

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5884108号
(P5884108)

(45) 発行日 平成28年3月15日(2016. 3. 15)

(24) 登録日 平成28年2月19日(2016. 2. 19)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01) C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 13 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2014-22600 (P2014-22600)	(73) 特許権者	391017849
(22) 出願日	平成26年2月7日(2014. 2. 7)		山梨県
(65) 公開番号	特開2015-146786 (P2015-146786A)		山梨県甲府市丸の内1丁目6番1号
(43) 公開日	平成27年8月20日(2015. 8. 20)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成26年6月6日(2014. 6. 6)		弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		(74) 代理人	100182992
			弁理士 江島 孝毅
		(72) 発明者	▲柳▼本 恵太
			山梨県甲府市富士見1丁目7-31 山梨県衛生環境研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マルチプレックスシャトルPCRによる食中毒原因菌の一括検出法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、
 食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、
 (a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号1及び配列番号2に記載の配列からなるプライマー対、
 を用い、さらに、
 (b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号3及び配列番号4に記載の配列からなるプライマー対、
 (c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号5及び配列番号6に記載の配列からなるプライマー対、
 (e) eae遺伝子を増幅するための配列番号9及び配列番号10に記載の配列からなるプライマー対、
 (f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号11及び配列番号12に記載の配列からなるプライマー対、
 (g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号13及び配列番号14に記載の配列からなるプライマー対、
 (h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号15及び配列番号16に記載の配列からなるプライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 に記載の配列からなるプライマー対、

からなる群より選択されるプライマー対のうち、少なくとも5以上のプライマー対を用いて試料について核酸増幅反応を行う工程及び増幅産物を確認する工程を含む、試料中の食中毒原因菌を検出する方法。

【請求項 2】

前記核酸増幅反応において、

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を用い、さらに、

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 1 0 に記載の配列からなるプライマー対、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 に記載の配列からなるプライマー対、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 に記載の配列からなるプライマー対、

からなる群より選択されるプライマー対のうち、少なくとも6以上のプライマー対を用いる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記核酸増幅反応において、

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を用い、さらに、

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 1 0 に記載の配列からなるプライマー対、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 に記載の配列からなるプライマー対、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 に記載の配列からなる

10

20

30

40

50

プライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 に記載の配列からなるプライマー対、

からなる群より選択されるプライマー対のうち、少なくとも7以上のプライマー対を用いる請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記核酸増幅反応において、

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を用い、さらに、

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 1 0 に記載の配列からなるプライマー対、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 に記載の配列からなるプライマー対、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 に記載の配列からなるプライマー対、

からなる群より選択されるプライマー対のうち、少なくとも8以上のプライマー対を用いる請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記核酸増幅反応において、

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を用い、さらに、

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 1 0 に記載の配列からなるプライマー対、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 に記載の配列からなるプライマー対、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 に記載の配列からなる

10

20

30

40

50

プライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 に記載の配列からなるプライマー対を用いる請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記核酸増幅反応においてさらに、

(d) invA遺伝子を増幅するための配列番号 7 及び配列番号 8 に記載の配列からなるプライマー対、及び / 又は

(i) It遺伝子を増幅するための配列番号 1 7 及び配列番号 1 8 に記載の配列からなるプライマー、

を用いる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

核酸増幅反応がシャトルPCRであり、シャトルPCRにおいて試料溶液を(i)9 4 で1分間変性させ、その後、(ii)9 4 で5秒間変性させ(iii)6 4 で4 5秒間アニーリング及び伸長させる(ii)及び(iii)からなるサイクルを繰り返す、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

食中毒原因菌を検出するためのキットであって、

食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を含み、さらに

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 1 0 に記載の配列からなるプライマー対、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 に記載の配列からなるプライマー対、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 に記載の配列からなるプライマー対、

からなる群より選択されるプライマー対のうち、少なくとも5以上のプライマー対を含む、食中毒原因菌検出用キット。

【請求項 9】

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を含み、さらに

10

20

30

40

50

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 10 に記載の配列からなるプライマー対、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号 11 及び配列番号 12 に記載の配列からなるプライマー対、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号 13 及び配列番号 14 に記載の配列からなるプライマー対、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号 15 及び配列番号 16 に記載の配列からなるプライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 19 及び配列番号 20 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 21 及び配列番号 22 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 23 及び配列番号 24 に記載の配列からなるプライマー対、

