

表 1 使用に供した *Salmonella* Enteritidis 菌株とその由来

菌株番号	原因	発生	原因施設	由来	事例
99463	?		タイ (DMS1588)	feces	
00052	不明		不明	feces	患者 H12-27
00057	不明		不明	feces	患者 H12-21
00061	不明		不明	feces	患者 H12-17
00125	ケーキ	児童施設	菓子製造業	feces	患者 1 H12-78
01158	調査から		液卵業者	food	液卵
01167	不明	家庭	不明	feces	患者便 H13-35
01251	弁当	飲食店	飲食店(余市)	food	原因食 1 H13-48
01286	折り詰め等	家庭	飲食店(仕出し)	feces	患者 H13-51
03222	オムライス	函館市	飲食店	feces	patient H15-18
03234	クレープ	美深町	祭りの出店	feces	patient H15-19
03240	ホテルイカ塩辛	函館市	飲食店(旅館)(函館)	feces	patient H15-24
03256	不明		不明	feces	patient sp/03-4
03320	アサリとネギのぬた	風連町	社会福祉施設	vomit	patient H15-37
06266	調査	HC が実施	学校給食食材	food	ブラジル産鶏肉
LCI 105	調査(05-12-27)	D72-1(CH)	採卵養鶏場	ovary	食鳥処理場

表 2-a 試験に供した *Salmonella* Enteritidis 以外の血清型 (地研 A)

番号	菌株番号	菌種	血清型名	血清型	原因	由来
1	02115	<i>Salmonella</i>	Typhimurium	O4:i;1,2	V14-1	environ 河口泥
2	03226	<i>Salmonella</i>	Infantis	O7:r:1,5	弁当?	feces 取扱者
3	03269	<i>Salmonella</i>	Derby	O4:f,g:-	養豚場	直腸 直腸内容
4	03426	<i>Salmonella</i> (II)	Sofia	O4:b:-	食鳥処理場	Food 食鳥とたい
5	05324	<i>Salmonella</i> (II)	Sofia	O4:b:-	給食	food 生鶏肉
6	04233	<i>Salmonella</i>	Typhi	O9:d:-		feces 散発事例
7	04249	<i>Salmonella</i>	Agona	O4:f,g,s:-		feces 散発事例
8	04250	<i>Salmonella</i>	Anatum	O3,10:e,h:1,6		feces 散発事例
9	04251	<i>Salmonella</i>	Stanley	O4:d:1,2		feces 散発事例
10	04252	<i>Salmonella</i>	Weltevreden	O3,10:r:z6		feces 散発事例
11	04253	<i>Salmonella</i>	Tennessee	O7:z29:-		feces 散発事例
12	05150	<i>Salmonella</i>	Braederup	O7:e,h:e,n,z15	中部 1	ovary 鶏卵巣
13	05151	<i>Salmonella</i>	Montevideo	O7: g,m,s:-		feces 散発事例
14	07244	<i>Salmonella</i>	Montevideo	O7: g,m,s:-		feces 患者
15	05190	<i>Salmonella</i>	Oranienburg	O7:m,t:-	中部 2	盲腸 食鳥とたい
16	06004	<i>Salmonella</i>	Livingstone	O7:d:l,w		feces 散発事例
17	06007	<i>Salmonella</i>	Thompson	O7:k:1,5		feces 散発事例
18	06008	<i>Salmonella</i>	Singapore	O7:k:e,n,x		feces 散発事例
19	06009	<i>Salmonella</i>	Virchow	O7:r:1,2		feces 散発事例
20	06010	<i>Salmonella</i>	Choleraesuis	O7:c:1,5		feces 散発事例
21	06011	<i>Salmonella</i>	Mbandaka	O7:z10:e,n,z15		feces 散発事例
22	Th451	<i>Salmonella</i>	Rissen	O7:fg:-		food 豚肉(タイ)
23	Th455	<i>Salmonella</i>	Kentucky	O8:i:1,z6		food 豚肉(タイ)
24	Th457	<i>Salmonella</i>	Hvittingfoss	O16:b:e,n,x		food 豚肉(タイ)

表 2-b 試験に供した *Salmonella* Enteritidis 以外の血清型 (地研 B)

番号	菌株番号	菌名	検体の由来
1	F480	<i>Salmonella</i> Abaetetuba	不明
2	F4019	<i>Salmonella</i> Typhimurium	直腸拭い液
3	F1260	<i>Salmonella</i> Braenderup	不明
4	F1511	<i>Salmonella</i> Infantis	不明
5	F1960	<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	糞便
6	F2891	<i>Salmonella</i> Chester	食品
7	F2904	<i>Salmonella</i> Oranienbrug	糞便
8	F3367	<i>Salmonella</i> Kottbus	不明
9	F3385	<i>Salmonella</i> Shleissheim	直腸拭い液
10	F3386	<i>Salmonella</i> Hvitvingfoss	直腸拭い液
11	F3390	<i>Salmonella</i> Richmond	直腸拭い液
12	F3408	<i>Salmonella</i> Heidelberg	直腸拭い液
13	F3600	<i>Salmonella</i> Agona	直腸拭い液
14	F3646	<i>Salmonella</i> Weltevreden	便
15	F3705	<i>Salmonella</i> Typhi	便
16	F3809	<i>Salmonella</i> Paratyphi A	血液
17	F3829	<i>Salmonella</i> Stanley	直腸拭い液
18	F3995	<i>Salmonella</i> diarizonae	糞便
19	F4076	<i>Salmonella</i> Enteritidis	糞便
20	F4083	<i>Salmonella</i> sp. 亜種 I 4:i:-	糞便
21	F4084	<i>Salmonella</i> Thompson	糞便
22	F4178	<i>Salmonella</i> Montevideo	腸内容物

表 3 試験に供した *Vibrio parahaemolyticus* 菌株

菌株番号	血清型	病原遺伝子	試料由来			事例番号
99036	O4:K68	<i>tdh</i> (+)	カニ M	食品	カニ	H11-25
99064	O4:K68	<i>tdh</i> (+)	カニ M	便	患者	H11-25
99020	O3:K6	<i>tdh</i> (+)	R 民宿	便	患者	H11-14
99078	O3:K6	<i>tdh</i> (+)	カニ紋別	便	患者	H11-25
99241	O3:K6	<i>tdh</i> (-)	スーパー	拭き取り	カニ	H11-36
01160	O3:K6	<i>tdh</i> (+)		便	患者	H13-26
03261	O3:K6	<i>tdh</i> (+)		便	患者	H15-28
06225	O4:K9	<i>tdh</i> (+)		便	患者	H18-38
99027	O4:K10	<i>tdh</i> (+)	カニ M	便	患者	H11-25
99014	O5:KUT	<i>tdh</i> (+)	煮エビ	便	患者	H11-13
03018	O3:K6	<i>tdh</i> (+)	環境	砂	河口	5/NOV/02
03239	O3:K6	<i>tdh</i> (+)	環境	砂	河口	4/AUG/02
04277	O4:K68	<i>tdh</i> (+)		便	患者	H16-26

表 4 試験に供した *Bacillus cereus* 菌株

菌株番号	特徴	由来	事例番号
06220	emetic toxin	food 原因食 チキンライス	H18-25
06221	emetic toxin	feces 患者 1	H18-25
06222	emetic toxin	feces 患者 2	H18-25
06223	emetic toxin	feces 患者 3	H18-25
06224	emetic toxin	feces 患者 4	H18-25
01053	emetic toxin	患者	
03071	enterotoxin	food 食中毒事例検食試料	H15-2
05012	enterotoxin	environ 河口 No.6 砂	
01045	enterotoxin	food 原因食 おひたし	H13-9
01048	enterotoxin	vomit 患者	H13-9
01052	enterotoxin	feces 患者	H13-9

