

検討

6 血清群の反応系の組み合わせは、以下の 8 通りを設定した。

組み 合わ せ	反応系					
	1		2		3	
A	026	0111	0103	0145	0121	0157
B	026	0111	0103	0121	0145	0157
C	026	0157	0103	0145	0111	0121
D	026	0157	0103	0111	0121	0145
E	0111	0157	0121	0145	026	0103
F	0111	0157	0103	0121	026	0145
G	026	0103	0111	0121	0145	0157
H	026	0145	0103	0111	0121	0157

各組合せについて、TaqMan Environmental MasterMix 2.0 (アプライドバイオシステムズ ジャパン) 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、DNA 混合液 5 μ l を加えて合計 30 μ l とした。

標的	プライ マー終 濃度 (nM)	プロ ーブ終 濃度 (nM)	プロ ーブの 蛍 光ラ ベル
026	250	150	HEX
0103	250	200	FAM
0111	250	200	Cy5
0121	250	200	HEX
0145	250	200	Cy5
0157	200	200	FAM

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、ABI PRISM 7500 (ABI7500、アプライドバイオシステムズ ジャパン) にて測定した。蛍光ラベルの設定は、FAM は FAM-None、HEX は VIC-None、Cy5 は Cy5-None とした。

(2) 自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系の反応条件およ

び検出感度の検討

ア. 組み合わせ A、D、H の感度の確認

用いた DNA 液は、 10^{-4} - 10^{-7} 希釈 DNA 液とした。

イ. 組み合わせ D のプライマー・プローブ濃度およびプローブの蛍光ラベル種類の変化による感度の検討

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 μ l を加えて合計 30 μ l とした。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、ABI7500 にて測定した。蛍光ラベルの設定は、FAM は FAM-None、HEX は VIC-None、VIC は VIC-None とした。

反応系	標的	プライ マー終 濃度 (nM)	プロ ーブ終 濃度 (nM)	プロ ーブの 蛍 光ラ ベル
1	026	200- 250	50-200	HEXC または VIC
	0157	200	50-200	FAM
2	0103	200- 250	50-200	FAM
	0111	200- 250	50-200	HEXC または VIC
3	0121	200- 250	50-200	FAM
	0145	200- 250	50-200	HEXC または VIC

ウ. 組み合わせ D の各機種での感度の確認

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 μ l を加えて合計 30 μ l とした。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、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、ABI Viia7ではFAMはFAM-None、HEXはVIC-Noneとし、LC480ではFAMはExcitation 465nmおよびEmission 510nm、HEXはExcitation 533nmおよびEmission 580nmとした。

反応系	標的	プライマー終濃度 (nM)	プローブ終濃度 (nM)	プローブの蛍光ラベル
1	0157	200	50	FAM
	026	200	100	HEX
2	0103	200	50	FAM
	0111	200	100	HEX
3	0121	200	50	FAM
	0145	200	100	HEX

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

6 血清群の反応系の組み合わせは、以下の3通りを設定した。

反応系	組み合わせ		
	A	B	C
1	026	026	0121
	0111	0145	0145
	0157	0157	0157
2	0103	0103	026
	0121	0111	0103
	0145	0121	0111

各組合せについて、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、DNA混合液5μlを加えて合計30μlとした。

標的	プライマー終濃度 (nM)	プローブ終濃度 (nM)	プローブ蛍光ラベル
026	250	150	HEX
0103	250	200	FAM
0111	250	200	Cy5
0121	250	200	HEX
0145	250	200	Cy5
0157	200	200	FAM

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、ABI7500にて測定した。蛍光ラベルの設定は、FAMはFAM-None、HEXはVIC-None、Cy5はCy5-Noneとした。

(4) リアルタイムPCRの triplex 反応系の検出感度の検討

上記Bの組み合わせのみについて、 10^{-4} – 10^{-7} 希釈DNA液を用いて実施した。

2) 食品を用いた感度の検討

4で 10^2 – 10^4 cfu/ml菌接種食品培養液から抽出したDNA液について、リアルタイムPCR法では自家調製試薬、LAMP法では各0抗原対象自家調製プライマーセットとDNA増幅試薬キット（LMP204、栄研化学）を用いた自家調製試薬および大腸菌0157検出試薬キット（LMP631、栄研化学）の2種類の試薬を用いて、繰り返し測定数2にて測定した。リアルタイムPCR法では、自家調製試薬を表3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 および ABI Viia7 では FAM-BHQ1 は FAM-None、HEX-BHQ1 は VIC-None とし、LC480 では FAM-BHQ1 は Excitation 465nm および Emission 510nm、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。LAMP 法では、自家調製試薬では表 4 に従って反応液を調製し、増幅反応は全血清群について 65°C60 分、80°C2 分、0157 についてはこれに加えて 63°C60 分、80°C2 分に設定して反応を行った。市販キットでは添付文書に従って反応液を調製し、65°C60 分、80°C2 分とした。

7. 各検討の機器・解析条件

1) 菌液を用いた検討

<リアルタイム PCR 機器と試薬の組み合わせと解析方法>

機器	自家調製試薬	
	Duplex	Triplex
ABI7500	Auto 解析、 Manual 解析	Auto 解析、 Manual 解析
ABIViia7	Auto 解析、 Manual 解析	
LC480	Auto 解析、 Manual 解析	

