

事例であった。培養法の検出数が多かったものは6事例中3事例であった。

#### (4)黄色ブドウ球菌

培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出は、3事例中2事例であった。

#### (5)腸管出血性大腸菌、病原大腸菌

*stx*遺伝子でみるかぎり、培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出はなかった。

しかし、いずれも1検体ずつの差であり、ほぼ差のないレベルと考えられた。その他の病原大腸菌は1事例にRFBS24V法の各種遺伝子検出数が多かった。

#### (6)一例のみの事例

一例のみの事例については、リステリア以外、検出数が培養法ならびにRFBS24V法ともに同数であった。リステリアの事例は、食品衛生法第6条違反食品喫食者便であり、また、凍結保存期間が長期であったこともRFBS24V法で検出数が低かった要因であると思われる。

#### (7)ウイルスが原因ならびに原因が不明な事例

培養法では、ウェルシュ菌、黄色ブドウ球菌、セレウスが散見され、RFBS24V法では *astA*, *aggR*, *daaD*, *eae* 遺伝子をはじめ、黄色ブドウ球菌、セレウスの遺伝子が検出された。ウェルシュ菌、黄色ブドウ球菌、セレウスは常在菌でもあることから、培養法を用いても検出されたことと考えられる。

一方、*astA* 遺伝子をはじめとする腸管凝集接着性大腸菌の各種遺伝子は、健康人からも散発的に検出されるといわれている<sup>20,21</sup>。今後、case-control study を行い、これら遺伝子の疫学的評価を行う必要がある。

糞便にはPCR妨害物質が含まれているため、専用のDNA抽出キットを使用した。しかし、これはDNA抽出効率に変動があり、また、消化管感染症の患者便は、水様下痢便から固形に近い便まで性状が異なるため、均一な抽出が期待できない。そうした中で、培

養法と同等レベルの検出ができたことは、RFBS24Vの性能が、実験レベルに留まらず、充分実用レベルにあると考えられた。

#### 7. ノロウイルス陰性糞便を用いたRFBSVの評価

疫学情報から原因物質としてノロウイルスが疑われた事例でも、細菌検査の陰性確認を行う必要がある。そこで、このような場合にRFBS24V法を使用することを想定し、ノロウイルス検査陰性であった糞便40検体について検討を行った。その結果、3 / 40 (7.5%) で陽性となり、検出遺伝子は *aggR*, *astA*, *femB* が1検体ずつであった。これらは、腸管凝集接着性大腸菌および黄色ブドウ球菌由来の遺伝子で、患者の常在菌であったと考えられる。RFBS24V法の検査結果を解析する際には、常在菌や不顕性感染菌が一部検出されることを考慮する必要がある。

#### 8. マルチプレックス SG-PCR法を用いた小規模検出系の検討

O157:NM (*stx1*, *stx2*, *eae* 保有株) を含む STEC 9 株を用いて、PCR試薬の検討を行った。RFBS24Vで採用している Dimer Eraser を用いた場合、いずれの株でも増幅が確認された (図6 a-1)。しかし、*stx1* の  $T_m$  値のピークが極端に弱くなる傾向が認められた (図6 a-2)。Power SYBR Green は今回設定した増幅条件では増幅の効率が悪く (図6 b-1)、*stx1*, *eae* の  $T_m$  値のピークが弱くなる株があった (図6 b-2)。今回の反応条件のままでは、Dimer Eraser, Power SYBR Green 共に *stx1* や *eae* の判定が困難となる場合があり、この マルチプレックス リアルタイム PCR には適さないことが分かった。一方、Ampdirect では増幅効率もよく (図6 c-1)、*stx1*, *stx2*, *eae* 全てを保有する株においても、それぞれの  $T_m$  値のピークがはっ

きりと確認できた (図6 c-2) . Ampdirectと同じBIOTAQを用いるBYOTAQ DPでは、IACを含め増幅が確認されなかった (図6 d-1) . Ampdirectで非常に良い結果が得られたのは、少なくともBIOTAQ単独の効果ではなく、Ampdirect plus使用による効果と考えられる。Ampdirect plusはPCR阻害物質の中和作用を持つPCR bufferであるが、今回の3種類の遺伝子を検出するマルチプレックスリアルタイムPCRに利用しても有効であることが分かった。STECの中にはこれら3種類の遺伝子を全て保有する株も多いことから、マルチプレックスリアルタイムPCR試薬にはAmpdirectを使用することにした。

前述の9株を含む86株のSTECに対し、既存のPCRとの比較を試みた。これらの菌株の多くは既に*stx1*, *stx2*, *eae*について調べていたが<sup>22)</sup>、一部の菌株については、既報の論文に従ってPCRを行った<sup>23-27)</sup>。これら86株に対し、Ampdirectを用いたリアルタイムマルチプレックスPCRを行ったところ、PCRの結果と一致した (表12, 図7) . また、RFBS24Vで新たに導入された*stx2*-ET-F, *stx2*-ET-Rプライマーは*stx2f*が検出できるように設計されている。しかも、このプライマーによる*stx2f*の増幅産物はその他の*stx2*の増幅産物と比べTm値が低くなるため、他の*stx2*と容易に区別することが出来た (図8) . 一方で、血清型が異なっても、遺伝子型が同一の場合、融解曲線はほぼ一致することが分かった (図9) . 以上のことから、Ampdirectを用いたSTEC用のマルチプレックスリアルタイムPCRは実際に多くのSTECで利用可能であると分かった。増幅産物のTm値は、同じPCR産物であっても、諸条件により多少の変動がみられる。そこで、O157:H7 (*stx1*, *stx2*, *eae*保有) 3株

について、DNA抽出法による影響を調査した。(1) DNeasy Blood & Tissue kitで抽出されたDNA、(2) TE煮沸法で抽出されたDNA、(5) 培養液をTEで10倍希釈した菌液に対するマルチプレックスリアルタイムPCRではいずれもTm値に大きな変化は認められなかった (図7a) . DNeasy Blood & Tissue kitで抽出されたDNAを陽性対照として利用するのであれば、これらの方法でのDNA抽出や菌液などをサンプルとして利用できることが分かった。一方で、(3) アルカリ熱抽出によるDNAや(4) 培養液に対するマルチプレックスリアルタイムPCRでは、(1) DNeasy Blood & Tissue kitで抽出されたDNAと比較して、Tm値が約0.5~1°C近く上昇した (図9b) . この差によって、判定が困難となる場合が想定されるため、このようなDNAや菌液をサンプルにするときには、同一の方法で抽出したDNAもしくは菌液を陽性対照として用いる必要があることが分かった。

既報のSTECを対象としたマルチプレックスリアルタイムPCR<sup>28,29)</sup>とは異なり、今回考案したマルチプレックスリアルタイムPCRにはIAC検出系が含まれているため、PCR反応の失敗による偽陰性を検出することが出来る。これを更に発展させ、IAC加TEを用いたTE煮沸法を導入すれば、サンプルのPCR反応液への入れ忘れによる偽陰性を防げると期待される。

リアルタイムPCRにおいて、SYBR Green Iを用いたインターカレーター法はプローブ法に比べ、マルチプレックス化が困難である。しかし、マルチプレックス化を目的に設計されているRFBS24Vのプライマーを採用することにより、STEC検査用のリアルタイムPCRを簡便にマルチプレックス化することに

