

標的	プライマ 一終濃度 (nM)	プローブ 終濃度 (nM)	プローブ の蛍光ラ ベル
<i>Stx1</i>	600	200	FAM
<i>Stx2</i>	600	200	FAM
<i>eae</i>	1000	200	HEX
16Sr RNA	160	100	VIC

(2) 自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における triplex 反応系の各種試薬濃度での検出感度の検討

各検出試薬について、TaqMan Environmental MasterMix 2.0 を用い、下表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、 $10^{-4}$ - $10^{-7}$  希釈 DNA 液 5  $\mu$ l を加えて合計 30  $\mu$ l とした。増幅反応は、50°C2 分、95°C10 分、95°C15 秒・60°C1 分 45 サイクルに設定し、ABI7500、ABI Viia7 (アプライドバイオシステムズ ジャパン) および LightCycler 480 (LC480、ロシュ・ダイアグノスティックス) にて測定した。蛍光ラベルの設定は、ABI7500 および ABI Viia7 では FAM は FAM-None、HEX は VIC-None、Cy5 は Cy5-None とし、LC480 では FAM は Excitation 465nm および Emission 510nm、HEX は Excitation 533 nm および Emission 580 nm、Cy5 は Excitation 618 nm および Emission 660 nm とした。

標的	プライマ 一終濃度 (nM)	プローブ 終濃度 (nM)	プローブ の蛍光 ラベル
<i>Stx1</i>	120-600	50-200	FAM
<i>Stx2</i>	120-600	50-200	FAM
<i>eae</i>	1000	200	HEX
16Sr RNA	160	100	Cy5

(3) Simplex および duplex 反応系試作キットでのリアルタイム PCR 法における各種機器

による検出感度の検討

試作キット (タカラバイオ) を用い、下表および表 3 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、 $10^{-4}$ - $10^{-7}$  希釈 DNA 液 5  $\mu$ l を加えて合計 25  $\mu$ l とした。増幅反応は、ABI7500 では 95°C10 秒、95°C5 秒・55°C10 秒・72°C34 秒 45 サイクル、ABI Viia7 および LC480 では 95°C10 秒、95°C5 秒・55°C10 秒・72°C20 秒 45 サイクルに設定して測定した。蛍光ラベルの設定は、ABI7500 および Viia7 では FAM は FAM-None、ROX は ROX-None とし、LC480 では FAM は Excitation 498nm および Emission 580nm、ROX は Excitation 533 nm および Emission 610 nm とした。

反応系	標的	プローブの 蛍光ラベル
1	VT 遺伝子	FAM
	インターナル・ コントロール	ROX
2	<i>eae</i>	FAM

(4) 自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法における simplex 反応系の反応条件での検出感度の検討

各組合せについて、下表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、 $10^{-4}$ - $10^{-7}$  希釈 DNA 液 5  $\mu$ l を加えて合計 50  $\mu$ l とした。増幅反応は、*Ex Taq* では 94°C1 分・62°C1 分・72°C1 分を 40 サイクル、*Gflex* では 98°C10 秒・55 または 60°C15 秒・68°C30 秒を 40 サイクル、*PrimeSTAR* では 98°C10 秒・55 または 60°C15 秒・72°C30 秒を 40 サイクル、*TaqHot Start* では 98°C10 秒・60°C30 秒・72°C1 分を 40 サイクルに設定した。ただし、16SrRNA の検出での *ExTaq* については、95°C15 秒・60°C1 分を 45 サイクル、94°C1 分・55°C1 分・72°C1 分を 40 サイクル、94°C10 秒・55°C15 秒・72°C30 秒を 40 サイクルの設定した。

標的	プライマー 終濃度 (nM)	DNA ポリメラーゼ
<i>Stx1</i>	100	<i>ExTaq</i> *1
<i>Stx2</i>	100	
<i>eae</i>	100	
16Sr RNA	100	<i>ExTaq</i> 、 <i>Gflex</i> *2、 <i>PrimeSTAR</i> *3、 <i>Taq</i> <i>Hot Start</i> *4

\*1 *TaKaRa ExTaq* (タカラバイオ) \*2 *Tks Gflex DNA Polymerase* (タカラバイオ) \*3 *PrimeSTAR HS DNA Polymerase* (タカラバイオ) \*4 *TaKaRa Taq Hot Start Version* (タカラバイオ)

(5) 自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法における triplex 反応系での反応条件での検出感度の検討

各組合せについて、下表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、 $10^{-4}$ – $10^{-7}$  希釈 DNA 液 5  $\mu$ l を加えて合計 50  $\mu$ l とした。増幅反応は、*Gflex* では 98°C10 秒・60°C15 秒・68°C30 秒を 40 サイクル、*Taq Hot Start* では 98°C10 秒・60°C30 秒・72°C1 分を 40 サイクルに設定して行った。

標的	プライマー 終濃度 (nM)	DNA ポリメラーゼ
<i>Stx1</i>	各 100	<i>Gflex</i> 、 <i>Taq Hot Start</i>
<i>Stx2</i>		
<i>eae</i>		
16Sr RNA		

(6) VT 遺伝子およびインターナル・コントロールを検出対象とする Duplex 反応系試作キットでのコンベンショナル PCR 法における Control template 添加量の検討

0-157 (ペロ毒素遺伝子) PCR Screening Set (RR100、タカラバイオ) を用い、下表および添付文書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、 $10^{-4}$ – $10^{-7}$  希釈 DNA 液 5  $\mu$ l

を加えて合計 50  $\mu$ l とした。Control Template EC3 添加量の設定については、0-157 & ペロ毒素遺伝子同時検出キット (RR107A、タカラバイオ) の技術情報を参考にした。増幅反応は、94°C1 分・55°C1 分・72°C1 分を 35 サイクルとして行った。

標的	1 反応あたりの Control Template EC3 添加量 ( $\mu$ g)
<i>Stx</i> および インターナル・ コントロール	50
	25
	10
	5