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	自家調製試薬
ABI7500	Auto 解析、 Manual 解析
ABI7900	Auto 解析、 Manual 解析
ABIViia7	Auto 解析、 Manual 解析
LC480	Auto 解析、 Manual 解析
Dice II	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。

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 LAMP 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 duplex 反応系の組み合わせの検討 (表 5) では、8 つの組み合わせ (A~H) のうち A、D および H での反応が比較的優れていた。他の組み合わせは感度が優れないことを意味する Ct 値が 20 以上である血清群が多かった。また、比較的優れていた 3 つの組み合わせのうち、A および H では 0121 の増幅曲線が比較的指数関数的増加としてはなだらかであり、最も優れていたのは D であった。これら 3 つの組み合わせについて、さらに検出感度の検討を行った結果 (表 6)、ほとんど 3 者に差はなかった。このため、後の検討は反応系 D の条件を基本とした。

Duplex 反応系 D における HEX ラベルの場合での反応条件 (各種濃度試薬) の検討 (表 7) では、6 つの組み合わせ (a~f) のうち e での反応が比較的優れていた。反応系 a では、対象血清群のみを供試した場合と 6 血清群混合物を供試した場合の両方とも検出感度は 10^3 cfu/ml 以上と優れるものの、026 および 0157 の duplex 反応系において 0157 の検出試薬の蛍光色素 (FAM) が 0157 遺伝子増幅に伴い 026 検出時に 026 の蛍光色素 (HEX) として非特異的に検出された。このため、組み合わせ b、c、d においてプローブ濃度を変更して検討したが、いず

れも 026 または 0157 のどちらかに非特異的に蛍光色素の検出が起こった。さらに、全体的にプローブ濃度を減らした組み合わせ e を設定して検討した結果、非特異的に蛍光色素の検出は起こらなかった。検出感度も対象血清群のみを供試した場合と 6 血清群 DNA 混合物を供試した場合の両方とで 10^3 cfu/ml 以上と優れた結果であった。追加して、さらに経済性を高めるために HEX ラベルのプローブ濃度を減らした組み合わせ f を設定した。検出感度は組み合わせ e と同様であったが、HEX の検出蛍光値が低かった。

また、蛍光色素のうち HEX ラベルを VIC ラベルに変更した系についても検討した (表 8)。HEX と VIC は蛍光スペクトルが近似するため一般的試薬の HEX のほうが汎用性は高いが、ABI で特許取得された VIC が ABI 機器対応の純正品として使用される場合も多い。このため、VIC ラベルプローブの使用時に適切な反応系を確認した。その結果、組み合わせ a では検出感度は 10^3 cfu/ml 以上と優れるものの 3 つの duplex 系のすべてにおいて蛍光色素の両方 (FAM および VIC) または片方が非特異的に検出された。また、組み合わせ b および c においても、0121 および 0145 の duplex 検出系では非特異的な検出は認められなかったものの、026 および 0157、0103 および 0111 の各 duplex 検出系では非特異的な検出が認められた。組み合わせ d では、0103 および 0111 の duplex 検出系において非特異的な検出が認められた。しかし、組み合わせ e および f においては、いずれの duplex 検出系でも非特異的な検出が認められなかった。検出感度を比較すると、組み合わせ f

では 10^3 cfu/ml と大変に優れていたが、経済性を高めるために VIC ラベルのプローブ濃度を組み合わせ f より減らした組み合わせ e では検出感度が 10^4 cfu/ml 以上と求められる検出感度の最低レベルであった。

このように設定された濃度のプローブを使用したリアルタイム PCR の duplex 反応系 D の各種機器による検出感度の検討 (表 9) では、それまでの検討に統一して使用された ABI7500 を比較参考にして、他の機種を使用した。その結果、試験した 2 機種 (ABI Viiia7、および LC480) のいずれにおいても ABI7500 と同様に 10^3 cfu/ml 以上の感度を示した。

次に、自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における triplex 反応系の組み合わせの検討 (表 10) では、3 つの組み合わせ (A~C) において比較的 B および C が優れていた。B では、最も患者の多い 0157 と次いで患者の多い 026 が同じ系に含まれるため、最も B が適切であると判断され、これの系の感度を検討した (表 11)。その結果、 10^4 cfu/ml 以上の感度であることが確認された。

以上の菌液での検討の結果を踏まえて、食品培養液を供試して検討を行った。

リアルタイム PCR 法の duplex 反応系 D における各種機器での食品中での検出感度の検討 (表 12) では、8 種類のいずれの食品においても、また検討した 5 機種のいずれにおいても、026 および 0157、0103 および 0111、0121 および 0145 の 3 種類の duplex 反応系のいずれにおいても 10^4 cfu/ml 以上の感度であることが確認された。026 および 0157 の反応系では、トマトにおいて 0157 および 026 で感度が他食品に

比べて低い結果であった。0103 および 0111 の反応系では、026 および 0157 の反応系と同様にトマトにおいて0103および026の感度が他食品に比べて低い結果であり、特に0111についてはABI7500において感度が 10^5 cfu/ml であった。追加したトマト検体では 10^2 cfu/ml の検出感度であり、検体によって感度が大きく異なった。0121 および 0145 の反応系では、牛レバー、チーズ、トマト、ハウレンソウで 10^4 cfu/ml の検出感度である機器があった。全体的に0111および0121では検出感度が 10^4 cfu/ml である食品と機器の組み合わせが他血清群の検出系よりも多い傾向であった。