図1 *Salmonella* Enteritidis 菌株の増幅

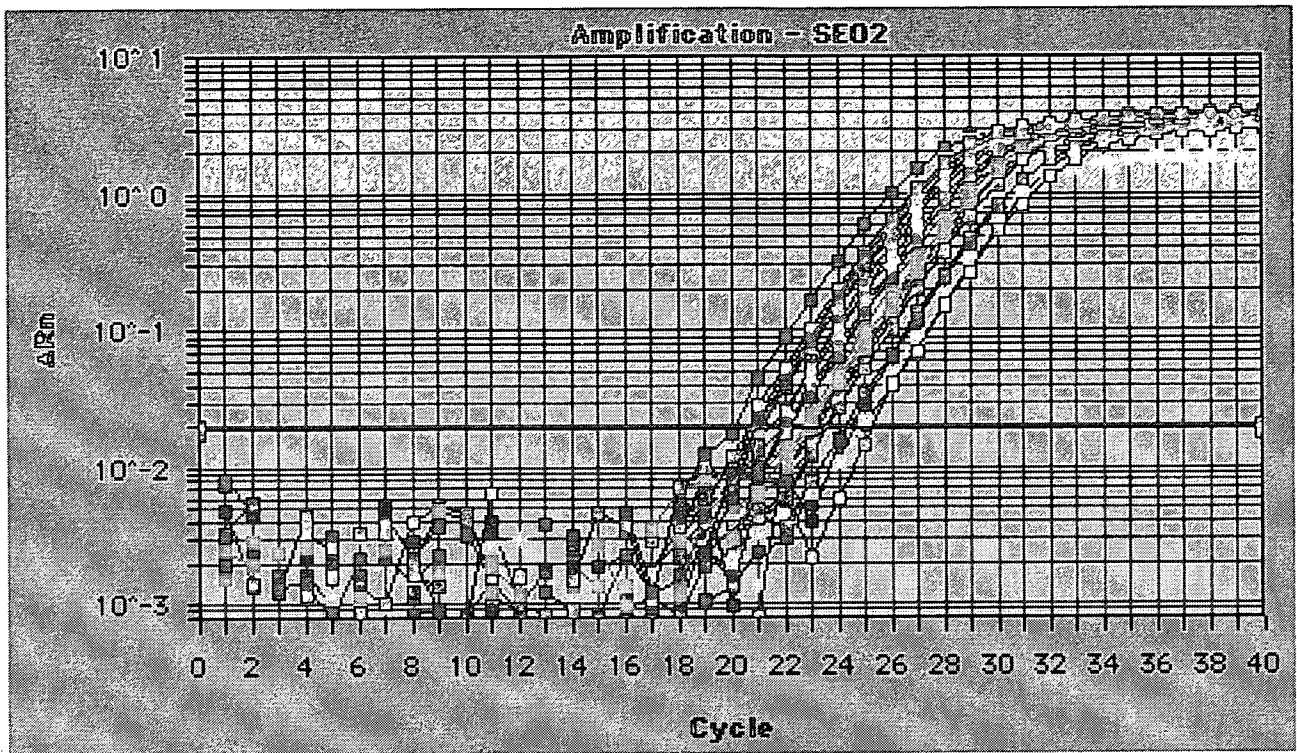


図2 *Salmonella* spp. 菌株の増幅曲線

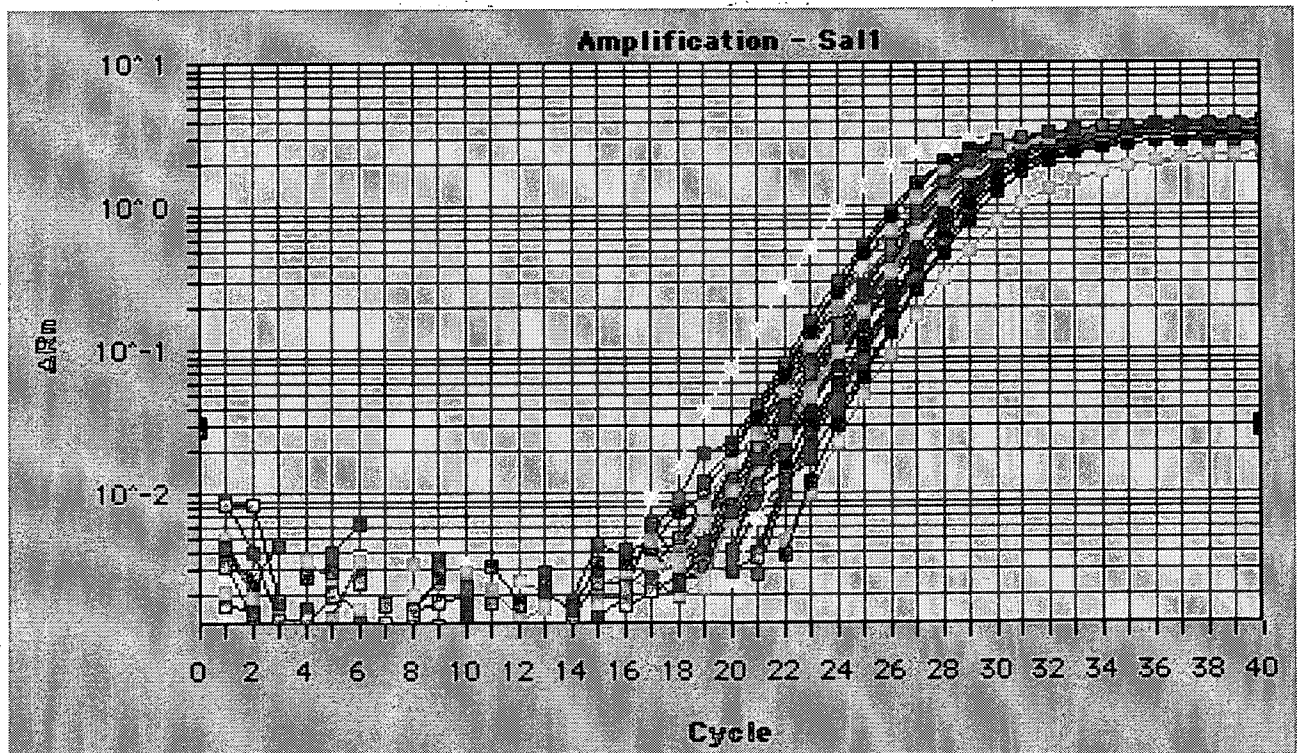


図3 *Salmonella Infantis* 菌株添加糞便試料 検査結果

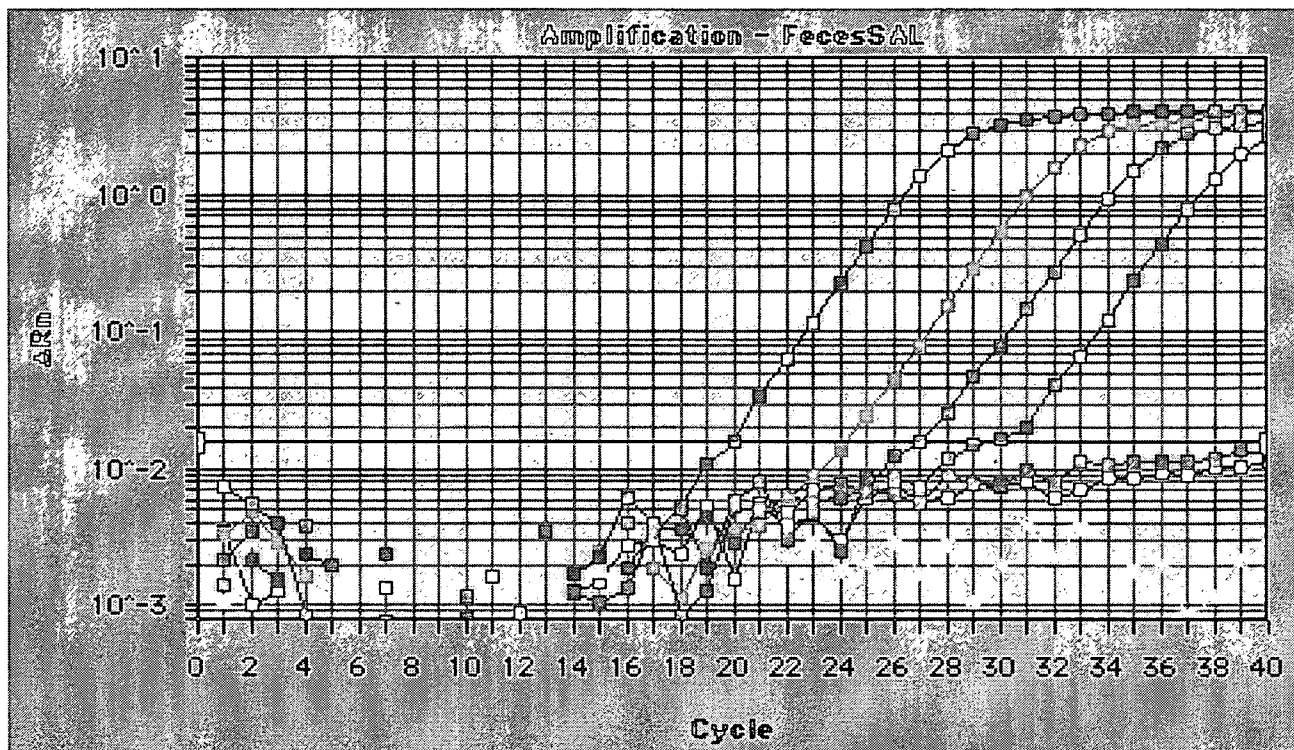


図4 *Bacillus cereus* の増幅曲線

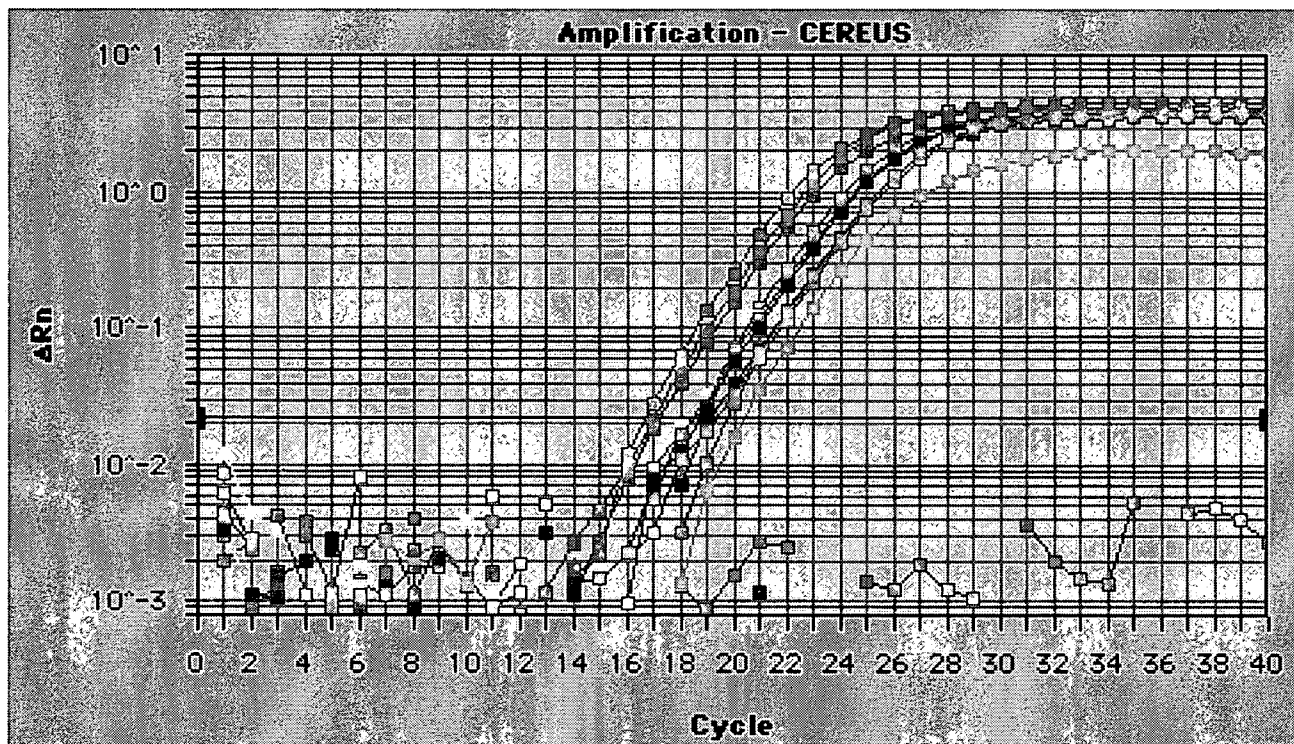
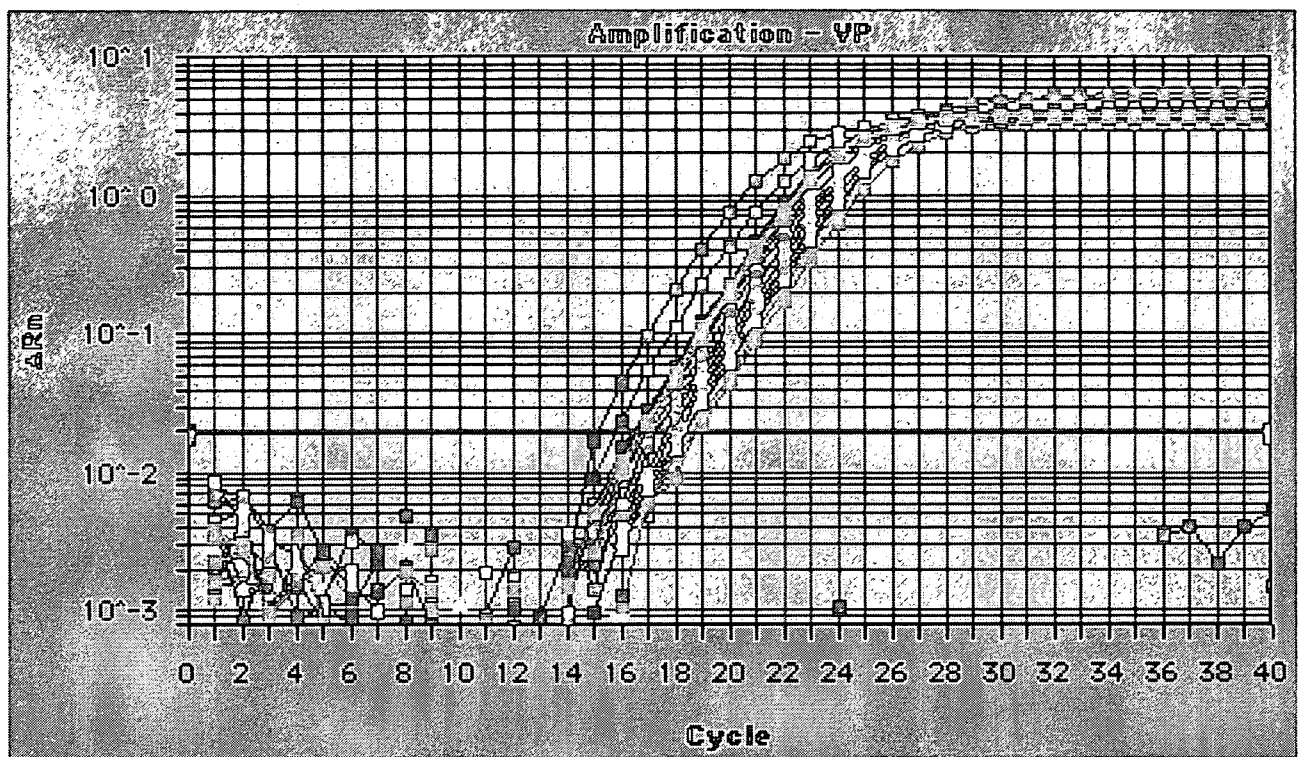


図 5 *Vibrio parahaemolyticus* 菌株の増幅曲線



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
— 主要な食中毒原因菌 8 菌種のスクリーニングのための SYBR Green I PCR の検討 —

分担研究者 澤田幸治 北海道立衛生研究所

要旨 食中毒原因菌のうち発生頻度の高い 8 菌種 (*Salmonella* spp.