成功した。インターカレーター法かつマルチプレックスであることから、ランニングコストを下げることができ、導入しやすいリアルタイムPCRだと考えられる。特に、平成24年12月17日付、食安監発1217第1号により、食品の腸管出血性大腸菌検査法がPCR法主体となったことから、今後、本PCR法を用いて、*stx*遺伝子をスクリーンすることが可能となる。糞便からのみならず、食品・食材の一次増菌菌液からDNAを抽出し、本法を用いることにより効率的な検査を実施することが可能になると考えられる。

#### D. 結論

24種の病原遺伝子を網羅的に検出するRapid Foodborne Bacteria Screening 24の感度をあげるために、PCR増幅回数を30から35回に上げ、それに伴いプライマーの再設計、競合型内部標準の作成を行った。その結果、RFBS24Vを完成させた。

RFBS24Vの性能評価のため、コピー数既知のDNAテンプレートを作成し、複数の施設においてそれぞれの機器を用いて試験を実施した。2種の標的遺伝子の増幅が低いものの、全体として検出限界は $5 \times 10^3 \sim 10^4$ copies/mLであることがわかった。

実際の事例から得た糞便試料を用いて培養法とRFBS24V法とを比較した。RFBS24V法は陽性検体数で評価すると、培養法と大きな差はなく、充分実用に耐えるものであることが分かった。

数種類の標的遺伝子を増幅することを目的に、RFBS24を利用したキットを作成した（仮称：RFBS-STEC）。*stx1*, *stx2*, *eae*遺伝子を同時に増幅するもので、Ampdirect plusを使用し、増菌菌液から直接リアルタイムPCRを行うことが可能であった。迅速検査の観点から、DNA調整手技の検討も重要で

あることがわかった。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

○山口敬治：multiplex Real-time PCR法による食中毒原因菌の網羅的検査法，第3回カンピロバクター研究会，宮崎，DEC 2010

○江藤良樹，川瀬 遵，池田徹也，山口敬治，嶋 智子，亀山光博，綿引正則，堀川和美，福島 博，後藤良一，調 恒明：網羅的迅速遺伝子検査システムRapid Foodborne Bacteria Screening 24の改良と検出限界の検討，第33回日本食品微生物学会学術総会，福岡，OCT 2012 (1A09)

○川瀬 遵，江藤良樹，池田徹也，山口敬治，綿引正則，嶋 智子，亀山光博，飯田奈都子，堀川和美，福島 博，後藤良一，調 恒明：改良した網羅的迅速遺伝子検査システムRapid Foodborne Bacteria Screening 24による食中毒事例等の検討，第33回日本食品微生物学会学術総会，福岡，OCT 2012 (1A10)

○池田徹也，山口敬治，嶋智子，綿引正則，川瀬 遵，亀山光博，江藤良樹，堀川和美，福島 博，後藤良一，調 恒明：網羅的迅速遺伝子検査システムRFBS24を応用したmultiplex real-time PCRによる*stx1*, *stx2*, *eae*遺伝子検査法，第33回日本食品微生物学会学術総会，福岡，OCT 2012 (2B10)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

Rapid Foodborne Bacteria Screening 24について特許出願中（特許出願元：島根県

#### G. 文献

1) 熊谷進：モダンメディア，47(7)，181-187，2001

- 2) Fukushima, H., Tsunomori, Y., and Seki, R. : Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food- or Waterborne Pathogens in Stools, *J. Clinical Microbiol.*, 41, 5134-5146, 2003
- 3) 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, *感染症学雑誌*, 79, 644-655, 2005
- 4) Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N., Yamaguchi, K. : Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using multiplex Real-time SYBR Green PCR Analysis, *Inter. J. Microbiol.*, volume 2010, article ID864817, 18 pages, 2010
- 5) 加藤直樹, Kim, M.S., 加藤はる, 田中香お里, 渡辺邦友, 上野一恵, Yongsop, C. : Polymerase chain reactionによるエンテロトキシン産生性*Clostridium perfringens* の同定, *J. Jpn. Ass. Infect. Dis.*, 67(8), 724-729, 1993
- 6) Furrer, B., Candrian, U., Luethy, J.: Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment, *Lett. Appl. Microbiol.*, 10(1), 31-34, 1990
- 7) Price, E.P., Huygens, F, Giffard, P.M.: Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* by using resolution-optimized binary gene targets derived from comparative genome hybridization studies, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12), 7793-7803, 2006
- 8) Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A., Rudi, K.: Application of the 5'-nuclease PCR Assay in Evaluation and Development of Methods for Quantitative Detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4029-4036, 2000
- 9) Nishibuchi, M., Takeda, Y., Tada, J., Ohashi, T., Nishimura, N., Ozaki, H., Fukushima, S.: Method to Detect the Thermostable Direct Hemolysin Gene and a Related Hemolysin Gene of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR, *Nihon Rinsho*, 642, 348-352, 1992
- 10) Hough, A.J., Harbison, S.-A., Savill, M.G., Melton, L.D., Fletcher, G.: Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction, *J. Food Protect.*, 65(8), 1329-1332, 2002
- 11) Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J., Akiba, Y.: Comprehensive and rapid real-time PCR analysis of 21 foodborne outbreaks, *Intl. J. Microbiology*, volume 2009, article ID917623, 13 pages, 2009
- 12) Gubala, A.J. & Proll, D.E.: Molecular-beacon multiplex real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*, *App. Environ. Microbiol.*, 72(9), 6424-6428, 2006
- 13) Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moo, H.W.: multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves, *J. Clinical Microbiol.*, 36(6), 1795-1797, 1998
- 14) 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
- 15) Yang, I.-C., Shih, D.Y.-C., Wang, J.-Y., Pan, T.-M.: Development of rapid real-time PCR and most-probable-number real-time PCR assays to quantify enterotoxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group, *J. Food Protect.*, 70(12), 2774-2781, 2007
- 16) Ratchtrachenchai, O.A., Subpasu, S., Ito, K.: Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR, *Bull. Dept. Medical Sci.*, 39, 211-222, 1997
- 17) 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