LAMP 法における自家調製試薬 (simplex 反応系) および市販キット (simplex 反応系) での食品中での検出感度の検討 (表 13) では、自家調製試薬での反応は026、0103、0111、0121 および 0145 では 65°C 反応でいずれの食品でも検出感度が 10^4 cfu/ml であった。しかし、0157 では 65°C 反応は検出感度がカイワレダイコンおよびハウレンソウで 10^5 cfu/ml であった。開発の報告では 63°C 反応となっているため、0157のみ 63°C で反応したところ 10^4 cfu/ml に検出感度が改善された。また、市販の0157検出キットでは反応条件が 65°C であり、検出感度は 10^4 cfu/ml であった。

D. 考察

本研究では、昨年度に検討して選定した諸外国の政府機関で使用されている試験法を参照した日本での主要な血清群026、0103、0111、0121、0145 および 0157 についての0抗原特異的遺伝子対象リアルタイムPCR法について、自家調製での試薬濃度、

duplex および triplex の multiplex での検出対象遺伝子の組み合わせ、対応機種、食品での感度などの点で検討した。また、検出感度に優れ検出機器が簡易であるなどの利点のある LAMP 法についても自家調製試薬および既存キット製品を使用した検出の検討を行った。

リアルタイムPCR法では、multiplexによって1反応で複数の対象遺伝子を検出できるという利点がある反面、複数遺伝子が同時に増幅される場合での遺伝子増幅の効率の違いによる検出の低下や複数の蛍光色素の相互の影響など配慮する必要がある。また、増幅対象判別のために蛍光色素の種類は対象遺伝子の種類と同数必要であるため、増幅対象が多いほど機器が搭載する蛍光フィルターが複数種必要となり、機器の高度化が求められる。本研究では duplex と triplex 反応系を検討したが、機器によっては triplex 反応系に対応できない場合もあり、汎用性という面では duplex が適当であると考えられた。また、検出感度としても、菌液の検討で triplex よりも duplex のほうが優れていた。ただし、経済性の面ではマスターミックスを効率的に使用する triplex が duplex よりも優れている。

菌液を使った duplex リアルタイムPCR法の組み合わせの検討 (表 5) では、8つの組み合わせ (A~H) のうちA、DおよびHでの反応が比較的優れていた。特に、0111と0157を組み合わせた反応系であるEとFにおいては0111のCt値が他血清群と比べて15前後大きく検出性が優れない結果であった。EとFではプローブの蛍光色素ラベルが0157はFAMラベルであり0111はCy5ラベルであったが、優れていたDおよびH

においても FAM ラベルの 0103 プローブおよび Cy5 ラベルの 0111 プローブであり、蛍光色素の組み合わせのためではなく遺伝子増幅の組み合わせに原因があるとも考えられた。

反応系 D について、全体的にプローブ濃度を減らした組み合わせ e (HEX ラベルのプローブは 100 nM、FAM ラベルのプローブは 50 nM) を設定して検討した結果、非特異的な蛍光色素の検出はなく、検出感度も 10^3 cfu/ml 以上と優れた結果であった。追加して、さらに経済性を高めるために HEX ラベルのプローブ濃度を 50 nM に減らした組み合わせ f を設定したが、検出感度は組み合わせ e と同様であったが、HEX の検出蛍光値が低く食品検体でのバックグラウンドの影響が危惧されたため最終的には組み合わせ e が最も優れていると考えられた。ABI 蛍光色素である VIC ラベルでも、HEX ラベルと同様のプローブ濃度の条件が最も優れていることが本研究で確認された。また、HEX および VIC の両ラベルともにどの機器でも使用はできるものの、ABI の機器では VIC ラベルを使用すること、Dice ではそれぞれの蛍光試薬のフィルターに設定することによって、高い蛍光強度やベースラインの安定が認められた。

食品での検討では、腸管出血性大腸菌の食中毒や汚染に関連する食肉、野菜、チーズを対象に 8 種類を選定した。食品によっては、duplex リアルタイム PCR 法のいくつかの反応系において検出感度が複数の機器で検出感度が 10^4 cfu/ml であるものもあった。これらの検討は、複数機関で食品または機器を分担して実施している。このため、DNA 抽出や反応が同時でない場合もあるた

め、さらに試験回数を増やすなどの検討も重要である。また、トマトでは 1 検体で 0111 の検出が 10^5 cfu/ml と ABI7500 で優れなかったが、同一の DNA 抽出物で試験した他の反応系でも 10^4 cfu/ml である場合が多かったため、検体を追加して試験を行ったところ 10^2 cfu/ml の感度が得られた。これまでの予備検討においても複数機関で比較したトマトからの検出感度が優れない結果を得ており、DNA 抽出や遺伝子増幅の抑制などがトマトの成分によって起こることも推察された。

LAMP 法では、自家調製のプライマーを基本として文献報告の条件を参照して使用しやすいうように考慮した。文献では 0157 のみ 63°C で他 5 血清群は 65°C の設定であった。0157 も 65°C での反応で行えないか検討したが検出性が優れず、良好な検出感度である 63°C が適切と確認された。また、0157 検出キットは既に発売されていたが、設定温度が 65°C であり、感度は良好であった。自家調製試薬とキットと組み合わせること容易に LAMP 法にて検出できることが明らかになった。

