

ABI7500fast では auto 解析および manual 解析を、LC480 および Dice では auto 解析のみを実施し(表 3)、Ct 値を得た。Manual 解析の設定は、ベースラインについては測定サンプル間で振れ幅が小さくなるサイクル数の範囲を選択し、threshold については陰性コントロールが陰性に判定され、なおかつ指数関数的な蛍光値の増幅が認められるサンプルが陽性に判定される範囲を選択した。

(2) Nielsen らの方法

表 2 に従って反応液を調製して反応プレートに分注したのち、DNA 抽出原液および陰性コントロール(滅菌超純水) 5 μ l を加えた。増幅反応は ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480、LightCycler nano(LCnano、ロシュ・ダイアグノスティックス)、Dice にて、50°C で 2 分、95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 15 秒、60°C で 1 分を 40 サイクルに設定して測定した。リアルタイム PCR 測定結果の解析は、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast および LC480 では auto 解析および manual 解析を、LCnano および Dice では auto 解析のみを実施し(表 3)、Ct 値を得た。manual 解析の設定は、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast においては threshold のみを 0.2 とし、LC480 においてはベースラインのみを安定した範囲のサイクルとした。

3. 試薬調製による増幅ベースラインの安定化

1) 供試 DNA 抽出液

2 の 4) で調製した VT2 陽性菌接種豚

スライス肉培養液および VT2 陽性菌液の DNA 抽出原液を供試した。また、陰性コントロールには滅菌超純水を用いた。

2) 反応液の調製

試薬調製における混和操作による増幅ベースラインの安定化を検討した。2 の 5) で示した Nielsen らの方法に従って調製した反応液を 8 連チューブに分注した。8 連チューブに DNA 抽出原液および陰性コントロール(滅菌超純水) 5 μ l を添加して 10 回タッピングしてスピンドウンしたのち、その全量を LC480 用反応プレートに移し替えた。また、その LC480 用反応プレートの別のウェルに DNA 抽出原液および陰性コントロール(滅菌超純水) 5 μ l を添加し混和操作は行わないで、LC480 にて測定した。測定結果は auto 解析(Abs quant/2nd derivative max) を実施し、Ct 値を算出した。

C. 研究結果

1. 反応系の縮小化

Nielsen らの方法での総反応液量が 50 および 30 μ l において、希釈菌液を接種した牛挽肉およびカイワレダイコン検体から抽出した DNA 溶液を用いて検出した結果、牛挽肉について 50 μ l 反応系で auto 解析の場合の 10^2 cfu/ml での 1 反応、カイワレダイコンについて 50 μ l 反応系で manual 解析の場合の 10^2 cfu/ml での 1 反応で検出されなかったが、それ以外の菌接種食品培養液(約 10^8 – 10^2 cfu/ml) では 2 反応の両方で検出された。このよう

に、50 µl 反応系よりも 30 µl 反応系の方が検出性の高い結果であった。

これらの結果から食品種ごとに各容量での検量線を作成した (図 1 ~ 4)。牛挽肉検体の auto 解析結果での検量線の近似曲線式は、30 µl 反応系で $y = -1.437 \ln(x) + 42.891$ ($R^2 = 0.99$)、50 µl 反応系で $y = -1.42 \ln(x) + 42.926$ ($R^2 = 0.997$) であった。 10^4 cfu/ml での Ct 値は、30 µl 反応系で 29.7、50 µl 反応系で 29.8 を示した (図 1)。カイワレダイコン検体の auto 解析結果での検量線の近似曲線式は、30 µl 反応系で $y = -1.485 \ln(x) + 43.517$ ($R^2 = 0.9978$)、50 µl 反応系で $y = -1.446 \ln(x) + 43.569$ ($R^2 = 0.9969$) であった。 10^4 cfu/ml での Ct 値は、30 µl 反応系で 29.8、50 µl 反応系で 30.3 を示した (図 2)。牛挽肉検体の manual 解析結果に基づいて作成した検量線の近似曲線式は、30 µl 反応系で $y = -1.432 \ln(x) + 44.744$ ($R^2 = 0.9916$)、50 µl 反応系で $y = -1.423 \ln(x) + 45.455$ ($R^2 = 0.9994$) であった。 10^4 cfu/ml での Ct 値は、30 µl 反応系で 31.6、50 µl 反応系で 32.3 を示した (図 3)。カイワレダイコン検体の manual 解析結果での検量線の近似曲線式は、30 µl 反応系で $y = -1.473 \ln(x) + 45.291$ ($R^2 = 0.9989$)、50 µl 反応系で $y = -1.463 \ln(x) + 46.168$ ($R^2 = 0.9996$) であった。 10^4 cfu/ml での Ct 値は、30 µl 反応系で 31.7、50 µl 反応系で 32.7 を示した (図 4)。このように、 10^4 cfu/ml での Ct 値は 30 µl 反応系および 50 µl 反応系の間では 1 未満の差

となり、さらに全ての菌接種食品培養液において manual 解析より auto 解析にて低い値を示した。

2. 試薬および機器の組み合わせによる検出感度

食品培養液への接種菌液原液の菌数は、VT1 陽性菌株および VT2 陽性菌株ともに約 10^9 cfu/ml であった。食品検体中の一般生菌数は、食肉では牛レバーで約 $10^2 - 10^3$ cfu/g、牛挽肉で約 $10^5 - 10^6$ cfu/g、豚スライス肉で約 $10^3 - 10^4$ cfu/g、チーズでは約 $10^8 - 10^9$ cfu/g、野菜ではレタスで約 10^5 cfu/g、カイワレダイコンで約 10^7 cfu/g、トマトで約 10^2 cfu/g 以下、ホウレンソウで約 $10^6 - 10^7$ cfu/g を示した (表 4)。大腸菌群数は、食肉では牛レバーで検出限界以下、牛挽肉で約 $10^2 - 10^4$ cfu/g、豚スライス肉で約 $10^2 - 10^3$ cfu/g、チーズでは約 10^6 cfu/g 以下、野菜ではレタスで約 $10 - 10^3$ cfu/g、カイワレダイコンで約 $10^4 - 10^6$ cfu/g、トマトで検出限界以下、ホウレンソウで約 $10^3 - 10^6$ cfu/g を示した (表 4)。

供試食品種の総合での VT 遺伝子検出結果について、検出試薬、機種および解析方法ごとに試験した 8 食品種のうち、各食品種数中の繰り返し 2 反応での測定結果が両方とも陽性だった食品種の数を表 5 に示した。

CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を ABI7500 (図 5)、ABI7900 (図 6)、ABI7500fast (図 7)、LC480 (図 8) および Dice (図 9) の 5 機種において auto