からなる群より選択されるプライマー対のうち、少なくとも6以上のプライマー対を含む、請求項8に記載のキット。

【請求項10】

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を含み、さらに

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 10 に記載の配列からなるプライマー対、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号 11 及び配列番号 12 に記載の配列からなるプライマー対、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号 13 及び配列番号 14 に記載の配列からなるプライマー対、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号 15 及び配列番号 16 に記載の配列からなるプライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 19 及び配列番号 20 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 21 及び配列番号 22 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 23 及び配列番号 24 に記載の配列からなるプライマー対、

からなる群より選択されるプライマー対のうち、少なくとも7以上のプライマー対を含む、請求項9に記載のキット。

【請求項11】

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を含み、さらに

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

10

20

30

40

50

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 10 に記載の配列からなるプライマー対、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号 11 及び配列番号 12 に記載の配列からなるプライマー対、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号 13 及び配列番号 14 に記載の配列からなるプライマー対、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号 15 及び配列番号 16 に記載の配列からなるプライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 19 及び配列番号 20 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 21 及び配列番号 22 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 23 及び配列番号 24 に記載の配列からなるプライマー対、

からなる群より選択されるプライマー対のうち、少なくとも 8 以上のプライマー対を含む、請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を含み、さらに

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 10 に記載の配列からなるプライマー対、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号 11 及び配列番号 12 に記載の配列からなるプライマー対、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号 13 及び配列番号 14 に記載の配列からなるプライマー対、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号 15 及び配列番号 16 に記載の配列からなるプライマー対、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号 19 及び配列番号 20 に記載の配列からなるプライマー、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号 21 及び配列番号 22 に記載の配列からなるプライマー対、並びに

(l) aqgR遺伝子を増幅するための配列番号 23 及び配列番号 24 に記載の配列からなるプライマー対を含む、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

さらに

(d) invA遺伝子を増幅するための配列番号 7 及び配列番号 8 に記載の配列からなるプライマー対、及び / 又は

(i) It遺伝子を増幅するための配列番号 17 及び配列番号 18 に記載の配列からなるプライマー、

を含む、請求項 8 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の食中毒原因菌検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、食中毒原因菌の検出法、例えば核酸増幅反応を用いた食中毒原因菌の一括検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

食中毒原因施設からの患者の発生を最小限に留めるためには、当該施設に対し適切かつ早急な行政対応を行う必要があり、そのために検査法に迅速性が求められている。食中毒事件が発生した際には、行政処分等の対応が行われることにより新たな患者の発生が防止されているが、病因物質や原因食品及び施設の特定には科学的な根拠が必要とされている。一般的に食中毒原因菌の検索には培養操作が必要となるため、通常3～7日間を要する。また近年、生化学的性状が通常と異なる細菌による食中毒事件が報告されており（非特許文献1、非特許文献2）、原因菌を検出するためには豊富な知識や経験を要する。

【0003】

2011年には欧州を中心に腸管出血性大腸菌O104による集団食中毒が発生したが、この当時、国内においてはO104の抗血清は入手困難であったため、発生があった場合には抗血清による同定は非常に困難であったと考えられる。このような状況を改善するために遺伝子検査が有効となることがある。生化学的、血清学的特徴が定型でなかった場合であっても、病原性が不変であれば関連遺伝子を検出することが可能と考えられる。

【0004】

また、遺伝子検査は培養と比較し、結果までに数時間と迅速性が期待されることから、近年複数遺伝子を同時に検出することができるマルチプレックスPCRを用いた検査法の検討がなされている（非特許文献3～6）。非特許文献5に記載の食中毒起因微生物検出方法では、1つの検体当たり3つの反応液を要する。

【0005】

大規模で広域的な食中毒事件が発生した場合、原因食品の特定が急務であり、スクリーニング法としてマルチプレックスPCRは有効であるが、このような場合は食品を含む大量の検体に対応でき、広範囲の細菌を検出できる能力が要求される。また、検体搬入即日に結果の判定が可能で、その後の培養操作に反映できる迅速性が望まれる。さらに、日常搬入される全ての検体のスクリーニングで用いる場合については操作性や1検体当たりの経済性も求められる。

【0006】

非特許文献7にはinvA遺伝子を増幅するためのプライマー対が記載されている。該プライマー対の塩基配列は本願明細書の配列番号7及び配列番号8に相当する。

【0007】

非特許文献8にはIt遺伝子を増幅するためのプライマー対が記載されている（491頁、表1）。該プライマーLT1の塩基配列は本願明細書の配列番号17に相当する。該プライマーLT2の塩基配列は本願明細書の配列番号18の1～20位の塩基配列に相当する。

