

精確性に関してはAOAC基準が最も厳密であるが、微生物検査の迅速法への適用時には過度に厳密である。ISO16140はAOAC基準と比較すると微生物検査の目的に合うように検討されており、実用的である。

生菌数測定においては、精度と迅速性はトレードオフの関係となりやすい。また実使用状況を鑑みると対数の世界である微生物数計測において1桁の誤差は大きな問題とはならないことが多い (CCFRA guideline #29, Guidelines for establishing the suitability of food microbiology methods, Campden guideline, Campden company, 2001)。その上で今回検討した迅速法3種類のデータセットを考察すると、いずれも実用十分に良好な結果と言える。鮮魚というやや難しい検体 (低温あるいは好塩性の細菌が存在する) であるためA社迅速法においては若干の精度の不良が見られるが、概ね良好である。これらの迅速法は、培養と原理を同一にする手法ではなく、迅速性に主眼を置いており、迅速性と精度のバランスを鑑みるとその有用性が認められて然るべきと考えられる。

そこで、現存の妥当性確認基準のような厳密な評価指針と同時に、実用レベルの迅速法の価値を正当に評価する基準の存在は、有用と考えられ、次項にてその素案を考察する。

C-4 妥当性確認基準 素案

本節では、培養とは全く異なる物理量を指標として迅速測定を目指した手法の評価にお

いて、迅速性ととの両立を考慮した精度の評価基準案を考察する。前節までの結果をもとに、ISO16140、およびCampden guidelineの内容を特に参考としつつ、実績の多いAOAC基準と極端に矛盾しないよう考慮した。

<サンプリング>

データ収集用サンプルの準備について、

- 1) naturally contaminated を基本とするべきと考えられる。(ISO)
- 2) 菌数が少ない食品について菌数の多いサンプルを必要とする場合は、汚染を防いだ状態で室温～35℃下、適切な時間保管したものをサンプルとして認めるべきである。(案)
- 3) 接種-回収試験を行う場合は、少なくとも類似のサンプルから分離された菌株を複数種類混合して接種することが必要。artificially contaminated がデータの多数を占めないことを要求する。(ISO) これは、接種原(菌)液を段階希釈し、無菌のサンプルに接種して得られた結果をまとめるとデータの相関性を実際以上に高く評価してしまうためである(データ非表示、菌叢や、細胞の状態が揃うためと考えられる)。

<測定>

- 1) 繰返し精度については別途、試験を要求する。(ISO)
- 2) その場合、精度確認および実験室間比較データなどの処理時は申請法と、参照法ともに $n=2$ 測定で充分と考える。(ISO)

- 2) 申請法が仕様とする測定レンジ内であるべく均等に分布したデータを収集する。測定レンジ内を3.0log 値毎の区分〔低- (中) -高〕に分け(仕様が3log ~9log であれば3.0~4.9、5.0~6.9、7.0~8.9)、できればそれぞれに少なくとも10個以上のデータポイントが入るように試験する。(ISOは回帰分析のため5区分)
- 3) データの一致率を評価する・・・参照法との差異が±1.0 log 値を上回る差異を示すデータポイントが、+/-、各5%を超えないことを求める(±1.0 log 値以内に90%以上)。

(Campden guideline, 2001)

本案は、他の妥当性確認基準と過度に異なるよう考慮した。その上で上記AOAC、ISO16140の実績等を鑑みると、これらの妥当性確認基準を満たしている方法については、本案にも同等以上に適合するとして扱うべきと考えられる。この案をもとに各迅速法のデータセットを再評価すると、下の通りとなる。

	A迅速法	B迅速法	C迅速法
AOAC	×	×	×
ISO 16140	×	○*	○
本素案	○*	○	○

○、適合；×、不適合

*：若干の調整(機器・解析)を行えば、適合すると考えられる。

D. 総括

本研究では、近年ますます重要性が増している生菌数測定迅速化法について、その精度を評価するための基準について諸外国の例も踏まえつつ検討した。その結果、現在本邦の迅速法はAOAC、ISOの精度評価制度を利用しており、本邦からの申請にあたってはいくつかの課題点があることが判明した(平成18年度)。その内、精度評価の基準に関する問題点は特に重要であると判断した。そこで平成19年度には実験的な検証を行い、平成20年度には現在市販されている迅速法(培養法と原理を異にし、迅速性を高めた方法)についてその有用性を正当に評価できる基準はどうあるべきかについて実験を含めた検討を行い、素案を考察した。

本研究で考察した素案は迅速法により収集したデータセットを用いた精度評価に関する部分のみであり、その他の項目についてはさらに検討を行うことでより良い迅速法評価指針の策定に資すると考えられる。

本研究では、精度評価という迅速法評価指針の根幹部分についてデータを元にした考察を行い、有用な知見を多数得ることができ、所期の目的を達成したと考える。

E. 参考資料

・ European Committee for Standardization. 2003. ISO16140:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods.

• Campden company. 2001. CCFRA guideline #29, Guidelines for establishing the suitability of food microbiology methods, Campden guideline.

F. 発表論文

- 1) Y. Tanaka, B. Kimura, H. Takahashi, T. Watanabe, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii. Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008) 1283-1293.
- 2) B. Kimura, R. Kimura, T. Fukaya, K. Sakuma, S. Miya, and T. Fujii. Growth and toxin production of proteolytic *Clostridium botulinum* in aseptic steamed rice products at pH 4.6 - 6.8 packed under modified atmosphere using a deoxidant pack. *J. Food Prot.* 71 (2008) 468-72.
- 3) H. Takahashi, B. Kimura, Y. Tanaka, M. Mori, A. Yokoi, and T. Fujii. Use of single-strand conformation polymorphism of amplified 16S rDNA for grouping of bacteria isolated from foods. *J. Food Prot.* 71 (2008) 839-842.
- 4) B. Kimura, Y. Sekine, H. Takahashi, Y. Tanaka, H. Obata, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii: Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J. Microbiol. Meth.* 72 (2008) 313-320.
- 5) B. Kimura, H. Takahashi, S. Hokimoto, Y. Tanaka, and T. Fujii. Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formally *P. histaminum*) at low pH. *J. Appl. Microbiol.* In press (2009).
- 6) H. Takahashi, S. Miya, B. Kimura, K. Yamane, Y. Arakawa, and T. Fujii. Difference of Genotypic and Phenotypic Characteristics and Pathogenicity Potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between Clinical and Environmental Isolates from Japan. *Microbial Pathogenesis*, 45 (2008) 150-158.
- 7) S. Miya, B. Kimura, M. Sato, H. Takahashi, T. Ishikawa, T. Suda, C. Takakura, T. Fujii and M. Wiedmann. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (2008) 239-249.

