

表 1. 腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子型, 毒素産生性およびリボタイピングによる分類

菌株番号	リボタイプ番号	血清型	タカラPCR キットによる VT型	リボグループ	RPLA による VT1検出 (力価)	RPLA による VT2検出 (力価)	stx1 遺伝子型	stx2 遺伝子型
No.106	422-13-S-8	O111	1&2	ECORI 422-9-S-2			A	A
No.107	422-14-S-1	O111	1	ECORI 422-14-S-1			A	
No.16	422-9-S-2	O111H+	1&2	ECORI 422-9-S-2			A	A
No.17	422-9-S-3	O114H19	2	ECORI 422-9-S-3				C
No.20	422-9-S-4	O128H2	1&2	ECORI 422-9-S-4				
No.108	422-14-S-2	O152	1	ECORI 422-9-S-4			C	
No.121	422-15-S-5	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.123	422-15-S-7	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.124	422-15-S-8	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.128	422-16-S-2	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.129	422-16-S-5	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.132	422-16-S-8	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.133	422-17-S-1	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.135	422-17-S-3	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.138	422-17-S-6	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.140	422-17-S-8	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.144	422-18-S-4	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.145	422-18-S-5	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.146	422-18-S-6	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.147	422-18-S-7	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.148	422-18-S-8	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.149	422-19-S-1	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.150	422-19-S-2	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.151	422-19-S-3	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.153	422-19-S-5	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.154	422-19-S-6	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.155	422-19-S-7	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.156	422-19-S-8	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.159	422-20-S-3	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.161	422-20-S-5	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.162	422-20-S-6	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.163	422-20-S-7	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.166	422-21-S-2	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	4	A	A
No.170	422-21-S-6	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.174	422-22-S-2	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.192	422-24-S-4	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.193	422-24-S-5	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.194	422-24-S-6	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.131	422-16-S-7	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	—	A	G
No.122	422-15-S-6	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	—	A	H
No.139	422-17-S-7	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	16	A	H
No.141	422-18-S-1	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	—	A	H
No.143	422-18-S-3	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	16	A	H
No.160	422-20-S-4	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	H-1
No.168	422-21-S-4	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	—	A	I
No.125	422-16-S-1	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	—	A	J
No.195	422-24-S-7	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	—	128	A	H
No.169	422-21-S-5	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	—	—	A	K
No.130	422-16-S-6	O157	1&2	ECORI 422-18-S-6	—	—	A	L
No.176	422-22-S-4	O157	1&2	ECORI 422-22-S-4	—	—	A-1	F
No.127	422-16-S-3	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	4	A-2	A
No.137	422-17-S-5	O157	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	4	A-3	H-1
No.152	422-19-S-4	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A-4	A
No.134	422-17-S-2	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	B	C
No.136	422-17-S-4	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	32	B	C
No.157	422-20-S-1	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	B	C
No.158	422-20-S-2	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	B	C
No.167	422-21-S-3	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	B	C
No.128	422-16-S-4	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	8	B	H
No.142	422-18-S-2	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	—	B	H
No.164	422-20-S-8	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	4	B	H
No.165	422-21-S-1	O157	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	—	B	H
No.175	422-22-S-3	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		A
No.178	422-22-S-6	O157	2	ECORI 422-9-S-5	—	64		A
No.180	422-22-S-8	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		A

表1. 腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子型, 毒素産生性およびリボタイピングによる分類 (続き)

菌株番号	リボタイプ番号	血清型	タカラPCR キットによる VT型	リボグループ	RPLA による VT1検出 (力価)	RPLA による VT2検出 (力価)	stx1 遺伝子型	stx2 遺伝子型
No.181	422-23-S-1	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		A
No.184	422-23-S-4	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		A
No.186	422-23-S-6	O157	2	ECORI 422-9-S-5	—	128		A
No.185	422-23-S-5	O157	2	ECORI 422-9-S-5	—	128		A-1
No.173	422-22-S-1	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		B
No.187	422-23-S-7	O157	2	ECORI 422-9-S-5	—	128		B
No.171	422-21-S-7	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	8		H
No.172	422-21-S-8	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		H
No.177	422-22-S-5	O157	2	ECORI 422-9-S-5	—	128		H
No.179	422-22-S-7	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		H
No.182	422-23-S-2	O157	2	ECORI 422-9-S-5	—	128		H
No.183	422-23-S-3	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		H
No.188	422-23-S-8	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	64		H
No.189	422-24-S-1	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		H
No.190	422-24-S-2	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	32		H
No.191	422-24-S-3	O157	2	ECORI 422-9-S-7	—	32		H
No.25	422-9-S-5	O157H-	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	128	A	A
No.26	422-9-S-6	O157H-	1&2	ECORI 422-9-S-5	128	8	A	H
No.27	422-9-S-7	O157H-	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		E
No.37	422-12-S-1	O157H20	-	ECORI 422-9-S-4	—	—		
No.196	422-24-S-8	O157H7	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.28	422-9-S-8	O157H7	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.30	422-11-S-2	O157H7	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	128	A	A
No.31	422-11-S-3	O157H7	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	16	A	H
No.32	422-11-S-4	O157H7	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	32	A	H
No.29	422-11-S-1	O157H7	1&2	ECORI 422-9-S-7	128	—	A	
No.33	422-11-S-5	O157H7	1	ECORI 422-9-S-7	128	—	A	
No.36	422-11-S-8	O157H7	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		A
No.35	422-11-S-7	O157H7	2	ECORI 422-9-S-7	—	128		A-1
No.34	422-11-S-6	O157H7	2	ECORI 422-9-S-5	—	128		H
No.93	422-12-S-3	O26	1&2	ECORI 422-9-S-1			B	A
No.94	422-12-S-4	O26	1&2	ECORI 422-9-S-1			B	A
No.95	422-12-S-5	O26	1&2	ECORI 422-12-S-5			B	A
No.96	422-12-S-6	O26	1&2	ECORI 422-12-S-5			B	A
No.97	422-12-S-7	O26	1&2	ECORI 422-9-S-1			B	A
No.98	422-12-S-8	O26	1&2	ECORI 422-9-S-1			B	A
No.99	422-13-S-1	O26	1&2	ECORI 422-9-S-1			B	A
No.100	422-13-S-2	O26	1	ECORI 422-9-S-1			B	
No.101	422-13-S-3	O26	1	ECORI 422-12-S-5			B	
No.102	422-13-S-4	O26	1	ECORI 422-9-S-1			B	
No.103	422-13-S-5	O26	1	ECORI 422-12-S-5			B	
No.15	422-9-S-1	O26:H11	1	ECORI 422-9-S-1			B	
No.92	422-12-S-2	O8	2	ECORI 422-9-S-4				D-3
No.104	422-13-S-6	O91	1	ECORI 422-8-S-3			D	
No.105	422-13-S-7	O91	1	ECORI 422-8-S-3			D	
No.114	422-14-S-8	OUT	1	ECORI 422-8-S-3			B	
No.116	422-15-S-2	OUT	1	ECORI 422-8-S-3			B	
No.117	422-15-S-3	OUT	1	ECORI 422-8-S-3			B	
No.115	422-15-S-1	OUT	1	ECORI 422-15-S-1			B-1	
No.110	422-14-S-4	OUT	2	ECORI 422-9-S-3				C
No.109	422-14-S-3	OUT	2	ECORI 422-8-S-3				D-1
No.111	422-14-S-5	OUT	2	ECORI 422-9-S-4				D-2
No.112	422-14-S-6	OUT	2	ECORI 422-14-S-6				M
No.113	422-14-S-7	OUT	2	ECORI 422-14-S-7				N

