

マルチプレックス リアルタイム PCR 法を用いた食中毒菌のスクリーニング法の改良

菊池 俊、平井 晋一郎、横山 栄二

Improvement of screening of food poisoning bacteria using multiplex real-time PCR

Takashi KIKUCHI, Shinichiro HIRAI, Eiji YOKOYAMA

要旨

食中毒事例の原因である病原菌（食中毒菌）を特定するためには分離培養法が用いられる。しかし、分離培養に用いられる培地は菌種によって異なるため、食中毒菌の可能性のある全ての菌種に対して分離培養を試みると、多くの時間と労力を費やす。分離培養を行う前に食中毒菌のスクリーニングを行うことで、菌種を絞り込むことが可能である。近年、食中毒菌のスクリーニング法として、マルチプレックス リアルタイム PCR 法を用いて 24 菌種の食中毒菌を検出する方法が開発された。しかし、この方法では、食中毒菌として希な菌種も標的としているため、マルチプレックス リアルタイム PCR 法を 8 回運行する必要がある。そこで、本研究では、食中毒菌を 6 菌種に絞り、マルチプレックス リアルタイム PCR 法の 2 回の運行でこれら菌を一斉に検出する方法を考案した。

キーワード：食中毒菌、リアルタイム PCR 法、SYBR green、マルチプレックス PCR 法

Key word: Food poisoning bacteria, Real-time PCR, SYBR green, Multiplex PCR

(平成 29 年 7 月 20 日受付 平成 29 年 8 月 15 日受理)

序文

現在、食中毒事例の原因である病原菌を特定するために、分離培養法が用いられている¹⁾。食中毒事例が発生すると、原因になっている可能性のある全ての菌種に対して分離培養法を試みる場合が多い。しかし、食中毒菌の分離培養に用いる培地及び条件は、菌種によって異なるため²⁾、複数の菌種について分離培養を行うと、多くの時間と労力が必要である。また、菌種によっては、患者便や食品からの分離に 1 週間程度を要する³⁾。

食中毒事例において、食中毒菌の特定までの日数を短縮するためには、分離培養前のスクリーニングが有効である。食中毒菌のスクリーニング法として、検出感度及び特異性の高い Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法や蛍光プローブを用いた Multiplex real-time polymerase chain reaction (マルチプレックス リアルタイム PCR) 法が利用されてきた⁴⁾。しかし、LAMP 法では、遺伝子の増幅を濁度として検出するため、1 つの反応系で複数の遺伝子を検出できない。また、蛍光プローブを用いたマルチプレックス リアルタイム PCR 法では、蛍光プローブの種類に限りがあることから、1 つの反応系で検出できる遺伝子の数に限りがある。以上より、これらの方法は、複数の遺伝子の同時検出には適しているとは言えない。

近年、食中毒菌の様々な病原遺伝子を一斉に検出す

る方法として、福島らは SYBR green を用いたマルチプレックス リアルタイム PCR 法を開発した⁷⁾。しかし、この方法では、食中毒菌として希な菌種の病原遺伝子も標的としているため、マルチプレックス リアルタイム PCR 法を 8 回行う必要がある。効率良く食中毒菌をスクリーニングするためには、検出対象とする食中毒菌の種類を絞り込むことが有効であろう。

そこで、本研究では、食中毒事例の発生数、疫学及び臨床的重症度を考慮し、食中毒菌として、腸管出血性大腸菌、赤痢菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター ジェジュニ及びコリ、及び腸炎ビブリオを選定した。これら食中毒菌を同時に検出する方法として、福島らが開発した SYBR green を用いたマルチプレックス リアルタイム PCR 法⁷⁾を改良した。

実験方法

1. 各食中毒菌における供試菌株の選定

本研究で、検出対象とする 6 菌種の食中毒菌として、腸管出血性大腸菌、赤痢菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター ジェジュニ及びコリ、及び腸炎ビブリオを選んだ。腸管出血性大腸菌の主な病原因子は Stx1 及び Stx2 であり、菌株によってはどちらか一方しか保有していない⁸⁾。また、腸炎ビブリオの主な病原因子は TRH 及び TDH であり、菌株によってはどちらか一方しか保有していない⁹⁾。以上より、腸管出血性大腸菌及び腸炎ビブリオの供試菌株については、保有する病原因子の

