分　担　研　究　報　告　書

鶏肉由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別について

齊藤　志保子

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）
食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究
研究代表者　大西　貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究報告書
地方衛生研究所のネットワーク構築：鶏肉由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別について

研究分担者　齊藤志保子（秋田県健康環境センター）
研究協力者　小林　昭彦（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者　黒木　俊郎（神奈川県衛生研究所）
研究協力者　古川　一郎（神奈川県衛生研究所）
研究協力者　堀川　和美（福岡県保健環境研究所）
研究協力者　八柳　潤　（秋田県健康環境センター）
研究協力者　高橋　志保（秋田県健康環境センター）
研究協力者　今野　貴之　（秋田県健康環境センター）
研究協力者　和田恵理子（秋田県健康環境センター）
研究協力者　熊谷　優子（秋田県健康環境センター）
研究協力者　樫尾　拓子（秋田県健康環境センター）

各自治体が行う食品中の食中毒菌のサーベイランスに活用できるタイピング方法を検討するため、市販国産鶏肉の汚染実態調査等で分離された黄色ブドウ球菌についてPOT法、MLVA法、PFGE法により遺伝子型別を実施した。また、従来の検査で対象としているブドウ球菌エンテロトキシン（SEs：Staphylococcal enterotoxins）の*sea*～*see*遺伝子に加えて、新型エンテロトキシンの*seg*, *seh*, *sei*遺伝子の保有状況についてもPCR法により検討した。その結果、鶏肉32検体由来94株はPOT法により19種類に型別された。同77株はMLVA法により20種、同52株はPFGE法により24種に型別された。2事例の食中毒由来株5株についても同様に型別できることが確認された。一方、分離株のSEs保有については*seg*と*sei*遺伝子の保有率が高いことが明らかとなった。POT法及びMLVA法はPFGE法に匹敵する解析力を有していることが確認され、簡便性・迅速性からも有用な型別法であると考えられたが、同じPOT型とMLVA型の株がPFGEでさらに型別された例も認められ、この点に留意する必要がある。

A. 研究目的

一般に流通している食品における各種食中毒菌の汚染状況及び菌株の型別等の疫学情報は食中毒発生時の原因究明あるいは食品衛生指導等に非常に有用と考えられる。昨年度は「食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築」班研究の一環として食中毒の重要な原因食品である市販の鶏肉について食中毒菌の汚染実態を調査した。今年度は各自治体が行う食品中の食中毒菌のサーベイランスに活用できるタイピング方法を検討するため、昨年度の鶏肉汚染実態調査で分離された黄色ブドウ球菌についてPOT法、MLVA法、PFGE法により遺伝子型別を実施した。またブドウ球菌エンテロトキシンの保有状況について、現在各施設においてルーチンで実施されているA～E型の*sea*～*see*遺伝子検索に

加えて新型エンテロトキシンのG,H,I型の*seg*, *seh*, *sei*遺伝子の保有状況についてPCR法により検討した。さらに、実際の食中毒事例における応用の可能性を検討するため、2事例由来株についても同様に検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

供試株の一覧を表1に示す。昨年度に実施した国産非凍結市販鶏肉の汚染実態調査において分離された黄色ブドウ球菌のうち、神奈川県衛生研究所分離保存14株（5検体由来）、さいたま市健康科学研究センター分離保存43株(13検体由来)、秋田県健康環境センター分離保存50株(14検体由来)、計鶏肉32検体由来の107株をブドウ球菌エンテロトキシン(SEs)遺伝子の検出試験に供試した。これらの株から選択した94株をPOT法による型別に、77株をMLVA法による型別に、52株をPFGEによる型別に供した。また福岡県保健環境研究所で分離した食中毒2事例由来株5株を同様に試験に供した。

2. ブドウ球菌エンテロトキシン(SEs)遺伝子の検出

ブドウ球菌エンテロトキシンA～E型の遺伝子である*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*に加えG型，H型，I型の遺伝子である*seg*, *seh*, *sei*の保有についてPCR法により検索した。プライマー、各種条件等についてはKatsuhiko Omoeらの報告[1]に従った。

3. POT法（Phage ORF typing法）

POT法は菌株ごとに異なるORFの保有パターンをMultiplex PCRによって検出する方法である。シカジーニアスDNA抽出試薬を用いてテンプレートを作成し、黄色ブドウ球菌用シカジーニアス分子疫学解析POTキット（関東化学株式会社）を用いてPCRを行った。ターゲットとする22領域の増幅バンドの有無からPOT型の数値に変換し、POT1-POT2-POT3の3つの数値により型を標記した。

4. MLVA法(Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis)

MLVA法はMRSAを型別対象としたArtur Sabatらの方法[2]に従い実施した。*clfA*, *clfB*, *sdr*（sdrC, sdrD, sdrE），*spa*, *ssp*の7カ所の遺伝子を対象として5種類のプライマーセットによりMultiplex PCRを行った。本法は株におけるVNTRの多様性により異なるバンドパターンを比較解析して型別するものであり、解析はFingerprinting IIを用いてN.Malachowaらの方法[3]に従い類似係数Dice、デンドログラムタイプUPGMAにより実施した。各パターンは任意に定めてMLVA型（ML数値）として示した。

5. PFGE法

菌株をBHIで30℃一夜培養後、遠心し、その沈さにCSB*1（リゾチーム5mg/ml、リゾスタフィン0.2μg/ml加）100μlを加え、1％ Seakem Gold Agarose／TEを等量混合し、プラグを作成した。プラグをCLB*2（リゾチーム5mg/ml、リゾスタフィン0.2μg/ml加）1ml中37℃ 2時間処理後、プロテネースK処理を50℃一夜行った。制限酵素には*Sma*Iを用い、泳動条件は 6V/cm^2、5.3～34.9 S 20時間とした。解析はFingerprinting IIを用いて、類似係数Jacaard、デンドログラムタイプUPGMAにより実施した。各パターンは任意に定めてPFGE型（PF数値）として示した。

*1 Cell suspension buffer (CSB)
100mM Tris、100mM EDTA (pH 8.0)
*2 Cell Lysis buffer (CLB)

50mM Tris、50mM EDTA (pH 8.0)
＋1％Sarcosyl

C. 研究結果

1. ブドウ球菌エンテロトキシン(SEs) 遺伝子の保有状況

A 型～E 型及び G 型～I 型の遺伝子 *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*seg*、*seh*、*sei* の保有状況を表 2,3 に示した。表中の SEs 型"/"は同一株から複数の型の SE s 遺伝子が確認されたことを示し、例えば B/H は B 型(*seb*)と H 型(*seh*)の二つを同時に保有する株であったことを示す。