解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で LC480 および Dice においては 8 食品種全て、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast においては 8 食品種中 5 食品種以下で検出された。 10^3 cfu/ml では、LC480 および Dice においては 8 食品種中 7 食品種、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast においては 8 食品種中 5 食品種以下で検出された。 10^2 cfu/ml では、5 機種全てで 8 食品種中 5 食品種以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で LC480 および Dice においては 8 食品種全て、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast においては 8 食品種中 5 食品種以下で検出された。 10^3 cfu/ml では、Dice においては 8 食品種全て、LC480 においては 8 食品種中 7 食品種、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast においては 8 食品種中 5 食品種以下で検出された。 10^2 cfu/ml では、5 機種全てで 8 食品種中 5 食品種以下の検出であった。このように、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480 および Dice において auto 解析を行った結果では、LC480 および Dice においては 10^4 cfu/ml で VT1 および VT2 遺伝子検出ともに 8 食品種全てで検出されたが、LC480 および Dice 以外においては 8 食品種中 5 食品種以下の検出であり、得られた増幅曲線では不安定なベースラインが散見され、妥当な解析結果が得られなかった。特に、 10^3 cfu/ml での ABI7900 における 1 食品、 10^2 cfu/ml での ABI7900 および

ABI7500fast における各 1 食品では、増幅曲線が上昇していないにもかかわらず陽性の判定になっており、正しく判定がされていなかった。

次に、ABI7500 (図 10)、ABI7900 (図 11) および ABI7500fast (図 12) の 3 機種において manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では 10^5 および 10^4 cfu/ml で 3 機種全てにおいて、8 食品種全てで検出された。 10^3 cfu/ml では、ABI7500 においては 8 食品種全てで検出され、ABI7900 および ABI7500fast においては 8 食品種中 7 食品種が検出された。 10^2 cfu/ml では、3 機種全てで 8 食品種中 5 食品種以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で 3 機種全てにおいて、8 食品種全てで検出された。 10^3 cfu/ml では、ABI7900 および ABI7500fast においては 8 食品種全て、ABI7500 においては 8 食品種中 7 食品種で検出された。 10^2 cfu/ml では、3 機種全てで 8 食品種中 5 食品種以下の検出であった。このように、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast において manual 解析を行った結果では、 10^4 cfu/ml で VT1 および VT2 遺伝子検出ともに 8 食品種全てで検出され、適切な解析結果が得られた。

Nielsen らの方法の反応結果を、ABI7500 (図 13)、ABI7900 (図 14)、ABI7500fast (図 15)、LC480 (図 16)、LCnano (図 17) および Dice (図 18) の 6 機種において auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で 6 機種

全てにおいて8食品種全てで検出された。 10^3 cfu/ml では、LCnano においては8食品種全て、ABI7500、ABI7500fast および Dice においては8食品種中7食品種、ABI7900 および LC480 においては8食品種中6食品種で検出された。 10^2 cfu/ml では、6機種全てで8食品種中6食品種以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で6機種のほとんどにおいて8食品種全てで検出されたが、 10^5 cfu/ml の ABI7900 でのみ8食品種中7食品種の検出であった。 10^3 cfu/ml では、ABI7500fast および Dice の2機種においては8食品種全て、ABI7500 および ABI7900 においては8食品種中7食品種、LC480 および LCnano においては8食品種中5食品種以下で検出された。 10^2 cfu/ml では、6機種全てで8食品種中6食品種以下の検出であった。このように、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480、LCnano および Dice において auto 解析を行った結果では、 10^4 cfu/ml では VT1 および VT2 遺伝子検出ともに8食品種全てで検出され、適切な解析結果が得られた。特に、 10^3 cfu/ml で ABI7900 における1食品、 10^2 cfu/ml で ABI7500 における1食品および ABI7900 における2食品では、増幅曲線が上昇していないにもかかわらず陽性の判定になっており、正しく判定がされていなかった。次に、ABI7500 (図 19)、ABI7900 (図 20)、ABI7500fast (図 21) および LC480 (図 22) の4機種において manual 解析したところ、VT1 遺伝子

検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で4機種全てにおいて、8食品種全てで検出された。 10^3 cfu/ml では、ABI7500 においては8食品種全て、ABI7500fast および LC480 においては8食品種中7食品種、ABI7900 においては8食品種中6食品種で検出された。 10^2 cfu/ml では、4機種全てで8食品種中5食品種以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で4機種全てにおいて、8食品種全てで検出された。 10^3 cfu/ml では、ABI7500fast においては8食品種全て、ABI7500 および LC480 においては8食品種中7食品種、ABI7900 においては8食品種中6食品種で検出された。 10^2 cfu/ml では、4機種全てで8食品種中4食品種以下の検出であった。このように、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast および LC480 においては、auto 解析および manual 解析ともに適切な解析結果が得られた。

また、上記結果の詳細を食品種別に表 6-13 に示した。なお、結果は2回の反応での陽性であった反応数として示されている。また、CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果は、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480 および Dice の5機種において auto 解析、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast の3機種において manual 解析を行い、Nielsen らの方法の反応結果は、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480、LCnano および Dice の6機種において auto 解析、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast および LC480 の4

機種において manual 解析を行った。

牛レバーにおける検出結果について表 6 に示した。CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で使用した 5 機種全てにおいて 2 反応全てで検出された。 10^3 cfu/ml では、LC480 以外においては全て、LC480 においては 1 反応で検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7900 および ABI7500fast においては全てで検出され、ABI7900 および ABI7500fast 以外においては 1 反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で使用した 3 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^3 cfu/ml では、ABI7900 以外においては全てで検出され、ABI7900 においては 2 反応ともに検出されなかった。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast においては全てで検出され、ABI7500fast 以外においては 2 反応ともに検出されなかった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、全ての組み合わせで検出された。しかし、ABI7900 における 10^3 および 10^2 cfu/ml では、増幅曲線が上昇していないにもかかわらず陽性の判定になっており、正しく判定がされていないものがあつた (図 6-1)。Nielsen らの方法の反応結果を auto 解析したところ、

VT1 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で使用した 6 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^3 cfu/ml では、LC480 および ABI7900 以外においては全てで検出され、LC480 においては 1 反応で検出され、ABI7900 においては 2 反応ともに検出されなかった。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast および Dice においては全てで検出され、ABI7900fast および Dice 以外においては 2 反応ともに検出されなかった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で VT1 遺伝子検出と同様であった。 10^3 cfu/ml では、LCnano 以外においては全て、LCnano においては 1 反応で検出された。 10^2 cfu/ml では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で使用した 4 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^3 cfu/ml では、ABI7900 以外においては全てで検出され、ABI7900 においては 2 反応ともに検出されなかった。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast のみで全てで検出され、ABI7500fast 以外においては 2 反応ともに検出されなかった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、全ての組み合わせで検出された。

