

令和2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）
食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究
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

Escherichia albertii の制御法の確立

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

E. albertii 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

研究要旨

日本では、*E. albertii*による集団食中毒事例の発生が多数報告されているが、原因食品が特定された事例はわずかし報告されていない。このため、原因食品特定に対応する食品中の *E. albertii* を迅速かつ高感度に検出する遺伝子検査法の確立を目標に研究を行った。その結果、*E. albertii* に特異性が高く、感度も優れた1組のリアルタイム PCR のプライマーおよびプローブが選定された。*E. albertii* を接種した食品検体を増菌培養して、そこから検出したところ、鶏肉 25 g あたりに 1 cfu 以上の *E. albertii* が汚染している場合でリアルタイム PCR 陽性となった。さらに、実際の鶏検体においても以前検討した nested PCR よりも *E. albertii* の検出に優れていることが示されたため、実試験での応用性も示された。今後食中毒事例発生時や、食品などの汚染実態を調査する際に本リアルタイム PCR を活用し、試験を実施したい。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 新井沙倉、大屋賢司、大西貴弘

A. 研究目的

日本において *E. albertii* 食中毒が発生しているが、原因食品が特定された事例は少ない(大岡, 日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017)。このため、原因食品特定に対応する *E. albertii* の検査法を確立することが求められている。

E. albertii 同定用プライマーには、*clpX*、*lysP*、*mdh* を標的とした Hyma らのマルチプレックス PCR (J. Bacteriol, 2005, 187(2), 619-628) が広く用いられているが、食品(野菜)を対象とした試験で、本プライマーが非特異的反応を示すことが Maeda らによって発表された (Jpn. J.

Infect. Dis., 2014, 67, 503-505)。また、本研究事業の別の分担研究を実施する大岡唯祐研究分担者の報告したEACBF2103およびEACBF2104遺伝子を検出対象としたnested PCR法(Ooka et al., Genome. Biol. Evol., 2015, 7(12), 3170-3179)は、PCR反応を2回繰り返すため煩雑であり、判定までに時間を要する。そこで、判定までの時間を短縮し、感度が高く、食品検査分野でも広く使用されている遺伝子検出系としてリアルタイムPCRに着目した。昨年度は、*E. albertii*特異的リアルタイムPCRのプライマーおよびプローブセットを設計し、その反応組成と特異性試験を実施した。今年度は、昨年度選定したプライマーおよびプローブセットにおいて、検討した反応条件を元に、感度測定や食品培養液を用いた検討を実施した。さらに、実際の鶏検体への応用性についても検討した。

B. 研究方法

(1) 特異性試験

昨年度 *E. albertii* 特異的リアルタイムPCR用の1組のプライマーおよびプローブ候補(EA_rt2)を設計した。その特異性試験の際に、ZENとIBFQの2種類のクエンチャーで標識したFAM/ZEN/IBFQ標識プローブを使用していたため、今年度はより広く使用されているFAM/BHQ1標識プローブを用いて改めて特異性試験を実施した。また、新たに菌株を追加し、特異性を

再評価した。

1) 菌株

食中毒および下痢症の事例由来株、無症状保菌者由来株、動物由来株、食品由来株の合計43株の *E. albertii* を供試した(表1)。また、その他の細菌種として、*E. albertii* の遺伝的近縁種である *Escherichia coli*、*Escherichia fergusonii*、*Hafnia alvei*、*Shigella boydii*、*Shigella dysenteriae*、*Shigella sonnei*(Lukjancenko et al., Microb. Ecol., 2010, 60(4), 708-720; Oh et al., J. Microbiol., 2011, 49(5), 747-752; Na et al., J. Microbiol., 2018, 56(4), 280-285)に加え、各種食中毒細菌や食品由来細菌の合計25菌種、29株を供試した(表1)。

2) DNA溶液の調製

E. albertii 株は、カジトン培地に保存している菌株1エーゼ分(10 μL)をTSB 10 mLに接種し、37°Cにて18時間培養した。その他の菌株は、-80°Cに冷凍保管されている菌株1エーゼ分(10 μL)をTSB 5 mLに接種し、37°Cにて18時間培養した。菌培養液をNucleoSpin Tissueキットを用いたDNA抽出に供試した。抽出DNAの濃度をNanodrop 2000によって測定した。抽出DNA溶液を滅菌DWにて2 ng/μLの濃度に希釈した。この希釈DNA溶液をリアルタイムPCRのテンプレートとした。