- 18) Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K.-I., Enomoto, K.: Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J. Clinical Microbiol.*, 40(1), 294-297, 2002
- 19) Wang, G., Clark, C.G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C.K., Kruk, T.M., Caldeira, R., Woodward, D.L., Rodgers, F.G.: Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR, *J. Clinical Microbiol.*, 41(3), 1048-1054, 2003
- 20) 石畝 史, 京田芳人, 望月典郎, 堀川武夫, 石森治樹, 大森聖門, 片山敏夫, 高塚英男: *astA*遺伝子保有大腸菌O169:HNMが原因と考えられた食中毒事例-福井県, 病原体検出情報, 25, 262-263, 2004
- 21) 森屋一雄, 角 典子, 中尾昌弘, 山崎 貢, 齊藤 眞, 伊藤健一郎: 散発下痢症患者及び乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌 (EPEC, EAaggEC) 関連遺伝子, *eaeA*, *aggR*, *astA*の保有状況, 感染症学雑誌, 74, 134-142, 2000
- 22) 山口敬治, 池田徹也, 森本洋: 北海道においてまれに分離される血清型の志賀毒素産生性大腸菌の性状, 北海道衛研所報, 58, 43-46, 2008
- 23) Pollard, D.R., Johnson, W.N., Lior, H., Tyler, D., Rozee, K.R. : Rapid and Specific Detection of Verotoxin Genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction, *J. Clinical Microbiol.*, 28(3), 540-545, 1990
- 24) Paton, A.W., Paton, J.C., Goldwater, P.N., Manning, P.A. : Direct Detection of *Escherichia coli* Shiga-Like Toxin Genes in Primary Fecal Cultures by Polymerase Chain Reaction, *J. Clinical Microbiol.*, 31(11), 3063-3067, 1993
- 25) Piérard, D., Muyltermans, G., Moriau, L., Stevens, D., Lauwers, S. : Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates, *J. Clinical Microbiol.*, 36(11), 3317-3322, 1998
- 26) Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S. Caprioli, A., Wieler, L. H., Karch, H. : A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons, *Applied Environ. Microbiol.*, 66(3), 1205-1208, 2000
- 27) 小林一寛, 瀬戸和子, 八柳 潤, 齋藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎貢, 林賢一, 松根渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田亨, 伊藤健一郎: 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察, 感染症学雑誌, 76(11), 911-920, 2002
- 28) Chassagne, L., Pradel, N., Robin, F., Livrelli, V. : Detection of *stx1*, *stx2*, and *eae* Genes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Using SYBR Green in a Real-time Polymerase Chain Reaction, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64, 98-101, 2009
- 29) Jothikumar, N. and Griffiths, M.W. : Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex Real-time PCR Assays, *Applied Environ. Microbiol.*, 68(6), 3169-3171, 2002

表1 我が国における細菌性食中毒の発生状況

菌種	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012*
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	469	428	447	491	558	645	416	335	509	345	361	336	238
<i>Salmonella</i> spp.	518	361	465	350	225	144	124	89	99	67	73	67	30
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	422	307	229	108	205	113	71	28	17	14	36	9	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	87	92	72	59	55	63	61	43	58	41	33	37	42
<i>Clostridium perfringens</i>	32	22	37	34	28	27	35	20	34	20	24	24	23
<i>Bacillus cereus</i>	10	9	7	12	25	16	18	5	21	13	15	10	2
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	16	24	13	12	18	24	24	18	17	26	27	25	14
その他の <i>Escherichia coli</i>	203	199	83	35	27	25	19	9	12	10	8	24	4
<i>Clostridium botulinum</i>			1				1	1			1		1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	4	8		1								2
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1	5	1	2	2					1				1
<i>Vibrio cholerae</i>	1	1	2						3				
<i>Shigella</i> spp.	1	3	2	1	1		1		3		1	7	
その他の細菌	18	18	9	6	9	8	4	5	4		1	4	5
総事例数	1,783	1,469	1,377	1,110	1,152	1,065	774	553	778	536	580	543	371

2000～2011年は確定値、2012年は速報値を集計

出典: <http://www.mhlw.go.jp/topics/shokuchu/04.html>

表2 使用した菌種

試料番号	菌種	対象遺伝子	菌株由来	菌数 (cfu/mL)	DNA濃度 (ng/μL)			希釈倍率
					1	2	平均	
1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	ATCC12915	$5.0 \times 10^5$	3.56	2.05	2.81	1.00
2	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	wild	$1.2 \times 10^9$	19.51	19.26	19.39	6.91
3	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (LT)	<i>lt, stp</i>	wild	$1.7 \times 10^9$	6.39	5.86	6.13	2.18
4	<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	JCM2529(ATCC335391)	$7.9 \times 10^8$	20.23	19.20	19.72	7.03
5	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific	ATCC33560	$1.7 \times 10^9$	72.50	71.44	71.97	25.7
6	TRH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (TRH1)	<i>trh1</i>	AQ4037	$2.8 \times 10^7$	145.00	143.73	144.37	51.5
7	TRH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (TRH2)	<i>trh2</i>	AT4	$1.4 \times 10^9$	426.64	432.17	429.41	153
8	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	wild	$9.0 \times 10^8$	12.23	11.28	11.76	4.19
9	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	wild	$9.3 \times 10^7$	3.60	2.82	3.21	1.14
10	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>	wild O1小川川	$1.2 \times 10^8$	23.05	22.62	22.84	8.14
11	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ST)	<i>sth</i>	wild	$1.6 \times 10^9$	45.77	43.41	44.59	15.9
12	Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>	wild Sakai O157	$2.3 \times 10^9$	7.55	5.97	6.76	2.41
13	Enterotoxigenic <i>B. cereus</i>	<i>nheB</i>	wild	$7.0 \times 10^7$	8.15	8.12	8.14	2.90
14	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i>	<i>aggR</i>	wild O111	$3.0 \times 10^9$	6.81	5.21	6.01	2.14
15	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	ATCC25923	$9.5 \times 10^8$	5.42	2.21	3.82	1.36
16	TDH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	RIMD2210633	$1.2 \times 10^9$	282.85	284.74	283.80	101
17	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	ATCC14029	$3.4 \times 10^7$	6.27	5.70	5.99	2.13
18	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i>	<i>stx2f, eae, astA</i>	wild 07E033	$1.7 \times 10^9$	6.28	3.85	5.07	1.81
19	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	<i>ipaH</i>	RIMD05091045	$7.2 \times 10^8$	23.94	22.31	23.13	8.24
20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	wild	$1.4 \times 10^9$	12.18	10.93	11.56	4.12
21	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	wild HP09009	$3.5 \times 10^8$	27.14	26.57	26.86	9.57
22	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>	wild SP2536	$6.6 \times 10^8$	18.04	16.12	17.08	6.09
23	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	wild	$1.2 \times 10^9$	15.04	13.46	14.25	5.08
24	Deffusely adherent <i>Escherichia coli</i>	<i>daaD</i>	wild KI2214	$4.4 \times 10^8$	26.39	26.72	26.56	9.47