鶏肉由来 107 株のうち SEs 遺伝子保有株は 78 株 (72.9%) であった。単独の SE s 遺伝子を保有する株は A (*sea*) が 3 株のみであったのに対して、2 種以上の SE s 遺伝子を保有する株は 75 株と大多数であった。また、新型の *seg* と *sei* を保有している株が 56 株 (52.3%) 認められた。一方、現在、多くの機関においてルーチン検査として実施していると思われる A～E 型の *sea*～*see* 遺伝子陽性株は 22 株 (20.6%) であった(表 2-2)。

検体別では、黄色ブドウ球菌分離陽性鶏肉検体 32 検体中 SEs 遺伝子保有株が分離された検体は 25 検体 (78.1%) であった。また、異なる種類の SE s 遺伝子を保有する株が同時に検出された検体が 7 検体認められた(表 3)。

2. POT 法による型別

鶏肉由来 94 株は POT 法により 19 種類に型別された。複数の検体由来株で認められた POT 型は 7 種類 (0-1-0、0-27-80、2-1-0、2-53-32、4-0-0、4-16-0、4-18-16) あり、そのうち 5 種類の型の株は分離機関が同一 (0-1-0:秋田県 2 検体由来、0-27-80:秋田県 2 検体由来、2-1-0:さいたま市 6 検体由来、2-53-32:さいたま市 6 検体由来、4-18-16 : 秋田県 3 検体由来) であったが、POT 型 4-0-0 は 2 機関 (秋田県 2 検体、神奈川県 1 検体)、POT 型 4-16-0 は 3 機関(秋田県 2 検体、神奈川県 2 検体、さいたま市 2 検体) における分離株を含んでいた。POT 型 2-1-0 については SE s 型が A/B/H 株と B/H 株の 2 種類が認められた(表 4)。なお、今回供試した株は *mec* 遺伝子を対象としたバンドが認められなかったことから全て MSSA であった。

3. MLVA 法による型別

鶏肉由来 77 株は MLVA 法により 20 種類に型別された。これらのうち、3 種類の POT 型 (2-1-0, 2-53-32, 4-16-0) がそれぞれ 2 種類の MLVA パターンに細分化された。2-1-0 については SE s 型が A/B/H の株は ML10 に、B/H の株は ML11 と、SE s 型により異なるパターンとなった。一方、POT 型 4-16-0 の一部と 4-18-16 の両型が ML17 に、4-24-0 と 4-82-97 の両型が ML18 に型別された(表 4, 図 1)。

4. PFGE による型別

鶏肉由来 52 株は PFGE 法により 24 種類に型別された。POT 型が同一で MLVA 法により 2 種類に型別された 4-16-0;ML17, ML19 はさらに PF18～23 に細分化されたが、PF23 以外は一つのクラスターに包含された。また、4-18-16;ML17 は PF16、4-24-0;ML18 は PF17、4-82-97 ; ML18 は PF24 と POT 型別同様に PFGE によっても型別された。6-0-64;ML20 と 6-0-84:ML21 は *Sma*I では切断されず PFGE パターンは得られなかった(表 4, 図 2)。

検体別では、32 検体中、同じ検体からの分離株が同一の遺伝子型であったものは 26 検体、2 種類の遺伝子型の株が検出されたものは 5 検体 (AK08, AK12, SA01, SA07, SA11) 、3 種類の遺伝子型の株が検出されたものは 4 検体 (AK05, KA03, SA02, SA08)

であった(表5)。

5. 食中毒事例由来株の遺伝子型別

食中毒事例由来株についても遺伝子型別を検討した結果、事例1では供試株3株全てPOT型2-193-33;ML14;PF13と型別された。事例2ではSEs型がAの株が0-1-0;ML03;PF03、G/Iの株が6-18-81;ML22;PF25と型別された(表6)。なお、鶏肉由来A;0-1-1;ML04株もPF03に型別された。

D. 考察

平成24年度の鶏肉の汚染実態調査において、黄色ブドウ球菌の汚染率は47%と非常に高率であった。今回はその分離株の一部を用いて新型エンテロトキシン遺伝子の保有状況、3種類の遺伝子型別法について検討した。

ブドウ球菌食中毒の原因菌のSEs型はA, B, C, D, Eが95%を占めるとされているが、近年A～E以外の新しい型が報告されている。今回、新型SEsのG(*seg*)、H(*seh*)、I(*sei*)について検索したところ、鶏肉分離株が*seg*, *sei*を高率に保有していることが明らかとなった。さらに、食中毒由来株にも*seg*, *sei*遺伝子保有株が存在することが確認された。今後これらの新型SEsについて、さらに食中毒への関与も含めて分離株の保有状況を把握する必要があると考えられた。

今回、MRSAの疫学解析に有用とされているPOT法とMLVA法を用いて鶏肉由来株, 食中毒事例由来株の型別を試行した。今回供試した株は全てMSSAであり、POT法では、対象とする22領域中の*mec*遺伝子関連のバンドが(－)となることから、解析に用いられるバンド数がMRSAと比較して少なかったが、検出されたバンドを数値化することによりPOT型別は可能であり、鶏肉由来株は19種類に型別された。MLVA法についても、MRSAの場合は通常7本のバンドが検出されるが、供試株では4本しかバンドが検出されない株も有り、主に5,6本のバンドの位置による解析となったが、鶏肉由来株が20種類に型別されることが確認された。POT法とMLVA法の型別の評価のためPFGEを実施したところ、鶏肉由来株はPRGE法により24種類に型別され、同じPOT型、MLVA型がPFGEで細分化された例は極一部に認められた。このようにPOT法及びMLVA法による型別はPFGE型別に匹敵する解析力を有することが確認されたが、PFGE型別で細分

化される可能性について留意する必要がある。しかし、POT法及びMLVA法は、操作の簡便性、結果判定の迅速性がPFGE法より優れており、食品検査等における型別法として両法の有用性は非常に高いと考えられた。とりわけ、POT法では型別結果が数値により標記されることから、分離機関、地域、時期等が異なる分離株においても比較解析が容易であるという特徴がある。これに対して今回検討したMLVA法はPFGE法と同様にバンドの位置による画像解析のため、PFGE法と同様に他のデータとの比較はFingerprintingⅡ等を用いた系統樹解析が必要となる点が問題である。しかし、MLVA法はPFGE法と異なりプライマー5セット1組を使用するMultiplex PCRに基づいた方法であることから、迅速性ではPFGE法よりも優れており、同時解析における菌株の比較においては有効に活用可能と考えられる。

