

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究
ーリアルタイムPCR法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理ー

分担研究者 長井忠則

研究要旨 インターカレーター法による食水系感染症原因菌の迅速検査法について、リアルタイムPCR機器を用いて網羅的検査を実施するための検査法について、平成21年度までに24病原遺伝子を網羅的に検出するシステムを作成した。平成21年度は8群の遺伝子検出セットの中の代表遺伝子を保有するの8菌株をもちいて検証した。今年度はすべての遺伝子の増幅を検証するため、26菌株からDNAを抽出し、DNA濃度を調整したのち各所に配布し、複数の地方衛生研究所において10倍段階希釈した24種の対象遺伝子についてそれぞれのリアルタイムPCR機器を用いて検証した。

参加施設保有の標準株を含んだ菌株26株について、共通の方法でDNAを抽出し、吸光度により濃度を測定し、同一濃度に調整した。希釈したDNAを原液(10^0)とし、その 10^1 ～ 10^5 希釈液を作成し、それらを鋳型としてリアルタイムPCRを実施した。一箇所で作成したprimerキットならびにSYBR Green Premix DimerEraser (TaKaRa)を用いてPCR mixtureを調整した。一方、培養菌液はコロニーカウントにより菌数濃度を測定した。

Ct値、Tm値ならびに増幅曲線を用いて標的遺伝子の検出の有無を判定した。DNA濃度から換算した最低検出菌数は 10^3 ～ 10^9 cfu/mLであった。複数種類の機器で測定した最低検出菌数の差が 10^0 ～ 10^1 乗のものは20種、 10^2 乗のものは2種、 10^3 乗のものが2種、一施設以上で検出できなかったものが4種あった。multiplex PCRにおけるprimerの干渉等が原因と考えられた。

Tm値が 1°C 以上の差がみられ、multiplex PCRで判定が困難な菌種が3種あった。*Listeria monocytogenes*について、標準株ならびに分離株から得たDNA鋳型7試料を用いてPCRを行ったところ、Tm値で 1°C 以上の株が他にも存在した。

一部の標的遺伝子を検出するPrimer setの再設計もしくはprimer setの再構築を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

感染症を惹起する微生物は、創傷感染、呼吸器感染、消化器感染、性感染等様々な感染経路を通じて人体に侵入する。人体侵入後、生体の反応と対応しながら特有の組織に定着

し、生体反応の度合いにより緩解・増悪等の転帰をとる。

消化管感染症は食品や水を介して感染が起きるため、食水系感染症(Food-borne infectious diseases)ともいわれる。日本の法

制度上、食水系感染症は、伝播力の強い疾病(伝染病)と食中毒に分類された。いわゆる食中毒は食品中の「毒」で生体に影響を与えるが、日本における法制度上の「食中毒」は狭義の食中毒(Food intoxication)のほか、食品・施設を介する感染性胃腸炎の様相を呈することが多く、感染拡大防止や危害の未然防止など公衆衛生の観点から、早急な原因物質ならびに原因食品等の究明が必要である。

「食中毒」原因菌は、厚生省(当時)により、昭和27年にチフス、パラチフスA以外のサルモネラと黄色ブドウ球菌が指定されて以降、4回に渡り追加指定されてきた。最近では、平成11年に6菌種追加され、合計21菌種/菌群によるものが報告すべき疾病として指定されている¹⁾。

「食中毒」発生時に現在行われている原因物質究明調査は培養法が主である。現在、事例発生時は全ての食中毒細菌を対象として培地を調整・準備し検査を実施している。そのため、食中毒事例が発生すると、膨大な量と種類の培地が消費され、また人的浪費も大きい(表1)。

近年、各種病原細菌に特有の遺伝子配列が解明され、PCR等遺伝子増幅法が感染症の原因究明に広く利用されている。現在は、1サイクル毎に蛍光を測定しPCR反応をモニターするリアルタイム PCRが導入されつつある。リアルタイム PCR法の中で、SYBR Greenを用いたインターカレーター法(以下、SG-PCR法)は、DNA複製時に試薬が取り込まれ蛍光を発するため菌種毎のプローブを必要とせず、安価に実施できる利点を持っている。また、福島ら²⁾はインターカレーター法による食中毒細菌特異遺伝子部位検出法を開発した。

そこで、食中毒発生時の細菌検査に応用するため、SG-PCR法の導入が、各地方衛生研

究所等において配備されているリアルタイムPCR機器を用いて実施できるか実証試験を行った。原法はLight Cyclerを用いて開発されたものである。SG-PCR法に関する機種毎の導入方法について保存菌株を用いて検討した。

24種の病原遺伝子部位を増幅するプライマーを用い、一度に検出する網羅的検査キットを開発した。標準菌株を含む保存菌株から抽出したDNAを用いて、機器間、施設間の検出状況について検証を実施した。

一方、試料溶液中の菌数測定については、さまざまな方法が記載されているが、基本的には混釈法と表面塗抹法である。一般生菌数の定量では、混釈法が通常用いられるが、実験的に菌を接種する場合は、単一菌叢のため、菌数について混釈法や表面塗抹法が用いられる。表面塗抹法は、主としてコンラージ棒で検液をシャーレ一面に塗り広げるコンラージ法が行われるが、1枚のシャーレで複数の試験を実施するMiles & Misra法³⁾を用いる場合もあり、菌濃度の表現について、それぞれの報告間で差が生じることがある。材料の選択ならびに調整や術者の技量により差が広がる可能性がある。複数の施設で菌数を定量する場合、試験検査法の詳細を決定し、遵守することが必要であるが、誤差の少ない検査方法が求められる。そこで、誤差の発生要因を追求し、施設間の差が少ない方法を検討することとした。

B. 研究方法

つぎの研究を行った。

- 共通DNA試料の作成ならびに使用菌株の菌数測定。
- multiplex PCRによるSG-PCR法の施設ごとの検出限界の検証。
- multiplex PCRによるSG-PCR法の機種

ごとの検出限界の検証。

- 菌数測定時の誤差の確認。

材料

1. 対象菌種

使用した細菌菌株は、各地方衛生研究所に保存する標準株ならびに野生株を用いた。これらの菌種は *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Bacillus cereus*, emetic toxin producing *B. cereus*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *astA* positive *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffusively adhesive *E. coli* (DAEC), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Providencia alcalifaciens* の24菌株であった。菌種毎に使用した菌株を表2に示した。

2. サーマルサイクラー機器

使用した機器は次のとおりであった。

- ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems: 以下, ABI7000)
- Mx3000P Real Time QPCR System (STRATAGENE: 以下, Mx3000P)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems: 以下, 7500FAST)
- Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 (タカラバイオ株式会社: 以下, TP800)

3. PCR試薬

次の試薬を使用した。試薬は同一ロットのものを使用した。

- SYBR® Premix Dimererazer® (タカラバイオ株式会社)

4. DNA抽出用試料の作成

DNA試料の作成は、菌株をブレインハー

トインフュージョンブイヨン培地（以下、BH1b）に接種し、それぞれの菌の適切な培養条件で24時間培養して、その1mLをDNA抽出に使用した。培養液は、同時に菌数確認を行った（「7.コロニーカウント」の項参照）。

5. DNA抽出

次の、市販のDNA抽出試薬キットを用いた。DNA抽出はキット製造会社の使用説明書に従って行った。

- DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN)
抽出DNAは、Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific社、) でDNA濃度を測定した。DNA試料を分取し各施設に送付した後、菌株毎の希釈率から配付試料を抽出試薬キット添付の抽出試薬 (A E buffer) により希釈し、すべてのDNA試料を一定濃度に調整したあと試験に供した。

6. プライマーおよびRFBS24システム

共通試料による検討に用いたprimer setを表3に示した^{4~20}。プライマーセットは今回三回目の改変を行い、陽性対照について、混合陽性対照を作成した。PCR試験にあたり、検査が効率的に行えるようするためであった。

