

マルチプレックスPCRを用いた食中毒起因細菌一括検出方法

田栗 利紹・野口 英太郎・平山 文俊

The Simultaneous detection method of 18 species of Food-born Pathogenic Bacteria by Multiplex PCR.

Toshitsugu TAGURI , Hidetaro NOGUCHI , Humitoshi HIRAYAMA

The Simultaneous detection method of 18 species of Food-born Pathogenic Bacteria was developed by multiplex PCR. The 18 species of Food-born Pathogenic Bacteria examined were Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum*. At first, We picked up some used primers in reference, which were authorized by specificity and sensitivity, and then selected the best sets out by gradient thermal cycling condition. Secondly, We grouped them into multipurpose applications (ex. *E. coli* group, *salmonella* and *shigella* group, genus *Vibrio* group and so on) and decided the optimum concentration ratio on them by examined competitive interaction. As saving the time, the labor and the cost for which programmed any primers and proved their specificity and sensitivity, we were able to present the new method which was rapid, convenient and comprehensible after all.

Key word : Simultaneous detection , Food-born Pathogenic Bacteria , Multiplex PCR

キーワード：一括検出方法，食中毒起因細菌，マルチプレックスPCR

はじめに

食品衛生、食品工場、環境衛生、家畜衛生に係わる環境の中で、HACCPを中心とした微生物制御体制が計られている今日、対象となる病原細菌の種類は非常に多い。加えて、1999年(平成11年)12月、食品衛生法施行規則の一部を改正する省令(厚生省令第105号)により、2類感染症であるコレラ菌、赤痢菌及びチフス菌等が食品媒介性の原因物質として追加されている。一般的に、腸管出血性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、チフス菌、サルモネラ属菌、赤痢菌、コレラ菌、腸炎ビブリオ、ビブリオバルニフィカス、ウェルシュ菌、カンピロバクター、ジェジュニ、カンピロバクターコリ、リステリアモノサイトゲネス、エルシニアエンテロコリチカ、エルシニアシュードチュベクローシス、セレウス菌、黄色ブドウ球菌及びボツリヌス菌のような細菌を検出し同定する

ためには、選択分離培地による培養や有機物の分解性を観察する性状試験、染色法による形態観察および薬物感受性試験等により細菌固有の性状を証明することが行われてきた。これらの検査方法は、細菌種ごとに異なっており、食中毒事件毎に全ての細菌種を網羅することは不可能に近く、事件の発生状況や検査者の判断で菌種の絞り込みを行い検査に供してきた。もちろん全ての事件に対して全ての検査を実施することは現実的ではなく必要性も乏しいが、一方で検査に供しても目的の細菌が検出されず、原因不明となることも少なくない。従って、多数の細菌種を一括して検査できる新検査技法の開発が望まれてきた。

PCRが食品衛生検査に応用されるようになって久しいが、前述の食中毒起因細菌に対して、様々な研究者により様々なプライマー対が設計され、それぞれ

の特異性が証明されてきた¹⁾⁻²⁴⁾。この中で細菌株間や数種類の細菌種間ではM - PCRが応用され、方法論も確立してきたが、前述の細菌種を全般にわたって調査した報告は少ない²⁾。

一般的に、プライマー対の作製においては、プライマー設計のみならず特異性の証明が最重要点であると考えられる。特異性の証明には、標的遺伝子を保持した細菌株や類属細菌の基準株および野生株等の入手が必要であり、加えて成績がプライマーの設計用ソフトの優劣および技術や経験に左右されるため簡単ではない。さらに、標的細菌種数が多くなればなるほど莫大な時間、労力および費用を費やさなければならぬ。

このような状況の中で、本研究は、多数の既成PCR用プライマー対からの有効な選抜方法を試行することと、選抜プライマー対を用途に応じてグループ化し、それらの最適濃度条件を決定することを通じて、食中毒起因細菌に対する迅速、簡便かつわかりやすい一括検出方法を確立することを目的として実施された。

調査方法

1 既成プライマー対の選抜・合成及び調製方法

図1により、文献等から抽出した様々なプライマー対を調製した。即ち、プライマー対は、カラム精製グレードで委託合成(インピトロジェン)したものを、

乾燥状態のオリゴヌクレオチドを滅菌蒸留水で200 μMに調製し、-30℃で凍結保存した。単プライマー対の場合はセンス及びアンチセンスを終濃度10 μMになるように調製し、マルチプレックスプライマー対の場合は最適濃度比となるように調製して使用溶液とし、-30℃で凍結保存した。

2 供試菌株とDNAの抽出

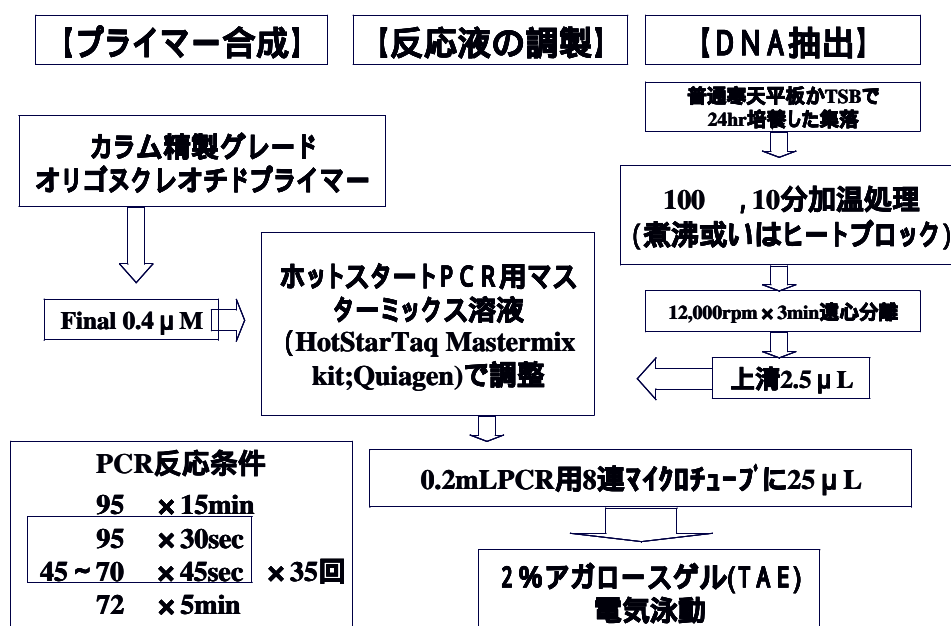
試験に供した細菌株の一覧を表1に示した。一部の菌株を除き全て野生株を用いた。図1に示した処理方法により、これらの菌株からDNAを抽出した。

即ち、0.5 mL用マイクロチューブに200 μLの滅菌蒸留水を分注し、予めTSA寒天培地に純培養した細菌集落の1/3白菌耳を懸濁した。100℃、10分間煮沸するかヒートブロックで加熱したのち、12,000 rpm × 3分間遠心分離した上清2.5 μLを粗DNA溶液として試験に供した。

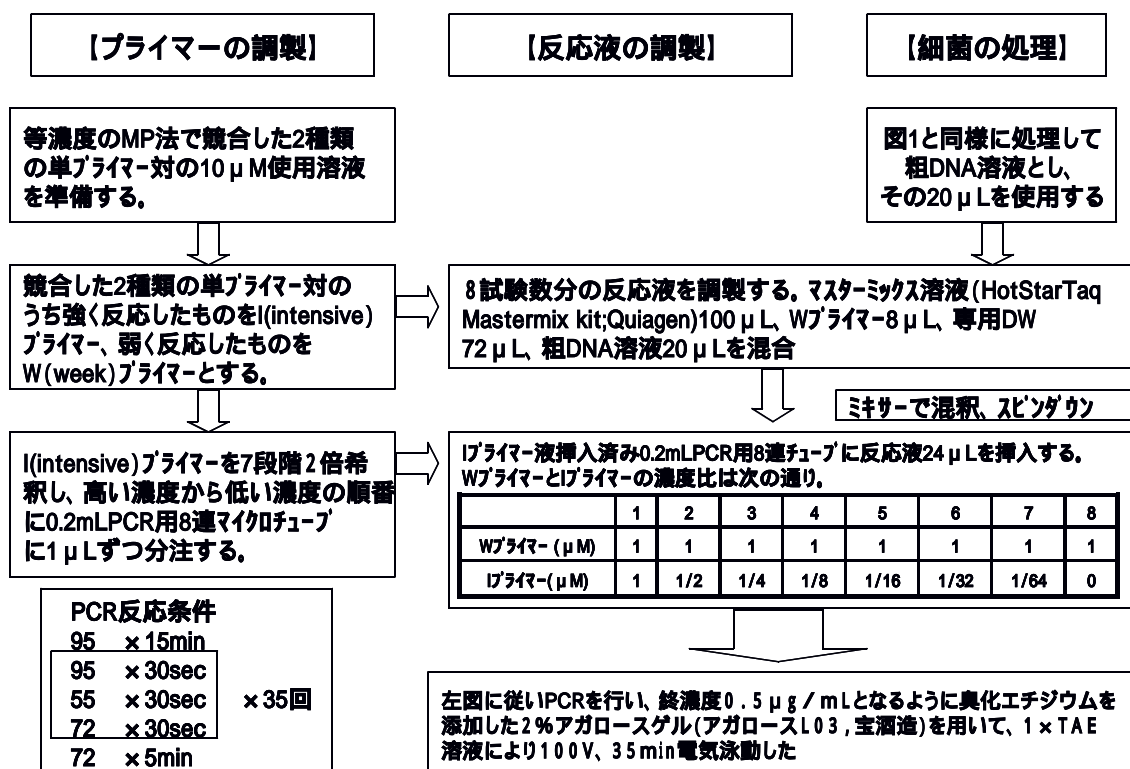
3 PCR反応

(1) グラジエントPCR

各プライマー対の最適アニーリング温度範囲を測定した。PCR反応液は、最適pHを維持するためのPCR緩衝液、耐熱性ポリメラーゼ、プライマー対、4種のヌクレオチドおよび標的粗DNA溶液から構成される。最終的にM - PCRを目的とするため、本研究におけるポリメラーゼは、硫酸アンモニウムと塩化カリウムとをPCR緩衝液に使用することで高度な特異性が



