

同定などの研修コースの開設を求める（5機関、3県2市）、また、質疑応答、同定依頼など（4機関、1府、2県、1市）

苦情の受付は、保健所（相当機関）が窓口で、保健所で顕微鏡観察などによるある程度の検査が実施され、そこでの判断、あるいは行政の判断により、衛生研究所（相当機関）へ検査が依頼されるのが検査依頼の通例経路と思われる。リスクプロファイルの開放をどの機関レベルまでとするかを、今後検討する必要があると
思われた。

以上

厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)

馬肉中に存在するザルコシスチスの遺伝子検査法 分担報告書

研究分担者 野崎 智義 国立感染症研究所 寄生動物部部長
研究協力者 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部主任研究官

要旨

原因不明下痢症との関連が指摘される生食用馬肉とそこに含まれる住肉胞子虫ザルコシスチスに関して、ザルコシスチスと不明下痢症の因果関係を明らかにすることを目的に、馬肉中のザルコシスチス遺伝子検査法を考案した。不明下痢症事例残品ならびに市販馬肉商品を試料として、ザルコシスチスの検出と遺伝学的特定、さらに残品より検出されるザルコシスチスの定量を PCR 法により行った。その結果、残品中にはウマ特有のザルコシスチスが存在することを明らかにし、残品と同程度のザルコシスチス量が市販品の中にも検出される場合があることを明らかにした。遺伝子検査法は客観性と迅速性を備え、検査現場にも導入可能と考えられ、同法を用いて残品調査を拡大し不明下痢発症とザルコシスチス量の関係を明確にするとともに、馬肉の汚染モニタリングを行うことにより下痢症発生のリスク管理を図ることが重要と考えられた。

1. 研究目的

近年、全国的に病因物質が不検出、あるいは検出しても症状と合致せず、原因不明として処理された食中毒または有症苦情において、発症患者の共通食として生食用の生鮮食品を提供していた事例が多数報告されている。その中には馬肉の生食（馬刺し）が関連する事例も多数含まれている。獣医学的には馬肉中に住肉胞子虫ザルコシスチスが検出されることはよく知られているが、ウマ感染のザルコシスチスがヒトの健康に影響を及ぼした例はこれまで国内外にない (Fayer, 2004)。

ザルコシスチスと不明下痢症の因果関係を明らかにするためには、発症とザルコシスチス種との関係を明らかにし、またザルコシスチスによる馬肉汚染と発症との量的関係を知ることが必要である。食肉中のザルコシスチスを定量する方法には病理学的方法等があるが、遺伝子検査法の応用はこれまでのところ研究が少ない。本研究では汚染の定量測定が可能な遺伝子検査法を考案することを主たる目的とし、事例喫食残品ならびに市販馬肉製

品のザルコシスチス量を明らかにした。

2. 研究方法

2-1. 研究材料

馬肉試料として不明下痢症事例残品（以下残品と略）を 3 検体、市販馬肉商品（以下、市販品と略）を 5 検体、計 8 検体を用いた。いずれの検体も -20°C 以下で凍結保存された材料であった。なお市販品の No. 1-3 の 3 検体は通信販売の馬肉、また No. 4 および 5 は店舗購入した馬肉であった。

2-2. 方法

2-2-1. 馬肉からの DNA 試料の調整

1) 肉試料よりカミソリで $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 程度に肉片を切り出した（およそ 0.5 g 、図-1A）。肉の部分によっては脂質に富む場合があり、検査用には脂肪の部分避け、肉眼的に赤身の部分を採取した。その際交叉汚染に注意する。2) パラフィルム上でカミソリを用いて肉をミンチ状になるまで切断しながら均一に混ぜた。馬肉は柔らかく、数分間の処

理ででミンチ状になった(図-1B)。3) 1.5ml 遠心管に 0.3g 分のミンチ状の試料を入れ、TE バッファーを加え 1ml にメスアップした。4) 30 秒間激しく攪拌し、ミンチ状の肉が均一に分散することを確認後、卓上の遠心機で数秒間遠心した(図-1C)。5) 上清 200 μ l を新しい 1.5ml 遠心管に試料を移し(図-1D)、QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出精製し、最終的に 100 μ l の AE(kit 付属) に溶出したものを DNA 試料とした。