違いにより各 2 菌株を供試菌株とした。これら以外の菌種については各 1 菌株を供試菌株とした。全ての供試菌株については、過去に千葉県において感染者から分離したものをを用いた（表-1）。

2. 供試菌株からの DNA の抽出

供試菌株から DNA を抽出するためには、最初に増菌培養を行った。カンピロバクター ジェジュニ及びコリの各供試菌株が保存されているマイクロバンクのビーズを 5 %ヒツジ血液寒天培地に塗抹し、37 °C で 2 晩、培養した。培養後、3 白金耳分の菌体を掻き取って 500 μ L の超純水に懸濁し、10,000 $\times g$ で 5 分間、遠心分離した後、上清を除去し、沈査を得た。

一方で、カンピロバクター ジェジュニ及びコリ以外の供試菌株については、各菌株が保存されているマイクロバンクのビーズを LB 培地 Lennox (Becton, Dickinson and Company, Ltd.) に入れ、37 °C で 1 晩、振とう培養した。培養液の 100 μ L を 10,000 $\times g$ で 5 分間、遠心分離した後、上清を除去し、沈査を得た。

上述の様に得た供試菌株の沈査に 200 μ L の InstaGne Matrix (Bio-Rad laboratories, inc.) を加えて、56 °C で 30 分間、加温した。次に、沸騰水で 8 分間、加熱した後、10,000 $\times g$ で 5 分間、遠心分離した。その後、上清を取り、沈査を供試菌株の DNA とした。本研究で改良するマルチプレックス リアルタイム PCR 法について、検出感度を評価する必要がある。吸光度計を用いて、各供試菌株の DNA の OD₂₆₀ の値を測定して DNA 濃度を求め、これら DNA を超純水で 100、10、1、0.1、0.01、0.001 及び 0.0001 ng/ μ L となるように希釈した。

3. マルチプレックス リアルタイム PCR 法を用いた食中毒菌のスクリーニング法の改良

福島らが開発したマルチプレックス リアルタイム PCR 法を用いた食中毒菌のスクリーニング法を、以下の手順で改良した。最初に、福島らの方法で使用されたプライマーの中から、本研究で選定した食中毒菌の病原遺伝子を検出するプライマーを選んだ（表-1）。これらプライマーを組み合わせて、1) 2 つのプライマーセットを作成した。次に、2) 作成したプライマーセットを用いてマルチプレックス リアルタイム PCR 法を行い、食中毒菌の DNA を検出できるか確認した。

1) プライマーセット作成

本方法では、マルチプレックス リアルタイム PCR 法で複数の病原遺伝子を増幅させた後、増幅産物の融解曲線を得て、Tm 値から増幅した病原遺伝子を判別する。どの病原遺伝子が増えたかを正確に判定するためには、同じプライマーセットで検出される複数の病原遺伝子間で、遺伝子増幅産物の Tm 値の差を大きくする必要がある。従って、プライマーセットの作成に

あたり、各病原遺伝子の増幅産物の Tm 値を把握する必要がある。

各病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の把握のために、各供試菌株の濃度調製済みの DNA (100、10、1、0.1、0.01、0.001 及び 0.0001 ng/ μ L) を用いて、各病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の把握を行い、各病原遺伝子を増幅させた後、融解曲線を得た。この時、供試菌株の DNA を異なる菌種間で混和せずに使用した。各病原遺伝子の増幅産物について、融解曲線が最も高い蛍光強度を示した時の温度を Tm 値とした。

しかし、SYBR Green で遺伝子増幅産物の融解曲線から Tm 値を求めた場合、同じ増幅産物でも、測定之都度、Tm 値が僅かに異なることから¹⁰⁾、各病原遺伝子の増幅産物の Tm は、「温度の幅」として捉える必要がある。そこで、各供試菌株について、濃度が異なる DNA (100、10、1、0.1、0.01、0.001 及び 0.0001 ng/ μ L) を用いてシングル プレックス PCR 法を実施した後、病原遺伝子の増幅産物の Tm 値を得た。各病原遺伝子について、供試菌株の DNA 濃度の違いにより、8 つの Tm 値が得られるので、これら Tm 値の内、最大値及び最小値を調査した。また、8 つの Tm 値の平均値を算出した。

