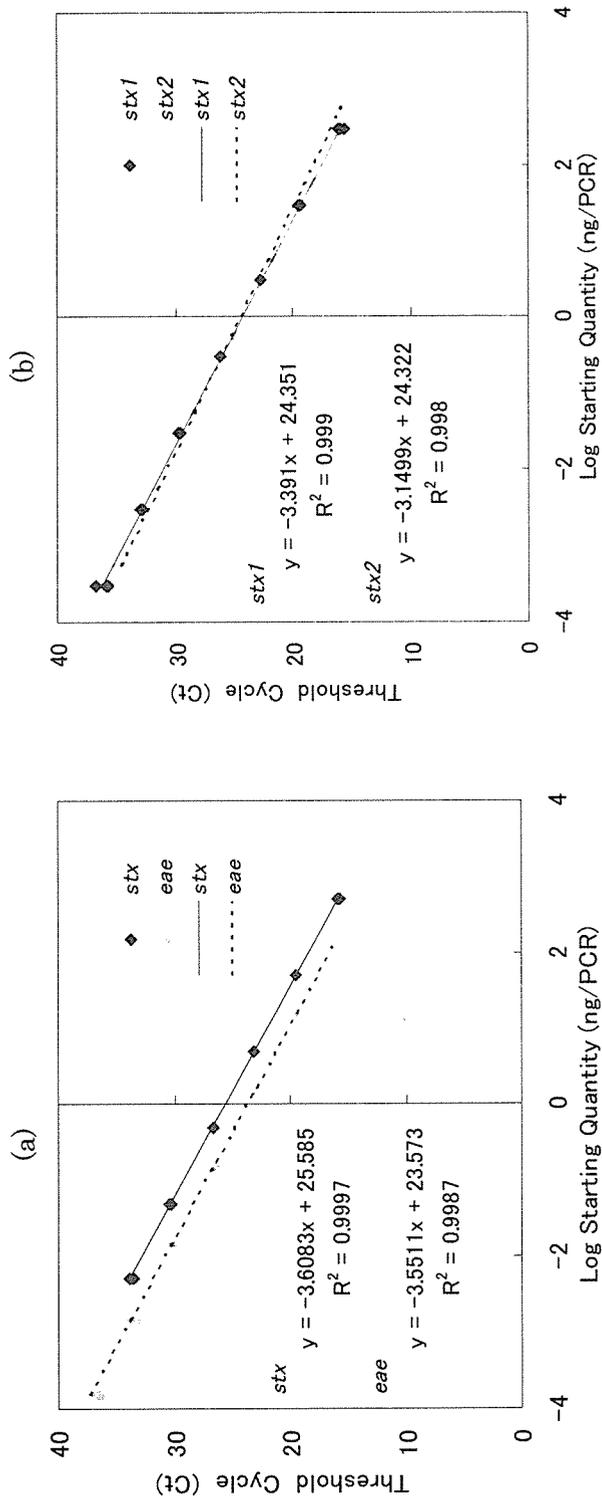


図1-1. 各マルチプレックス・リアルタイムPCRによる検量線

(a) *stx* (Stx1, Stx2)と *eae* の 3plex, (b) *stx1* と *stx2* の 2plex  
 $E=0.89$  (*stx*),  $0.91$  (*eae*),  $0.97$  (*stx1*),  $1.08$  (*stx2*)