、*Campylobacter jejuni*、腸管出血性 *Escherichia coli*、TDH 産生性 *Vibrio parahaemolyticus*、*astA* 陽性 *E. coli*、*Clostridium perfringens*、嘔吐毒産生 *Bacillus cereus*、*Staphylococcus aureus*) を患者糞便から迅速に検出するための duplex SYBR Green I PCR (SG-PCR) について検討した。さらに、ハンバーグに添加した食中毒原因菌 8 菌種を低・高速遠心後密度勾配遠心法により濃縮し、回収された食中毒菌を培養法と SG-PCR により定量した。ハンバーグ 3g へ添加した食中毒菌の検出限界は腸管出血性 *E. coli* が 10^2 CFU、TDH 産生性 *V. parahaemolyticus* と *C. perfringens*、*B. cereus* が 10^3 CFU、*Salmonella* spp. が 10^4 CFU および *C. jejuni* と *astA* 陽性 *E. coli*、*S. aureus* が 10^5 CFU であった。Duplex SG-PCR を食中毒 3 事例の糞便検査に応用し、事例 1 から *C. jejuni*、事例 2 から EPEC と *Plesiomonas shigelloides*、事例 3 から *C. jejuni* と *astA* 陽性 *E. coli* が検体搬入後 2~3 時間以内に検出された。