表3 RFBS24IVに用いたprimer setsならびにその組合せ

群	菌種	対象遺伝子	プライマー名	配列	Tm値	文献
A	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	GAP-11	GGTTCATTAATTGAAACTGGTG	76.3	5
			GAP-12	AACGCCAATCATATAAAATTACAGC		
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	PAG38-F	TCTGCACGGTGTGGGTGTT	79.1	2
			PAG110-R	ACCGTCACGGCGGATTACT		
	ETEC LT	<i>lt</i>	LT-1	TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA	80.3	6
			LT-2	GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC		
B	<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	ceuE-For	CAAGTACTGCAATAAAAACTAGCACTACG	74.2	7
			ceuE-Rev	AGCTATCACCCCTCATCACTCATACTAATAG		
	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific	AB-F	CTGAATTTGATACCTTAAGTGCAGC	77.3	8
			AB-R	AGGCACGCCTAAACCTATAGCT		
	TRH <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>trh</i>	trh250-F	GGCTCAAATGGTTAAGCG	79.8	9
			trh250-R	CATTTCGCTCTCATATGC		
C	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	Lm-hly-F	GGGAAATCTGTCTCAGGTCATGA	77.8	10
			Lm-hly-R	CGATGATTTGAACCTTCATCTTTTGC		
	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	ces-TM-F	GATGTTTGCACGATGCAA	78.9	11
			ces-TM-R	CTTTCCGGCGTGATACCCATT		
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>	ompW-F	AACATCCGTGGATTTGGCATCTG	80.5	12
			ompW-R	GCTGGTTCCCTCAACGCTTCTG		
D	ETEC ST	<i>st</i>	STa-F	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA	76.5	13
			STa-R	AGGATTACAACAAAGTTACACAGCAGTAA		
	EHEC, EPEC <i>eae</i>	<i>eaeA</i>	eae-F2	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	78.9	14
			eae-R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA		
	Enterotoxigenic <i>Bacillus cereus</i>	<i>nheB</i>	SG-F3	GCACTTATGGCAGTATTTGCAGC	80.6	15
			SG-R3	GCATCTTTAAGCCTTCTGGTC		
E	EAEC	<i>aggR</i>	aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	74.9	16
			aggRKas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC		
	EHEC Stx1	<i>stx1</i>	JMS1-F	GTCACAGTAACAAACCGTAACA	79.3	H22
			JMS1-R	TCGTTGACTACTTCTTATCTGGA		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	FemB-fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	81.4	17
			FemB-rv	TGCGCAACACCCTGAACTT		
F	TDH <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	tdh-F176	TCCATCTGTCCCTTTTCTCTG	80.2	4
			tdh-R422	AGACACCGCTGCCATTGTAT		
	EHEC stx2	<i>stx2</i>	JMS2-F	CGACCCCTCTTGAACATA	82.6	H22
			JMS2-R	GATAGACATCAAGCCCTCGT		
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	PSG-F64	TTAACGCCCTGTCCGATAAG	86.5	4
			PSG-R313	TCGAGCAGATGAATCGACAC		
G	EAEC	<i>astA</i>	EAST-1-S	GCCATCAACACAGTATATCC	83.7	18
			EAST-AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC		
	EIEC, <i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>	ipaH1672-F	CTCTCAGAGGGTGGCTGACC	85.5	4
			ipaH1761-R	TCACGCATCACCTGTGCA		
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahhI</i>	AHH1-F	GCCGAGCGCCAGAAGGTGAGTT	88.1	19
			AHH1-R	GAGCGGCTGGATGCGGTTGT		
H	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	yadA-F1757	ACGAGTTGACAAAGGTTTAGCC	82.1	4
			yadA-R1885	GAACCAACCGCTAATGCCTGA		
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>invA</i>	invA2-F	GATTCTGGTACTAATGGTGATGATC	85.6	H22
			invA2-R	GCCAGGCTATCGCCAATAAC		
	DAEC	<i>daaD</i>	daaD-F31	GTCACCTGCGGGATGTTACT	89.4	4
			daaD-R263	AGCTCATGACGACCATCCTT		
IAC	<i>Y. ruckeri</i>	<i>yersH2</i>	yersH2-F	GGCTCACCTAGGCGACGA	86.4	2
			yersH2-R	TCAGTGCTATTAACAGTTAACCCTTCC		
	<i>Y. ruckeri</i>	<i>yers</i>	yers-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGTTA	78.0	2
			yers-R	GAGTTAGCCGGTGCTTCTT		

H22: 平成22年度に改変したもの

表4 共通試料を用いた菌種別・機種別試験結果 -Ct値, Tm値, 融解曲線から得た最終発現希釈倍率-

Group	試験に供した菌種	対象	増幅物	希釈率	菌数		A			B			C		D		E	
		遺伝子	サイズ(bp)	菌数	換算値	ABI7000	ABI7500Fast	MX3005P	TP800	ABI7500Fast	TP800	ABI7500Fast	TP800					
A	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	73	1.00	5.0E+05	5.0E+05	100	100	100	1,000	100	100						
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	73	6.91	1.2E+09	1.7E+08	100	1,000	100	1,000	1,000	100						
	ETEC( <i>lt</i> & <i>stp</i> )	<i>lt</i>	275	2.18	1.7E+09	7.8E+08	1,000	1	10	10	100	100						
B	<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	72	7.03	7.9E+08	1.1E+08	1,000	1,000	1,000	100	100	100						
	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific	86	25.70	1.7E+09	6.6E+07	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	100						
	<i>Vibrio parahaemolyticus (trh1)</i>	<i>trh(trh1)</i>	250	51.50	2.8E+07	5.4E+05	100	ND	ND	1	1	10						
	<i>Vibrio parahaemolyticus (trh2)</i>	<i>trh(trh2)</i>	250	153.00	1.4E+09	9.2E+06	ND	ND	ND	ND	ND	ND						
C	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	106	4.19	9.0E+08	2.1E+08	1,000	1,000	1,000	10,000	1,000	1,000						
	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	65	1.14	9.3E+07	8.2E+07	100	100	100	1,000	100	1,000						
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>	89	8.14	1.2E+08	1.5E+07	10	100	100	100	100	100						
D	ETEC( <i>sth</i> )	<i>st(sth)</i>	190	15.90	1.6E+09	1.0E+08	ND	ND	ND	ND	ND	ND						
	ETEC( <i>lt</i> & <i>stp</i> )	<i>st(stp)</i>	190	2.18	1.7E+09	7.8E+08	100	10	10	10	100	100						
	EHEC( <i>stx1, stx2, eae</i> )	<i>eaeA</i>	106	2.41	2.3E+09	9.5E+08	1,000	100	1,000	1,000	1,000	100						
	Enterotoxigenic <i>Bacillus cereus</i>	<i>nheB</i>	152	2.90	7.0E+07	2.4E+07	100	100	100	1,000	10	100						
E	EHEC( <i>stx1, stx2, eae</i> )	<i>stx1</i>	95	2.41	2.3E+09	9.5E+08	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	100						
	EAEC	<i>aggR</i>	254	2.14	3.0E+09	1.4E+09	10	ND	ND	1	1	1						
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	93	1.36	9.5E+08	7.0E+08	100	10	10	100	100	100						
F	<i>Vibrio parahaemolyticus (tdh)</i>	<i>tdh</i>	247	101.00	1.2E+09	1.2E+07	1,000	1	10	100	100	100						
	EHEC( <i>stx1, stx2, eae</i> )	<i>stx2</i>	108	2.41	2.3E+09	9.5E+08	1,000	100	100	1,000	100	100						
	EAEC( <i>astA, eae, stx2f</i> )	<i>stx2(stx2f)</i>	108	1.81	1.7E+09	9.4E+08	100	10	100	10	10	10						
	<i>Plisiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	250	2.13	3.4E+07	1.6E+07	1,000	100	100	1,000	100	100						
G	EAEC( <i>astA, eae, stx2f</i> )	<i>astA</i>	106	1.81	1.7E+09	9.4E+08	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000						
	EIEC	<i>ipaH</i>	90	8.24	7.2E+08	8.7E+07	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	100						
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	130	4.12	1.4E+09	3.4E+08	100	100	100	100	1,000	100						
H	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	129	9.57	3.5E+08	3.7E+07	10	10	10	10	1	10						
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>	129	6.09	6.6E+08	1.1E+08	10	10	10	10	10	1						
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	288	5.08	1.2E+09	2.4E+08	100	1	10	10	100	100						
	DAEC	<i>daaD</i>	233	9.47	4.4E+08	4.6E+07	100	100	100	1,000	100	100						