G. 学会発表

- 1) ステンレス上で乾燥させた *Listeria*

- monocytogenes* の生残性についての研究. 倉本晋太郎, 高橋肇, 須田貴之, 木村凡. (第 95 回日本食品衛生学会学術講演会, 銀座プロッサム, 5/15~16)
- 2) Real-time PCR 法を用いた米飯サンプル中の *C. botulinum* のモニタリング法. 高倉知佳子, 高橋肇, 木村凡. (第 96 回日本食品衛生学会学術講演会, 神戸学院大学, 9/18~19)
- 3) ネズミノロウィルスのステンレス表面上における生残性. 大内歩, 高橋肇, 木村凡. (第 29 回日本食品微生物学会学術総会, 広島国際会議場, 11/12~13)
- 4) Cycleave PCR を用いた *Listeria monocytogenes* の定量法および検出法の開発. 上村周子, 高橋肇, 山本純子, 中筋愛, 橋爪克仁, 木村凡. (第 29 回日本食品微生物学会学術総会, 広島国際会議場, 11/12~13)
- 5) 16SrDNA T-RFLP 法による鮮魚の菌叢解析法の検討. 北澤奈緒, 田中悠一郎, 高橋肇, 木村凡. (平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 3・27~30)
- 6) 非加熱喫食水産食品における *Listeria monocytogenes* の増殖挙動とその制御法についての予備検討. 犬塚嶺, 倉本晋太郎, 真船碧, 高橋肇, 木村凡. (平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 3・27~30)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

表1) A社迅速法と参照法における一般生菌数測定結果の比較

Sample	一般生菌数測定結果 (log CFU/g)		標準偏差 (n=5)		有意差 (両側、危険 率5%)
	SPC	A社迅速法	SPC	A社迅速法	
2	2.89	3.30	0.02	0.27	有り
4	6.48	6.81	0.37	0.06	有り
9	4.86	5.83	0.19	0.05	有り
17	7.23	7.88	0.05	0.01	有り
20	4.31	5.29	0.08	0.13	有り
21	7.09	7.92	0.06	0.00	有り
23	3.30	4.94	0.09	0.16	有り
24	6.54	7.39	0.22	0.21	有り
25	2.99	2.13	0.09	0.21	有り
26	2.46	3.54	0.23	0.20	有り
28	7.71	7.88	0.12	0.01	有り *
29	2.99	3.92	0.06	0.54	有り
30	2.98	4.84	0.04	0.12	有り
31	3.95	5.91	0.47	0.15	有り
32	7.08	7.85	0.14	0.01	有り
33	8.45	7.88	0.11	0.01	有り
35	2.25	3.69	0.08	1.13	有り
36	4.18	5.72	0.07	0.03	有り
38	5.92	7.83	0.04	0.02	有り
40	3.66	4.40	0.06	0.16	有り
41	6.93	7.18	0.09	0.05	有り
42	8.30	7.71	0.01	0.06	有り
1	2.21	2.63	0.13	1.22	なし
5	5.57	5.75	0.10	0.17	なし
6	3.92	4.09	0.23	0.10	なし
10	6.16	6.16	0.05	0.06	なし
15	2.80	3.32	0.06	0.95	なし
16	3.19	3.09	0.09	1.45	なし
18	7.57	7.52	0.04	0.06	なし
22	2.30	1.59	0.07	2.43	なし
34	2.33	0.33	0.06	2.25	なし
39	3.97	3.31	0.03	0.66	なし *