食中毒事例について今回は検討数が少なかったが、POT法とMLVA法は鶏肉由来株と同様に食中毒事例由来株の解析にも応用可能と考えられた。今後、さらに食中毒事例由来株の遺伝子型別データ等を蓄積し食品由来株と比較することにより、健康被害に関与する株のSEs型とPOT型あるいはMLVA

型との組み合わせを明らかにすることが可能と考えられる。このような情報を関係機関が共有することは食中毒予防・迅速な原因食品究明に役立つと考えられる。

E. 結論

鶏肉由来や食中毒事例由来の黄色ブドウ球菌株おいては、新型のエンテロトキシン遺伝子 *seg*, *sei* の保有率が高かった。また、POT 法や MLVA 法による遺伝子型別は PFGE に匹敵する解析力を有し、操作の簡便性、結果判明の迅速性からも食品等の黄色ブドウ球菌検査において有用な型別法と考えられた。

F. 参考文献

1. K.omoe et al.,Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates.,FEMS Microbiology Letters 246,p191-198(2005)
2. A.Sabat et al.,New Method Typing Staphylococcus aureus Strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of Clinical Isolates., JCM, Vol.41,No.4,p1801-1804(2003)
3. N.Malachowa et al.,Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed Field Gel Electrophresis, *spa* Typing and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates.,JCM, Vol.43,No.7,p3095-3100(2005)

G. 研究発表

論文発表

なし

表1 供試株一覧

分離地研機関	由来		供試株数			
	市販食肉	検体数	SEs検索	POT法	MLVA法	PFGE法
秋田県	鶏肉	14	50	37	31	18
神奈川県	鶏肉	5	14	14	14	14
さいたま市	鶏肉	13	43	43	32	20
小計		32	107	94	77	52
福岡県	食中毒事例1(患者便、従事者手指、残食品)		3	3	3	3
	食中毒事例2(患者便、吐物)		2	2	2	2
合計			112	99	82	57

表2-1 分離株のSEs遺伝子保有j状況 (A～I 型、sea～sei遺伝子)

SEs型	鶏肉由来株数(%)		食中毒由来株数(%)		計(%)	
A	3	(2.8)	4	(80.0)	7	(6.3)
B/H	1	(0.9)	0	(0.0)	1	(0.9)
G/I	56	(52.3)	1	(20.0)	57	(50.9)
A/B/H	15	(14.0)	0	(0.0)	15	(13.4)
A/C/G/I	3	(2.8)	0	(0.0)	3	(2.7)
小計	78	(72.9)	5	(100)	83	(74.1)
未保有	29	(27.1)	0	(0.0)	29	(25.9)
合計	107	(100)	5	(100)	112	(100)

表2-2 分離株のSEs遺伝子保有状況 (A～E 型、sea～see遺伝子)

SEs型	鶏肉由来株数(%)		食中毒由来株数(%)		計(%)	
A	3	(2.8)	4	(80.0)	7	(6.3)
B	1	(0.9)	0	(0.0)	1	(0.9)
A/B	15	(14.0)	0	(0.0)	15	(13.4)
A/C	3	(2.8)	0	(0.0)	3	(2.7)
小計	22	(20.6)	4	(80.0)	26	(23.2)
未保有	85	(79.4)	1	(20.0)	86	(76.8)
合計	107	(100)	5	(100)	112	(100)

表3 SEs遺伝子保有株陽性検体数

SEs型	鶏肉検体数(%)		食中毒事例数
A	1	(3.1)	1
G/I	15	(46.9)	0
A/B/H	1	(3.1)	0
A/C/G/I	1	(3.1)	0
A, G/I	1	(3.1)	1
B/H, A/B/H	1	(3.1)	0
A/B/H, －	4	(12.5)	0
G/I, －	1	(3.1)	0
小計	25	(78.1)	2
未保有	7	(21.9)	0
計	32	(100)	2