牛挽肉における検出結果について表 7 に示した。CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3

cfu/ml で ABI7500 以外においては 2 反応全てで検出され、ABI7500 においては 1 反応以下の検出であった。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast および Dice においては全てで検出され、ABI7500fast および Dice 以外においては 1 反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 3 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7500 においては全てで検出され、ABI7500 以外においては 1 反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 、 10^3 および 10^2 cfu/ml の全ての菌数で 3 機種全てにおいて、全てで検出された。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、ABI7500 の auto 解析以外の全ての組み合わせで検出された。しかし、ABI7500fast における 10^2 cfu/ml では、増幅曲線が上昇していないにもかかわらず陽性の判定になっており、正しく判定がされていないものがあつた (図 7-1)。Nielsen らの方法の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 6 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7900、LC480 および LCnano 以外においては全てで検出され、ABI7900、LC480 および LCnano においては 1 反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様で

あつた。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 4 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7900 および ABI7500fast においては全てで検出され、ABI7500 および LC480 においては 2 反応ともに検出されなかつた。VT2 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で VT1 遺伝子検出と同様であつた。 10^2 cfu/ml では、LC480 においては全て、LC480 以外においては 1 反応で検出された。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、全ての組み合わせで検出された。しかし、ABI7500 における 10^2 cfu/ml では、増幅曲線が上昇していないにもかかわらず陽性の判定になっており、正しく判定がされていないものがあつた (図 13-1)。

豚スライス肉における検出結果について表 8 に示した。CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で ABI7500 および ABI7900 以外においては 2 反応全てで検出され、ABI7500 においては少なくとも 1 反応で検出され、ABI7900 においては 2 反応ともに検出されなかつた。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast および LC480 においては全てで検出され、ABI7500fast および LC480 以外においては 1 反応以下の検出であつた。VT2 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で VT1 遺伝子検出と同様であ

った。10² cfu/ml では、5機種全てにおいて1反応以下の検出であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、10⁵、10⁴および10³ cfu/ml で使用した3機種全てにおいて、全てで検出された。10² cfu/ml では、ABI7500fast においては全てで検出され、ABI7500fast 以外においては1反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である10⁴ cfu/ml において、ABI7500 およびABI7900 の auto 解析以外の全ての組み合わせで検出された。Nielsen らの方法の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、10⁵、10⁴および10³ cfu/ml で使用した6機種全てにおいて全てで検出された。10² cfu/ml では、ABI7900 および Dice においては全てで検出され、ABI7900 および Dice 以外においては1反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、10⁵および10⁴ cfu/ml で VT1 遺伝子検出と同様であった。10³ cfu/ml では、ABI7900 および LC480 以外においては全てで検出され、ABI7900 および LC480 においては1反応以下の検出であった。10² cfu/ml では、ABI7900、ABI7500fast および Dice においては全てで検出され、ABI7500、LC480 および LCnano においては1反応以下の検出であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では10⁵、10⁴ および10³ cfu/ml で使用した4機種全てにおいて、全てで検出された。10²

cfu/ml では、4機種全てにおいて1反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である10⁴ cfu/ml において、全ての組み合わせで検出された。しかし、ABI7900 における10² cfu/ml では、増幅曲線が上昇していないにもかかわらず陽性の判定になっており、正しく判定がされていないものがあった(図14-1)。

チーズにおける検出結果について表9に示した。CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、10⁵、10⁴および10³ cfu/ml で ABI7500 以外においては2反応全てで検出され、ABI7500 においては2反応ともに検出されなかった。10² cfu/ml では、ABI7500 および LC480 以外においては全てで検出され、ABI7500 および LC480 においては1反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、10⁵、10⁴および10³ cfu/ml で使用した3機種全てにおいて、全てで検出された。10² cfu/ml では、ABI7500 以外においては全て、ABI7500 においては1反応で検出された。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である10⁴ cfu/ml において、ABI7500 の auto 解析以外の全ての組み合わせで検出された。Nielsen らの方法の反応結果を auto 解析

したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 6 機種全てにおいて全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast、LC480 および Dice においては全て、ABI7500、ABI7900 および LCnano においては 1 反応で検出された。VT2 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml において、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。 10^2 cfu/ml では、ABI7900 および LC480 においては全てで検出され、ABI7900 および LC480 以外においては 1 反応以下の検出であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 4 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast および LC480 においては全てで検出され、ABI7500 および ABI7900 においては 1 反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で VT1 遺伝子検出と同様であった。 10^2 cfu/ml では、ABI7900 および LC480 においては全てで検出され、ABI7500 および ABI7500fast においては 1 反応以下の検出であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、全ての組み合わせで検出された。

レタスにおける検出結果について表 10 に示した。CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で ABI7500 および ABI7900 以外においては 2 反応全てで検出され、ABI7500 および

ABI7900 においては 1 反応以下の検出であった。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast および Dice においては全てで検出され、ABI7500fast および Dice 以外においては 1 反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml においては、VT1 遺伝子検出と同様であった。 10^2 cfu/ml では、5 機種全てにおいて 1 反応以下の検出であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 3 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast においては全てで検出され、ABI7500fast 以外においては 1 反応以下での検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、ABI7500 および ABI7900 の auto 解析以外の全ての組み合わせで検出された。Nielsen らの方法の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 6 機種全てにおいて全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast においては全てで検出され、ABI7500fast 以外においては 1 反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 4 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast においては全てで検出され、

ABI7500fast 以外においては1反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出と同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、全ての組み合わせで検出された。

カイワレダイコンにおける検出結果について表 11 に示した。CycleavePCR O-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で ABI7500 および ABI7500fast 以外においては2反応全てで検出され、ABI7500 および ABI7500fast においては2反応ともに検出されなかった。 10^2 cfu/ml では、ABI7900 および LC480 においては全てで検出され、ABI7900 および LC480 以外においては1反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 、 10^3 および 10^2 cfu/ml の全ての菌数で使用した3機種全てにおいて、全てで検出された。VT2 遺伝子検出でも VT1 遺伝子検出と同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、ABI7500 および ABI7500fast の auto 解析以外の全ての組み合わせで検出された。Nielsen らの方法の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した6機種全てにおいて、全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、LCnano 以外においては全て

で検出され、LCnano においては2反応ともに検出されなかった。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 、 10^3 および 10^2 cfu/ml の全ての菌数で使用した4機種全てにおいて、全てで検出された。VT2 遺伝子検出では、VT1 遺伝子検出とほとんど同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、全ての組み合わせで検出された。

トマトにおける検出結果について表 12 に示した。CycleavePCR O-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で LC480 および Dice においては2反応全てで検出され、ABI7500 においては少なくとも1反応で検出され、ABI7900 および ABI7500fast においては2反応ともに検出されなかった。 10^3 cfu/ml では、ABI7500 および LC480 においては全てで検出され、ABI7500 および LC480 以外においては1反応以下の検出であった。 10^2 cfu/ml では、5機種全てにおいて、2反応ともに検出されなかった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/ml で ABI7900 および ABI7500fast 以外においては全てで検出され、ABI7900 および ABI7500fast においては2反応ともに検出されなかった。 10^3 cfu/ml では、Dice においては全てで検出され、Dice 以外においては1反応以下の検出であった。 10^2 cfu/ml では、5機種