表 2. *L.monocytogenes* の *hly* 構造遺伝子 1126-1527 塩基領域の塩基配列による分類

グループ	食品及び環境からの分離株										臨床分離株		
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4b	4c	4e	UT	1/2a	1/2b	4b
1		19, 22, 26, 27, 29, 30, 31, 102, 103, 105, 139, 167							24	140		175, 178	
2		107											
3		74, 134, 135			63, 67		F2365, 3, 6, 7, 14, 15, 16, 20, 28, 45, 46, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 64, 150, 161, 162, 193, 145, 146, 147, 148, 149, 164, 169, 170					122, 124, 173, 179, 183	125, 126, 128, 129, 130, 131, 182, 184, 185, 186, 197
4		18, 42, 47, 49, 50, 68, 69, 70, 71, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 142, 187, 188, 192			44, 48, 163					62		123	127
5	2, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 36, 143, 159, 165			23		25				108, 109	117, 118, 119, 120, 121, 174, 180		
6	EDG-e, 1, 8, 17, 33, 34, 37, 38, 133, 136, 137, 160, 166, 171, 190, 191, 194, 196,		32, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158								172, 177		
7	65, 66			115						110, 111, 113	176		
8			13										
9	21, 35, 39, 101, 104, 106, 112, 132, 141, 195									114	181		
10	189												
11								168					
12	138												