2) 食品を用いた検討

本検討では、4 で  $10^2$ – $10^4$  cfu/ml 菌接種食品培養液から抽出した DNA 液を用い、繰り返し測定数 2 にて測定した。

(1) リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 法では自家調製試薬および試作キット (タカラバイオ) の 2 種類の試薬を用いた。自家調製試薬では、表 4 に従って反応液を調製し、増幅反応は 50°C2 分、95°C10 分、95°C15 秒・60°C1 分を 45 サイクルに設定して、ABI7500、ABI PRISM7900 (ABI7900、アプライド・バイオシステムズジャパン)、ABI Viia7、LC480、Thermal Cycler Dice Real Time System II (Dice II、Filter Unit (HEX/VIC) for Thermal Cycler Dice Real Time System および Filter Unit (Cy5) for Thermal Cycler Dice Real Time System を搭載、タカラバイオ) にて測定した。蛍光ラベルの設定は、ABI7500、ABI7900、ABI Viia7 では FAM-BHQ1 は FAM-None、HEX-BHQ1 は VIC-None とし、LC480 では FAM-BHQ1 は Excitation 465 nm および Emission 510 nm、HEX-BHQ1 は Excitation 533 nm および Emission 580 nm とし、Dice II では FAM-BHQ1 は FAM、HEX-BHQ1 は HEX とした。

市販キットでは、表5に従って反応液を調製し、増幅反応は、ABI7500では95℃10秒、95℃5秒・55℃10秒・72℃34秒を45サイクル、ABI7900では95℃10秒、95℃5秒・55℃10秒・72℃30秒を45サイクル、ABI Viiia7、LC480およびDice IIでは95℃10秒、95℃5秒・55℃10秒・72℃20秒を45サイクルに設定して測定した。蛍光ラベルの設定は、ABI7500、ABI7900およびABI Viiia7ではFAMはFAM-None、ROXはROX-Noneとし、LC480ではFAMはExcitation 498 nmおよびEmission 580 nm、ROXはExcitation 533 nmおよびEmission 610 nmとし、Dice IIではFAMはFAM、ROXはROXとした。

## (2) LAMP法

LAMP法ではインターナル・コントロールの検出についてのみの試作キット（栄研化学）を用いた。表6に示した試薬と試薬量に従って反応液を調製し、増幅反応は65℃60分、80℃2分とした。

## (3) コンベンショナルPCR法

コンベンショナルPCR法では自家調製試薬および試作キット（市販キットのControl Template EC3添加量を調製）の2種類の試薬を用いた。自家調製試薬では、表7に従って反応液を調製し、増幅反応は98℃10秒・60℃15秒・68℃30秒を40サイクルとした。コンベンショナルPCR法の試作キットでは、表8に従って反応液を調製し、増幅反応は94℃1分・55℃1分・72℃1分を40サイクル、72℃10分とした。

## 7. 各検討の機器・解析条件

### 1) 菌液を用いた検討

#### (1) リアルタイムPCR法

<機器と試薬の組み合わせと解析方法>

機器	試薬		
	自家調製		試作キット
	Simplex	Triplex	
ABI7500	Auto解析	Auto解析	Auto解析
ABI Viiia7		Auto解析	Auto解析
LC480		Auto解析	Auto解析

### (2) コンベンショナルPCR法

<各試薬の電気泳動条件>

条件	試薬		
	自家調製		市販キット
	Simplex	DuplexおよびTriplex	
ゲル濃度*、100V設定での電気泳動時間	2%ゲルで55または70分、3%ゲルで40-55分、4%ゲルで70分	3%ゲルで40または50分	3%ゲルで30-50分

\* アガロースゲルにはNuSieve 3:1 (Lonza)を用いた。

### 2) 食品を用いた検討

#### (1) リアルタイムPCR法

<機器と試薬の組み合わせと解析方法>

機器	試薬	
	自家調製	試作キット
ABI7500	Auto解析	Auto解析、Manual解析
ABI7900	Auto解析	Auto解析、Manual解析
ABI Viiia7	Auto解析	Auto解析、Manual解析
LC480	Auto解析	Auto解析、Manual解析
Dice II	Auto解析	Auto解析

## (2) LAMP 法

Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-320C または EXIA、栄研化学) にて検出した。

## (3) コンベンショナル PCR 法

<各試薬の電気泳動条件>

条件	試薬	
	自家調製	試作キット
アガロースゲル濃度*、100V 設定での電気泳動時間	3%ゲルで 40 分	3%ゲルで 30 分

\* アガロースゲルには NuSieve 3:1 (Lonza) を用いた。

## C. 研究結果

はじめに菌液を供試して、リアルタイム PCR 法およびコンベンショナル PCR 法を検討した。

自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における simplex 反応系の検出感度の確認 (表 9) では、標的遺伝子とする *stx1*、*stx2*、*eae*、16SrRNA のいずれもが  $10^3$  cfu/ml 以上と優れた結果であった。

自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における triplex 反応系の各種試薬濃度での検出感度の検討 (表 10) では、まず主な機器である ABI7500 で 3 種類の *stx1&2* のプローブ濃度 (200 nM、100 nM および 50 nM) を検討した。*stx1&2* の検出は、200 nM では  $10^2$  cfu/ml まで全株で検出され、100 および 50 nM では  $10^3$  cfu/ml までに全株で検出された。それら条件下での *eae* の検出はそれぞれ *stx1&2* 検出と同じ感度、16SrRNA の検出はすべての *stx1&2* プローブ濃度で  $10^2$  cfu/ml の感度であった。また、他機器として LC480 および ABI ViiA7 についても検討した。*stx1&2* プローブ濃度を 100

nM または 200 nM として反応した場合、どちらの濃度でも *stx1&2* および *eae* は  $10^3$  cfu/ml まで、16SrRNA は  $10^2$  cfu/ml まで全株で検出された。総合すると *stx1&2* プローブ濃度は 100 nM で十分な検出感度が得られた結果であった。

Simplex および duplex 反応系試作キットでのリアルタイム PCR 法における各種機器による検出感度の検討 (表 11) では、使用したすべての機種において duplex 検出系での VT 遺伝子およびインターナル・コントロール、simplex 検出系での *eae* は、 $10^3$  cfu/ml まで全株で検出された。