2-2-2. ザルコシスチスのシストからの陽性対照 DNA の調整

残品より分離回収し凍結保存したザルコシスチス・シストより DNA 精製キットを用いてゲノム DNA を抽出精製し、実験に供した。

2-2-3. 定性 PCR

使用プライマーは、18S1F: 5' -GGATAACC GTGGTAATTCTATG ならびに 18S11R: 5' -TCCTATGCTGACCTGGTGGAG を用いた(Pritt, B.P., et al., (2008)。このプライマーの組み合わせによりザルコシスチス 18SrDNA 内の約 1,100bp が増幅される。

温度反応条件は、①初期変性 94 $^{\circ}$ C、3 分間 → ②変性 94 $^{\circ}$ C、30 秒間 → ③アニーリング 60 $^{\circ}$ C、30 秒間 → ④伸長反応 72 $^{\circ}$ C、1 分間、②→④を 40 サイクル繰り返す。PCR 後、2.0% アガロース、TBE バッファーを用いて電気泳動を行い、産物を確認した。

2-2-4. シークエンス解析

PCR 産物のシークエンス用に以下の 4 種のプライマー (Sarco2F: 5' -CAGAGTAACAATTG-GAGGGCAAG-3'、Sarco3F: 5' -GCATTCGT ATTTAACTGTCAGAG-3'、Sarco12R: 5' -CTCTGACAGTTAAATACGAATGC-3'、Sarco13R: 5' -CTTCCCTCCAATTGTTACTCTG-3') を各種ザルコシスチスの 18SrDNA シークエンスアライメントに基づき設計し、18S1F および 11R とともに、定性 PCR 増幅産物のダイレクトシークエンシングを行った。図-2 に各プライマーの位置を示した。また Clustal W を用いてアライメントを比較

した。

2-2-5. 定量 PCR

PCR 反応試薬には Power SYBR Green PCR master Mix (アプライドバイオシステムズ: ABI) を使用した。反応液量は総量 20 μ l、DNA 試料は 1 μ l を使用した。また装置には Step One PlusTM (ABI) を用い、検量線作成および増幅 DNA の定量も同装置を用いて行った。

使用プライマーは、Sarco HRS 1F: 5' -GATA CAGAACCAATAGGGACATCAC ならびに Sarco HRS 3R: 5' -ACTACCGTCGAAAGCTG ATAGG を設計し、濃度 100nM で PCR を行った。この HRS 1F/3R の組み合わせにより、定性 PCR で増幅される領域内の 140bp が増幅される。

温度反応条件は、①初期変性 98 $^{\circ}$ C、10 分間 → ②変性 98 $^{\circ}$ C、5 秒間 → ③アニーリング・伸長反応 62 $^{\circ}$ C、30 秒間、②→③を 40 サイクル繰り返した。

2-2-6. スタンダード用 DNA の調整

1F/11R プライマーを用いた 18SrDNA の PCR 産物をプラスミド (pCR⁴-TOP0⁺、インビトロジェン) に組み込み、単クローンのプラスミドを精製した。DNA 濃度をコピー数濃度で調整し、スタンダードとして用いた。また検量線作成はスタンダード DNA の 10 倍希釈系列を用いて行った。

3. 研究結果

3-1. ザルコシスチス属プライマーを用いた定性的 PCR

各肉試料につき 1ヶ所より DNA 試料を調整し、PCR を行った。その結果、残品の 0301、0201 および 0401、市販品の No. 1-3、そして陽性対照から約 1,100bp の DNA が増幅された。一方、市販品の No. 4 および 5 からの DNA 増幅は見られなかった(図-3)。

3-2. 増幅産物のシークエンスと系統解析

各検体より増幅された DNA のダイレクトシークエンスの結果、検体および陽性試料のシークエンスはいずれも一致した。このシーク

エンス（以下、症例タイプと称す）1053bpをBLASTによりGene Bankに登録されている各種のザルコシスチスの18SrDNA配列と比較した。その結果、他種のシークエンスの中でと一致するものはなく、最も高い相同性を示したのは*S. fushiformis*の登録株で、その相同性は91%であった。図-4には増幅領域内の高変異領域に関するアライメントを示した。系統樹からは症例タイプはヒト感染性である*S. hominis* *S. sui hominis*とは明らかに異なり、またウマに病原性の知られる*S. neuroma*とも遺伝学的に異なることが示された(図-5)。なおウマ感染性である*S. fayeri*ならびに*S. bertrami*の登録配列はGene Bank等DNAデータベースに存在せず、これらの種との関係は明らかではなかった。