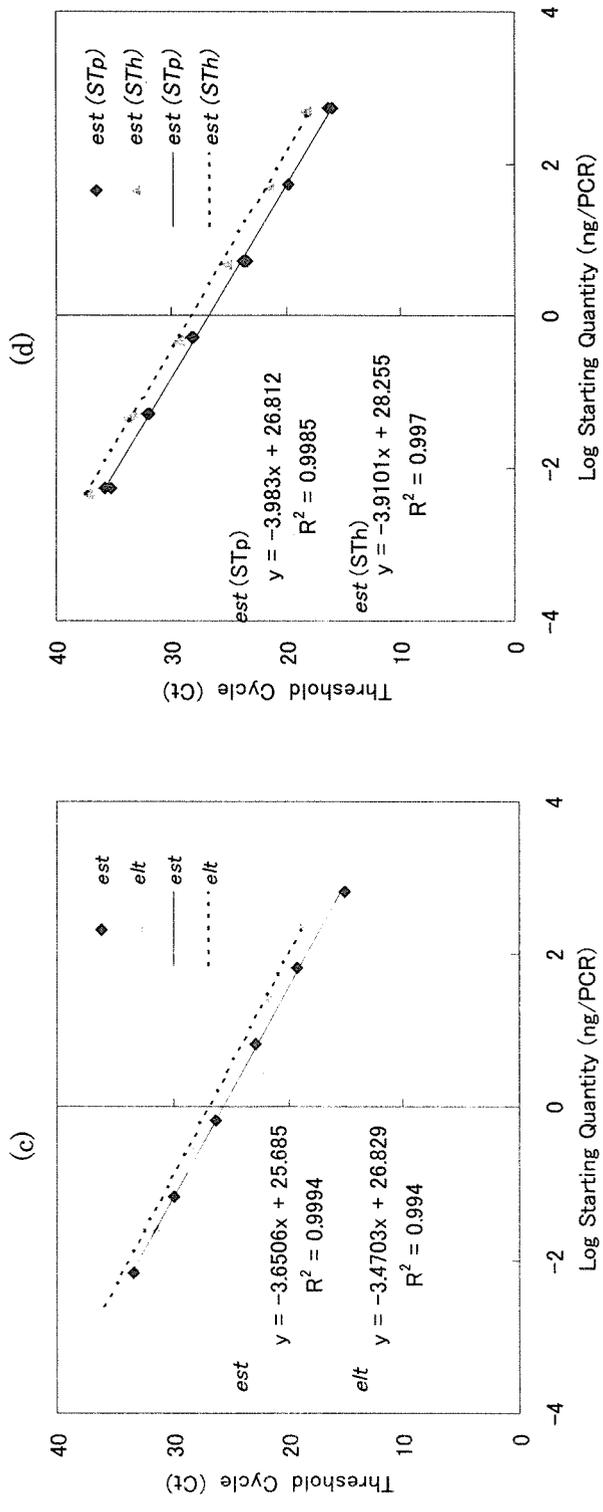


図1-2. 各マルチプレックス・リアルタイムPCRによる検量線

(c)est (STp, STh)と elt の 3plex, (d)est (STp)と est (STh)の 2plex

E=0.87 (est), 0.94 (elt), 0.78 (est (STp)), 0.80 (est (STh))