自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法における simplex 反応系の反応条件での検出感度の検討 (表 12) では、検出感度を上昇させる DNA ポリメラーゼの種類を検討した。*ExTaq* を使用した *stx* 検出では、*stx1* および *stx2* とともに  $10^4$  cfu/ml まで全株で検出された。*ExTaq* を使用した *eae* 検出では、 $10^5$  cfu/ml で全株から検出されたが、 $10^4$  cfu/ml では 3 株中 2 株しか検出されなかった。16SrRNA 検出では、*ExTaq* を使用して条件検討を行ったがいずれも  $10^5$  cfu/ml でも全株から検出されることはなかった。このため、他種の DNA ポリメラーゼ (Gflex、PrimeSTAR、*Taq* Hot Start version) を供試し条件を検討した結果、 $10^3$  または  $10^2$  cfu/ml まで全株で検出された。

自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法における triplex 反応系での反応条件での検出感度の検討 (表 13) では、Gflex および *Taq* Hot Start Version の 2 種類の DNA ポリメラーゼを用いて反応条件を検討した。Gflex では、*stx1*、*stx2*、*eae* および 16SrRNA は  $10^3$  cfu/ml まで全株で検出され、*eae* および 16SrRNA は  $10^2$  cfu/ml でも全株で検出された。*Taq* Hot Start version では、*stx1*、*stx2* および *eae*

は  $10^4$  cfu/ml まで全株で検出されたが、16SrRNA は  $10^4$  cfu/ml では 3 株中 2 株しか検出されなかった。このため、Gflex のみで良好な検出結果であった。

コンベンショナル PCR 法では、VT 遺伝子およびインターナル・コントロールを検出対象とする duplex 反応系試作キット (*eae* は検出対象外) でのコンベンショナル PCR 法における control template 添加量の検討 (表 14) を行った。既存のキットを基礎に添加する control template の濃度を減少させて VT 遺伝子およびインターナル・コントロール検出感度を確認した結果、VT 遺伝子の検出を妨げない control template の量は検討した中での最小量である 1 反応あたり 5  $\mu$ g であった。

*stx* および *eae* の市販食品での検出率についても検討した。その結果、37 検体中 3 検体が *stx* 陽性、6 検体が *eae* 陽性であり、そのうち 1 検体が両方とも陽性であった (表 15)。このことから両方を測定すると 1 検体が第 2 次スクリーニングに該当し、*stx* のみの測定では 3 検体が該当することが判明した。

上記の菌液での検討で得られた優れる条件をもとに、牛レバー、牛挽肉、豚スライス、チーズ、レタス、カイワレダイコン、トマトおよびホウレンソウの 8 種類の食品を選定し、自家調製試薬および試作キットでのリアルタイム PCR 法、試作キットでの LAMP 法、自家調製試薬および試作キットでのコンベンショナル PCR 法にて感度を検討した。なお、これ以後は、*eae* を検出対象遺伝子から除いて検出感度の検討を実施した。

自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系の各種機器による食品中での検出感度の検討 (表 16) では、反応数を各条件 2 として実施し、*stx* および 16SrRNA とともにいずれの食品でも、またいずれの機器でも

$10^2$  または  $10^3$  cfu/ml で 2 反応ともに検出された。

Duplex 反応系試作キットでのリアルタイム PCR 法における各種機器による食品中での検出感度の検討 (表 17) では、*stx* はいずれの機種においても auto または manual 解析によって  $10^4$ – $10^2$  cfu/ml で検出された。インターナル・コントロールはいずれの機種においても auto または manual 解析によって  $10^2$  cfu/ml で検出された。

試作キットでの LAMP 法における食品中でのインターナル・コントロールの検出感度の検討 (表 18) では、いずれの食品においても  $10^2$  cfu/ml で検出された。

自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法における duplex 反応系の食品中での検出感度の検討 (表 19) では、菌液を供試して検討し優れていた条件にて試験した (Gflex)。*Stx1* の検出感度は牛レバーで  $10^5$  cfu/ml、カイワレダイコンでは検出されなかった。また、*stx2* の検出感度はカイワレダイコンおよびホウレンソウで  $10^5$  cfu/ml であった。16SrRNA は、牛レバーおよびカイワレダイコンでは検出されなかった。

Duplex 反応系試作キットでのコンベンショナル PCR 法における食品中での検出感度の検討 (表 20) では、*stx* は半数以上の食品で検出感度が  $10^4$  cfu/ml であり、他食品では  $10^2$  または  $10^3$  cfu/ml であった。インターナル・コントロールは全食品で検出感度は  $10^2$  cfu/ml であった。

#### 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、LAMP 法およびリアルタイム PCR 法が設定されている。昨年度は通知法での VT 遺伝子ス

クリーニング法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（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」平成 24 年 12 月 17 日）が通知された。

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、前回の通知においては、経済性を高めることを目的に検出感度を確認して反応系の縮小化を行った。本研究では、さらに経済性を高めることを考え、プローブ濃度を低減することを検討した。その結果、現通知法における *stxI&2* 検出用プローブの濃度（200 nM）を半減した場合、若干検出感度が下がるものの高い検出感度を示したことから、プローブ濃度を半減し、経済性を高めることが可能であることが明らかになった。

インターナル・コントロールを設定した自家調製試薬またはキットのリアルタイム PCR 法、LAMP 法およびコンベンショナル PCR 法を検討した。諸外国でもインターナル・コントロールが設定されており、食品成分による PCR 反応阻害の発生による *stx* 陰性でないことを確認することができ、試験結果の判定に重要となる。本研究では、検討したリアルタイム PCR 法、LAMP 法およびコンベンショナル PCR 法のほとんどで優れた感度での反応が確認されたが、自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法では食品培養液において牛レバーとカイワレダイコンで検出されなかった。いずれ

の検体においても *stx* が  $10^5$  cfu/ml の検出感度を示しており、食品培養液中の成分による PCR 反応抑制があったことが考えられた。自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法以外では、*stx* の検出よりもインターナル・コントロールのほうが検出感度の低いことが認められないため、*stx* とインターナル・コントロールとして選定した 16SrRNA のプライマーなどの組み合わせが duplex コンベンショナル PCR 法の設定には適切ではないことが考えられる。他プライマーなどの選定や duplex 反応条件のさらなる検討が必要である。また、試作キットは市販品に添付されている control template の濃度を下げて *stx* の検出感度に影響しない濃度を確認するために菌液を供試して検討した。最終的に 5  $\mu$ g を 1 反応に加えたものでも十分に検出された。食品培養液での検討では control template の濃度をさらに下げて試験したところ、食品培養液による抑制なく十分に検出された。