3-3. 症例タイプのシークエンス検出のための定量的PCR

馬肉中のザルコシスチスは同一肉試料でも部分的にその存在量に偏りがあることを想定し、馬肉試料中3-5ヶ所よりDNAを抽出し、肉全体におけるザルコシスチス汚染を調べることにした。

症例タイプ特異的なプライマーHRS1FおよびHRS3Rを用いてまず検量線の作成を行った。反応ケミストリーにはSYBR Greenを用い、スタンダードの10倍希釈段階試料についてPCRの条件設定を行った。目標としては10コピーを定量下限として検量線の直線性(R^2)と増幅効率(Eff%)を調べた。現状の至適条件は、プライマー濃度100nM、変性条件95℃、5秒間、アニーリング条件62℃、30秒間、サイクル数40の反応条件で、 $10-10^6$ コピー/assayに対し良好な検量線($R^2 > 0.99$ 、増幅効率Eff% > 80)が得られた(図-6)。なお本研究ではSYBR Green法を用いていることから、その反応特異性を溶解曲線で調べたが、10コピーからのDNA増幅はプライマーダイマーの産生ではなく、目的とするDNA増幅が行われていることを確認した。以上の結果より、SYBR Green法による定量限界が下限10コピー、上限 10^6 コピーとする定量PCR法を確立した。

これはg(肉重量)あたりのコピー数に換算すると、下限が約 1.7×10^4 コピー/g、上限が約 1.7×10^9 コピー/gとなり、また検出限界は計算上1コピー/アッセイであるのでg肉重量あたりのコピー数では 1.7×10^3 コピー/gであった。

表-1に残品ならびに市販品に関して行った定量PCRの結果をまとめた。残品2検体のザルコシスチス量はおよそ 10^6-10^7 コピー/gで、検体0401では検体0201のおよそ10倍程度のザルコシスチス量が検出された。同一の検体内ではDNA試料間の差は2倍程度でザルコシスチスがほぼ均一に分布する傾向を示した。一方、市販品では定性PCRが陽性であった検体Ref 1-3の場合、ザルコシスチス量は 10^5-10^6 コピー/gで、Ref 2では3ヶ所調べた中の1ヶ所で残品検体と同程度の量が検出された。Ref 1-3の間ではザルコシスチス量の差はおよそ2倍程度で、全体的に残品に近い汚染があったことが示された。また定性PCRでは陰性であったRef 4, 5の場合は、Ref 4のザルコシスチス量は 10^3-10^4 コピー/gで、肉全体で低い検出量であったが、Ref 5ではRef 4と同様の低いザルコシスチス量が示される中で、1試料が 5.7×10^5 コピー/gを示し、調べる場所によっては多量のザルコシスチスが集中して存在することが明らかとなった。

4. 考察

本研究では定性的なPCR法を用いて馬肉汚染に関わるザルコシスチスの種あるいは株を分子遺伝学的に特定し、さらに馬肉のザルコシスチス汚染の定量に有用な定量的PCR法の開発を行った。

定性的PCRと18SrDNAのシークエンス解析の結果より、残品中のザルコシスチスは既知のザルコ種とは異なる新規の配列をもつウマ特有のザルコシスチス(症例タイプ)と考えられた。系統解析、BLASTの結果も同様のことを示唆しているが、本症例タイプが野生動物類(シカ等)に検出されるザルコシスチスのグループに近いことが示されたことは興味深い点で、症例タイプのザルコシスチスがど

のような由来、また生活環をもつのか、今後の汚染対策を考える上でも重要な問題と思われる。種の特定に関しては現在までウマ感染性の *S. fayeri* ならびに *S. bertrami* のシーケンズが登録されていないので比較をしていないが、これらのザルコシスチス種か、あるいは別種である可能性もあり、今後明らかにする必要がある。

また定性的 PCR では馬肉中に存在するザルコシスチスの種構成、あるいは重複感染の問題も残されている。ザルコシスチス属 18SrDNA の高変異領域を利用し種特異的なプライマーを用いた Nested-PCR 等により、幅広くザルコシスチス検索を行うことでザルコシスチスの種と下痢症の関係を明らかにする予定である。