一方で、SYBR Green は、遺伝子に架橋していない状態でも弱い蛍光を有する。遺伝子に未架橋の SYBR Green の蛍光強度を把握するため、各病原遺伝子を検出するプライマーと超純水を用いて、シングル リアルタイム PCR 法を行った後、8 つの融解曲線を得た。これら融解曲線を基に、蛍光強度の cut-off 値を設定した。供試菌株の DNA を用いて、上述の様に、病原遺伝子の Tm 値を求めた時、Tm 値の蛍光強度が cut-off 値以下の時は、病原遺伝子の増幅無しと判定した。

シングル リアルタイム PCR 法の試薬及び機器として、それぞれ SYBR Premix DimerEraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ (株)) 及び StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, inc.) を用いた。

シングル リアルタイム PCR 法の反応液の組成については、1 検体当たり 10 μ L の Premix DimerEraser (Perfect Real Time) (2 $\times$ conc.)、0.6 μ L の 10 μ mol/ L フォワード及びリバースプライマー、0.4 μ L の Rox Reference Dye (50 $\times$ conc.)、6.4 μ L の超純水及び 2 μ L の各供試菌株の DNA とした（表-1）。

シングル リアルタイム PCR 法の反応条件を、最初の 1 サイクルが 95 °C で 30 秒間、次の 30 サイクルが 95 °C で 5 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 30 秒間とした。シングル リアルタイム PCR 法で各病原遺伝子を増幅させた後、95 °C で 15 秒間、60 °C で 60 秒間、95 °C で 15 秒間の条件で融解曲線を得た。

各病原遺伝子の増幅産物の Tm 値を把握した後、病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の差が大きくなる様に、プライマーセット A 及び B を作成した。

表-1 各供試菌株の病原遺伝子と検出に使用したプライマー

食中毒菌	菌株番号	病原遺伝子	プライマー ²	
			名称	配列
腸管出血性大腸菌	CEC11151	stx1	JMS1-F	GTCAACGTAACAAACCGTAACA
			JMS1-R	TCGTTGACTACTTCTTATCTGGA
	CEC14018	stx2	JMS2-F	CGACCCCTCTTGAACATA
			JMS2-R	GATAGACATCAAAGCCCTCGT
赤痢菌	CSH15002	ipaH	ipaH1672-F	CTGAATTGATACCTTAAGTCAAGC
			ipaH1671-R	AGGCACGCCCTAAACCTATAAGCT
サルモネラ菌	CS14064	invA	invA2-F	GATTCTGGTACTAATGGTGATGATC
			invA2-R	OCCAGGCTATCGCCAATAAC
カンピロバクター ジェジュニ	CC15004	specific	AB-F	CTGAATTGATACCTTAAGTCAAGC
			AB-R	AGGCACGCCCTAAACCTATAAGCT
カンピロバクター コリ	CC15007	ceuE	ceuE-For	GGCTCAAAATGGTTAAGCG
			ceuE-Rev	CATTTCGCTCTCATATGC
腸炎ビブリオ	CVP00001	tdh	tdh250-F	CAAGTACTGCAATAAAAACTAGCACTACG
			tdh250-R	AGCTATCACCCCTCATCATATACTAATAAG
	CVP02022	tdh	tdh-F176	TCCATCTGTCCCTTTTCCTG
			tdh-R422	AGACACCGCTGCCATTGTAT

² 福島県に報告されたプライマーを本研究において利用した³⁾。

作成した各プライマーセットにおいて、異なる病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の「温度の幅」が重なっていないことを確かめるために、以下のことを行った。1 つのプライマーセットにおいて、「病原遺伝子 A の増幅産物の Tm の平均値 > 病原遺伝子 B の増幅産物の Tm の平均値」の関係にある病原遺伝子 A 及び B について、「病原遺伝子 A の増幅産物の Tm の最小値－病原遺伝子 B の増幅産物の Tm の最大値」を算出した。この値が 0 より大きい時、異なる病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の「温度の幅」は重なっていないと判定した。

2) マルチプレックス リアルタイム PCR 法による食中毒菌の検出

プライマーセット A 及び B の食中毒菌検出における有用性を評価するため、各供試菌株の濃度調製済みの DNA (100、10、1、0.1、0.01、0.001 及び 0.0001 ng/μL) を用いて、マルチプレックス リアルタイム PCR 法を行った。各病原遺伝子を増幅させた後、融解曲線を得た。供試菌株の DNA は、異なる菌種間で混和せずに使用した。融解曲線の Tm 値の蛍光強度が「1) プライマーセット作成」で設定した cut-off 値以上であり、かつ、その Tm 値が「1) プライマーセット作成」で把握した Tm 値の温度幅に収まっている場合、目的の病原遺伝子の増幅有りと判定した。DNA 濃度の違いから各供試菌株の検出限界を調査した。