菌液を供試して検討した際には、自家調製試薬にて *stx*、*eae* および 16SrRNA を検出対象としてリアルタイム PCR 法および自家調製試薬でのコンベンショナル PCR 法の条件検討を行い、優れた方法が判明した。次に、食品培養液での検出感度を検討した。しかし、この際に *stx* および *eae* の市販食品での検出率についても検討した。その結果、37 検体中 3 検体が *stx* 陽性、6 検体が *eae* 陽性であり、そのうち 1 検体が両方とも陽性であった。このことから両方を測定すると 1 検体が第 2 次スクリーニングに該当し、*stx* のみの測定では 3 検体が該当、することが判明した。また、研究分担者（西川禎一教授）の調査結果では、食品 333 検体中、2 検体（0.6%）が *stxI* および *stx2* 陽性、25 検体（7.5%）が *eae* 陽性であった。検出対象の血清群を菌の性質から考えると、

*stx* および *eae* が食品培養液での遺伝子スクリーニングに含まれている方が検出効率の良いように思えるが、食品中に *stx* および *eae* の一方だけ陽性の菌も含まれることがあり、合わさって両遺伝子が陽性になる場合も考えられる。第2次スクリーニングで2検体が余分に試験されるか、37検体が *eae* の試験をするかとの判断をすると、第1次スクリーニングの対象遺伝子がひとつ多いことによる機器の限定、反応試薬のコストの上昇などを鑑みると、*eae* を含まない方が合理的であると考えられた。このため、以後の食品培養液での検出感度の検討は *eae* を検出対象から除いて実施した。

以上のように、第1次スクリーニングとしての *stx* 検出をインターナル・コントロールを含めた系として検討し、検出感度が優れかつできるだけ経済性に優れた検出条件を確認した。また、*stx* および *eae* の市販食品からの検出率を鑑み、*eae* は対象遺伝子に含めないことにし、使用機器の広範化および経済性のさらなる改善をはかった。

#### E. 結論

本研究では、*stx* の食品での検査方法をインターナル・コントロールを含め正常な試験反応の確認が行える系を検討して確立した。自家調製試薬および試作キットでのリアルタイムPCR法およびコンベンショナルPCR法、試作キットでのLAMP法における反応条件(DNAポリメラーゼ種類、反応温度や時間など)、使用機器での検出感度の検討を行った。はじめに菌液を、次いで食品培養液を供試して試験した。その結果、自家調製試薬および試作キットでのリアルタイムPCR法におけるduplex反応系、試作キットでのLAMP法、試作キットでのコンベンショナルPCR法におけるduplex

反応系において食品での検出感度の良好な条件が明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kobayashi, N., Lee, K., Yamazaki, A., Saito, S., Furukawa, I., Kono, T., Maeda, E., Isobe, J., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 51: 4022-4028, 2013.

Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Kamata, K., Miyahara, M., Takatori, K., Onoue, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. Prevalence of main foodborne pathogens in retail food under the National Food Surveillance System in Japan. Food Addit. Contam. Part A, Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 30(8): 1450-1458, 2013.

工藤由起子、小田みどり. 第2節 生肉のリスク 原因菌と食中毒事件. 第3章 生食のリスクとは. 一色賢司 監修 生食のおいしさとリスク.p. 329-337. (株) エヌ・ティー・エス 東京

工藤由起子. 食品の腸管出血性大腸菌検査法の変遷と今後. 食品衛生研究. Vol. 63, p25-34, 2013.

##### 2. 学会発表

Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Konishi, N., Mori, T., Nakagawa, H., Iizuka, S., Taga, K., Kai, A. Universal enrichment followed by real-time PCR assay and

plating for Shiga toxin-producing Escherichia coli O26, O111 and O157 in food. 127<sup>th</sup> AOAC Annual meeting and exposition. Aug. 2013. Chicago.

小林直樹、齊藤志保子、古川一郎、河野智美、青木佳代、前田詠里子、江藤良樹、堀川和美、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の病原因子保有パターンと臨床症状の対応についての解析. 第105回日本食品衛生学会. 平成25年.

小林直樹、前田詠里子、河野智美、齊藤志保子、古川一郎、青木佳代、江藤良樹、堀川和美、小西良子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の高病原性の指標となる病原因子についての解析. 第17回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 平成25年7月.

小西典子、森哲也、中川弘、大塚佳代子、小林直樹、長尾清香、甲斐明美、工藤由起子. 複数のリアルタイムPCR機器を用いた食品培養液中VT遺伝子検出感度の検討. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 平成25年10月.

大塚佳代子、中川弘、森哲也、小西典子、甲斐明美、小林直樹、長尾清香、工藤由起子. 食品からのベロ毒素遺伝子検出に使用するリアルタイムPCR機器及び試薬の組み合わせと反応条件の検討. 第106回日本食品衛生学会学術講演会. 平成25年11月.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表1 リアルタイムPCR法に用いたプライマーおよびプローブ配列

参照法	遺伝子	プライマーおよび プローブ名	配列
Nielsen らの報告	<i>stx1</i>	プライマー	
		VT1-F	5' GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C 3'
		VT1-R	5' CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT 3'
		プローブ	
		VT1-P	5' CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A 3'
	<i>stx2</i>	プライマー	
		VT2-F	5' GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA 3'
		VT2-R	5' GAA AGT ATT TGT TGC CGT ATT AAC GA 3'
		プローブ	
		VT2-P	5' ATG TCT ATC AGG CGC GTT TTG ACC ATC TT 3'
USDA法	<i>eae</i>	プライマー	
		Eae F	5' CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA 3'
		EaeR	5' CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTM 3'
		プローブ	
		Eae-P	5' ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC 3'
16SrRNA	プライマー	16SRna-F	5' CCT CTT GCC ATC GGA TGT G 3'
		16SRna-R	5' GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC 3'
		プローブ	
		16SrRNA-P	5' GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC 3'