【図1】 グラジエントPCR検査法フロー



【図2】 競合PCRフロー

期待できるホットスタータックマスターミックスキット(キアゲン)を用いた。メーカー手順書に沿ってマスターミックスを調製し(終濃度塩化マグネシウム:1.5 mM, dNTP:200 μM, その他の試薬組成未公表)、プライマー対濃度を最終0.4 μMに統一して挿入し、最後に標的DNA溶液2.5 μLを入れて最終反応液量25 μLで反応させた。PCR装置は、グラジエント式サーマルサイクラー(i-Cycler, BIO-RAD)を用いて、95 × 15minの前熱変性(ホットスタート用ポリメラーゼの活性化に必要)の後、95 × 30secの熱変性と45.0 - 70.0のグラジエントなアニーリング温度での反応(45sec)を35回繰り返し、72.0 × 7minの後伸長反応を行った。グラジエント温度の詳細は45.0、46.8、49.8、54.1、60.6、65.2、68.2、70.0 である。

増幅産物は、終濃度0.5 μg/mLとなるように臭化エチジウムを添加した2%アガロースゲル(アガロースL03, 宝酒造)を用いて、1×TAE溶液により100V, 35min電気泳動した。

(2)競合PCR

測定したプライマー対は、用途とプライマー対数を考慮に入れて、大腸菌用、サルモネラ赤痢菌用、ピブリオ属菌用、キャンピロバクター・ウェルシュ菌用、黄色ブドウ球菌用およびボツリヌス菌用にグループ

化し、それぞれのマスターミックスの作製を試みた。各プライマー対は100 μMの保存溶液を適宜希釈混合して各々10 μMの試作混合液を調製し、最終濃度0.4 μMで試験に供した。

以上の方法で作製したマスターミックス群を用いて、表1の菌株について、PCRを実施した。この成績により、プライマー対同士の競合作用が認められる場合は、増幅されるべきバンドが消失したり、薄く反応して増幅効率に影響が認められ、そうでない場合は明瞭なバンドが形成される。ここで、最適濃度比を決定するために競合PCRを次により実施した(図2)。競合しないプライマー対群はそのままの条件を用い、競合するプライマー対群には影響される側のプライマー濃度を1とし、影響する側のプライマー対を2倍段階希釈したプライマー溶液を6列作製して、コンペティティブに反応させる。その成績により、両者プライマー対の最適濃度比を決定し、最終的にミックスプライマーの濃度比を決定した。

(3)一括検出試薬の作製

以上の方法で調製したプライマー対溶液を、無菌およびDNAaseフリーのディスプレイブルチューブに分注し、乾燥させることを試みた。合成プライマーは全て保存溶液が200 μMとなるように調製した。これらの保存溶液を用いて、各種マスターミックスを、

前述の濃度比で0.5 mLマイクロチューブに100 µL調製した。即ち、ECMXはpmMK原液、pLT原液、pST原液、pI原液、およびpEco原液の各々2.5 µL、0.625 µL、2.5 µL、0.625 µLおよび5 µLずつを0.5 mLマイクロチューブに入れ滅菌蒸留水で100 µLとした。同様にSSMX、VIBMX、CCWMX、およびSAMXを調製した。これらのマスターミックスを滅菌済み8連チューブ用分割リザーバー(B-0817-1, ビーエム機器)にその順番で注入し、第8番目の分割容器にはDWを100 µL注入した。これらをよく混釈した後、8連マイクロピペットを用いて、各々の分割容器から1 µLをキャップ付き8連チューブに分注し、濃縮乾燥機(マイクロ遠心エバポレーター、旭テクノグラス)を用いて、60 °Cで3時間程度処理して完全に乾燥させた。これを食中毒起因細菌一括検出試薬とした。

(4) 食中毒起因細菌一括検出試薬の特異性

食中毒起因細菌一括検出試薬を使用して特異性を確認した。耐熱性ポリメラーゼは、高度な特異性が

期待でき、簡便な操作で準備できるホットスタートマスターミックスキット(キアゲン)を用いた。メーカー手順書に沿ってマスターミックスを調製し(終濃度塩化マグネシウム:1.5 mM, dNTP:200 µM, その他の試薬組成未公表)、無菌的に、食中毒起因細菌一括検出試薬にチューブ当たり22.5 µLずつ分注した。最後に表1で準備した標的DNA溶液2.5 µLを株番号の順番で各々のマスターミックスに対応するように入れて反応させた。サーマルサイクラーの温度条件は、95 °C × 15 minの前熱変性(ホットスタート用ポリメラーゼの活性化に必要)の後、95 °C × 30 secの熱変性、55.0 °C × 30 secのアーニリング、72 °C × 30 secの伸長反応を35回繰り返し、72.0 °C × 7 minの後伸長反応を行った。増幅産物は、マスターミックス毎に株番号の順番で泳動した。電気泳動は終濃度0.5 µg / mLとなるように臭化エチジウムを添加した2%アガロースゲル(アガロースL03, 宝酒造株式会社)を用いて、1 × TAE溶液により100 V、25 min行った。

[表1] 供試菌株一覧

菌株番号	大腸菌(毒素)	菌株番号	サルモネラ属菌(O抗原)および赤痢菌	菌株番号	ビブリオ属菌(CT or TDH)
Eco1	<i>Escherichia coli</i>	SS1	<i>Salmonella</i> Typhi(09)	VIB1	<i>Vibrio cholerae</i> 0139(+)
Eco2	<i>E. coli</i>	SS2	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB2	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco3	<i>E. coli</i>	SS3	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB3	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco4	<i>E. coli</i>	SS4	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB4	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco5	<i>E. coli</i> IFO15034	SS5	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB5	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco6	<i>E. coli</i> IFO15035	SS6	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB6	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco7	<i>E. coli</i> IFO3972	SS7	<i>S. Haifa</i> (04)	VIB7	<i>V. cholerae</i> 0139(+)
Eco8	<i>E. coli</i> -ETEC(LT)	SS8	<i>S. Typhimurium</i> (04)	VIB8	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco9	<i>E. coli</i> -ETEC(LT)MIYAGI	SS9	<i>S. Tennessee</i> (07)	VIB9	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco10	<i>E. coli</i> -ETEC(LT)AKITA	SS10	<i>S. Tompson</i> (07)	VIB10	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco11	<i>E. coli</i> -ETEC(LTST)	SS11	<i>S. Mbandaka</i> (07)	VIB11	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco12	<i>E. coli</i> -ETEC(LTST)	SS12	<i>S. Newport</i> (08)	VIB12	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco13	<i>E. coli</i> -ETEC(ST)	SS13	<i>S. Chincol</i> (08)	VIB13	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco14	<i>E. coli</i> -ETEC(ST)MIYAGI	SS14	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB14	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco15	<i>E. coli</i> -ETEC(ST)AKITA	SS15	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB15	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco16	<i>E. coli</i> -O157 (SLT1+2)	SS16	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB16	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco17	<i>E. coli</i> -O157 (SLT1+2)	SS17	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB17	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco18	<i>E. coli</i> -O157 (SLT1+2)	SS18	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB18	<i>V. parahaemolyticus</i> (-)
Eco19	<i>E. coli</i> -O157 (SLT1+2)	SS19	<i>Shigella flexinelli</i>	VIB19	<i>V. parahaemolyticus</i> (-)
Eco20	<i>E. coli</i> -O157 (SLT1+2)	SS20	<i>S. flexinelli</i>	VIB20	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco21	<i>E. coli</i> -O157 (SLT1+2)	SS21	<i>S. flexinelli</i>	VIB21	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco22	<i>E. coli</i> -O157 (SLT1+2)	SS22	<i>S. flexinelli</i>	VIB22	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco23	<i>E. coli</i> -O157 (SLT2)	SS23	<i>S. flexinelli</i>	VIB23	<i>V. parahaemolyticus</i> (-)
Eco24	<i>E. coli</i> -O157 (SLT2)	SS24	<i>Shigella sonnei</i>	VIB24	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco25	<i>E. coli</i> -O157 (SLT2)	SS25	<i>S. sonnei</i>	VIB25	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco26	<i>E. coli</i> -EIEC	SS26	<i>S. sonnei</i>	VIB26	<i>V. parahaemolyticus</i> (-)
Eco27	<i>E. coli</i> -EIECMYAGI	SS27	<i>S. sonnei</i>	VIB27	<i>V. vulnificus</i>
Eco28	<i>E. coli</i> -EIECAKITA	SS28	<i>S. sonnei</i>	VIB28	<i>V. vulnificus</i>
				VIB29	<i>V. vulnificus</i>
				VIB30	<i>V. vulnificus</i> MIYAGI
				VIB31	<i>V. vulnificus</i> MIYAGI