研究協力者

福島 博 島根県保健環境科学研究所
微生物部長

A. 研究目的

食中毒の集団発生時における微生物検査の目的は、その事件の疫源を迅速かつ正確に検出し、その後の二次感染の発生および再発を防止するための的確な情報を提供することにある。集団事例では患者便や推定原因食品などが採取され、原因微生物が検査されるが、細菌性食中毒の検査は長時間にわたる煩雑な分離・同定作業を必要とするため、これまで検査法の改良をはじめ検査時間の短縮が試みられてきた。1990 年代に入り糞便からの食中毒菌の検査に PCR 法が、近年ではリアルタイム PCR 法が糞便だけでなく推定原因食品からの迅速検出に応用されるようになってきた。多くの菌種を対象とする細菌性食中毒の検査では安価で簡便に同時検出できる方

法が理想的であり、リアルタイム PCR 法は既存の分子生物学的迅速検査法のうちでこの目的に最も適している。リアルタイム PCR 法には二本鎖 DNA に特異的に挿入(インターカレート)して蛍光を発する色素 (SYBR green I) を用いる方法と、特異的な DNA 配列に蛍光色素を結合させた TaqMan プローブを用いる方法が広く用いられている。

2001 年の炭疽菌によるバイオテロを契機に配備した LightCycler (Roche) の有効利用を目的に、食中毒菌の網羅的迅速スクリーニングシステムを開発した^{3,4)}。食中毒の急性期患者 5 名の糞便 (10 倍懸濁液) から QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) を用い DNA を抽出し、食中毒菌 8 菌種を duplex SYBR Green I PCR (SG-PCR) で 2 時間以内に検査し、次いで他のセットで陰性確認を行った。PCR 反応ガラスカピラリー中の DNA 量は糞便 1g 中の約 1/40,000 となり、本法の検出感度は $10^4 \sim 10^6$ CFU/g であった。食中毒患者の急性

期糞便には $>10^6$ CFU/gの食中毒菌が含まれており、少量菌を保菌する健康保菌者との鑑別が容易であることを報告した。

近年の食品媒介性疾病の増大に対応し、食の安全・安心の確保のため、食品媒介性微生物の迅速検出法の開発が望まれ、食品や環境材料からの病原微生物の検出法が検討されてきたが、食品中の大量で複雑なマトリックスやそこに生存する大量の微生物叢の中から少量の食中毒菌を検出することは極めて難しい。これまで、DNA ハイブリダイゼーションや酵素免疫法など様々な方法が試みられたが、その検出菌量は最も効率が良いものでも $10^3\sim 10^4$ CFU/gで、推定原因菌の確証には更に増菌培養を必要とし、より優れた分別・濃縮技術の開発が期待されている。我々はその一方法として食品中の食中毒菌をろ過と低速および高速遠心で濃縮した後、密度勾配用媒体のPercoll (Amersham)を用いた浮遊法による食品マトリックスの除去と沈澱法による標的菌の分別・濃縮を開発した。食中毒発生時には食品の搬入後2時間以内に原因菌の分別・濃縮を終了し、定量SG-PCRにより $10^1\sim 10^3$ CFU/gの原因菌を1時間以内に検出できることを報告した⁵⁾。

しかし、これまでに報告した食中毒原因菌検出用プライマーの中には食品中の少量菌を検出するには感度が低いプライマーも含まれていた。本研究では表1に示す食中毒原因菌のうち発生頻度の高い上位7菌種と近年食中毒事例の報告が増加している*astA*陽性*E. coli*を含めた8菌種を対象とし、duplex SG-PCRによる患者便からの食中毒原因菌の網羅的迅速検出と食品からの少量菌の検出に適したプライマーについて検討した。

B. 研究方法

1) 使用菌株

主要な食中毒原因菌8菌種(*Salmonella* Enteritidis、*C. jejuni*、腸管出血性*E. coli*、TDH産生性*V. parahaemolyticus*、*astA*陽性

E. coli、*C. perfringens*、嘔吐毒産生*B. cereus*、*S. aureus*)の検出プライマーの特異性の検査に使用したその他の食中毒原因菌を含め、24種類の食中毒原因菌を表1に示した。

1) プライマーセット

表2に*Salmonella* spp.検出用プライマー Stynva、*C. jejuni*検出用プライマー AB、腸管出血性*E. coli*検出用プライマー eae、TDH産生性*V. parahaemolyticus*検出用プライマー Tdh、*astA*陽性*E. coli*検出用プライマー EAST、*C. perfringens*検出用プライマー CPerf、嘔吐毒産生*B. cereus*検出用プライマー Ces、*S. aureus*検出用プライマー FemBのシークエンス等をduplex PCRのための組み合わせとともに示した。TDH産生性*V. parahaemolyticus*と*astA*陽性*E. coli*検出用プライマーは従来のもを使用した。*Salmonella* spp.と*C. jejuni*、腸管出血性*E. coli*、*C. perfringens*、*S. aureus*検出プライマーは最近論文に報告されたものから選択した。嘔吐毒産生*Bacillus cereus*検出プライマーは嘔吐毒産生に関与するセレウリドの*ces* gene²⁾ (GenBank accession no. DQ360825)を標的とし新たに設計した。

2) 糞便の duplex SYBR Green I PCR

食中毒急性期の患者糞便の滅菌生理食塩10倍懸濁液200 μ LをQIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen、Hilden、Germany)で処理し鋳型DNAを抽出した。SG-PCRは反応試薬SYBR Premix EX TaqTM(タカラバイオ株式会社)を用いLightCycler (Roche)で行った。試薬の調合と反応条件は添付の説明書に従った。Duplex SG-PCRでは2セットのプライマー量をPCRグレード水量で調整し、PCR混合液20 μ Lを作成した。アニーリング温度とサイクル数は60 $^{\circ}$ Cと30サイクルとした。蛍光シグナルは伸長反応の後に1サイクルごとに記録され、反応後にF1 channelでのSYBR Green I 蛍光色素検出を行った。また、PCR増幅産物は融解曲線分析(T_m 値の測定)を行った。全反応において陰性コントロールとして

PCR グレード水、陽性コントロールとして当該食中毒菌の DNA を用いた。定量 SG-PCR の検量線は DNA 抽出液の 10 段階希釈液を増幅し作成した。

3) 食中毒検査のための糞便の duplex SG-PCR

LightCycler に装着できるガラスカピラリー 32 本のうち 8 本ずつに表 2 に示す 2 種類ずつの T_m 値が異なるプライマーをセットした 4 グループについて初回検査を行った。各グループは陰性コントロールと 2 種類の陽性コントロール、糞便 5 検体からの鋳型 DNA とした。次回検査は他のプライマーセットで行った。増幅曲線で増幅を確認し、融解曲線分析で標的細菌と同一の T_m 値を示した検体を陽性と判定した。定量 PCR における検量線作成には各食中毒菌の純培養菌液 (10^7 CFU/mL) を QIAamp DNA Stool Mini Kit で抽出して得られた DNA を使用した。

5) ハンバーグへの添加回収試験

ア) 低速および高速遠心による濃縮

市販の加熱加工済みハンバーグ 25g と Tween 20 (0.02%) - Buffered Peptone Water 225 mL を Stomafilter P-type へ入れ、Stomacher で 1 分間破碎後、ろ過した。ろ液 30 mL をプラスチック遠心管に分注し、8 本の遠心管に食中毒原因菌の 10 段階希釈液 ($10^0 \sim 10^7$ CFU) を添加し、 $1,880 \times g$ 5 分間遠心後、その上清を $16,000 \times g$ 5 分間遠心し得た沈殿 1.5 mL を再遠心し、0.5 mL に濃縮した。

イ) 密度勾配遠心法による分別と濃縮

浮遊法: 濃縮物 0.5 mL を密度 1.050 g/mL の Percoll 1 mL と混合し、 $4,500 \times g$ 15 分間遠心後、浮遊した食品マトリクスを除去し、底層の 0.5 mL を試料とした。