USDA および EFSA の検査法では、USDA 法では使用機器を 1 機種に特定し、その機器に適した DNA ポリメラーゼや蛍光ラベルを詳細に設定して検出法を確立している。一方、EFSA 法では、USDA 法のような詳細な設定はなく、各機関で使用方法の設定を行う。対照的な検査法の設定であるが、USDA 法は一国の一機関で使用方法であることから、機器等の統一性も図りやすく、一定レベルの技術を想定して特定の方法に限定することが可能であると考えられる。このため、大変に詳細なプロトコルが作成されて

おり、使用者の作業ミスは少ないものと思われる。EFSA 法については、加盟国の多様な状況を考慮すると特定の機種や試薬に限定する事が難しいものと思われ、各国や各機関での状況によって詳細な検査法が各自で決められるように設定されているのではないと思われる。検査法実施の際の条件の詳細な設定については検証が必要となるため、USDA 法のように詳細が示されている方が応用性には限度があるが検証は最小限にとどめる事が可能とも言える。日本での腸管出血性大腸菌の食品での検査の通知法は、これまでに汎用性の高い機器を複数含めて、比較的安価に準備することのできる公表されているプライマー・プローブを自家調製した試薬や、製造者による製品管理を行っている市販キットを設定している。O 抗原特異的遺伝子を対象とした検出法でも、汎用性の高い機種を複数、また自家調製および市販キットを含めた複数の方法を含む検出法や、代表的手法をひとつ決めて、それと同様な手法を各機関で応用し検証して使用することが可能な検出法など、方向性が考えられる。

本研究では、リアルタイム PCR 法については自家調製試薬を中心に多様な機種を含めて経済性および汎用性も考慮した上で、食品での感度の優れる反応系を検討した。一方で、市販キット製品の使用も試験の試薬調製や反応手順などを簡易化する上で重要である。今後、食品培養液での感度や対応機器などを確認し検討を行うことが必要である。

今後、本研究の成果によって、腸管出血性大腸菌食中毒の原因食品の探索、輸入検疫や国内流通食品調査などでの本菌の検査

法に結びつく試験法の策定に貢献できるものと考えられる。

E. 結論

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 $10^4/\text{ml}$ 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 $10^4/\text{ml}$ 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および O157 検出キットにおいて $10^4/\text{ml}$ 以上の感度で検出されることが判明した。

F. 健康被害情報

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

Hasegawa, A., Hara-Kudo, Y., Ogata, K., Saito, S., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S. Differences in the stress tolerances of *Vibrio parahaemolyticus* strains due to their source and harboring of virulence genes. J. Food Prot. 76:1456-62, 2013.

Jones, J.L., Benner, R.A., DePaola, A. and Hara-Kudo, Y. *Vibrio* densities in the intestinal contents of finfish from coastal Alabama. Agriculture, Food and Analytical Bacteriology. 3: 186-194, 2013.

小林直樹、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の分子生物学的研究と食品での検査法の発展. 日本食品微生物学会雑誌. 30(3):147-155. 2013年.

2. 学会発表

工藤由起子、長尾清香、小林直樹. 多血清群の腸管出血性大腸菌の病原因子遺伝子およびO抗原特異的遺伝子検出法の検討. 第106回日本食品衛生学会学術講演会. 平成25年11月.

工藤由起子. 多血清群の腸管出血性大腸菌試験法の検討. 食品衛生登録検査機関協会. 平成25年度微生物研修会. 平成25年12月.

長尾清香、小林直樹、工藤由起子. 大腸菌のO抗原特異的遺伝子を対象としたマルチプレックス・リアルタイムPCR法の検討. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 平成25年10月.

小林直樹、江藤良樹、前田詠里子、齊藤志保子、古川一郎、工藤由起子. 臨床症状の異なる腸管出血性大腸菌株間での病原性と遺伝型の解析. 第106回日本食品衛生学会学術講演会. 平成25年11月.

森哲也、市川希美、難波豊彦、吉成知也、工藤由起子. ゼリー状飲料の細菌試験における課題. 第34回日本食品微生物学会学術総会. 平成25年10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