今回、各所で試験を実施した「RFBS24」について略述する。RFBS24とは、Rapid Foodborne Bacteria Screening 24の略称であり、試料DNA中の病原遺伝子24種を同時に検査できるシステムをキット化したものである。福島ら¹⁸⁾が考案した。基本構成はSYBR Greenを用いたintercalator multiplex real-time PCRである。

96ウェルプレートを使用し、1試料は1列のセットで検査する。病原遺伝子3種ならびにPCR増幅確認用内部標準 (Internal Amplification Control: IAC) 用primer計4組を1ウェルにセットし1列8ウェル、計24種の

対象遺伝子を同時に検査できる。基本列は第1列から5列、それぞれ、左から陰性対照、IAU対照、1～3遺伝子陽性対照から成る。試料DNAは第6列目から第12列目まで7列使用することが可能である。すなわち、7試料について24種の病原遺伝子を同時に網羅的に検出することができる。機器により異なるが、通常PCR過程は1時間～1時間半で終了し、サイクル毎に遺伝子増幅の有無を確認することができる。

7. コロニーカウント

使用した24菌株（表2）についてBHIbで培養後、滅菌0.1%ペプトン加滅菌生理食塩水により10倍段階希釈を行った。適切な希釈溶液から100 μ Lをブレインハートインフュージョン寒天培地（以下、BHIa）に接種し、コンラージ棒で広げたのち、それぞれの適切な培養条件で24時間培養し、コロニーカウントを行った。希釈倍率から培養液中の菌数を定量した。

8. Rapid Foodborne Bacteria Screening 24の作成と検証

RFBS24の作成は1箇所の施設で作成し、各施設に配布した。

各施設では、「5. DNA抽出」の項で作成したDNA試料について、10⁶希釈まで希釈した試料溶液を鋳型として、SG-PCRを実施した。24種プライマーによる8群のmultiplex PCRの結果は、Ct値ならびに融解曲線解析により、それぞれの標的遺伝子検出の感度を確認するとともに、同一機種があったことから、それらを用いて施設間の差を検討した。

9. 菌数測定における誤差発生要因の検討

菌数測定に際して、それぞれの方法における誤差発生要因を検討した。1菌株を用いて、次の2種の方法について検討を行った。

- コンラージ法
- Miles & Misra法

菌株は*Listeria monocytogenes*（以下、

LM）を用いた。菌株は標準菌株であるATCC19114およびATCC19115、野生株であるLm444、Lm1、Lm375、Lm492、Lm1303、計7株を使用した。LM以外の*Listeria*属菌については、*L. innocua*（ATCC33090）、*L. ivanovii*（ATCC19119）について検討した。

増菌液の希釈は、0.1%ペプトン加滅菌生理食塩水による10倍段階希釈とした。コロニーカウントにはBHIa（Difco）を用いた。

コンラージ法は10倍段階希釈した菌液の10⁶ならびに10⁷希釈について100 μ Lをそれぞれの培地上に滴下し、コンラージ棒を用いて培地表面にまんべんなく塗り広げた。37 $^{\circ}$ Cで24時間好気培養後菌数を測定した。また、48時間まで培養を続けて菌数変化の有無を確認した。

Miles & Misra法（以下、ミスラ法）は、十分乾燥させた培地上に、コンラージ法と同様に100 μ L希釈菌液を滴下し、そのまま静置して希釈菌液が培地に吸収されたあと、37 $^{\circ}$ Cで24時間好気培養後菌数を測定した。また、48時間まで培養を続けて菌数変化の有無を確認した。

C. 研究結果

1. DNAの抽出ならびに菌数測定

各施設で調整したDNA濃度ならびに菌数は表2のとおりであった。

2. RFBS24を用いたリアルタイムPCR法

24菌株28株についてSG-PCRの結果を、融解曲線と希釈DNA毎の蛍光強度変化のグラフを図1-1～図1-7までに示した（TP-800のみ）。

RFBS24における各群のT_m値は、理論的にそれぞれ1～4 $^{\circ}$ Cで離れている3種の対象遺伝子と、それらからさらに2～6 $^{\circ}$ C程度離れるIACで構成されている。一部の菌株を除いて理論T_m値付近に実際のT_m値が存在した。

LMとstx2fは実際のTm値が1°C以上変化した(図3-1ならびに図3-2)。LMはTm値がもともと低い温度であり、菌株により、それより低温にシフトした。また、もともとのstx2のTm値は中央にあったが、stx2fはそれより1°C程度低温側にシフトし、tdh positive *V. parahaemolyticus*との分別が困難であると考えられた。

調査に参加した5機関に整備されていた4種6台のリアルタイムPCR機器を用いた。

その中で同型機種が2機種2台あった(TP800ならびに7500FAST)。

Ct値、Tm値ならびに融解曲線におけるIACと比較したピークの大きさから検出の有無を決定し、検出した最大希釈率(表4)を用いて、最低検出濃度(換算)を算出した。それらを、対照遺伝子毎ならびに検査機器毎に集計し表5に結果を示した。

一部の対象遺伝子をのぞいて、検出感度はおおむね $10^4 \sim 10^6$ cfu/mLであった。検出感度が低い試料としては、ETEC(*lt*)、ETEC(*stp*)、*Staphylococcus aureus* (*femB*)、*Vibrio parahaemolyticus*(*tdh*)、*Yersinia enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis*(*yadA*)、*Salmonella* spp(*invA*)が認められた。

また、一部の施設で増幅が確認できなかったものは、*V. parahaemolyticus* (*trh*)、ETEC(*sth*)、EAEC(*aggR*)であった。

*trh*遺伝子については、通常のPCRで十分ampriconが増幅したことから、Taqの変更とPCR時の伸長反応の延長を試みたところ、いずれも $10^1 \sim 10^3$ 程度の結果の向上がみられた。

TP800を使用した2施設の結果は、 $10^0 \sim 10^1$ 倍の範囲にあった。ABI7500FAST使用施設では、一部増幅が確認できない対象遺伝子以外では、サルモネラをのぞいて $10^0 \sim 10^1$ 倍の範囲にあった。

すべての施設を対象に比較すると、最低発

現菌数(換算値)の範囲が $10^0 \sim 10^1$ 倍の範囲にある対象遺伝子は20種あり、 10^2 のものが2種(*Enterotoxigenic B. cereus*、*Salmonella* spp.)、 $>10^2$ のものが2種(ETEC(*lt*)、*V. parahaemolyticus*(*tdh*))、1施設以上で検出できなかったものは4種(*V. parahaemolyticus*(*trh1* & *trh2*)、ETEC(*sth*)、EAEC(*aggR*))あった。

3. 菌数測定時の誤差

同一試料から3回採取し、10倍段階希釈したもの(19115-1~19115-3)のコロニーカウントを表6に示した。 10^6 および 10^7 希釈について、コンラージ法では5回、ミスラ法では4回実施した。

LMについて複数の菌株について希釈し、 10^6 希釈についてのみ表7に示した。同一希釈は3回測定し、コンラージ法とミスラ法の結果を示した。

コンラージ棒に残るLMを評価するために、培地表面に塗抹した後、さらに新しい培地に20往復塗抹したものを2枚作成した(19115-1、19114-1~19114-3)(表8)。その結果、ほとんどの試料について、コンラージ棒に菌の付着はなかったが、1例に14cfu生残する検体があった。

D. 考察

1. SYBR Green法によるリアルタイムPCR法

RFBS24キットは今回検討したものは、3回の改変を経たものであった。いずれも、検出感度を上げるべくプライマーの再設計、プライマーセットの調整を行ったものであった。今回検討キットであるRFBS24IV(バージョン4)はRFBS24III(バージョン3)と比較し、Tm値の調整のため、3種のプライマーを再設計と5種のプライマーセットを再調整したものであった。