表中の数字や文字は菌株番号である。

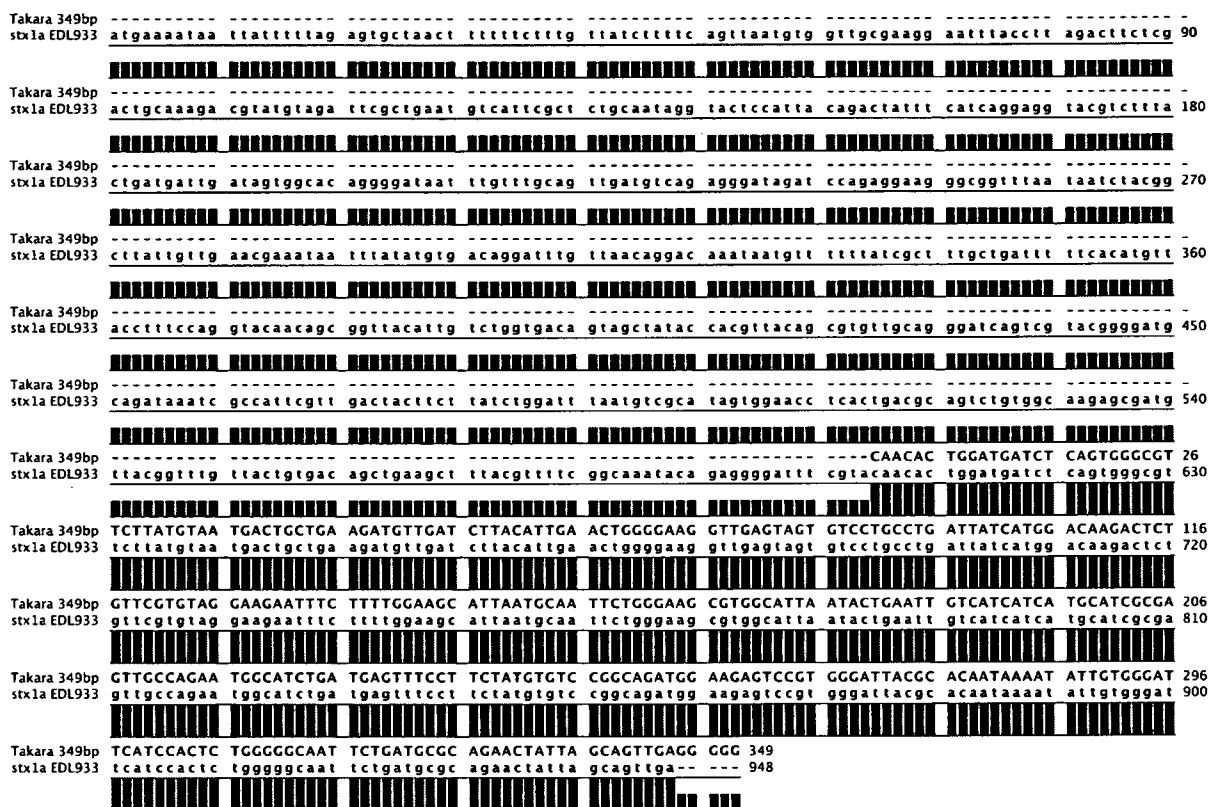


図 1. タカラバイオ社のキット O-157 & ペロ毒素遺伝子同時検出キットで増幅される 349 bp PCR 産物の同定


```

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 atgaagtgta tattatttaa atgggtactg tgcctgttac tgggtttttc ttcgggatcc tattccccgg agtttacgat agacttttcg 90
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 acccaacaaa gttatgtctc ttcgttaaat agtatacgga cagagatatac gacccctcct gaacatataa ctcaggggac cacatcggtg 180
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 tcigtatta accacacccc accgggcagt tattttgctg tggatatacg agggcttgat gtctatcagg cgcgttttga ccatcttcgt 270
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 ctgattatg agcaaaataa ttatatagtg gccgggttcg ltaatacggc aacaaatact ttctaccgit ttcagattt tacacatata 360
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 tcagtcccc gttgacaac ggtttccatg acaacggaca gcagttatac cactctgcaa cgtgtcgcag cgcctggaacg ttccggaatg 450
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 ---ATCAGTC GTCACACT GGTTCATCA TATCTGGCGT TAATGGAGTT CAGTGGTAAT ACAATGACCA GAGATGCATC CAGAGCAGTT 87
caaatcagtc gtcactcact ggttccatca tatctggcgt taatggagtt cagtggtaat acaalgacca gagatgcac cagagcagtt 540
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 CTGCGTTTTG TCACTGTAC AGCAG-----
ctgcgttttg tcactgtcac agcagaagcc ttacgcttca ggcagatatac gagagaattt cgtcaggcac tgtctgaaac tgcttcctgtg 112
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ 630

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 tatacagatga cgccgggaga cgtggacctc actctgaact gggggcgaat cagcaatgtg ctccgggagt atcggggaga ggaatgggttc 112
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ 720

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 agagtgggga gaatatcctt taataatata tcagcgatac tggggactgt ggccgttata ctgaattgcc atcatcaggg ggcgcgttct 112
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ 810

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 gttcgcgccg tgaatgaaga gagtcaacca gaatgtcaga taactggcga caggccigtgt ataaaaataa acaatacatt atgggaaagt 112
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ 900

Takara 112bp -----
stx2a EDL933 aatacagctg cagcgtttct gaacagaaag tcacagttt tatatacaac gggtaataa 112
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ 960
██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████

```

図3. タカラバイオ社のキット O-157 & ペロ毒素遺伝子同時検出キットで増幅される 112 bp PCR 産物の同定

```

Takara EVS rev -----
stx2a EDL933 atgaagtgta tattatttaa atgggtactg tgcctgttac tgggtttttc ttcggtatcc tattcccggg agtttacgat agacttttcg 90
-----
-----
Takara EVS rev -----
stx2a EDL933 acccaacaaa gttatgtctc ttcgttaaat agtatacggg cagagatadc gacccctctt gaacatatal ctccaggggac cacatcggtg 180
-----
-----
Takara EVS rev -----
stx2a EDL933 tctgttatta accacacccc accgggcagt taatttgcctg tggatatacg agggcttgat gtcctacagg cgcgttttga ccatctcgt 270
-----
-----
Takara EVS rev -----
stx2a EDL933 ctgattattg agcaaaataa ttatatatgtg gccgggttcg ttaatacggc acaaaatact ttctaccggt tticagattt tacacatata 360
-----
-----
Takara EVS rev -----
stx2a EDL933 tcagtccccg gtgtgacaac ggtttccatg acaacggaca gcagittac cactctgcaa cgtgtcgcag cgcctggaac ttccggaatg 450
-----
-----
Takara EVS rev ---ATCAGTC GTCACACT GGTTCACAA TATCTGGCGT TAATGGAGTT CAGTGGTAAT ACAATGACCA GAGATGCATC CAGAGCAGTT 87
stx2a EDL933 caaatcagtc gtcactcact ggtttcacta taictggcgt taatggagtt cagtggtaat acaatgacca gagatgcac cagagcagtt 540
-----
-----
Takara EVS rev CTGCGTTTTG TCACTGTAC AGCAGAACC ITACGTTCA GCCAGATACA GAGAGAATTT CGTCAGGCAC TGTCTGAAAC TGCTCCTGTG 177
stx2a EDL933 ctgcgttttg tcaactgtac agcagaacc itacgttica gccagataca gagagaatit cgtcaggcac tgtctgaaac tgcctcctgtg 630
-----
-----
Takara EVS rev TATACGATGA CGCCGGGAGA CGTGGACCTC ACTCTGAAC TGGGGCGAAT CAGCAATGTG CTTCCGGAGT ATCGGGGAGA GGATGGTGTG 267
stx2a EDL933 tatacगतga cgccgggaga cgtggacctc actctgaact tggggcgaat cagcaatgtg ctccggagt atcggggaga ggatgggtgtc 720
-----
-----
Takara EVS rev AGAGTGGGGA GAATATCCTT TAATAATATA TCAGCGATAC TGGGGACTGT GGCCGTATA CTGAATTGCC ATCATCAGGG GCGCGTCT 357
stx2a EDL933 agagtgggga gaatalcctt taataatata tcagcgatac tggggactgt ggccgtata ctgaattgcc atcatcaggg ggcgcttct 810
-----
-----
Takara EVS rev GTTCGGCCCG TGAATGAAGA GAGTCAACCA GAATGTGAGA TAACTGG--- ----- 404
stx2a EDL933 gttcggcccg tgaatgaaga gagtcaacca gaatgtgaga taaactgg--- ----- 900
-----
-----
Takara EVS rev ----- 404
stx2a EDL933 aatacagctg cagcgtttct gaacagaaag tcacagittt tatatacaac gggtaaataa 960
-----
-----