全てにおいて、1反応以下の検出であった。また、manual解析したところ、VT1遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/mlで使用した3機種全てにおいて、全てで検出された。 10^3 cfu/mlでは、ABI7500fast以外においては全て、ABI7500fastにおいては1反応で検出された。 10^2 cfu/mlでは、3機種全てにおいて、2反応ともに検出されなかった。VT2遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/mlではVT1遺伝子検出と同様であった。 10^3 cfu/mlでは、ABI7500以外においては全てで検出され、ABI7500においては2反応ともに検出されなかった。 10^2 cfu/mlでは、VT1遺伝子検出と同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/mlにおいて、ABI7900およびABI7500fastのauto解析以外の全ての組み合わせで検出された。Nielsenらの方法の反応結果をauto解析したところ、VT1遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/mlで使用した6機種全てにおいて、全てで検出された。 10^3 cfu/mlでは、LCnanoにおいては全てで検出され、LCnano以外においては1反応以下の検出であった。 10^2 cfu/mlでは、6機種全てにおいて、1反応以下の検出であった。VT2遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/mlでVT1遺伝子検出と同様であった。 10^3 cfu/mlでは、ABI7900、ABI7500fastおよびDiceにおいては全てで検出され、ABI7500、LC480およびLCnanoにおいては1反応以下の検出であった。 10^2 cfu/mlでは、ABI7900にお

いては全てで検出され、ABI7900以外においては2反応ともに検出されなかった。また、manual解析したところ、VT1遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/mlで使用した4機種全てにおいて、全てで検出された。 10^3 cfu/mlでは、ABI7500においては全てで検出され、ABI7500以外においては1反応以下の検出であった。 10^2 cfu/mlでは、4機種全てにおいて、2反応ともに検出されなかった。VT2遺伝子検出では、 10^5 および 10^4 cfu/mlで、VT1遺伝子検出と同様であった。 10^3 cfu/mlでは、ABI7500fastにおいては全てで検出され、ABI7500fast以外においては2反応ともに検出されなかった。 10^2 cfu/mlでは、VT1遺伝子と同様であった。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/mlにおいて、全ての組み合わせで検出された。しかし、ABI7900における 10^3 および 10^2 cfu/mlでは、増幅曲線が上昇していないにもかかわらず陽性の判定になっており、正しく判定がされていないものがあった。

ハウレンソウにおける検出結果について表13に示した。CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0の反応結果をauto解析したところ、VT1遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/mlでABI7500およびABI7500fast以外においては2反応全てで検出され、ABI7500およびABI7500fastにおいては2反応ともに検出されなかった。 10^2 cfu/mlでは、5機種全てにおいて、1反応で以下の検出であった。VT2遺伝子検出

では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で VT1 遺伝子検出と同様であった。 10^2 cfu/ml では、ABI7500 および ABI7500fast 以外においては全てで検出され、ABI7500 および ABI7500fast においては 2 反応ともに検出されなかった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 3 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7500 においては全て、ABI7500 以外においては 1 反応で検出された。VT2 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で VT1 遺伝子検出と同様であった。 10^2 cfu/ml では、ABI7500 以外においては全て、ABI7500 においては 1 反応で検出された。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、ABI7500 および ABI7500fast の auto 解析以外の全ての組み合わせで検出された。Nielsen らの方法の反応結果を auto 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 6 機種全てにおいて全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、LCnano および Dice 以外においては全てで検出され、LCnano および Dice においては 1 反応以下の検出であった。VT2 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で VT1 遺伝子検出と同様であった。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast、LC480 および Dice においては全てで検出され、ABI7500、ABI7900 および LCnano においては 1 反応以下の検出であった。また、manual 解析したところ、VT1 遺伝子検出では、 10^5 、

10^4 および 10^3 cfu/ml で使用した 4 機種全てにおいて、全てで検出された。 10^2 cfu/ml では、ABI7500fast 以外においては全て、ABI7500fast においては 1 反応で検出された。VT2 遺伝子検出では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で VT1 遺伝子検出と同様であった。 10^2 cfu/ml では、ABI7500 以外においては全て、ABI7500 においては 1 反応で検出された。このように、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml において、全ての組み合わせで検出された。

3. 試薬調製による増幅ベースラインの安定化

Nielsen らの方法において、試薬調製時の反応液の混合操作の有無の結果への影響を検討した結果、混和操作をしなかった場合では、 10^5 、 10^4 および 10^3 cfu/ml で陽性であったが、 10^2 cfu/ml で陰性であった。しかし、混和操作を行った場合では、 10^5 、 10^4 、 10^3 および 10^2 cfu/ml 全てで陽性を示した (図 23)。また、混和操作をしなかった場合では、陽性コントロールおよび陰性コントロールを含めた全てのサンプルにおいて初めの 3 サイクルで蛍光値の上昇が測定されているが、混和操作を行った場合では、ベースラインは安定しており反応初期の蛍光値の上昇は認められなかった。

D. 考察

腸管出血性大腸菌の食品での通知法における VT 遺伝子検出によるスクリーニン

グは、PCR 法、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法およびリアルタイム PCR 法が設定されている。PCR 法は、遺伝子増幅産物をアガロースゲル電気泳動法等によって検出することが必要であり、検出感度が LAMP 法およびリアルタイム PCR 法よりも劣る場合もある。LAMP 法は、試薬調製や機器操作が簡易であり検出感度も高いが、自家調製が難しく市販キットを利用する。また、専用機器での検出結果の判定が必要である。リアルタイム PCR 法は、自家調製や市販キット等試薬の選択性があり、複数の機器が選択できることから汎用性が高い。このため、リアルタイム PCR 法が使用されている場合が少なくない。2006 年（平成 18 年）11 月 2 日食安監発第 1102004 号「腸管出血性大腸菌 0157 及び 026 の検査法について」において初めて示された。2012 年（平成 24 年）5 月 15 日に通知された食安監発 0515 第 1 号「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」において、VT 遺伝子検出法のリアルタイム PCR 法での自家調製法での反応試薬を食品検査に適するものに改定し、また、VT1 および VT2 の検出を同一反応に変更し、感度改善および効率化が行なわれた。しかし、2006 年以降のリアルタイム PCR 法での市販キットや使用機器の改良や開発にともない、これらの更新によって試験操作の簡略化や経費の削減が期待された。このため、特にリアルタイム PCR 法の改定のために検討を行った。

自家調製試薬は市販キットと比べて経済的であるため使用する場合が多い。しかし、プローブとマスターミックスが比較的高額であり反応コストの大きな部分と言える。このため、経済性を高めることを目的として反応系の縮小化を行った。これまで総反応液量は 50 μ l であったが、30 μ l での反応系を検討した結果、作成した検量線は 10^3 – 10^8 cfu/ml において牛挽肉およびカイワレダイコンの両培養液で auto および manual 解析の両解析ともに、50 および 30 μ l 間でほとんど差はなかった。しかし、 10^2 cfu/ml において、50 μ l 反応系で、牛挽肉での auto 解析の場合およびカイワレダイコンでの manual 解析の場合で、それぞれ 1 反応が検出されなかったことから、30 μ l の方が検出感度に優れる可能性が示された。このため、反応系を 30 μ l にすることによって経済性を高められることが判明した。