さらに、新しいキットでは、従来24本の陽性対照を添付していたのに対し、3本の陽性

対照セットにするということ、試料準備をより容易にすることが可能となった。

表4で示すとおり、同一機器を用いた施設の結果はほぼ同一の結果を得ることができた。Ct値でみると1~2サイクルの差であり、同一種の機器を使用した場合、検査者の技術は検査結果に影響する要因としてはPCR増幅系、プライマーの種類より小さいと考えられる。

機器が異なる場合、結果は様々であった。すべての施設の結果が 10^0 ~ 10^1 乗差である対象遺伝子が20であり、今回使用した4機種を用いた場合、ほぼ均質な成績を示すことができると考えられた。一方、 10^2 乗もしくはそれ以上の差を示す対象遺伝子が4、および1施設以上で検出できなかった対象遺伝子が4種あったことは、PCR反応を確実に行う必要があること、ならびにプライマーの再設計の必要性があることが示唆された。

特に、*trh*遺伝子について、試料DNAならびに使用プライマーを用いて、通常のPCRをsingle primerで実施したところ、十分増幅がみられ、プライマーセットの競合による感度低下が示唆された。そこで、*trh*遺伝子を検出するB群のプライマーセットを用いて、TaqをSYBR Green Premix Taq IIを用いた場合とTaqは変更せずにextension timeを延長した場合を試行したところいずれも 10^1 ~ 10^3 乗程度の感度向上がみられた（図2-1および図2-2）。

そこで、*trh*ならびに*aggR*遺伝子を増幅する系であるB群とE群について、extension timeを30秒から1分間に変更して3+3種、計6種のDNA試料について試行したところ、PCR時間は15分間の増加（75分間→90分間）にとどまり、競合するプライマーで増幅される他の遺伝子は、extension time 30秒の時と同様の検出感度であったが、*trh*なら

びに*aggR*については、それぞれ 10^1 乗の感度向上が確認された（結果は示さない）。

2. コロニーカウントの誤差要因

今回使用した菌株の培養系では、液体培地1mL中 10^8 ~ 10^9 cfuになることが確認された。これは、腸内細菌科の細菌等、他の細菌と同様に培養結果を示すものであった。

菌数測定において、混釈培養法は代表的な検査法であり、一般生菌数等の測定に使用される²¹⁾。しかし、この方法では菌が凝集している場合は、凝集塊からコロニーを形成するため、コロニーを計数することによる菌数測定では、実際の菌数より少なくなることが考えられる。

黄色ブドウ球菌において、表面塗抹法と混釈法ならびに菌体支持剤を含む簡易培地を比較し、混釈法ならびに菌体支持剤を含む簡易培地の結果は表面塗抹法の44~67%程度であることが報告されている²²⁾。

表6では、同一の培養液に対して3試料採取し、それぞれを10倍段階希釈したのち、コンラージ法とミスラ法を実施した結果を示した。3回の検査について、1回目（19115-1）と他の2回の結果の差が、コンラージ法、ミスラ法ともに同様の評価をしており、LMの菌数確認を行う場合、操作法は簡便ではあるもののミスラ法が十分使用に耐えることが示された。また、表7で示すとおり、異なる菌種や同一菌種であっても異なる菌株についても、コンラージ法とミスラ法の個々の成績について検討したところ、ミスラ法が若干ではあるものの標準偏差が小さい傾向をみとめた。コンラージ法では、コンラージ棒で培地面に試料溶液を塗抹するため、コンラージ棒に被検菌が残留することが考えられた。そこで、コンラージ棒で塗抹したあと、さらに新しい培地に塗抹を2回実施した。その結果、一部に被検菌の残留が認められた（表8）。

これは、試験菌液の塗抹法に関して、試験法の整備と遵守が必要であると示唆された。

菌数測定を行う際の、培地作成、試料調整、試料接種法等について統一した方法を検討することが肝要であると考えられる。

E. 結論

24種の病原遺伝子を網羅的に検出する Rapid Foodborne Bacteria Screening 24の評価のため、共通のDNA試料をもとに複数の施設においてそれぞれの機器を用いて試験を実施した。対象遺伝子により感度にばらつきがあり、多数の試験系で実用可能であるものの、一部プライマーの再設計とプライマーセットの再調整が必要な試験系があった。

菌数測定法では、一菌種について検討し、検査法の検討が必要であることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 文献

- 1) 熊谷進: モダンメディア, 47(7), 181-187, 2001
- 2) 福島博, 角森ヨシエ: リアルタイムPCR法による食中毒細菌の迅速スクリーニングの検討. 感染症誌, 79 : 644-655, 2005
- 3) 坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二: 新 細菌培地学講座 -上-, 第二版, 182-192, 近代出版, 1986

- 4) 加藤直樹, Kim, M.S., 加藤はる, 田中香お里, 渡辺邦友, 上野一恵, Yongsop, C.: Polymerase chain reactionによるエンテロトキシン産生性Clostridium perfringens の同定, J . Jpn. Ass. Infect. Dis., 67(8), 724-729, 1993
- 5) 福島博, 角森ヨシエ: リアルタイムPCR法による食中毒細菌の迅速スクリーニングの検討, 感染症学雑誌, 79(9), 644-655, 2005
- 6) Furrer, B., Candrian, U., Luethy, J.: Detection and identification of E. coli producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment, Lett. Appl. Microbiol., 10(1), 31-34, 1990
- 7) Price, E.P., Huygens, F., Giffard, P.M.: Fingerprinting of Campylobacter jejuni by using resolution-optimized binary gene targets derived from comparative genome hybridization studies, Appl. Environ. Microbiol., 72(12), 7793-7803, 2006
- 8) Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A., Rudi, K.: Application of the 5'-nuclease PCR Assay in Evaluation and Development of Methods for Quantitative Detection of Campylobacter jejuni. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4029-4036, 2000
- 9) Nishibuchi, M., Takeda, Y., Tada, J., Ohashi, T., Nishimura, N., Ozaki, H., Fukushima, S.: Method to Detect the Thermostable Direct Hemolysin Gene and a Related Hemolysin Gene of Vibrio parahaemolyticus by PCR, Nihon Rinsho, 642, 348-352, 1992
- 10) Hough, A.J., Harbison, S.-A., Savill, M.G., Melton, L.D., Fletcher, G.: Rapid enumeration of Listeria monocytogenes in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction, J. Food Protect., 65(8), 1329-1332, 2002
- 11) Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J., Akiba, Y.: Comprehensive and rapid real-time PCR analysis of 21 foodborne outbreaks, Intl. J. Microbiology, volume 2009, article

- ID917623, 13 pages, 2009
- 12) Gubala, A.J. & Proll, D.E.: Molecular-beacon multiplex real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*, *App. Environ. Microbiol.*, **72**(9), 6424-6428, 2006
- 13) Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moo, H.W.: Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves, *J. Clinical Microbiol.*, **36**(6), 1795-1797, 1998
- 14) Nielsen, EM., Andersen, MT. : Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay, *J Clin Microbiol*, **41**, 2884-2893, 2003
- 15) Yang, I.-C., Shih, D.Y.-C., Wang, J.-Y., Pan, T.-M.: Development of rapid real-time PCR and most-probable- number real-time PCR assays to quantify enterotoxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group, *J. Food Protect.*, **70**(12), 2774-2781, 2007
- 16) Ratchtrachenchai, O.A., Subpasu, S., Ito, K.: Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR, *Bull. Dept. Medical Sci.*, **39**, 211-222, 1997
- 17) Klotz, M., Opper, S., Heeg, K., Zimmermann, S.: Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A to D by real-time fluorescence PCR assay, *J Clin Microbiol*, **41**, 4683-4687, 2003
- 18) Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N., Yamaguchi, K.: Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-time SYBR Green PCR Analysis, *Inter. J. Microbiol.*, volume 2010, article ID864817, 18 pages, 2010
- 19) Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K.-I., Enomoto, K.: Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J. Clinical Microbiol.*, **40**(1), 294-297, 2002
- 20) Wang, G., Clark, C.G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C.K., Kruk, T.M., Caldeira, R., Woodward, D.L., Rodgers, F.G.: Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR, *J. Clinical Microbiol.*, **41**(3), 1048-1054, 2003
- 21) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針 微生物編, 社団法人日本食品衛生協会, 705pp, 2004
- 22) 池田徹也, 森本洋, 清水俊一, 山口敬治: 黄色ブドウ球菌検出培地の性能比較 (第2報) : 北海道立衛生研究所報, **59**, 61-62, 2009