```

図 4. タカラバイオ社のキット腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子検出用プライマーセット EVS-1,-2 で増幅される 404 bp PCR 産物の同定

```

ABI O157 -----
eae EDL933 atgatttacc atggtttgta taccgggacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattg attatgclia gtcctgggtt aggatgtgtt ttatatgta atcagaattc atttgcaat 120
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 ggtgaaat atttaaat gggctcgat tcaaacigt taactcaiga lagctatcag aatcgccllt ttatatacgt gaaaacigt gaactgttg ccgactcttc taaactcga 240
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 gatattaat tatcgacgat ttggtctgtt aataagcatt tatcacagttc tgaaggcga atgatgaag ccgctgcttg tcagcagattc attttgccac tcaaaaact tcccttgaa 360
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 tacagtgcac taccacttit aggttcggca ccctctgttg ctgacgggtg tgttgcctgt cacacgaata aactgactaa aatgtccccg gacgtgacca aagcaaat gaccgatgac 480
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 aaggcattaa attatggcg cacaacggcg gcgagctctg gtacccagct tcagctcgca tctctgaag cgpallacg gaagatacc gctcttgta tgcctgtaaa ccagctctg 51
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 TCACAGTTGC AGGCC----- GCGATTACCG GAAAGATACC GCCTCTGGTA TCCCTGCTAA CCAGGCTTCC 60
tcacagttgc aggctctgtt acaacattat ggaacggcag aggttaactt gcagagtggt aataactllg acggagcttc acitggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaaaatg 66
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 ctggcatttg gtcaggctcg agcgccttac attgactccc gcttaccggc aattttaggt cggggctcag gtttttctct tctgcaaac atgttggctt alaactcttc cattgatcag 840
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 gattttcttg gtgataatac ccggttaggt attggggcg aatcctggcg agactatttc aaaaagtagc ttaacggcta ttcccgcttg agcggctggc atgagtcata caataaгаа 960
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 gactatgat agcggccagc aatggctctt gatattcgtt ttaattggca tctaccgtca tatccggcat tagcgccaa cgtgatata gacgactat atggtgataa tgttgccttg 1080
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 ttaattctg ataaagcga gtcgaactct ggtcggcga ccgttgggtt aaactatact ccgattcttc tggtagcat gggagcgtt laccgtctg gtacggtaa tgaaaatg 1200
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 ctccttact caatgcagt ccgttatcag ttgataaat cgtggtctca gcaaatgaa ccacagtag ttaacagtt aagaacatta tcaggcagcc gttacgatc ggttccggt 1320
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 aataacaata ttattcga gtaacaagc caggatattc ttctctgaa tattccgat gatattaag gtactgaac cagtagcag aagattcgt tpatcttaa gagcaaatc 1440
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 ggtctggatc gtatcgtctg ggtgatagt gctttacgca gtcaggggcg tcagattcag catagcgaa gccaaagcgc acaagactac caggctattt tgcctgcta tgttcagggt 1560
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 ggcagcaata ttataaagt gacggctcgc gcctatgacc gtaaggca lagctctaac aatgacagc ttactattac cgttctgtcg aatggtcaag tgtcgcaca ggttgggta 1680
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 accgattta cggcggataa gacttcgctt aaagcgaata acgctgatac cattacttat accgacagc tgaaaaaga tgggtagct caggctaag tccctgttc attataat 1800
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 gtttcaggaa ctgcaactc tggggcaat agtgcacaaa cgtatgctaa cgttaagca accgtaact tgaagtcag tacgccaga caggctgctg tctctgtaa aaccgggag 1920
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 atgacttcag cacttaatgc cagtgcggtt atattllttg atcaaacca gccagcattt actgagata agcgtgata gacaactgca gtagcaaat gtaaggatgc tattaatat 2040
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 actgtaagc ttatgaaaaa cggctagcca gtaataatc atccgcttac attctcaaca aactttggga tgttcaacg taagctcaaa acgcaagca cccagggaaa tpatgctgt 2160
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 gtcagataa cactaacctc cagttccgc gtaaaagca ctgtatgtc gacagtcagt gatgggctg aggttaagc gactgagtc actttttg atgaactgaa aattgacaac 2280
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 aaggttgata ttatgtgtaa caatgtcaga ggcgagttgc ctaaatattg cctgcaatat ggtcagttta aacgaagc aagcgttgt gatgtacat attcatgta ttcaaaaat 2400
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 accgattatg cgcactgca tgcctcagg aaagcactt tgaatgtaa agcagttgc gtaattaaag ccacactcgg tgaagcaaa acagtaagt acactataa agcaccgtcg 2520
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 tatatgataa aagtgataa gcaagcctat tatgtgatg ctatgtccat ttgcaaaaat ttattaccat ccacacagac ggtattgca gatatttat actcatggg gctgcaaat 2640
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 aatatagcc attatagtc tatgaacta ataactgctt gatttaaca gactatagt gaccagctt ctggagatc aagcacttat aacctataa cacaaaacc tctctcgg 2760
|||||
ABI O157 -----
eae EDL933 gttaatgta atactcaaa tgcctatgc gtttgttag aata 2805
|||||

```

図5. Applied Biosystems 社 TaqMan E. coli O157:H7 detection kit で増幅される 66 bp PCR 産物の同定