3) リアルタイム PCR

EA_rt2 (表 2) のプライマーおよび 2 種類のプローブそれぞれを供試し、リアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR 試薬には、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた。上記にて調整した DNA 溶液を 5 μ L 加えた。リアルタイム PCR は、EA_rt2 のみを検出する条件 (Single) に加え、食品培養液中の細菌全般を検出し、食品による PCR 阻害の評価に利用される 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーおよびプローブを混合した条件 (Duplex) の 2 通りを行った (表 3)。この 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーおよびプローブの配列および反応溶液中の濃度は、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と共通の条件を利用した。1 菌株につき 3 反応実施した。機器は Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。50°C2 分および 95°C10 分の熱変性ののち、95°C15 秒-60°C1 分を 45 サイクル増幅反応させた。3 反応のうち 1 反応でも蛍光が検出された場合は陽性と判定した。

(2) *E. albertii* 株培養液によるリアルタイム PCR の感度測定

1) 菌株

E. albertii の type strain である JCM 17328^T 1 株を供試した。

2) DNA 抽出

カジトン培地に保存している菌株 1 エーゼ分 (10 μ L) を TSB10 mL に接種し、37°Cにて 18 時間培養した。この菌培養液 1 mL を 10,000 \times g にて 10 分間遠心し、沈渣に滅菌リン酸緩衝食塩水 (滅菌 PBS) を 1 mL 加え混和した溶液を原液とした。滅菌 PBS にて 10⁻¹ から 10⁻⁷ まで 10 倍階段希釈し、原液から 10⁻⁷ の希釈溶液 (想定 10⁹~10² cfu/mL) の各 100 μ L を以下の方法でアルカリ熱抽出法に供試した。菌培養液 100 μ L を 10,000 \times g にて 10 分間遠心し、沈渣に 50mM NaOH を 85 μ L 加え混和後、100°C にて 10 分間加熱した。冷却後、1M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μ L 加え、10,000 \times g にて 10 分間遠心し、その上清を DNA 溶液として保存した。

3) リアルタイム PCR

前述の (1) 3) と同様に実施した。但し、FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブおよび FAM/BHQ1 標識プローブを使用した EA_rt2 の 2 種類についてそれぞれ Single と Duplex の 2 通りを行った (表 3)。1 濃度につき 3 反応実施した。

(3) リアルタイム PCR の食品培養液での感度の検討

E. albertii は野鳥からの分離報告が多く、過去に鶏肉からも分離されているため (Asoshima *et al.*, Jpn. J. Infect. Dis., 2015, 68, 248-250; Maeda *et al.*, J. Vet. Med. Sci.,

2015, 77(7), 871-873; Wang *et al.*, *Epidemiol. Infect.*, 2016, 144, 45-52)、鶏肉培養液を利用し感度を検討することとした。

1) 菌株

食中毒事例由来株である EA12、EA21、EA24、EA29 の 4 株を供試した。

2) DNA 溶液の調製

カジトン培地に保存している 4 株の 1 エーゼ分 (10 μ L) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。鶏肉検体を 25 g 採取し、modified EC 培地 (mEC、日水製薬) およびノボビオシン加 mEC (NmEC、栄研化学) 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42°C にて 22 \pm 2 時間培養した。この鶏肉培養液にて *E. albertii*4 菌株の増菌培養液を 10 倍階段希釈し、菌接種鶏肉培養液 (想定 10⁶~10² cfu/mL 鶏肉培養液) を調製した。菌接種鶏肉培養液各 100 μ L を上記アルカリ熱抽出法に供試した。抽出 DNA をリアルタイム PCR のテンプレート (想定 10³~10⁻¹ cfu/ μ L) とした。

3) リアルタイム PCR

前述の (1) 3) と同様に実施した。但し、FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブおよび FAM/BHQ1 標識プローブを使用した EA_rt2 の 2 種類についてそれぞれ Duplex にて行った。1 濃度につき 3 反応実施した。

(4) 菌を接種した鶏肉でのリアルタイム

PCR 検出の検討

前述の (3) 1) と同様に *E. albertii*4 菌株の 1 エーゼ分 (10 μ L) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。この菌液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて 10 倍階段希釈 (想定 10⁴~10¹ cfu/mL) した。希釈菌液各 100 μ L を鶏肉 25 g に接種 (想定 10³~1 cfu/25 g 鶏肉) し、mEC および NmEC 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42°C にて 22 \pm 2 時間培養した。培養液 100 μ L から上記アルカリ熱抽出法によって DNA を抽出した。抽出 DNA をリアルタイム PCR のテンプレートとした。リアルタイム PCR は、前述の (3) 3) と同様に実施した。