表2 コンベンショナルPCR法で用いたプライマー配列

参照法	遺伝子	プライマー名	配列
EFSA法	<i>stx1</i>	stx1F-EFSAPCR	5' ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC 3'
		stx1R-EFSAPCR	5' AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC 3'
	<i>stx2</i>	stx2F-EFSAPCR	5' GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC 3'
		stx2R-EFSAPCR	5' TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G 3'
	<i>eae</i>	eaeAF-EFSAPCR	5' GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC 3'
		eaeAR-EFSAPCR	5' CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG 3'
USDA法	16SrRNA	16SRna-F	5' CCT CTT GCC ATC GGA TGT G 3'
		16SRna-R	5' GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC 3'

表3 Simplexおよびduplex反応系試作キットでのリアルタイムPCR法における  
各種機器による検出感度の検討での反応試薬

試薬	蛍光ラベル	1反応(μl)	1反応(μl)
2×Cycleleave Reaction Mixture			12.5
各検出用のPrimer/Probe Mix			5
[反応系1]VT/インターナル・コントロール検出のPrimer/Probe Mix			
VT Primer/Probe Mix	FAM : VT ROX : IC	5	
[反応系2] <i>ea</i> e 検出のPrimer/Probe Mix			
<i>ea</i> e Primer/Probe Mix	FAM : <i>ea</i> e	5	
D. W.			2.5
Template DNA			5
Total			25

表4 自家調製試薬でのリアルタイムPCR法におけるduplex反応系の  
各種機器による食品中での検出感度の検討での検出感度の検討

試薬 (濃度)	蛍光ラベル	1反応(μl)	終濃度 (nM)
TaqMan Environmental Master Mix 2.0		15	
VT1-F (50 μM)		0.36	600
VT1-R (50 μM)		0.36	600
VT2-F (50 μM)		0.36	600
VT2-R (50 μM)		0.36	600
16SRna-F (20 μM)		0.24	160
16SRna-R (20 μM)		0.24	160
VT1-P (5 μM)	FAM-BHQ1	0.6	100
VT2-P (5 μM)	FAM-BHQ1	0.6	100
16SrRNA-P (5 μM)	HEX-BHQ1	0.6	100
D. W.		6.28	
Template DNA		5	
Total		30	

表5 Duplex反応系試作キットでのリアルタイムPCR法における各種機器による  
食品中での検出感度の検討での反応試薬

試薬	蛍光ラベル	1反応(μl)
2×Cycleleave Reaction Mixture		12.5
VT Primer/Probe Mix	FAM : VT ROX : IC	5
D. W.		2.5
Template DNA		5
Total		25

表6 試作キットでのLAMP法における食品中でのインターナル・コントロールの  
検出感度の検討での反応試薬

試薬	1反応(μl)
マスターミックス	
Reaction MIX. eCT (RM eCT)	20
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1
	上記のうち
	20
Template DNA	5
Total	25

表7 自家調製試薬でのコンベンショナルPCR法におけるduplex反応系の  
食品中での検出感度の検討での反応試薬

試薬 (濃度)	1反応(μl)	終濃度(nM)
2x Gflex PCR Buffer	25	
stx1F-EFSAPCR(10 μM)	0.5	100
stx1R-EFSAPCR(10 μM)	0.5	100
stx2F-EFSAPCR(10 μM)	0.5	100
stx2R-EFSAPCR(10 μM)	0.5	100
16SRna-F (20 μM)	0.25	100
16SRna-R (20 μM)	0.25	100
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/μl)	1	
D. W.	16.5	
Template DNA	5	
Total	50	

増幅DNAサイズ(bp) : *stx1*は180、*stx2*は255、16SrRNAは99。

表8 Duplex反応系試作キットでのコンベンショナルPCR法における  
食品中での検出感度の検討

試薬 (濃度)	1反応(μl)
10×Ex Taq Buffer	5
dNTP Mixture (各2.5 mM)	4
EVC-1/2(VT) Primer Mix (19 pmol/μl)	0.5
Control Template EC3 (10 fg/μl)	5
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/μl)	0.25
D. W.	30.25
Template DNA	5
Total	50

増幅DNAサイズ(bp) : VTは171、ECは685。

表9 自家調製試薬でのリアルタイムPCR法におけるsimplex反応系の検出感度の確認

標的遺伝子	供試菌株数	菌数レベル (cfu/ml)			
		10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
<i>stx1</i>	1	1/1*	1/1	1/1	1/1
<i>stx2</i>	1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>eae</i>	2	2/2	2/2	2/2	1/2
16SrRNA	3	3/3	3/3	3/3	3/3

\* 陽性菌株数/総菌株数

表10 自家調製試薬でのリアルタイムPCR法におけるtriplex反応系の各種試薬濃度での検出感度の検討

機種	<i>stx1&amp;2</i> プローブ終濃度 (nM)	標的遺伝子	供試菌株数	菌数レベル (cfu/ml)			
				10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
ABI 7500	200	<i>stx1&amp;2</i>	3	3/3*	3/3	3/3	3/3
		<i>eae</i>	3	3/3	3/3	3/3	3/3
		16SrRNA	3	3/3	3/3	3/3	3/3
	100	<i>stx1&amp;2</i>	2	2/2	2/2	2/2	1/2
		<i>eae</i>	2	2/2	2/2	2/2	1/2
		16SrRNA	2	2/2	2/2	2/2	2/2
	50	<i>stx1&amp;2</i>	2	2/2	2/2	2/2	0/2
		<i>eae</i>	2	2/2	2/2	2/2	1/2
		16SrRNA	2	2/2	2/2	2/2	2/2
ABI Viia7	100	<i>stx1&amp;2</i>	2	2/2	2/2	2/2	1/2
		<i>eae</i>	2	2/2	2/2	2/2	1/2
		16SrRNA	2	2/2	2/2	2/2	2/2
LC 480	200	<i>stx1&amp;2</i>	4	4/4	4/4	4/4	1/4
		<i>eae</i>	4	4/4	4/4	4/4	3/4
		16SrRNA	4	4/4	4/4	4/4	4/4
	100	<i>stx1&amp;2</i>	2	2/2	2/2	2/2	1/2
		<i>eae</i>	2	2/2	2/2	2/2	2/2
		16SrRNA	2	2/2	2/2	2/2	2/2