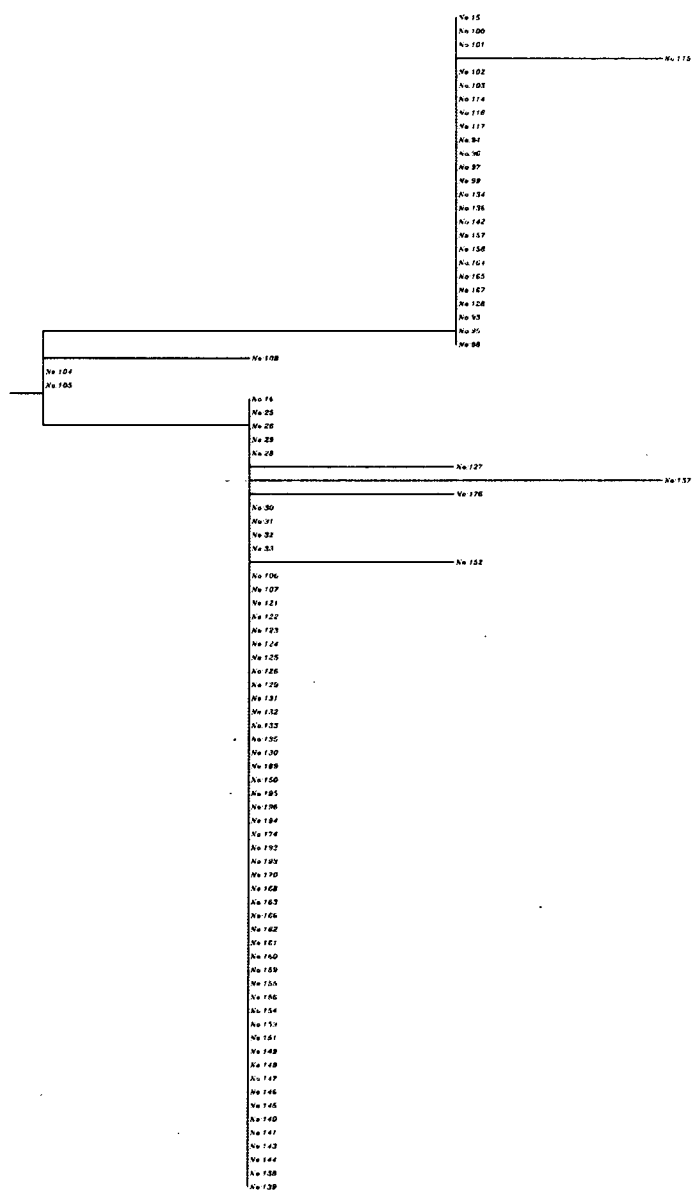


図6. 腸管出血性大腸菌 87 株の stx1a-stx1b 遺伝子領域におけるアライメント解析による系統樹

stx1a-stx1b 遺伝子領域(1272 塩基)中の 1159 塩基配列(31-1189 塩基部分)を決定し, ClustalW により解析した。

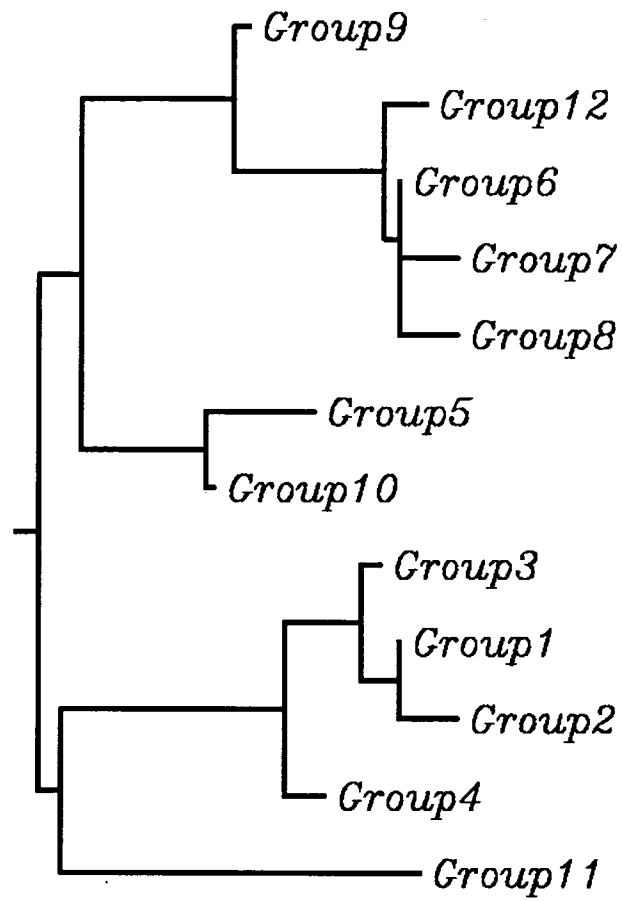


図 8. *L. monocytogenes* の *hly* 構造遺伝子部分塩基配列のアライメント解析による系統樹

hly 構造遺伝子中の 402 塩基配列 (1126-1527 塩基部分) を決定し, ClustalW により解析した。

平成 19 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）
分担研究報告書

食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究

迅速検査法に適する検体処理方法の検討

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 室長
研究協力者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所
梶川 揚申 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品における微生物検査に於いて、一般に当該微生物の汚染菌数は低く、そのまま直接微生物検査を行っても、検出限界以下となる場合がほとんどである。このようなことから培養による検査法では、一般的に当該微生物を選択的に増菌する選択増菌培養を行った後、微生物の分離を行っている。一方、迅速検査法では、選択増菌培養を行うと時間がかかるため、可能であれば選択増菌は必要最小限に留めたい。迅速検査法の実用的な検出限界は、 $10^4 \sim 10^5$ 個/g と考えられており、食品の前処理や前増菌などにより迅速検査法実施前にこのレベルに菌数を高める必要がある。このレベルまで菌数を高める方法としては、当該微生物を選択的に濃縮して試験系に持ち込む方法と、短い時間の選択増菌を行い当該微生物の菌数を高める方法がある。昨年度に引き続き濃縮法について情報収集を行い、磁気ビーズ法を応用した循環型濃縮システムについて検討した。微生物はエンテロバクター・サカザキを対象とし、緩衝液中での回収実験を行った。磁気ビーズ法を応用した循環型濃縮システムでは、原理的には期待される手法ではあるが、今回の実験結果では最大で 5% の捕集結果であった。

A. 研究目的

食品からの微生物検査迅速法においては、様々な特性を持つ各種食品の影響を受けないで、食品中に存在する非常に低いレベルの当該菌をいかにして迅速検査法の検出限界以上に高めるかの方法論の提供が重要である。本研究では、食品検体の処理方法、増菌または濃縮による菌数確保などの迅速検査法に適した検体処理について検討

し、方法論を提供することを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、昨年度に引き続き、増菌または濃縮による菌数確保などの迅速検査法に適した検体処理について情報収集を行い、食品検体から、当該微生物を濃縮により菌数確保する手法について検討した。この中から実用性が高く論文的にも報告のある方

法として、免疫磁気ビーズ法の応用型である循環型濃縮システムについて、抗体を用いる手法とは菌体の捕集様式の異なる陽イオン吸着型磁気ビーズについて検討を行った。循環型濃縮システムの原理は図1に示した。同システムの最新型の循環ユニットの検体乳剤を入れる交換部分の写真を、図2に示す。