(5) 鶏検体での汚染実態調査

主に平成 30 年度の本研究事業にて nested PCR を行った鶏肉 (内臓肉も含む) の DNA を用いて、今回開発したリアルタイム PCR を実施した。過去の nested PCR は 1 検体あたり 1 反応のみ実施していたため、リアルタイム PCR の結果と一致しなかった場合は、追加で 2 反応を実施し、合計 3 反応とした。

1) Nested PCR

Nested PCR は、Ooka らが報告した方法 (*Genome. Biol. Evol.*, 2015, 7(12), 3170-3179) を参照した。酵素は、平成 30 年度の本研究事業にて報告した最も感度の優れていた TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いた。また、プライマー

(表 4) は、終濃度が 0.3 μM となるよう調製した。機器は MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Global Medical Instrumentation) を使用した。反応条件は、94°C 2 分間、94°C 30 秒間 - 54°C 30 秒間 - 68°C 1 分間の 30 サイクル、68°C 2 分間とした。1st PCR 後にその産物を ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック) によって精製し、それを用いて nested PCR の 2 段階目 (2nd PCR) を実施した。1st PCR および 2nd PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供試し、結果を判定した。

2) リアルタイム PCR

前述の (1) 3) と同様に実施した。但し、FAM/BHQ1 標識プローブを使用した EA_rt2 について Duplex にて行った。1 検体につき 3 反応実施した。

C. 研究結果

(1) 特異性試験

FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブを用いた EA_rt2 および FAM/BHQ1 標識プローブを用いた EA_rt2 共に供試した合計 43 株の全 *E. albertii* が陽性となり、合計 29 株のその他全ての細菌種では、陰性となった (表 1)。

(2) *E. albertii* 株培養液によるリアルタイム PCR の感度測定

FAM/ZEN/3IABkFQ 標識プローブ使用時に Duplex の条件下では、0.3 cfu/PCR

tube ($=6.8 \times 10$ cfu/mL) において 3 反応中 3 反応で遺伝子を検出した (表 5)。FAM/ZEN/3IABkFQ 標識プローブ使用時に Single の条件下、FAM/BHQ1 標識プローブ使用時に Single および Duplex の条件下では、3.4 cfu/PCR tube ($=6.8 \times 10^2$ cfu/mL) において 3 反応中 3 反応で遺伝子を検出した (表 5)。

得られた Ct 値と蛍光値をプロットした像では、いずれの条件でも等間隔に蛍光が検出されており (図 1~図 4)、特に Duplex の条件下では 16S rRNA 遺伝子の蛍光値が EA_rt2 の蛍光値よりも大幅に低かった (図 2、図 4)。また、いずれの条件でも菌濃度と Ct 値の間に高い相関が認められた (図 5~図 8)。

(3) リアルタイム PCR の食品培養液での感度の検討

FAM/ZEN/3IABkFQ 標識プローブ使用時は、mEC および NmEC で共に 5.4~7.5 cfu/PCR tube ($=1.1 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^3$ cfu/mL) において 3 反応中 3 反応で遺伝子を検出した (表 6)。FAM/BHQ1 標識プローブ使用時は、mEC の場合 0.6~7.5 cfu/PCR tube ($=1.1 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3$ cfu/mL)、NmEC の場合 0.5~7.5 cfu/PCR tube ($=1.1 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3$ cfu/mL) において 3 反応中 3 反応で遺伝子を検出した (表 6)。

(4) 菌を接種した鶏肉でのリアルタイム PCR 検出の検討

FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブおよび

FAM/BHQ1 標識プローブで共に 1.2~1.4 cfu/25 g 鶏肉以上の *E. albertii* を接種した条件にて遺伝子が検出された (表 7)。

(5) 鶏検体での汚染実態調査

合計 20 検体の市販鶏肉を試験したところ、1st PCR は全検体で陰性であった (表 8)。また、鶏肉部位 a の 1 検体が 2nd PCR 陽性であり、この 1 検体を含む鶏肉部位 a の 2 検体がリアルタイム PCR 陽性となった (表 8)。但し、2nd PCR およびリアルタイム PCR の両方で陽性となった鶏肉部位 a 検体 (ブランド H) はリアルタイム PCR において 3 反応中 3 反応が陽性 (Ct 値: 35.7、35.8、36.6) であり、リアルタイム PCR でのみ陽性となった鶏肉部位 a 検体 (ブランド A) は 3 反応中 1 反応が陽性 (Ct 値: 41.0) であった。