表5 共通知試料を用いた菌種別・機能別試験結果 --換算菌数と最小発現菌数（換算値）

Group	試験に供した菌種	対象 遺伝子	増幅物 サイズ(bp)	菌数 換算値	A		B		C	D	E
					ABI7000	ABI7500Fast	MX3005P	TP800	ABI7500Fast	TP800	
A	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	73	5.0E+05	5.0E+03	5.0E+03	5.0E+03	5.0E+02	5.0E+03	5.0E+03	
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	73	1.7E+08	1.7E+06	1.7E+05	1.7E+06	1.7E+05	1.7E+05	1.7E+06	
	ETEC ( <i>lt</i> & <i>stp</i> )	<i>lt</i>	275	7.8E+08	7.8E+05	7.8E+08	7.8E+07	7.8E+07	7.8E+06	7.8E+06	
B	<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	72	1.1E+08	1.1E+05	1.1E+05	1.1E+05	1.1E+06	1.1E+06	1.1E+06	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific	86	6.6E+07	6.6E+04	6.6E+04	6.6E+04	6.6E+04	6.6E+04	6.6E+05	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( <i>trh1</i> )	<i>trh(trh1)</i>	250	5.4E+05	5.4E+03	ND	ND	5.4E+05	5.4E+05	5.4E+04	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( <i>trh2</i> )	<i>trh(trh2)</i>	250	9.2E+06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
C	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	106	2.1E+08	2.1E+05	2.1E+05	2.1E+05	2.1E+04	2.1E+05	2.1E+05	
	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	65	8.2E+07	8.2E+05	8.2E+05	8.2E+05	8.2E+04	8.2E+05	8.2E+04	
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>	89	1.5E+07	1.5E+06	1.5E+05	1.5E+05	1.5E+05	1.5E+05	1.5E+05	
D	ETEC ( <i>sth</i> )	<i>st(sth)</i>	190	1.0E+08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	ETEC ( <i>lt</i> & <i>stp</i> )	<i>st(stp)</i>	190	7.8E+08	9.4E+06	9.4E+07	9.4E+07	9.4E+07	9.4E+06	9.4E+06	
	EHEC ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> )	<i>eaeA</i>	106	9.5E+08	7.8E+05	7.8E+06	7.8E+05	7.8E+05	7.8E+05	7.8E+06	
	Enterotoxigenic <i>Bacillus cereus</i>	<i>nheB</i>	152	2.4E+07	2.4E+05	2.4E+05	2.4E+05	2.4E+04	2.4E+06	2.4E+05	
E	EHEC ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> )	<i>stx1</i>	95	9.5E+08	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+06	
	EAEC	<i>aggR</i>	254	1.4E+09	1.4E+08	ND	ND	1.4E+09	1.4E+09	1.4E+09	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	93	7.0E+08	7.0E+06	7.0E+07	7.0E+07	7.0E+06	7.0E+06	7.0E+07	
F	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( <i>tdh</i> )	<i>tdh</i>	247	1.2E+07	1.2E+04	1.2E+07	1.2E+06	1.2E+05	1.2E+05	1.2E+05	
	EHEC ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> )	<i>stx2</i>	108	9.5E+08	9.5E+05	9.5E+06	9.5E+06	9.5E+05	9.5E+06	9.5E+06	
	EAEC ( <i>astA</i> , <i>eae</i> , <i>stx2f</i> )	<i>stx2(stx2f)</i>	108	9.4E+08	9.4E+06	9.4E+07	9.4E+06	9.4E+07	9.4E+07	9.4E+07	
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	250	1.6E+07	1.6E+04	1.6E+05	1.6E+05	1.6E+04	1.6E+05	1.6E+05	
G	EAEC ( <i>astA</i> , <i>eae</i> , <i>stx2f</i> )	<i>astA</i>	106	9.4E+08	9.4E+05	9.4E+05	9.4E+05	9.4E+05	9.4E+05	9.4E+05	
	EIEC	<i>ipaH</i>	90	8.7E+07	8.7E+04	8.7E+04	8.7E+04	8.7E+04	8.7E+04	8.7E+05	
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	130	3.4E+08	3.4E+06	3.4E+06	3.4E+06	3.4E+06	3.4E+05	3.4E+06	
H	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	129	3.7E+07	3.7E+06	3.7E+06	3.7E+06	3.7E+06	3.7E+07	3.7E+06	
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>	129	1.1E+08	1.1E+07	1.1E+07	1.1E+07	1.1E+07	1.1E+07	1.1E+08	
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	288	2.4E+08	2.4E+06	2.4E+08	2.4E+07	2.4E+07	2.4E+06	2.4E+06	
	DAEC	<i>daaD</i>	233	4.6E+07	4.6E+05	4.6E+05	4.6E+05	4.6E+04	4.6E+05	4.6E+05	

表6 RFBS24Vに用いたprimer setsならびにその組合せ

菌種	対象遺伝子	primer	配列	文献
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	CPE-Et-F	TAATAGATAAAGGAGATGGTTGGAT	H23
		CPE-Et-R	AAATCCATATTCTACAGATGCTTG	
A <i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	PAG38-F	TCTGCACGGTGTGGGTGTT	2
		PAG110-R	ACCGTCACGGCGGATTACT	
EHEC stx2	<i>stx2</i>	stx2-ET-F	CATGACAACGGACAGCAGTTAT	H23
		stx2-ET-R	AACTCCATTAACGCCAGATATGA	
EHEC Stx1	<i>stx1</i>	stx1-ET-F	CATTACAGACTATTTTCATCAGGAGGT	H23
		stx1-ET-R	CAAATTATCCCCTGAGCCACTA	
B <i>Campylobacter jejuni</i>	specific	AB-F2	GATACCTTAAGTGCAGCCTGTGA	H23
		AB-R2	ACGCCTAAACCTATAGCTCCTTC	
TRH <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>trh</i>	F-trh82	CCATCMATACCTTTTCTTCTCC	H23
		R-trh-287	ACYGTCATATAGGCGCTTAAC	
ETEC LT	<i>lt</i>	LT-F2	AGCCATTGAAAGGATGAAGGA	H23
		LT-2	GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC	6
C Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	ces-TM-F	GATGTTTGCGACGATGCAA	11
		ces-TM-R	CTTTCGGCGTGATACCCATT	
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>	ompW-F	AACATCCGTGGATTTGGCATCTG	12
		ompW-R	GCTGGTTCTCAACGCTTCTG	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	Lm-hly-F	GGGAAATCTGTCTCAGGTCATGA	10
		Lm-hly-R-kai1	GTAAATTACGGCTTTGAAGGAAGA	H23
D EHEC EPEC eae	<i>eae</i>	eae-F2	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	14
		eae-R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA	
Enterotoxigenic <i>Bacillus cereus</i>	<i>nheB</i>	SG-F3	GCACTTATGGCAGTATTTGCAGC	15
		SG-R3	GCATCTTTTAAGCCTTCTGGTC	
<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	ceuE-For	CAAGTACTGCAATAAAAACCTAGCACTACG	7
		ceuE-Rev	AGCTATCACCCCTCATCACTCATACTAATAG	
E EAEC	<i>aggR</i>	aggRks1-kai1	GTATACACAAAAGAAGGAAGCAATA	H23
		aggRKas2-kai1	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	FemB-fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	17
		FemB-rv	TGCGCAACACCCTGAACTT	
EHEC ST	<i>st</i>	STa-Et-F2	CTGTATTATCTTTCCCCTCTTTAGTC	H23
		STa-Et-R	AGGATTACAACACAGTTCACAGCAG	
	<i>sth</i>	Stb-Et-F	CGCTCAGGATGCTAAACCAG	
F TDH <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	tdh-F2	ATGAGATATTTGTTGTTGTTTCGAGA	H23
		tdh-R2	TCACAGTCATGTAGGATGTCA	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	PSG-F64	TTAACGCCCTGTCCGATAAG	4
		PSG-R149	TACCGGCTCACCCAGATG	H23
EAEC	<i>astA</i>	EAST-1-S	GCCATCAACACAGTATATCC	18
		EAST-AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	
G EIEC <i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>	ipaH1632-F	CAGGCAGAAGAGCAGAAGTATGA	H23
		ipaH1771-R	CTGTTTCAGTCTCACGCATCAC	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahhI</i>	AHH1-1062--F	CCAGGATTACCGGTGCGAAC	H23
		AHH1-1241-R	GGCACGAACCCCTTGTAGC	
<i>Yershinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	yadA-F1757	ACGAGTTGACAAAGTTTAGCC	4
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		yadA-R1885X	GAACCAACCGCTAATGCCTGA	
H <i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	invA386-F	CGTTCGGGCAATTCGTTAT	H22
		invA662-R	ATAAACTTCATCGCACCGTCA	
DAEC	<i>daaD</i>	daaD-F31	GTCACCTGCGGGATGTTACT	4
		daaD-R263	AGCTCATGACGACCATCCTT	