今回開発した症例タイプ特異的なプライマーを用いた定量 PCR 法は、10 コピー/assay の定量限界はあるが、良好な定量性を示す検量線が得られた。さらに感度と特異性を向上させるには TaqMan[®] アッセイの利用も考えられるが、今回の結果からは現在の定量法で汚染の度合いを評価するに足るものと考えられた。なお、検査法としての定量値の表示に関しては、現状でコピー数/g を用いているが、今後精製したブラディゾイトを用いて定量 PCR を行い原虫数に換算した表示を行うこととした。シストに内包されるブラディゾイトの 1 個体あたりの 18SrDNA コピー数がザルコシスチスでは不明であることがその理由であり、ザルコシスチスの属するコクシジウム類では、クリプトスポリジウムの 5 コピーからトキソプラズマの約 100 コピーまでコピー数は大きな幅があり、ザルコシスチスのコピー数を確定する必要がある。

b 遺伝子検査における DNA 試料調整は結果に大きく影響する行程である。本研究では検査現場での実際を想定し、検査の迅速簡便性、多検体処理対応、相互汚染の防止という点を重視し、少量多検体処理の方法を考案した。肉片からの全 DNA 抽出はザルコシスチスの絶対量の測定を可能にするが、その方法は今後の課題とし、本研究では同一の DNA 試料調整条件の上で各馬肉試料の汚染度を定量的に比

較することとした。

定量 PCR により今回調べた残品のザルコシスチス量は $10^6 \sim 10^7$ コピー/g であり、かなり多量の虫体数が発症と関連することが示された。疫学調査からの発症喫食量のデータが充実すれば発症ザルコシスチス量を算出することが可能であると期待される。さらにザルコシスチスの毒性試験研究データと併せることで実際のリスク評価が可能となることが期待される。なおこの点に関しては、残品の最少ザルコシスチス量が大きく影響する要因となる。多数の残品に関する定量解析を行えば最少検出量は低くなる可能性もあり、今後の研究で詳細に調べていく必要がある。一方、市販品中に残品程度のザルコシスチス量が部分的ではあるが検出されたことは重要である。ウマのザルコシスチス感染率は形態学的な検査法を用いた結果として、国内に関しては 14% (斉藤ら、1995)、英国での 62% (Edward, 1984)、ドイツでの 16%、(Erber and Geisei, 1981) などの報告がある。ザルコシスチス汚染のリスクコントロールという観点から、今後は輸入を含め流通販路を把握し、馬肉汚染の実態調査を国内外の肉製品あるいは屠畜段階で行うこと、さらにはモニタリングによる汚染監視の必要性も今後の課題になるものと考えられる。

5. 結論

馬肉中のザルコシスチスの分子遺伝学的特定と定量を目的に、客観性と迅速性を備え、検査現場にも導入可能な遺伝子検査法の開発を行った。残品中にはウマ特有のザルコシスチスが存在することを明らかにし、その馬肉中存在量を明らかにした。一方で、残品と同程度のザルコシスチスが市販品の中にも検出された。今後は残品調査を拡大し不明下痢発症のザルコシスチス量を明確にすること、および馬肉の汚染モニタリングを行うことにより、下痢症発生のリスク管理を図ることが重要である。

6. 参考文献

Fatyer, R., (2004) Clin. Microbiol. Rev.,
17(4) :894-902.
Pritt, B.P., et al., (2008) J. Food. Prot.,
71(10): 2144-2147.
Edward, G.T., (1984) Vet. Rec., 115(11):
265- 267.

Erber, M and Geisei, O., (1981) Z.
Parasitenkd., 65(3):283-291.