マルチプレックス リアルタイム PCR 法及び融解曲線の反応条件については、「1) プライマーセット作成」と同様にした。

各プライマーセットの組成については、1 検体当たり、各病原遺伝子を検出する 10 μmol/L のフォワード及びリバースプライマーを 0.6 μL ずつ混和し、全量を 4.8 μL とした。マルチプレックス リアルタイム PCR 法の反応液の組成については、1 検体当たり、10 μL の Premix DimerEraser (Perfect Real Time) (2×conc.)、4.8 μL のプライマーセット A 又は B、0.4 μL の Rox

Reference Dye (50×conc.)、2.8 μL の超純水及び 2 μL の各供試菌株の DNA とした。

結果

1. プライマーセットの作成

シングル及びマルチプレックス リアルタイム PCR 法における遺伝子増幅の有無を判定する際に必要となる、cut-off 値を以下の様に設定した。各病原遺伝子を検出するプライマーと陰性コントロールである超純水を用いて、シングル リアルタイム PCR 法を行った後、8 つの融解曲線を得たところ、各融解曲線の最大値は 1400～3000 程度であった。そこで、本研究では、融解曲線の Tm 値の蛍光強度 (-R' (T)) が 5000 以上の場合を遺伝子の増幅有りと判定した。

各病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の把握のために以下のことを行った。各病原遺伝子について、シングルリアルタイム PCR 法を行った後、遺伝子増幅産物の融解曲線を得た。その結果、全ての病原遺伝子において、全ての DNA 濃度で非特異的な融解曲線を示す増幅遺伝子は確認されなかった。

シングル リアルタイム PCR 法実施後の各病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の最大値、最小値及び平均値を表-2 に示した。カンピロバクター ジェジュニ及びコリ以外の食中毒菌の病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の「最大値－最小値」は、0.3 °C 以内であった。カンピロバクター ジェジュニ及びコリの病原遺伝子の増幅産物について、Tm 値の「最大値－最小値」は、それぞれ 0.9 °C 及び 0.6 °C であった。

各病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の差が大きくなる様に、プライマーセット A 及び B を作成した (表-2)。

具体的なプライマーセットの作成方法としては、全ての病原遺伝子の増幅産物の平均の Tm 値を、降順に並べた後、プライマーセット A には 1、3、5 及び 7 番目の病原遺伝子が、プライマーセット B には 2、4、6 及び 8 番目の病原遺伝子のプライマーが含まれる様に

表-1 供試菌株のDNA濃度別にみた増幅産物のTm値

プライマー セット	食中毒菌	病原 遺伝子	シングルリアルタイムPCR法実施後の融解曲線における「供試菌株のDNA濃度」及び「病原遺伝子の増幅産物のTm値」							Tm値の代表値		
			100 ng/μL	10 ng/μL	1 ng/μL	0.1 ng/μL	0.01 ng/μL	0.001 ng/μL	0.0001 ng/μL	最大値 ²	最小値 ²	平均値 ²
A	赤痢菌	ipaH	84.8℃	84.8℃	84.5℃	84.5℃	84.5℃	84.5℃	NA ³	84.8℃	84.5℃	84.61℃
	腸炎ビブリオ	vh	79.7℃	79.7℃	79.7℃	79.7℃	80.0℃	NA	NA	80.0℃	79.7℃	79.79℃
		sh	79.1℃	79.1℃	79.4℃	79.4℃	79.4℃	NA	NA	79.4℃	79.1℃	79.31℃
	カンピロバクター ジェジュニ	spvB	77.0℃	77.0℃	77.0℃	76.7℃	76.4℃	76.1℃	NA	77.0℃	76.1℃	76.71℃
B	サルモネラ属菌	invA	82.1℃	82.1℃	82.1℃	82.4℃	82.4℃	NA	NA	82.4℃	82.1℃	82.24℃
	腸管出血性大腸菌	eae	80.8℃	80.8℃	79.7℃	79.7℃	79.7℃	NA	NA	80.8℃	79.7℃	79.85℃
		eae	79.1℃	79.1℃	79.1℃	78.8℃	79.1℃	NA	NA	79.1℃	78.8℃	79.07℃
	カンピロバクター コリ	camE	73.7℃	73.7℃	73.7℃	73.4℃	73.1℃	73.4℃	NA	73.7℃	73.1℃	73.52℃