菌株番号	カンピロバクター属菌およびウェルシュ菌	菌株番号	黄色ブドウ球菌(毒素型)	菌株番号	リステリアモノサイトゲネス・エルシニア属菌・セレウス菌
CCW1	<i>Campylobacter lariidis</i>	Sa1	<i>Staphylococcus aureus</i> (A型)	LYB1	<i>Listeria monocytogenes</i> MIYAGI
CCW2	<i>C. lariidis</i>	Sa2	<i>S. aureus</i> (B型)	LYB2	<i>L. monocytogenes</i> AKITA
CCW3	<i>Campylobacter jejuni</i>	Sa3	<i>S. aureus</i> (-)	LYB3	<i>Yersinia enterocolitica</i> MIYAGI
CCW4	<i>C. jejuni</i>	Sa4	<i>S. aureus</i> (C型)	LYB4	<i>Y. enterocolitica</i> MIYAGI
CCW5	<i>C. jejuni</i>	Sa5	<i>S. aureus</i> (A型)	LYB5	<i>Y. enterocolitica</i> AKITA
CCW6	<i>C. jejuni</i>	Sa6	<i>S. aureus</i> (-)	LYB6	<i>Y. pseudotuberculosis</i> MIYAGI
CCW7	<i>C. jejuni</i>	Sa7	<i>S. aureus</i> (A型)	LYB7	<i>Bacillus cereus</i> MIYAGI
CCW8	<i>C. jejuni</i>	Sa8	<i>S. aureus</i> (-)	LYB8	<i>B. cereus</i> MIYAGI
CCW9	<i>C. jejuni</i>	Sa9	<i>S. aureus</i> (-)	菌株番号	ポツリヌス菌(毒素型)
CCW10	<i>Campylobacter coli</i>	Sa10	<i>S. aureus</i> (A型)		
CCW11	<i>C. coli</i>	Sa11	<i>S. aureus</i> (AB型)MIYAGI	CB1	<i>Clostridium botulinum</i> (TypeA)
CCW12	<i>Campylobacter fetus</i>	Sa12	<i>S. aureus</i> (-)MIYAGI	CB2	<i>C. botulinum</i> (TypeB)AKITA
CCW13	<i>C. fetus</i>	Sa13	<i>S. aureus</i> (D型)MIYAGI	CB3	<i>C. botulinum</i> (TypeE)AKITA
CCW14	<i>Clostridium perfringens</i> MIYAGI	Sa14	<i>S. aureus</i> (-)MIYAGI	CB4	<i>C. botulinum</i> (TypeA)AKITA
CCW15	<i>C. perfringens</i> MIYAGI	Sa15	<i>S. aureus</i> (A型)MIYAGI		
CCW16	<i>C. perfringens</i> MIYAGI	Sa16	<i>S. aureus</i> (C型)MIYAGI		
CCW17	<i>C. perfringens</i>	Sa17	<i>S. aureus</i> (A型)MIYAGI		
CCW18	<i>C. perfringens</i>	Sa18	<i>S. aureus</i> (-)MIYAGI		
CCW19	<i>C. perfringens</i>	Sa19	<i>S. aureus</i> (B型)MIYAGI		
CCW20	<i>C. perfringens</i>	Sa20	<i>S. aureus</i> (C型)MIYAGI		
CCW21	<i>C. perfringens</i>				
CCW22	<i>C. perfringens</i>				
CCW23	<i>C. perfringens</i>				

IFO番号の菌株は発酵研究所から分譲された菌株、末尾MIYAGI及びAKITA株はそれぞれ宮城県保健環境センターおよび秋田衛生科学研究所から分譲された菌株、その他は全て長崎県衛生公害研究所にて分離同定された菌株
 ETEC: 毒素原性大腸菌, EIEC: 侵入性大腸菌, EHEC: 出血性大腸菌

成績

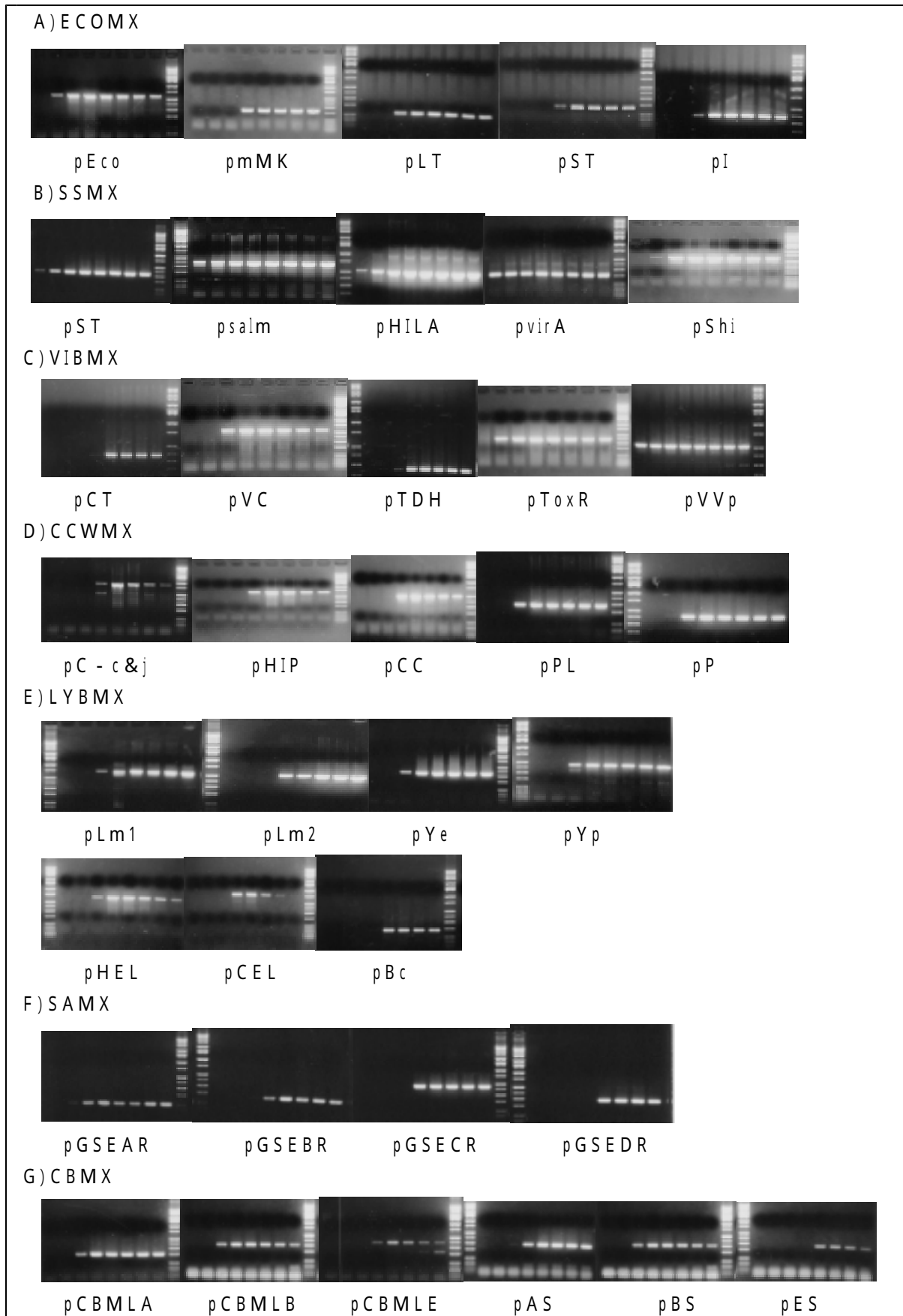
1 グラジエントPCRおよび競合PCR成績

選抜したプライマー対のグラジエントPCR成績を図3に示した。ここで、明確なバンドを形成する温度範囲を各プライマー対の至適アニーリング温度範囲とし、その最大値をグラジエント濃度最大値とした(表2, 3: Tamax)。これらを基にプライマー対の使用用途に従ってグループ化を行った(表2, 3)。