\* 陽性菌株数/総菌株数

表11 Simplexおよびduplex反応系試作キットでのリアルタイムPCR法における各種機器による検出感度の検討

機種	反応系	標的遺伝子	供試菌株数	菌数レベル (cfu/ml)			
				10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
ABI7500	1	VT	1	1/1*	1/1	1/1	1/1
		インターナル・コントロール	1	1/1	1/1	1/1	1/1
	2	<i>eae</i>	1	1/1	1/1	1/1	1/1
ABIViia7	1	VT	2	2/2	2/2	2/2	1/2
		インターナル・コントロール	2	2/2	2/2	2/2	2/2
	2	<i>eae</i>	2	2/2	2/2	2/2	2/2
LC480	1	VT	1	1/1	1/1	1/1	1/1
		インターナル・コントロール	1	1/1	1/1	1/1	1/1
	2	<i>eae</i>	1	1/1	1/1	1/1	1/1

\* 陽性菌株数/総菌株数

表12 自家調製試薬でのコンベンショナルPCR法におけるsimplex反応系の反応条件での検出感度の検討

標的遺伝子	DNAポリメラーゼ*1	供試菌株数	菌数レベル (cfu/ml)			
			10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
<i>stx1</i>	<i>Ex Taq</i> 1	2	2/2**2	2/2	2/2	0/2
<i>stx2</i>	<i>Ex Taq</i> 1	2	2/2	2/2	1/2	0/2
<i>eae</i>	<i>Ex Taq</i> 1	3	3/3	2/3	2/3	0/3
16SrRNA	<i>Ex Taq</i> 1	3	1/3	0/3	0/3	0/3
	<i>Ex Taq</i> 2	3	1/3	0/3	0/3	0/3
	<i>Ex Taq</i> 3	3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>Ex Taq</i> 4	1	0/1	0/1	0/1	0/1
	Gflex 1	1	1/1	1/1	1/1	1/1
	Gflex 2	1	1/1	1/1	1/1	1/1
	PrimeSTAR 1	1	1/1	1/1	0/1	0/1
	PrimeSTAR 2	1	1/1	1/1	1/1	1/1
	<i>Taq Hot Start</i>	2	2/2	2/2	2/2	0/2

\*1 各DNAポリメラーゼを用いた反応条件：*ExTaq* 1；94°C1分・62°C1分・72°C1分を40サイクル、*ExTaq* 2；95°C15秒・60°C1分を45サイクル、*ExTaq* 3；94°C1分・55°C1分・72°C1分を40サイクル、*ExTaq* 4；94°C10秒・55°C15秒・72°C30秒を40サイクル、Gflex 1；98°C10秒・55°C15秒・68°C30秒を40サイクル、Gflex 2；98°C10秒・60°C15秒・68°C30秒を40サイクル、PrimeSTAR 1；98°C10秒・55°C15秒・72°C30秒を40サイクル、PrimeSTAR 2；98°C10秒・60°C15秒・72°C30秒を40サイクル、*Taq HotStart*；98°C10秒・60°C30秒・72°C1分を40サイクル

\*2 陽性反応数/総反応数

表13 自家調製試薬でのコンベンショナルPCR法におけるtriplex反応系での反応条件での検出感度の検討

DNA ポリメラーゼ	標的 遺伝子	供試 菌株数	菌数レベル (cfu/ml)			
			10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
Gflex	<i>stx1</i>	2	2/2*	2/2	2/2	1/2
	<i>stx2</i>	2	2/2	2/2	2/2	0/2
	<i>eae</i>	3	3/3	3/3	3/3	3/3
	16SrRNA	3	3/3	3/3	3/3	3/3
Taq Hot Start	<i>stx1</i>	2	2/2	2/2	0/2	0/2
	<i>stx2</i>	2	2/2	2/2	2/2	1/2
	<i>eae</i>	3	3/3	3/3	3/3	0/3
	16SrRNA	3	3/3	2/3	1/3	0/3

\* 陽性反応数/総反応数

表14 VTおよびICを検出対象とするduplex反応系試作キットでのコンベンショナルPCR法におけるControl template添加量の検討

Control template 添加量 (μg)	標的 遺伝子	供試 菌株数	菌数レベル (cfu/ml)			
			10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
50	VT	3	1/3**	0/3	0/3	0/3
	インターナル・ コントロール	3	3/3	3/3	3/3	3/3
25	VT	1	1/1	1/1	0/1	0/1
	インターナル・ コントロール	1	1/1	1/1	1/1	1/1
10	VT	1	1/1	1/1	0/1	0/1
	インターナル・ コントロール	1	1/1	1/1	1/1	1/1
5	VT	1	1/1	1/1	0/1	0/1
	インターナル・ コントロール	1	1/1	1/1	1/1	1/1

\*\* 陽性菌株数/総菌株数

表15 市販食品での*stx*および*eae*の検出状況

食品	<i>stx</i> 陽性	<i>eae</i> 陽性
肉	2/19 (10.5 %)*	3/19 (15.8 %)
牛レバー	2/10 (20 %)	2/10 (20 %)
豚スライス	0/6	1/6 (16.7 %)
野菜	1/15 (6.7 %)	2/15 (13.3 %)
ホウレンソウ	0/3	1/3 (33.3 %)
カイワレダイコン	1/4 (25 %)	1/4 (25 %)
チーズ	0/3	1/3 (33.3 %)
合計	3/37 (8.1 %)	6/37 (16.2 %)
<i>stx</i> のみ陽性	2/37 (5.4 %)	-
<i>eae</i> のみ陽性	-	5/37 (13.5 %)
両方陽性	1/37 (2.7 %)**	1/37 (2.7 %)

表16 自家調製試薬でのリアルタイムPCR法におけるduplex反応系の各種機器による食品中での検出感度の検討

食品	Stx					16SrRNA				
	ABI 7500	ABI 7900	ABI Viia7	LC480	Dice II	ABI 7500	ABI 7900	ABI Viia7	LC480	Dice II
牛レバー	2*	3	2	3	2	2	2	2	2	2
牛挽肉	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2
豚スライス	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2
チーズ	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2
レタス	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2
カイワレダイコン	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2
トマト	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2
ハウレンソウ	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