対象病原微生物は、エンテロバクター・サカザキとした。リン酸緩衝液(PBS)に一定量のエンテロバクター・サカザキをスパイクしたのち、上述の処理を行い、菌数の回収状況を調べた。菌の回収状況は直接寒天平板への接種による生菌数の測定を行った。用いた平板培地は、接種菌数の推定に Trypticase Soy Agar(TSA)、循環後の菌数測定には TSA および DHL を用いた。濃縮システムを用いた濃縮法は単純な免疫磁気ビーズ法に比べ、食品乳剤全量を循環、濃縮できるため、高い濃縮結果が期待される。理論的にはこの回収率が 100%に近くなれば、直接検査が可能であるので、捕集効率を計算した。

実験：濃縮システムを用いた捕集効率確認

- ①供試菌を TSB 37℃で一晩培養
- ②PBS に懸濁し、循環ユニットに入れる
- ③取り扱い説明書に従い、循環濃縮を行う
- ④最終 200 μ l に浮遊
- ⑤浮遊液 50 μ l をそれぞれ DHL と TSA 寒天平板 2 枚へ接種し、培養後、菌数確認

C.研究結果

現在市販品として入手可能な濃縮手法としては、免疫磁気ビーズを用いた濃縮法とその発展型である循環型の濃縮システム

がある。昨年に引き続き循環型の濃縮システムを用いて、エンテロバクター・サカザキの添加回収実験を行い、濃縮がどの程度行えるかを評価した。昨年度は、抗体により菌体を吸着する磁気ビーズを用いたが、本年度は陽イオン吸着活性のある磁気ビーズを用いた。

実験：陽イオン吸着磁気ビーズによる捕集効率

濃縮結果は、表1～表3に示した。表1は、循環濃縮時間 30 分、表2は、同 60 分の結果である。表3は、加える陽イオン吸着磁気ビーズを 100 μ l として比較を行った結果である。表1では、DHL でモニターした場合と TSA でモニターした場合、それぞれの捕集効率は、0～1%、0～3%であった。濃縮時間を倍にした結果は、表2のように DHL と TSA でモニターした場合、それぞれの捕集効率は、0～1%、3～5%であった。ビーズ量を変化させて回収した実験結果は、表3のように DHL と TSA でモニターした場合、それぞれの捕集効率は、0%、0～1%であった。

D.考察

特定の菌を選択的な濃縮により定量的に検出可能であるかを調べるために、現在入手可能な市販品を調査した。抗体を磁気ビーズに固定化した免疫磁気ビーズと、磁気ビーズを循環型の装置により洗浄濃縮を行うシステムが入手可能であることがわかった。後者は、ノロウイルスの環境や食品からの分離に用いる方法として米国 FDA が検討を開始しているという情報もあり、実際にどの程度の濃縮効果が得られるか評価することにした。循環型のシステムはわ

が国で市販されて間もないこともあり、どの程度の濃縮が可能であるかに関する知見はなかった。製品としては、増菌をしないで直接試験することを推奨しているわけではない。昨年度は腸管出血性大腸菌の食品等からの分離では効果のあるといわれている免疫磁気ビーズ法と免疫磁気ビーズを用いた循環型の濃縮システムにつき、リステリア・モノサイトゲネスを対象とし定量的に評価したが、濃縮という点では思わしい結果が得られていない。本年度は、エンテロバクター・サカザキを対象として、陽イオン吸着磁気ビーズを用い、循環型の濃縮システムを評価した。

循環型の濃縮システムは操作が煩雑で熟練を必要とした昨年のものから、図2に示すようなものに変更となり、操作性はかなり向上していた。チューブの接続でサンプルが漏出する、あるいは作業者がチューブ接続操作時に検体に接触しコンタミを起こす危険性があったが、改良品は随分改善されていた。

免疫磁気ビーズでは、当該病原体に対する親和性の高い抗体の取得が必要であるが、今回検討した陽イオン吸着磁気ビーズは、非特異的に微生物を吸着するため、吸着用抗体等が整備されていないエンテロバクター・サカザキやノロウイルスなどの濃縮精製に有用と思われた。原理的には特異性の面で抗体を用いるものと比べると劣る可能性は考えられた。

表1では、取扱説明書にある条件で行った場合の捕集効率を示す。理論値は、100%の回収が期待されるが、昨年同様捕集効率はかなり低く、最も良い場合で3%程度であった。モニターとして、腸内細菌科の選択培地を用いた場合と、非選択のTSA

培地で明らかに異なり、選択培地が機能していないのは、他の菌の混在する食品検体におけるモニターを困難とするものと思われた。

表2では、循環時間を2倍として評価したが、最も良い捕集効率は5%で、全般を通じて明らかに捕集効率が上がっていることが示された。表3では、陽イオン吸着磁気ビーズの量を変えたが、捕集率はやや低下し、取扱説明書の添加量が適量であることが示された。

これらの結果を見ると、数値上の回収率は良くないが、この操作を行うメリットはあると思われる。当初のサンプル乳剤50mlから、0.2mlあるいは、0.1mlのバッファーに濃縮できることは、その後行う試験結果に影響を与える。例えば、PCR等でサンプルとして試験系に添加する検体量を1 μ lとすると、50ml中に50000個菌がいる場合、1CFU/乳剤1 μ lということになり、直接試験をする場合は、理論上これ以上の菌数がなければ検出できないことになる。一方、循環濃縮の回収率2%で処理後100 μ lのバッファーに分散したとすると、 $50000 \times 0.02 = 1000$ で10個/分散液 μ lとういことになり、10倍感度が上がることになる。従って、循環装置を用いることは、試験の感度を上げるには有効である。一方、標準的な培養法とのバリデーションとなると、評価は低く、培養法に代わって、循環濃縮効率が100%となることが必要で、循環濃縮だけで代替法として同等な感度や精度の試験法とすることは困難であると思われる。