表1 我が国における細菌性食中毒の発生状況

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

表2 使用した菌種

試料番号	菌種	対象遺伝子	菌株由来	菌数 (cfu/mL)	DNA濃度 (ng/μL)			希釈倍率
					1	2	平均	
1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	ATCC12915	5.0×10^5	3.56	2.05	2.81	1.00
2	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	wild	1.2×10^9	19.51	19.26	19.39	6.91
3	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (LT)	<i>lt, stp</i>	wild	1.7×10^9	6.39	5.86	6.13	2.18
4	<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	JCM2529(ATCC335391)	7.9×10^8	20.23	19.20	19.72	7.03
5	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific	ATCC33560	1.7×10^9	72.50	71.44	71.97	25.7
6	TRH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (TRH1)	<i>trh1</i>	AQ4037	2.8×10^7	145.00	143.73	144.37	51.5
7	TRH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (TRH2)	<i>trh2</i>	AT4	1.4×10^9	426.64	432.17	429.41	153
8	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	wild	9.0×10^8	12.23	11.28	11.76	4.19
9	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	wild	9.3×10^7	3.60	2.82	3.21	1.14
10	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>	wild O1小川	1.2×10^8	23.05	22.62	22.84	8.14
11	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ST)	<i>sth</i>	wild	1.6×10^9	45.77	43.41	44.59	15.9
12	Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>	wild Sakai O157	2.3×10^9	7.55	5.97	6.76	2.41
13	Enterotoxigenic <i>B. cereus</i>	<i>nheB</i>	wild	7.0×10^7	8.15	8.12	8.14	2.90
14	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	<i>aggR</i>	wild O111	3.0×10^9	6.81	5.21	6.01	2.14
15	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	ATCC25923	9.5×10^8	5.42	2.21	3.82	1.36
16	TDH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	RIMD2210633	1.2×10^9	282.85	284.74	283.80	101
17	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	ATCC14029	3.4×10^7	6.27	5.70	5.99	2.13
18	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	<i>stx2f, eae, astA</i>	wild O7E033	1.7×10^9	6.28	3.85	5.07	1.81
19	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	<i>ipaH</i>	RIMD05091045	7.2×10^8	23.94	22.31	23.13	8.24
20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	wild	1.4×10^9	12.18	10.93	11.56	4.12
21	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	wild HP09009	3.5×10^8	27.14	26.57	26.86	9.57
22	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>	wild SP2536	6.6×10^8	18.04	16.12	17.08	6.09
23	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	wild	1.2×10^9	15.04	13.46	14.25	5.08
24	Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i>	<i>daaD</i>	wild K12214	4.4×10^8	26.39	26.72	26.56	9.47

表3 今回使用したprimer sets

群	菌種	対象遺伝子	プライマー名	配列	Tm値	文献
A	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	GAP-11	GGTTCATTAATTGAAACTGGTG	76.3	4
			GAP-12	AACGCCAATCATATAAATTACAGC		
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	PAG38-F	TCTGCAOGGTGTGGGTGTT	79.1	5
			PAG110-R	ACCGTCACGGCGGATTACT		
	ETEC LT	<i>lt</i>	LT-1	TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA	80.3	6
			LT-2	GGTCTCGGTACAGATATGTGATTC		
B	<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	ceuE-For	CAAGTACTGCAATAAAAACTAGCACTACG	74.2	7
			ceuE-Rev	AGCTATCACCCCTCATCACTCATACTAATAG		
	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific	AB-F	CTGAATTTGATACCTTAAGTGCAGC	77.3	8
			AB-R	AGGCACGCCTAAACCTATAGCT		
	TRH <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>trh</i>	trh250-F	GGCTCAAAATGGTTAAGCG	79.8	9
			trh250-R	CATTTCGCTCTCATATGC		
C	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	Lm-hly-F	GGGAAATCTGTCTCAGGTCATGA	77.8	10
			Lm-hly-R	CGATGATTTGAACTTCATCTTTTGC		
	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	ces-TM-F	GATGTTTGGCAGCATGCAA	78.9	11
			ces-TM-R	CTTTCGGCGTGATACCCATT		
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>	ompW-F	AACATCCGTGGATTTGGCATCTG	80.5	12
			ompW-R	GCTGGTTCCTCAACGCTTCTG		
D	ETEC ST	<i>st</i>	STa-F	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTCTGTA	76.5	13
			STa-R	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA		
	EHEC, EPEC <i>eae</i>	<i>eaeA</i>	<i>eae</i> -F2	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	78.9	14
			<i>eae</i> -R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA		
	Enterotoxigenic <i>Bacillus cereus</i>	<i>nheB</i>	SG-F3	GCACCTTATGGCAGTATTTGCAGC	80.6	15
			SG-R3	GCATCTTTTAAGCCTTCTGGTC		
E	EAEC	<i>aggR</i>	aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	74.9	16
			aggRKas2	ACAGAAATCGTCAGCATCAGC		
	EHEC Stx1	<i>stx1</i>	JMS1-F	GTCACAGTAACAAACCGTAACA	79.3	今回
			JMS1-R	TCGTTGACTACTTCTTATCTGGA		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	FemB-fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	81.4	17
			FemB-rv	TGCGCAACACCCTGAACCTT		
F	TDH <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	tdh-F176	TCCATCTGTCCCTTTTCTCTG	80.2	18
			tdh-R422	AGACACCGCTGCCATTGTAT		
	EHEC stx2	<i>stx2</i>	JMS2-F	CGACCCCTCTTGAACATA	82.6	今回
			JMS2-R	GATAGACATCAAGCCCTCGT		
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	PSG-F64	TTAAGCCCTGTCCGATAAG	86.5	18
			PSG-R313	TCGAGCAGATGAATCGACAC		
G	EAEC	<i>astA</i>	EAST-1-S	GCCATCAACACAGTATATCC	83.7	19
			EAST-AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC		
	EIEC, I spp.	<i>ipaH</i>	ipaH1672-F	CTCTCAGAGGGTGGCTGACC	85.5	18
			ipaH1761-R	TCACGCATCACCTGTGCA		
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahhI</i>	AHH1-F	GCCGAGCGCCAGAAAGGTGAGTT	88.1	20
			AHH1-R	GAGCGGCTGGATGCGGTTGT		
H	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	yadA-F1757	ACGAGTTGACAAAGGTTTAGCC	82.1	18
			yadA-R1885	GAACCAACCGCTAATGCCTGA		
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>invA</i>	invA2-F	GATTCTGGTACTAATGGTGATGATC	85.6	今回
			invA2-R	GCCAGGCTATCGCCAATAAC		
	DAEC	<i>daaD</i>	daaD-F31	GTCACCTGCGGGATGTTACT	89.4	18
			daaD-R263	AGCTCATGACGACCATCCTT		

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

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

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

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

表6 同一の試料を複数回実施したコロニーカウント成績

ATCC19115を使用した試験

コンラージ法

	10 ⁶ 希釈					10 ⁷ 希釈					菌数 cfu/mL
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
19115-1	145	172	140	145	135	15	17	19	14	17	1.47 × 10 ⁹
19115-2	141	118	134	116	123	6	14	9	16	8	1.26 × 10 ⁹
19115-3	144	129	147	114	108	17	14	13	13	13	1.28 × 10 ⁹