次に、養鶏場から直接購入した内臓 a~q の合計 17 種類の鶏検体について、mEC および NmEC にて増菌した培養液合計 234 検体を試験したところ、1st PCR は 26 検体、2nd PCR は 37 検体、リアルタイム PCR は 54 検体が陽性であった (表 9)。1st PCR で陽性の 26 検体は全て 2nd PCR 陽性であり、Nested PCR で陽性の 37 検体は全てリアルタイム PCR 陽性となった。

D. 考察

FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブを用いた

EA_rt2 および FAM/BHQ1 標識プローブを用いた EA_rt2 共に *E. albertii* のみを増幅し、非特異的反応が認められなかったため (表 1)、特異性が高いことが示された。

E. albertii 株培養液によるリアルタイム PCR の感度測定では、いずれの蛍光標識であっても検出限界が約 10^3 cfu/mL 以下となり、感度が優れていることが示された (表 5)。特に、Duplex の条件下において、16S rRNA 遺伝子の蛍光値が EA_rt2 の蛍光値よりも大幅に低かった (図 2、図 4) ことから、16S rRNA 遺伝子の増幅が EA_rt2 の蛍光値に影響を及ぼす可能性が低いと考えられた。今回利用した 16S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーおよびプローブ配列、さらにその濃度は、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と共通の条件を参照したが、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR においても Duplex の条件として利用可能であることが示された。

食品培養液でのリアルタイム PCR の感度を検討したところ、*E. albertii* 株培養液を使用した感度測定の際と同様に、検出限界が約 10^3 cfu/mL 以下となり、感度が優れていることが示された (表 6)。そのため、本試験に用いた鶏肉培養液においては、PCR 阻害は少ないものと予想される。なお、鶏肉の培養を mEC および NmEC で行ったが、増菌培地による検出感度の差はほとんど認められなかった。

次に、鶏肉に *E. albertii* を接種した検体で検討したところ、1.2~1.4 cfu/25

gであった(表7)ため、鶏肉 25 g あたりに 1 cfu 以上の *E. albertii* が汚染している場合は、本試験の増菌培養条件にて *E. albertii* 数が十分に増え、リアルタイム PCR にて検出できることが示された。なお、鶏肉の培養を mEC および NmEC で行ったが、増菌培地による検出感度の差は認められなかった。

鶏検体にて本リアルタイム PCR と nested PCR による検体中の *E. albertii* の検出結果を比較したところ、nested PCR 陽性検体は全てリアルタイム PCR 陽性となった。さらに、Nested PCR 陰性でリアルタイム PCR 陽性の結果が得られた検体が 17 検体存在したことから、鶏検体に関しては、nested PCR よりもリアルタイム PCR の方が検出に優れていることが示された。本試験から、本リアルタイム PCR の実検体での応用性が示された。

E. 結論

E. albertii 特異的リアルタイム PCR として、EA_rt2 の特異性と感度を測定したところ、本リアルタイム PCR は特異性が高く、感度も優れていることが示された。さらに、*E. albertii* を接種した食品検体を増菌培養して、そこから検出したところ、鶏肉 25 g あたりに 1 cfu 以上の *E. albertii* が汚染している場合でリアルタイム PCR 陽性となった。さらに、実際の鶏検体においても、以前検討した nested PCR よりも本リアルタイム PCR の方が *E.*

albertii の検出に優れていることが示され、実試験での応用性も示された。今後食中毒事例発生時や、食品などの汚染実態を調査する際に本リアルタイム PCR を応用したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Arai et al. Detection of *Escherichia albertii* from retail chicken in Japan using a novel quantitative polymerase chain reaction assay. (投稿予定)

(学会等発表)