7. その他
なし

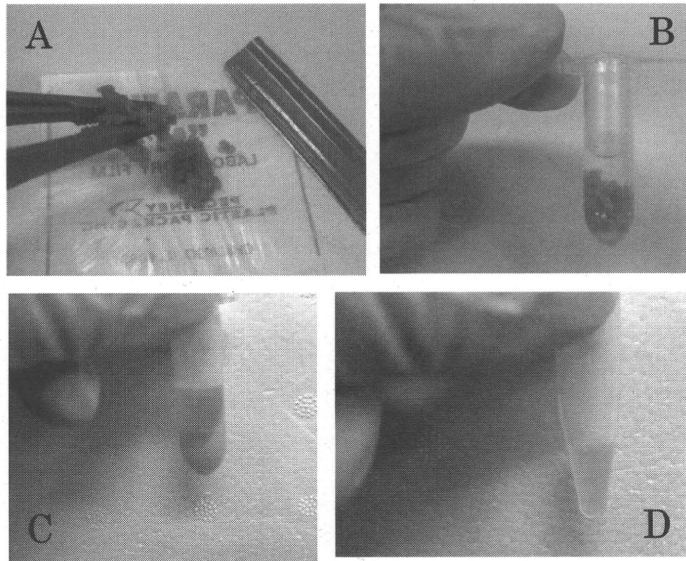


図-1、馬肉からの DNA 試料の調整

肉片をミンチ状に処理し(A)、TE バッファーを加え 1ml の懸濁液を調整し(B)、遠心する(C)。上清を回収し(D)、DNA を抽出精製する。

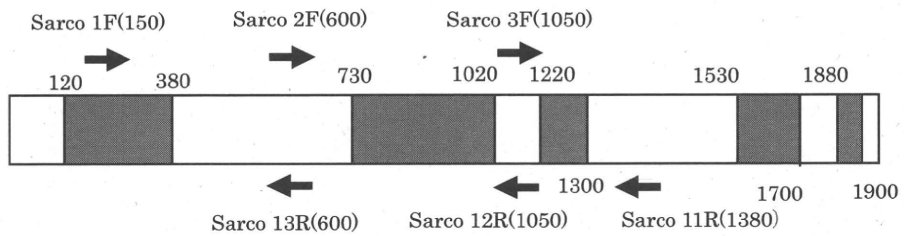


図-2. シークエンス解析プライマーとその位置

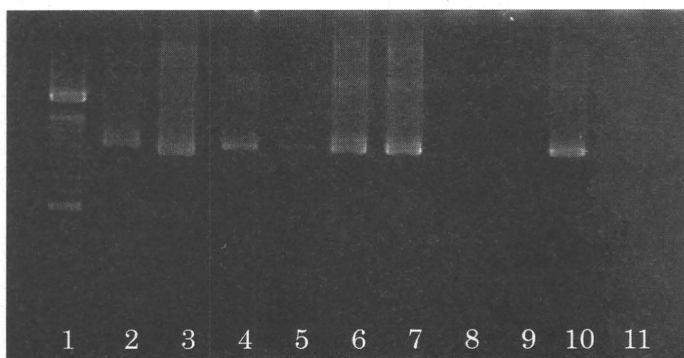


図-3. ザルコシスチス属プライマーF1/R11 を用いた定性的 PCR

試料

- 1、マーカー100bp ラダー
- 2、残品 0201
- 3、残品 0301
- 4、残品 0401
- 5、市販品 Ref1
- 6、市販品 Ref2
- 7、市販品 Ref3
- 8、市販品 Ref4
- 9、市販品 Ref5
- 10、陽性対照
- 11、陰性対照

Sarcocystis	suihominis_AF17693	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGCTAATACATGCGCAAACTACTATGTCGTTCCCTCTCTTT
Sarcocystis	hominis_AF006470	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGC-----AAATACTATAAC-----CTT
Sarcocystis	rangiferi_GQ250982	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGC-----AGATACTATAAC-----CTC
Sarcocystis	tarandi_GQ250976	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGC-----AAATACTATAAC-----CTC
Sarcocystis	buffalonis_AF01712	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGC-----AAATACTATATTATGT-----CACTT
Sarcocystis	hirsuta_AF017122	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGC-----AAATACTATATTATGT-----CACTT
Sarcocystis	fusiformis_AF17692	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGC-----AAATACTATAAC-----CACTC
Sarco_HRS_JPN		GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGC-----AAATATCCTTT-----
Sarcocystis	tenella_L24383	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGC-----AAATATCCTTT-----TT
Sarcocystis	cruzi_AF017120	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGC-----AAATATCCTTT-----TT
Sarcocystis	neurona_U07812	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGCA-----CA-----TACCTC-----TTC
Sarcocystis	hardangeri_GQ25098	GGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCGCA-----CAATACCATTT-----TTC

