

Table 3. Epidemiological investigations in 21 food-borne outbreaks examined by SG-PCR and bacteriological cultures in Shimane Prefecture, Japan

| Case No. | Date occurred (day/mo/yr) | Days for examination after occurrence | Infected group | Source of infection (suspected source) | No. of patients/total | No. of examined patients | Causative pathogens | Stool samples (No. of positive/ examined samples) | | | | | |
|----------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--|-----------------------|--------------------------|---|---|----------|----------|------------|-------|-----------------|
| | | | | | | | | SG-PCR | | | | | |
| | | | | | | | | 1st test | 2nd test | 3rd test | Final test | Total | |
| 1 | 4-Oct-02 | 6 | School excursion in a mountain area | Stream water ^a | 23/33 | 22 | * EPEC O:125, O:166, O:UT * <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> O:1, <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> O:18, O:20, O:114, O:159, O:UT [Norovirus] | 1/7 | - | - | 4/22 | 7/22 | 5/22 |
| 2 | 03-Sep-03 | 3 | Protective care school | Catering box lunch | 22/46 | 10 | * <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> O:18, O:20, O:114, O:159, O:UT | 1/5 | - | - | 6/10 | 6/10 | 3/10 |
| 3 | 01-Oct-03 | 2 | Celebration in a company | Catering box lunch | 437/1354 | 12 | * <i>C. jejuni</i> O:13, O:16 | 5/5 | - | - | 7/12 | 7/12 | 10/12 |
| 4 | 11-Jun-04 | 6 | Camping group of high school | Grilled meat (beef, bovine intestinal meat) | 4/8 | 4 | <i>C. jejuni</i> | 1/4 | - | - | 1/8 | 1/8 | 5/8 |
| 5 | 12,13-Jun-04 | 6~7 | 9 citizen groups in Choppouse | Grilled meat (beef, bovine intestinal meat) | 30/UN | 12 | <i>C. jejuni</i> | 4/5 | - | - | 8/12 | 8/12 | 17/20 |
| 6 | 17-Jun-04 | 5 | Cooking practise in a high school | Shelf-cooked lunch (salada mixed) | 31/41 | 20 | * <i>C. jejuni</i> | 4/5 | - | - | 12/14 | 12/14 | 17/20 |
| 7 | 07-Jul-04 | 1 | Citizen in Chinese restaurant | Fried rice ^b | 6/6 | 6 | * <i>B. cereus</i> | 1/1 | - | - | 2/6 | 2/6 | 2/6 |
| 8 | 11-Oct-04 | 3 | Sport club in a high school | Shelf-cooked lunch | 26/47 | 6 | * <i>C. jejuni</i> O:16, O:UT | 1/5 | - | - | 3/6 | 3/6 | 4/6 |
| 9 | 5~7-Nov-04 | 5~7 | Restaurant | Unknown | 5 | 5 | <i>C. jejuni</i> | 2/5 | - | - | 2/5 | 2/5 | 2/5 |
| 10 | Unknown | Several days (19-Jun-05) | Nursery | Unknown | 24/73 | 22 | * EHEC O26 | - | - | - | 8/22 | 8/22 | 8/22 |
| 11 | 28~30-Sep-05 | 1~3 | Prisoners in a prison | Shelf-cooked meal ^c | 113/600 | 61 | [Norovirus] <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> | - | - | 14/14 | 14/14 | 14/14 | 41/46 |
| 12 | 2~6-Oct-05 | 1~5 | Elementary and high school children | Unknown (School lunch) | 39/94 | 39 | <i>C. jejuni</i> (sporadic case) <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> EPEC | 1/5 | - | - | 5/5 | 5/5 | IM ^f |
| 13 | 28~30-May-06 | 0~2 | Citizens at restaurant | Lunch (pilaf and scrambled egg ^d) | 27/34 | 27 | <i>A. hydrophila</i> <i>C. jejuni</i> (sporadic) * <i>S. aureus</i> | 2/5 | - | - | 1/16 | 1/16 | IM |
| 14 | 4-Jul-06 | 0 | Boarder of high school | Catering box lunch | 34/51 | 34 | <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> | 1/5 | - | - | 8/8 | 8/8 | 19/50 |
| 15 | 16-Aug-06 | 1 | Citizens at restaurant | Fried rice | 15/34 | 15 | * <i>B. cereus</i> | 1/4 | - | - | 1/4 | 1/4 | 2/4 |
| 16 | 23~29-Aug-06 | 2~8 | Boarder of training high school | Supper (contaminated sliced cabbage ^e) | 19/43 | 18 | * <i>C. jejuni</i> <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> | 3/5 | - | - | 6/9 | 8/9 | 9/14 |
| 17 | 2-Sep-06 | 3 | Citizens in Buddhist service | Catering box lunch | 14/49 | 4 | <i>V. parahaemolyticus</i> | 4/5 | - | - | 5/9 | 5/9 | IM |
| 18 | 22-Dec-06 | 5 | Citizens at restaurant | Supper (chicken) | 12/12 | 8 | * <i>C. jejuni</i> | 4/5 | - | - | 4/6 | 4/6 | 3/6 |
| 19 | 4-Jul-07 | 6 | Citizens at restaurant | Supper (chicken) | 7/11 | 7 | * <i>C. jejuni</i> | 3/5 | - | - | 4/9 | 4/9 | 4/10 |
| 20 | 21-Oct-07 | 1 | Citizens at restaurant | Supper | 7/13 | 7 | EPEC | 1/2 | - | - | 1/2 | 1/2 | 2/3 |
| 21 | 29-Nov-07 | 1 | Citizens at restaurant | Supper (raw chicken liver) | 8/8 | 7 | * <i>P. shigelloides</i> * <i>C. jejuni</i> | 2/5 | - | - | 3/5 | 3/5 | IM |
| Total | | | | | 54/93 | 58.1% | 110/191 | 57.6% | 55.4% | | | | |

a: EPEC O:166, O:UT and *astA*-positive *E. coli* O:27, O:UT strains were isolated from stream water drunk by patients in case 1; b: *B. cereus* was isolated from cooked pork in case 7; c: *astA* genes were detected from 5 food samples in case 11; d: *S. aureus* was isolated from pilaf and scrambled egg in case 13; e: *C. jejuni* specific gene was detected from 5 food samples in case 17; f: Impossible isolation. *: 14 cases examined by SG-qPCR and viable cell count.

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)
分担研究報告書

Real-time PCR を用いた食中毒細菌の網羅的検査法の標準化

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、機器には ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems 以下 ABI) と 7500 Fast Real-Time PCR System (ABI)を、試薬には SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)を用い、福島ら¹⁾の条件で代表的食中毒細菌 (*Salmonella* spp.、*eaeA*-positive *Escherichia coli*、*Campylobacter* spp.、*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、両機種において 8 菌種全ての標的遺伝子を十分な感度で増幅できたが、7500 Fast Real-Time PCR System を Fast mode で使用した場合にのみ、*V. parahaemolyticus* と *Campylobacter* spp. において遺伝子増幅に問題があることわかった。また、両機種ともに、*Salmonella* spp. と *C. perfringens* のプライマーセットで非特異的増幅が高頻度に起こることから、対策が必要であると考えられた。

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。昨年度の検討の結果、ABI PRISM 7000 (ABI) 及び通常使用している Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI) の組み合わせでは標的遺伝子が増幅できない菌種があることが判明した。そこで、今回は試薬を SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)に変更し検討を行うこととした。また、7500 Fast Real-Time PCR System (ABI) が当研究所