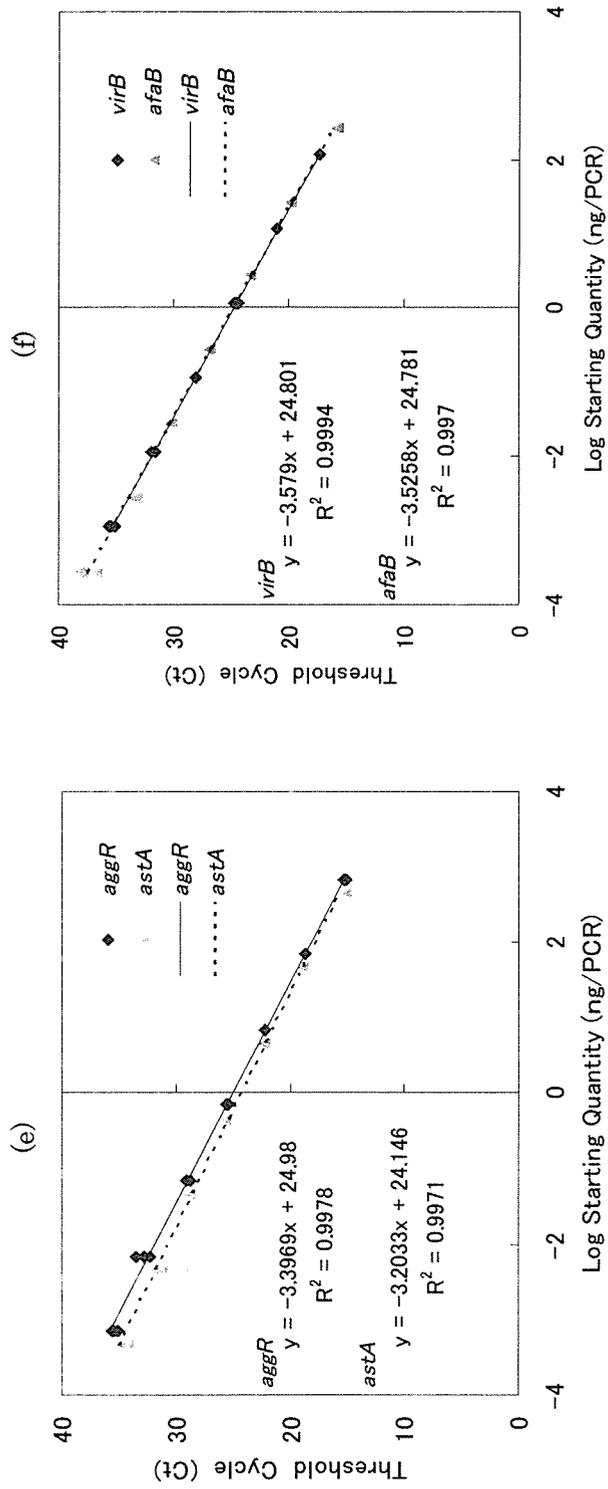


図1-3. 各マルチプレックス・リアルタイムPCRによる検量線

(e)*aggR*と*astA*の2plex, (f)*virB*と*afaB*の2plex

E=0.97 (*aggR*), 1.05 (*astA*), 0.90 (*virB*), 0.92 (*afaB*)