令和 3 年度に発表予定

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

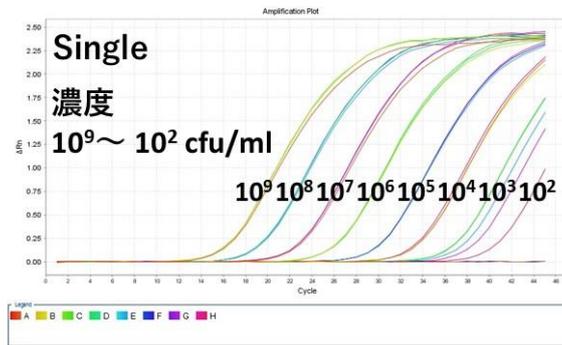


図 1. FAM/ZEN/IBFQ 標識 EA_rt2 の Single 条件下の Linear 蛍光プロット像

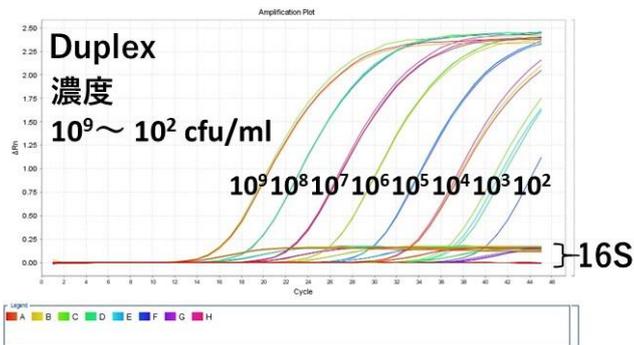


図 2. FAM/ZEN/IBFQ 標識 EA_rt2 の Duplex 条件下の Linear 蛍光プロット像

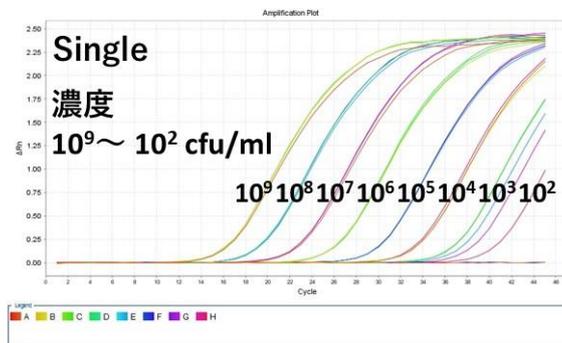


図 3. FAM/BHQ1 標識 EA_rt2 の Single 条件下の Linear 蛍光プロット像

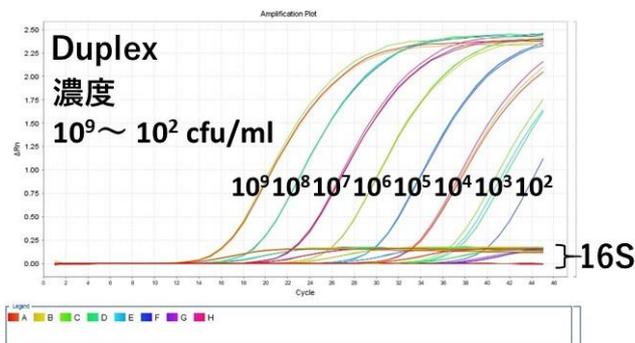


図 4. FAM/BHQ1 標識 EA_rt2 の Duplex 条件下の Linear 蛍光プロット像

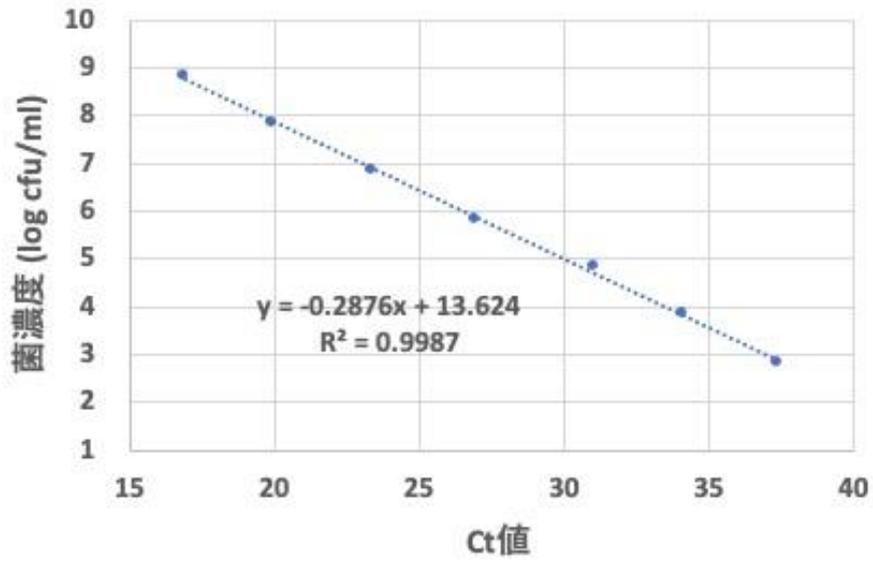


図5. FAM/ZEN/IBFQ標識 EA_rt2のSingle条件下の*E. albertii*を標的とした検量線

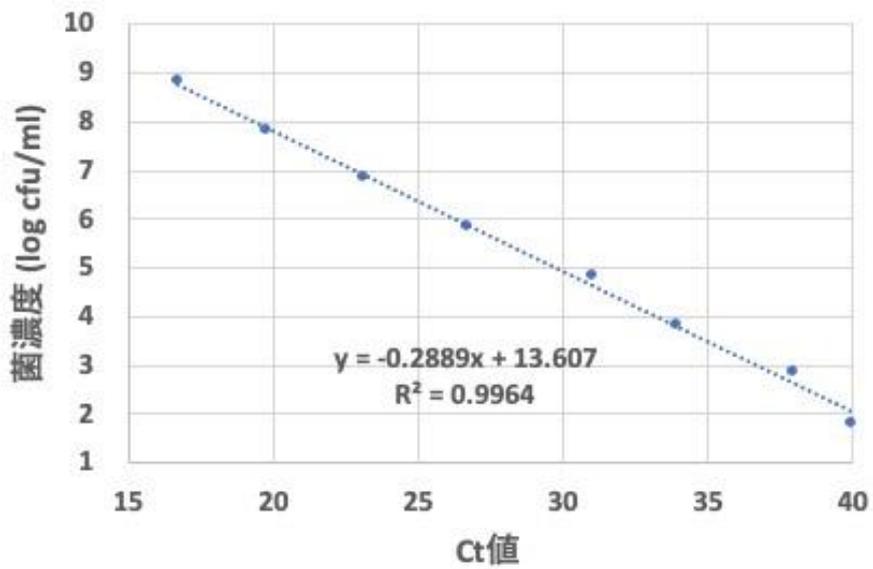


図6. FAM/ZEN/IBFQ標識 EA_rt2のDuplex条件下の*E. albertii*を標的とした検量線

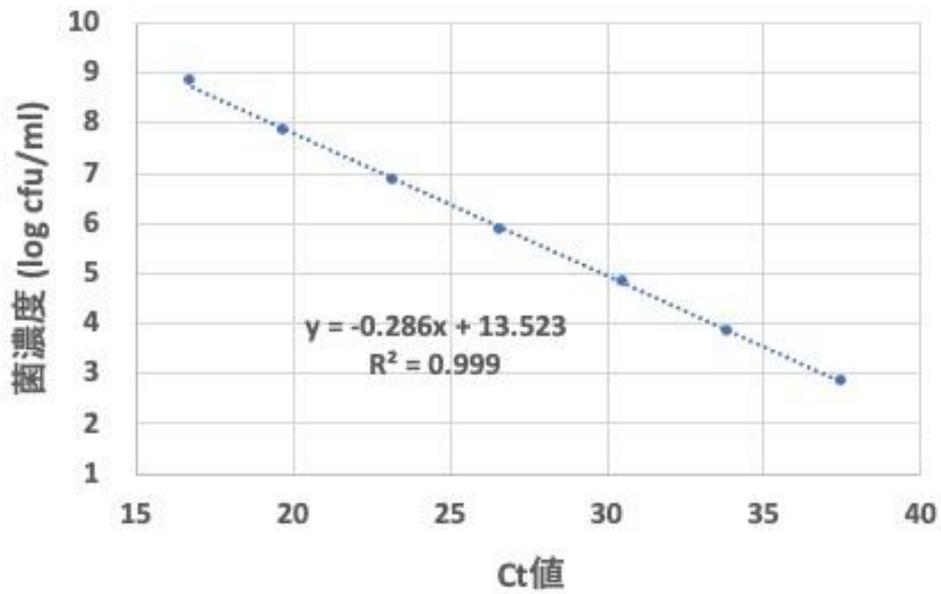


図7. FAM/BHQ1標識 EA_rt2のSingle条件下の*E. albertii*を標的とした検量線

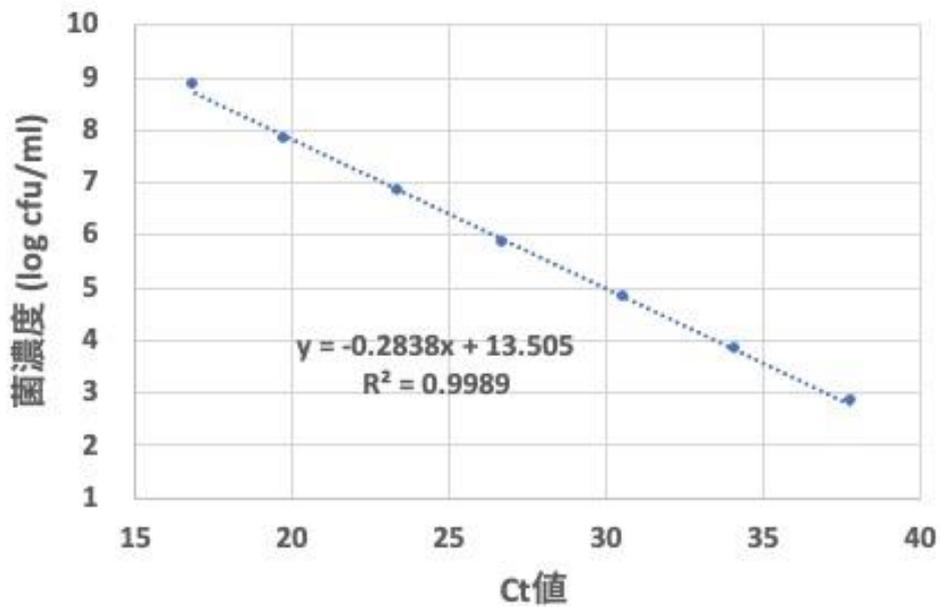


図8. FAM/BHQ1標識 EA_rt2のDuplex条件下の*E. albertii*を標的とした検量線

表1. 開発したリアルタイムPCRの特異性試験へ供試した菌種と結果

細菌種	供試株数	リアルタイムPCR陽性株数	
		FAM/ZEN/3IABkFQ標識EA_rt2	FAM/BHQ1標識EA_rt2