沈殿法: マイクロチューブに密度 1.123 g/mL の Percoll 0.6 mL を入れ、その上に密度 1.050 g/mL の Percoll 0.6 mL を重層した。密度が 1.033 g/mL と 1.121 g/mL の Density Marker Beads (DMS, Pharmacia Biotech) 0.2 mL ずつと試料を Percoll 層に重層し、 $14,500 \times g$ 5 分間遠心後、

両 DMS 間の約 1 mL の Percoll 層をピペットで採取した。生食で 1.5 mL に調整後二分したものを遠心洗浄し、一方を生食 (50 μ l) に浮遊し生菌数の測定に、他方を Instagene Matrix (50 μ l) (Bio Rad) を用い DNA 抽出し、定量リアルタイム PCR に供した。食品 3g は 2 時間以内に 0.1 mL に濃縮された。

ウ) 定量 SYBR Green I PCR

8 種類の食中毒原因菌検出用プライマーを用い、SYBR Premix Ex Taq の操作方法に従い LightCycler (Roche) で検査した。検量線作成には各食中毒菌の純培養菌液 (10^7 CFU/mL) 1 mL を遠心し得られたペレットを Instagene Matrix (100 μ l) で処理して得られた DNA を使用した。

C. 結果

1) 食中毒原因菌 8 菌種検出プライマーの特異性

表 2 に各プライマーの SG-PCR による特異性を示した。各プライマーは標的遺伝子を保有する食中毒菌のみを増幅した。特に、今回新しく設計した、嘔吐毒産生 *B. cereus* 検出用プライマー Ces は嘔吐毒産生株 10 株のみが陽性で、嘔吐毒非産生株 30 株は全て陰性であった。

2) Duplex SYBR Green I PCR

表 2 に示す食中毒菌 8 菌種を一度に検出するための duplex SG-PCR における 4 組のプライマーの組み合わせによる、融解曲線解析を図 1 に示した。各組み合わせにおいて T_m 値に 1~5 $^{\circ}$ C の違いがありそのピークを明確に区別することができた。*astA* 陽性 *E. coli* の T_m 値は 84.4~85.4 と菌株により違いがあった。

3) 食中毒事例の検査

平成 19 年度に島根県で発生した食中毒 11 例のうち複数の糞便検体が検査できた 3 事例の検査結果を表 4 に示す。事例 1 は焼肉店で生牛レバーをはじめ焼肉料理を喫食した 11 名のうち 6 名が発症し、発症後 7 日後に採取された糞便 3 検体中 2 検体から duplex SG-PCR により *C. jejuni* の種特異遺伝子が検出され、その後の培養検査

により当該菌が分離された。事例 2 では飲食店で夕食を喫食した 13 名のうち 7 名が発症し、翌日に採取された糞便 5 検体中 2 検体から初回の duplex SG-PCR で *eaeA* 遺伝子が 2 検体から検出され、2 回目の duplex SG-PCR で *Plesiomonas shigelloides* の *gyrB* 遺伝子が別の 2 検体から検出された。培養検査では *P. shigelloides* が PCR 陽性の 2 名から分離された。*eaeA* 遺伝子陽性検体からは他の病原大腸菌の遺伝子は検出されず、EPEC が存在することが示唆されたが、*eaeA* 遺伝子保有株を分離することは出来なかった。事例 3 では飲食店で生鶏レバーなどを含む料理を喫食した 8 名全員が発症し、4 日後に採取された糞便 5 検体についての初回の duplex SG-PCR で 3 検体から *C. jejuni* の種特異遺伝子、うち 1 検体から *astA* 遺伝子が検出された。糞便 8 検体の培養検査で 4 検体から *C. jejuni*、1 検体から *astA* 陽性 *E. coli* が分離された。

4) ハンバーグへの添加回収試験

表 5 に食中毒原因菌 8 菌種の検量線の作成に用いたデータを用い、検出限界を標的遺伝子の増幅の立ち上がりサイクル数(Cycle threshold: C_T 値)で示した。SG-PCR による各菌の検出限界は *Salmonella* Enteritidis と腸管出血性 *E. coli* が 10^3 CFU/mL、*astA* 陽性 *E. coli* と *C. jejuni*、TDH 産生性 *V. parahaemolyticus*、*C. perfringens* が 10^2 CFU/mL、嘔吐毒産生 *B. cereus* と *S. aureus* が 10^1 CFU/mL であった。*B. cereus* と *S. aureus* 以外の菌では検出限界よりも 1 log 少ない菌数でも増幅が確認されたが、定量できない増幅量であった。

ハンバーグステーキへ添加した食中毒原因菌 8 菌種を密度勾配遠心法により濃縮した後、培養と定量 SG-PCR による回収菌数を表 6 に示した。*Salmonella* Enteritidis は $10^{3.6}$ CFU/3g 添加試料から分離され、生菌数は $10^{2.2}$ CFU/3g で回収率は 4.4% であった。SG-PCR では $10^{4.6}$ CFU/3g 添加試料から $10^{3.8}$ CFU/3g 検出され、回収率は 17.6% であった。腸管出血性 *E. coli* は $10^{2.9}$

CFU/3g 添加試料から分離培養と SG-PCR で分離または検出され、生菌数は $10^{2.5}$ CFU/3g で回収率は 42.5% であった。SG-PCR では検査した 2 試料のうち 1 試料から $10^{3.0}$ CFU/3g 検出されたが、他の試料では定量できない程度の陽性反応を示し、回収率は 11.4% であった。他の菌のデータは表 5 に示すとおりであるが、ハンバーグステーキに添加した食中毒原因菌の密度勾配遠心法で濃縮した試料からの SG-PCR による検出限界は純培養菌液からのそれに比較し、腸管出血性 *E. coli* を除く 7 菌種では 1~4 log 低下した。SG-PCR による検出限界と回収率は *astA* 陽性 *E. coli* では $10^{5.7}$ CFU/3g と 0.4%、*C. jejuni* では $10^{5.1}$ CFU/3g と 2.5%、TDH 産生性 *V. parahaemolyticus* では $10^{3.1}$ CFU/3g と 78.89%、*C. perfringens* では $10^{3.8}$ CFU/3g と 2.7%、嘔吐毒産生 *B. cereus* では $10^{3.9}$ CFU/3g と 2.7%、*S. aureus* では $10^{5.4}$ CFU/3g と 0.04% であった。

D. 考 察

食品および水を媒介し感染する細菌感染症の原因菌 15 菌種の duplex SG-PCR による網羅的迅速検査法については既に報告した^{3,4)}。本研究では食中毒原因菌のうち発生頻度が高く、LightCycler を用いた duplex SG-PCR で初回の試験に用いる食中毒菌 8 菌種 (*Salmonella* spp.、*C. jejuni*、腸管出血性 *E. coli*、TDH 産生性 *V. parahaemolyticus*、*astA* 陽性 *E. coli*、*C. perfringens*、嘔吐毒産生 *B. cereus*、*S. aureus*) の検出プライマーの感度の向上を目的とし、最近報告されたプライマーを文献上で比較し選択した。特に、従来のプライマーでは検出感度が低かった *C. perfringens* と嘔吐毒産生 *B. cereus*、*S. aureus* については検出感度の高いプライマーを検討した。*C. perfringens* は 16S rRNA を標的としたプライマー、*S. aureus* は種特異遺伝子 *femB* を標的としたプライマーを使用することにより、当該菌の検出感度は向上した。嘔吐毒産生 *B. cereus* については嘔吐毒産生に関与するセレウリ

ドの *ces* 遺伝子²⁾を標的することにより特異性と感度の高いプライマーを設計することができた。腸管出血性 *E. coli* と *C. jejuni*、*Salmonella* spp. 検出用プライマーは増幅産物の T_m 値が duplex SG-PCR での組み合わせに適し感度の高いものを選択した。TDH 産生性 *V. parahaemolyticus* と *astA* 陽性 *E. coli* については従来のプライマーを使用し、表 2 と図 1 に示す 8 菌種を網羅的に検出する duplex SG-PCR システムを開発した。これらの 8 菌種の食中毒菌を検査することにより、表 1 に示すとおりわが国で発生する食中毒事例のほとんどに対応することができる。