遺伝子	プライマーおよび プローブ名	配列
<i>WZX</i> ₀₂₆	プライマー	
	Wzx-026-F	5' GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C 3'
	Wzx-026-R	5' AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC 3'
	プローブ	
	Wzx-026-P	5' TGG TTC GGT TGG ATT GTC CAT AAG AGG G 3'
<i>WZX</i> ₀₁₀₃	プライマー	
	Wzx-0103-F	5' TTG GAG CGT TAA CTG GAC CT 3'
	Wzx-0103-R	5' ATA TTC GCT ATA TCT TCT TGC GGC 3'
	プローブ	
	Wzx-0103-P	5' AGG CTT ATC TGG CTG TTC TTA CTA CGG C 3'
<i>wbdI</i> ₀₁₁₁	プライマー	
	WbdI-0111-F	5' TGT TCC AGG TGG TAG GAT TCG 3'
	WbdI-0111-R	5' TCA CGA TGT TGA TCA TCT GGG 3'
	プローブ	
	WbdI-0111-P	5' TGA AGG CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GC 3'
<i>WZX</i> ₀₁₂₁	プライマー	
	Wzx-0121-F	5' AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A 3'
	Wzx-0121-R	5' GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT 3'
	プローブ	
	Wzx-0121-P	5' CGC TAT CAT GGC GGG ACA ATG ACA GTG C 3'
<i>WZX</i> ₀₁₄₅	プライマー	
	Wzx-0145-F	5' AAA CTG GGA TTG GAC GTG G 3'
	Wzx-0145-R	5' CCC AAA ACT TCT AGG CCC G 3'
	プローブ	
	Wzx-0145-P	5' TGC TAA TTG CAG CCC TTG CAC TAC GAG GC 3'
<i>rfbE</i> ₀₁₅₇	プライマー	
	0157-rfbE-F	5' TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A 3'
	0157-rfbE-R	5' CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT 3'
	プローブ	
	0157-rfbE-P	5' AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG 3'

表2 LAMP法に用いたプライマー配列

参照法	遺伝子	プライマー名	配列
Wangらの報告*	<i>wzy</i> ₀₂₆	026-wzy-F3	5' GACTATGAAGCGTATGTTGAT 3'
		026-wzy-B3	5' TCCTGATTTGAACAATGTCAAT 3'
		026-wzy-FIP	5' ACCGCCTAAATACTTAACACCATAATTAATGTCAATGAACTTTATGCC 3'
		026-wzy-BIP	5' TTCCTTGGGACCACATTCCTACATGTAAAGCAGCAAACC 3'
		026-wzy-LF	5' ACCAGCGATAACCAATCTC 3'
		026-wzy-LB	5' TACAATACAGTAAGTATACAGCATT 3'
<i>wzx</i> ₀₁₀₃	0103-wzx-F3	5' ACTCAGTGGTGTAGTAACATG 3'	
		0103-wzx-B3	5' TCACCTTGATTTTCTGCTGA 3'
		0103-wzx-FIP	5' ATTTGCTATTCCAATTGGACCAGTACTTTAGACTAATTTGTGGCCTTC 3'
		0103-wzx-BIP	5' TTGGGACAATTGCAAAATTTTGTGGATCTATTAACCTTGTGAAACTTG 3'
		0103-wzx-LF	5' AATTGCAACAACCTTTTGAATAA 3'
		0103-wzx-LB	5' CCTTTATAAATGGATTCATTTTCATC 3'
<i>wzy</i> ₀₁₁₁	0111-wzy-F3	5' AAGGCGTAACTTTTTTTGAAC 3'	
		0111-wzy-B3	5' TCATGAGGGTCATTAGGAATT 3'
		0111-wzy-FIP	5' TCACCAAGCTGTGAAACCAAACCTACAGCAAGTAATATTGAACGT 3'
		0111-wzy-BIP	5' TCCATGGTATGGGGACATTAATTTTGTGGAAGTCCATATAACGT 3'
		0111-wzy-LB	5' CTAAATAACGGCGGACAAT 3'
<i>wzy</i> ₀₁₂₁	0121-wzy-F3	5' GCTCAGCTTTTATCTTGTTCAA 3'	
		0121-wzy-B3	5' ATAGGCTCCCAACCATCC 3'
		0121-wzy-FIP	5' ACGCAAAAAGTATGGATTACATCCTGATATAACAGAACCGACTTGG 3'
		0121-wzy-BIP	5' TGTTGCTGGTTCCTTATTATGTAGTAAAAGCAAGCCAAAACACTC 3'
		0121-wzy-LF	5' TAAAGCCATCCAACCACGC 3'
<i>wzx</i> ₀₁₄₅	0145-wzx-F3	5' TTTGTAAGACAAGGTGTATGG 3'	
		0145-wzx-B3	5' GCATTGGTACAGACAGCTTTA 3'
		0145-wzx-FIP	5' CACAGTACCACCAACCAAAAAATATTGGTTAGCTATAGCTGTGA 3'
		0145-wzx-BIP	5' AGTGTGCTTGGAGTGGCTTACAATCCCAGTTTGTAAATATCGC 3'
		0145-wzx-LF	5' TTCTTAAGTTCGGATACACTAGCA 3'
<i>wzy</i> ₀₁₅₇	0157-wzy-F3	5' TCCCTTTAGGGATATATATACCTT 3'	
		0157-wzy-B3	5' ATAAGTATATTTTCATTTTCGTGAT 3'
		0157-wzy-FIP	5' TTCCCAGCCACTAAGTATTGCAATATGAAAAAACCCATAGCTCGA 3'
		0157-wzy-BIP	5' TGCATCGGCCTTCTTTTTTGGAACGTATCATGCAATAAGATCA 3'
		0157-wzy-LF	5' ATAATGATATATGAATAGAATGCGC 3'
		0157-wzy-LB	5' TCCTTTTCTCTCCGTAATTGAT 3'

* Appl. Environ. Microbiol., vol. 78, p. 2727-36, 2012

表3 食品を用いた感度の検討での反応試薬濃度および反応条件
(リアルタイムPCR法、自家調製試薬)