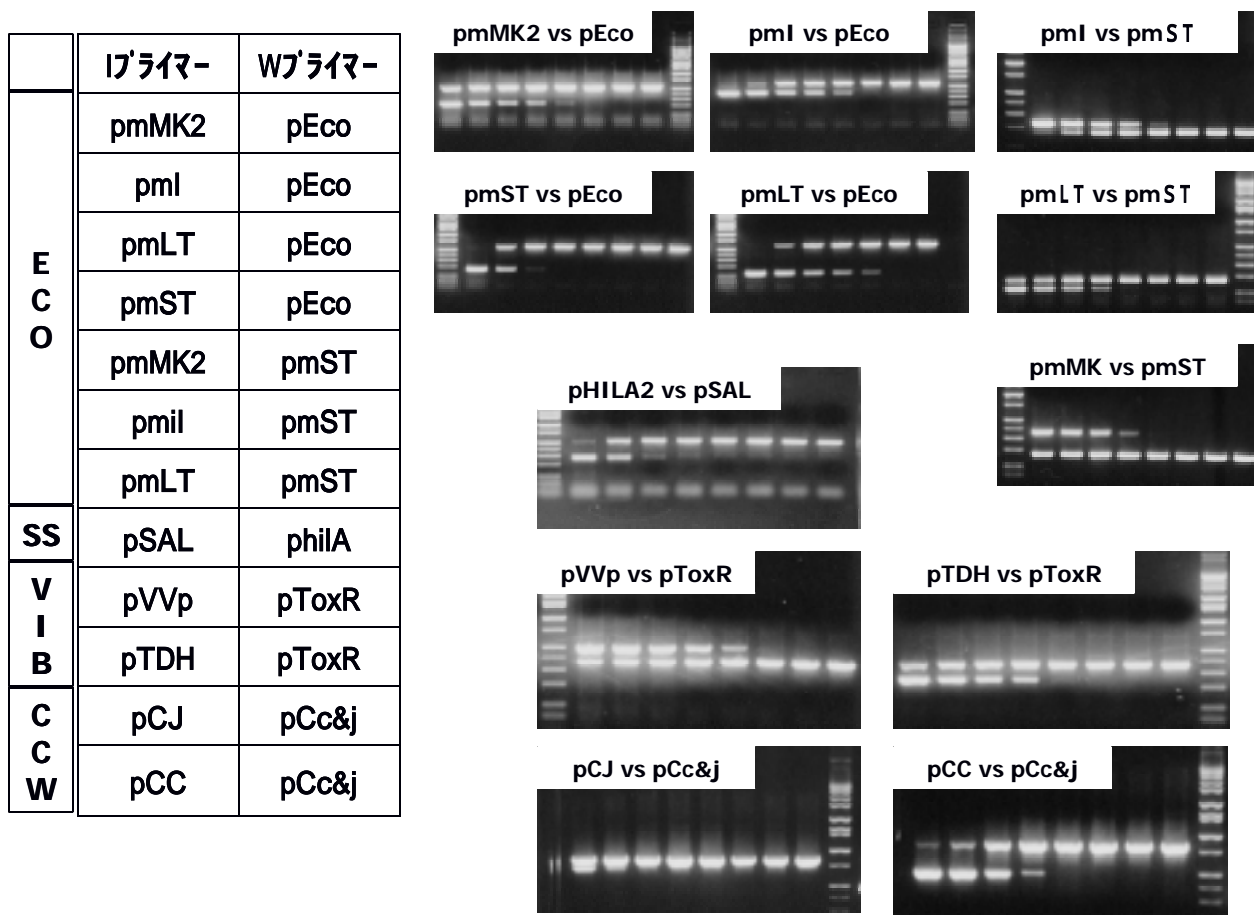
大腸菌用マスターミックス(以下「ECMX」)は、malB遺伝子検出用プライマー対Eco-1 & Eco-2(以下「pEco」)、志賀毒素様毒素SLT遺伝子検出用プライマー対mMK2-1 & mMK2-2(以下「pmMK」)、毒素原性大腸菌易熱性毒素LT遺伝子検出用プライマー対LT-11 & LT-2(以下「pLT」)、毒素原性大腸菌耐熱性毒素ST遺伝子検出用プライマー対ST1a-s & ST1a-as & ST1b-s & ST1b-as(以下「pST」)、およびinvE遺伝子検出用プライマー対I-1 & I-51(以下「pI」)が含まれる(表2)。ECMXにおいてpEcoは他の4種全てと競合作用を示した。成績(図4)により決定した各プ

ライマー対の濃度比はpmMK:pLT:pST:pI:pEco = 2:1:2:1:4(プライマー対最終濃度は各々0.2μM:0.1μM:0.2μM:0.1μM:0.4μM)であった(表2)。

サルモネラ赤痢菌用マスターミックス(以下「SSMX」)は、dH flagellin遺伝子検出用プライマー対ST3 & ST4(以下「pST」)、invA遺伝子検出用プライマー対salm3 & salm4(以下「psalm」)、hilA遺伝子検出用プライマー対HILA2-F & HILA2-R(以下「pHILA」)、ipaH遺伝子検出用プライマー対Shi-1 & Shi-2(以下「pShi」)、およびinvE遺伝子検出用プライマー対I-1 & I-51(以下「pI」)、virA遺伝子検出用プライマー対virA-f & virA-r(以下「pvirA」)が含まれる(表2)。SSMXでは、pSALとpHILAがそれぞれ競合作用を示した。成績(図4)により決定した各プライマー対の濃度比はpST:pSAL:pHILA:pShi:pI:pvirA = 2:1:2:2:2:1(プライマー対最終濃度は各々0.4μM:0.2μM:0.4μM:0.4μM:0.4μM:0.2μM)であった(表2)。



【図3】 選択プライマーグラジエント成績一覧



【図4】 競合PCR成績

ビブリオ属菌用マスターミックス(以下「VIBM X」)は、ctx遺伝子検出用プライマー対CT1&CT2(以下「pCT」)、ctx遺伝子検出用プライマー対VC-1&VC-2(以下「pVC」)、耐熱性溶血毒素TDH遺伝子検出用プライマー対TDH-1&TDH-2(以下「pTDH」)、ToxR遺伝子検出用プライマー対ToxR339-1&ToxR339-2(以下「pToxR」)、およびcytotoxin-hemolysin遺伝子検出用プライマー対VVp1&VVp2(以下「pVVp」)が含まれる(表2)。VIBM Xでは、pToxRとpTDHおよびpVVpが競合作用を示した。成績(図4)により決定した各プライマー対の濃度比はpCT:pVC:pToxR:pTDH:pVVp=4:2:4:1:1(プライマー対最終濃度は各々0.4μM:0.2μM:0.4μM:0.1μM:0.1μM)であった(表2)。

キャンピロバクター・ウェルシュ菌用マスターミックス(以下「CCWMX」)は、16SrRNA検出用プライマー対C-c&j-F&C-c&j-R(以下「pC-c&j」)、hippuricase遺伝子検出用プライマー対CJ-HIP-F&CJ-HIP-R(以下「pHIP」)、C. coli(NCTC11366^T株)オープンリーディングフレームO

RF検出用プライマー対CC18-F&CC18-R(以下「pCC」)、phospholipase C遺伝子検出用プライマー対PL3&PL7(以下「pPL」)、およびenterotoxin遺伝子検出用プライマー対P145&P146(以下「pP」)が含まれる(表2)。CCWMXでは、pC-c&jとpHIPおよびpCCが、それぞれ競合作用を示した(図4)。成績により決定した各プライマー対の濃度比は、pPL:pP:pC-c&j:pHIP:pCC=2:2:2:2:1(プライマー対最終濃度は各々0.4μM:0.4μM:0.4μM:0.4μM:0.2μM)であった(表2)。

リステリア・エルシニア・セレウス菌用マスターミックス(以下「LYBMX」)は、iap遺伝子検出用プライマー対MONOA&LIS1B(以下「pLm1」)、listeriolysin O遺伝子検出用プライマー対LL5&LL4(以下「pLm2」)、ail遺伝子検出用プライマー対Ye1&Ye2(以下「pYe」)、inv遺伝子検出用プライマー対YP-3&YP-4(以下「pYp」)、hemolysin BL遺伝子検出用プライマー対HEL-F&HEL-R(以下「pHEL」)、cereolysin AB遺伝子検出用プライマー対CEL-F&CEL-R(以下「pCEL」)。