リアルタイム PCR 法の市販キットで、専用機器を必要としない汎用性の高い試薬が通知法に含まれているが、近年、改良された製品が市販されている。また、改良された機器や経済性に優れる機器も市販されており、市販キットおよび上記の自家調製の試薬と汎用性の高い複数の機器の組み合わせによる使用について検討が必要であった。このため、食肉、チーズ、野菜の 8 食品種での検出感度を比較した結果、市販キット（CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0）では、ABI 機器 3 種では auto 解析は適さず、増幅曲線から考

えられる妥当な結果を判定するためには manual 解析にて解析条件を調整する必要があることが明らかになった。また、LC480 および Dice では manual 解析の設定はなく、auto 解析によって妥当な結果を判定できることが明らかになった。自家調製での Nielsen らの方法では、ABI 機器 3 種は auto 解析および manual 解析でほとんど結果は同じであったが、若干結果判定が異なる場合も見受けられた。このため、増幅曲線を確認し auto 解析および manual 解析のどちらが適切かの判断が必要な場合もあることが明らかになった。LC480 では auto 解析および manual 解析でほとんど結果は同じであった。また、LC nano および Dice では、auto 解析によって妥当な結果を判定できることが明らかになった。リアルタイム PCR 試薬と機器の組み合わせによって、解析方法を考慮し適切な設定条件下にて解析することが重要と考えられた。以上のように、試薬と機器の組み合わせにより適切な解析を行った結果について食品種で比較すると、牛挽肉、豚スライス肉、チーズ、レタス、カイワレダイコンおよびハウレンソウについては、 10^3 cfu/ml まで 2 反応の両方で検出され、高感度であることが示された。しかし、牛レバーおよびトマトについては、 10^4 cfu/ml までは 2 反応の両方で検出されたが、 10^3 cfu/ml では 2 反応の両方で検出されないものが多かった。このため、牛レバーとトマトにおいては DNA 抽出や PCR 反応を阻害する成分等が含まれてい

る可能性が考えられた。牛レバーでは血液の成分が DNA 抽出や PCR 反応を阻害することが考えられる。本研究ではアルカリ熱抽出法を使用した。通知法に記載されている他の DNA 抽出法の中で精製操作も含まれる手法を使うことで、検出率が改善される可能性が考えられる。また、トマトについては pH が低いことの影響が DNA 抽出や PCR 反応にあるかもしれないが、果肉の粒子など物理的な要因も考えられるため、今後、要因の解明と改善方法の検討が必要である。

自家調製で用いている試薬の混和が不十分な場合に、使用する機種との組み合わせによっては増幅ベースラインが反応初期で乱れが生じる場合がある。このため、安定化を検討した結果、試薬の混和を確実に行えば容易に改善できることが判明した。これによって適切なベースラインが設定され auto 解析によっても妥当な結果を判定できることが示された。

以上のように、自家調製法の反応系の縮小化の検討、試薬および機器の組み合わせにおける検出感度の検討、試薬調製による増幅ベースラインの安定化の検討を行ない、通知法の改定に資する研究成果を得た。腸管出血性大腸菌の食中毒の解明や汚染食品の調査等に貢献することが期待される。

E. 結論

腸管出血性大腸菌はヒトへの病原性が強く、重症者や死者が発生する食中毒事

例が社会的に問題になっており、食中毒事例では原因食品確定が不可欠である。腸管出血性大腸菌の食品からの検出には、食品培養液からのVT遺伝子検出によるスクリーニング法が有効であり通知法に含まれているが、検出系の効率化等の改善の必要がある。このため、本研究では通知法でのVT遺伝子スクリーニングの改定の基礎となる検出系や試薬調製等の検討を行った。特に、自家調製法の反応系の縮小化の検討、試薬および機器の組み合わせでの検出感度の検討、試薬調製による増幅ベースラインの安定化の検討を行った。その成果をもとに、自家調製法の改定、市販試薬キットおよび機器の改定などを含む検査法（平成24年12月17日食安監発1217第1号「腸管出血性大腸菌026、0111及び0157の検査法について」）が通知された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Kumagai, S., Konuma, H., Miwa, N., Masuda, T., Ozawa, K., Nishina, T. Decontamination of *Vibrio parahaemolyticus* in fish by washing with hygienic seawater and impacts of the high level contamination in the gills and viscera. J. Vet. Med. Sci.

75:589-596, 2013.

Ohnishi, T., Goto, K., Kanda, T., Kanazawa, Y., Ozawa, K., Sugiyama, K., Watanabe, M., Konuma, H., Hara-Kudo, Y. Microbial contamination by procedures of consumption and the growth in beverage. J. Environ. Sci. Health, Part A. 48:781-790, 2013.

2. 学会発表

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Kai, A., Ohtsuka, K. DNA extraction and molecular detection methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. VTEC 2012, May 3-7, 2012. Amsterdam.

曾我部祐介、塚原めぐみ、丸山弓美、飯塚太由、荒木恵美子、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌026、0111および0157一斉試験法のための増菌培養法の基礎検討. 第33回日本食品微生物学会学術総会. 平成24年10月 福岡.

小西典子、齊木大、大塚佳代子、森哲也、中川弘、飯塚信二、多賀賢一郎、甲斐明美、小西良子、工藤由起子. 複数機関で実施した腸管出血性大腸菌026、0111および0157一斉試験法のための増菌培養法の検討. 第33回日本食品微生物学会学術総会. 平成24年10月 福岡.

山本祐嗣、林昭宏、飯塚信二、多賀

賢一郎、大塚佳代子、小西典子、森 哲也、中川 弘、齊藤志保子、磯部順子、廣井みどり、神吉政史、右田雄二、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 026、0111 および 0157 の一斉試験法のコラボレイティブスタディによる評価(1). 第 33 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 24 年 10 月 福岡.