【0008】

非特許文献9には種々の食中毒原因菌が記載されている。食中毒の原因菌として多いのはサルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コリであり、他にはブドウ球菌、ポツリヌス菌、腸炎ビブリオ、病原大腸菌、他にはウエルシュ菌、セレウス菌、エルシニア・エンテロコリチカ、ナグビブリオ、コレラ菌、赤痢菌、チフス菌、パラチフスA菌等が挙げられる（非特許文献9）。

【0009】

非特許文献10はcadF遺伝子を用いたカンピロバクター・ジェジュニ及びカンピロバクター・コリの同定法を記載している。同文献は専らカンピロバクター属細菌の同定が目的であり、カンピロバクター・ジェジュニとカンピロバクター・コリとを鑑別することには主眼が置かれていない。

【0010】

非特許文献11はリアルタイムPCR法による食中毒原因菌のスクリーニング法を記載している。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

非特許文献 1 2 は食中毒原因菌の24標的遺伝子を一齐検出するためのMultiplexリアルタイムSYBR Green PCR法を記載している。この方法では1検体の検査には8つの反応液が必要とされる。

【 0 0 1 2 】

非特許文献 1 3 はリアルタイムPCR法における蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックスPCR法による細菌性嘔吐毒関連遺伝子の同時検出および識別を記載している。開示されている方法は、一般的な食中毒原因菌の一部のみを同定するものである。検出時間は4～5時間程度であり、反応液当たりの検出感度は $10^7 \sim 10^8$ cfu/反応である。

【 0 0 1 3 】

特許文献 1 はカンピロバクターのcdtB遺伝子を標的とする検出法を記載している。同文献の手法はリアルタイムPCR法であり、カンピロバクター属細菌のみに着目しており、他の属の食中毒原因菌の記載はない。

【 0 0 1 4 】

このように、現状では1検体当たり複数の反応液が必要となる方法や、高価な試薬・機器を用いる方法、発生する食中毒原因菌のうち一部にしか対応できない方法、判定に1日以上かかってしまう方法等しか提供されていない。迅速性、操作性、経済性、合理性を同時に持ち、上記のような事例に対応できる検出方法はない。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 5 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 1 0 - 1 3 0 9 0 1

【 非特許文献 】

【 0 0 1 6 】

【 非特許文献 1 】 木村薫ら:下痢症より分離された乳糖分解性サルモネラ菌について, 感染症学雑誌, 62, 123 128(1988)

【 非特許文献 2 】 仲西寿男、丸山務監修:食品由来感染症と食品微生物, 中央法規出版, 3 80 397(2009)

【 非特許文献 3 】 Hiroshi Fukushima et al.: Simultaneous screening of 24 target genes of foodborne pathogens in 35 food borne outbreaks using multiplex real time SYBR green PCR analysis, Int J Microbiol., 18 pages (2010)

【 非特許文献 4 】 田栗利紹、野口英太郎、平山文俊: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, 長崎県衛生公害研究所報, 43 56 (2002)

【 非特許文献 5 】 重本直樹ら:蛍光RT multiplex PCR法を用いた食中毒起因微生物の包括的検出, Jpn. J. Food Microbiol., 29(1), 11 17(2012)

【 非特許文献 6 】 Jie Liu et al.: Simultaneous Detection of Six Diarrhea Causing Bacterial Pathogens with an In House PCR Luminex Assay, J. Clin. Microbiol., 50, 98 103(2012)

【 非特許文献 7 】 Christine C. Ginocchio et al.: Naturally Occurring Deletions in the Centisome 63 Pathogenicity Island of Environmental Isolates of Salmonella sp., Infect. Immun., 65, 1267 1272(1997)

【 非特許文献 8 】 小西典子ら:6種類の毒素原性大腸菌が検出された仕出し弁当を原因とする集団食中毒事例とColony sweep PCR法を応用した検査法について, 感染症学雑誌, 83, 490 495(2009)

【 非特許文献 9 】 厚生労働省:食中毒統計資料 過去の食中毒発生状況<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>

【 非特許文献 1 0 】 Konkel et al. : Identification of the Enteropathogens Campylobacter jejuni and Campylobacter coli based on the cadF virulence gene and its product, J. Clin. Microbiol., 37, 510 517(1999)