Dduplex SG-PCRを2002年から2006年に発生した食中毒20事例の検査に応用した。細菌培養検査で原因菌が検出されなかった1事例を除く19事例から原因菌の標的遺伝子が検出され、食中毒検査の迅速化に役立てることができた。2007年には3事例を検査し、表4に示すようにduplex SG-PCRにより原因菌を推定し、効率的な分離作業が行えた。また、1事例においてはduplex SG-PCR の初回試験で *eaeA* 遺伝子が検出され、2回目の試験では *P. shigelloides* の種特異遺伝子が検出された。その後の分離培養においては *eaeA* 遺伝子を保有する大腸菌を分離することはできなかったが、*P. shigelloides* については分離培地に発育した1~2集落を探し分離することができた。これらのことはduplex SG-PCRの初回試験で原因と推測される菌が検出されても、混合感染の有無の確認を目的とした他のプライマーによる試験は欠くことができないこと、また、SG-PCRによるスクリーニングは *P. shigelloides*をはじめ *Yersinia enterocolitica* や *Aeromonas hydrophila*、*Providencia alcalifaciens* などの発生頻度が極めて低く、培養する機会の少ない食中毒原因菌の検査に極めて有効な方法であることが示された。これらの稀少な食中毒原因菌のスクリーニングにも特異性に優れ検出感度の高いプライマーの再検討が必要である。

新たなプライマーセットを用いた SG-PCR による

食品からの食中毒原因菌の検出について、市販レトルト食品のハンバーグステーキへの添加回収試験を行い検討した。食中毒における原因食品の多くはハンバーグなどの調理済み食品であり、これらの食品には動物性タンパク質の他に小麦粉、食油、調味料などをはじめ PCR 反応阻害物質や分別不可能な微細なマトリックスが含まれている。本研究では密度勾配媒体の Percoll を用い浮遊法と沈殿法を用いることにより、食品 3g に含まれる食中毒原因菌を生菌状態で高率に回収すると共に PCR 反応阻害に関わる食品マトリックスを除去し、その検体量を 1 mL に濃縮した。ハンバーグステーキへ添加した8種類の食中毒原因菌の濃縮物からの定量 SG-PCR による回収量を生菌数測定の結果と比較・評価した。生菌数測定による回収量は菌種によって異なるが、添加量から 0~2 log 低下し、その回収率は腸管出血性 *E. coli* と *C. jejuni*、*V. parahaemolyticus* が 10~43%、*Salmonella* Enteritidis は 4%であり、その他の菌は 0.2~0.9% 以下であった。定量 SG-PCR による回収量は腸管出血性 *E. coli* を除く7菌種では添加量から 1~4 log 低下した。その回収率は *V. parahaemolyticus* が 79%、*Salmonella* Enteritidis が 20%、腸管出血性 *E. coli* が 11%と高率であるのに対し、*C. jejuni* と *C. perfringens*、*B. cereus* は 3%、*astA* 陽性 *E. coli* は 0.4%であり、*S. aureus* は 0.04%と低率であった。今回の試験ではハンバーグのみについて添加回収試験を行ったが、既に報告した 12 種類の食品への添加回収試験³⁾とほぼ同様な成績であり、今回新たに使用したプライマーも食品からの食中毒原因菌の検出に十分対応できるものと考えられた。いずれにせよ、密度勾配遠心法により数グラムの食品から濃縮した試料から SG-PCR で $\leq 10^3$ CFU/g の食中毒菌を確実に検出することは難しく、本法は食品を汚染する $>10^4$ CFU/g の食中毒菌の検出に有効であることが示された。

細菌性食中毒は食中毒原因菌が食品中で増殖し産生される大量の毒素や増殖した菌の摂取

により発生する毒素型および中間型食中毒と食品と共に摂取された食中毒菌が腸管内で増殖して発生する感染型食中毒に分けられる。*S. aureus* や嘔吐毒産生 *B. cereus*, *C. perfringens* などの毒素型および中間型食中毒における摂取菌量は 10^4 個以上で多くの事例では 10^7 個程度の菌の摂取により発生する⁸⁾。また、*Salmonella* spp., *C. jejuni*, *E. coli* などの感染型食中毒においても潜伏期間が 50~60 時間以内の事例では摂取菌量は *Salmonella* 食中毒の研究で 10^4 個以上であることが報告されており¹⁾、このような大量菌に汚染された食品を摂取した事例では SG-PCR は極めて有効な迅速検査法であることが示唆された。

以上のことから、食中毒の急性期患者の糞便に排泄される $\geq 10^6$ CFU/g の原因菌を duplex SG-PCR により 2 時間以内に特定し、並行して食品中の原因菌を密度勾配遠心法により分別・濃縮した試料について SG-PCR で検査することにより、毒素型食中毒および潜伏期間が短い感染型食中毒においては検体搬入から 3 時間以内に原因食品を特定することができる。

E. 文献

- 1) Abe, K., Saito, N., Kasuga, F., and Yamamoto, S.: Prolonged incubation period of salmonellosis associated with low bacterial doses. *J. Food Prot.* 67: 2735-2740, 2004.
- 2) Fricker, M., Messelhauser, U., Busch, U., Scherer, S., and Ehling-Schulz, E.: Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in food and recent food-borne outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1892-1898, 2007.
- 3) 福島博、角森ヨシエ: リアルタイム PCR 法による食中毒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., Tsunomori, Y. and Seki, R.: Duplex real-time SYBR Green assays for

detection of 17 species of food-or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol*41: 5134—46. 2003

- 5) Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R., and Fujiwara, S.: Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:92-100, 2007
- 6) Hoorfar, J., Ahrens, P., and Radstrom, P.: Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol*, 38:3429-3435, 2000
- 7) Klotz, K., Opper, S., Heeg, K., and Zimmermann S: Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. *J Clin Microbiol.* 41: 4683 - 4687, 2003
- 8) Kramer, J. M., and Gilbert, R. J.: *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: Food borne bacterial pathogens. Doyle, M. P. (ed.) pp21-27, Marcel Dekker, Inc. New York, 1988
- 9) Nielsen, E.M., and 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) 西淵光昭, 竹田美文, 多田淳, 大橋鉄雄, 西村直行, 尾崎博子, 他: PCR による腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒遺伝子および類似毒素遺伝子の検出法. *日本臨床*1992;50 特別号: 348—52.
- 11) Nogva, H.K., Bergh, A., Holck, A., and Rudi, K.: Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. 66:4029-4037
- 12) Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K-I., and Enomoto, K.: Characterization of enteropathogenic and

enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. J Clin Microbiol 40:294-7.

2002

13) Wise, M.G., and Siragusa, G.R.: Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. Appl. Environ. Microbiol. 71: 3911-3916,

2005

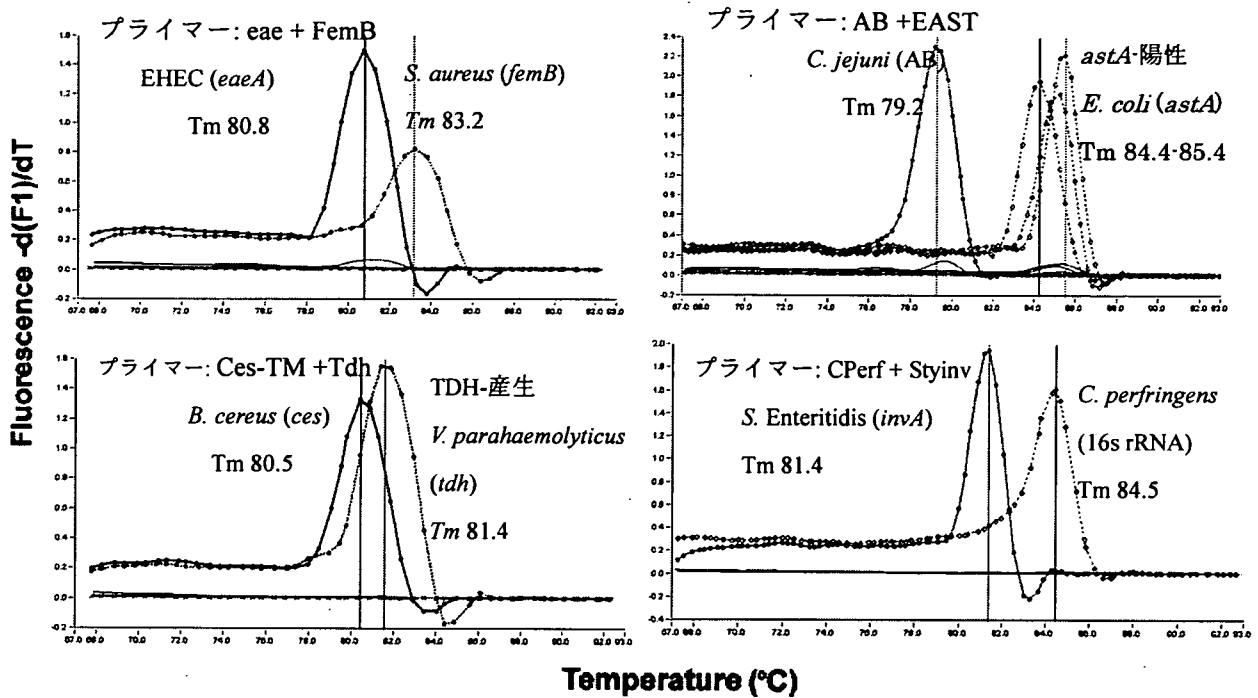


図 1 Duplex SYBR Green I PCR 増幅産物の融解曲線解析.