大塚佳代子、門脇奈津子、森 哲也、高見明代、中川 弘、林昭宏、上田泰史、小西典子、甲斐明美、右田雄二、神吉政史、廣井みどり、磯部順子、齊藤志保子、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 026、0111 および 0157 の一斉試験法のコラボレイティブスタディによる評価(2). 第 33 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 24 年 10 月 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

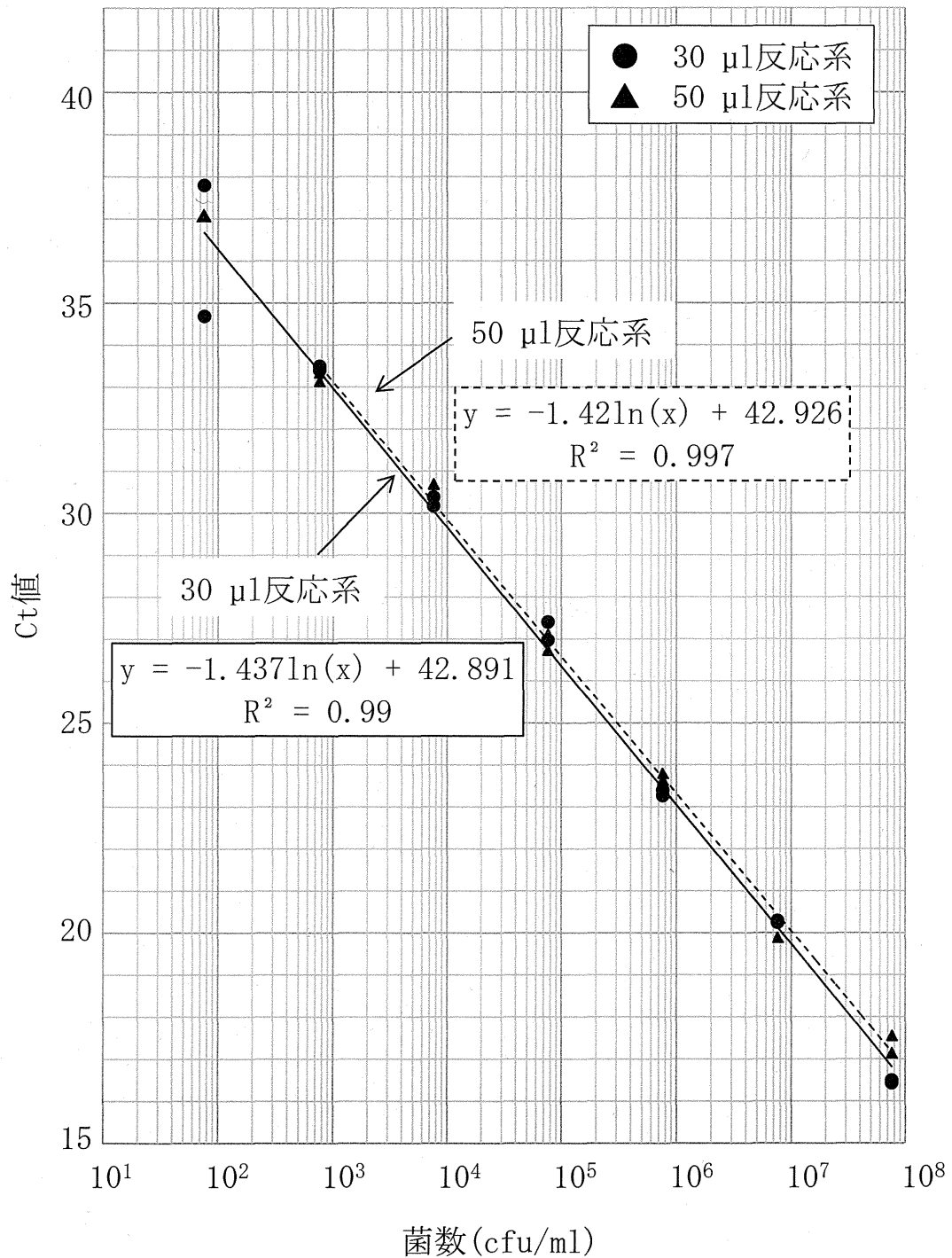


図1 牛挽肉培養液でのVT遺伝子検出の検量線 (auto解析)

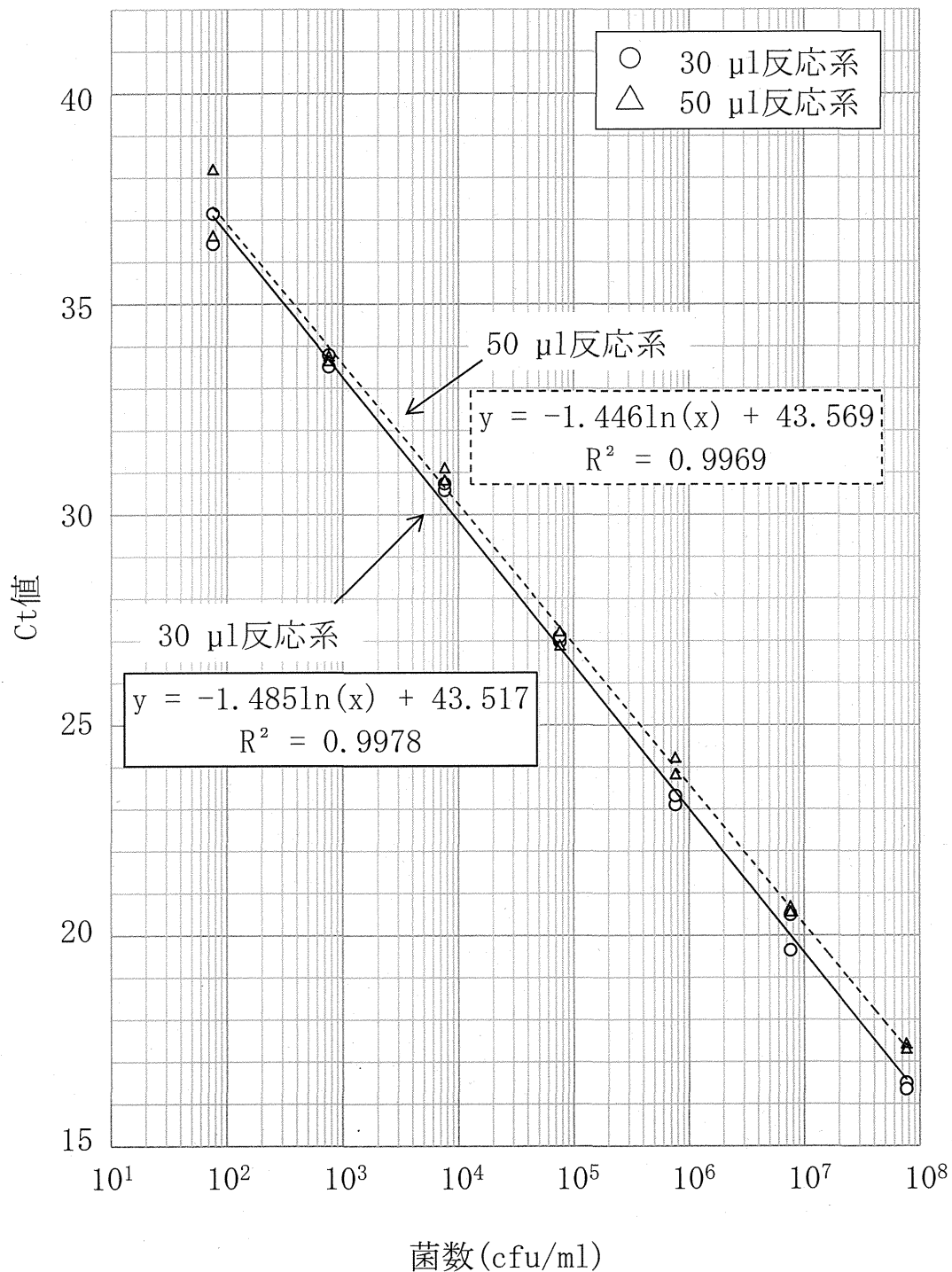


図2 カイワレダイコン培養液でのVT遺伝子検出の検量線 (auto解析)