* 本文中で記載のあるものについて、太字で示した。

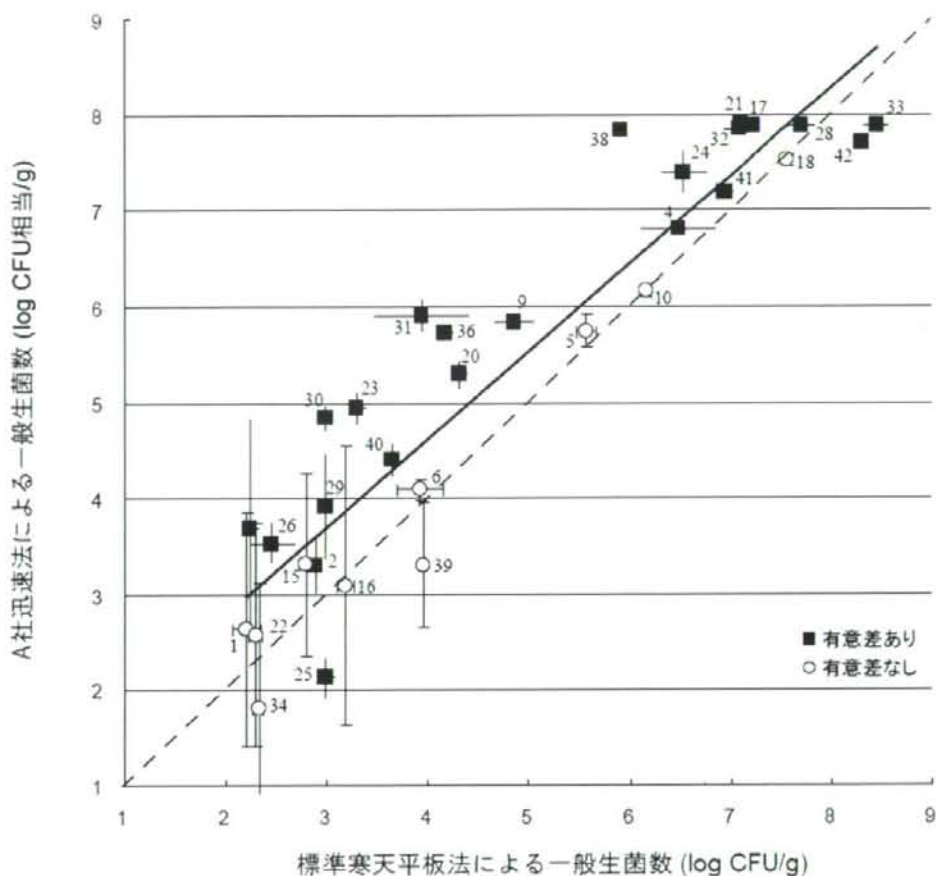


図2) A社迅速法および標準寒天平板法による一般生菌数の測定結果の比較。

いずれもn=5にて測定し、平均値をプロットした。標準偏差をバーで表す。

○は双方の結果に有意差 (p<0.05)がないと判定されたデータポイント、

■は有意差があると判定されたデータポイントをそれぞれ示す。

図中破線はy=xの直線、すなわち双方法の結果が完全に一致するラインを示し、

実線はデータポイント全てを含む回帰直線を示す (y=0.915x + 0.953)。

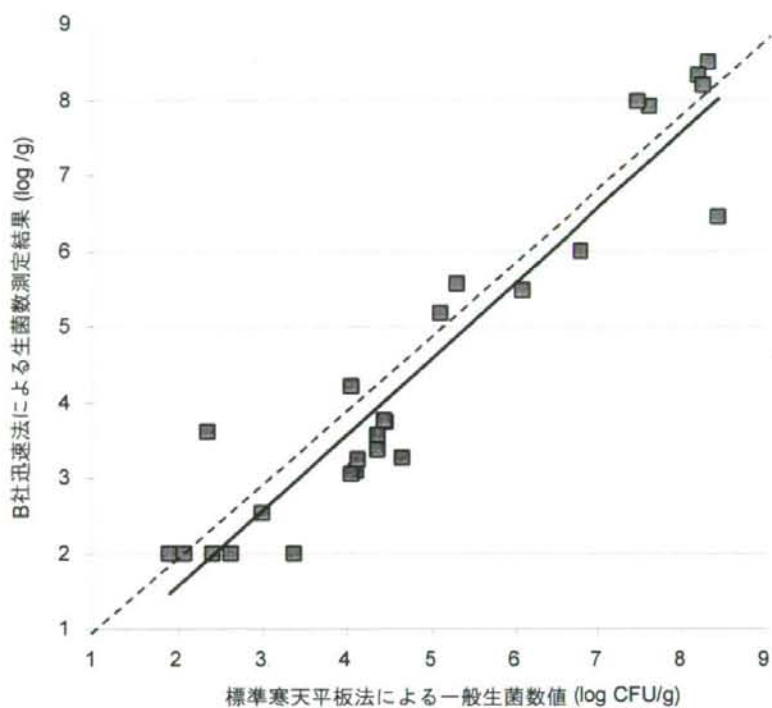


図3) B社迅速法および標準寒天平板法による一般生菌数測定結果.

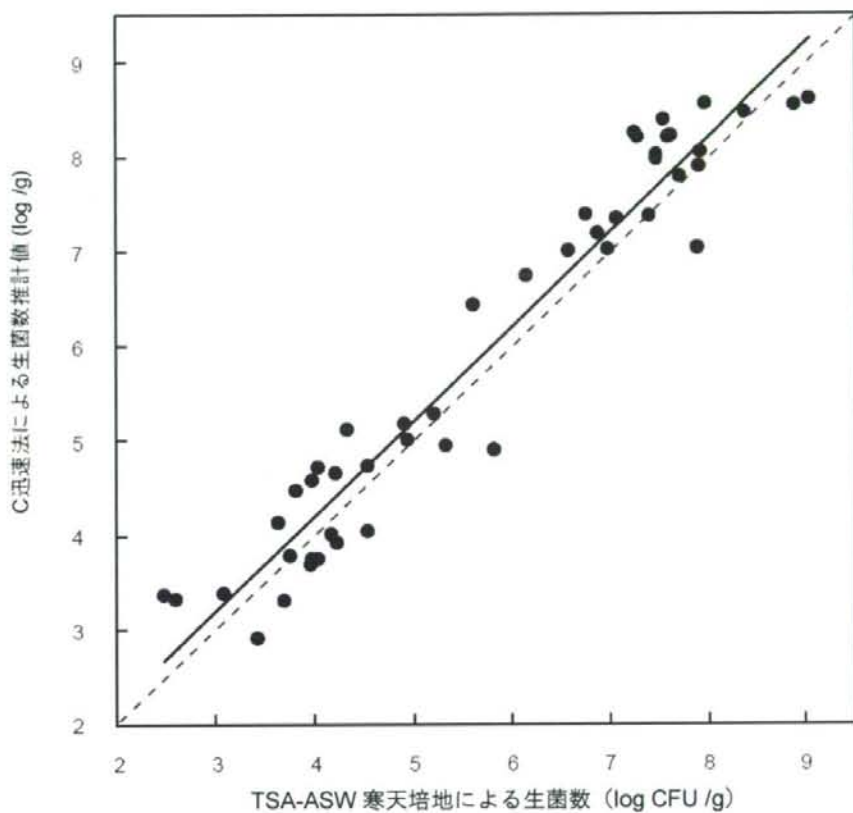


図4) C迅速法およびTSA-ASW寒天培地による生菌数の比較.

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
分子生物学的手法を応用した食中毒菌の迅速検出法の開発

分担研究者 宮本 敬久 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 教授
研究協力者 本城 賢一 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 准教授
李 睿 九州大学大学院生物資源環境科学府
原田 天章 九州大学大学院生物資源環境科学府

研究要旨

本年度は、88 株の腸管出血性大腸菌 O157 をペロ毒素遺伝子型により分類し、その毒素産生性と、市販の遺伝子診断キットによる検出率との相関を調べた結果、偽陰性は無かったが、毒素産生性との一致率は 87% であった。また、*Listeria monocytogenes* については multi locus sequence typing (MLST) 型の異なる 57 株についての試験結果、市販 2 社の遺伝子診断キットでは偽陰性はなかったが、*L. monocytogenes* 以外のリステリア属細菌の検出率が高かった。また、サルモネラ検査についても 50 検体の食肉検査において 2 社の市販サルモネラ検出キットによる結果を標準法（培養法）と比較した結果、1 社のキットでは少数だが擬陽性が認められた。これらの遺伝子解析の結果をもとに腸管出血性大腸菌 O157 については市販のものより毒素産生性との一致率の高いペロ毒素遺伝子 1 型、2 型および O157 血清型決定因子遺伝子のマルチプレックス PCR 検出用新規プライマーセットを開発した。*L. monocytogenes* についても擬陽性の少ない新規 PCR 検出用プライマーセットの開発が可能である。

A. 研究目的

我が国をはじめ、世界的にも食品流通の広域化や国際化が進んだことから、食品の賞味期限表示の偽装や冷凍食品における農薬の混入問題など、食の安全に関わる問題は後を絶たない。近年は、食中毒の件数も、毎年、1500 件程度、患者数は 25000 名と、減少する傾向はない。これら細菌性食中毒により、我が国でも死者も出ている。2006 年にアメリカ合衆国では、ウィスコンシン

州、ニューヨーク州などでカリフォルニア産ホウレンソウによる食中毒が発生し、これは全米の 20 州以上に拡大し、約 150 名が O157 に感染・発症し、1 名が死亡している。厚生労働省が毎年実施している食品の食中毒菌汚染実態調査 (http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/yobou/060317-1_1.html) の結果では、近年でも生の肉や内臓、レタス、三つ葉、キュウリなどから、サルモネラ属菌や腸管出血性大腸菌 O157

が検出されており、生の食材の食中毒細菌汚染対策が強く求められている。

このような状況にあることから、消費者および生産者の食の安全に対する意識も高まり、食品の製造においても Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) システムや ISO22000 などの衛生管理手法および品質管理手法が導入が進んできている。また、農産物生産段階においても適正農業規範 (Good Agricultural Practice, GAP) の導入による生産管理や工程管理が行われつつある。しかし、食の安全を保つ上で、食中毒細菌検査法の簡易化、高感度化は重要である。従来の食中毒細菌検出法は培養を基礎としており、検出までに数日を要し、煩雑な培養操作も必要となることから、様々な食中毒細菌の簡易迅速検査法の開発が行われてきた。これまでに遺伝学的および免疫学的手法を駆使した様々な検出法が開発されてきている。この中でも特定の細菌に特異的な遺伝子の塩基配列を増幅して検出を行う、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法に基づいた検査法は、その感度、迅速性ならびに特異性の高さから様々な食中毒細菌検出法に応用されている。これに加え、同時に2つ以上の遺伝子を増幅する Multiplex PCR 法、リアルタイムに遺伝子の増幅を測定することができる Real-time PCR 法が開発され、食中毒細菌検出の更なる迅速、簡便化が期待されている。しかし、PCR 法をはじめ、これら迅速検査法の検出下限は 10^3 cfu/ml 程度であり、食品試料の10倍乳剤から直接標的食中毒細菌を検出する事は非常に困難である。