\* 検出感度：2反応共に検出された最小菌濃度（対数 cfu/ml）

表17 Duplex反応系試作キットでのリアルタイムPCR法における各種機器による食品中での検出感度の検討

食品	Stx										インターナル・コントロール								
	ABI 7500		ABI 7900		ABI Viia7		LC 480		Dice II	ABI 7500		ABI 7900		ABI Viia7		LC 480		Dice II	
	A <sup>*1</sup>	M <sup>*2</sup>	A	M	A	M	A	M	A	A	M	A	M	A	M	A	M	A	
牛レバー	4 <sup>*3</sup>	4	2	2	3	3	3	4	3	2	2	2	2	2	2	2	NT	2	
牛挽肉	ND	2	2	2	2	NT	2	2	2	2	2	ND	2	2	NT	2	2	2	
豚スライス	2	2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	4	2	2	2	2	NT	2	
チーズ	ND	2	2	2	2	NT	3	2	2	2	2	2	2	2	NT	2	2	2	
レタス	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	NT	2	
カイワレダイコン	ND	2	2	2	2	NT	2	2	2	2	2	4	2	2	NT	2	2	2	
トマト	2	3	3	3	4	4	3	3	3	2	2	3	2	2	2	2	NT	2	
ハウレンソウ	ND	2	ND	2	2	NT	2	2	2	2	2	2	2	2	NT	2	2	2	

ND：陰性

NT：試験を実施しなかった

\*1 Auto解析

\*2 Manual解析（詳細は印刷範囲外）

\*3 検出感度：2反応共に検出された最小菌濃度（対数 cfu/ml）

表18 試作キットでのLAMP法における食品中での  
インターナル・コントロールの検出感度の検討

食品	インターナル・コントロール
牛レバー	2*
牛挽肉	2
豚スライス	2
チーズ	2
レタス	2
カイワレダイコン	2
トマト	2
ホウレンソウ	2

\* 検出感度：2反応共に検出された最小菌濃度（対数 cfu/ml）

表19 自家調製試薬でのコンベンショナルPCR法におけるduplex反応系の  
食品中での検出感度の検討

食品	<i>Stx 1</i>	<i>Stx 2</i>	16SrRNA
牛レバー	5*	-	ND
牛挽肉	2	2	2
豚スライス	2	4	2
チーズ	4	3	2
レタス	-	3	2
カイワレダイコン	ND	5	ND
トマト	-	2	2
ホウレンソウ	-	5	2

ND：陰性

-：接種菌株が検査対象の*stx*を保有していない。

\* 検出感度：2反応共に検出された最小菌濃度（対数 cfu/ml）

表20 Duplex反応系試作キットでのコンベンショナルPCR法における食品中での  
検出感度の検討

食品	<i>Stx</i>	インターナル・コントロール
牛レバー	3*	2
牛挽肉	3	2
豚スライス	4	2
チーズ	4	2
レタス	4	2
カイワレダイコン	2	2
トマト	4	2
ホウレンソウ	4	2

\* 検出感度：2反応共に検出された最小菌濃度（対数 cfu/ml）

平成25年度 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）  
食中毒調査における食品中の病原大腸菌の統括的検査法の開発に関する研究  
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌の統括的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

多血清群でのO抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

研究要旨

腸管出血性大腸菌の多様なO血清群に対応した食品検査法を確立するために、昨年度の基礎検討にて選定した血清群O26、O103、O111、O121、O145 およびO157 特異的遺伝子を対象とした検出法（リアルタイムPCR法およびLAMP法）の具体的な条件を菌液および食品培養液を供試し検討した。菌液での検討では、経済性に優れる自家調製試薬を用いたリアルタイムPCR法において、試薬濃度、duplex反応系での検出対象遺伝子の組み合わせ、対応機器の種類を、検出感度が $10^4$ /ml以上であることや非特異的な蛍光検出がないことを視点にして検討した結果、適切なプローブ濃度、検出対象遺伝子の適切な組み合わせ、対応機器の種類を見いだした。また、triplex反応系での適切な検出対象遺伝子の組み合わせを見いだした。次に、前述の検討で決定した優れた方法について菌を接種した8種類の食品の培養液を供試して検出感度を確認したところ、自家調製試薬を用いたリアルタイムPCR法での反応はいずれの食品でも複数の機器で $10^4$ /ml以上の感度で検出されることが判明した。LAMP法では、いずれの食品においても6血清群を対象にした自家調製試薬およびO157検出キットにおいて $10^4$ /ml以上の感度で検出されることが判明した。

研究協力者

大塚佳代子

埼玉県衛生研究所

小西典子、甲斐明美

東京都健康安全研究センター

森 哲也

財団法人 東京顕微鏡院

中川 弘

株式会社 BML フード・サイエンス

上田泰史、原田 誠

神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

小林直樹、長尾清香

国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症では血清群O157が主要であるが、他の多様な血清群による患者の発生が知られており、汚染食品の調査や汚染の制御が日本を含め世界的に

重要な課題となっている。諸外国では血清群O157に加え、感染の多い血清群4-6種類を対象にした食品または牛肉からの検査法が確立されており、日本でも独自に主要な血清群を決定し、食品検査法を確立する

必要がある。そこで、昨年度の研究にて日本での食品検査法の対象を血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 とすることとし、今年度はリアルタイム PCR 法および loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法について O 抗原遺伝子を対象とした検出法を検討することにした。コンベンショナル PCR 法はアガロースゲル電気泳動法による産物の大きさを確認する必要がある、リアルタイム PCR 法および LAMP 法に比べて判定までに時間を要する。O 抗原遺伝子の検出は Vero toxin (VT) 遺伝子 (または志賀毒素遺伝子 *stx*) 検出法の後に行なわれ、両方が陽性であれば当日中に分離培養を終えている必要がある。このため、遺伝子増幅反応と同時に結果がわかるリアルタイム PCR 法および LAMP 法を対象とした。リアルタイム PCR 法においては、昨年度に諸外国での方法を参照し、日本での通知法策定の基礎となる遺伝子検査について検討した。今年度はさらに duplex および triplex での検出系の組み合わせや対応機器の種類を、検出感度が  $10^4$ /ml 以上であることや非特異的な蛍光検出がないことを視点にして検討することとした。菌液での検討によって優れた検出系を決定し、食品培養液での検出感度などを確認した。諸外国での方法を参照し、食品培養液からまずは VT 遺伝子または *stx* など病原因子遺伝子を遺伝子スクリーニングとして検出し、陽性検体については O 抗原遺伝子による検出を行う流れを想定して検出法を確立したい。