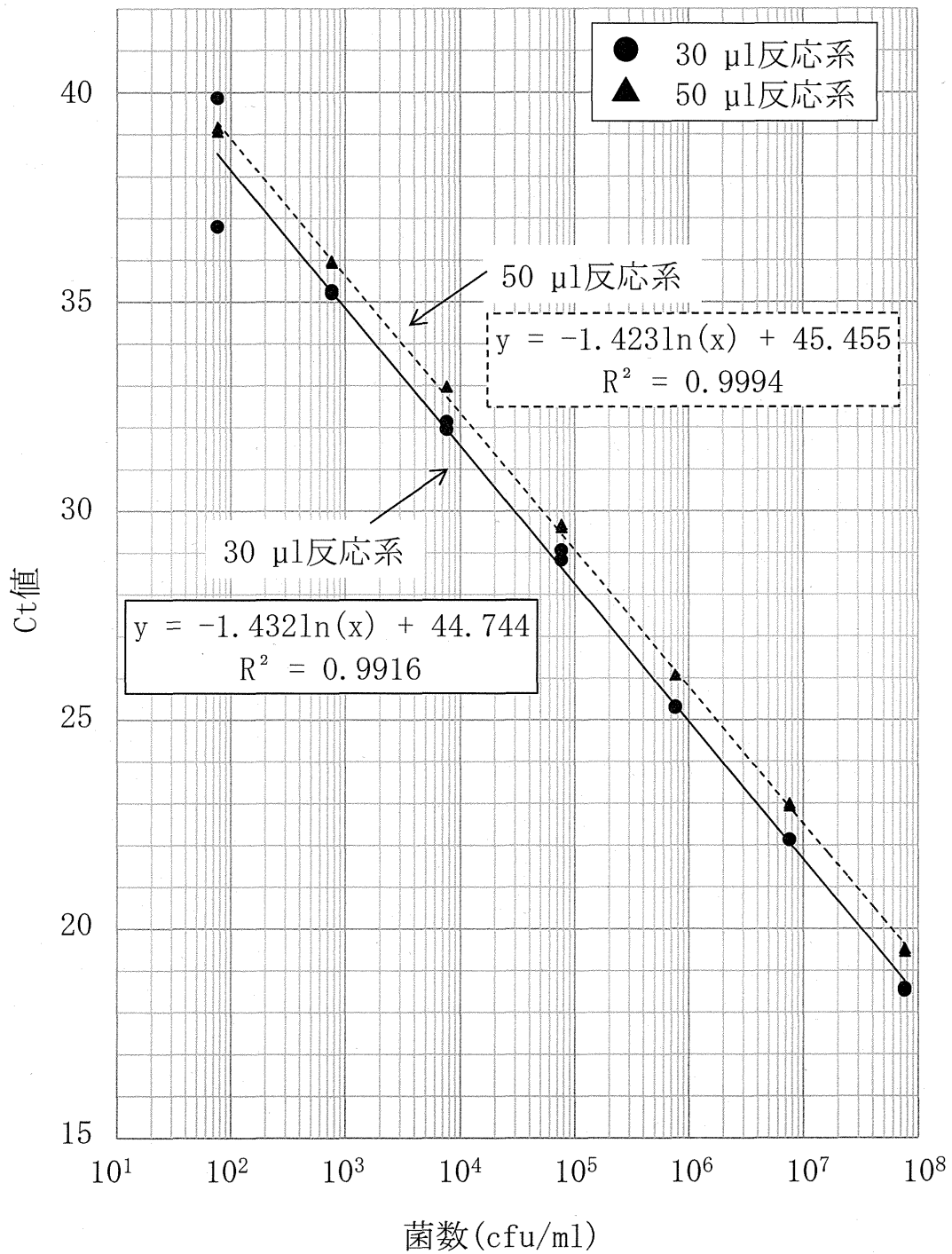


図3 牛挽肉培養液でのVT遺伝子検出の検量線 (manual解析)