に導入されたことから、この機種を用いた検討も合わせて行った。

B. 研究方法

Real-time PCR を行った機種は ABI PRISM 7000 及び 7500 Fast Real-Time PCR System で、試薬は SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) を使用した。また、合成プライマー (Sigma) はカートリッジ精製のものを使用し(表 1)、反応溶液中の最終濃度が 0.4 μ M となるよう調整した。菌体からの鋳型 DNA 抽出にはアルカリ抽出法を用い、使用した菌株は、表 2 に示した。

ABI PRISM 7000 については、反応液量が 50 μ l で、95°C、30 秒の酵素の活性化を行った後に、95°C、5 秒の熱変性後、60°C、31 秒のアニーリングを 40 サイク

ル行った。7500 Fast Real-Time PCR System では、反応液量 20 μ l で実施した。反応条件は、Fast mode では、95 $^{\circ}$ C, 30 秒の酵素の活性化を行った後に、95 $^{\circ}$ C, 3 秒の熱変性後、60 $^{\circ}$ C, 25 秒のアニーリングを 40 サイクル行った。Standard mode では、95 $^{\circ}$ C, 30 秒の酵素の活性化を行った後に、95 $^{\circ}$ C, 5 秒の熱変性後、60 $^{\circ}$ C, 34 秒のアニーリングを 40 サイクル行った。いずれの条件においても、反応終了後、融解曲線解析を実施し、Tm 値の測定を行った。

糞便への添加実験は、各菌のブレインハートインフュージョンブロス培養液を原液とし、滅菌生理食塩水で 10 倍階段希釈系列を作成し、それぞれ 50 μ l ずつを 2mL チューブに入れ、遠心を行い上清を取り除いたものに糞便 200mg を加え試料とした。QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) で DNA を抽出した後、7500 Fast Real-Time PCR System の Fast mode と Standard mode にて反応を行った。この添加実験においては、反応サイクル数は 30 サイクルとした。また、同時に培養液中の各菌の生菌数を測定し、感度を求めた。

Salmonella Enteritidis による食中毒事例の解析については、7500 Fast Real-Time PCR System の Standard mode で反応を行い、反応サイクルは 40 サイクルと 30 サイクルの 2 通り行った。糞便からの鋳型 DNA の抽出には、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を、食品には QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた。また、conventional PCR と比較を行うために、サルモネラ菌 *invA* 遺伝子検出用 Primer Set SIN-1&2 (TaKaRa) を用い conventional PCR を実施した。反応条件等は、マニュアルに従った。

C. 研究結果

初めに生菌数を測定した 8 菌種から抽出した DNA を用い 10 倍階段希釈系列を作成し、ABI PRISM 7000 と 7500 Fast Real-Time PCR System の 2

機種で Real-time PCR を実施した。PCR 反応チューブ当りの生菌数と閾値を越えたサイクル数 (Ct 値) で検量線を作成した (図 1、2、3)。その結果、いずれの条件においても 30 サイクルで、チューブ当たり 10 colony forming unit (CFU) 程度の感度があることが分かった。しかしながら、7500 Fast Real-Time PCR System において、Fast mode で反応を行うと、*Vibrio parahaemolyticus* の標的遺伝子が増幅できないことと、*Campylobacter* spp. の標的遺伝子の増幅効率が Standard mode より低いことが分かった。このことから、今後、7500 Fast Real-Time PCR System では Fast mode を用いず、Standard mode で反応を行うこととした。また、*Salmonella* spp. と *Clostridium perfringens* を対象とする反応で、陰性対象を含む全ての検体で、プライマーダイマーの生成と考えられる非特異的増幅がみられた (図 4)。この非特異的増幅は *Salmonella* spp. を標的とした反応では 28 サイクル前後から、*C. perfringens* を標的とした反応では 33 サイクル前後から始まっていた。これらの非特異的増幅を抑えるため、反応サイクル数を減らすことや、プライマーの再検討を行う必要があると考えられる。

これまでに検討を行った、条件ごとの Tm 値を表 3 にまとめた。その結果、同じ株の遺伝子を増幅したにも関わらず、使用する機種・試薬により Tm 値が異なることが分かる。今回、同じ試薬と鋳型 DNA を用いて、ABI PRISM 7000 と 7500 Fast Real-Time PCR System で反応を行ったが、Tm 値が 1 $^{\circ}$ C 近く異なるものがあつた。このことから、解析する際には使用する機種・試薬の組み合わせにより、Tm 値が僅かに異なることがあることを意識しておく必要があると思われる。

次に、糞便への添加実験を行い、7500 Fast Real-Time PCR System で 30 サイクルの反応条件で検出を試みたところ、Standard mode においては、全て菌において $10^3 \sim 10^5$ CFU/g stool と、Light Cycler を使用した福島らの報告¹⁾と同じ程度の感度であつ

た(表4)。しかし、Fast modeにおいては十分な感度が得られない菌種があった。これらの結果から、7500 Fast Real-Time PCR System においては、Standard mode で30サイクルの反応条件で十分な感度が得られることが分かった。

また、実際の食中毒1事例において、7500 Fast Real-Time PCR System で解析を行ったところ、表5及び、図5のような結果が得られた。この事例の原因食は*S. Enteritidis*に汚染された自家製のちらし寿司であり、検査を行った患者便はいずれも水様便であった。Real-time PCR(40サイクルの反応条件)では、患者3人と食品1件から*invA*が検出され、conventional PCRと同等の結果が得られた。しかし、real-time PCR で30サイクルの反応条件では、患者3人が検出することができず、十分な感度が得られなかった。これらの検体に含まれる標的遺伝子の定量を行ったところ、全ての検体において反応チューブ当たり10 CFU未満であり、非常に低コピー数であった。このことから、検体が水様便や食品のように菌数が少ないことが予想される場合には、反応サイクルが40サイクルであるほうが良好な結果が得られると考えられる。

D. 結論

今回、ABI PRISM 7000と7500 Fast Real-Time PCR System の2機種において、SYBR *Premix Ex Taq II*を用い、食中毒細菌を検出できるか否かについて検討した。その結果、両方の機種において、30サイクルの反応条件で8菌種全てを十分な感度で検出することができた。しかし、7500 Fast Real-Time PCR System においては、Fast mode で反応を実施すると、*V. parahaemolyticus*と*Campylobacter spp.*で増幅に問題があったことから、この機種ではstandard mode で反応を実施する必要があることがわかった。また、今回検討を行った2機種において、*Salmonella spp.*と*C. perfringens*を対象にしたプライマーセットで、プライマーダイマー生成と考えられる非特異的増幅が高頻度に観察されたことから、対策が必要と考えられた。

E. 研究発表

なし

F. 文献

- 1) 福島博、角森ヨシエ:リアルタイム PCR 法による食中毒細菌の迅速スクリーニングの検討、感染症誌 2005;79、644-655.