【表2】 選抜、グループ化後のプライマー対一覧

Group Name	Product size	reference	target gene	Primer Name	Sequence	Length	%GC	Tm	Tamax	F _{nal} conc.(μ M)
ECOMX	234	ITO 2001 ⁸⁾	SLT1&2	mMK2-1	GAGTTTACGATAGACCTTTTCGAC	23	43.5%	66.0	60.6	0.20
				mMK2-2	GGCCACATATAAAATTTTGGCTC	24	33.3%	64.0		
	123	ITO 2001 ⁸⁾	LT	LT-11	CCCACCGGATCACCA	15	66.7%	50.0	65.2	0.10
				LT-2	GTGCTCAGATTCTGGGCTCTC	20	55.0%	62.0		
	179	ITO 2001 ⁸⁾	ST	ST1a-s	GCAATTTTATTTCTGTATTATCTTT	26	19.2%	62.0	54.1	0.20
				ST1a-as	GGATTACAACAAAGTTCACAG	21	38.1%	58.0		
				ST1b-s	TTTATTTTCTTCTGTATTGCTTTT	26	19.2%	62.0		
				ST1b-as	GGATTACAACACAATTACACAG	21	38.1%	58.0		
	379	ITO 2001 ⁸⁾	invE	I-1	ATATCTCTATTTCACATCGCGT	22	36.4%	60.0	60.6	0.10
				I-51	GGCGAGAAATATATCCCG	19	47.4%	56.0		
585	WANG 1997 ²⁵⁾	malB promoter	Eco-1	GACCTCGGTTTAGTTCACAGA	21	47.6%	62.0	65.2	0.40	
			Eco-2	CACACGCTGACGCTGACCA	19	63.2%	62.0			
SSMX	343	SONG 1993 ²¹⁾	dh flagellin	ST3	AGATGGTACTGGCGTTGCTC	20	55.0%	62.0	65.2	0.40
				ST4	TGGAGACTTCGGTCGCGTAG	20	60.0%	64.0		
	275	RAHN 1992 ¹⁷⁾	invA	Sal-3	TATCGCCACGTTCCGGCAA	19	57.9%	60.0	70.0	0.20
				Sal-4	TGCACCGTCAAAGGAACC	19	57.9%	60.0		
	497	X.GUO 2000 ⁶⁾	hlyA	HILA2-F	CTGCCGCACTGTTAAGGATA	20	50.0%	60.0	68.2	0.40
				HILA2-R	CTGTCCGCTTAATCGCATGT	20	50.0%	60.0		
	610	SETHABUTR 1993 ¹⁹⁾	ipaH	Shi-1	CTTGACCGCTTCCCGATAC	21	57.1%	66.0	65.2	0.40
				Shi-2	CAGCCACCCTCTGAGAGTA	19	57.9%	60.0		
	379	ITO 2001 ⁸⁾	invE	I-1	ATATCTCTATTTCACATCGCGT	22	36.4%	60.0	60.6	0.40
				I-51	GGCGAGAAATATATCCCG	19	47.4%	56.0		
215	VILLALOBO 1998 ²⁴⁾	virA	virA-f	CTGCATTCTGGCAATCTTTCACATC	26	46.2%	76.0	70.0	0.20	
			virA-r	TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC	26	50.0%	78.0			
			CT1	TCAAACATATATGCTGTCGTC	20	35.0%	54.0			
VIBMX	380	KOBAYASHI 1992 ¹¹⁾	ctx	CT2	CGCAAGTATTACTCATCGA	19	42.1%	54.0	54.1	0.40
				VC-1	GGCAGATTCTAGACCTCCT	19	52.6%	58.0		
	563	FIELDS 1992 ⁵⁾	ctx	VC-2	TCGATGATCTGGAGCATTC	20	45.0%	58.0	65.2	0.20
				TDH-1	GGTACTAAATGGCTGACATC	20	45.0%	58.0		
	251	NISHIBUCHI 1985 ¹⁶⁾	TDH	TDH-2	CCACTACCACTCTCATATGC	20	50.0%	60.0	60.6	0.10
				ToxR399	AGCCCCTTCTTCAGACTC	20	55.0%	62.0		
	399	Y B KIM 1999 ⁹⁾	ToxR	ToxR399	AACGAGCTTCTGCATGGTG	20	50.0%	60.0	68.2	0.40
				VVp1	CCGGCCGTACAGTTGGCCGC	20	75.0%	70.0		
	500	HILL 1991 ⁷⁾	cytotoxin-hemolysin	VVp2	CGCCACCCACTTTCGGGCC	19	73.7%	66.0	70.0	0.10
				C-c&j-F	AATCTAATGGCTTAACCATTA	21	28.6%	54.0		
CCWMX	854	LINTON 1997 ¹³⁾	16srRNA	C-c&j-R	GTAAC TAGTTTAGTATTCGGG	21	38.1%	58.0	60.6	0.40
				CJ-HIP-F	GAAGAGGGTTTGGGTGGTG	19	57.9%	60.0		
	735	"	hippuricase	CJ-HIP-R	AGCTAGCTTCGCATAATACTTG	23	39.1%	64.0	60.6	0.40
				CC18-F	GGTATGATTCTACAAGCGAG	22	40.9%	62.0		
	500	"	ORF of <i>C.coli</i> NCTC11366 ^T	CC18-R	ATAAAAGACTATCGTCGCGTG	21	42.9%	60.0	60.6	0.20
				PL3	AAGTTACCTTTGCTGCATAATCCC	24	41.7%	68.0		
	283	FACH 1997 ³⁾	plc	PL7	ATAGATACTCCATATCATCCTGCT	24	37.5%	66.0	60.6	0.40
				P145	GAAAGATCTGTATCTACAACGCTGGTCC	29	44.8%	84.0		
	426	"	enterotoxin	P146	GCTGGCTAAGATTCTATATTTTGTCCAGT	30	36.7%	82.0	65.2	0.40

Length : プライマー長, %GC : GC含有量, Tm : 融解温度, Tamax : グラジエント最大値, final conc.: ミックスプライマー至適濃度

およびhemolysin遺伝子検出用プライマー対BC-1 & BC-2 (以下「pBc」) が含まれる(表3)。LYBMXでは、pHELとpCELおよびpBCに競合作用が認められた。成績(図4)により決定した各プライマー対の最終濃度比は、pLm1:pLm2:pYe:pYp:pHEL:pCEL:pBc = 4:4:4:4:4:2:1 (プライマー対最終濃度は各々0.4 μ M:0.4 μ M:0.4 μ M:0.4 μ M:0.4 μ M:0.2 μ M:0.1 μ M)であった(表3)。

黄色ブドウ球菌用マスターミックス(以下「SAM

X」)は、enterotoxin A遺伝子検出用プライマー対GSEAR-1 & GSEAR-2 (以下「pGSEAR」)、X」)は、enterotoxin A遺伝子検出用プライマー対GSEAR-1 & GSEAR-2 (以下「pGSEAR」)、enterotoxin B遺伝子検出用プライマー対GSEBR-1 & GSEBR-2 (以下「pGSEBR」)、enterotoxin C遺伝子検出用プライマー対GSECR-1 & GSECR-2 (以下「pGSECR」)、enterotoxin D遺伝子検出用プライマー対GSEDR-1 & GSEDRF-2 (以下「pGSEDR」)、及びenterotoxin E遺伝子