表1 わが国における細菌性食中毒の発生状況:

原因菌	astA陽性大腸菌を除く主要7菌種による食中毒の発生頻度 (食中毒統計)							
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	469	428	447	491	558	645	416	335
<i>Salmonella</i> spp.	518	361	465	350	225	144	124	89
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	422	307	229	108	205	113	71	28
<i>Staphylococcus aureus</i>	87	92	72	59	55	63	61	43
<i>Clostridium perfringens</i>	32	22	37	34	28	27	35	20
<i>Bacillus cereus</i>	10	9	7	12	25	16	18	5
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	16	24	13	12	18	24	24	18
小計	1554	1243	1270	1066	1114	1032	749	538
小計 / 総数(%)	87	85	92	96	97	97	97	97
その他の <i>Escherichia coli</i> *	203	199	83	35	27	25	19	9
<i>Clostridium botulinum</i>	—	—	1	—	—	—	1	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	4	8	—	1	—	—	—
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1	5	1	2	2	—	—	—	—
<i>Vibrio cholerae</i>	1	1	2	—	—	—	—	—
<i>Shigella</i> spp.	1	3	2	1	1	—	1	—
その他の細菌	18	18	9	6	9	8	4	5
総数	1783	1469	1377	1110	1152	1065	774	553

a: astA陽性大腸菌と腸管出血性大腸菌以外の eaeA陽性大腸菌はその他の病原大腸菌に含まれる。

表2 主要な8食中毒原因菌のSYBR Green I PCR

菌種 (遺伝子)	菌株	各プライマーを用いたSYBR Green I PCRによる結果							
		ae	EAST	Styinv	AB	Tdh	CPerf	FemB	Ces
<i>Escherichia coli</i> EIEC O124:HNM (<i>virA</i>)	EA32	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> EPEC O55 (<i>aeA</i>)	EC-2736	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> EPEC O153 (<i>aeA</i> and <i>astA</i>)	EC-2649	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> EHEC O157:H7 (<i>aeA</i> , <i>Stx1</i> and <i>Stx2</i>)	SE-02027	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ETEC O148 (LT, ST, and <i>astA</i>)	EC-3515	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ETEC O169 (ST and <i>astA</i>)	EC-4725	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> EAEC O111 (<i>aggR</i> and <i>astA</i>)	EC-4131	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	I00031	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Sal-2339	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O3/B4	Pa241	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O4b	SP988	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Providencia alcalifaciens</i>	NIID124	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	NIID123	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	SC 009	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1	ATCC 14035	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i> O139	NIID63-93	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i> non-O1	SVP84	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> O3:K6 (<i>tdh</i>)	SVP02	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> O3:K6 (<i>trh</i>)	NIIDK4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> O1	ATCC 7966	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	H2	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	SS 05	-	-	-	-	-	-	+	-
Emetic <i>Bacillus cereus</i> (<i>ces</i>)	No.127 とその 他の9菌株	-	-	-	-	-	-	-	+
Non-emetic <i>B. cereus</i>	No.68 とその他 の29菌株	-	-	-	-	-	-	-	-

+, 陽性; -, 陰性、プライマーセットは表3を参照。

表 3 プライマーセット

Duplex PCRのためのプライマーセット	菌種	標的遺伝子プライマー名	シーケンス	GenBank accession no.	位置	増幅産物の大きさ	Tm 値	文献	
1	EHEC, EPEC	<i>eaeA</i>	<i>eae</i> -F2	CATTGATCAGGATTTTCTGGTGATA	Z11541	899-924	106 bp	80.8	9
			<i>eae</i> -R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA		1000-979			
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	FemB-fw	AATTAACGAAATGGCAGAAACA	AF106850	277-299	93 bp	83.2	7
			FemB-rv	TGCGCAACACCCTGAACTT		370-351			
2	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> -種特異 DNA	AB-F	CTGAATTTGATACCTTAAGTGCAGC	AL111168	381121	86bp	79.2	11
			AB-R	AGGCACGCCTAAACCTATAGCT		-381135 381206 -381185			
3	<i>astA</i> -positive <i>E. coli</i>	<i>astA</i>	EAST-1S	GCCATCAACACAGTATATCC	L11241	63-82	106 bp	84.8	12
			EAST-1AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC		168-149			
3	TDH-positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	Tdh199-F	GGTACTAAATGGCTGACATC	M10069	504-523	251 bp	81.4	10
			Tdh199-R	CCACTACCACTCTCATATGC		735-754			
4	<i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	<i>ces</i> -TM-F	GATGTTTGGCAGGATGCAA	DQ360825	8689-8707	65 bp	80.5	本研究
			<i>ces</i> -TM-R	CTTTCGGCGTGATACCCATT		8793-8734			
4	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	StyinvA-JHO-2-right	TCGTATTCCATTACCTACC	M90846	167-186	119 bp	80.8	6
			StyinvA-JHO-3-left	AAACGTTGAAAACTGAGGA		285-234			
4	<i>Clostridium perfringens</i>	16S r RNA	CPerf165F	CGCATAACGTTGAAAGATGG	AM889032	154-173	105 bp	84	13
			CPerf269R	CCTTGGTAGGCCGTTACCC		258-240			

表4 平成19年度の島根県における食中毒事例の検査

事例番号	発生日時	検査日時	発生施設	原因食品	患者数/ 喫食者	原因菌	糞便検査 (陽性検体数/検体数)		
							Duplex SYBR Green PCR		分離 培養
							初回	2回目	
1	7/4	7/10	飲食店	食事 (生牛レバー)	6/11	<i>C. jejuni</i>	2/3	-	2/3
2	10/21	10/22	飲食店	食事	7/13	EPEC <i>P. shigelloides</i>	2/5	2/5	0/5 2/5
3	11/26	11/30	飲食店	食事 (生鶏レバー)	8/8	<i>C. jejuni</i> <i>astA</i> 陽性 <i>E. coli</i>	3/5 1/5	-	4/7 1/7 1/8

表5 純培養した食中毒原因菌8菌種のSYBR Green I PCR による検出限界

試験	<i>S. Enteritidis</i>			<i>E. coli</i> O157:H7			<i>astA</i> -陽性 <i>E. coli</i>			<i>C. jejuni</i>		
	菌量 ^a	平均 C _T 値 ±SD ^b		菌量	平均 C _T 値 ±SD		菌量	平均 C _T 値 ±SD		菌量	平均 C _T 値 ±SD	
1	7.5	12.55 ±	0.35	7.1	12.55 ±	0.27	7.3	13.24	0.08	7.4	11.25 ±	0.19
2	6.5	16.19 ±	0.75	6.1	15.74 ±	0.37	6.3	16.31 ±	0.28	6.4	14.85 ±	0.75
3	5.5	19.30 ±	0.31	5.1	19.16 ±	0.82	5.3	19.79 ±	0.30	5.4	18.17 ±	0.88
4	4.5	23.22 ±	0.21	4.1	22.72 ±	0.19	4.3	22.59 ±	0.67	4.4	21.15 ±	0.63
5	3.5	26.07 ±	0.82	3.1	25.46 ±	0.34	3.3	24.94 ±	1.47	3.4	24.41 ±	0.67
6	2.5			2.1			2.3	28.37 ±	1.01	2.4	27.38 ±	0.61
7	1.5			1.1			1.3			1.4		
8	0.5			0.1			0.3			0.4		