表4　鶏肉由来株の遺伝子型別結果

No	検体No	枝番	SEs遺伝子検索PCR		POT型別法				MLVA法		PFGE法		H24年度汚染実態調査	
			エンテロトキシン型	供試株数*	POT型			供試株数*	パターン	供試株数*	パターン	供試株数*	分離地研	検体番号
1	KA01	1	G/I	4	0	0	0	4	ML01	4	PF01	4	神奈川県	鶏肉5
2	AK04	1	G/I	5	0	1	0	4	ML02	2	PF02	1	秋田県	鶏肉5
3	AK11	1	G/I	3	0	1	0	2	ML02	2	PF02	1	秋田県	鶏肉13
4	AK08	1	A	1	0	1	1	1	ML04	1	PF03	1	秋田県	鶏肉9
5	AK12	1	−	1	0	3	1	1	ML05	1	PF04	1	秋田県	鶏肉16
6	SA13	1	G/I	2	0	9	16	2	ML06	2	PF05	1	さいたま市	鶏肉20
7	AK05	1	G/I	1	0	25	80	1	ML07	1	PF06	1	秋田県	鶏肉6
8	AK06	1	−	3	0	27	80	2	ML08	2	PF07	1	秋田県	鶏肉7
9	AK07	1	−	1	0	27	80	1	ML08	1	PF07	1	秋田県	鶏肉8
10	SA12	1	A	2	0	113	17	2	ML09	2	PF08	1	さいたま市	鶏肉19
11	SA01	1	A/B/H	1	2	1	0	1	ML10	1	PF09	1	さいたま市	鶏肉1
12	SA01	2	B/H	1	2	1	0	1	ML11	1	PF10	1	さいたま市	鶏肉1
13	SA02	1	A/B/H	2	2	1	0	2	ML10	2	PF09	1	さいたま市	鶏肉2
14	SA07	1	A/B/H	1	2	1	0	1	ML10	1	PF09	1	さいたま市	鶏肉11
15	SA08	1	A/B/H	4	2	1	0	4	ML10	2	PF09	1	さいたま市	鶏肉12
16	SA10	1	A/B/H	2	2	1	0	2	ML10	2	PF09	1	さいたま市	鶏肉16
17	SA11	1	A/B/H	5	2	1	0	5	ML10	2	PF09	1	さいたま市	鶏肉17
18	SA02	2	−	1	2	53	32	1	ML12	1	PF11	1	さいたま市	鶏肉2
19	SA02	3	−	2	2	53	32	2	ML13	1	PF12	1	さいたま市	鶏肉2
20	SA05	1	−	4	2	53	32	4	ML13	2	PF12	1	さいたま市	鶏肉9
21	SA06	1	−	4	2	53	32	4	ML13	2	PF12	1	さいたま市	鶏肉10
22	SA07	2	−	3	2	53	32	3	ML13	2	PF12	1	さいたま市	鶏肉11
23	SA08	2	−	1	2	53	32	1	ML12	1	PF11	1	さいたま市	鶏肉12
24	SA08	3	−	1	2	53	32	1	ML13	1	PF12	1	さいたま市	鶏肉12
25	SA11	2	−	1	2	53	32	1	ML12	1	PF11	1	さいたま市	鶏肉17
26	AK02	1	G/I	3	4	0	0	2	ML15	2	PF14	1	秋田県	鶏肉2
27	AK03	1	G/I	3	4	0	0	2	ML15	2	PF14	1	秋田県	鶏肉4
28	KA02	1	G/I	3	4	0	0	3	ML15	3	PF14	3	神奈川県	鶏肉8
29	AK14	1	G/I	6	4	8	80	2	ML16	2	PF15	1	秋田県	鶏肉18
30	AK08	2	G/I	4	4	16	0	4	ML19	2	PF18	1	秋田県	鶏肉9
31	AK09	1	G/I	4	4	16	0	2	ML19	2	PF18	1	秋田県	鶏肉10
32	KA03	1	G/I	3	4	16	0	1	ML17	1	PF22	1	神奈川県	鶏肉9
33	KA03	2	G/I		4	16	0	1	ML17	1	PF20	1	神奈川県	鶏肉9
34	KA03	3	G/I		4	16	0	1	ML17	1	PF21	1	神奈川県	鶏肉9
35	KA04	1	G/I	1	4	16	0	1	ML17	1	PF23	1	神奈川県	鶏肉10
36	SA03	1	G/I	2	4	16	0	2	ML17	2	PF19	1	さいたま市	鶏肉4
37	SA04	1	G/I	2	4	16	0	2	ML17	2	PF19	1	さいたま市	鶏肉5
38	AK01	1	G/I	3	4	18	16	3	ML17	2	PF16	1	秋田県	鶏肉1
39	AK05	2	G/I	3	4	18	16	3	ML17	2	PF16	1	秋田県	鶏肉6
40	AK10	1	G/I	4	4	18	16	2	ML17	2	PF16	1	秋田県	鶏肉11
41	AK05	3	−	1	4	24	0	1	ML18	1	PF17	1	秋田県	鶏肉6
42	SA09	1	−	2	4	82	97	2	ML18	2	PF24	1	さいたま市	鶏肉13
43	AK13	1	−	2	6	0	64	2	ML20	2	UT	1	秋田県	鶏肉17
44	AK12	2	−	2	6	0	84	2	ML21	2	UT	1	秋田県	鶏肉16
45	KA05	1	A/C/G/I	3	6	132	32	3	ML23	3	PF26	3	神奈川県	鶏肉13
型数、供試株数				107	19種			94	20種	77	24種	52		

＊　同じ検体において同じSEs型、POT型、MLVA型、PFGE型に分類された菌株数

表5　検体別遺伝子型別結果

No	検体No	SEs遺伝子検索	POT型別法			MLVA法	PFGE法	No	検体No	SEs遺伝子検索	POT型別法			MLVA法	PFGE法
		ｴﾝﾃﾛﾄｷｼﾝ型	POT型			パターン	パターン			ｴﾝﾃﾛﾄｷｼﾝ型	POT型			パターン	パターン
1	AK01	G/I	4	18	16	ML17	PF16	19	KA04	G/I	4	16	0	ML17	PF23
2	AK02	G/I	4	0	0	ML15	PF14	19	KA05	A/C/G/I	6	132	32	ML23	PF26
3	AK03	G/I	4	0	0	ML15	PF14	20	SA01	A/B/H	2	1	0	ML10	PF09
4	AK04	G/I	0	1	0	ML02	PF02			B/H	2	1	0	ML11	PF10
5	AK05	G/I	0	25	80	ML07	PF06	21	SA02	A/B/H	2	1	0	ML10	PF09
		G/I	4	18	16	ML17	PF16			-	2	53	32	ML12	PF11
		-	4	24	0	ML18	PF17			-	2	53	32	ML13	PF12
6	AK06	-	0	27	80	ML08	PF07	22	SA03	G/I	4	16	0	ML17	PF19
7	AK07	-	0	27	80	ML08	PF07	23	SA04	G/I	4	16	0	ML17	PF19
8	AK08	A	0	1	1	ML04	PF03	24	SA05	-	2	53	32	ML13	PF12
		G/I	4	16	0	ML19	PF18	25	SA06	-	2	53	32	ML13	PF12
9	AK09	G/I	4	16	0	ML19	PF18	26	SA07	A/B/H	2	1	0	ML10	PF09
10	AK10	G/I	4	18	16	ML17	PF16			-	2	53	32	ML13	PF12
11	AK11	G/I	0	1	0	ML02	PF02	27	SA08	A/B/H	2	1	0	ML10	PF09
12	AK12	-	0	3	1	ML05	PF04			-	2	53	32	ML12	PF11
		-	6	0	84	ML21	UT			-	2	53	32	ML13	PF12
13	AK13	-	6	0	64	ML20	UT	28	SA09	-	4	82	97	ML18	PF24
14	AK14	G/I	4	8	80	ML16	PF15	29	SA10	A/B/H	2	1	0	ML10	PF09
15	KA01	G/I	0	0	0	ML01	PF01	30	SA11	A/B/H	2	1	0	ML10	PF09
16	KA02	G/I	4	0	0	ML15	PF14			-	2	53	32	ML12	PF11
17	KA03	G/I	4	16	0	ML17	PF22	31	SA12	A	0	113	17	ML09	PF08
		G/I	4	16	0	ML17	PF20	32	SA13	G/I	0	9	16	ML06	PF05
		G/I	4	16	0	ML17	PF21								