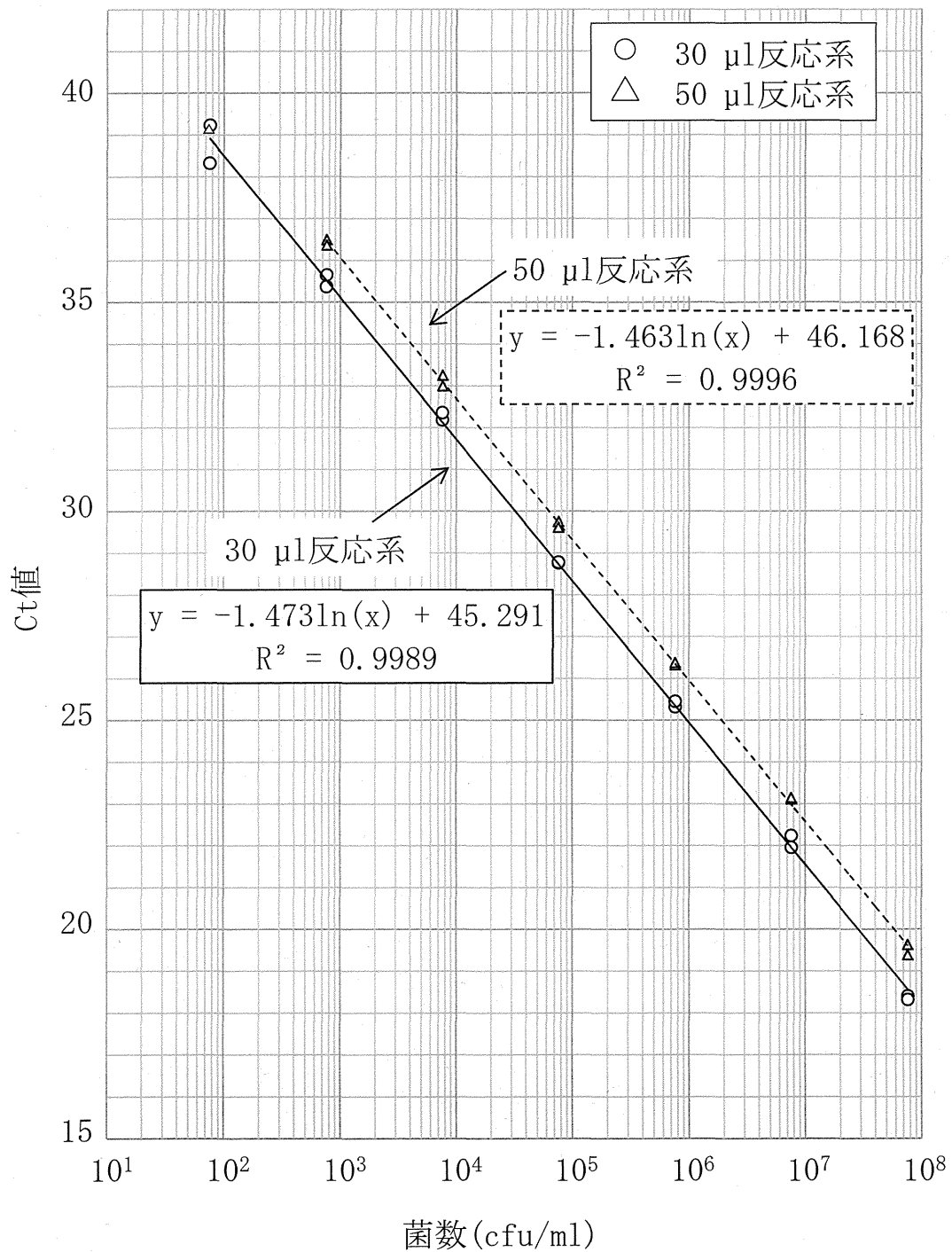
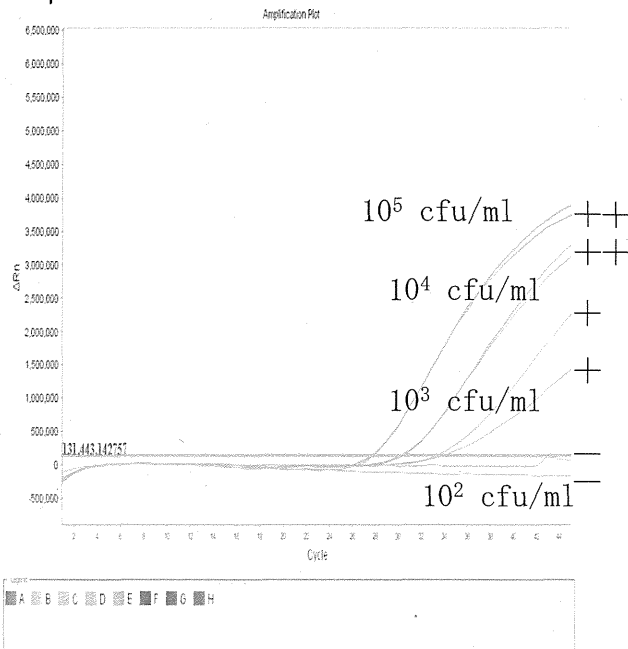
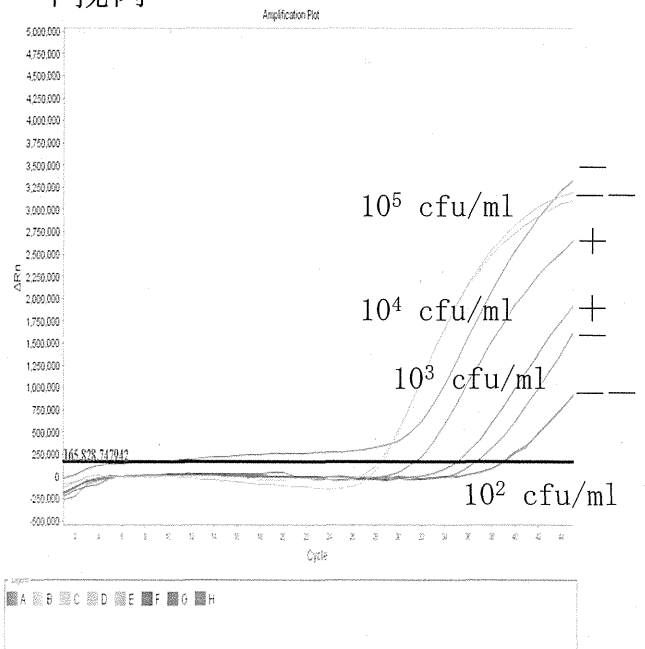


図4 カイワレダイコン培養液でのVT遺伝子検出の検量線 (manual解析)

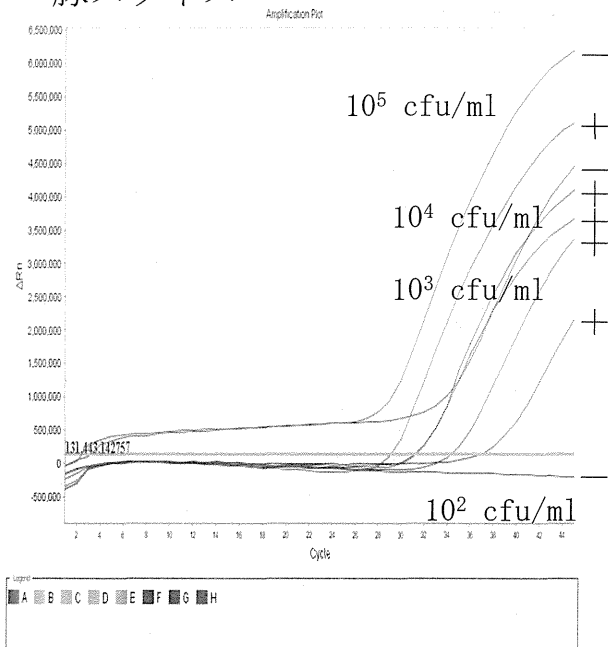
牛レバー



牛挽肉



豚スライス



チーズ

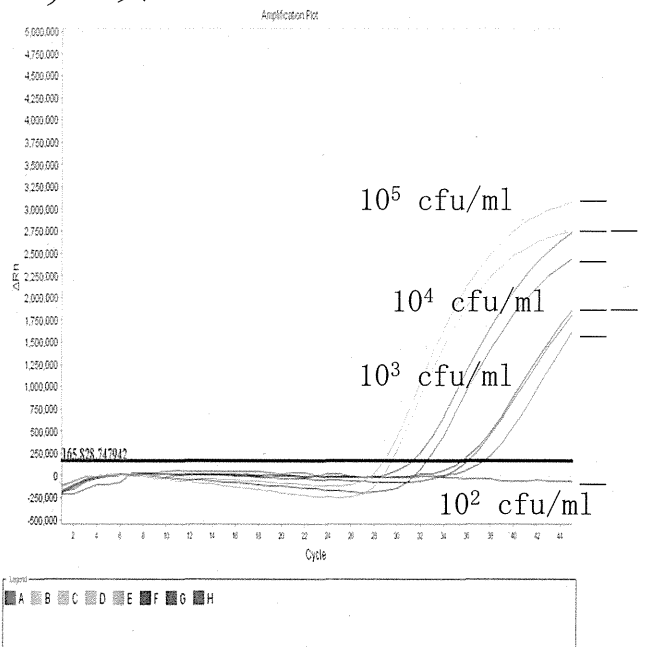


図5-1 CycleavePCR 0-157 kit Ver. 2.0でのABI7500を使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (auto解析)