試薬 (濃度)	蛍光ラベル	1反応 (μ l)	終濃度 (nM)	1反応 (μ l)
TaqMan Environmental Master Mix 2.0				15
各検出用のプライマーおよびプローブ				2.1
[反応系1]026/0157検出用のprimer・probe				
Wzx-026-F (20 μ M)		0.3	200	
Wzx-026-R (20 μ M)		0.3	200	
0157-rfbE-F (20 μ M)		0.3	200	
0157-rfbE-R (20 μ M)		0.3	200	
Wzx-026-P (5 μ M)	HEX-BHQ1	0.6	100	
0157-rfbE-P (5 μ M)	FAM-BHQ1	0.3	50	
Subtotal		2.1		
[反応系2]0103/0111検出用のprimer・probe				
Wzx-0103-F (20 μ M)		0.3	200	
Wzx-0103-R (20 μ M)		0.3	200	
WbdI-0111-F (20 μ M)		0.3	200	
WbdI-0111-R (20 μ M)		0.3	200	
Wzx-0103-P (5 μ M)	FAM-BHQ1	0.3	50	
WbdI-0111-P (5 μ M)	HEX-BHQ1	0.6	100	
Subtotal		2.1		
[反応系3]0121/0145検出用のprimer・probe				
Wzx-0121-F (20 μ M)		0.3	200	
Wzx-0121-R (20 μ M)		0.3	200	
Wzx-0145-F (20 μ M)		0.3	200	
Wzx-0145-R (20 μ M)		0.3	200	
Wzx-0121-P (5 μ M)	FAM-BHQ1	0.3	50	
Wzx-0145-P (5 μ M)	HEX-BHQ1	0.6	100	
Subtotal		2.1		
D. W.				7.9
Template DNA				5
Total				30

表4 食品を用いた感度の検討での反応試薬濃度および反応条件 (LAMP法、自家調製試薬)

①026検出試薬		
試薬 (濃度)	1反応 (μl)	終濃度 (μM)
2 × Reaction Mix.	12.5	
026-F3および026-B3 (各2.5 μM)	各1.0	0.1
026-FIPおよび026-BIP (各45 μM)	各1.0	1.8
026-LFおよび026-LB (各25 μM)	各1.0	1
D. W.	0.5	
Bst DNA Polymerase	1.0	
Template DNA	5.0	
Total	20.0	
②0103検出試薬		
試薬 (濃度)	1反応 (μl)	終濃度 (μM)
2 × Reaction Mix.	12.5	
0103-F3および0103-B3 (各2.5 μM)	各1.0	0.1
0103-FIPおよび0103-BIP (各45 μM)	各1.0	1.8
0103-LFおよび0103-LB (各25 μM)	各1.0	1
D. W.	0.5	
Bst DNA Polymerase	1.0	
Template DNA	5.0	
Total	20.0	
③0111検出試薬		
試薬 (濃度)	1反応 (μl)	終濃度 (μM)
2 × Reaction Mix.	12.5	
0111-F3および0111-B3 (各2.5 μM)	各1.0	0.1
0111-FIPおよび0111-BIP (各45 μM)	各1.0	1.8
0111-LB (25 μM)	1.0	1
D. W.	1.5	
Bst DNA Polymerase	1.0	
Template DNA	5.0	
Total	20.0	
④0121検出試薬		
試薬 (濃度)	1反応 (μl)	終濃度 (μM)
2 × Reaction Mix.	12.5	
0121-F3および0121-B3 (各2.5 μM)	各1.0	0.1
0121-FIPおよび0121-BIP (各45 μM)	各1.0	1.8
0121-LF (25 μM)	1.0	1
D. W.	1.5	
Bst DNA Polymerase	1.0	
Template DNA	5.0	
Total	20.0	
⑤0145検出試薬		
試薬 (濃度)	1反応 (μl)	終濃度 (μM)
2 × Reaction Mix.	12.5	
0145-F3および0145-B3 (各2.5 μM)	各1.0	0.1
0145-FIPおよび0145-BIP (各45 μM)	各1.0	1.8
0145-LF (25 μM)	1.0	1
D. W.	1.5	
Bst DNA Polymerase	1.0	
Template DNA	5.0	
Total	20.0	
⑥0157検出試薬		
試薬 (濃度)	1反応 (μl)	終濃度 (μM)
2 × Reaction Mix.	12.5	
0157-F3および0157-B3 (各2.5 μM)	各1.0	0.1
0157-FIPおよび0157-BIP (各45 μM)	各1.0	1.8
0157-LFおよび0157-LB (各25 μM)	各1.0	1
D. W.	0.5	
Bst DNA Polymerase	1.0	
Template DNA	5.0	
Total	20.0	

表5 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検討

組み合わせ	反応系	標的遺伝子	供試血清群	判定結果 (コメント)
A	1	026 0111	6血清群*	○ Duplex第2候補 (反応系3で、0121は直線的な増幅曲線)
	2	0103 0145		
	3	0121 0157		
B	1	026 0111	6血清群	× (Ct値20以上が比較的多い)
	2	0103 0121		
	3	0145 0157		
C	1	026 0157	6血清群	× (Ct値20以上が比較的多い)
	2	0103 0145		
	3	0111 0121		
D	1	026 0157	6血清群	○ Duplex第1候補
	2	0103 0111		
	3	0121 0145		
E	1	0111 0157	6血清群	× (反応系1で0111のCt値が他より15程度高い)
	2	0121 0145		
	3	026 0103		
F	1	0111 0157	6血清群	× (反応系1で0111のCt値が他より15程度高い)
	2	0103 0121		
	3	026 0145		
G	1	026 0103	6血清群	× (Ct値20以上が比較的多い)
	2	0111 0121		
	3	0145 0157		
H	1	026 0145	6血清群	○ Duplex第2候補 (反応系3で、0121は直線的な増幅曲線)
	2	0103 0111		
	3	0121 0157		