このため高感度な検出の為には、効果的な増菌培養法も必要となってくるが、現在、市販されている分子生物学的原理に基づいた食中毒細菌検出法のプライマーセット、キットの検出感度、精度などについての正確な評価が我が国で行なわれているわけではない。

そこで本研究では、市販の分子生物学的手法を応用した食中毒細菌の迅速検査法の評価・検討を行っている。まず、腸管出血性大腸菌 O157 およびペロ毒素産生性大腸菌について、ペロ毒素遺伝子の塩基配列を解析し、標準的な塩基配列を持つ、分子生物学的検査法評価のための遺伝学的に異なる菌株の選択を試みた。また、これらの菌株のリボプリントパターンによる分類ならびにペロ毒素遺伝子の塩基配列に基づく遺伝子型、市販の免疫学的ペロ毒素検出キットによる毒素産生性を比較することにより、毒素産生性との関連も調べた。これらの塩基配列解析結果から、ペロ毒素遺伝子検出用新規プライマーセットの設計を試みる計画である。

また、*Listeria monocytogenes* についても、検出感度および精度の高い分子生物学的検査法開発のため、遺伝子診断で最も良く利用されているリステリオリシンOをコードする *hly* 遺伝子の部分塩基配列解に加え、*plcA*, *inlA* および *clpC* 遺伝子の内部塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに分類を行った。

最後に、50 検体の生肉を試料として、サルモネラ属菌の遺伝子診断法として市販されているタカラバイオ社およびアブライドバイオシステム社のサルモネラ検出キット

による検査結果を培養法と比較した

B. 研究方法

1. 供試菌株および培養

本研究で使用した腸管出血性大腸菌株 119 株は福岡市保健環境研究所から分与を受けた。また、*L. monocytogenes* については食品及び環境中からの分離株、福岡市保健環境研究所ならびに佐久保健所より分与を受けた患者由来株の合計 192 株を使用した。大腸菌では通常の増菌培養には T S B 培地を用いて 37°C で一晚培養した。デンカ生研社の R P L A キットによるベロ毒素型別では、B H I 寒天培地で 37°C, 16 時間培養した。

2. ベロ毒素産生量の測定

各大腸菌 0157 株については、VT 産生能を「ベロトックス-F「生研」(デンカ生研(株))を用いて、指定の方法で測定した。凝集反応の認められた培養液の最大稀釈倍率を力価とした。

ベロ細胞毒性試験は、Muniesa and Jofre の方法で行った(M. Muniesa and J. Jofre. 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* 0157:H7 and that carry the shiga toxin 2 gene. Appl. Environ. Microbiol. 64:2443-2448.)。毒素の中和試験に用いた抗ベロ毒素 1 型抗体 Verotoxin 1, mAb 13C4 は (Hycult biotechnology 社, オランダ) より購入した。

3. *L. monocytogenes hlyA*, *plcA*, *inlA* および *clpC* 遺伝子部分塩基配列の決定

被検菌株を TSB 5 ml で 37°C、一晚静置培養し、培養液 1 ml を 5, 100×g で 10 分間遠心分離して集菌後、DNA Tissue Kit (キアゲン社)を用い、付属のプロトコールに従ってゲノム DNA 調製を行った。*hlyA* 遺伝子、*plcA* 遺伝子、*inlA* 遺伝子および *clpC* 遺伝子の内部塩基配列を増幅するための PCR に用いるプライマーとして、既に全塩基配列が決定されている *Listeria monocytogenes* EDG-e 株 (血清型 1/2a) および F2365 (血清型 4b) において共通性の高い塩基配列部分で以下に示すプライマーセットを作製した。

hlyA 遺伝子の 1070-1558 bp を増幅するための LM f2-r2 プライマーセット、*plcA* 遺伝子の 101-920 bp を増幅するための LM f3-r3 プライマーセット、*inlA* 遺伝子の 1099-1918 bp を増幅するための LM f4-r4 プライマーセット、*clpC* 遺伝子の 378-1210 bp を増幅するための LM f5-r5 プライマーセットを合成した。これらの塩基配列は以下の通りである。

f2 : 5' -AAATCATCGACGGCAACCT-3'

r2 : 5' -ATTTCCGATAAAGCGTGGT-3'

f3 : 5' -ACTGGAATAAGCCAATAAAGAACTC-3'

r3 : 5' -ATTGTTTGTTCCTCGGGAAGT-3'

f4 : 5' -TTTTTCTATAATAACAAGGTAAGTGAC-3'

r4 : 5' -CTGTATAGCTATTGGCGCTAT-3'

f5 : 5' -TCTTGGTATTAGTTTGAATAAAGCTC-3'

r5 : 5' -TCAAACGTACTTTAGAACAGATT-3'

EX Taq DNA polymerase (タカラバイオ社),

および TaKaRa PCR Thermal Cycler (タカラバイオ社) を用い、熱変性 (95℃、1min) の後、95℃, 30sec → 55℃, 30sec → 72℃, 60sec の反応を 35 サイクル行った。PCR 産物のサイズはアガロースゲル電気泳動により確認した後、市販の PCR 産物精製キットで精製し、その塩基配列は、株式会社バイオマトリックス研究所 (千葉県流山市) に依頼して決定した。

4. 市販サルモネラ遺伝子診断キットによる生肉からのサルモネラ検査

4.1. 培養法による検査

試料 25g に BPW 225ml を加え、1 分間ストマッカー処理した。35℃、22±2 時間前増菌培養後、BPW で前培養した培養液 0.1ml を RV 培地 10ml、3 本に接種し、RV 培地を 42℃、22±2 時間培養した。培養後の RV 培地をよく攪拌し、1 白金耳量を硫化水素の産生により判定する培地である DHL および、硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地である CHS (クロモアガーサルモネラ) それぞれの分離平板培地に RV 1 本につき 3 枚ずつ画線塗抹し、35℃、22±2 時間培養した。コロニーの色については、硫化水素産生により判定する培地では黒色集落、クロモアガーサルモネラでは藤色がサルモネラである。

各分離平板培地に形成された定型的集落 (各培地の判定方法を参照) を 3 個ずつ釣菌して (3 枚から計 3 個釣菌)、TSI 培地と LIM 培地に接種し培養後、以下の結果が得られたものをサルモネラと判定した。