S. suihominis	ATGGGAGGGTGGTGATATAGTAGTGTTTATTAGATACAGAACCAACACATCATT-----ATTATCATTCTATGATGATAGTGA
S. hominis	AAG---GG-----TATAGTAGTGTTTATTAGATACAGAACCAACA-----CGCTCCATTTTGGGGTGT---
S. rangiferi	TAC---GG-----TATAGTAGTGTTTATTAGATACAGAACCAATA-----CGCTCCTTTTCTGGGGTGT---
S. tarandi	TACTACGG-----TATAGTAGTGTTTATTAGATACAGAACCAATA-----CGCTCCTTTTATGGGGTGT---
S. buffalonis	TACGGTGGATGATA---TAGTAGTGTTTATTAGATACAGAACCAATA-----CACCTG---TAAAGGGGTGT---
S. hirsuta	AACGGTGGATGATAATATAGTAGTGTTTATTAGATACAGAACCAATA-----CACCTCCTTAAAGGGGTGT---
S. fusiformis	GGGGGTA-----TAGTAGTGTTTATTAGATACAGAACCAATA-----CACCTTTTTAAAGGGGTGT---
S. arco_HRS_JPN	---GAGAGA-----AGGATAGTGTTTATTAGATACAGAACCAATAGG-----GACATCATTTATTGTTGGTGTCT
S. tenella	CGCAAGGA-----AGAGGATAGTGTTTATTAGATACAGAACCAATACACCA-----GTG---TCACA---GCTGGTGTGA-
S. cruzi	CGCAAGGA-----AGAGGATAGTGTTTATTAGATACAGAACCAATACACCA-----TCTGTTAACAGCAGGTGGTGTAA-
S. neurona	CCTCGTGG-----AAGGGTAGTGTTTATTAGATACAGAACCAAC-----CCACCTTCGGGT---TCC---
S. hardangeri	TTCCGAAG-----AAGGGTAGTGTTTATTAGATACAGAACCGACAGTAATATTGACCTCCTACTATTACTACTTTACTGTAGTATAGT

***** *

S. suihominis	T-----GTAAATAAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCATT---ATAATTATCATTAT-TTGATGATTGGGAAC-GGATCGCATT--
S. hominis	-----AAAAGGAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT---TATGATCATATT-ATTATGATTGGGAAC-GGATCGCAT--
S. rangiferi	-----TCAATGAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT---TATGATCATATT-ATTATGATTGGGAAC-GGATCGCAT--
S. tarandi	-----TGAATGAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT---TATGATCATATTATTATGATTGGGAAC-GGATCGCAT--
S. buffalonis	-----AGAAAAAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT-ATATTATAATCATTTCGGTGATTATTGGGAAC-GGATCGCAT-AT
S. hirsuta	-----AGAAAAAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT-ATATTATAATCATTTCGGTGATTATTGGGAAC-GGATCGCAT-AT
S. fusiformis	-----AGAAAAAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT---TATAATCATTTCGATGATT---GGGAAC-GGATCGCAT--
Sarco_HRS_JPN	-----TTTTAAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT-----ATTCTATTTAGAAATGGGAAC-GGATCGCAT--
S. tenella	-----AAAAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT-TATGGTCATT-CITTTGTAATGGCTGGGAAC-GGATCGCAT-T
S. cruzi	-----AAAAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT-TATGGTCATT---TTATA-TGGCTGGGAAC-GGATCGCAT-T
S. neurona	-----TCA-----GGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCAT-----TATGGCCTT---T---TGGTCGGGAAC-GGATCGCAT--
S. hardangeri	AGTGAAGTGTCAAGAAAAGGTGATTCATAGTAACCGAACCGGATCGCATG---AATATCATTATTTT---TAATGATTGGGAAC-GGATCGCATG--

***** ***** *

図-4. プライマーF1/R11 を用いたザルコシスチス 18SrRNA 増幅領域内
の高変異領域に関するアライメント
SarcoHRS JPN が本研究で明らかにしたシーケンス