* 026、0103、0111、0121、0145、0157 各1株ずつを等量混合

表6 自家調製試薬でのリアルタイムPCR法におけるduplex反応系の検出感度の検討

組み 合わせ	反応 系	標的 遺伝子	供試 血清群	菌数レベル (cfu/ml)							
				Auto解析				Manual解析			
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
A	1	026	026	2/2*	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2
		0111	0111	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2
	2	0103	0103	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
		0145	0145	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
	3	0121	0121	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
		0157	0157	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2
D	1	026	026	2/2*	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2
		0157	0157	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2
	2	0103	0103	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
		0111	0111	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
	3	0121	0121	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2
		0145	0145	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
H	1	0103	0103	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
		0111	0111	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2
	2	026	026	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2
		0145	0145	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
	3	0121	0121	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2
		0157	0157	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2

* 陽性菌株数/総菌株数

表7 リアルタイムPCR法のduplex反応系D (HEXラベル) における反応条件 (各種試薬濃度) の検討

試薬 組み 合わせ	反応系	標的 遺伝子	プローブ 終濃度 (nM)	供試 血清群	菌数レベル (cfu/ml)								HEX測定で のFAM検出 またはFAM 測定での HEX検出の 有無	
					Auto解析				Manual解析					
					10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²		
a	1	026	150	026	1/1 ^{*1}	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	無	
		0157	200	0157	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	有	
	2	0103	200	0103	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
		0111	200	0111	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
	3	0121	200	0121	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
		0145	200	0145	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
	1	026	150	6 血清群 ^{*2}	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	非該当
		0157	200		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	非該当
	2	0103	200		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	非該当	
		0111	200		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	非該当	
	3	0121	200		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	非該当	
		0145	200		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	非該当	
b	1	026	150		026	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	有
		0157	150		0157	NT	1/1	ND	NT	NT	1/1	ND	NT	無
c	1	026	200		026	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
		0157	150		0157	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	有
d	1	026	200		026	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	有
		0157	200		0157	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
e	1	026	100	026	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
		0157	50	0157	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
	2	0103	50	0103	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
		0111	100	0111	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
	3	0121	50	0121	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
		0145	100	0145	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無	
	1	026	100	6 血清群	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	非該当	
		0157	50		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	非該当	
	2	0103	50		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	非該当	
		0111	100		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	非該当	
	3	0121	50		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	非該当	
		0145	100		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	非該当	
f	1	026	50		6 血清群	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	非該当
		0157	50			1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	非該当
	2	0103	50			1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	非該当
		0111	50			1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	非該当
	3	0121	50			1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	非該当
		0145	50			1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	非該当

*1 陽性菌株数/総菌株数

*2 026、0103、0111、0121、0145、0157 各1株ずつを等量混

表8 リアルタイムPCR法のduplex反応系D (VICラベル) における反応条件 (各種試薬濃度) の検討

試薬 組み 合わせ	反応 系	標的 遺伝子	プローブ 終濃度 (nM)	供試 血清群	菌数レベル (cfu/ml)								VIC測定で のFAM検出 またはFAM 測定での VIC検出の 有無
					Auto解析				Manual解析				
					10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	
a	1	026	150	026	1/1*	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	有
		0157	200	0157	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	有
	2	0103	200	0103	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	無
		0111	200	0111	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	有
	3	0121	200	0121	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	有
		0145	200	0145	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	無
b	1	026	150	026	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	有
		0157	150	0157	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	有
	2	0103	150	0103	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
		0111	200	0111	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	有
	3	0121	150	0121	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
		0145	200	0145	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
c	1	026	150	026	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	有
		0157	100	0157	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
	2	0103	100	0103	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
		0111	200	0111	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	有
	3	0121	100	0121	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
		0145	200	0145	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
d	1	026	150	026	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
		0157	50	0157	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
	2	0103	200	0103	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
		0111	50	0111	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	有
	3	0121	200	0121	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
		0145	50	0145	NT	1/1	1/1	NT	NT	1/1	1/1	NT	無
e	1	026	50	026	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2	無
		0157	50	0157	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2	無
	2	0103	50	0103	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2	無
		0111	50	0111	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	無
	3	0121	50	0121	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	無
		0145	50	0145	2/2	2/2	1/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2	無
f	1	026	100	026	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無
		0157	50	0157	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無
	2	0103	50	0103	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無
		0111	100	0111	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無
	3	0121	50	0121	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無
		0145	100	0145	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	無