H22, H23: 平成22および23年度に改変したものの

表7 共通試料を用いた菌種別・機種別試験結果 -Ct値, Tm値, 融解曲線から得た最小発現コピー数-

表7-1 志賀毒素産生性大腸菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>X</sup> copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
Shiga toxin producing <i>Escherichia coli</i> (STEC)	<i>stx1</i>	A	TP900			3					3	
		B	TP800		2	1				2	1	
		C	ABI7500		2	1				3		
		D	MX3000P		3					1	2	
		E	ABI7900		1	2				2	1	
STEC	<i>stx2</i>	A	TP900		1	2				1	2	
		B	TP800		3					3		
		C	ABI7500		2	1				3		
		D	MX3000P		3					2	1	
		E	ABI7900		1	2				1	2	
STEC	<i>stx2f</i>	A	TP900				3					3
		B	TP800			1	2				1	2
		C	ABI7500				3				2	1
		D	MX3000P				3					3
		E	ABI7900				3				1	2

表7-2 腸管毒素産生性大腸菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>X</sup> copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)	<i>lt</i>	A	TP900			3						3
		B	TP800		2	1				3		
		C	ABI7500		2	1				3		
		D	MX3000P			3					3	
		E	ABI7900			3					3	
ETEC	<i>stp</i>	A	TP900		2	1				3		
		B	TP800		3					3		
		C	ABI7500		1	2				2	1	
		D	MX3000P	1	2					2	1	
		E	ABI7900		2	1				3		
ETEC	<i>sth</i>	A	TP900	1	2					1	1	1
		B	TP800		3					3		
		C	ABI7500		3					2	1	
		D	MX3000P		3					3		
		E	ABI7900		2	1				3		

表7-3 腸管病原性大腸菌，腸管侵入性大腸菌，赤痢菌，  
腸管凝集接着性大腸菌分散接着性大腸菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
EPEC/EHEC	<i>eae</i>	A	TP900		3						2	1
			TP800		2	1		1	2			
			ABI7500		2	1			3			
			MX3000P		3				2	1		
			ABI7900	1	2			2	1			
EPEC	<i>astA</i>	A	TP900		2	1			1	2		
			TP800		1	2			3			
			ABI7500		3				3			
			MX3000P		3				1	2		
			ABI7900	1	2			1	2			
EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>	A	TP900		2	1			1	2		
			TP800		2	1			2	1		
			ABI7500		1	2			3			
			MX3000P			3				3		
			ABI7900			3			1	2		
EAEC	<i>aggR</i>	A	TP900			3				3		
			TP800			3				3		
			ABI7500		1	2			1	1	1	
			MX3000P		2	1			1	2		
			ABI7900			3				3		
DAEC	<i>daaD</i>	A	TP900		1	2			3			
			TP800		3				3			
			ABI7500		1	2			3			
			MX3000P		3				1	2		
			ABI7900	1	2			2	1			

表7-4 ウェルシュ菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	最低検出コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)							
				LOT 1				LOT 2			
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3
<i>Cl. perfringens</i>	<i>cpe</i>	A	TP900		2	1				2	1
			TP800		3				3		
			ABI7500	1	2				3		
			MX3000P		3				2	1	
			ABI7900		1	2			1	2	

表7-5 腸炎ビブリオ

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	A	TP900		3				1	2		
		B	TP800		3					3		
		C	ABI7500		3			1	2			
		D	MX3000P	1	2				3			
		E	ABI7900		1	2			2	1		
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>trh1</i>	A	TP900		1	2			1	2		
		B	TP800		2	1			3			
		C	ABI7500		3				1	2		
		D	MX3000P		3				3			
		E	ABI7900		1	2					3	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>trh2</i>	A	TP900		3				3			
		B	TP800		3				3			
		C	ABI7500		3				3			
		D	MX3000P		3				2	1		
		E	ABI7900		3				3			

表7-6 コレラ

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>V. cholerae</i>	<i>ompW</i>	A	TP900		2	1					3	
		B	TP800			3			3			
		C	ABI7500		3				3			
		D	MX3000P		1	2			2	1		
		E	ABI7900			3					3	

表7-7 エロモナス

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>A. hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	A	TP900		2	1			2	1		
		B	TP800		2	1			2	1		
		C	ABI7500		2	1			2	1		
		D	MX3000P		1	2					3	
		E	ABI7900		2	1					3	

表7-8 プレシシオモナス

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)								
				LOT 1				LOT 2				
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>Plesiomonas</i> spp.	<i>gyrB</i>	A	TP900		1	2				3		
		B	TP800		1	2					3	
		C	ABI7500			3					3	
		D	MX3000P		1	2					3	
		E	ABI7900			3					3	

表7-9 カンピロバクター属菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X=	0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>C. jejuni</i>	specific	A	TP900			2	1						3
		B	TP800			1	2				3		
		C	ABI7500			3					3		
		D	MX3000P	1		2							3
		E	ABI7900				3						3
<i>C. coli</i>	ceuE	A	TP900				3				1	2	
		B	TP800			1	2				3		
		C	ABI7500			2	1				2	1	
		D	MX3000P			2	1				1	2	
		E	ABI7900				3						3

表7-10 セレウス菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X=	0	1	2	3	0	1	2	3	
Emetic <i>B. cereus</i>	ces	A	TP900			1	2						3
		B	TP800			1	2				1	2	
		C	ABI7500				3				1	2	
		D	MX3000P				3					3	
		E	ABI7900				3					3	
Enterotoxigenoc <i>B. cereus</i>	nheB	A	TP900	1		2					1	2	
		B	TP800			3					2	1	
		C	ABI7500			2	1					3	
		D	MX3000P	1		2						3	
		E	ABI7900				3					3	