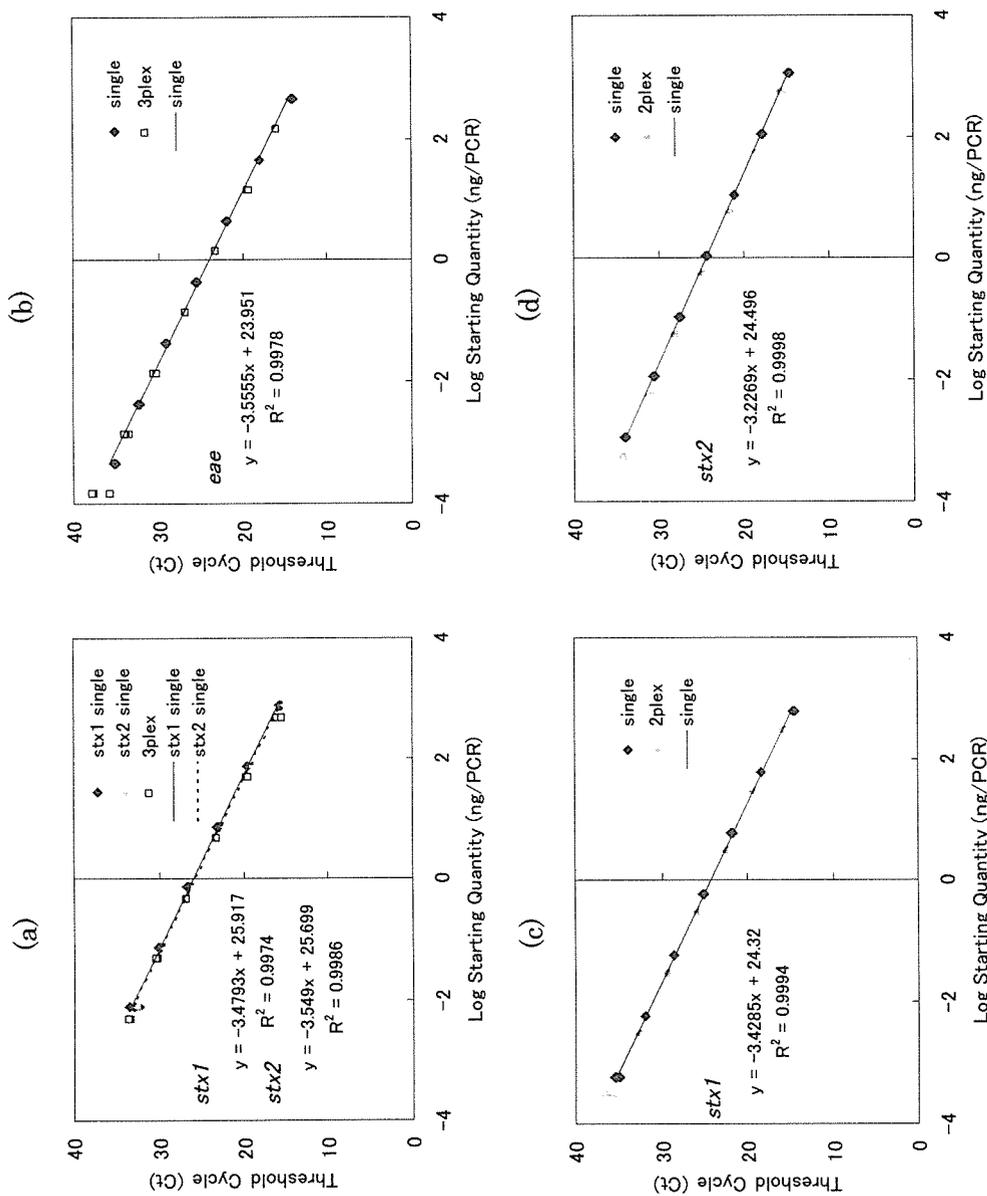


図2-1. 単一(single)の遺伝子増幅時とマルチプレックス(duplex, triplex)増幅時の検量線

*stx* (*Stx1*, *Stx2*)と *eae* の triplex 反応における(a)*stx*, (b)*eae*

*stx1* と *stx2* の duplex 反応における(c)*stx1*, (d)*stx2*

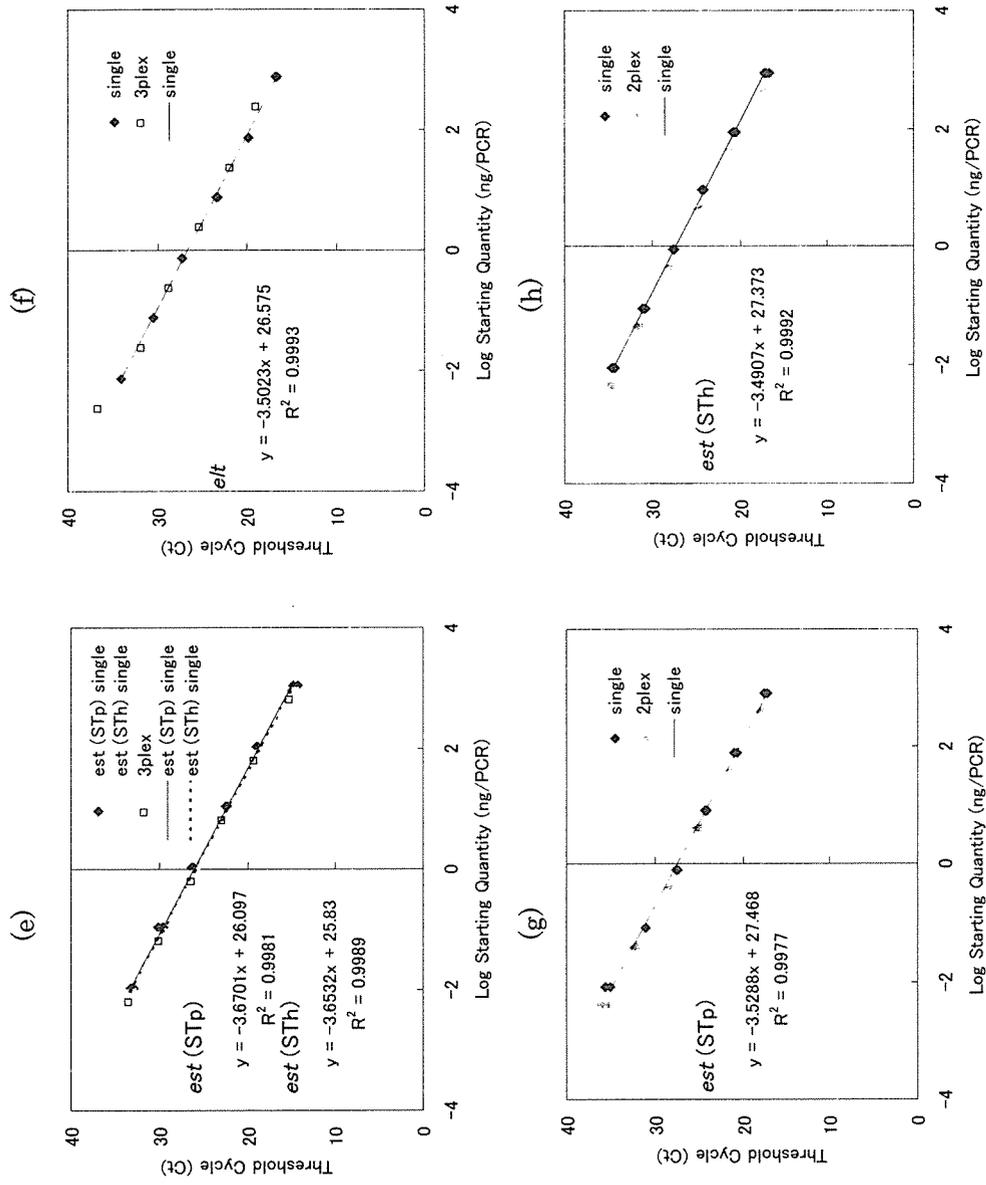


図2-2. 単一(single)の遺伝子増幅時とマルチプレックス(duplex, triplex)増幅時の検量線

est (STp, STh)と elt の triplex 反応における(e)est, (f)elt

est (STp)と est (STh)の duplex 反応における(g)est (STp), (h) est (STh)