<i>Arcobacter butzleri</i>	1	0	0
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	1	0	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	0	0
<i>Campylobacter coli</i>	1	0	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0
<i>Escherichia albertii</i>	43	43	43
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0	0
<i>Escherichia hermannii</i>	1	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	0
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>Morganii</i>	1	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	1	0	0
<i>Shigella boydii</i>	4	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	1	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	0	0

表2. *Escherichia albertii*特異的リアルタイムPCRのプライマーおよびプローブ候補

名称	プライマーおよびプローブ (蛍光およびクエンチャー標識)	産物
FAM/ZEN/3IABkFQ標識 EA_rt2	フォワードプライマー：EA_rt2F リバースプライマー：EA_rt2R プローブ：EA_rt2P (FAM/ZEN/IBFQ)	97 bp
FAM/BHQ1標識 EA_rt2	フォワードプライマー：EA_rt2F リバースプライマー：EA_rt2R プローブ：EA_rt2P (FAM/BHQ1)	97 bp

表3. リアルタイムPCRの1 wellあたりの反応溶液組成

試薬	Single	Duplex
Taqman Environmental Master Mix	15 μ L	15 μ L
20 μ M EA_rt2F	0.45 μ L	0.45 μ L
20 μ M EA_rt2R	0.45 μ L	0.45 μ L
10 μ M EA_rt2P (FAM標識)	0.45 μ L	0.45 μ L
20 μ M 16S F primer		0.24 μ L
20 μ M 16S R primer		0.24 μ L
5 μ M 16S probe (HEX標識)		0.6 μ L
MQ	8.05 μ L	7.57 μ L
DNA	5 μ L	5 μ L
合計	30 μ L	30 μ L

表4. Nested PCRのプライマー配列

PCR	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')
1st PCR	E_al_OF	GGTCCATAATGAATCTGACTGA
	E_al_OR	CCATATGACAGGCGTAATTGAT
2nd PCR	E_al_NF	CAGTCGATGGTTTCACCTGA
	E_al_NR	ACACCGTGGCGAAATGGCA

表5. 異なるクエンチャー標識を利用したEA_rt2の検出限界の比較

菌濃度 (cfu/ml)	菌濃度 (cfu/PCR tube)	FAM/ZEN/3IABkFQ標識クエン チャー		FAM/BHQ1標識クエン チャー	
		Single*	Duplex**	Single	Duplex
6.8×10^8	3.4×10^6	3/3	3/3	3/3	3/3
6.8×10^7	3.4×10^5	3/3	3/3	3/3	3/3
6.8×10^6	3.4×10^4	3/3	3/3	3/3	3/3
6.8×10^5	3.4×10^3	3/3	3/3	3/3	3/3
6.8×10^4	3.4×10^2	3/3	3/3	3/3	3/3
6.8×10^3	3.4×10	3/3	3/3	3/3	3/3
6.8×10^2	3.4	3/3	3/3	3/3	3/3
6.8×10	0.3	1/3	3/3	2/3	1/3