Miles & Misra法

	10 ⁶ 希釈				10 ⁷ 希釈				菌数 cfu/mL
	1	2	3	4	1	2	3	4	
19115-1	137	157	152	139	12	13	13	8	1.46 × 10 ⁹
19115-2	113	136	118	123	13	18	9	14	1.22 × 10 ⁹
19115-3	139	122	103	130	19	9	11	9	1.24 × 10 ⁹

表7 各種血清型の*L. monocytogenes*菌株の結果

コンラージ法

菌株番号	菌種	血清型	10 ⁶ 希釈			菌数 cfu/mL
			1	2	3	
ATCC19115	<i>L. monocytogenes</i>	4b	107	80	75	8.7 × 10 ⁸
ATCC19114	<i>L. monocytogenes</i>	4a	35	27	36	3.3 × 10 ⁸
Lm444	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	19	32	25	2.5 × 10 ⁸
Lm1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	41	42	34	3.9 × 10 ⁸
Lm375	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	72	62	61	6.5 × 10 ⁸
Lm492	<i>L. monocytogenes</i>	3c	35	45	57	4.6 × 10 ⁸

Miles & Misra法

菌株番号	菌種	血清型	10 ⁶ 希釈			菌数 cfu/mL
			1	2	3	
ATCC19115	<i>L. monocytogenes</i>	4b	46	64	65	5.8 × 10 ⁸
ATCC19114	<i>L. monocytogenes</i>	4a	35	30	31	3.2 × 10 ⁸
Lm444	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	25	28	26	2.5 × 10 ⁸
Lm1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	39	41	49	4.3 × 10 ⁸
Lm375	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	78	84	74	7.9 × 10 ⁸
Lm492	<i>L. monocytogenes</i>	3c	42	28	45	3.8 × 10 ⁸

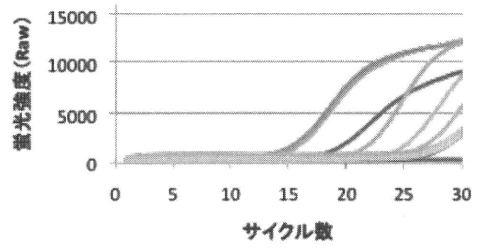
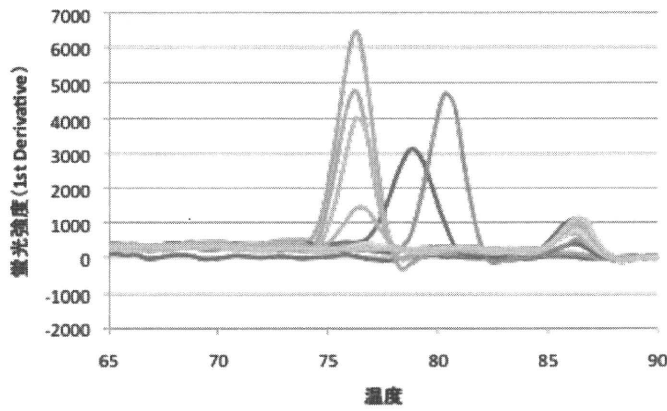
表8 *Listeria*属菌の菌数測定 -使用したコンラージ棒を新しい培地に塗抹した-

コンラージ法

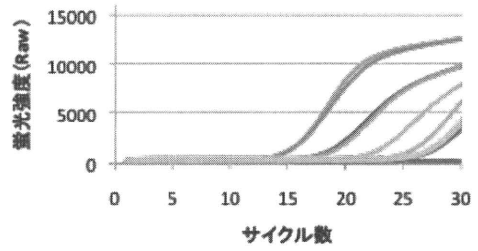
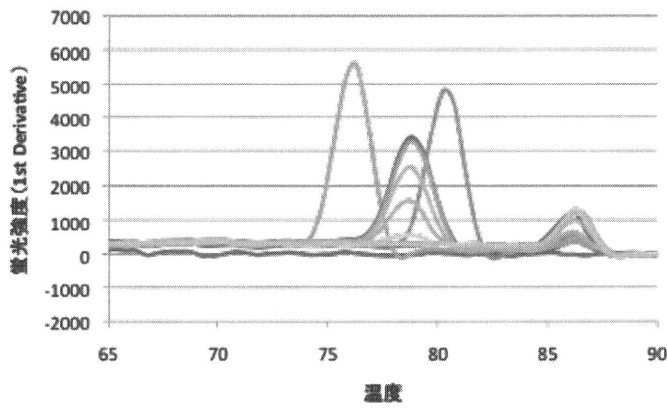
菌株番号	菌種	10 ⁶ 希釈					菌数 cfu/mL
		1	2	3	4	5	
ATCC19115	<i>L. monocytogenes</i>	32	38	36	35	31	3.4 × 10 ⁸
ATCC19114	<i>L. monocytogenes</i>	35	31	23	39	41	3.4 × 10 ⁸
ATCC33090	<i>L. innocua</i>	79	62	57	-	-	6.6 × 10 ⁸
ATCC19119	<i>L. ivanovii</i>	81	52	68	-	-	6.7 × 10 ⁸

		1	2
19115-1	<i>L. monocytogenes</i>	0	0
19114-1	<i>L. monocytogenes</i>	0	0
19114-2	<i>L. monocytogenes</i>	1	0
19114-3	<i>L. monocytogenes</i>	7	7

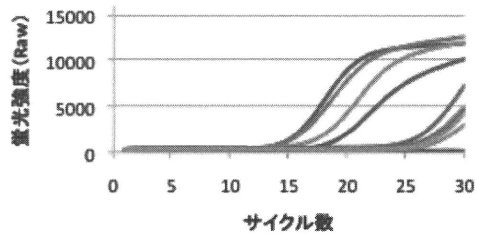
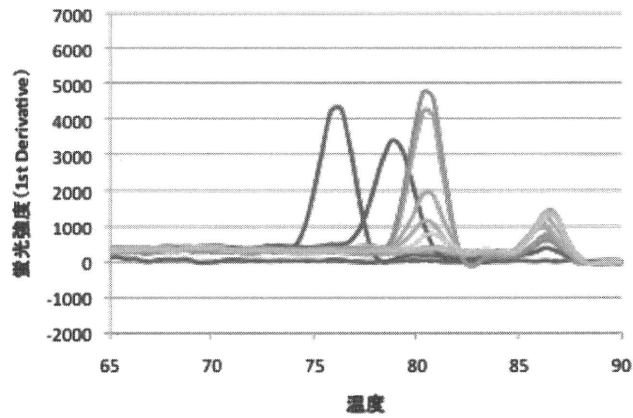
図1-1 24種のプライマーによる標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (1)



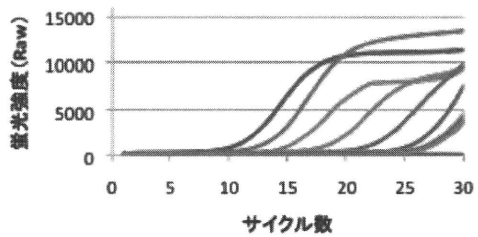
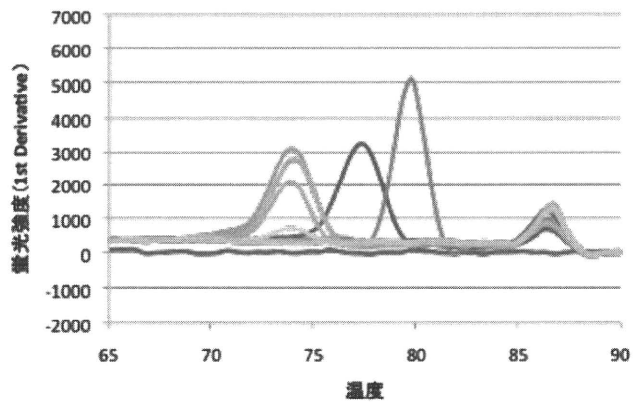
1 *C. perfringens*