表 1 今回使用したプライマー

| 菌種 | 標的遺伝子 | プライマー |
|--------------------------------------|-------------|---|
| <i>eaeA</i> -positive <i>E. coli</i> | <i>eaeA</i> | eae-F2-Nielsen eae-R-Nielsen |
| <i>Campylobacter</i> spp. | <i>gyrA</i> | JL238 JL239 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | <i>tdh</i> | Tdh199-F Tdh199-R |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>FemB</i> | FemB-fw FemB-rv |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 16S rRNA | Cperf165F Cperf269R |
| <i>Bacillus cereus</i> | <i>crsI</i> | ces-TM-F ces-TM-R |
| <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> | <i>astA</i> | EAST-1S EAST-1AS |
| <i>Salmonella</i> spp. | <i>invA</i> | Styinva-JHO-2-left Styinva-JHO-2-right |

表 2 検討に使用した菌株

| No. | 菌株名称 | 菌株番号 |
|-----|--------------------------------------|--------------|
| 1 | <i>Escherichia coli</i> (O157) | ATCC 43894 |
| 2 | <i>Campylobacter jejuni</i> | ATCC 43440 |
| 3 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 当所分離株 (22-1) |
| 4 | <i>Staphylococcus aureus</i> | IFO 12732 |
| 5 | <i>Clostridium perfringens</i> | ATCC 12715 |
| 6 | <i>Bacillus cereus</i> | 当所分離株 (5-3) |
| 7 | <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> | 当所分離株 (2-8) |
| 8 | <i>Salmonella</i> Typhimurium | ATCC 13311 |