表7-11 黄色ブドウ球菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X=	0	1	2	3	0	1	2	3	
<i>S. aureus</i>	femB	A	TP900					3					3
		B	TP800					3				2	1
		C	ABI7500				1	2				1	2
		D	MX3000P					3					3
		E	ABI7900					3					3

表7-12 リステリア・モノサイトゲネス

菌種	対象遺伝子	施設	機器	最低検出コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3		
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	A	TP900		2	1				3			
		B	TP800		1	2				3			
		C	ABI7500		1	2				2	1		
		D	MX3000P		1	2				2	1		
		E	ABI7900		1	2						3	

表7-13 サルモネラ属菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3		
Salmonellas	<i>invA</i>	A	TP900		1	2				3			
		B	TP800		1	2				3			
		C	ABI7500			2	1			2	1		
		D	MX3000P			3				3			
		E	ABI7900			2	1			2	1		

表7-14 エルシニア属菌

菌種	対象遺伝子	施設	機器	対象遺伝子を検出した最低コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3		
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	A	TP900				3					3	
		B	TP800				3					3	
		C	ABI7500		1	2			1	2			
		D	MX3000P		1	2					3		
		E	ABI7900				3					3	
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>	A	TP900				3					3	
		B	TP800				3		1	2			
		C	ABI7500				3		1	2			
		D	MX3000P		2	1					3		
		E	ABI7900				3					3	

表7-15 プロビデンシア・アルカリファシエンス

菌種	対象遺伝子	施設	機器	最低検出コピー数 (1×10 <sup>x</sup> copies)									
				LOT 1				LOT 2					
				X= 0	1	2	3	0	1	2	3		
<i>P. alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	A	TP900				3					3	
		B	TP800		2	1			1	2			
		C	ABI7500				3		1	2			
		D	MX3000P		2	1					3		
		E	ABI7900				3		1	2			

表8 使用した試料の由来

複数事例における原因究明確認ならびに行政判断事例数

	原因究明調査で確認された事例数	行政機関で断定された事例数
カンピロバクター	13	7
ウェルシュ菌	7	3
サルモネラ	6	4
黄色ブドウ球菌	3	2
腸管出血性大腸菌	3	3
病原大腸菌	2	1

表9 培養法とRFBS24法による検出数の比較

	事例数	培養法とRFBS24法による検出数の比較		
		同じ検出数	培養法が多い	RFBS24法が多い
カンピロバクター	13	9	3	2
ウェルシュ菌	4		2	2
サルモネラ	6	3	3	
黄色ブドウ球菌	3	3		
腸管出血性大腸菌	3		2	1
病原大腸菌	2	1		1
<i>P. alcalifaciens</i>	1	1		
<i>P. shigeloides</i>	1	1		
<i>B. cereus</i>	1	1		
<i>L. monocytogenes</i>	1		1	
<i>Y. enterocolitica</i>	1	1		

カンピロバクターは2種の菌種が同時に検出された事例があった

腸管出血性大腸菌は*stx* geneで比較, ウェルシュ菌は*cpe* geneで比較した.

# 表10-1 培養法とRFBS24V法の比較

## (1) カンピロバクター, ウェルシュ, サルモネラ

行政対応 取扱	行政結果 原因物質	原因 物質	菌分離			RFBS24結果												
			1	2	3	1	2	3	4	5								
感染症		Campy	C. jejuni	2/2	astA	1/2		C. jejuni	1/2	astA	1/2	S. aureus	1/2					
食中毒	カンピロバクター・ジェジュニ		C. jejuni	4/5	S. aureus	4/5	DAEC	1/5	C. jejuni	4/5	S. aureus	1/5	DAEC	1/5				
食中毒	カンピロバクター・ジェジュニ		C. jejuni	4/7	ウェルシュ	1/7	S. aureus	1/7	C. jejuni	3/7	eae	1/7	aggR	1/7	astA	1/7		
食中毒	カンピロバクター		C. coli	2/2					C. coli	2/2	C. jejuni	2/2	astA	1/2				
食中毒	カンピロバクター		C. jejuni	3/4	C. coli	1/4	S. aureus	3/4	C. jejuni	2/4	C. coli	1/4	astA	2/4				
食中毒	カンピロバクター		C. coli	2/4	ウェルシュ	1/4	S. aureus	2/4	C. coli	2/4								
食中毒	カンピロバクター		C. jejuni	3/10	C. coli	2/10	ウェルシュ	3/10	C. jejuni	3/10	C. coli	2/10	eae	2/10	astA	1/10	DAEC	1/10
有症苦情	カンピロバクター		C. jejuni	1/2					C. jejuni	1/2								
有症苦情			C. jejuni	1/1					C. jejuni	1/1	astA	1/1						
有症苦情			C. jejuni	3/6					C. jejuni	2/6	Salmonella	2/6	A. hydro	1/6				
有症苦情			C. jejuni	1/4	C. coli	1/4			C. jejuni	2/4	C. coli	2/4						
有症苦情			C. jejuni	2/3					C. jejuni	2/3	astA	1/3						
有症苦情			C. jejuni	1/1	S. aureus	1/1			C. jejuni	1/1	astA	1/1						
食中毒	ウェルシュ菌		CPER	ウェルシュ*(5)	7/7				ウェルシュ	7/7	S. aureus	2/7	astA	1/7				
食中毒	ウェルシュ菌	ウェルシュ*(4)		5/6					ウェルシュ	3/6	stp & sth	1/6						
食中毒	ウェルシュ菌	ウェルシュ*		3/7					ウェルシュ	5/7	A. hydro	3/7	S. aureus	1/7	DAEC	1/7		
有症苦情		(ウェルシュ*)		6/7	(S. aureus)	3/7			ウェルシュ	2/7								
有症苦情		CPER?	(ウェルシュ)	2/5				astA	5/5	eae	1/5	ウェルシュ	1/5					
有症苦情			(ウェルシュ)	2/5	(S. aureus)	3/5	(Salmonella)	1/5	astA	5/5	eae	1/5	A. hydro	1/5				
有症苦情			ウェルシュ	2/7	(S. aureus)	1/7			ND									
食中毒	サルモネラ	SAL	Salmonella	7/12	S. aureus	4/12	ウェルシュ	2/12	Salmonella	5/12	S. aureus	1/12	astA	2/12	A. hydrophila	1/12		
食中毒	サルモネラ		Salmonella	2/3	S. aureus	1/3			Salmonella	2/3	DAEC	1/3	ウェルシュ	1/3				
有症苦情	サルモネラ		Salmonella	1/3					Salmonella	1/3	astA	1/3						
有症苦情	不明		Salmonella	2/2					Salmonella	1/2								
有症苦情			Salmonella	2/2					Salmonella	2/2								
他県食中毒関連調査			Salmonella	3/6	(B. cereus)	1/6			Salmonella	1/6								