2 *P. alcalifaciens*

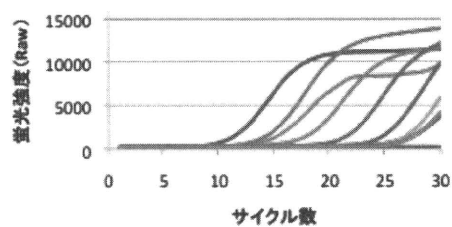
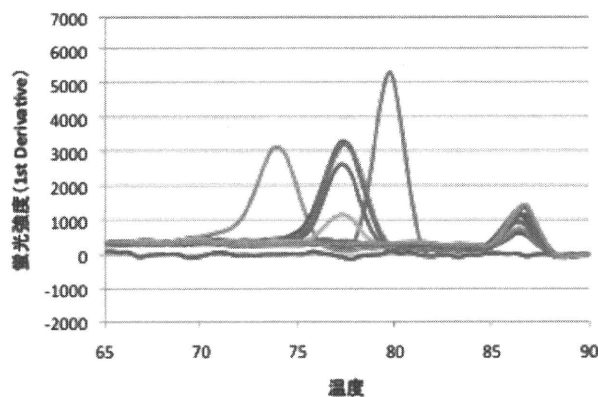


3 It ETEC

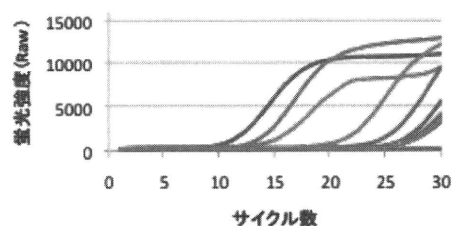
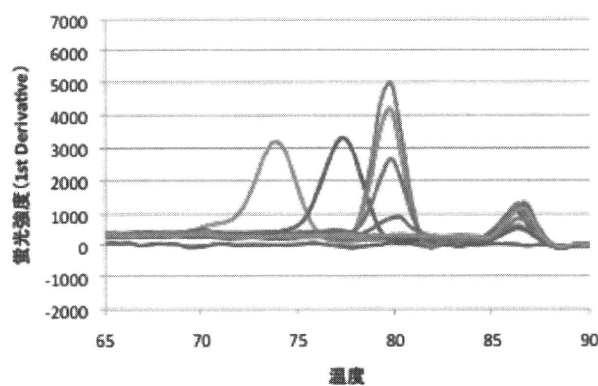


4 *C. coli*

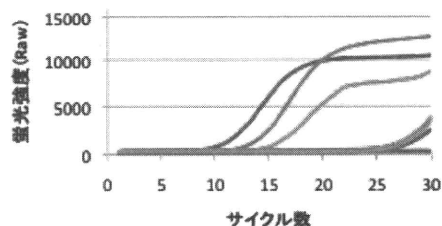
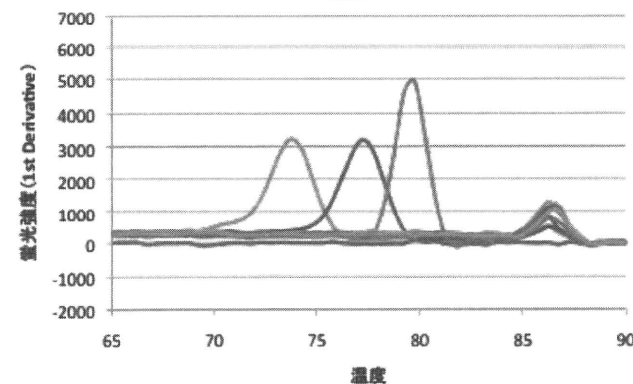
図1-2 24種のプライマーによる標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (2)



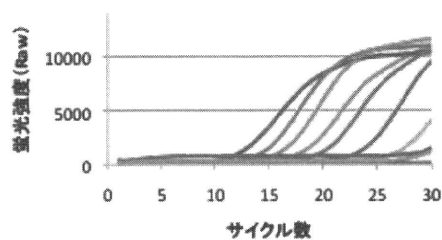
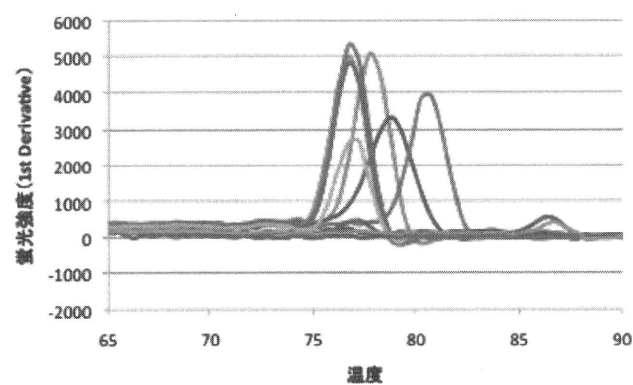
5 *C. jejuni*



6 *trh1 V. parahaemolyticus*



7 *trh2 V. parahaemolyticus*



8 *L. monocytogenes*

図1-3 24種のプライマーによる標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (3)