表6　食中毒事例由来離株の遺伝子型別結果

株No	事例No（発生年）	検体種	枝番	SEs遺伝子検索	POT型別法			MLVA法	PFGE法
				ｴﾝﾃﾛﾄｷｼﾝ型	POT 型			パターン	パターン
1	FU01	患者便	1	A	2	193	33	ML14	PF13
2		従業員手指	2	A	2	193	33	ML14	PF13
3	(2009)	残食品	3	A	2	193	33	ML14	PF13
4	FU02	患者便	1	A	0	1	0	ML03	PF03
5	(2011)	患者吐物	2	G,I	6	18	81	ML22	PF25

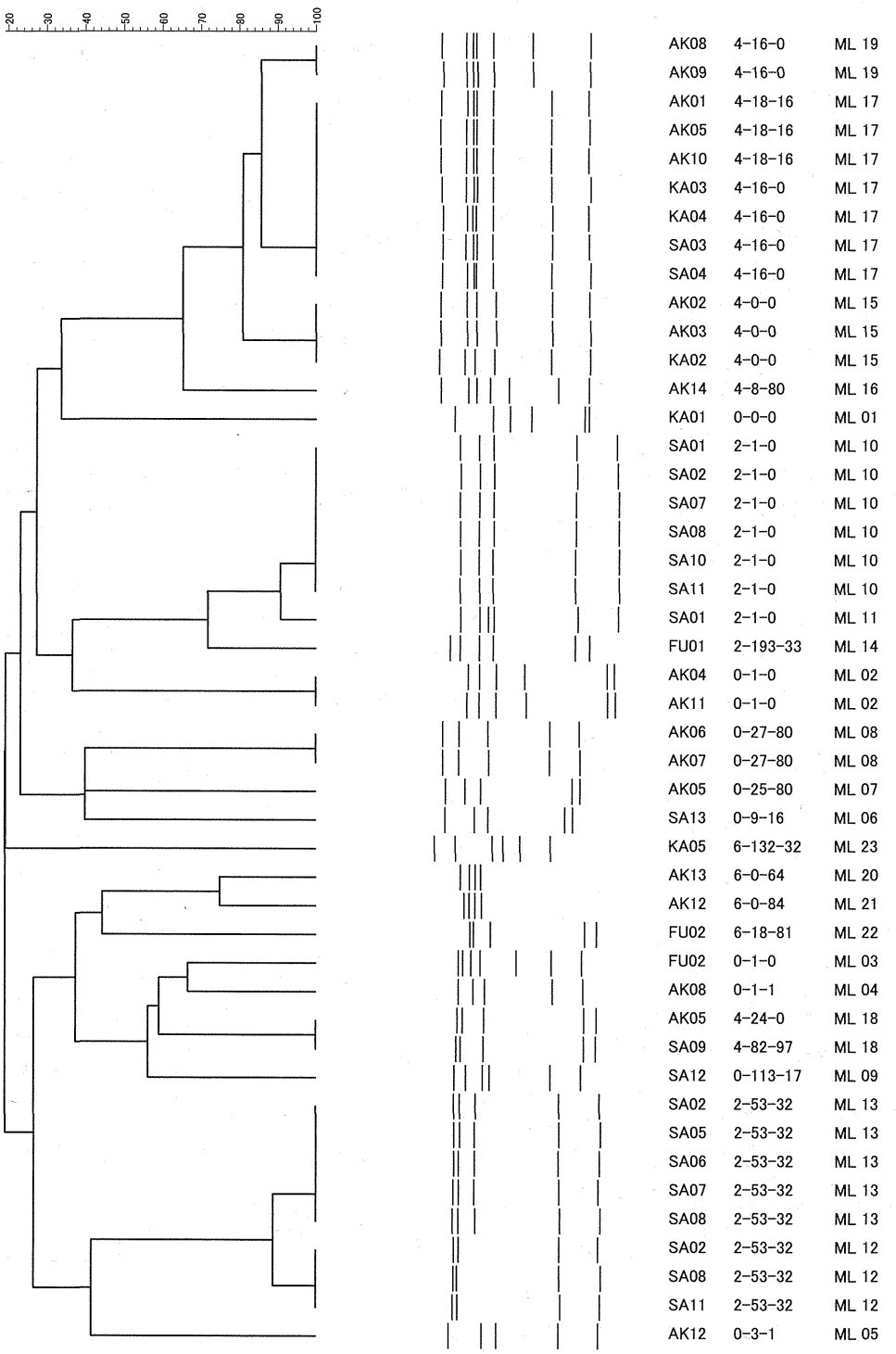
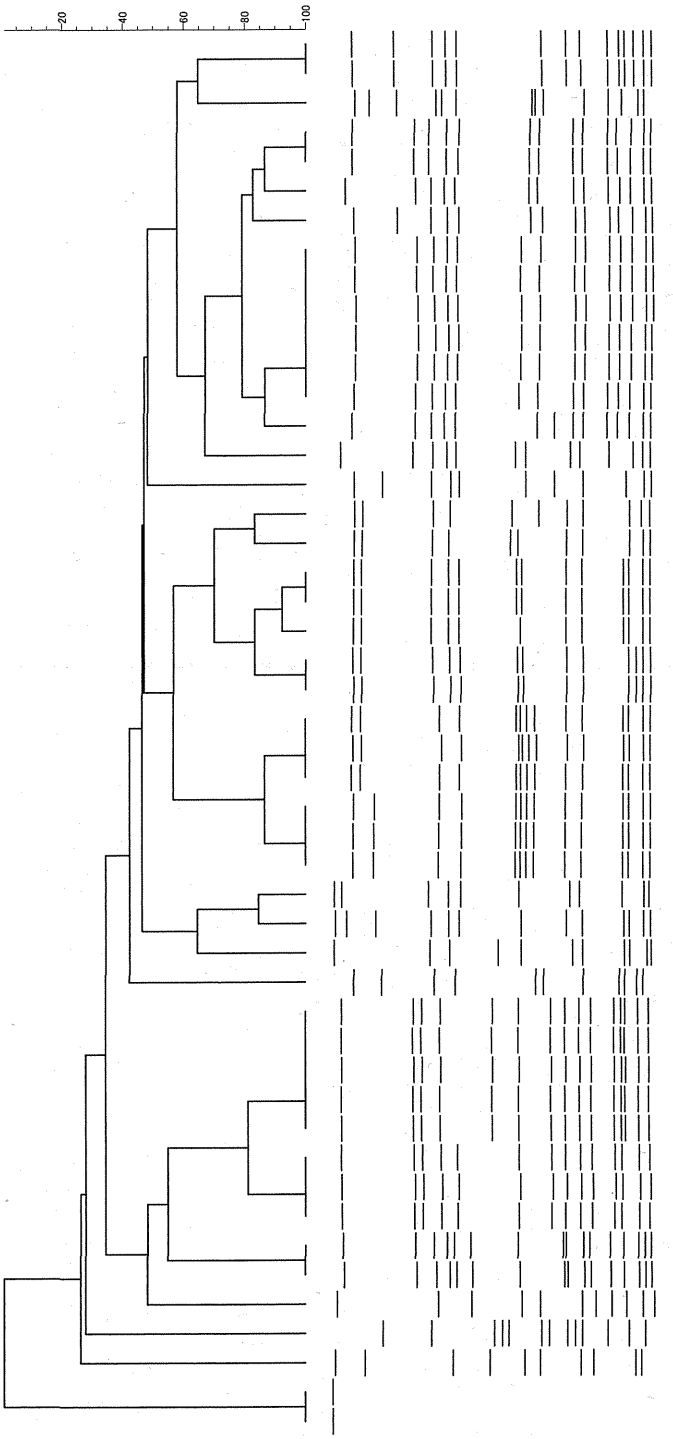