²濃度が異なるDNA(100、10、1、0.1、0.01、0.001及び0.0001 ng/μL)を用いてシングルプレックスPCR法を実施した後、遺伝子増幅産物のTm値の最大値、最小値及び平均値を示した。

³蛍光強度(−R(T))の最大値がout-of-range以下のため、Tm値が算出されなかった。

した。その結果、プライマーセット A には、赤痢菌、腸炎ビブリオ及びカンピロバクター ジェジュニの病原遺伝子を検出するプライマーが、プライマーセット B には、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌及びカンピロバクター コリの病原遺伝子を検出するプライマーが含まれた。

作成したプライマーセットにおいて、「病原遺伝子 A の増幅産物の Tm の平均値 > 病原遺伝子 B の増幅産物の Tm の平均値」の関係にある病原遺伝子 A 及び B について、「病原遺伝子 A の増幅産物の Tm の最小値－病原遺伝子 B の増幅産物の Tm の最大値」を算出すると、その値は 5.10～0.30℃であった。以上より、作成したプライマーセットにおいて、異なる病原遺伝子の増幅産物の Tm 値の「温度の幅」は重なっていなかった。

2. マルチプレックス リアルタイム PCR 法による食中毒菌の検出

腸管出血性大腸菌及び腸炎ビブリオの病原遺伝子の検出限界は、0.01 ng/μL であった（図）。赤痢菌及びカンピロバクター ジェジュニ及びコリの病原遺伝子は、0.001 ng/μL であった。また、全ての病原遺伝子の全ての DNA 濃度において、プライマーダイマー等の非特異的な増幅遺伝子は確認されなかった。

考察

本研究では、福島らが開発した SYBR green を用いたマルチプレックス リアルタイム PCR 法を改良することで⁷⁾、6 種の食中毒菌を一斉にスクリーニングする系を作成した。改良した方法の感度は高かった。

本研究におけるスクリーニングの対象として、過去の日本での食中毒発生件数から¹¹⁾、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター ジェジュニ及びコ

リ及び腸炎ビブリオを選んだ。黄色ブドウ球菌及びウェルシュ菌による食中毒も発生件数が多かったが、これら菌種をスクリーニングの対象にしなかった。黄色ブドウ球菌及びウェルシュ菌は、毒素型の食中毒菌（食品中で産生された毒素をヒトが摂取することで発症）である¹²⁻¹³⁾。黄色ブドウ球菌及びウェルシュ菌が食中毒の原因菌と証明するには、これら菌が毒素産生能を有する必要がある。一般的に、細菌において、毒素産生を制御している遺伝子領域の変異や構造の違いにより、毒素産生量が極めて低い菌株は存在する^{10, 14)}。従って、毒素型食中毒における原因菌の証明には毒素遺伝子の保有では無く、産生性を調べるのが大切である¹⁵⁻¹⁶⁾。以上より、黄色ブドウ球菌及びウェルシュ菌は、本研究で開発を目指す病原「遺伝子」による食中毒菌のスクリーニング法には適さないもので、スクリーニングの対象から除外した。また本研究では、感染者の症状が重篤化し易いことから、赤痢菌をスクリーニングの対象とした。赤痢菌は、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律¹⁷⁾」の三類感染症に指定されている公衆衛生的に重要な病原体である。また、赤痢菌の食中毒の発生頻度は低い、過去に数回、広域的な食中毒が発生している¹⁸⁻¹⁹⁾。

本研究で検出対象とした全ての病原遺伝子において、検出限界は 0.01 ng/μL 以下であった。菌のゲノムサイズを 500 万塩基（例えば、腸管出血性大腸菌 O157 及びサルモネラ属菌のゲノムサイズは、それぞれ約 550 万及び約 500 万塩基²⁰⁻²¹⁾）とした場合、0.01 ng/μL は、約 10³ copies/μL に相当する。検出感度が極めて高い LAMP 法の検出限界が 10² copies/μL 程度である⁹⁾ことを考えると、本研究で改良したスクリーニング法の感度は良好と言える。