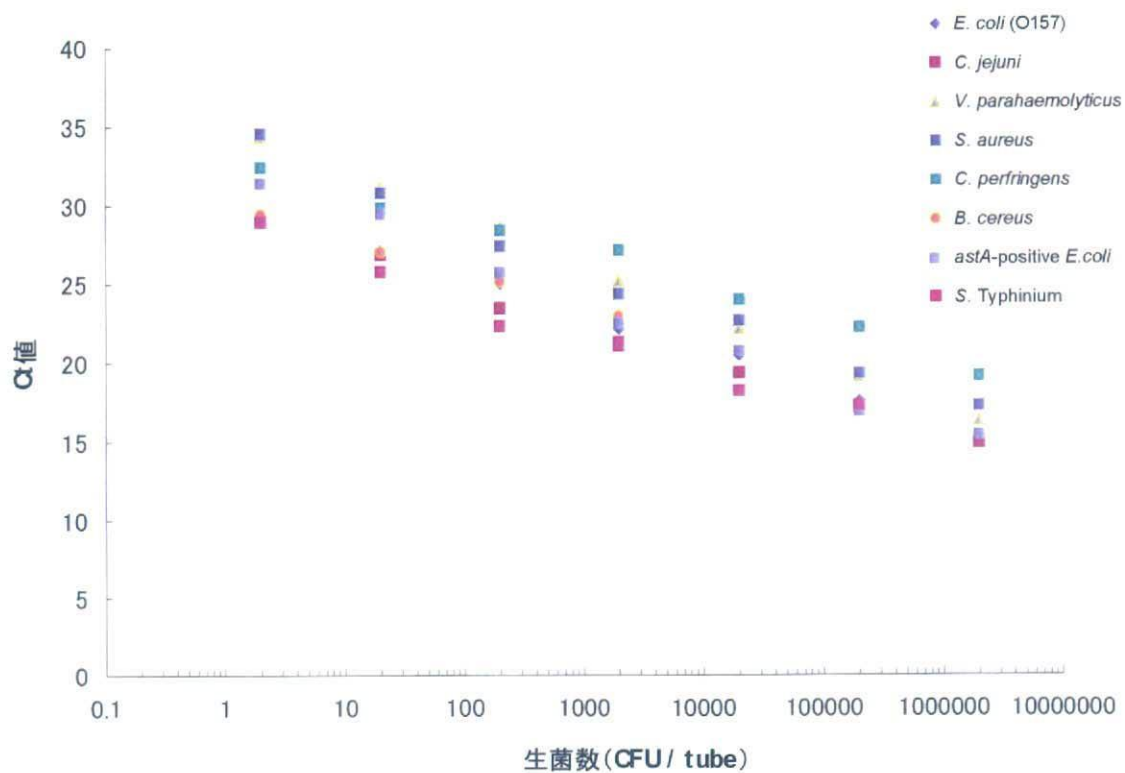


図 1 ABI PRISM 7000 におけるチューブ当たりの生菌数と Ct 値の比較

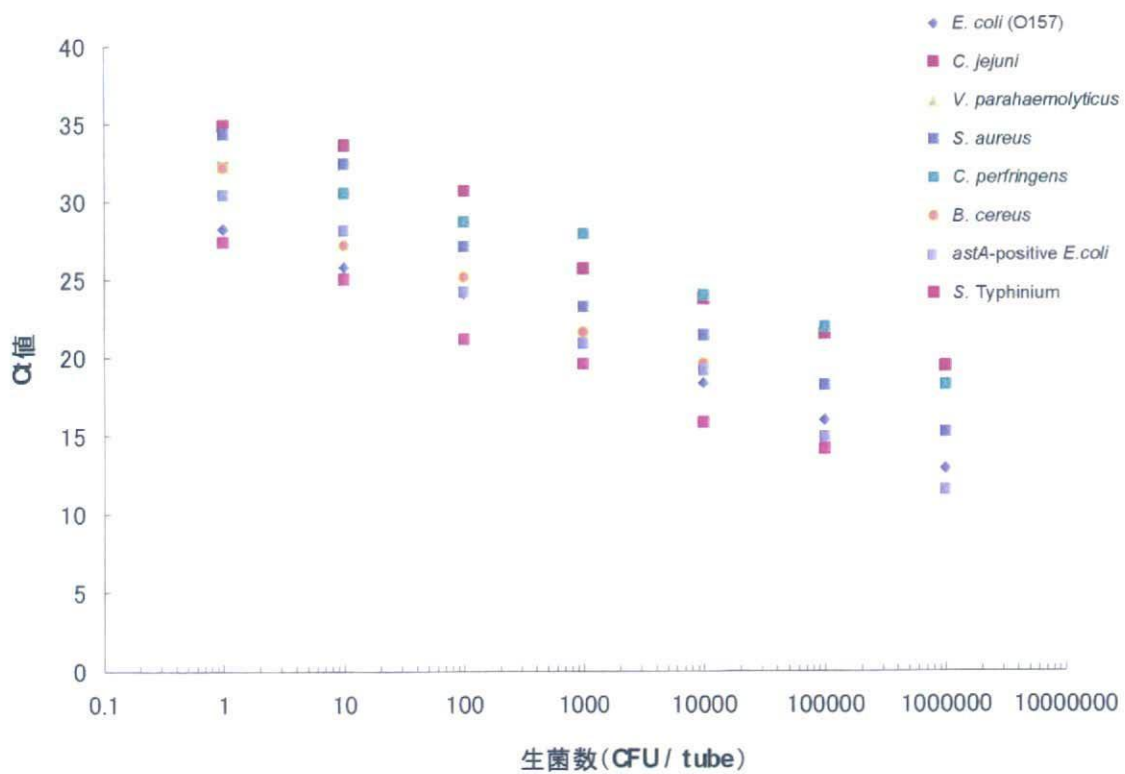


図 2 7500 Fast Real-Time PCR System (Fast mode)における

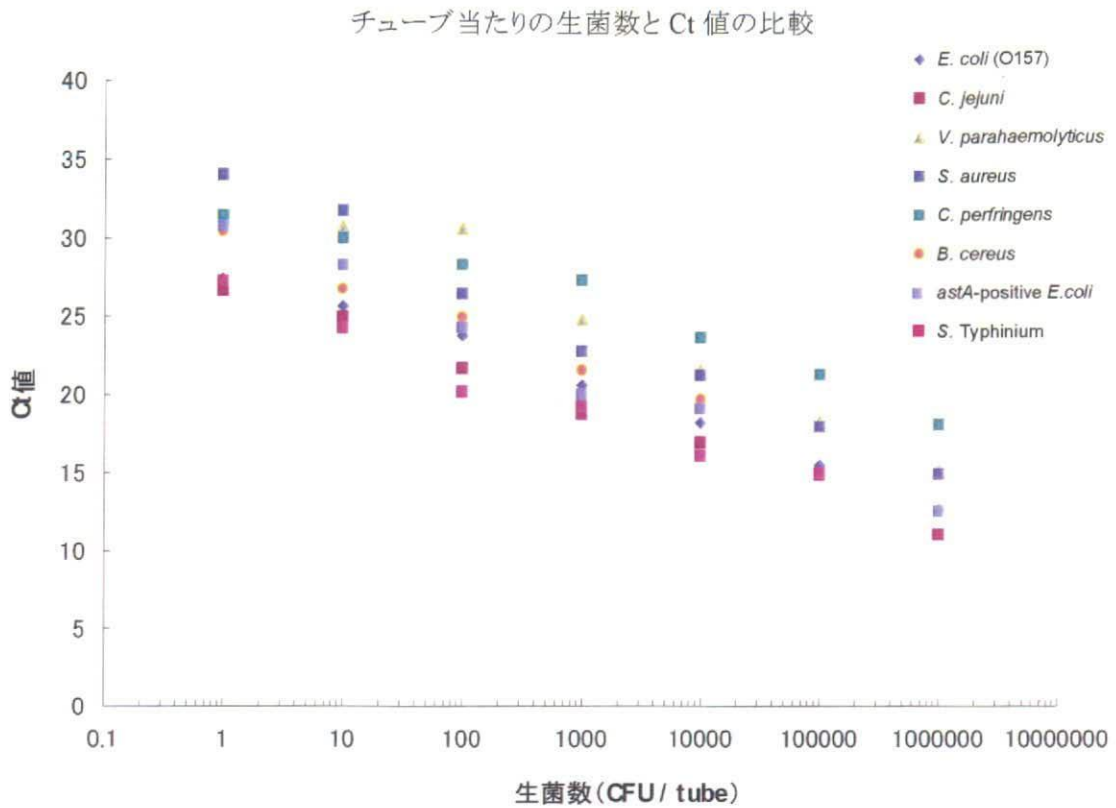


図3 7500 Fast Real-Time PCR System (Standard mode)における
チューブ当たりの生菌数と Ct 値の比較

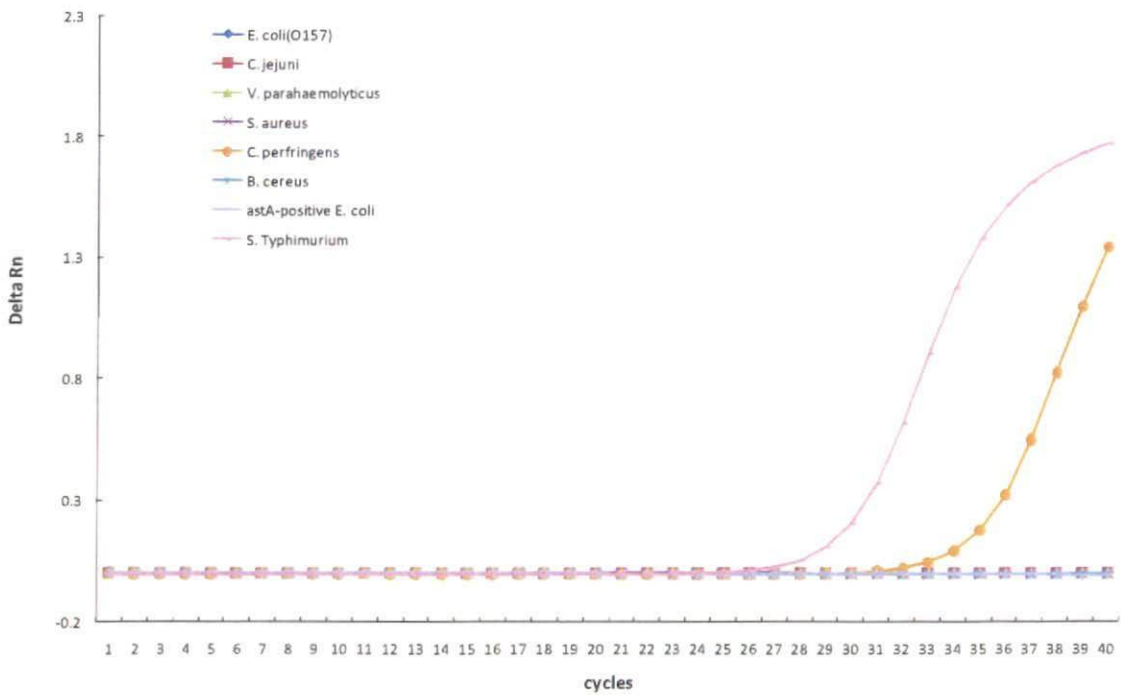


図4 陰性対象における非特異的増幅

*使用機種(反応条件): 7500 Fast Real-Time PCR System (Standard mode)

表3 機種・試薬の組み合わせによる Tm 値の比較

| No. | 菌株名称 | Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI) | | SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) | |
|-----|--------------------------------------|---|----------------|--------------------------------|-----------|
| | | ABI PRISM 7000 | ABI PRISM 7000 | ABI 7500 Fast | |
| | | | | Standard mode | Fast mode |
| 1 | <i>Escherichia coli</i> O157 | 77.1 | 80.6±0.4 | 79.8 | 79.7±0.2 |
| 2 | <i>Campylobacter jejuni</i> | 78.6 | 82.2±0.2 | 81.2±0.2 | 81.3±0.2 |
| 3 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | NT* | 81.8±0.2 | 81.0±0.2 | ND** |
| 4 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 79.9 | 83.6±0.5 | 82.9±0.2 | 82.9±0.2 |
| 5 | <i>Clostridium perfringens</i> | 81 | 84.1±0.3 | 83.6±0.3 | 83.6±0.2 |
| 6 | <i>Bacillus cereus</i> | NT* | 80.5±0.6 | 80.2±0.2 | 80.4±0.2 |
| 7 | <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> | 81.4 | 84.8±0.4 | 84.7±0.2 | 84.7±0.2 |
| 8 | <i>Salmonella</i> Typhimurium | ND** | 80.1±0.2 | 80.1±0.3 | 79.9 |

*未検査 **増幅されなかった

表4 7500 Fast Real-Time PCR System における糞便への添加実験結果

| No. | 菌株名称 | 感度 (CFU / g stool) | |
|-----|--------------------------------------|--------------------|-----------------|
| | | Fast mode | Standard mode |
| 1 | <i>Escherichia coli</i> O157 | 10 ⁵ | 10 ⁵ |
| 2 | <i>Campylobacter jejuni</i> | 10 ⁷ | 10 ³ |
| 3 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | ND* | 10 ³ |
| 4 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 ⁴ | 10 ⁴ |
| 5 | <i>Clostridium perfringens</i> | 10 ⁶ | 10 ⁵ |
| 6 | <i>Bacillus cereus</i> | 10 ³ | 10 ³ |
| 7 | <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> | 10 ⁴ | 10 ⁵ |
| 8 | <i>Salmonella</i> Typhimurium | 10 ⁵ | 10 ⁴ |

*増幅されなかった

表 5 食中毒事例での Real-time PCR の応用例
(*Salmonella* Enteritidis が分離された1事例)

| 番号 | 試料 | 分離 | Conventional PCR | Real-time PCR** | | |
|----|---------------|----|------------------|-------------------|-------------------|-------------|
| | | | | 検出 (30cycle) | 検出 (40cycle) | Tm値 (°C) |
| 1 | 患者便 | ○ | ○ | ○ | ○ | 80.0 |
| 2 | 患者便 | ○ | × | × | × | — |
| 3 | 患者便 | ○ | ○ | × | ○ | 80.6 |
| 4 | 食材 (ちらし寿司) | ○ | × | × | △* | 80.9 |
| 5 | 患者便 | × | ○ | ○ | ○ | 80.6 |