【表3】 選抜、グループ化後のプライマー対一覧

Group Name	Product size	reference	target gene	Primer Name	Sequence	Length	%GC	Tm	Tamax	Final conc.(μM)
LYBMX	660	BUBERT 1999 ¹⁾	<i>iap</i>	LM-MONOA	CAAACGTCTAACACAGCTACT	21	42.9%	60.0	60.6	0.40
				LM-LIS1B	TTATACGCGACCCGAAGCCAAC	21	52.4%	64.0		
	520	THOMAS 1991 ²³⁾	listeriolysin O(hlyA)	LM-LL5	AACCTATCCAGGTGCTC	17	52.9%	52.0	60.6	0.40
				LM-LL4	CGCCACACTTGAGATAT	17	47.1%	50.0		
	359	RAMESH 2002 ¹⁸⁾	<i>ail</i>	Ye-1	CTATTGGTTATCGCGAAAGC	20	45.0%	58.0	60.6	0.40
				Ye-2	TGCAAGTGGGTTGAATTGCA	20	45.0%	58.0		
	440	WANG 1997 ²⁵⁾	inv gene	YP-3	CTTGGCTGATGGCAGCAT	18	55.6%	56.0	65.2	0.40
				YP-4	TCGTACCTGACCCCTGAT	18	55.6%	56.0		
	639	Y-R KIM 2000 ¹⁰⁾	hemolysin BL	BC-HEL-F	GAAGGTTGCTATTTGGGTCTAC	23	47.8%	68.0	60.6	0.40
				BC-HEL-R	AGGGTAGGGTTCAAGTTCTAATC	23	43.5%	66.0		
780	"	cereolysin AB	BC-CEL-F	CATGGGCAAACCTTTACGAACCT	23	47.8%	68.0	60.6	0.20	
			BC-CEL-F	TAATCTGCCGCCCCGAATAAAT	22	45.5%	64.0			
185	WANG 1997 ²⁵⁾	hemolysin	BC-1	CTGTAGCGAATCGTACGTATC	21	47.6%	62.0	54.1	0.10	
			BC-2	TACTGCTCCAGCCACATTAC	20	50.0%	60.0			
SAMX	102	MEHROTRA 2000 ¹⁵⁾	enterotoxinA	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	20	55.0%	62.0	65.2	0.40
				GSEAR-2	CGGCACCTTTTTCTCTTCGG	20	50.0%	60.0		
	164	"	enterotoxinB	GSEBR-1	GTATGGTGTGTAAGTCTGAGC	20	50.0%	60.0	60.6	0.40
				GSEBR-2	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	20	45.0%	58.0		
	451	"	enterotoxinC	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	24	37.5%	66.0	60.6	0.40
				GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	20	40.0%	56.0		
	278	"	enterotoxinD	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAG	23	26.1%	58.0	54.1	0.40
				GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTCGTTTC	20	25.0%	50.0		
	209	"	enterotoxinE	GSEER-1	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	21	42.9%	60.0	NT	0.40
				GSEER-2	CTTTTTTCTTCGGTCAATC	21	33.3%	56.0		
CBMX	782	LINDSTROM 2001 ¹²⁾	<i>BonT A</i>	CBML A1	AGCTACGGAGGCAGCTATGTT	21	52.4%	64.0	60.6	0.40
				CBML A2	CGTATTTGGAAAGCTGAAAAGG	22	40.9%	62.0		
	205	"	<i>BonT B</i>	CBML B1	CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA	20	50.0%	60.0	60.6	0.40
				CBML B2	CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG	20	45.0%	58.0		
	389	"	<i>BonT E</i>	CBML E1	CCAAGATTTTCATCCGCTA	20	45.0%	58.0	60.6	0.40
				CBML E2	GCTATTGATCCAAAACGGTGA	21	42.9%	60.0		
	543	"	<i>BonT F</i>	CBML F1	CGGCTTCATTAGAGAACGGA	20	50.0%	60.0	NT	0.40
				CBML F2	TAACCTCCCTAGCCCGTAT	20	55.0%	62.0		
	283	K TAKESHI 1996 ²²⁾	<i>BonT A</i>	AS-11	TGCAGGACAAATGCACACAGT	21	47.6%	62.0	60.6	0.40
				AS-22	TCCACCCCAAAATGGTATTCC	21	47.6%	62.0		
	315	"	<i>BonT B</i>	BS-11	CCTCCATTTGCGAGAGGTACG	21	57.1%	66.0	65.2	0.40
				BS-22	CTCTCGAGTGAACACGTCT	21	52.4%	64.0		
	290	"	<i>BonT C</i>	CS-11	ATACACTAGCTAATGAGCCTG	21	42.9%	60.0	NT	0.40
				CS-22	TGGAGTATTGTTATCCAGG	21	42.9%	60.0		
	497	"	<i>BonT D</i>	DS-11	GTGATCCTGTTAATGACAATG	21	38.1%	58.0	NT	0.40
				DS-22	TCCTTGCAATGTAAGGGATGC	21	47.6%	62.0		
	266	"	<i>BonT E</i>	ES-11	CAGGCGGTTGTCAAGAATTTTA	22	40.9%	62.0	54.1	0.40
				ES-22	ATTAGCTTTTGACAGTTCTTC	21	33.3%	56.0		
332	"	<i>BonT F</i>	FS-11	CAATAGGAACGAATCCTAGTG	21	42.9%	60.0	NT	0.40	
			FS-22	ATCAGTCTCGTCCCAATAC	21	52.4%	64.0			

Length : プライマー長, %GC : GC含有量, Tm : 融解温度, Tamax : グラジエント最大値, final conc.: ミックスプライマー至適濃度

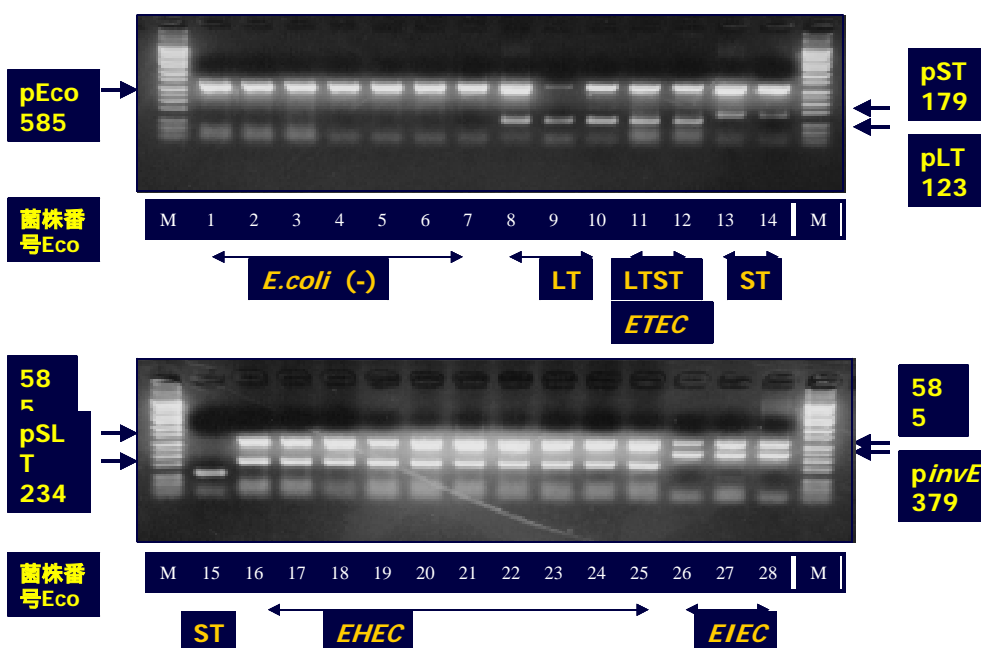
検出用プライマー対GSEER-1 & GSEER-2 (以下「pGSEER」。)が含まれる(表3)。SAMXは、既製のM-PCR用プライマーであり、文献から引用した濃度比により目的のバンドが良好に増幅された。決定した各プライマー対の濃度比は、pGSEAR:pGSEBR:pGSECR:pGSEDR:pGSEER = 1:1:1:1:1 (プライマー対最終濃度は各々0.4 μM :0.4 μM :0.4 μM :0.4 μM :0.4 μM)であった(表3)。

ボツリヌス菌用マスターミックス(以下「CBMX」。)

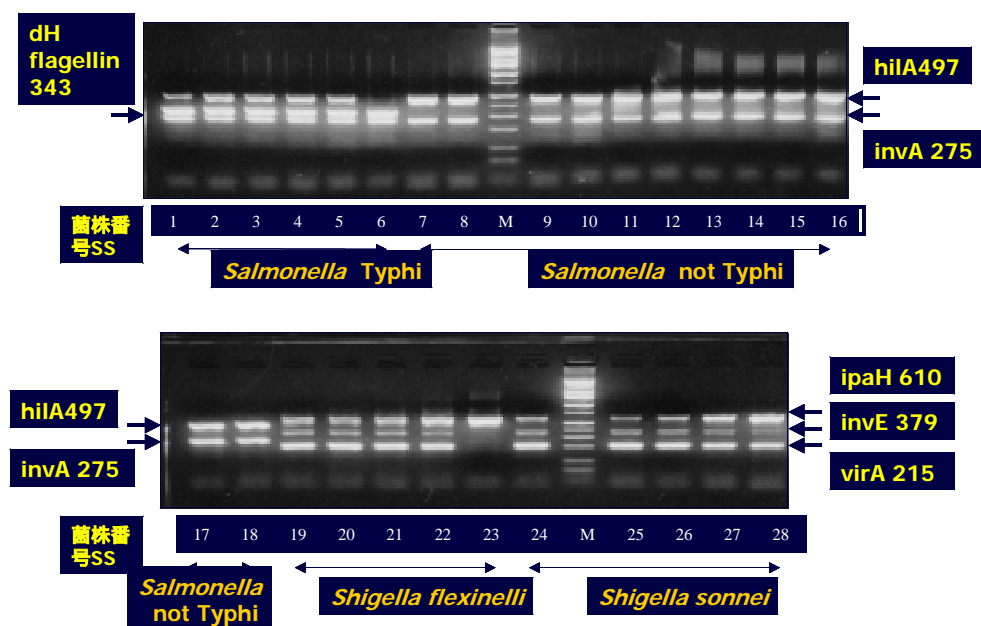
は、BonT A遺伝子検出用プライマー対CBMLA1 & CBMLA2 (以下「pCBMLA」。)、BonT B遺伝子検出用プライマー対CBMLB1 & CBMLB2 (以下「pCBMLB」。)、BonT E遺伝子検出用プライマー対CBMLE1 & CBMLE2 (以下「pCBMLE」。)、BonT F遺伝子検出用プライマー対CBMLF1 & CBMLF2 (以下「pCBMLF」。)、BonT A遺伝子検出用プライマー対AS11 & AS-22 (以下「pAS」。)、BonT B遺伝子検出用プライマー対BS-11 & BS-22 (以下「pBS」。)、BonT C遺伝子検出用プライマー対C