本研究の今後の課題として以下のことが挙げられる。第一に、本研究では、目的とする病原遺伝子以外の遺

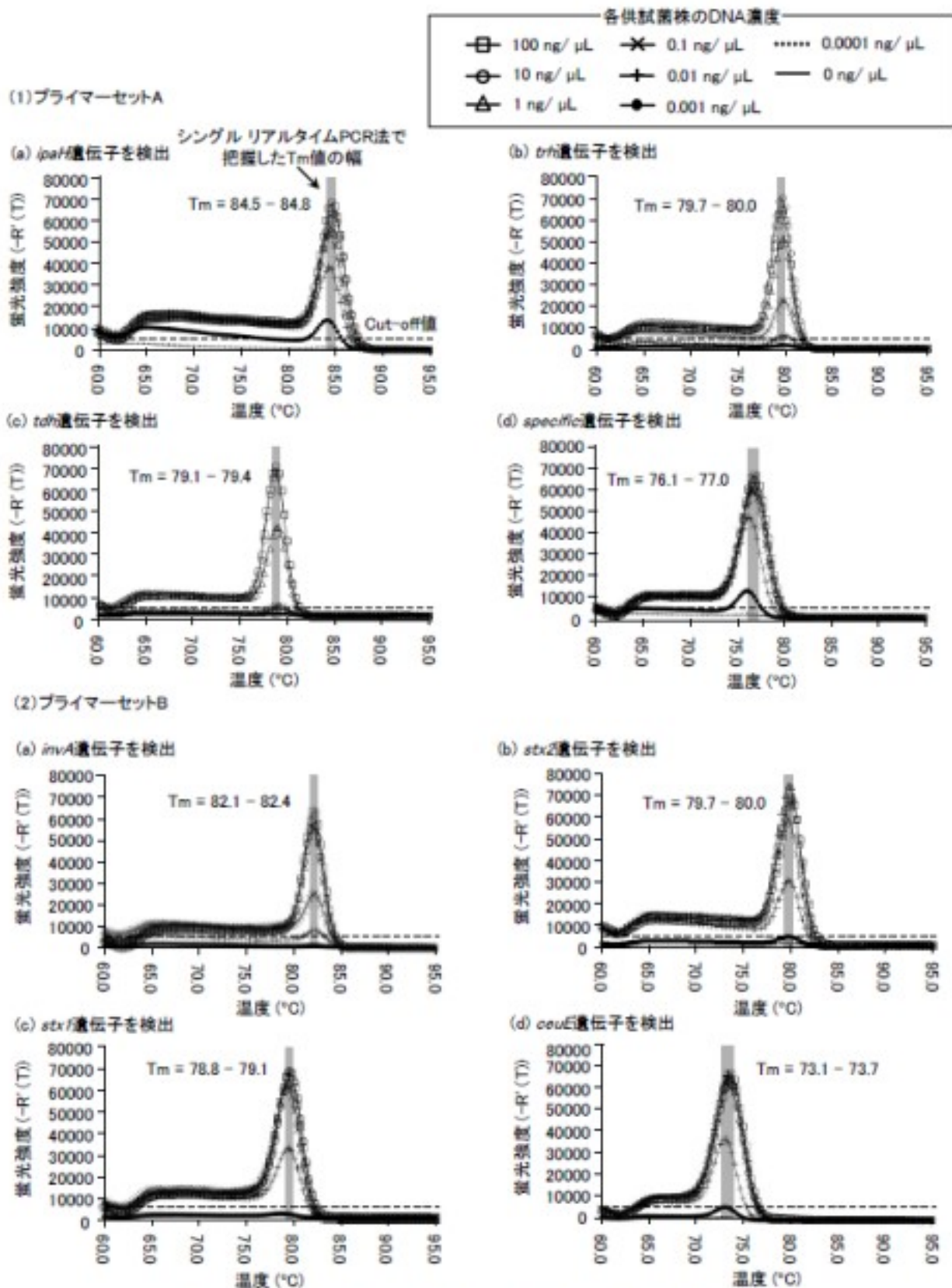


図 マルチプレックスリアルタイムPCR法による病原遺伝子の増幅産物の融解曲線

伝子の混入がない理想的な状態でしか、改良したスクリーニング法の感度を評価していない。

また、本方法の特異性も評価されていない。今後、目的以外の遺伝子が多く含まれる検体を用いて、感度及び特異性を評価する必要があるだろう。次に、本研究では、食中毒菌を含む食品や患者便からの食中毒菌 DNA の抽出法を検討していない。本研究では、調製した食中毒菌の DNA を用いたが、実際の食中毒事例では、患者便や食品培養液から食中毒菌の検出を行う。便に含まれる胆汁酸や培地中の成分で、PCR 法や LAMP 法における遺伝子増幅が阻害されることが報告されている²²⁻²³⁾。本研究で改良したスクリーニング法を食中毒事例で活用する前に、患者便や食品培養液からの食中毒菌 DNA を抽出する方法も検討する必要がある。