(ア) TSI 培地: (高層部黄変)・黒変・ガス産生 (高層部における気泡または亀裂の発

生) および斜面部が赤変したもの。

(イ) LIM 培地では、培地全体が紫変 (リシン陽性)、インドール反応陰性、運動性陽性のものである。

さらに以下の生化学試験を行い同定した。

(ア) オキシダーゼ試験: チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙に菌を塗布して 1 分以内に深青色になったものを陽性とした。

(イ) クエン酸: シモンズクエン酸ナトリウム培地に菌を塗抹後、35℃、3 日間培養した。培地が深青色になれば陽性とした。

(ウ) VP: ブドウ糖リン酸ペプトン培地に菌を接種し、35℃、5 日間培養後、VP 用試薬 (クレアチン加 40w/v% 水酸化ナトリウム溶液 1 ml、6w/v% α-ナフトール・アルコール溶液 0.5 ml) を滴下し、激しく振った。数分後に赤色となったものを陽性、1 時間後も赤色とならなかったものを陰性とした。

サルモネラはオキシダーゼ陰性、クエン酸陽性、VP 陰性である。

サルモネラの性状を示した菌株についてはサルモネラ免疫血清 1 号セット (デンカ生研) を用いたスライド凝集法による O 血清型別試験を、分離コロニー (標準寒天平板、TSA) から菌を採取して実施した。O 多価血清と O1 多価血清を用いての凝集試験を行い、凝集が見られたら O 群血清を用いて当該菌の O 群を決定した。サルモネラの定型的な生化学性状が一致したのかかわらず、いずれの血清にも凝集が見られないときは O 群型別不能とした。

4.2. 市販のキットによる遺伝子診断法

上記培養法の前増菌培養 (BPW)、選択増菌培養 (RV) で得られた培養液について、

各々1 ml、0.33 ml×3 をマイクロ遠心管にとり、5,000 rpm、5 分間遠心し、上清を捨てた。RV については、再度 1 ml の滅菌水に懸濁後、遠心、上清を捨てるという洗浄操作を 2 回行った。沈殿を 100 µL 滅菌水に懸濁し、沸騰浴中で、5 分間加熱後、5,000 rpm、5 分間遠心して得られた上清を鋳型 DNA とした。

TAKARA invA 遺伝子検出プライマーセット（タカラバイオ社）および Taqman SALMONELLA detection kit（アプライドバイオシステム社）によるリアルタイム PCR により遺伝子診断を行った。

C. 研究結果

1. タカラバイオ社の「0-157 &ペロ毒素遺伝子同時検出キット」の検出結果とペロ毒素産生性との相関

88 株の腸管出血性大腸菌 0157 についてのペロ毒素産生性とタカラバイオ社のペロ毒素遺伝子検出キットによる検査結果をこれまでに実施したりボタイピング、stx 遺伝子の塩基配列解析による遺伝子型別結果とともに表 1 に示す。また、ペロ毒素産生性とタカラバイオ社のキットによるペロ毒素遺伝子型の相関を表 2 に示す。

この結果、ペロ毒素 1 型のみを産生株 9 株では、全株 stx1 遺伝子陽性となったが、ペロ毒素 2 型は産生しないにもかかわらず stx2 遺伝子陽性となった株が 8 株有り、毒素産生性との一致率は 11% と低かった。

ペロ毒素 2 型のみを産生する 24 株では、全株 stx2 遺伝子陽性となったが、ペロ毒素 1 型は産生しないにもかかわらず stx1 遺伝子陽性となった株が 1 株有り、毒素産生

性との一致率は 96% となった。

ペロ毒素 1 および 2 型ともに産生する 52 株では、全株 stx1 および 2 遺伝子陽性となり、毒素産生性との一致率は 100% であった。

ペロ毒素非産生の 4 株では、3 株が stx1 および 2 遺伝子陽性となり、stx1 および 2 遺伝子陰性となったのは 1 株のみで、毒素産生性との一致率は 25% であった。

腸管出血性大腸菌株の遺伝子型別結果と毒素産生性の結果から、毒素産生性と遺伝子型が正しく一致したのは、89 株中 77 株で、一致率は 87% となった。今回試験したなかでは、ペロ毒素を産生する株で、stx 遺伝子が検出されなかった菌株は無かった。ペロ毒素 2 型非産生の 13 株のうち stx2 遺伝子陽性となった株が 11 株もあり、タカラバイオ社の遺伝子診断キットでは、ペロ毒素 2 型を産生しないが stx2 遺伝子の一部あるいは全部を保有する株が多いことを示す結果となった。この結果から、さらにペロ毒素 2 型産生性との一致率が高い stx2 遺伝子検出用プライマーセットの開発が望まれる。

2. *L. monocytogenes* の 4 遺伝子の MLST による分類

全塩基配列決定済みの *L. monocytogenes* 血清型 1/2a 株 (EDG-e) および 4b (F2365) の *hlyA*, *plcA*, *inlA* および *clpC* 遺伝子内においてそれぞれ共通性の高い塩基配列部位で作製したプライマーセットを用いて、内部塩基配列を PCR により増幅し、塩基配列を決定した。今回試験した全ての菌株において、4 種の遺伝子は増幅されたことから、今回試験した全ての菌株はこれらの遺伝子を保有しているものと考えられた。

hlyA 遺伝子の 1126-1527bp 塩基部分の比較により、*L. monocytogenes* 192 株は 14 群に分類された。血清型 1/2a では、食品 1/2a 株は 6 群、臨床 1/2a は 4 群に分類された。食品 1/2a は特定のグループに集中して分類されることはなかったが、臨床 1/2a は 11 株中 7 株がグループ 5 にまとまって分類された。血清型 1/2b では、食品 1/2b 株は 4 群、臨床 1/2b は 3 群に分類された。食品 1/2b はグループ 1 および 4 にまとまって分類され、臨床 1/2b はグループ 3 にまとまって分類された。血清型 4b では、食品 4b 株は 3 群、臨床 4b は 2 群に分類された。食品 4b および臨床 4b はそのほとんどがグループ 3 に分類された。

plcA 遺伝子の 153-865bp 塩基部分の比較により、192 株は 30 群に分類された。血清型 1/2a では、食品 1/2a 株は 13 群、臨床 1/2a は 5 群に分類された。食品 1/2a は特定のグループに集中して分類されることはなかったが、臨床 1/2a は 11 株中 7 株がグループ 16 にまとまって分類された。血清型 1/2b では、食品 1/2b 株は 5 群、臨床 1/2b は 5 群に分類された。食品 1/2b はグループ 8 および 9 にまとまって分類されたが、臨床 1/2b は特定のグループに集中して分類されることはなかった。血清型 4b では、食品 4b 株は 3 群、臨床 4b は 5 群に分類された。食品 4b および臨床 4b はそのほとんどがグループ 2 および 8 に分類された。

inlA 遺伝子の 1192-1799bp 塩基部分の比較により、192 株は 27 群に分類された。血清型 1/2a では、食品 1/2a 株は 9 群、臨床 1/2a は 7 群に分類された。食品 1/2a は特定のグループに集中して分類されることはな