今回理論値の濃縮が実現しなかった原因は、抗体の時と同様に、捕集に問題があるのか、システム自体の捕集効率に問題があるのかはまだ判断できない。食品検体

25gや5gといった検体量を対象として濃縮可能というシステムとしては理論的には優れていると思われるので、今後はシステムの細かい条件設定を検討してゆきたいと思う。

特に、今回検討した陽イオン吸着磁気ビーズは、増菌培養が出来ないノロウイルスに対してもそのまま適用が可能であり、現在の数%の捕集効率でも、試験としては1オーダーの検出感度の向上が期待されるため、この検討を開始した。

E. 結論

エンテロバクター。サカザキについて陽イオン吸着磁気ビーズを応用した循環型濃縮システムを検討した。陽イオン吸着磁気ビーズを用いた循環型濃縮システム法では最大5%の捕集効率が観察されたが、そのまま培養法と比較できるほどの高い捕集率は得られなかった。この方法は、培養が出来ない試験法の濃縮に有効と思われ、これにより理論的には、10倍以上の感度の上昇が期待できるものと思われた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

学会発表

- 1) 五十君静信。微生物検査標準法を必要とする背景とその目指すもの。シンポジウム“食品衛生管理と微生物検査のあり方”日本食品微生物学会総会。2007.9.26。東京
- 2) 五十君静信。微生物検査の標準化・日本の現状と今後。「食の安全確保のためのシステムづくり～世界・日本・埼玉の現状」。第29回日本食品微生物学

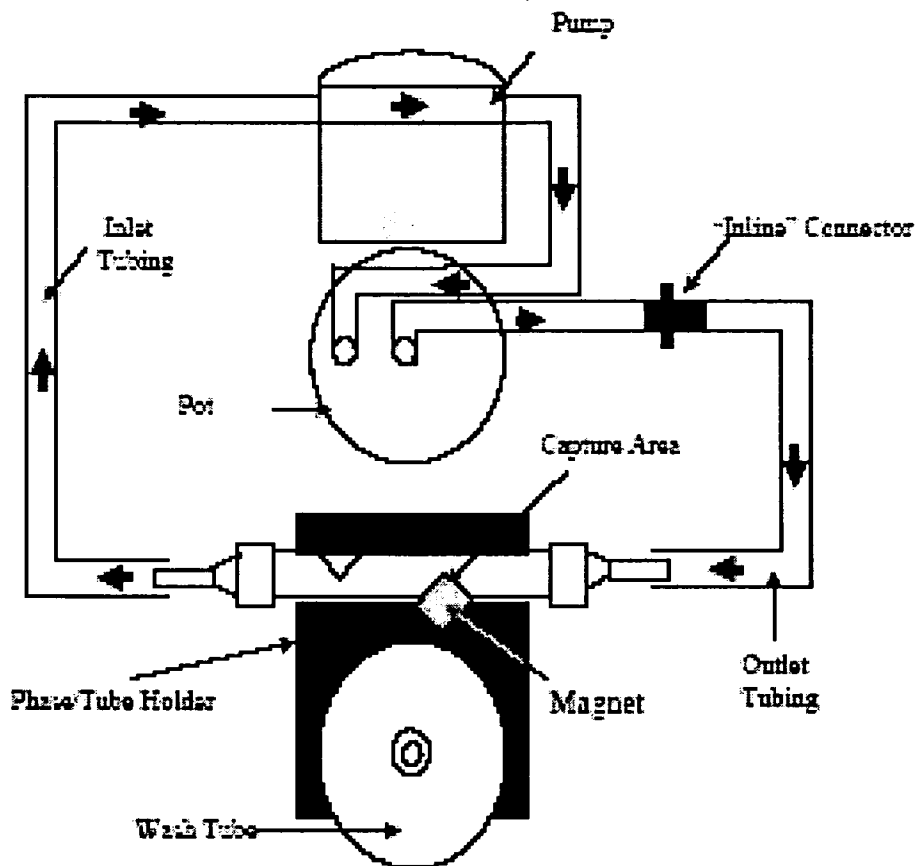


図1. 磁気ビーズを応用した循環型濃縮システムの原理

図真ん中に示す pot 部分に、検体の乳剤を置き2つのチューブ先端を検体乳剤に挿入した後、乳剤を循環させる。乳剤が Magnet 部を通過する時に、磁気ビーズはトラップされると同時にそのビーズに結合している当該微生物が回収される。