【 非特許文献 1 1 】 福島博ら:リアルタイムPCR法による食中毒菌の迅速スクリーニング

10

20

30

40

50

の検討, 感染症学雑誌, 79, 644 655(2005)

【非特許文献 1 2】島根保環研所報第50号(2008)食中毒菌の24標的遺伝子を一齐検出するためのMultiplexリアルタイムSYBR Green PCR法

【非特許文献 1 3】広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, No. 19, p15 20, 2011蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックスPCR法による細菌性嘔吐毒関連遺伝子の同時検出および識別。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明は、上記の問題点に対処可能な食中毒原因菌同定法を提供することを目的とする。例えば本発明は迅速性、操作性、経済性、合理性を同時に備えた食中毒原因菌同定法を提供することを課題とする。

【0018】

本発明は、1検体当たり1反応液で検査可能であり、発生する食中毒原因菌の大部分に対応でき、かつ短時間で結果判定が可能であるマルチプレックスPCR法を提供することを目的とする。

【0019】

例えばある実施形態において本発明は(i)大量の検体数(100検体前後)に対応でき、(ii)細菌性感染型食中毒の原因菌のほとんどを検出でき、(iii)試料搬入当日に結果が判定でき(所要時間2時間程度)、(iv)操作が簡便であり(1検体を1反応液で処理可能)、かつ(v)市販プライマーを用いたPCRと比較して検体当たりのランニングコストが安い、という5つの要件を満たす食中毒原因菌の検出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明者は上記の問題を解決するために鋭意検討した結果、食中毒原因菌の遺伝子を特異的に増幅できるマルチプレックスPCR用プライマーを作製し、多くの臨床分離株を含む食中毒原因菌についてマルチプレックスPCRの評価を行い、複数の食中毒原因菌を同時に検出できることを見出し本発明を完成させた。本発明のプライマーを用いたマルチプレックスPCRは、高い特異性を有し、複数の食中毒原因菌を同時に検出できる。また、本発明の方法は、多数の検体について、一回の操作によって菌種レベルで食中毒原因菌を同定できる。すなわち本発明は、以下の実施形態を提供する。

【0021】

第1の実施形態において、本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号1及び配列番号2に記載の配列からなるプライマー対、

を用いて試料について核酸増幅反応を行う工程及び増幅産物を確認する工程を含む、試料中の食中毒原因菌を検出する方法を提供する。配列番号1及び配列番号2に記載の配列からなるプライマー対を用いると、カンピロバクターのcadF遺伝子が増幅される。例えば配列番号25に示すCampylobacter coli JV20 contig00034のcadF遺伝子(391936位)が増幅され507bpの増幅産物が得られるか、または配列番号26に示すCampylobacter jejuni subsp. jejuni CG8421 CPSのcadF遺伝子(391897位)が増幅され546bpの増幅産物が得られる。こうした増幅産物は電気泳動等により確認することができ、これによりカンピロバクター・ジェジュニ及びノ又はカンピロバクター・コリを検出できる。本願明細書において増幅産物とは、核酸増幅反応により標的遺伝子が複製される結果生じる核酸をいう。

【0022】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号3及び配列番号4に記載の配列からなるプライマー対、
を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(b)のプライマー対を使用すると配列番号27のcpe遺伝子が増幅され378bpの増幅産物が得られる。該増幅産物からウエルシュ菌を検出することができる。

【0023】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号5及び配列番号6に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(c)のプライマー対を使用すると配列番号28のipaH遺伝子が増幅され332bpの増幅産物が得られる。該増幅産物から赤痢菌及び/又は腸管侵入性大腸菌を検出することができる。

【0024】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(d) invA遺伝子を増幅するための配列番号7及び配列番号8に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(d)のプライマー対を使用すると配列番号29のinvA遺伝子が増幅され284bpの増幅産物が得られる。該増幅産物からサルモネラ属菌を検出することができる。

【0025】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号9及び配列番号10に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(e)のプライマー対を使用すると配列番号30のeae遺伝子が増幅され252bpの増幅産物が得られる。該増幅産物から腸管病原性大腸菌を検出することができる。

【0026】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(f) tdh遺伝子を増幅するための配列番号11及び配列番号12に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(f)のプライマー対を使用すると配列番号31のtdh遺伝子が増幅され195bpの増幅産物が得られる。該増幅産物から腸炎ビブリオを検出することができる。