図１　MLVA パターン系統樹



AK07	–	0-27-80	ML 08	PF 07
AK06	–	0-27-80	ML 08	PF 07
SA09	–	4-82-97	ML 18	PF 24
FU02	A	0-1-0	ML 03	PF 03
AK08	A	0-1-1	ML 04	PF 03
FU01	A	2-193-33	ML 14	PF 13
SA12	A	0-113-17	ML 09	PF 08
SA01	A/B/H	2-1-0	ML 10	PF 09
SA02	A/B/H	2-1-0	ML 10	PF 09
SA07	A/B/H	2-1-0	ML 10	PF 09
SA08	A/B/H	2-1-0	ML 10	PF 09
SA10	A/B/H	2-1-0	ML 10	PF 09
SA11	A/B/H	2-1-0	ML 10	PF 09
SA01	B/H	2-1-0	ML 11	PF 10
AK12	–	0-3-1	ML 05	PF 04
AK14	G/I	4-8-80	ML 16	PF 15
KA03	G/I	4-16-0	ML 17	PF 20
KA03	G/I	4-16-0	ML 17	PF 21
SA03	G/I	4-16-0	ML 17	PF 19
SA04	G/I	4-16-0	ML 17	PF 19
KA03	G/I	4-16-0	ML 17	PF 22
AK08	G/I	4-16-0	ML 19	PF 18
AK09	G/I	4-16-0	ML 19	PF 18
AK10	G/I	4-18-16	ML 17	PF 16
AK01	G/I	4-18-16	ML 17	PF 16
AK05	G/I	4-18-16	ML 17	PF 16
AK02	G/I	4-0-0	ML 15	PF 14
AK03	G/I	4-0-0	ML 15	PF 14
KA02	G/I	4-0-0	ML 15	PF 14
AK05	G/I	0-25-80	ML 07	PF 06
KA04	G/I	4-16-0	ML 17	PF 23
SA13	G/I	0-9-16	ML 06	PF 05
AK05	–	4-24-0	ML 18	PF 17
SA02	–	2-53-32	ML 13	PF 12
SA05	–	2-53-32	ML 13	PF 12
SA06	–	2-53-32	ML 13	PF 12
SA07	–	2-53-32	ML 13	PF 12
SA08	–	2-53-32	ML 13	PF 12
SA02	–	2-53-32	ML 12	PF 11
SA08	–	2-53-32	ML 12	PF 11
SA11	–	2-53-32	ML 12	PF 11
AK04	G/I	0-1-0	ML 02	PF 02
AK11	G/I	0-1-0	ML 02	PF 02
KA05	A/C/G/I	6-132-32	ML 23	PF 26
KA01	G/I	0-0-0	ML 01	PF 01
FU02	G/I	6-18-81	ML 22	PF 25
AK13	–	6-0-64	ML 20	PF –
AK12	–	6-0-84	ML 21	PF –

図２　PFGE パターン系統樹

分　担　研　究　報　告　書

*Campylobacter jejuni*の遺伝子型別法の評価

黒木　俊郎

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）
食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究
研究代表者　大西　貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究報告書
Campylobacter jejuni の遺伝子型別法の評価

研究分担者　黒木俊郎（神奈川県衛生研究所微生物部）
研究分担者　泉谷秀昌（国立感染症研究所細菌第一部）
研究協力者　相川勝弘（神奈川県衛生研究所微生物部）
研究協力者　古川一郎（神奈川県衛生研究所微生物部）

Campylobacter jejuni による食中毒の発生時における原因物質の特定や感染経路の解明、食中毒の規模の把握等の疫学解析には、PFGE 法が広く普及し、多用されている。ところが PFGE 法では結果を得るまでに 3～4 日を要する、複数の機関間での結果の比較が必ずしも容易ではないといった課題がある。そこで、これらの課題を解決し、複数の遺伝子型別法による疫学的解析を可能にするために、*C. jejuni* における特定の遺伝子の有無を PCR 法により検出することにより型別を行う comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40)の導入を行うために、当該解析法の評価を行った。今年度の解析では、2 機関において *C. jejuni* の分離株を用いて CGF40 を実施したところ、結果の不一致が見られた。そのため、結果を一致させるために PCR 条件の設定の検討が必要となった。

A. 研究目的

C. jejuni は細菌性食中毒の主要な原因菌である。食中毒の発生時には原因物質の特定や感染経路の解明、食中毒の規模の把握のために、疫学解析としての分離菌株の型別は不可欠である。*Campylobacter* の型別法には、血清型別、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法、Amplified fragment length polymorphism (AFLP)法などがある。このうち、識別能が高いことや操作が容易であること、解析機器が普及していることなどから PFGE 法が最も普及している。

PFGE 法には多くの利点があるが、その一方で、結果を得るまでに 3～4 日を要するため、迅速に結果を得ることができない、フラグメント解析法であるために複数の機関が実施した解析結果を比較することが必ずしも容易ではないといった課題がある。そのため、これらの課題を解決する解析法を導入し、疫学解析の場において複数の型別法の選択肢があることが望まれる。

C. jejuni の PCR を用いた型別法 comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40) が 2012 年に Taboada らにより提案された。そこで本研究では、CGF40 の導入に向けて、CGF40 の評価を行った。