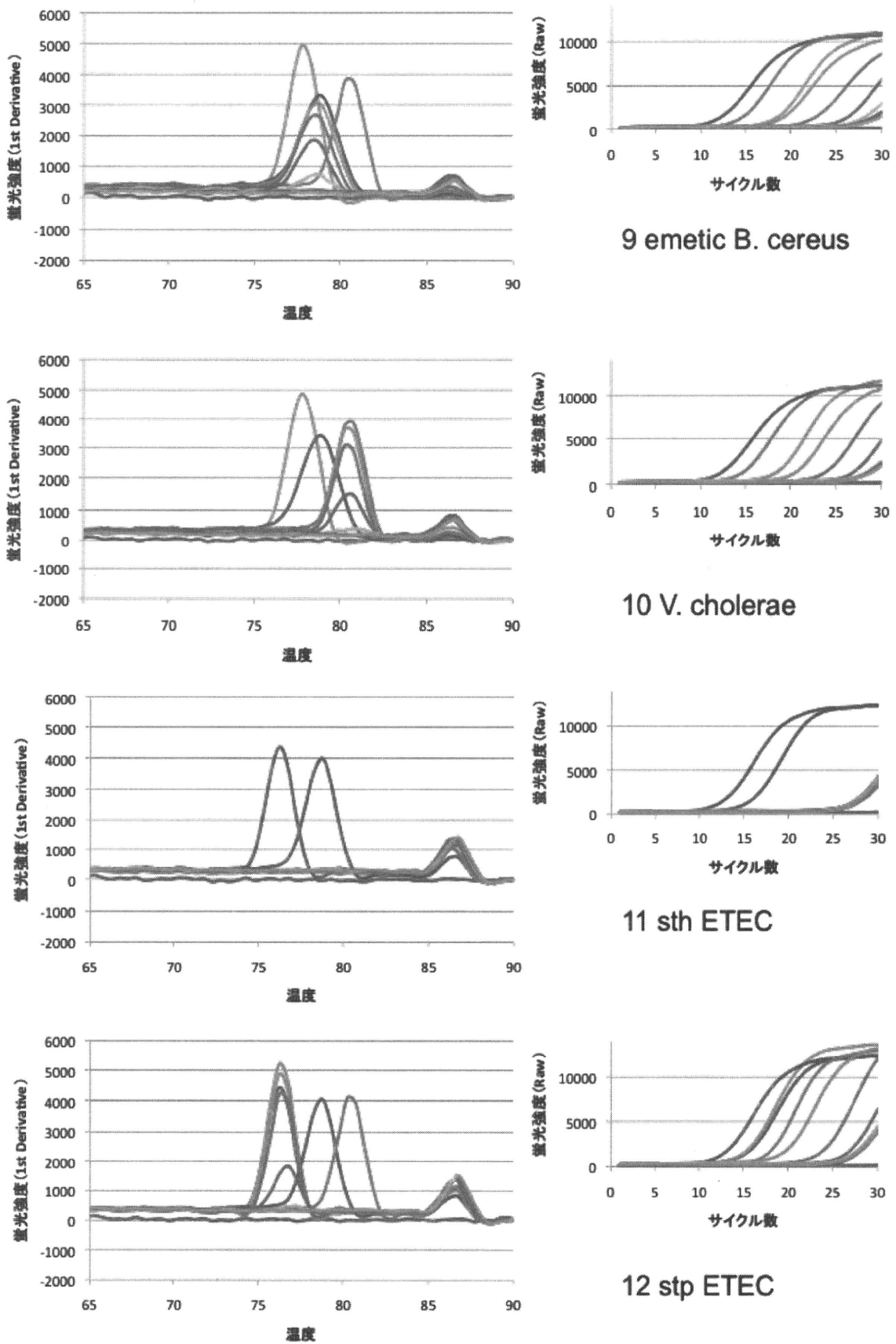
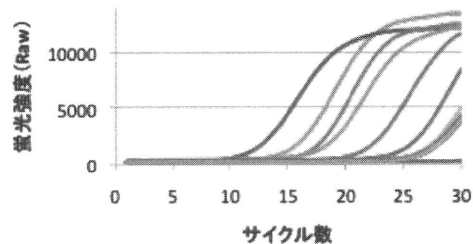
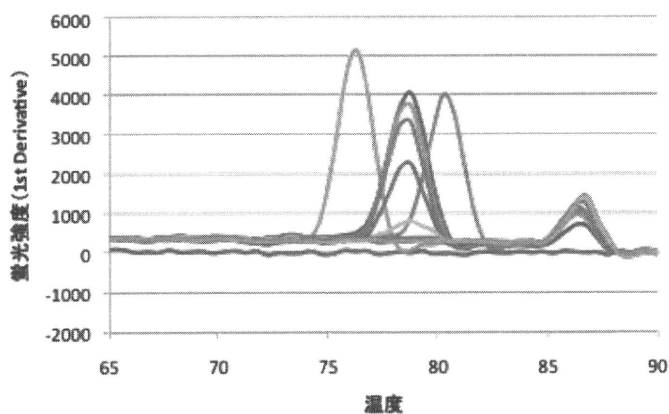
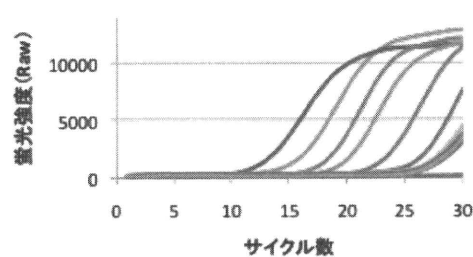
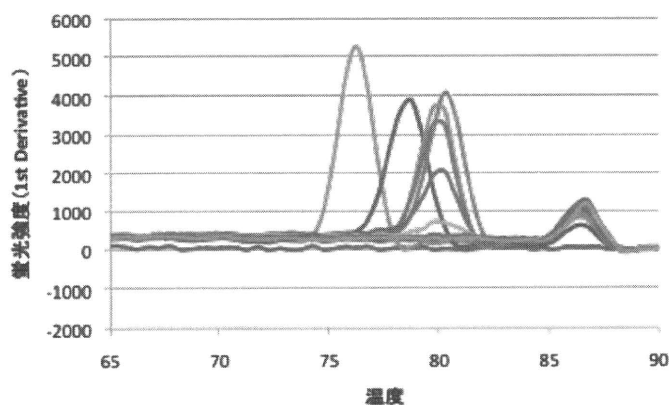


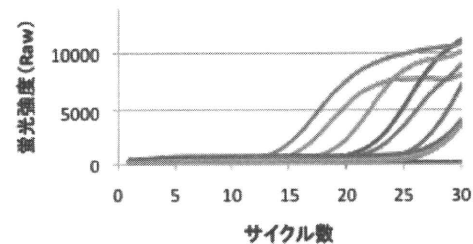
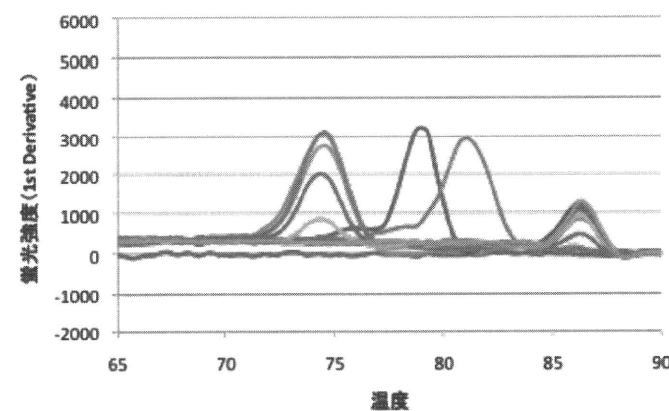
図1-4 24種のプライマーによる標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (4)



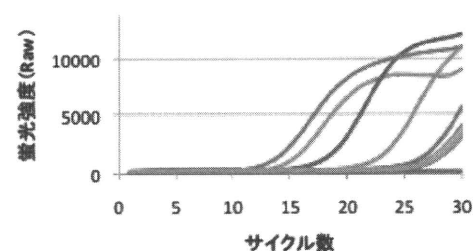
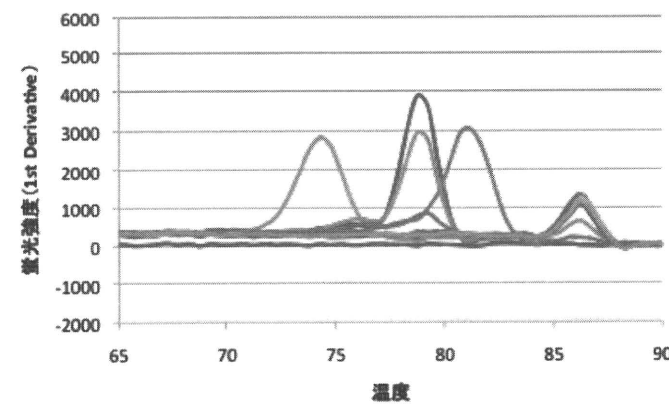
13 eae *E. coli*



14 nhe *B. cereus*



15 stx1 STEC



16 aggR *E. coli*

図1-5 24種のプライマーによる標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (5)