* *E. albertii*のみを検出する条件

** *E. albertii*および16S rRNA遺伝子を検出する条件

表6. 鶏肉培養液にて*Escherichia albertii*培養液を希釈した場合のリアルタイムPCRにおける異なるプローブでの検出限界の比較

供試菌株	菌濃度 (cfu/ml)	菌濃度 (cfu/PCR tube)	FAM/ZEN/3IABkFQ標識EA_rt2		FAM/BHQ1標識EA_rt2	
			mEC*	NmEC*	mEC*	NmEC*
EA12	1.1 × 10 ⁶	5.7 × 10 ³	3/3	3/3	NT	NT
	1.1 × 10 ⁵	5.7 × 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.1 × 10 ⁴	5.7 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.1 × 10 ³	5.7	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.1 × 10 ²	0.6	2/3	2/3	3/3	3/3
EA21	1.5 × 10 ⁶	7.5 × 10 ³	3/3	3/3	NT	NT
	1.5 × 10 ⁵	7.5 × 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.5 × 10 ⁴	7.5 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.5 × 10 ³	7.5	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.5 × 10 ²	0.8	2/3	2/3	2/3	1/3
EA24	1.2 × 10 ⁶	6.1 × 10 ³	3/3	3/3	NT	NT
	1.2 × 10 ⁵	6.1 × 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2 × 10 ⁴	6.1 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2 × 10 ³	6.1	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2 × 10 ²	0.6	2/3	1/3	1/3	2/3
EA29	1.1 × 10 ⁶	5.4 × 10 ³	3/3	3/3	NT	NT
	1.1 × 10 ⁵	5.4 × 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.1 × 10 ⁴	5.4 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.1 × 10 ³	5.4	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.1 × 10 ²	0.5	1/3	2/3	2/3	3/3
非接種			0/3	0/3	0/3	0/3

NT: 試験していない

*鶏肉の増菌に用いた培地

表7. 鶏肉に *Escherichia albertii* を接種し、増菌培養した場合のリアルタイムPCRにおける異なるプローブでの検出限界の比較

供試菌株	接種菌数 (cfu/25 g鶏肉)	FAM/ZEN/3IABkFQ標識EA_rt2		FAM/BHQ1標識EA_rt2	
		mEC*	NmEC*	mEC*	NmEC*
EA12	1.2 × 10 ³	3/3	3/3	NT*	NT
	1.2 × 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2	3/3	3/3	3/3	3/3
EA21	1.4 × 10 ³	3/3	3/3	NT	NT
	1.4 × 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.4 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.4	3/3	3/3	3/3	3/3
EA24	1.4 × 10 ³	3/3	3/3	NT	NT
	1.4 × 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.4 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.4	3/3	3/3	3/3	3/3
EA29	1.2 × 10 ³	3/3	3/3	NT	NT
	1.2 × 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2	3/3	3/3	3/3	3/3
非接種		0/3	0/3	0/3	0/3

NT: 試験していない

*鶏肉の増菌に用いた培地

表8. 市販鶏肉の *Escherichia albertii* 汚染実態調査

ブランド	部位	検体数	PCR陽性検体数		
			Nested PCR		リアルタイム
			1st	2nd	PCR
A	a	2	0	0	1
	b	1	0	0	0
	c	1	0	0	0
B	a	3	0	0	0
C	a	1	0	0	0
D	a	2	0	0	0
	d	1	0	0	0
	c	1	0	0	0
E	a	1	0	0	0
F	a	3	0	0	0
G	a	2	0	0	0
	c	1	0	0	0
H	a	1	0	1	1
		20	0	1	2

表9. 養鶏場より直接入手した鶏の*Escherichia albertii*汚染実態調査

臓器	増菌培地	供試検体数	PCR陽性検体数		
			Nested PCR		リアルタイム
			1st	2nd	PCR
a	mEC	21	2	4	4
b	mEC	21	2	2	5
	NmEC	6	0	0	0
c	mEC	20	5	7	10
	NmEC	6	2	3	4
d	mEC	21	1	3	4
	NmEC	11	2	2	2
e	mEC	21	2	3	4
f	mEC	21	6	7	9
g	mEC	17	1	2	4
h	mEC	17	0	0	1
	NmEC	6	0	0	0
i	mEC	17	0	0	0
	NmEC	6	0	0	0
j	mEC	1	0	0	0
k	mEC	1	0	0	1
l	mEC	16	3	4	4
m	mEC	1	0	0	1
n	mEC	1	0	0	0
o	mEC	1	0	0	1
p	mEC	1	0	0	0
q	mEC	1	0	0	0
合計		234	26	37	54