S - 11 & CS - 22 (以下「pCS」)、BonTD遺伝子検出用プライマー対DS - 11 & DS - 22 (以下「pDS」)、BonTE遺伝子検出用プライマー対ES - 11 & ES - 22 (以下「pES」)、およびBonTF遺伝子検出用プライマー対FS - 11 & FS - 22 (以下「pFS」)が含まれる(表3)。CBMXは、既製のM - PCR用プライマーであり、pCBMLAを除き、文献から引用した濃度比により目的のバンドが良好に増幅された。pCBMLAでは782bpのバンドが増幅されるはずであったがpCBMLBと同じ205bp程度のバンドが

検出された。したがって、同様にボツリヌス神経毒を対象としている別のM - PCRでデザインされたプライマーと組み合わせて使用することにした。決定した各プライマー対の最終濃度比は、pCBMLA:pCBMLB:pCBMLE:pCBMLF:pAS:pBS:pCS:pDS:pES:pFS = 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 (プライマー最終濃度は各々0.4μM:0.4μM:0.4μM:0.4μM:0.4μM:0.4μM:0.4μM:0.4μM:0.4μM)であった(表2)。



【図5】 ECOMIX 一括検出成績



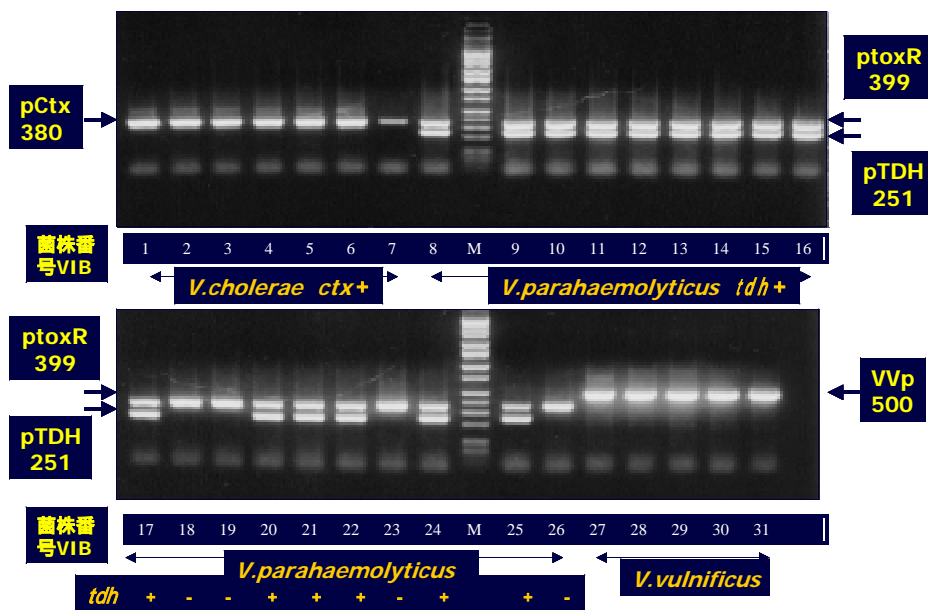
【図6】 SSMIX 一括検出成績

2 食中毒起因細菌一括検出試薬成績

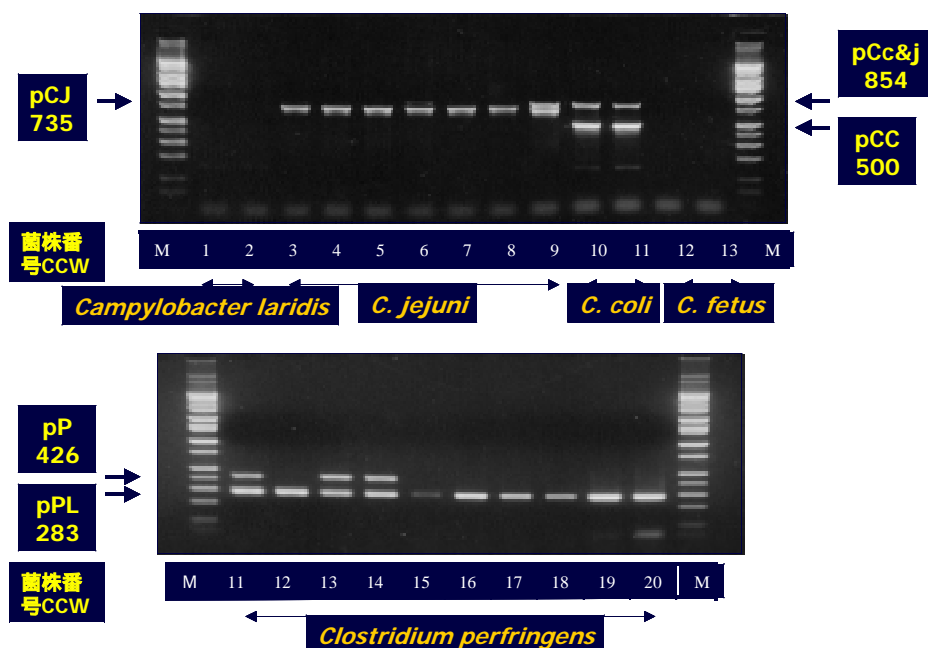
成績を図5～10に示した。

ECOMXにより非病原性大腸菌(株番号EC1-7)、腸管毒素原性大腸菌(株番号EC3&4)、腸管侵入性大腸菌(株番号EC5&6)および腸管出血性大腸菌(株番号EC7&8)が明確に分別された。SSMXによりチフス菌(株番号SS1&2)、赤痢菌(株番号SS3,4,5&6)、サルモネラ属菌(株番号SS7&8)が明確に分別された。VIBMXによりコレラ菌(株番号VIB1&2)、耐熱性毒素産生性腸炎ビブリオ(株番号VIB3&4)、耐熱性毒素非産生性腸炎ビブ

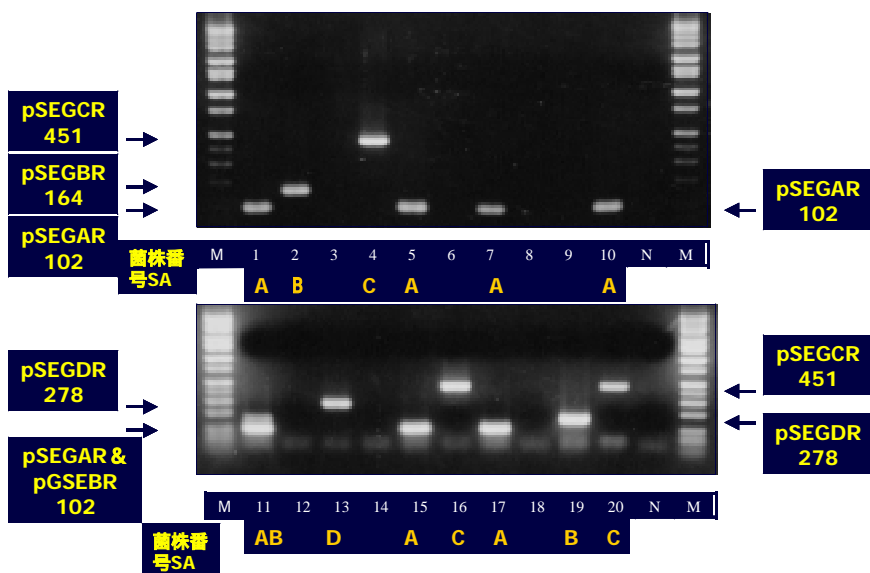
リオ(株番号VIB5&6)およびビブリオバルニフィカス(株番号VIB7&8)が明確に分別された。CCWMXにより毒素産生性ウェルシュ菌(株番号CCW1&2)、毒素非産生性ウェルシュ菌(株番号CCW3&4)、キャンピロバクタージェジュニ(株番号CCW5&6)およびキャンピロバクターコリ(株番号CCW7&8)が明確に分別された。LYBMXによりリステリアモノサイトゲネス(株番号LYB1&2)、エルシニアエンテロコリティカ(株番号LYB3,4&5)、エルシニアシュードチュベクローシス(株番号LYB6)およびセレウス菌(株番号LYB7&8)が明確に分別された。



【図7】 VIBMIX 一括検出成績

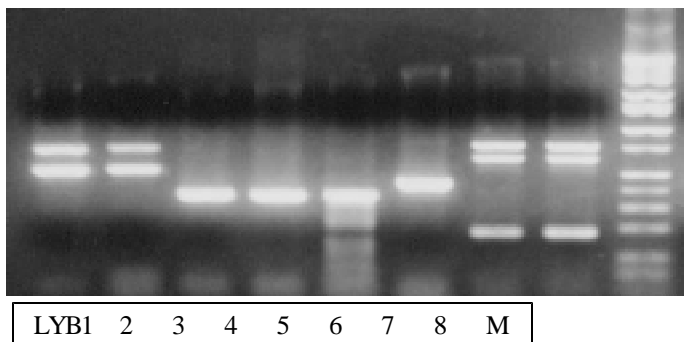


【図8】 CCWMIX 一括検出成績

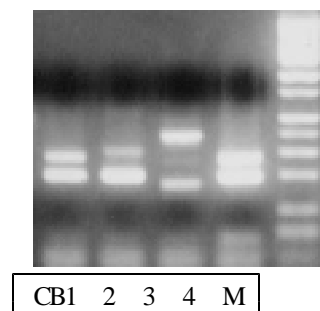


【図9】 SAMIX 一括検出成績

LYBMX



CBMX



【図10】 LYBMXおよびCBMXによる一括検出成績

SAMIXによりエンテロトキシンA陽性株(株番号SA1)、エンテロトキシンA & B陽性株(株番号SA2)、エンテロトキシンB陽性株(株番号SA3 & 7)、エンテロトキシンC陽性株(株番号SA5, 6 & 8)およびエンテロトキシンD陽性株(株番号SA4)が明確に分別された。CBMXによりニューロトキシンA陽性株(株番号CB1 & 4)、ニューロトキシンB陽性株(株番号CB2)お