* 陽性菌株数/総菌株数

表9 リアルタイムPCR法のduplex反応系Dの各種機器による検出感度の検討

機器	反応系	標的遺伝子	供試血清群	菌数レベル (cfu/ml)								
				Auto解析*1				Manual解析*2				
				10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	
ABI Viia7	1	026	6 血清群*3	1/1*4	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	
		0157		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	
	2	0103		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
		0111		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
	3	0121		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	
		0145		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	
LC480	1	026	026	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
		0157	0157	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
	2	0103	0103	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
		0111	0111	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
	3	0121	0121	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
		0145	0145	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
	1	026	6 血清群	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
		0157		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
	2	0103		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
		0111		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
	3	0121		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
		0145		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
ABI7500 (参考データ)	1	026	026	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
		0157	0157	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
	2	0103	0103	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
		0111	0111	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
	3	0121	0121	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
		0145	0145	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
	1	026	6 血清群	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
		0157		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
	2	0103		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
		0111		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
	3	0121		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
		0145		1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1

*1 ABI7500: threshold・baseline:auto、LC480: Abs Quant/2nd Derivative Max

*2 ABI7500: threshold:0.2・baseline:auto、LC480: Abs Quant/Fit Points

*3 026、0103、0111、0121、0145、0157 各1株ずつを等量混合

*4 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反応系の組み合わせの検討

組み 合わせ	反応系	標的 遺伝子	供試 血清群	判定結果 (コメント)
A	1	026	6血清群*	× (反応系1の0111は他と比べて 直線的かつ2段階状の増幅曲線)
		0111		
		0157		
	2	0103		
		0121		
		0145		
B	1	026	6血清群	○ Triplex第1候補 (反応系2の0111および0121は直線的な または2段階状の増幅曲線)
		0145		
		0157		
	2	0103		
		0111		
		0121		
C	1	0121	6血清群	○ Triplex第2候補 (反応系1の0121および反応系2の0111は 直線的なまたは2段階状の増幅曲線)
		0145		
		0157		
	2	026		
		0103		
		0111		

* 026、0103、0111、0121、0145、0157 各1株ずつを等量混合

表11 リアルタイムPCR法のtriplex 反応系Bの検出感度の検討
菌数レベル (cfu/ml)

反応系	標的 遺伝子	供試 血清群	菌数レベル (cfu/ml)			
			10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
1	026	026	2/2*	2/2	2/2	1/2
	0145	0145	2/2	2/2	1/2	0/2
	0157	0157	2/2	2/2	1/2	1/2
2	0103	0103	2/2	2/2	0/2	0/2
	0111	0111	2/2	2/2	2/2	1/2
	0121	0121	2/2	2/2	1/2	0/2

* 陽性菌株数/総菌株数

表12 リアルタイムPCR法のduplex反応系Dにおける各種機器での食品中での検出感度の検討

食品	反応系 1																	
	026									0157								
	ABI 7500		ABI 7900		ABI Viia7		LC480		Dice II	ABI 7500		ABI 7900		ABI Viia7		LC480		Dice II
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	A	M	A	M	A	M	A	M	A
牛レバー	3 ^{*3}	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	2
牛挽肉	3	3	ND	3	2	2	2	4	3	3	3	4	2	2	2	2	3	3
豚スライス	2	2	3	3	2	2	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2
チーズ	2	2	3	3	2	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	2	2	3
レタス	2	2	2	2	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3
カイワレダイコン	2	2	4	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3
トマト1	4	4	2	2	2	2	2	3	2	4	4	2	2	2	2	4	3	2
ハウレンソウ	3	3	ND	3	2	2	2	3	2	3	3	2	2	2	2	3	3	2

食品	反応系 2																	
	0103									0111								
	ABI 7500		ABI 7900		ABI Viia7		LC480		Dice II	ABI 7500		ABI 7900		ABI Viia7		LC480		Dice II
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	A	M	A	M	A	M	A	M	A
牛レバー	3	3	2	2	2	2	3	3	3	4	4	2	2	3	3	3	3	3
牛挽肉	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	ND	3	3	3	3	3	2
豚スライス	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	2	3	2
チーズ	2	2	3	3	2	2	3	3	3	3	3	ND	3	4	4	2	4	3
レタス	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	2	2	3	3	2	3	3
カイワレダイコン	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	ND	3	4	4	3	3	3
トマト1	4	4	2	2	3	3	4	4	3	5	5	2	2	2	2	3	3	3
トマト2	2	2	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	2	2	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ハウレンソウ	3	3	3	3	2	3	3	3	3	4	4	ND	3	4	4	2	4	3

食品	反応系 3																	
	0121									0145								
	ABI 7500		ABI 7900		ABI Viia7		LC480		Dice II	ABI 7500		ABI 7900		ABI Viia7		LC480		Dice II
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	A	M	A	M	A	M	A	M	A
牛レバー	3	3	3	3	2	2	4	4	2	3	3	3	3	2	2	3	3	3
牛挽肉	3	3	ND	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
豚スライス	2	2	3	3	2	2	3	4	3	3	3	3	3	3	3	2	3	2
チーズ	3	3	ND	3	4	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	2
レタス	2	2	3	3	2	2	3	4	3	3	3	2	2	3	3	2	3	3
カイワレダイコン	2	2	ND	3	3	3	3	3	2	3	3	4	3	3	3	2	2	3
トマト1	4	4	2	2	2	2	4	4	3	4	4	2	2	3	3	3	3	2
ハウレンソウ	4	4	ND	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	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

*3 検出感度：2反応共に検出された最小菌濃度（対数 cfu/ml）