かったが、臨床 1/2a は 11 株中 5 株がグループ 6 にまとまって分類された。血清型 1/2b では、食品 1/2b 株は 6 群、臨床 1/2b は 3 群に分類された。食品 1/2b はグループ 10 および 12 にまとまって分類され、臨床 1/2b はグループ 12 にまとまって分類された。血清型 4b では、食品 4b 株は 2 群、臨床 4b は 6 群に分類された。食品 4b および臨床 4b はそのほとんどがグループ 14 に分類された。

clpC 遺伝子の 489-1124bp 塩基部分の比較により、192 株は 17 群に分類された。血清型 1/2a では、食品 1/2a 株は 8 群、臨床 1/2a は 7 群に分類された。食品 1/2a は特定のグループに集中して分類されることはなかったが、臨床 1/2a は 11 株中 4 株がグループ 2 にまとまって分類された。血清型 1/2b では、食品 1/2b 株は 2 群、臨床 1/2b は 2 群に分類された。食品 1/2b はグループ 12 および 13 にまとまって分類され、臨床 1/2b はグループ 13 にまとまって分類された。血清型 4b では、食品 4b 株は 4 群、臨床 4b は 3 群に分類された。食品 4b 株ではグループ 13 および 14 にまとまって分類され、臨床 4b はグループ 13 にまとまって分類された。

図 1 に *L. monocytogenes* の MLST (*hlyA-plcA - inlA - clpC*) 分類結果に基づく系統樹を示す。

4 種の遺伝子の MLST による分類では、表 3 に示すように、192 株は 57 群に分類された。血清型 1/2a では、食品 1/2a 株は 17 群、臨床 1/2a は 8 群に分類された。食品 1/2a は特定のグループに集中して分類されることはなかったが、臨床 1/2a は 11 株中 4 株がグループ 45 にまとまって分類された。血清型 1/2b では、食品 1/2b 株は 11 群、臨床

1/2b は 5 群に分類された。食品 1/2b はグループ 4 および 13 にまとまって分類され、臨床 1/2b は特定のグループに集中して分類されることはなかった。血清型 4b では、食品 4b 株、臨床 4b とともに 7 群に分類された。食品 4b および臨床 4b はそのほとんどがグループ 22 および 24 に分類された。

今回試験した *L. monocytogenes* は、菌株によってその内部塩基配列中に塩基置換部位があるため同一血清型でも異なる遺伝子型に分類される場合があった。これは特に食品・環境由来 1/2a 株で顕著で、*hlyA* で 6 群、*plcA* で 13 群、*inlA* で 9 群そして *clpC* で 8 群の遺伝子型に分かれた。また、食品・環境由来 1/2b および 4b 株はそれぞれ 2 群の遺伝子型に集中する傾向があった。

今回決定した塩基配列を基に保存性の高い領域を見出して新規の検出用プライマーセットを設計する予定である。

3. 市販リステリア菌検出キットの特異性

MLST グループのうちから遺伝子型の異なる *L. monocytogenes* 49 株 (表 4) および *L. monocytogenes* 以外のリステリア属細菌とリボプリンターシステムで同定されたリステリア属細菌 12 株 (表 5) の菌株を用いてリアルタイム PCR を行った。鋳型として用いた DNA 濃度者 $5\text{pg}/\mu\text{l}$ のものをそれぞれ $1\mu\text{l}$ づつ用いた。市販のタカラバイオ社 CycleavePCR® *Listeria monocytogenes* (*inlA* gene) Detection Kit および Applied Biosystems 社遺伝子増幅キット TaqMan® *Listeria monocytogenes* Detection Kit による検出結果を比較した。各キットによる検出は、各附属の方法に従って実施した。

鋳型としては同様に DNA 濃度 $5\text{pg}/\mu\text{l}$ のものをそれぞれ $1\mu\text{l}$ づつ用い、Mx3000P® Real-Time PCR System (STRATAGENE 社) を用いてリアルタイム PCR を行なった。タカラバイオ社のキットによる結果を図 2 に、Applied Biosystems 社のキットによる結果を図 3 にそれぞれ示す。

その結果、タカラバイオ社及び Applied Biosystems 社キットでも全ての *L. monocytogenes* 株を検出できた。タカラ社のキットでは、*L. monocytogenes* 以外のリステリア属細菌 9 株でバンドの増幅が認められた。Applied Biosystems 社のキットでは、*L. monocytogenes* 以外のリステリア属細菌では 1 株 (LIS30) の *L. innocua* では Ct 値が 41.48 と 40 サイクル以上であったが、他の *L. monocytogenes* 以外のリステリア属細菌では 40 サイクル以前に蛍光強度の立ち上がりが認められた。

4. 生肉検査におけるサルモネラ遺伝子診断法と培養法の相関

50 検体の生肉を試料として、サルモネラ属菌の遺伝子診断法として市販されているタカラバイオ社および AB 社のサルモネラ検出キットによる検査結果を培養法と比較した結果を表 6 に示す。タカラ社のキットでは、偽陽性は無かったが、BPW による前増菌液を試料とすると偽陰性が 60% 程度検出されたが、選択培養後には 16% まで低下した。ABI 社のキットでは同社の装置と判定基準の入ったプログラムを用いない場合には BPW 前増菌液を試料とすると偽陰性はなかったが、選択培養後には 12% の偽陰性が検出された。しかし、偽陽性が BPW 後の雑増

菌液では76%、選択培養後でも44%と高く、正確な判定には同社の装置と判定プログラムが必要と思われる。

D. 結論

ベロ毒素遺伝子型により分類した89株の腸管出血性大腸菌O157についてRPLAによる毒素産生性と、タカラバイオ社の遺伝子診断キットによる型別との相関を調べた結果、タカラバイオ社のキットではVT型1&2の52株については検出率は100%であった。24株のVT2型は23株が2型、9株のVT1型については1株のみ1型、VT陰性の4株は3株が1&2型と判定された。偽陰性は無かったが、毒素産生性との一致率は87%であった。これらの遺伝子解析の結果をもとに腸管出血性大腸菌O157については市販のものより毒素産生性との一致率の高いベロ毒素遺伝子1型、2型およびO157血清型決定因子遺伝子のマルチプレックスPCR検出用新規プライマーセットを設計できると思われる。

また、*Listeria monocytogenes* 192株について、*hlyA*, *plcA*, *inlA*および*clpC*遺伝子の内部塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに分類すると、4遺伝子を組み合わせたmulti-locus sequence typing (MLST) による分類では57群に分類された。MLST型の異なる57株についての試験結果、*inlA*遺伝子を指標として検出するタカラバイオ社およびアブライドバイオシステム社の遺伝子診断キットでは偽陰性はなかったが、*L. monocytogenes* 以外のリステリア属細菌の検出率が高かった。本塩基配列解析結果をもとに偽陽性の少ない*hlyA*遺伝子を指標とした新規PCR検出用プ