よびエンテロトキシンE陽性株(株番号CB3)が明確に分別された。

考 察

1 グラジエントPCR

PCRのコアの試薬であるプライマー対は20~25対程度のオリゴヌクレオチドからなり、PCRの成否が

これらにより左右されると言っても過言ではなく、その特性は塩基配列から計算されるGC含量とTm値に依存すると考えられている²⁾。一般的に、設計されたプライマー対の塩基配列等からTm値を推測する方法は様々に報告されており、至適アニーリング温度を便宜的に推測することは可能である^{27),28)}。しかしながら、推測値と実測値の間に存在する誤差により、実際には温度条件を変えて反応させることが簡便な最良の検証手段であると考えられる。本研究においてもTm値と実測値によるグラジエント最大値(T_{amax})との関係は、プライマー対毎にかなりのばらつきが認められ、前述のことが良く実証された(表2, 3)。この他にもプライマー長、GC含有量、増幅産物量等から有効な指標が導き出される所見も認められたが、今回の主目的は食中毒起因細菌に対する迅速、簡便かつわかりやすい一括検出方法を確認することであるため、精査せず次の課題としたい。

2 競合PCR

一般的にM-PCRの実施には、使用されるプライマー対の設計が最も重視される²⁶⁾。設計の際に、ほぼ同等のTm値を持ち、相互作用が無いことが証明されていなければならない。本研究では、既存のプライマー対の再利用がテーマであるため、選抜プライマー対に対して競合PCRにより相互作用を精査した。競合PCRで設定した濃度比(表2, 3)を用いた一括検出成績では、図5-10の通り、目的のバンドが効率よく検出された。これらが成功した理由の一つには、現在市販されているPCR用試薬の品質向上があると考えられる。今回は精査していないが、使用したホットスタート用Taqおよびバッファーには汎用されているTaqに比べ特異性ととも反応液環境に対する耐用性が非常に優れているように感じられる。これらの証明は今後追究していきたい。

3 食中毒起因細菌一括検出試薬

有効なプライマー対を効率よく選抜き、組み合わせることができれば、M-PCRにおいては全く別の用途が生じると考えられる。例えば、鶏や豚の食肉工場では、サルモネラ属菌、リステリア属菌およびカンピロバクター属菌が重要な病原菌であるが、水産漁場ではビブリオ属菌、赤痢菌や大腸菌が主要な標的である。一方、乳製品工場では基本的に汚染の是非が最重要点であり、加えて大腸菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌およびカンピロバクターといった病原細菌のスクリーニングが必要である等、製品の種類によって重要管理点となる細菌の種類が異なっている。この

ように、製品の種類に応じて様々な細菌種の組み合わせが要求されるために、プライマー対の効率的な選抜方法を確認することは非常に有効なことである。

一方で、今回の既成のプライマー対¹⁾⁻²⁵⁾を用いたグラジエントPCR成績において(図4)、グラジエント最大値が高く増幅バンド量も多い有効なプライマー対が多数認められた。従って、これらを再利用する方式を確認さえすれば、プライマー対の再利用は可能であると考えられた。

本研究では、既報の様々な文献や特許から抽出した多数のプライマー対の中から有効なプライマー対を簡便且つ効率的に抽出する手段を検討した。今回作製した食中毒起因細菌一括検出試薬により、純培養細菌の煮沸抽出DNAに対し、全ての対象遺伝子を明瞭に検出することが出来た。また、対象遺伝子を複数のプライマー対を用いて証明することにより、正確性と分別性が向上し、より正確でわかりやすい検査系を確認することが出来た。

以上のことから、今回の食中毒起因細菌検出試薬の作製に対するプライマー対選抜方法や調製方法は、既報プライマー対の再利用に必要な手段としてM-PCRの実施に有効であると言える。

研究を実施するに当たり、貴重な菌株を分譲してくださった宮城県保健環境センターの斉藤紀行先生、および秋田県衛生科学研究所の斉藤志保子先生に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) A.Bubert, et al: Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR, Appl. Environ. Microbiol., 65, 4688~4692, (1999)
- 2) 江崎孝行: 微生物の検出方法、及び微生物の検出用プライマーセット, 特開 2002-223766, (2002)
- 3) P.Fach, et al: Detection of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Food and Fecal Samples with a Duplex PCR and the Slide Latex Agglutination Test, Appl. Environ. Microbiol., 63, 4232-4236 (1997)
- 4) R.Ferretti, et al: Twelve-Hour PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* spp. in Food., Appl. Environ. Microbiol., 67, 977-978, (2001)
- 5) P.I.Fields, et al: Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from Latin American cholera epidemic, J. Clin.

- Microbiol., 30, 2118-2121,(1992)
- 6) X.Guo, et al:PCR detection of *Salmonella enterica* Serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived *hilA*, Appl.Environ.Microbiol.,66, 5248-5252 ,(2000)
- 7) W.B.Hill, et al:Polymerase Chain Reaction Identification of *Vibrio vulnificus* in Artificially Contaminated Oysters, Appl. Environ. Microbiol., 57, 707-711, (1991)
- 8) K.Ito:大腸菌の PCR、平成 13 年度国立公衆衛生院特別課程「細菌」コース教材、7-9, (2001)
- 9) Y.B.Kim, et al:Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene, J. Clin. Microbiol., 37, 1173-1177, (1999)
- 10) Y-R.Kim, et al : Development of a Fluorogenic Probe-Based PCR Assay for Detection of *Bacillus cereus* in Nonfat Dry Milk, Appl. Environ. Microbiol., 66, 1453~1459, (2000)
- 11)K.Kobayashi, 他: PCR 法によるコレラ毒素遺伝子確認法と診断用プローブの開発, 日本臨床,50, 361-367, (1992)
- 12) M.Lindstrom, et al : Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F in Food and Fecal Material, Appl. Environ. Microbiol., 67, 5694~5699, (2001)
- 13) D.Linton, et al:PCR Detection, Identification to Species Level, and Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Direct from Diarrheic Samples,J. Clin. Microbiol., 35,2568-2572 (1997).
- 14) S.Makino, et al:A New Method for Direct Detection of *Listeria monocytogenes* from Foods by PCR, Appl. Environ. Microbiol., 61, 3745~3747, (1995)
- 15) M.Mehrotra, et al:Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance,J. Clin. Microbiol., 1032-1035 ,(2000).
- 16) M.Nishibuchi, et al:Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*, J. Bacteriol., 162, 558-564 ,(1985)
- 17) K.Rahn, et al:Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*,Mol.Cell.Probes, 6, 271-279, (1992)
- 18) A. Ramesh, et al:Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples, Mol. Cell. Probes, 16, 307~314, (2002)
- 19) O.Sethabutr, et al : Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery,J. Infect. Dis., 167, 458-461 ,(1993)
- 20) N.K.Sharma, et al:Development of a Single-Reaction Multiplex PCR Toxin Typing Assay for *Staphylococcus aureus* Strains, Appl. Environ. Microbiol., 66, 1347~1353, (2000)
- 21) J.H.Song, et al:Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction,J Clin Microbiol.,31,1439-1443,(1993)
- 22) K.Takeshi, et al : Simple Method for Detection of *Clostridium botulinum* Type A to F Neurotoxin Genes by Polymerase Chain Reaction, Microbiol. Immunol., 40, 5~11, (1996)
- 23) E.J.G.Thomas, et al : Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with the Polymerase Chain Reaction, Appl. Environ. Microbiol., 57, 2576~2580, (1991)
- 24) E.Villalobo, et al : PCR for Detection of *Shigella* spp. in Mayonnaise, Appl. Environ. Microbiol.,64 1242-1245, (1998)
- 25) R.-F.Wang, et al:A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods,J.Appl.Microbiol., 83, 727-736 ,(1997)
- 26) J.Sambrook, et al:Multiplex PCR,Molecular Cloning,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2,8.107, (2001)
- 27) 向井博之:PCRプライマー,蛋白質・核酸・酵素, 41, 437-439 ,(1996)
- 28) 三橋将人:PCRプライマーの設計,蛋白質・核酸・酵素,41, 439-445 ,(1996)