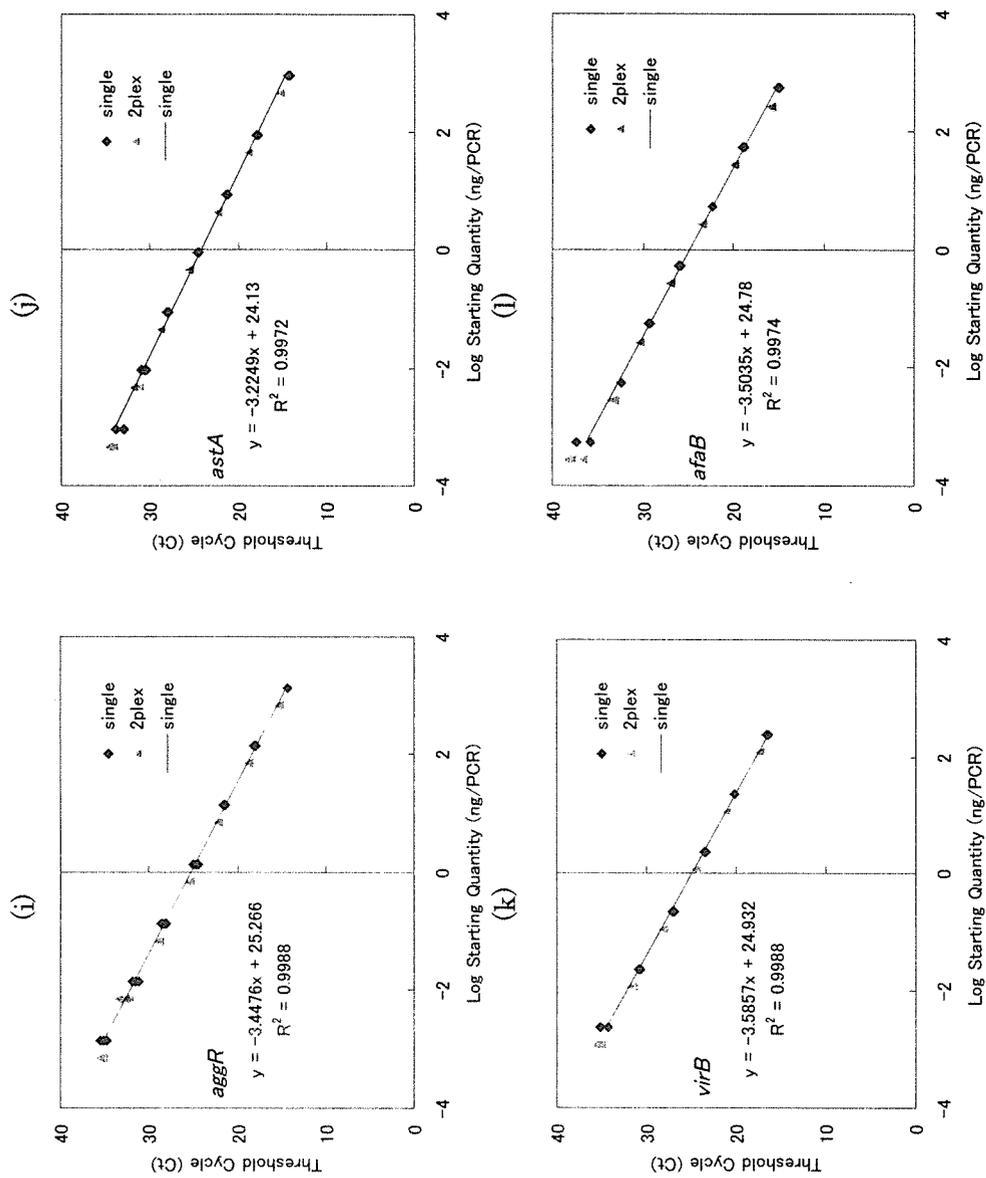


図2-3. 単一(single)の遺伝子増幅時とマルチプレックス(duplex)増幅時の検量線

*aggR*と*astA*のduplex反応における(i)*aggR*, (j)*astA*

*virB*と*afaB*のduplex反応における(k)*virB*, (l)*afaB*