*融解曲線解析において弱いピークを確認した

**使用機種(反応条件): 7500 Fast Real-Time PCR System(Standard mode)

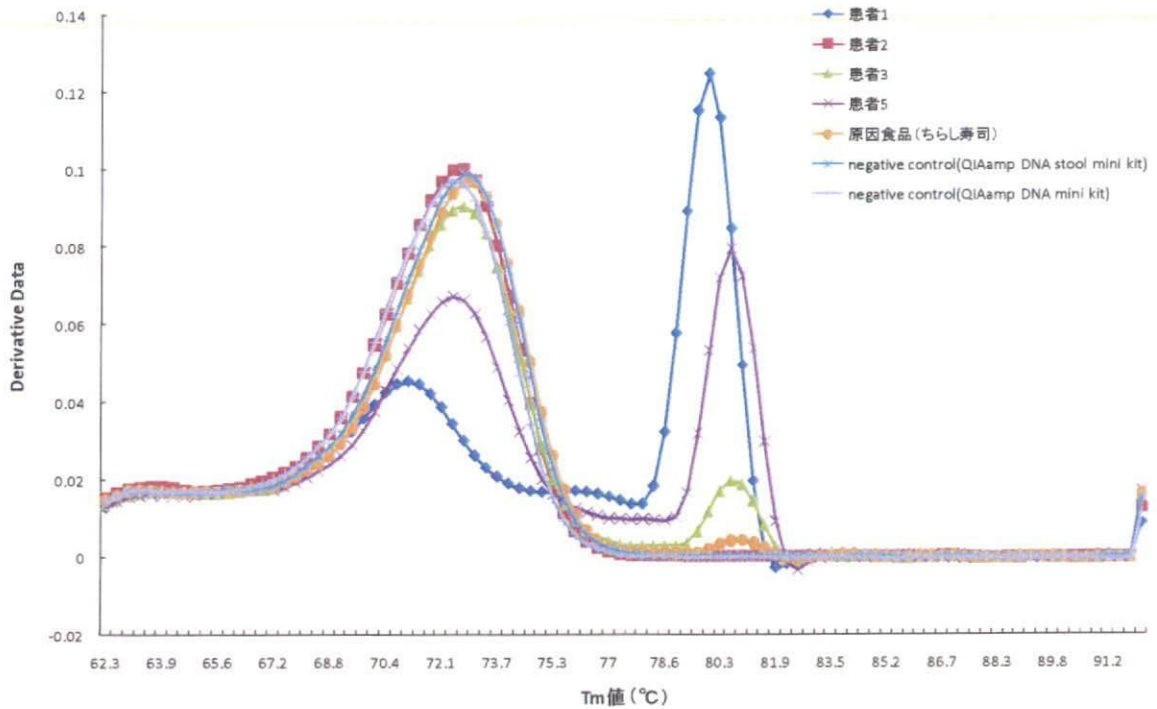


図 5 *Salmonella* Enteritidis が分離された食中毒事例での融解曲線解析結果

*使用機種(反応条件): 7500 Fast Real-Time PCR System (Standard mode: 40 サイクル)

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
ーリアルタイム PCR 法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法の検討ー

分担研究者 長井忠則 北海道立衛生研究所

研究要旨 SYBR Green を用いたインターカレーター法による食水系感染症原因菌の迅速検査法について、リアルタイム PCR 機器を用いて網羅的検査を実施するための検査法の確立を目指し、複数の地方衛生研究所において実証試験を実施した。サルモネラ、腸炎ビブリオ、セレウス、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌、黄色ブドウ球菌、ウェルシュ菌、*astA* 陽性大腸菌の 8 種を主に検証した。純培養菌についてリアルタイム PCR 並びに duplex リアルタイム PCR の 2 試験系により評価した。検出感度はどの菌種も 10^3 cfu/mL 程度を示した。食中毒事例で採取された有症者や従事者便をはじめ、食材・食品についてインターカレーター法によるリアルタイム PCR を検証した結果、短時間で妥当な結果を得た。多種類の遺伝子を同時に検査するリアルタイム PCR は、食中毒事例等の食水系感染症の迅速診断に有効な方法であることが確認された。

研究協力者

| | |
|-------|---------------|
| 須釜久美子 | 福島県衛生研究所微生物課 |
| 菅野奈美 | 福島県衛生研究所微生物課 |
| 小黑祐子 | 福島県衛生研究所微生物課 |
| 山口敬治 | 北海道立衛生研究所微生物部 |
| 清水俊一 | 北海道立衛生研究所微生物部 |
| 森本 洋 | 北海道立衛生研究所微生物部 |

食中毒発生時の各種疫学調査により想定された細菌を検出する培地を選択して培養を実施したが、現在は全ての食中毒細菌を対象として培地を調製・準備し検査を実施している。そのため、食中毒事例が発生すると、膨大な量と種類の培地が消費され、また人的浪費も大きい。

近年、各種病原細菌に特有の遺伝子配列が解明され、PCR 等遺伝子増幅法が感染症の原因解明に広く利用されている。リアルタイム PCR 法は、インターカレーター法、蛍光プローブ法、サイクリングプローブ法があり、標的遺伝子部位の増幅に伴い変化した発光強度を増幅サイクル毎に測定するため、標的遺伝子増幅の迅速な検出や定量解析が可能である。

SYBR Green を用いたインターカレーター法は、DNA 複製時に試薬が取り込まれ蛍光を発するため菌種毎のプローブを必要とせず、TaqMan Assay 等プローブを用いる方法より安価に実施

A. 研究目的

感染症を惹起する微生物は、創傷感染、呼吸器感染、消化器感染、性感染等様々な感染経路により人体に侵入する。消化器感染症は食品や水を介して感染が起きると食中毒の様相を呈することが多く、感染拡大防止など公衆衛生の観点から、早急な原因物質ならびに原因食品等の究明が必要である。

細菌性食中毒発生時に現在行われている原因物質究明調査は培養法が主である。過去には、

できる利点を持っている。また、福島ら¹⁾はインターカレーター法による食中毒細菌特異遺伝子部位検出法を開発した。

そこで、食中毒発生時の細菌検査に応用するため、インターカレーター法を用いたリアルタイム PCR 法の導入が、各地方衛生研究所において配備されているリアルタイム PCR 機器を用いて実施できるか実証試験を行った。原法は Light Cycler を用いて開発されたものである。インターカレーター法によるリアルタイム PCR 法の導入方法における各種条件について検討した。

B. 研究方法

対象とする細菌は、近年食中毒事例が多い原因である、カンピロバクター、サルモネラ、腸炎ピブリオ、ウェルシュ菌、セレウス、黄色ブドウ球菌、腸管出血性大腸菌、*astA* 保有大腸菌の 8 種を選択した。

(1) 使用菌株および調整

(地研 A) 試験に使用した菌株を表 1 に示した。それぞれの菌はトリプトソニアガー (TSA 培地) で培養し、その後ブレインハートインフュージョンブイヨンで 2 代継代培養した。ただし、*Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) については、1%NaCl 加 TSA 培地を用い、その後アルカリペプトン水で継代培養をした。*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (*C. jejuni*) は微好気培養し、*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) は嫌気培養をした。対数増殖期の状態で菌数測定を実施するため、約 18 時間培養の菌液を測定し、同時にその菌液からの DNA 抽出を実施した。