B. 研究方法

神奈川県衛生研究所において鶏肉から分離した *C. jejuni* 保存株 13 株と *C jejuni* ATCC33560 を対象にした（表１）。CGF40 は対象とする 40 の遺伝子を 5 つずつの 8 セットに分け、各 5 つの対象遺伝子は multiple-PCR により同時に検出する。CGF40 の PCR 条件は、既報に従った。Taq polymerase は Ex Taq Hot Start Version

（タカラバイオ）、EmeraldAmp PCR Master Mix（タカラバイオ）およびKOD FX Neo（東洋紡）を用いた。PCRは94℃、5分の後に、94℃、30秒；55℃、30秒；72℃、30秒を1サイクルとし、35サイクルを実施し、その後72℃で5分間加熱して完全に伸長させた。PCR後に3.0%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線下で観察した。CGF40は神奈川県衛生研究所微生物部と国立感染症研究所細菌第一部において実施し、結果を比較した。

C. 研究結果

C. jejuni 14株を対象に実施した結果を表2-1および表2-2に示した。解析の対象とした14株のうち12株は2機関で実施した。

PCRで使用するTaq polymeraseは3種類としたが、それぞれのTaq polymeraseによりPCRの結果が異なる対象遺伝子があった。Ex Taq Hot Start VersionとEmeraldAmp PCR Master Mixによる結果を比較した場合は、40遺伝子中、17遺伝子で2機関の結果が異なっていた。このうち、10遺伝子ではEx Taq Hot Start Version（＋）、EmeraldAmp PCR Master Mix（－）であり、7遺伝子ではEx Taq Hot Start Version（－）、EmeraldAmp PCR Master Mix（＋）であった。これに対して、Ex Taq Hot Start VersionとKOD FX Neoによる結果を比較した場合は、40遺伝子中、15遺伝子で2機関の結果が異なっていた。このうち、5遺伝子ではEx Taq Hot Start Version（＋）、KOD FX Neo（－）であり、8遺伝子ではEx Taq Hot Start Version（－）、KOD FX Neo（＋）で、2遺伝子ではEx Taq Hot Start Version（＋）、KOD FX Neo（－）とEx Taq Hot Start Version（－）、KOD FX Neo（＋）の組み合わせが混在していた。2機関の結果を比較した12株中、結果が一致したのはEx Taq Hot Start VersionとEmeraldAmp PCR Master Mixの組み合わせでは、C05140とC05161の2株、Ex Taq Hot Start VersionとKOD FX Neoの組み合わせでは、C05062とC05161の2株であった。

D. 考察

*Campylobacter*の型別法としては、血清型別（Lior法及びPenner法）や薬剤耐性パターンによる型別（antimicrobial resistotyping）があり、遺伝学的手法を用いた型別法として Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)法、Restriction fragment length polymorphism (RFLP)法、リボタイピング、Amplified fragment length polymorphism (AFLP)法、Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)法、Multilocus sequence typing (MLST)法、*fla* typing法、Single Nucleotide Polymorphism (SNP：一塩基多型)解析法がある。*C. jejuni*による食中毒の疫学調査では、操作性や簡易性等の理由からPFGE法が最も多用されている。PFGE法は識別能が高いなどの利点があるが、結果を得るのに3～4日を要することや、フラグメント解析法であるために複数の機関での結果の比較に限界があるといった課題がある。そこで、短時間で結果が得られ、複数の機関間での結果の比較を容易に行うことが可能な解析法の導入が望まれる。腸管出血性大腸菌感染症でも同様の課題が存在しており、腸管出血性大腸菌O157では、疫学的解析においてはPFGE法が主流ではあるが、短時間で結果が得られ、複数の機関間で結果の比較が容易なIS-printing法が近年急速に普及している。

*C. jejuni*の遺伝子型別法として開発されたCGF40は、*C. jejuni*の染色体中の遺伝子の中から40の遺伝子を対象に、その保有の有無に基づいて型別を行うfingerprinting法である。*C. jejuni*

NCTC11168 の全塩基配列が決定され、1,641,481bp の長さで、1,623 の ORF が識別された。この中から、*C. jejuni* における保有頻度から 40 の遺伝子を選択し、SNP-free 部位にプライマーを設定して、その保有を PCR により検出し、遺伝子の有無による型別法としている。

今年度の CGF40 の検討により、2 機関での結果に相違がみられたことから、結果が一致する PCR 条件を見出すことが必要となった。今後、PCR で使用する Taq polymerase を変える、PCR 条件を変えるなどの変更を加え、結果が安定する条件を探る。

E. 結論

神奈川県衛生研究所微生物部と国立感染症研究所細菌第一部の 2 機関において、*C. jejuni* の複数の同一株を対象として CGF40 を実施したところ、結果に不一致が見られた。この不一致の一因は、使用する Taq polymerase によると推測された。そこで、今後、使用する Taq polymerase の検討や PCR 条件の設定を検討することにより、結果が安定する条件を見出すこととした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

I. 参考文献

1. Taboada EN, Ross SL, Mutschall SK, Mackinnon JM, Roberts MJ, Buchanan CJ, Kruczkiewicz P, Jokinen CC, Thomas JE, Nash JH, Gannon VP, Marshall B, Pollari F, Clark CG. Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):788-97.
2. Clark CG, Taboada E, Grant CC, Blakeston C, Pollari F, Marshall B, Rahn K, Mackinnon J, Daignault D, Pillai D, Ng LK. Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):798-809.
3. Wassenaar TM, Geilhausen B, Newell DG.: Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. Appl Environ Microbiol. 1998 May;64(5):1816-21.