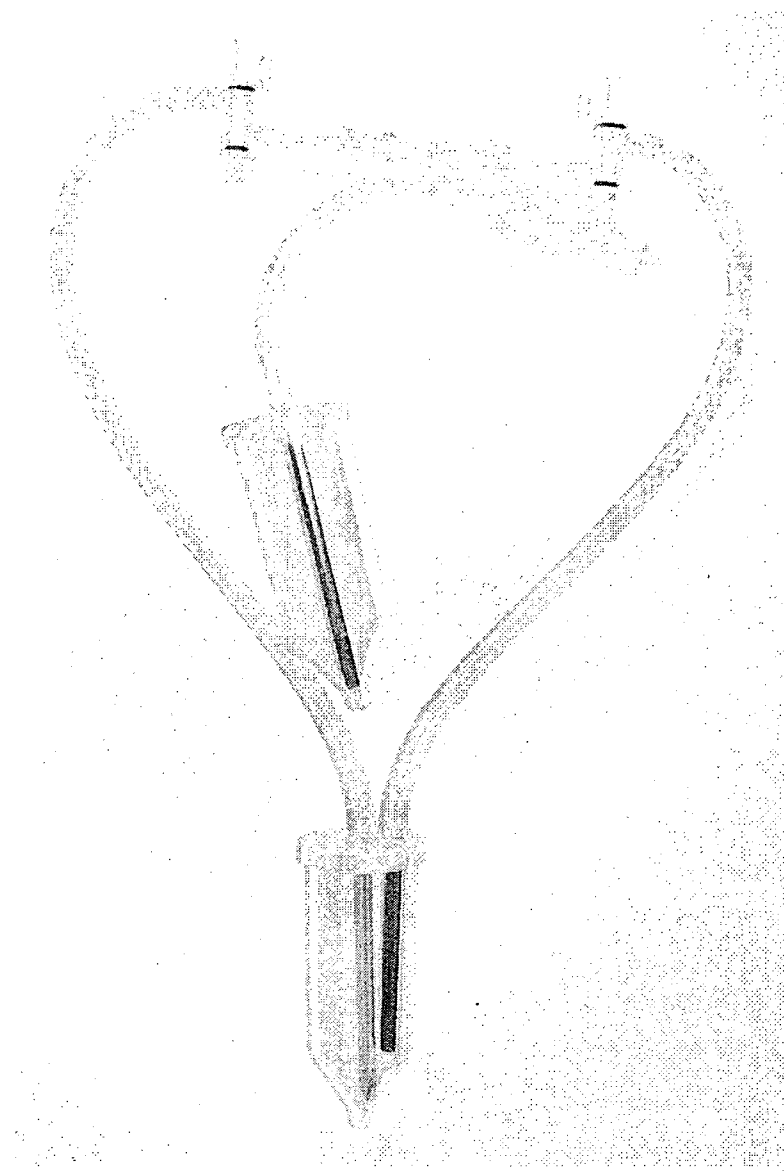


図2. 改良型の循環チューブユニット

以前の製品は、バラバラのチューブをつなぐ必要があったが、このときコンタミが起こりやすく使いにくかった。一方、改良型ではその必要が無くなり、使いやすさが向上していた。

表 1. 陽イオン吸着磁気ビーズ捕集効率 循環時間 30 分

対象微生物	#	推定初期菌数	濃縮菌数	捕集効率	濃縮菌数	捕集効率(%)
		TSA (CFU/50ml)	DHL (CFU/ml)	DHL 濃縮/初期	TSA (CFU/ml)	TSA 濃縮/初期
				(%)		(%)
<i>E. sakazakii</i>	D1	3410	8	0	100	3
<i>E. sakazakii</i>	C2	21010	84	0	320	2
<i>E. sakazakii</i>	C1	21010	144	1	616	3
<i>E. sakazakii</i>	B2	210000	476	0	2232	1
<i>E. sakazakii</i>	B1	210000	100	0	932	0

表 2. 陽イオン吸着磁気ビーズ捕集効率 循環時間 60 分

対象微生物	#	推定初期菌数	濃縮菌数	捕集効率	濃縮菌数	捕集効率(%)
		TSA (CFU/50ml)	DHL (CFU/ml)	DHL 濃縮/初期	TSA (CFU/ml)	TSA 濃縮/初期
				(%)		(%)
<i>E. sakazakii</i>	D2	3410	12	0	136	4
<i>E. sakazakii</i>	C4	21010	28	0	856	4
<i>E. sakazakii</i>	C3	21010	140	1	1092	5
<i>E. sakazakii</i>	B4	210000	80	0	6120	3
<i>E. sakazakii</i>	B3	210000	612	0	6312	3

表4. 陽イオン吸着磁気ビーズ捕集効率 吸着ビーズ量 100 μ l

対象微生物	#	推定初期菌数	濃縮菌数	捕集効率	濃縮菌数	捕集効率(%)
		TSA (CFU/50ml)	DHL (CFU/ml)	DHL 濃縮/初期 (%)	TSA (CFU/ml)	TSA 濃縮/初期 (%)
<i>E. sakazakii</i>	D3	3410	8	0	12	0
<i>E. sakazakii</i>	C6	21010	28	0	116	1
<i>E. sakazakii</i>	C5	21010	16	0	200	1
<i>E. sakazakii</i>	B6	210000	144	0	1360	1
<i>E. sakazakii</i>	B5	210000	84	0	576	0

食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究

培養法・非培養法・ハイブリッド法による迅速法の開発

分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻 教授

研究要旨

信頼性の高い迅速法のためには、食品マトリクスからの微生物細胞バイアブル分離が有効と考えられる。本研究では、難濾過性の食品として、生乳、魚肉（ブリ）、牡蠣を選び、各々から *Echerichia coli*、*Morganella morganii*、*Vibrio parahaemolyticus* をバイアブル分離するために Percoll 密度勾配遠心分離法を導入した。その結果、Percoll 25%、50%、75%、100% の 4 層からなる密度勾配によって、各微生物細胞を食品マトリクスから高効率に分離できることが示された。これによって、非培養法－培養法が連結したハイブリッド法が有効性が示された。ただし、*V. parahaemolyticus* の生菌計測に関しては TCBS よりも TSA の方が非培養法（蛍光顕微計測法）と良い相関を示した。また、将来の自動化を想定した、密度勾配層回収装置の基本設計・試作を行った。

A. 研究目的

実用的見地から最も有望と考えられる迅速法は蛍光顕微計数法である。しかし、共存する食品マトリクス微粒子等に起因する擬シグナルが問題となっている。一方、従来、基準とされてきた培養法でも、食品成分がコロニー形成能に影響を及ぼすことは否定できない。したがって、これらの問題を解決し、信頼性の高い結果を得るためには、前処理段階で微生物細胞のみを分離することが有効と考えられる。その場合、微生物細胞のバイアビリティー（特定の単一酵素の活性ではなく、細胞が生きている状態を保つために多くの酵素系が活性を保持している状態を指す。細胞活性、あるいは生き生き度。）に影響を及ぼすことなく分離すること（バイアブル分離）が重要である。それによって、非培養迅速法の結果を細胞

単位で、培養法で確認できることになる。しかし、種々の食品マトリクスからのバイアブル分離は簡単ではない。本研究は、特に難濾過性の食品を選び、そのバイアブル分離、それに続く生菌計数（非培養法、および培養法）からなるハイブリッド法の開発を目的としている。

既に初年度に、生乳、及び魚肉（ブリ）を選び、それぞれに添加した大腸菌 (*Echerichia coli*)、ヒスタミン産生菌 (*Morganella morganii*) を Ficoll あるいは Percoll による密度勾配遠心分離法によって、原理的にバイアブル分離ができることを示した。その結果に基づき、本年度は、
(1) ハイブリッド法の適用範囲についての検討、(2) 魚肉・*M. morganii* における分離性能の再評価、(3) 牡蠣 - 腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) における分離性能