菌数測定には希釈液としてペプトン加生理食塩水を用い、ミスラ法²⁾で実施した。培地は、*Bacillus cereus* (*B. cereus*) には TSA 培地と NGKG 培地を、*C. jejuni* には TSA II 5% ヒツジ血液寒天培地と CCDA 培地を、*C. perfringens* には TSA II 5% ヒツジ血液寒天培地と CW 寒天培地

を、*V. parahaemolyticus* には 1%NaCl 加 TSA 培地を用い、他には TSA 培地を用いた。菌数は複数の培地を用いた場合においても同様の結果を示した。また、NGKG 寒天培地と CW 寒天培地に使用した卵黄液は市販 (極東製薬) の卵黄液と生卵からの卵黄液を用いたが、その菌数はほぼ同じであった。

(地研 B) 2001~2006 年に発生したセレウス食中毒 3 事例からの分離株を含め 10 株を対象とした (表 2)。分離株の単コロニーを 0.6% 酵母エキス添加トリプティックソイブロス (以下、TSYEb) に接種し、37℃で 24 時間培養した。ウェルシュ菌は 1996 年~2001 年に発生したウェルシュ食中毒 3 事例からの分離株 10 株を対象とした (表 3)。分離株の単コロニーをクックトミート培地に接種し、37℃で 24 時間培養した。それぞれの培養液 1mL から DNA を抽出した。

(2) リアルタイム PCR 用プライマー

使用したリアルタイム PCR 用プライマーを表 4 に示した。

(3) リアルタイム PCR 機器

リアルタイム PCR 機器は ABI7000 (地研 A) 並びに ABI7700 (地研 B) を用いた。機器を駆動させるソフトウェアは MacOS 8.6 上で駆動する Sequense Detection System ver 1.9.1 (ABI) を用いた。また、 T_m (melting temperature) 値を求めるために Dissociation Curves ver 1.1 (ABI) を用いた。

(4) リアルタイム PCR 試薬および PCR 条件

(地研 A) リアルタイム PCR 試薬は、SYBR PREMIX ExTaq™ (TaKaRa) を用いた。PCR 条件は使用説明書に従った。菌株についてはサイクル数を 40 サイクルとし、糞便検体については 35 サイクルとした。PCR mixture は昨年度の結果から、20 μ L 系でも 50 μ L 系でも結果に差が見られなかったことから 20 μ L 系で実施した。

プライマーについては表 4 に示した。融解曲線分析による T_m 値は今回使用した菌株についての結果である。

(地研 B) リアルタイム PCR 試薬は、SYBR PREMIX ExTaq™II(TaKaRa)を用いた。PCR 条件は使用説明書に従った。PCR mixture は 20 μ L 系で実施した。

(5) DNA の抽出

(地研 A) 菌株からの DNA 抽出は QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用い、抽出 DNA の希釈には EASY Dilution (TaKaRa) を用いた。糞便検体からの DNA 抽出は QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)を用いた。

(地研 B) 菌株・食品からの DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)を用いた。糞便検体からの DNA 抽出は QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)を用いた。

(6) 事例試料

地研 A は 2008 年 6 月に発生した食中毒関連由来の糞便を用いた。分離培養の結果を表 5 に示す。ただし、DNA 抽出を実施したのは 2008 年 12 月である。保管は冷蔵であった。この食中毒事例の病因物質は *C. jejuni* と報告されている。

地研 B は 2008 年 6 月に発生した食中毒事例 (FP/08-12) の患者並びに原因施設の従業員の糞便 20 検体を試験に供した。食品として、食材、検食、弁当残品 (2 箇所) から 31 試料を試験に供した。当該事例の原因菌はウェルシュ菌 (以下、CP) とされたが、当初セレウス菌が疑われた。食品からセレウス菌が検出されものの、有症者便からは CP が検出された事例であった。事例発生後約 1 週間はセレウス菌がその原因として最も可能性が高いと考えられ、試料からのセレウス菌検査が優先的に行われた。しかし、先の事実から原因としての CP の再評価がなされ、検査の結果、原因菌は CP が妥当であるとの判断にたった。

C 研究結果

(1) 検出感度の測定

図 1 ~ 10 にそれぞれの菌株の増幅結果と融解曲線を示した。図を見やすくするために 1 ホ

ールのみの結果を示したが、実際には 2 ホールずつ実施した。ミスラ法で得られた菌数を基に $10^6 \sim 10^9$ CFU/mL まで実施した結果、全ての菌株が 10^3 CFU/mL まで確実に検出できた。予備実験で実施した結果、 10^7 CFU/mL については非特異増幅が多くみられたため 10^6 CFU/mL からの測定とした。

セレウス菌は、嘔吐毒産生株と非産生株を用い、検出プライマーは嘔吐毒産生に關与するセリウリドの *ces* gene を標的としたものを用いた。その結果、嘔吐毒非産生株は増幅が認められなかった。 10^1 CFU/mL まで検出可能であったが、DNA 濃度が低くなるにつれ T_m 値も低くずれ込んだ。

C. jejuni は、多くの株はナリジクス酸感受性でセファロシン耐性を示し、馬尿酸塩加水分解試験陽性である。今回、ナリジクス酸耐性でセファロシン感受性を示し、馬尿酸塩加水分解試験陰性を示す株を用いてみた結果、どちらの菌株も同様の結果を示し、 10^2 CFU/mL まで検出可能であった。

(2) Duplex SYBR Green リアルタイム PCR

今回、数種類の組み合わせを実施したが、 T_m 値が離れているもののみを図 11 ~ 13 に示した。

(3) 食中毒由来の糞便検体を用いての検討

図 14 に *C. jejuni* のリアルタイム PCR 結果を示した。増幅結果と融解曲線分析から、表 5 の番号 3, 5, 6, 7 に増幅が確認できた。

図 15 には *Salmonella* spp. のリアルタイム PCR 結果を示した。増幅は確認できなかった。

図 16 には、*C. jejuni* と *E. coli* (*astA*) の Duplex SYBR Green リアルタイム PCR の結果を示した。増幅結果と融解曲線分析から、表 2 の番号 3, 5, 6, 7 に *C. jejuni* の増幅が確認できた。また、*E. coli* (*astA*) の増幅は確認できなかった。

FP/08-12 事例における有症者便の直接培養では 17 名中 12 名から CP が検出された。便の RPLA では菌が陽性であった 8 名分を実施し、すべてから CP エンテロトキシンが検出された。

便増菌液から抽出した DNA を用いた PCR では検査に供した 19 検体全てから CP エンテロトキシン遺伝子が検出された。便から直接抽出した DNA を用いたリアルタイム PCR 検査では、有症者からは 17 名中 13 名が、従事者からは 3 名中 2 名から CP エンテロトキシン遺伝子が検出され(表 6)。一方、セレウス菌(以下、BC)は、増菌法による菌検出、PCR による下痢毒・嘔吐毒検査では検出されるものの、リアルタイム PCR では、下痢毒・嘔吐毒ともに検出されなかった(表 6)。

食材・食品の検査では、菌培養、食品 DNA による PCR 並びにリアルタイム PCR で煮物(鶏肉、コンニャク)から CP エンテロトキシン遺伝子が検出された(表 7)。BC は培養法・嘔吐毒遺伝子の PCR 並びにリアルタイム PCR 法で試料のほぼ全体から検出され、エンテロトキシン遺伝子は一部の食品から検出された(表 8, 9)。