試験	TDH-産生 <i>V. parahaemolyticus</i>		<i>C. perfringens</i>		嘔吐毒産生 <i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		
	菌量	平均 C _T 値 ±SD	菌量	平均 C _T 値 ±SD	菌量	平均 C _T 値 ±SD	菌量	平均 C _T 値 ±SD	
1	7.7	11.68 ±	0.43	7.3		7.7		7.2	
2	6.7	15.60 ±	0.95	6.3	13.99 ±	0.18	6.7	14.33 ±	0.54
3	5.7	12.47 ±	0.25	5.3	17.19 ±	0.91	5.7	17.96 ±	0.94
4	4.7	22.60 ±	0.52	4.3	19.75 ±	0.32	4.7	21.36 ±	0.68
5	3.7	17.11 ±	0.18	3.3	22.43 ±	0.53	3.7	24.69 ±	0.54
6	2.7	29.94 ±	1.72	2.3	25.46 ±	1.46	2.7	28.25 ±	1.18
7	1.7			1.3			1.7	21.08 ±	0.60
8	0.7			0.3			0.7		0.2

a: log 10 CFU/ml, b: 3試験の平均値

表6 ハンバーグステーキへ添加した食中毒原因菌8菌種を密度勾配遠心法により濃縮した後における培養と

定量SYBR Green I PCR による回収

試験	添加菌数(log10 CFU/3 g) および生菌数測定とSYBR Green I PCRによる回収菌数 (log10 CFU/3 g)*														
	<i>S. Enteritidis</i>				<i>E. coli</i> O157:H7				<i>astA</i> -陽性 <i>E. coli</i>						
	回収量		回収率 %		回収量		回収率 %		回収量		回収率 %				
	添加菌数	生菌数	定量PCR	生菌数	定量PCR	添加菌数	生菌数	定量PCR	生菌数	定量PCR	添加菌数	生菌数	定量PCR	生菌数	定量PCR
1															
2	7.6	6.2	6.8	4.4	22.5	7.9	7.5	6.1	42.5	4.1	7.7	4.7	4.8	0.1	0.5
3	6.6	5.2	5.6	4.4	20.4	6.9	6.5	5.7	42.5	6.5	6.7	3.7	4.2	0.1	0.3
4	5.6	4.2	3.5	4.4	18.8	5.9	5.5	5.0	42.5	14.0	5.7	2.7	3.3	0.1	0.5
5	4.6	3.2	3.8	4.4	17.6	4.9	4.5	4.2	42.5	21.2	4.7	2.3	-	0.4	-
6	3.6	2.2	- ^b	4.4	-	3.9	3.5	+ ^b , 3.0	42.5	12.8	3.7	1.3	-	0.4	-
7	2.4	-	-	-	-	2.9	2.5	+ ^c , 3.0	42.5	134	2.7	-	-	-	-
8	1.4	-	-	-	-	1.9	-	-	-	-	1.7	-	-	-	-
9	0.4	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-
陰性コントロール	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
回収率の平均 ^c				4.4	19.8				42.5	11.4				0.2	0.4

Test no.	添加菌数(log10 CFU/3 g) および生菌数測定とSYBR Green I PCRによる回収菌数 (log10 CFU/3 g)														
	<i>C. jejuni</i>				TDH-産生 <i>V. parahaemolyticus</i>				<i>C. perfringens</i>						
	回収量		回収率 %		回収量		回収率 %		回収量		回収率 %				
	添加菌数	生菌数	定量PCR	生菌数	定量PCR	添加菌数	生菌数	定量PCR	生菌数	定量PCR	添加菌数	生菌数	定量PCR	生菌数	定量PCR
1	8.6	8.1	7.0	31.3	2.3										
2	7.6	7.1	5.5	31.3	2.6	7.1	6.1	7.0	10.0	72.7	7.8	5.2	5.0	0.3	0.3
3	6.6	6.1	5.0	31.3	3.1	6.1	5.1	6.1	10.0	82.2	6.8	4.2	4.7	0.3	0.9
4	5.6	5.1	3.9	31.3	1.8	5.1	4.1	4.9	10.0	54.9	5.8	3.2	3.6	0.3	0.7
5	4.6	4.1	-	31.3	-	4.1	3.1	4.1	10.0	97.0	4.8	2.5	2.7	0.4	1.4
6	3.6	3.1	-	31.3	-	3.1	2.1	3.1	10.0	87.9	3.8	1.5	1.4	0.4	10.3
7	2.6	2.1	-	31.3	-	2.1	-	-	-	-	2.8	-	-	-	-
8						1.1	-	-	-	-	1.8	-	-	-	-
9											0.8	-	-	-	-
陰性コントロール	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
回収率の平均				31.3	2.5				10.0	78.9				0.4	2.7

Test no.	添加菌数(log10 CFU/3 g) および生菌数測定とSYBR Green I PCRによる回収菌数 (log10 CFU/3 g)									
	嘔吐毒産生 <i>B. cereus</i>				<i>S. aureus</i>					
	回収量		回収率 %		回収量		回収率 %			
	添加菌数	生菌数	定量PCR	生菌数	定量PCR	添加菌数	生菌数	定量PCR	生菌数	定量PCR
1						8.4	6.3	3.9	0.9	0.01
2						7.4	5.3	3.8	0.9	0.03
3						6.4	4.3	2.9	0.9	0.05
4	5.9	3.2	3.9	0.2	1.6	5.4	3.3	2.3	0.9	0.09
5	4.9	2.2	3.2	0.2	2.4	4.4	2.3	-	0.9	-
6	3.9	-	2.5	-	4.1	3.4	-	-	-	-
7	2.9	-	-	-	-	2.4	-	-	-	-
8	1.9	-	-	-	-	1.4	-	-	-	-
9	0.9	-	-	-	-					
陰性コントロール	0.0	-	-	-	-	0.0	-	-	-	-
回収率の平均				0.2	2.7				0.9	0.04

a 回収量は2試験の平均値で示した。定量PCR値はそれぞれの食中毒菌についての検量線から求めた。

b これらの検体では検量線から外れ定量できなかったが、+で示す検体では融解曲線解析により陽性反応が確認された。

c 陽性検体のみの平均値を示す。

Real-time PCR を用いた食中毒細菌の網羅的検査法の標準化

分担研究者

澤田 幸治

研究協力者

江藤良樹、中村祥子、村上光一、堀川和美、吉村健清 (福岡県保健環境研究所)

要 旨 Light Cycler (Roche) を用いたインターカレータ法による食中毒原因菌の網羅的検査法は、既に福島ら¹⁾により報告されている。しかし、検査機関によって保有している Real-time PCR 機種及び使用している試薬は異なっているため、Real-time PCR 法による検査法を導入する場合、使用する機種ごとの検査法の標準化が必要である。本研究では当所が保有している ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems 以下 ABI) 及び通常使用している Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI) を用い、福島ら¹⁾の条件で代表的食中毒細菌 (*Salmonella* Enteritidis、*Escherichia coli* O157、*Campylobacter jejuni*、*Staphylococcus aureus*、*Clostridium perfringens*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Bacillus cereus* 及び *astA* positive *E. coli*) を検出できるか否かについて検討を行った。その結果、*E. coli* (O157)、*C. jejuni*、*S. aureus*、*C. perfringens*、*astA* positive *E. coli* では問題なく標的遺伝子を増幅できたが、*S. Enteritidis*、*V. parahaemolyticus*、*B. cereus* の3菌種は標的遺伝子を増幅することができなかった。標的遺伝子が増幅できなかった菌種について、保有機種に最適な反応試薬及び条件を再検討する必要があることが判明した。

A. 研究目的

Light Cycler (Roche) を用いたインターカレータ法による食中毒原因菌の網羅的検査法は、既に福島ら¹⁾により報告されている。しかし、検査機関によって保有している Real-time PCR 機種及び使用している試薬は異なっている。Real-time PCR 法による検査法を導入する場合、使用する機種ごとの検査法の標準化が必要である。本研究では当所が保有している ABI PRISM 7000 (ABI) 及び通常使用している Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI) を用い、福島ら¹⁾の条件で代表的食中毒細菌を検出できるか否かについて検討を行うとともにその問題点を把握

することを目的とした。

B. 研究方法

Real-time PCR を行った機種は ABI PRISM 7000 で、試薬は Power SYBR Green PCR Master Mix を使用した。反応条件はマニュアルに従い、95°C で10分間の酵素の活性化を行った後に、95°C 15秒の熱変性後、60°C 1分間のアニーリングを40サイクル行った。使用したプライマーは表1に示した。鋳型DNAの抽出には、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)、ボイル法及びアルカリ抽出法を用いた。使用した菌株とDNAの抽出法は、表2に示した。