結論として、本研究では、主要な食中毒菌の 6 菌種の全てを、2 回のマルチプレックス リアルタイム PCR 法の運行で検出するスクリーニング法を作成した。千葉県内では、検査課を持つ全ての保健所には、リアルタイム PCR 法装置が整備されている。将来的に、本研究で改良したスクリーニング法を、保健所の検査課に導入できれば、この方法は食中毒事例における迅速な行政判断に貢献できるだろう。

謝辞

本研究は、平成 27 年度ちば県民保健予防財団予防基金事業助成金により実施されたものです。

文献

- 1) 栄研化学株式会社: 食品検査微生物マニュアル 改訂 第 2 版, 174-213 (2009)
- 2) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル, (2017).
- 3) 公益財団法人 日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 312-323 (2015)
- 4) 腸管出血性大腸菌 O26、O103、O121、O145 及び O157 の検査法について, 食安監発 1120 第 1 号, 平成 26 年 11 月 20 日
- 5) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA., *Nucleic Acids Res*, 28 (12), E63 (2000).
- 6) Yokoyama, E., Uchimura, M., Ito, K.: Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* by loop-mediated isothermal amplification., *J Food Prot*, 73 (6), 1064-1072 (2010)
- 7) Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N., et al.: Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-Time SYBR Green PCR Analysis., *Int J Microbiol*, 2010 (2010)
- 8) 国立感染症研究所: 腸管出血性大腸菌 2017 年 4 月現在 病原微生物検出情報, 38, 87-88 (2017)
- 9) 余 明順, 山本 耕一郎, 本田 武司: 腸炎ビブリオにおける溶血毒遺伝子 (*tdh*, *trh*) の保有とウレアーゼ産生性および血清型との関連性について, *感染症学雑誌*, 68 (9), 1068-1074 (1994)
- 10) Etoh, Y., Hirai, S., Ichihara, S., Maeda, E., Yokoyama, E., Sera, N, et al.: Evolutionary model of the divergence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 lineage I/II clades reconstructed from high resolution melting and Shiga-like toxin 2 analyses., *Infect Genet Evol*, 24, 140-145 (2014)
- 11) 食中毒統計資料, 厚生労働省医薬品食品局食品安全部 (URL: http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html)
- 12) 公益財団法人 日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 324-339 (2015)
- 13) 公益財団法人 日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 412-428 (2015)
- 14) 胡 東良, 岡村 雅史: ブドウ球菌エンテロトキシンに関する最新の知見-特に分子多様性と生物学的多機能性について-, *食品微生物学会雑誌*, 32 (2), 87-94 (2015)
- 15) 甲斐 明美, 五十嵐 英夫: 感染症の話・ブドウ球菌食中毒, *IDWR*, 3 (13) (2001)
- 16) 公益財団法人 日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 412-428 (2015)
- 17) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律, 法律第 114 号, 平成 10 年 10 月 2 日
- 18) IDWR 2012 年第 25 号<速報>細菌性赤痢, 国立感染症研究所細菌第一部 (URL: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/id/1583-disease-based/sa/dysentery/idsc/idwr-sokuhou/2354-idwrs-1225.html>)
- 19) 赤痢菌の試験法について, 厚生労働省医薬品食品保健部監視安全課発 事務連絡, 平成 14 年 1 月 9 日
- 20) Makino, K., Yokoyama, K., Kubota, Y., Yutsudo, CH., Kimura, S., Kurokawa, K., et al.: Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak., *Genes Genet Syst*, 74 (5), 227-239 (1999)
- 21) Iriarte, A., Giner-Lamia, J., Silva, C., Betancor, L., Astocondor, L., Cestero, JJ., et al.: Draft Genome Sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Infantis Strain SPE101, Isolated from a Chronic Human Infection., *Genome Announc*, 5 (29) (2017)

- 22) サルモネラ検出試薬キット，栄研化学株式会社
(URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/faq/salmonella.html>)
- 23) Zhang, BW., Li, M., Ma, LC., Wei, FW.: A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples., Biochem Genet, 44 (11-12), 503-512 (2006)