D. 考察

検出感度の測定から、純培養の菌株において菌数が $10^6 \sim 10^3$ CFU/mL に良好な結果が得られた。SYBR Green を用いたインターカレーター法を実施する場合は、primer dimer による非特異増幅が避けられないが、増幅産物の T_m 値を求めておくことにより標的 DNA の増幅が確認できる。今回の実験結果では、DNA 濃度が 10^2 CFU/mL より低くなるにつれて非特異増幅が認められた。

福島らは Duplex SYBR Green リアルタイム PCR について、SYBR Green を用いたインターカレーター法の特異性は T_m 値で確認できることにあり、 T_m 値の異なるプライマーを組み合わせることによって食中毒事例に対し迅速にスクリーニングできることを報告している¹⁾。今回、数種類の組み合わせを実施したが、 T_m 値が近い値のため、検体を用いた場合判別が困難になることが考えられた。 T_m 値で確認ができるものの、さらに検討が必要であると考えられる。食中毒由来の糞便検体を用いて実施した結果か

ら、*C. jejuni* については分離培養と検出番号は異なったが、ほぼ同様の結果となった。特に表 2 の番号 3 の検体については *C. jejuni* が糞便中に高濃度に存在していたと考えられた。DNA 抽出が食中毒発生時から時間を経過していたが、*C. jejuni* が糞便中で増殖しやすいとは考えにくく、食中毒発生時に対応できていても検出は可能であったと思われる。また、表 2 の培養において *Salmonella* 04 が検出されているが、増菌培養で検出したということから、糞便中の菌量が少なく、リアルタイム PCR では検出できなかったと思われる。

FP/08-12 事例では、初期対応で異なる菌種が原因と推測されたため、すべての検査過程に影響があったものと思われる。今回行ったリアルタイム PCR は、CP と BC について実施し、DNA 抽出後 2 時間程度で結果が得られた。

便の検査では、便から DNA を抽出しリアルタイム PCR を行う場合の検出感度が、 $10^4 \sim 5$ cfu/g 程度であることから、便中に十分菌が増殖していることが必要である。CP や BC は、健常人の便検査でも検出されるために腸管内に常在していると考えられるが、その菌量は少なく、増菌培養を行って検出されるレベルである。感染症では、それぞれの菌が腸管内で十分な菌量にまで増殖していると考えられ、福島ら¹⁾が報告しているとおり、便から抽出した DNA によるリアルタイム PCR は、検出感度が低いため常在菌の影響を受けないことが考えられる。

食品から DNA 抽出を行い、食品由来感染症の原因食品を追求するための方法としてリアルタイム PCR を使用することは、便と同様食品中に菌が十分増殖していることが条件になる。感染型食中毒では食品中の菌量が少なく検出されないおそれがあるが、今回の事例の原因菌と推定された CP や BC のような毒素型食中毒では食品中の原因菌量が多く、食品から抽出した DNA を用いたリアルタイム PCR は有効であると考えられる。特に CP の場合保存法に制限が多く、食材や

検食を保管する通常の凍結では短時間で死滅することが知られている¹²⁾。したがって、凍結や加熱などの操作により損傷を受け、その後の培養により菌が回収されない事例においても、DNAを抽出し過去の試料中の対象菌の増殖経過を明らかにすることが可能である。事実、Ikeda *et al.*¹³⁾は黄色ブドウ球菌死菌の定量にリアルタイムPCRを使用し、添加回収試験で生菌と死菌に相関があるとし、加熱した試料から黄色ブドウ球菌遺伝子を検出している。FP/08-12事例では菌培養でウェルシュ菌が一部の残品から抽出されたが食品から抽出したDNAでは、PCR、リアルタイムPCRともに複数の食品(検食・残品)から検出され、保存中に菌が死滅したことが考えられた。リアルタイムPCRは、死菌を含めて対象遺伝子の定量を行うことから、保存条件が厳しい細菌で、培養できない条件であっても、過去における試料中の対象菌増殖の経過が解明され、食水系感染症の原因解明に有効な手段と考えられる。

SYBR Green リアルタイムPCR法はTaqManプローブを用いたリアルタイムPCR法に比べ、特異性は劣るが安価である。今回の結果から、福島らも報告している¹⁾とおおり、細菌感染症の集団感染事例を迅速にスクリーニングするために極めて有用であることが示唆された。さらに多くの菌のプライマーを用いて検討することにより、食品衛生対策に貢献できるものと考えられる。

結論

腸管出血性大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ、セレウス菌、腸炎ピブリオ、*astA*保有大腸菌、ウェルシュ菌、カンピロバクターの8種でABI機器を用いたSYBR Green法により、使用菌株はそれぞれの標的遺伝子が増幅された。Duplex PCRによる複数遺伝子の検出はT_m値の差による解析で可能であるが、T_m値はDNA濃度ならびに機器により変動があるため、適切な

プライマーを選択する必要がある。食中毒事例の試料に今回の方法を適用した。DNA抽出後短時間で結果が得られ、今後使用するプライマー設定を行い、食中毒をはじめとした食水系感染症の網羅的迅速診断に利用することが期待される。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 文献

- 1) 福島博, 角森ヨシエ: リアルタイムPCR法による食中毒細菌の迅速スクリーニングの検討. 感染症誌, 79: 644-655, 2005
- 2) 坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二: 新 細菌培地学講座 -上-, 第二版, 182-192, 近代出版, 1986
- 3) Fukushima, H *et al*: in preparation
- 4) Wilson, DL., Abner, SR., Newman, TC., Mansfield, LS.: Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay, J Clin Microbiol., 38, 3971-3978, 2000
- 5) Klotz, M., Opper, S., Heeg, K., Zimmermann, S.: Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A to D by real-time fluorescence PCR assay, J Clin Microbiol, 41, 4683-4687, 2003
- 6) Juthikumard, N. and Griffiths, MW.: Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays, Appl Environ Microbiol, 68, 3169-3171, 2002
- 7) Nielsen, EM., Andersen, MT.: Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay, J Clin Microbiol, 41, 2884-2893, 2003
- 8) Hoorfar, J., Ahrens, P., and Radstrom, P.:

Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. J Clin Microbiol, 38: 3429-3435, 2000

9) Yatsuyanagi, J., Saito, S., Miyajima, Y., Amano, K., Enomoto, K. : Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan, J Clin Microbiol, 41, 2033-2039, 2003

10) Nishibuchi, M., Takeda, J., Oohashi, T., Nishimura, N., Ozaki, H., Fukushima, S.: Methods to detect the thermostable direct hemolysin gene and a related hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*, Nippon Rinsho, 642, 348-352, 1992

11) Wise, MG. and Siragusa, GR.: Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR, Applied Environ Microbiol, 71, 3911-3916, 2005

12) Food and Drug Administration: Chapter 16. *Clostridium perfringens*, Bacterial Analytical Manual, 8th edition, AOAC International, 1998

13) Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S-i.: Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real-time PCR, J Vet Med Sci, 67, 1037-1041, 2008