## B. 研究方法

### 1. 菌株および培養

菌液を用いた検討では、血清群 026 (VT1 陽性株) 2 株、血清群 0103 (VT1 陽性株) 2 株、血清群 0111 (VT1&2 陽性株) 2 株、血清群 0121 (VT2 陽性株) 2 株、血清群 0145 (VT1 陽性株) 2 株、血清群 0157 (VT1 または VT2 陽性株) 2 株を試験に供試した。食品を用いた検討では、これら 6 血清群から 1 株ずつに血清群 0157 (VT 陽性株) 4 株を加えて試験に供試した。

菌株をトリプトソイ・ブロス (TSB、ベクトン・ディッキンソン) 10 ml にて  $37^{\circ}\text{C}$  で 18 時間培養し (約  $10^9$  cfu/ml)、試験に用いた。なお、接種菌液の菌濃度測定のために、PBS (ダルベッコ PBS (-)、日水製薬) にて 10 倍階段希釈して作製した  $10^{-6}$  希釈菌液 (約  $10^3$  cfu/ml) 0.1ml を 5 枚のトリプトソイ寒天培地 (TSA、ベクトン・ディッキンソン) に塗抹し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 18-24 時間培養後に生育したコロニー数から接種菌数を算出した。

## 2. 食品検体および増菌培養

### 1) 食品検体および増菌培養

小売店で購入した検体 (牛挽肉、牛レバー、豚スライス、ヤギ・ナチュラルチーズ、レタス、カイワレダイコン、トマト、ホウレンソウ) 25 g をストマッカー袋に入れ、室温程度の mEC 培地 (日水製薬) 225 ml をそれぞれ加え、1 分間のストマッカー処理を行い、 $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$  で  $22 \pm 2$  時間培養した。

### 2) 食品検体の一般生菌数および大腸菌群数の計測

検体の一般生菌数および大腸菌群数を計測するために、検体 10 g をストマッカー袋に入れ、PBS 90 ml を加え 1 分間ストマッカー処理したもの ( $10^{-1}$  希釈液) を PBS 9 ml または 4.5 ml で 10 倍希釈して  $10^{-2}$ - $10^{-6}$

希釈液を調製した。各希釈液 0.1 ml を標準寒天培地（日水製薬）に塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$  で 24–48 時間培養した。同時に各希釈液 1 ml をシャーレに分注し、デソキシコレート寒天培地（パールコア デスオキシコレート寒天培地、栄研化学）で混釈、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$  で 24–48 時間した。培養後の標準寒天培地およびデソキシコレート寒天培地のコロニー数を計測し、検体 1 g あたりの生菌数および大腸菌群数を算出した。

### 3) 食品検体培養液の 0 抗原特異的遺伝子の陰性確認

2 の 1) の検体培養液 0.1 ml からアルカリ熱抽出（プロトコルは後述）を実施し、各 0 抗原特異的遺伝子が陰性であることを確認した。

### 3. 菌接種食品培養液の作製

1 の菌液 0.1 ml を、PBS 0.9 ml（菌液 1 ml と PSB 9 ml でも可）で  $10^{-6}$  まで 10 倍階段希釈した（約  $10^3$  cfu/ml）。この各血清群 1 株の  $10^{-2}$  希釈菌液 0.1 ml（合計 0.6 ml）を、検体培養液 9.4 ml（合計 10 ml）に接種した（約  $10^5$  cfu/ml）。同様にして、各血清群の  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  希釈菌液 0.1 ml（合計 0.6 ml）をそれぞれ検体培養液 9.4 ml に接種し（約  $10^2$ – $10^4$  cfu/ml）、アルカリ熱抽出法に供試した。

### 4. アルカリ熱抽出法

菌液を用いた検討では 1 の 6 血清群各 2 株の菌液から、食品を用いた検討では 3 で調製した  $10^2$ – $10^4$  cfu/ml 菌接種食品培養液から、DNA を次のアルカリ熱抽出法にて抽出した。まず、各菌液または菌接種食品培養液 0.1 ml をマイクロチューブに採り、 $10,000 \times g$  10 分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50 mM NaOH 85  $\mu\text{l}$  を添加

して再浮遊させ、 $100^\circ\text{C}$  で 10 分間加熱した。冷却後、滅菌した 1M Tris-HCl (pH 7.0) 15  $\mu\text{l}$  を添加して中和し、 $10,000 \times g$  10 分間遠心した上清約 0.1 ml を新たなチューブに移し DNA 液とした。ただし、LAMP 法では、50 mM NaOH の代わりに、キット付属（栄研化学、試作品）のインターナル・コントロール用 DNA を添加した 50 mM NaOH (ExF) を用いてアルカリ熱抽出法を行った。

### 5. 自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法および LAMP 法におけるプライマーおよびプローブ

リアルタイム PCR 法では、0157 については欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority、EFSA) の方法を、0157 以外の 5 血清群については米国農務省 (United States Department of Agriculture、USDA) の方法を参照した（表 1）。プローブの蛍光ラベルについては後述した。LAMP 法では、Wang らの方法 (Appl. Environ. Microbiol. 78:2727–36、2012) を参照した（表 2）。

### 6. 組み合わせおよび感度の検討での反応試薬濃度および反応条件

#### 1) 菌液を用いた組み合わせおよび感度の検討

組み合わせの検討においては、4 で抽出した DNA 液のうち 6 血清群各 1 株を等量混合して作製した DNA 混合液を用いた。また、感度の検討には、4 で抽出した DNA 液および DNA 混合液を滅菌精製水 (D. W.) にて  $10^{-7}$  まで 10 倍階段希釈したうちの、 $10^{-4}$ – $10^{-7}$  希釈 DNA 液を用いた。

各検討では基本的には繰り返し測定数 1 にて測定した。

(1) 自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系の組み合わせの