ライマーセットの設計が期待される。

50検体の生肉を試料として、サルモネラ属菌の遺伝子診断法として市販されているタカラバイオ社およびアブライドバイオシステム社のサルモネラ検出キットによる検査結果を培養法と比較した結果、タカラ社のキットでは、偽陽性はなかったが、BPWによる前増菌液を試料とすると偽陰性が60%程度検出されたが、選択培養後には16%まで低下した。アブライドバイオシステム社のキットでは同社の装置と判定基準の入ったプログラムを用いない場合にはBPW前増菌液を試料とすると偽陰性はなかったが、選択培養後には12%の偽陰性が検出された。しかし、偽陽性がBPW後の雑増菌液では76%、選択培養後でも44%と高く、正確な判定には同社の装置と判定プログラムが必要と思われる。

E. 健康危害情報

無し

F. 研究発表

論文発表

Kenichi HONJOH, Kumiko FUJIHARA, Takahiro HARAGUCHI, Yukari ONO, Hiroshi KOBAYASHI, Hiroshi HIWAKI, Hideaki KAMIKADO, Sung Sik JANG, Sangryeol RYU, and Takahisa MIYAMOTO, (2008) Subtyping of *Listeria monocytogenes* based on nucleotide polymorphism in the *clpC*, *inlA*, *hlyA*, and *plcA* genes and rapid identification of *L. monocytogenes* genetically similar to clinical isolates. Food Science and Technology Research,

14(6): 557-564

学会発表

Rui Li, Takaaki Harada, Ken-ichi Honjoh,
Takahisa Miyamoto, Genotyping

Characterization of Enterohemorrhagic
Escherichia Coli Strains Isolated from
Human Patients in Japan, ASM 2008
Melbourne/ Annual Scientific Meeting &
Exhibition , 2008. 07. 09.

Liu Pei, K. Fujihara, H. Mizue, K. Honjoh

and T. Miyamoto, Studies on subtyping and
pathogenicity of listeria
monocytogenes, 14th World Congress of
Food Science & Technology , 2008. 10.

G. 知的財産権の出願・登録情報（予定を含む）

無し

表1. 大腸菌O157 89株のペロ毒素産生性, リボタイピング, stx 遺伝子の塩基配列解析による遺伝子型別とタカラバイオ社のペロ毒素遺伝子検出キットによる検査結果

菌株番号	リボプリンターシ ステム番号	EC番号	リボプリンターシシステムによる 同定結果 (DuPont ID Label)	リボプリンターシ システムによる分群 結果 (Ribogroup)	血清型	遺伝子 型別 STX1 検出 結果 (DuPont ID Label)	遺伝子 型別 STX2 検出 結果 (DuPont ID Label)	中核領域 変異 (V1-V2) 変異 結果	塩基配列 解析による VT1 遺伝子型	塩基配列 解析による VT2 遺伝子型	TAKARA O157 One Shot PCR Screening キット 結果 (PCR Target Site)による同定 結果	新編マルチプレックス検 出法による検出結果	
No.025	422-9-5-5	EC-052	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157:H-	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.026	422-9-5-6	EC-053	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157:H-	128	6	A	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.027	422-9-5-7	EC-054	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157:H-	---	128	---	B-1	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.028	422-9-5-8	EC-055	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157:H-	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.029	422-11-5-1	EC-056	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157:H7	128	---	VT2	A	1.2	sta1 + WZY+	sta1 + WZY+	
No.030	422-11-5-2	EC-057	Escherichia coli	ECOR 422-9-5-7	O157:H7	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.031	422-11-5-3	EC-058	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157:H7	128	16	A	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.032	422-11-5-4	EC-059	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157:H7	128	32	A	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.033	422-11-5-5	EC-060	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157:H7	128	---	VT2	A	1	sta1 + WZY+	sta1 + WZY+	
No.034	422-11-5-6	EC-061	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-6	O157:H7	---	128	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.035	422-11-5-7	EC-062	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157:H7	---	128	---	A	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.036	422-11-5-8	EC-063	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157:H7	---	128	---	A	3	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.037	422-12-5-1	EC-064	Escherichia coli	ECOR 422-9-5-4	O157:H20	---	---	VT1-VT2	---	---	---	---	
No.121	422-15-5-3	EC-085	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-8	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.122	422-15-5-4	EC-086	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-8	O157	128	---	VT2	A	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+
No.123	422-15-5-5	EC-087	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.124	422-15-5-6	EC-088	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.125	422-15-5-7	EC-089	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	---	VT2	A	E-2	1.2	sta1 + WZY+	sta1 + WZY+
No.126	422-15-5-8	EC-090	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.127	422-16-5-3	EC-071	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	4	A-2	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.128	422-16-5-4	EC-072	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	6	B	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.129	422-16-5-5	EC-073	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.130	422-16-5-6	EC-074	Escherichia coli	ECOR 422-16-5-6	7	---	---	VT1-VT2	A	D	1.2	no product	no product
No.131	422-16-5-7	EC-075	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	---	VT2	A	C	1.2	sta1 + WZY+	sta1 + WZY+
No.132	422-16-5-8	EC-076	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.133	422-17-5-1	EC-077	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.134	422-17-5-2	EC-078	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	B	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.135	422-17-5-3	EC-079	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.136	422-17-5-4	EC-080	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	32	B	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.137	422-17-5-5	EC-081	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-8	O157	128	4	A-3	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.138	422-17-5-6	EC-082	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.139	422-17-5-7	EC-083	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	16	A	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.140	422-17-5-8	EC-084	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.141	422-18-5-1	EC-085	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	---	VT2	A	F	1.2	sta1 + WZY+	sta1 + WZY+
No.142	422-18-5-2	EC-086	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	---	VT2	B	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+
No.143	422-18-5-3	EC-087	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	16	A	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.144	422-18-5-4	EC-088	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.145	422-18-5-5	EC-089	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.146	422-18-5-6	EC-090	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.147	422-18-5-7	EC-091	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.148	422-18-5-8	EC-092	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.149	422-18-5-9	EC-093	Escherichia coli	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.150	422-18-5-10	EC-094	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	VT1+ VT2	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+
No.151	422-18-5-11	EC-095	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.152	422-18-5-12	EC-096	Escherichia coli	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A-4	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.153	422-18-5-13	EC-097	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.154	422-18-5-14	EC-098	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-8	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.155	422-18-5-15	EC-099	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.156	422-18-5-16	EC-100	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.157	422-20-5-1	EC-101	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	B	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.158	422-20-5-2	EC-102	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	B	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.159	422-20-5-3	EC-103	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.160	422-20-5-4	EC-104	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.161	422-20-5-5	EC-105	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.162	422-20-5-6	EC-106	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.163	422-20-5-7	EC-107	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.164	422-20-5-8	EC-108	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	4	B	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.165	422-21-5-1	EC-109	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	---	VT2	B	F	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+
No.166	422-21-5-2	EC-110	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	4	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.167	422-21-5-3	EC-111	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	B	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.168	422-21-5-4	EC-112	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	---	VT2	A	E-3	1.2	sta1 + WZY+	sta1 + WZY+
No.169	422-21-5-5	EC-113	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157	---	---	VT1-VT2	A	E-1	1.2	WZY+	WZY+
No.170	422-21-5-6	EC-114	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.171	422-21-5-7	EC-115	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	---	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.172	422-21-5-8	EC-116	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	---	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.173	422-23-5-1	EC-117	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	---	---	A	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.174	422-23-5-2	EC-118	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.175	422-23-5-3	EC-119	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	---	---	A	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.176	422-23-5-4	EC-120	Escherichia coli	ECOR 422-23-5-4	7	---	---	VT1-VT2	A-1	B-2	1.2	no product	no product
No.177	422-23-5-5	EC-121	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-8	O157	---	---	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.178	422-23-5-6	EC-122	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-8	O157	---	64	A	F	3	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.179	422-23-5-7	EC-123	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	128	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.180	422-23-5-8	EC-124	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	128	---	A	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.181	422-23-5-9	EC-125	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	128	---	A	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.182	422-23-5-10	EC-126	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-8	O157	---	128	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.183	422-23-5-11	EC-127	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	128	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.184	422-23-5-12	EC-128	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	128	---	A	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.185	422-23-5-13	EC-129	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-8	O157	---	128	---	A	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.186	422-23-5-14	EC-130	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-8	O157	---	128	---	A	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.187	422-23-5-15	EC-131	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157	---	128	---	A	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.188	422-23-5-16	EC-132	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	64	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.189	422-24-5-1	EC-133	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	128	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.190	422-24-5-2	EC-134	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	32	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.191	422-24-5-3	EC-135	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	---	32	---	F	2	sta2 + WZY+	sta2 + WZY+	
No.192	422-24-5-4	EC-136	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-7	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta2 + WZY+	
No.193	422-24-5-5	EC-137	Escherichia coli ser. O157:H7 #	ECOR 422-9-5-5	O157	128	128	A	A	1.2	sta1 + sta2 + WZY+	sta1 + sta	