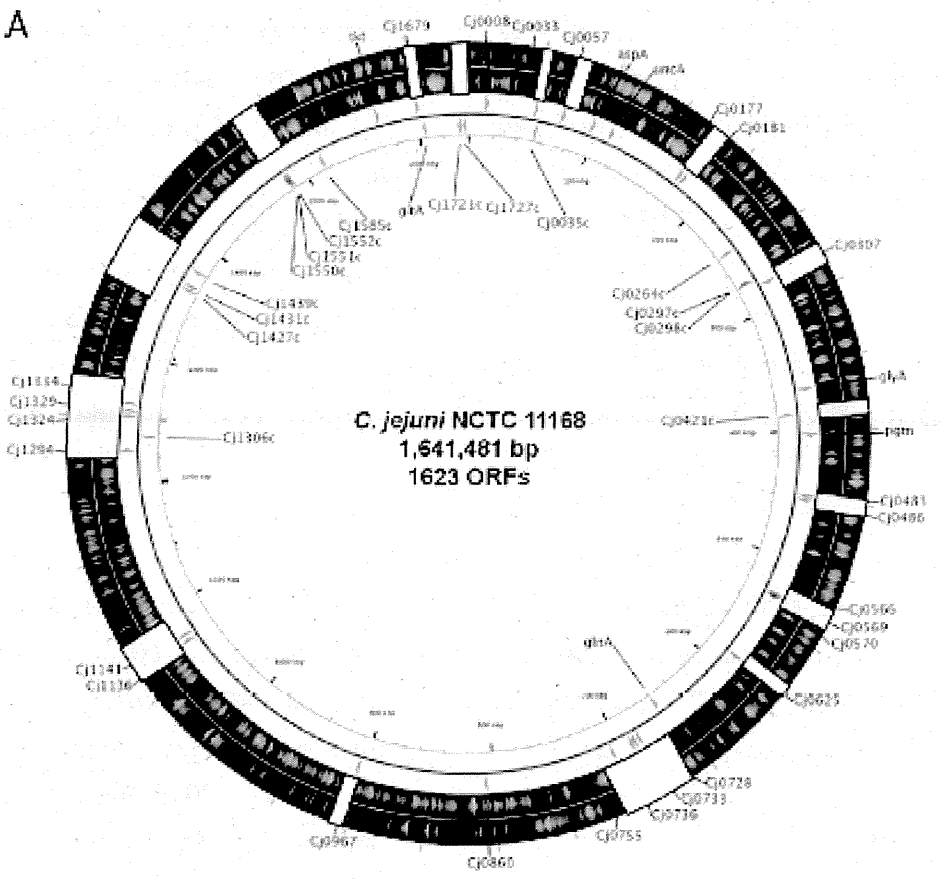


図１． *Campylobacter jejuni* NCTC11168 の塩基配列中の CGF40 の対象となる ORF の分布

出典：Taboada EN, et al.: Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):788-97.

表１　供試菌株の由来

菌株番号	検体	購入日	店舗
C05031	鶏ひき肉	2005年8月8日	A
C05035	鶏ひき肉	2005年9月27日	A
C05041	鶏ひき肉	2005年9月27日	B
C05051	鶏ひき肉	2005年9月27日	C
C05056	鶏ひき肉	2005年9月27日	D
C05058	鶏ひき肉	2005年9月27日	D
C05062	鶏ひき肉	2005年9月27日	D
C05083	鶏ひき肉	2005年9月27日	E
C05107	鶏ひき肉	2005年9月27日	F
C05117	鶏ひき肉	2005年11月21日	G
C05134	鶏ひき肉	2005年11月21日	G
C05140	鶏ひき肉	2005年11月21日	H
C05161	鶏ひき肉	2005年11月21日	H
ATCC 33560	－	－	－

表 2-1　*Campylobacter jejuni* 14 株の CGF40 による解析結果

菌株 No.		CGF_MP1					CGF_MP2					CGF_MP3					CGF_MP4					CGF_MP5					CGF_MP6					CGF_MP7					CGF_MP8				
		Cj 0238c	Cj 0728	Cj 0570	Cj 0181	Cj 0483	Cj 0057	Cj 0880	Cj 1434c	Cj 0733	Cj 1427c	Cj 0397c	Cj 1727c	Cj 0394c	Cj 0008	Cj 1565	Cj 1550c	Cj 1329	Cj 0177	Cj 1334	Cj 0565	Cj 0401c	Cj 0033	Cj 0486	Cj 0569	Cj 0625	Cj 0755	Cj 0763	Cj 0067	Cj 1141	Cj 1138	Cj 1134	Cj 1552	Cj 1439	Cj 1721	Cj 1679	Cj 1294	Cj 1151	Cj 0307	Cj 1324	Cj 0035
		198 bp	296	405	486	612	175	282	307	441	613	300	369	406	524	630	188	307	399	462	558	100	206	301	399	498	101	205	301	413	510	152	222	307	415	529	160	241	347	440	541
C05117	1	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	−	+	+
C05031	1	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
C05035	1	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	+	+	+
	2	+	+	+	−	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	+	+	+
C05051	1	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	+	+	+	+	+
C05134	1	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+
C05140	1	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+
C05056	1	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+
	2																																								
C05062	1	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+
	2	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+
C05107	1	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+
	2	+	−	−	−	−	+	−	+	−	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	−	+
C05041	1	+	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+
	2	+	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
C05083	1	+	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+
	2	+	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
C05161	1	+	+	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+
	2	+	+	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+
C05058	1	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+
	2	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+
ATCC 33	1	−	+	+	−	−	+	−	−	+	+	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+

1: Ex Taq Hot Start Version

2: EmeraldAmp PCR Master Mix

表 2-2

菌株 No.		CGF_MP1					CGF_MP2					CGF_MP3					CGF_MP4					CGF_MP5					CGF_MP6					CGF_MP7					CGF_MP8				
		Cj 0288c	Cj 0728	Cj 0570	Cj 0181	Cj 0453	Cj 0057	Cj 0860	Cj 1431c	Cj 0733	Cj 1427c	Cj 0237c	Cj 1727c	Cj 0224c	Cj 0008	Cj 1585	Cj 1555c	Cj 1329	Cj 0177	Cj 1334	Cj 0566	Cj 0471c	Cj 0033	Cj 0486	Cj 0569	Cj 0625	Cj 0755	Cj 0763	Cj 0967	Cj 1141	Cj 1136	Cj 1134	Cj 1552	Cj 1439	Cj 1721	Cj 1679	Cj 1294	Cj 1151	Cj 0307	Cj 1324	Cj 0035
		198	296	405	486	612	175	282	307	441	613	300	369	406	524	630	188	307	399	462	558	100	206	301	399	498	101	205	301	413	510	152	222	307	415	529	160	241	347	440	541
C05117	1	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	−
C05031	1	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	+	+	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
C05035	1	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	+	+	+
C05051	1	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
C05134	1	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C05140	1	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	+	+	+
C05056	1	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+
	2																																								
C05062	1	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+
	2	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+
C05107	1	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+
	2	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+
C05041	1	+	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+
	2	+	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	−	+	−	+
C05083	1	+	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+
	2	+	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+
C05161	1	+	+	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+
	2	+	+	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+
C05058	1	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	+
	2	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	+
ATCC 33	1	−	+	+	−	−	+	−	−	+	+	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	+

1: Ex Taq Hot Start Version

2: KOD FX Neo

分　担　研　究　報　告　書

食品の食中毒起因微生物検査に係る
サンプリングプランのモデリング

小西　良子