表 1 Real Time PCR の検証に使用した菌株一覧

| 番号 | 菌株番号 | 菌名 | 毒素産生等 | 由来 | 菌数 CFU/mL |
|----|-------|---|----------------------------------|---------------------|-------------------|
| 1 | F1894 | <i>Bacillus cereus</i> | 下痢毒(-), 嘔吐毒 PCR(+), レチナーゼ・遺伝子(+) | 食中毒関連(糞便) | 7×10 ⁷ |
| 2 | F1892 | <i>Bacillus cereus</i> | 下痢毒(+), 嘔吐毒 PCR(-), レチナーゼ・遺伝子(+) | 食中毒関連(食品) | 3×10 ⁷ |
| 3 | F4790 | <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> | CET 感受性, NA 耐性, 馬尿酸塩加水分解試験(-) | 食中毒関連(糞便) | 6×10 ⁸ |
| 4 | F4021 | <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> | CET 耐性, NA 感受性, 馬尿酸塩加水分解試験(+) | 感染症発生动向調査事業 (糞便) | 5×10 ⁸ |
| 5 | F2596 | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | IV型, エンテロトキシンA, マンニット非分解 | 食中毒関連(食品) | 6×10 ⁸ |
| 6 | F2588 | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | II型, エンテロトキシンD, マンニット分解 | 食中毒関連(糞便) | 6×10 ⁸ |
| 7 | F595 | <i>Clostridium perfringens</i> | エンテロトキシン産生, Hobbs の4型 | 食中毒関連(糞便) | 2×10 ⁸ |
| 8 | F3460 | <i>Clostridium perfringens</i> | エンテロトキシン産生, 血清型 TW71 | 食中毒関連(糞便) | 4×10 ⁸ |
| 9 | F2212 | <i>Salmonella</i> Enteritidis | O:9 I:g,m II:-, 77-ジ型 RDNC | 食中毒関連(食品) | 2×10 ⁹ |
| 10 | F2067 | <i>Salmonella</i> Enteritidis | O:9 I:g,m II:-, 77-ジ型 RDNC | 食中毒関連(食品) | 2×10 ⁹ |
| 11 | F2551 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6 | TDH(+), TRH(-) | 食中毒関連(糞便) | 6×10 ⁸ |
| 12 | F244 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6 | TDH(+), TRH(-) | 感染症発生动向調査事業 (糞便) | 1×10 ⁹ |
| 13 | F2633 | <i>E.coli</i> O157:H7 | stx1(+), stx2(+), eae(+) | 腸管出血性大腸菌感染症 | 2×10 ⁹ |
| 14 | F2204 | <i>E.coli</i> O157:H7 | stx1(+), stx2(+), eae(+) | 腸管出血性大腸菌感染症 | 1×10 ⁹ |
| 15 | F3877 | <i>E.coli</i> 1407aggR,astA | aggR(+), astA(+) | * 国立公衆衛生院分与株 | 2×10 ⁹ |

* 現 国立保健医療科学院

表 2 使用したセレウス菌株

| 番号 | 菌株番号 | 菌種 | 由来 | 原因施設 | 事例 | PCR | | SYBR Green | |
|----|-------|------------------------|------------------|--------------|-----|-----|-----|------------|-----|
| | | | | | | 嘔吐毒 | 下痢毒 | 嘔吐毒 | 下痢毒 |
| 1 | 06220 | <i>Bacillus cereus</i> | 患者 1 FP/06-24 | チキンライス 家庭 | 食中毒 | + | - | + | - |
| 2 | 06221 | <i>Bacillus cereus</i> | 患者 2 FP/06-24 | チキンライス 家庭 | 食中毒 | + | - | + | - |
| 3 | 06222 | <i>Bacillus cereus</i> | 患者 3 FP/06-24 | チキンライス 家庭 | 食中毒 | + | - | + | - |
| 4 | 06223 | <i>Bacillus cereus</i> | 患者 4 FP/06-24 | チキンライス 家庭 | 食中毒 | + | - | + | - |
| 5 | 01053 | <i>Bacillus cereus</i> | 患者 | | 嘔吐毒 | + | - | + | - |
| 6 | 03071 | <i>Bacillus cereus</i> | キヤベツ FP/03-2 | 事例検査試料 | 食中毒 | - | + | - | + |
| 7 | 05012 | <i>Bacillus cereus</i> | 砂 河口 No.6 | 石狩河口 No.6 | 調査 | - | - | - | - |
| 8 | 01045 | <i>Bacillus cereus</i> | 原因食 FP/01-9 | おひたし 給食施設 | 食中毒 | - | + | - | + |
| 9 | 01048 | <i>Bacillus cereus</i> | 吐物 FP/01-9 | おひたし 給食施設 | 食中毒 | - | + | - | + |
| 10 | 01052 | <i>Bacillus cereus</i> | 患者 FP/01-9 | おひたし 給食施設 | 食中毒 | - | + | - | + |

表3 使用したウェルシュ菌株 (エンテロトキシン産生株)

| 番号 | 菌株番号 | 菌種 | 試料由来 | 原因施設 | 事例 | SYBR |
|----|-------|--------------------------------|------|----------|-----|------|
| 1 | 00302 | <i>Clostridium perfringens</i> | 不詳 | | 食中毒 | + |
| 2 | 01010 | <i>Clostridium perfringens</i> | 患者 | 飲食店 | 食中毒 | + |
| 3 | 01030 | <i>Clostridium perfringens</i> | 患者 | 飲食店 | 食中毒 | + |
| 4 | 01319 | <i>Clostridium perfringens</i> | 五目ご飯 | 給食施設 | 食中毒 | + |
| 5 | 01320 | <i>Clostridium perfringens</i> | 調理員 | 給食施設 | 食中毒 | + |
| 6 | 01321 | <i>Clostridium perfringens</i> | 調理員 | 給食施設 | 食中毒 | + |
| 7 | 01322 | <i>Clostridium perfringens</i> | 教員 | 給食施設 | 食中毒 | + |
| 8 | 01323 | <i>Clostridium perfringens</i> | 学生 | 給食施設 | 食中毒 | + |
| 9 | 01324 | <i>Clostridium perfringens</i> | 学生 | 給食施設 | 食中毒 | + |
| 10 | 02002 | <i>Clostridium perfringens</i> | 患者 | 飲食店(ホテル) | 食中毒 | + |

表 4 使用したプライマー一覧

| 菌種 | 標的遺伝子 | プライマー名 | 文献番号 | T _m 値(°C) |
|---|--------------------------|---|------|----------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> | <i>ces</i> | ces-TM-F ces-TM-R | 3 | 79.5~80.0 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> 種特異 DNA | JL238 JL239 | 4 | 81.0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | <i>femB</i> | FemB-fw FemB-rv | 5 | 82.1~82.4 |
| stx1 gene positive EHEC | <i>stx1</i> | JMS1F JMS1R | 6 | 80.6~81.0 |
| stx2 gene positive EHEC | <i>stx2</i> | JMS2F JMS2R | 6 | 81.4 |
| eae gene positive | <i>eae</i> | eaeF2/N eaeR/N | 7 | 79.6 |
| <i>Salmonella</i> spp. | <i>invA</i> | StyinvA-JHO-3-left StyinvA-JHO-2-right | 8 | 79.8~80.1 |
| ast A positive <i>E. coli</i> | <i>astA</i> | EAST-1S EAST-1AS | 9 | 84.3 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | <i>tdh</i> | Tdh 199-R Tdh 199-F | 10 | 80.7 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 16SrRNA | CPerf165F CPerf269R | 11 | 82.9~83.3 |

表 5 Real Time PCR に供した食中毒事例の便試料

| 番号 | 採取年月 | 検出菌(培養) | | DNA 抽出年月 |
|----|--------|---------|---|----------|
| | | 病原性大腸菌 | <i>Salmonella</i> spp. <i>C. jejuni</i> | |
| 1 | 2008.6 | O1 | O4 | 2008.12 |
| 2 | 2008.6 | O25 | + | 2008.12 |
| 3 | 2008.6 | O74 | + | 2008.12 |
| 4 | 2008.6 | O119 | | 2008.12 |
| 5 | 2008.6 | | | 2008.12 |
| 6 | 2008.6 | O8 | + | 2008.12 |
| 7 | 2008.6 | O74 | + | 2008.12 |
| 8 | 2008.6 | | | 2008.12 |