表2 ペロ毒素産生性とタカラバイオ社のキットによるペロ毒素遺伝子型の相関

O157 株のペロ毒素型		Takara kits					毒素産生性との一致率 (一致数/全数)
		stx1	stx2	1&2	非産生	合計	
ペロ毒素産生性 RPLAテストおよびペ ロ細胞毒性試験	VT1	1	0	8	0	9	11%(1/9)
	VT2	0	23	1	0	24	96%(23/24)
	VT1&2	0	0	52	0	52	100%(52/52)
	非産生	0	0	3	1	4	25%(1/4)
合計		1	23	64	1	89	87%(77/89)

四遺伝子
(*hlyA-plcA-inlA-clpC*)

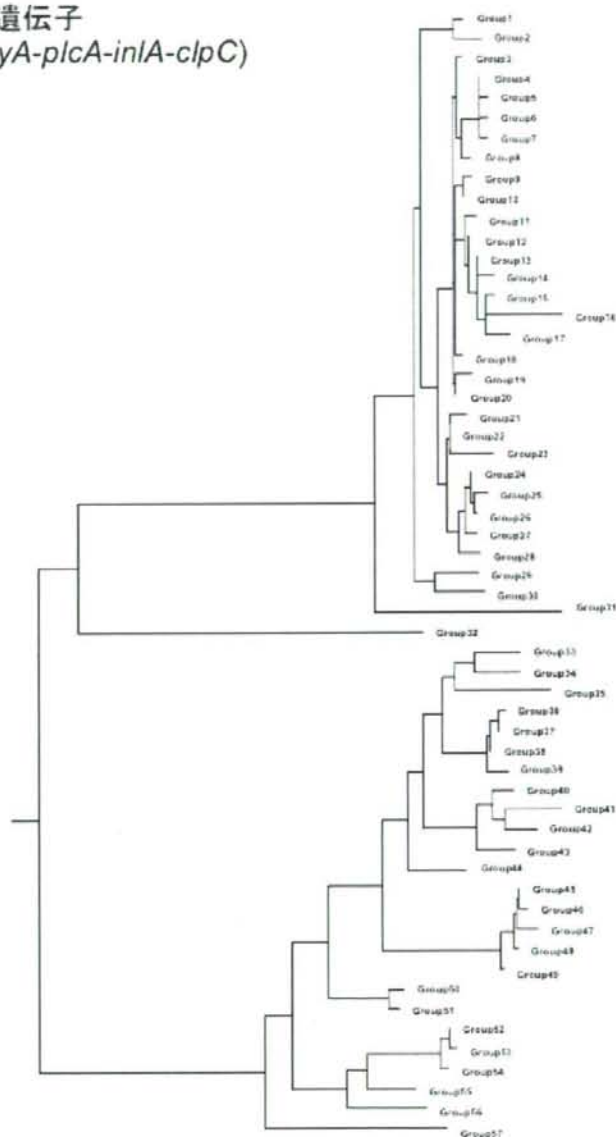


図1. *L. monocytogenes* のMLST (*hlyA-plcA-inlA-clpC*)分類結果に基づく系統樹

表3. *L. monocytogenes* の4遺伝子型によるMLST分類

Group	Strain No.													
	Strain from food and environment									Clinical strain				
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4b	4c	4e	UT	1/2a	1/2b	4b	
1													126	
2													184	
3										140				
4		19,22,26,27,29,30,102,103,105										175,178		
5		167												
6		31												
7		107												
8		139												
9		134, 135												
10												173,183		
11		142			44									
12		192			163									
13		18,42,47,49,50,68,69,70,71,73,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,96,97,98,99,100,187,188										123		
14		95												
15					46									
16										114				
17													127	
18		74												
19													197	
20												124,179		
21						3								
22							6,7,15,16,26,161,162,164,169,193, F2365					125,129,131,185,186		
23						14								
24					63,67		20,45,46,51,53,54,55,56,57,58,60,61,64,145,146,147,148,150,170						130,182	
25							52							
26							59							
27									62					
28							149							
29														
30												122		
31									24					
32									168					
33	1,8,190,196													
34	65,66													
35	138													
36			13											
37			151, 153, 154, 156, 158											
38	17,33,137,EGD-e		32, 152, 155, 157								172			
39	34													
40	133, 181, 194													
41	171													
42	144				115					110,111	176			
43										113				
44	160													
45	2,4,5,9,12,36,143,159,165			23		25				106,109	117, 118, 174, 180			
46	11													
47	10													
48											121			
49	189													
50											119			
51											120			
52	21,35,39,101,104,106,112,132,141													
53											181			
54	195													
55	136, 166													
56	37,38													
57											177			