表10-2 培養法とRFBS24V法の比較

(2) 黄色ブドウ球菌, 腸管出血性大腸菌ほか及びウイルス

行政対応 取扱	行政結果 原因物質	原因 物質	菌分離			RFBS24結果							
			1	2	3	1	2	3	4	5			
食中毒	黄色ブドウ球菌	STAPH	S. aureus	2/2			S. aureus	2/2					
食中毒	黄色ブドウ球菌		S. aureus	2/5			S. aureus	2/5	Salmonella	4/5	astA	1/5	
不明			S. aureus	1/3	ウエルシュ	1/3		S. aureus	?1/3				

食中毒	腸管出血性大腸菌O157	EHEC	EHEC	13/13			stx1&2	12/13	eae	13/13	S. aureus	2/13	
食中毒	腸管出血性大腸菌		EHEC	4/5			stx1&2	3/5	eae	4/5	astA	3/5	
食中毒	腸管出血性大腸菌		EHEC	5/7	ウエルシュ	4/7	(S. aureus)	1/7	stx1&2	6/7	astA	1/7	

食中毒	病原性大腸菌	EAEC	EAEC(astA)	6/8	EAEC(aggR)	4/8	ETEC	3/8	astA	8/8	aggR	5/8	st	4/8	eae	3/8	lt	1/8
有症苦情			EAEC(ast)	2/2	(ウエルシュ)	1/2			astA	2/2								
有症苦情		Palcal	(P. alcalif)	1/5	(S. aureus)	1/5			P. alcali	1/5	astA	2/5	eae	1/5				
食中毒	不明	Pshige	P. shigeloides	2/5					P. shigelides	2/5	eae	1/5						
食中毒	セレウス菌	Bcer	セレウス(ces,nhe)	2/4					B. cereus ces	1/4	B. cereus nhe	1/4	C. jejuni	1/4	aggR	1/4		
その他	リステリア	Lm	Lm	10/10					Lm	4/10	S. aureus	5/10	eae	1/10				
有症苦情	Y. pseudotuberculosis	Yersinia	Y. entero	2/5					Y. entero	2/5								

行政対応 取扱	行政結果 原因物質	原因 物質	菌分離			RFBS24結果							
			1	2	3	1	2	3	4	5			
食中毒	ノロウイルス	Noro	ウエルシュ	1/3				ND					
食中毒	原因不明	Rota	NT					St. aureus	1/2				
有症苦情		Noro						DAEC	1/7				
有症苦情		Noro	(S. aureus)	1/2				ND					
有症苦情		Rota	ウエルシュ	1/3	(S. aureus)	1/3		astA	2/3				
不明		Noro	Y. entero	1/6				S. aureus	3/6	astA	1/6	Y. entero	1/6
不明		Noro	NT					ND					
不明		Noro	NT					astA	1/6				
不明		Noro	NT					ND					
不明		Noro	NT					S. aureus	1/4				
不明		Sapo	NT					S. aureus	1/6				

表10-3 培養法とRFBS24V法の比較

(3) 原因物質不明の事例

行政対応 取扱	行政結果 原因物質	原因 物質	菌分離			RFBS24結果				
			1	2	3	1	2	3	4	5
感染症	腸管出血性大腸菌O157	不明	(EHEC) 1/1			astA 1/1				
感染症		不明	ND			S. aureus 1/2				
食中毒	原因不明	不明	NT			ウェルシュ 1/2				
食中毒	原因不明	不明	NT			eae 1/2				
食中毒	原因不明	不明	NT			eae 1/2				
食中毒	ウェルシュ菌	不明	NT			ウェルシュ 3/4	eae 2/4	St. aureus 1/4	astA 1/4	
食中毒	原因不明	不明	NT			DAEC 1/2				
食中毒	黄色ブドウ球菌	不明	ND			astA 4/7	S. aureus 2/7	B. cereus ces 1/7	B. cereus nhe 1/7	
食中毒	クドア・セプテンブクター タ	不明	(セレウス) 1/2 (ウェルシュ) 1/2			B.cereus nhe 1/2				
有症苦情	不明	不明	C. jejuni 1/6 Salmonella 1/6			astA 2/6				
有症苦情		不明	ウェルシュ 1/4			ND				
有症苦情	不明	不明	ND			ND				
有症苦情		不明	ND			C. coli 1/2	astA 1/2			
有症苦情		不明	S. aureus 1/5 (B. cereus) 2/5 (ウェルシュ) 1/5			astA 2/5	eae 1/5	STh 1/5		
有症苦情		不明	(S. aureus) 2/3			astA 3/3	daaD 1/3			
有症苦情		不明	(ウェルシュ) 2/5 S. aureus 1/5			astA 3/5	A. hydro 3/5			
有症苦情		不明	(セレウス) 1/4 (ウェルシュ) 1/4			C. jejuni 4/4	astA 3/4	eae 1/4	A. hydro 1/4	
有症苦情		不明	(セレウス) 1/4 (S. aureus) 2/4			astA 1/4	A. hydro 1/4			
有症苦情		不明	(セレウス) 1/3 (ウェルシュ) 1/3			astA 2/3				
有症苦情		不明	S. aureus 1/2			ND				
他県食中毒関連調査		不明	ND			astA 1/1				
不明		不明	NT			astA 1/5	DAEC 1/5			
不明		不明	NT			eae 1/5	astA 1/5			

	菌分離			RFBS24結果				
	1	2	3	1	2	3	4	5
Noro(-)				aggR 1/40	astA 1/40	S. aureus 1/40		

表11 使用菌株の*stx1*, *stx2*, *eae*遺伝子保有状況

遺伝子型	株数	血清型
<i>stx1</i>	5	O91:NM (2), O91:HUT (2), O115:H10 (1)
<i>stx2</i>	13	O8:NM (2), O8:H19 (2), O28ac:NM <sup>*c</sup> (1), O142:HUT (1), O168:HUT (1), OUT:NM (3), OUT:H11 (1), OUT:H21 (1), OUT:HUT (1)
<i>stx1, eae</i>	29	O26:NM (2), O26:H11 (11), O103:H2 (4), O111:NM (2), O111:H21 (1), O111:HUT (1), O119:HUT (1), O157:NM (3), O157:H7 (2), OUT:H2 (1), OUT:H16 (1)
<i>stx2, eae</i>	11	O63:H6 <sup>*f</sup> (2), O121:H19 (1), O145:NM (2), O145:H34 <sup>*f</sup> (1), O157:NM (1), O157:H7 (2), O153:NM <sup>*f</sup> (2)
<i>stx1, stx2</i>	3	O74:HUT (1), O128:H2 <sup>*d</sup> (2)
<i>stx1, stx2, eae</i>	25	O111:HUT (1), O121:H19 (1), O157:NM (6), O157:H7 (15), O157:H7 <sup>*c</sup> (1), O157:HUT(1)

() 内は当該遺伝子型・血清型の使用菌株数

\*c : *stx2c*遺伝子保有、\*d : *stx2d*遺伝子保有、\*f : *stx2f*遺伝子保有

表12 PCRによる遺伝子型とマルチプレックス リアルタイムPCRによる遺伝子型の比較

	multiplex real-time PCR					
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1, eae</i>	<i>stx2, eae</i>	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>
<i>stx1</i>	5					
<i>stx2</i>		13				
<i>stx1, eae</i>			29			
<i>stx2, eae</i>				11		
<i>stx1, stx2</i>					3	
<i>stx1, stx2, eae</i>						25

カラム内の数字は菌株数