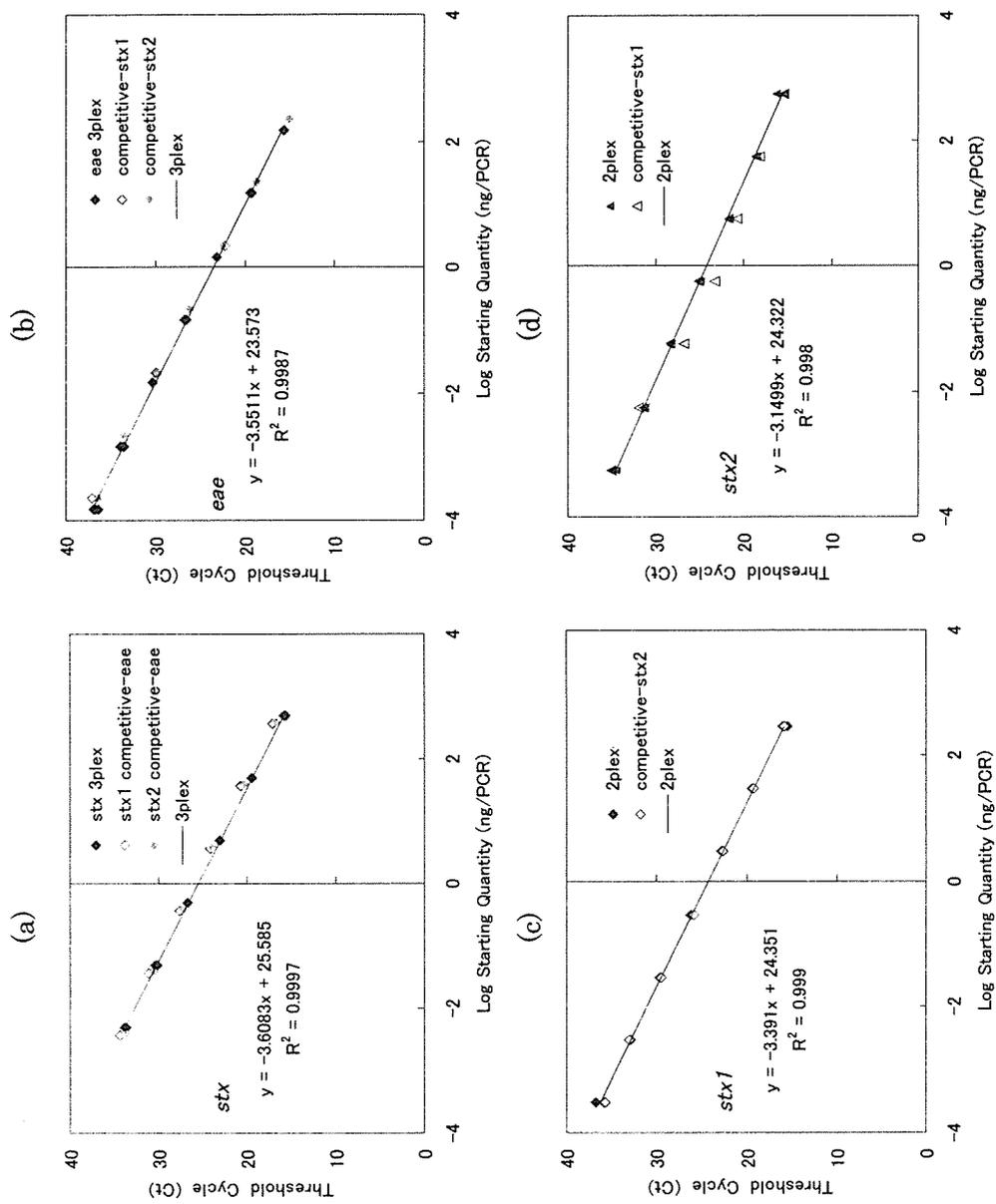


図3-1. マルチプレックス(2,3plex)増幅時と競合条件下(competitive, -以降は対立遺伝子を表す)増幅時の検量線

*stx* (Stx1, Stx2)と *eae* の triplex 反応における(a)*stx*, (b)*eae*

*stx1* と *stx2* の duplex 反応における(c)*stx1*, (d)*stx2*