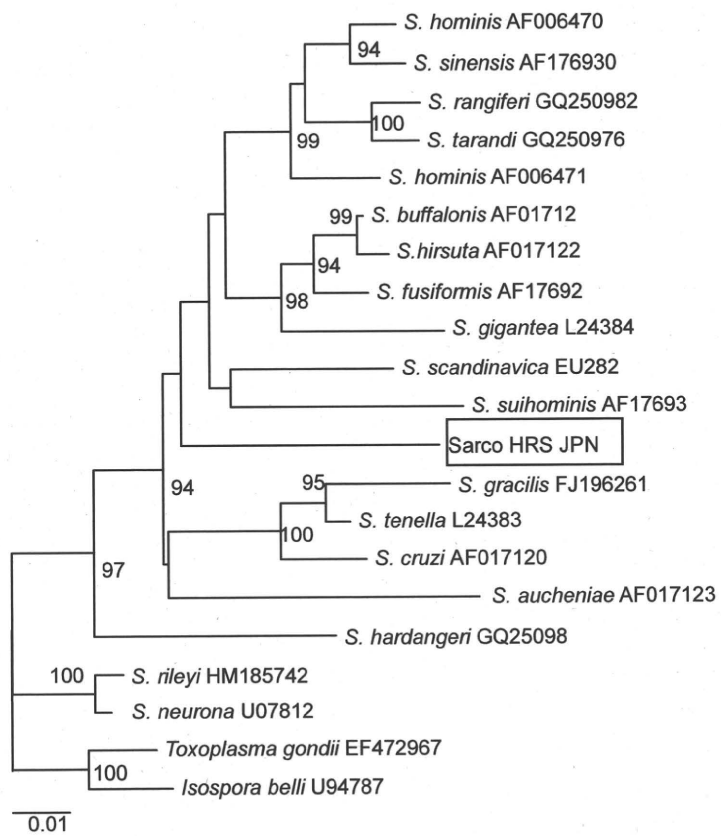


図-5. ザルコシスチス 18SrDNA シークエンスに基づく系統樹
種名後の表示は Genebank Accession ID、NJ 法により構築、
枝上の数字は Bootstrap 値、*Toxoplasma*、*Isospora* を out group

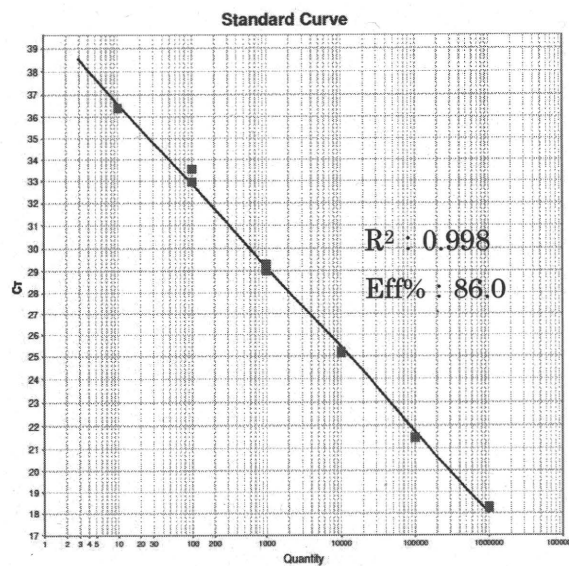


図-6. スタンダード DNA 試料を用いたザルコシスチス症例タイプに関する定量 PCR の検量線の一例

表-1. 残品ならびに市販品に関する定量 PCR の結果

馬肉 ID	各馬肉検体における DNA 試料番号				
	1	2	3	4	5
0201	1.1×10^6	1.7×10^6	2.0×10^6	ND	ND
0401	1.1×10^7	1.3×10^7	6.2×10^6	ND	ND
ref 1	4.0×10^5	5.8×10^5	5.4×10^5	ND	ND
ref 2	1.9×10^6	8.3×10^5	5.4×10^5	ND	ND
ref 3	4.6×10^5	4.2×10^5	1.2×10^5	ND	ND
ref 4	1.3×10^4	3.5×10^3	4.9×10^3	1.5×10^4	4.3×10^3
ref 5	1.3×10^4	3.6×10^3	5.7×10^5	2.7×10^4	2.4×10^3

表中の数値の単位はコピー数/g 肉重量、ND は検査なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y.	Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA.	Journal of Food Protection	73	1077-1084	2010
Akio Hasegawa, Yukiko Hara-Kudo and Susumu Kumagai.	Survival of Salmonella strains differing in their biofilm-formation capability upon exposure to hydrochloric and acetic acid and to high salt.	J Vet Med Sci	in press	in press	2011
Ken-ichi Lee, Nigel P. French, Yukiko Hara-Kudo, Sunao Iyoda, Hideki Kobayashi, Yoshiko Sugita-Konishi and Susumu Kumagai.	Multivariate Analyses Revealed Distinctive Features Differentiating Human and Cattle Isolates of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O157 in Japan.	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY	49(4)	1495-1500	2011