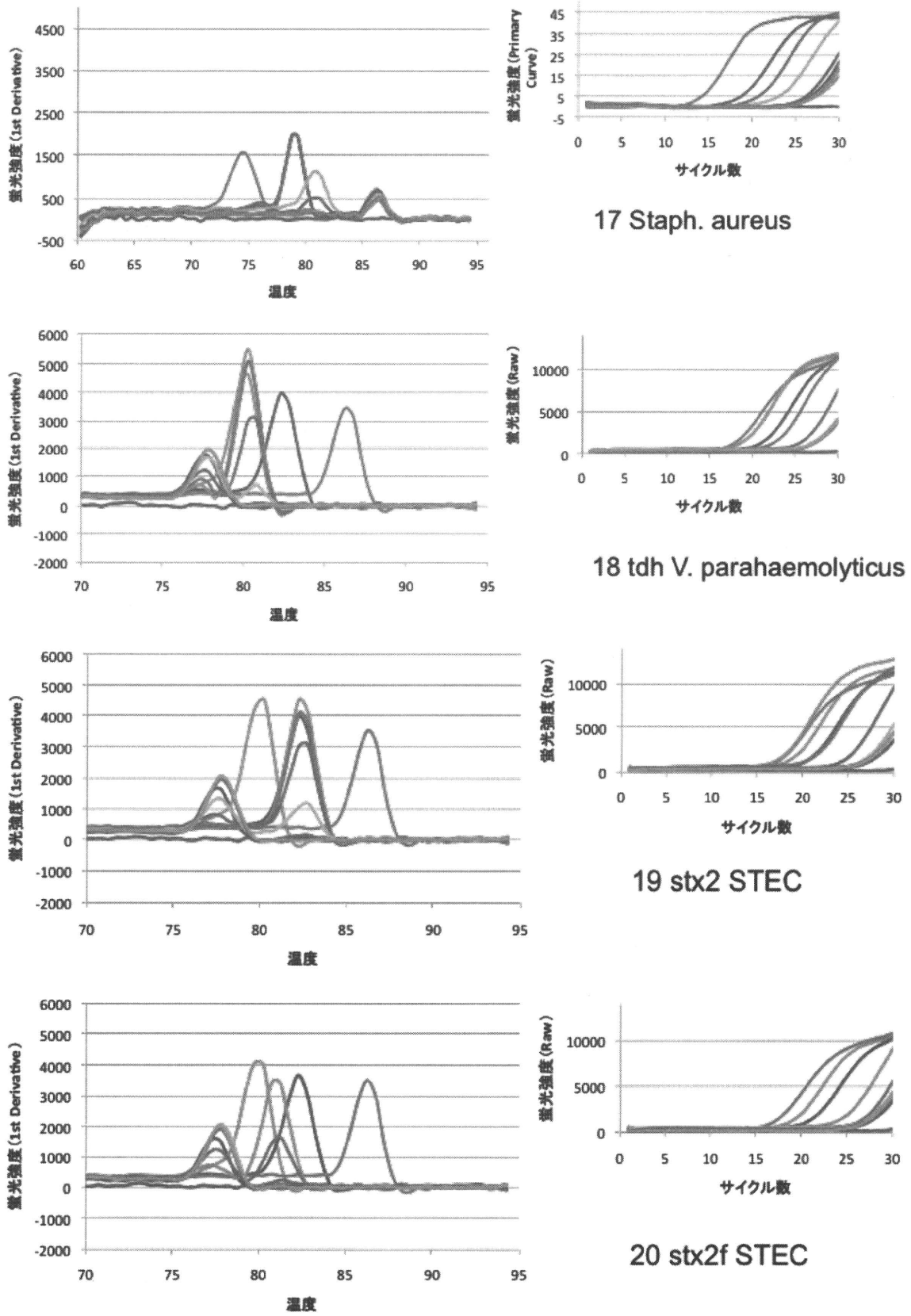
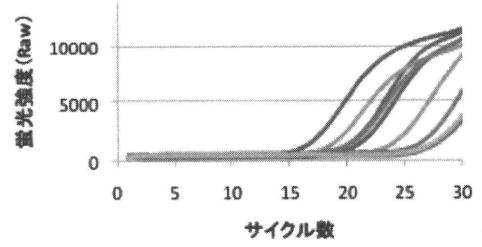
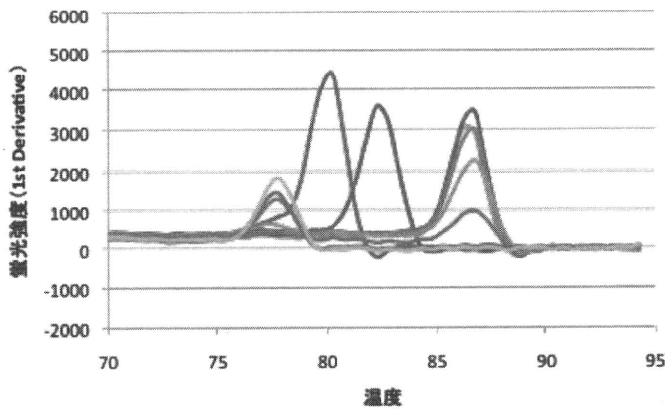
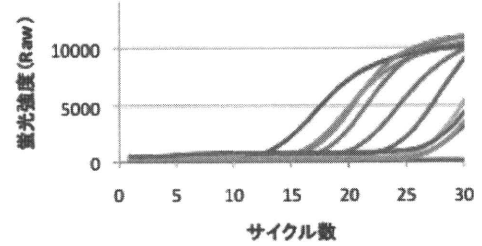
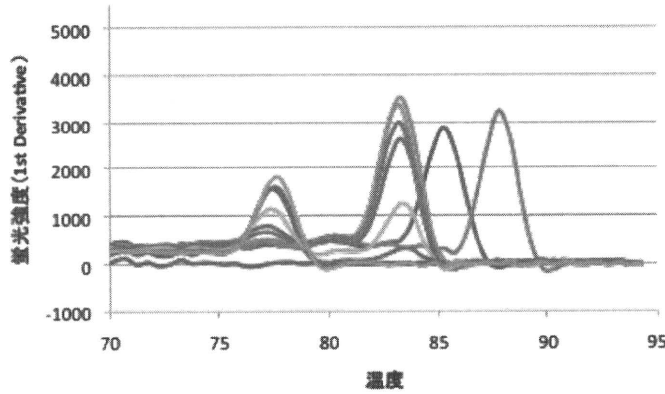


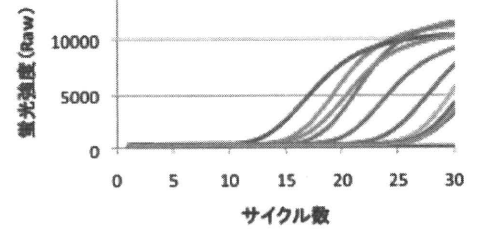
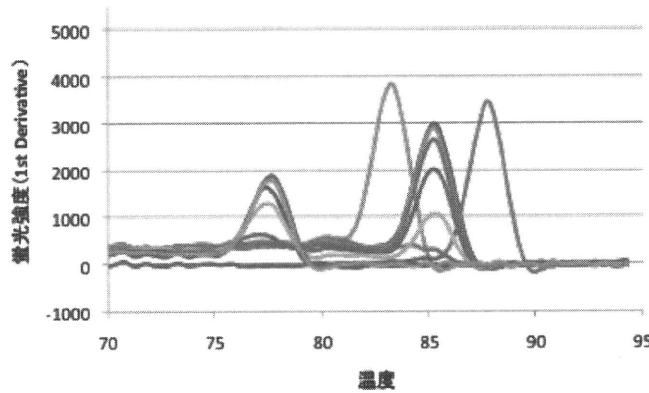
図1-6 24種のプライマーによる標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (6)



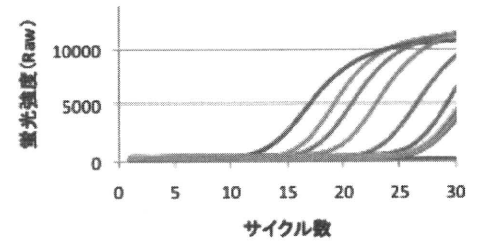
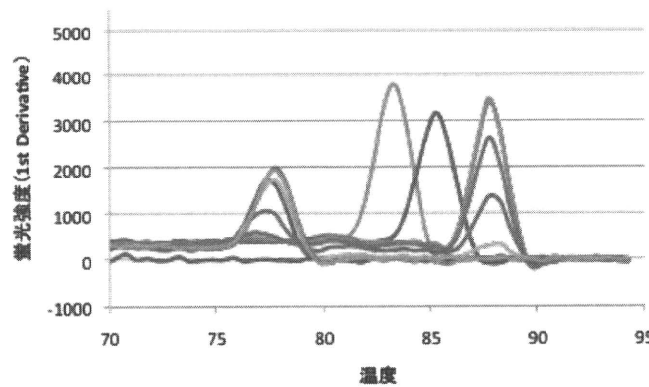
21 *P. shigelloides*



22 *astA E. coli*



23 EIEC, *Shigella* spp.



24 *Aero. hydrophila*