【0027】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(g) st1b遺伝子を増幅するための配列番号13及び配列番号14に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(g)のプライマー対を使用すると配列番号32のst1b遺伝子が増幅され169bpの増幅産物が得られる。該増幅産物から腸管毒素原性大腸菌を検出することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(h) st1a遺伝子を増幅するための配列番号15及び配列番号16に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(h)のプライマー対を使用すると配列番号33のst1a遺伝子が増幅され150bpの増幅産物が得られる。該増幅産物から腸管毒素原性大腸菌を検出することができる。

【 0 0 2 9 】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(i) It遺伝子を増幅するための配列番号17及び配列番号18に記載の配列からなるプライマー、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(i)のプライマー対を使用すると配列番号34のIt遺伝子が増幅され132bpの増幅産物が得られる。該増幅産物から毒素原性大腸菌を検出することができる。

【 0 0 3 0 】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(j) stx2遺伝子を増幅するための配列番号19及び配列番号20に記載の配列からなるプライマー、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(j)のプライマー対を使用すると配列番号35のstx2遺伝子が増幅され117bpの増幅産物が得られる。該増幅産物から腸管出血性大腸菌を検出することができる。

【 0 0 3 1 】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(k) stx1遺伝子を増幅するための配列番号21及び配列番号22に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(k)のプライマー対を使用すると配列番号36のstx1遺伝子が増幅され100bpの増幅産物が得られる。該増幅産物から腸管出血性大腸菌を検出することができる。

【 0 0 3 2 】

さらなる実施形態において本発明は、試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(l) aggR遺伝子を増幅するための配列番号23及び配列番号24に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、食中毒原因菌を検出する方法を提供する。(l)のプライマー対を使用すると配列番号37のaggR遺伝子が増幅され76bpの増幅産物が得られる。該増幅産物から腸管凝集付着性大腸菌を検出することができる。

【 0 0 3 3 】

これらの(a)~(l)のプライマー対は、単一の対で、又は複数の対を任意に組み合わせて、又は(a)~(l)の全ての対を組み合わせて同時に、又は逐次的に核酸増幅反応に用いることができる。複数のプライマー対を使用し、同一溶液中でPCRを行う場合、これをマルチプレックスPCRという。増幅産物の有無は電気泳動等により確認することができ、これに

10

20

30

40

50

より試料から増幅された遺伝子を有する食中毒原因菌を検出することができる。

【0034】

さらなる実施形態において核酸増幅反応はシャトルPCRとすることができる。またシャトルPCRにおいて試料溶液を(i)94で1分間変性させ、その後、(ii)94で5秒間変性させ(iii)61以上の温度、例えば61、62、63又は64で4.5秒間アニーリング及び伸長させる(ii)及び(iii)からなるサイクルを所定の回数、例えば30回以上、31回、32回、33回、34回、又は35回以上繰り返すことができる。これをさらに、その後72にて5分保持することができる。

【0035】

さらなる実施形態において本発明は、食中毒原因菌を検出する方法に用いるためのキットを提供する。該キットは上記(a)~(1)のプライマー対のいずれか、それらの任意の組合せ、又は全部を含み得る。また場合によりキットは他の試薬や使用説明書を含みうる。

【発明の効果】

【0036】

本発明のマルチプレックスシャトルPCR法により食中毒原因菌を一括検出することができる。具体的には、食中毒原因菌として頻繁に検出されるカンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter jejuni)及びカンピロバクター・コリ(C. coli)、ウエルシュ菌(Clostridium perfringens)、シゲラ属菌(Shigella spp.)、サルモネラ属菌(Salmonella spp.)、ビブリオ・パラヘモリティカス(Vibrio parahaemolyticus)、腸管出血性大腸菌(EHEC)、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管凝集付着性大腸菌(EAggEC)を一括検出することができる。

【0037】

ある実施形態において、本発明の方法はシャトルPCRを用いるため検出所要時間は、温度変化が遅い機器を使用し電気泳動を含めても2時間以内に検出が可能であった。

【0038】

本発明の方法は、特殊で高価な試薬を必要とせず、ある実施形態では1検体当たりの検出にかかる費用は試薬や電気泳動を全て含めて約130円であり、従来法と比較して低価格で効率的に食中毒原因菌を検出同定できる。また、リアルタイムPCRやLAMP法などと比べ高価な機器を導入する必要もない。さらに本発明の方法は多種の食中毒原因菌を一括検出するが、その際の特異度と感度も高く、菌株を用いたある実施形態では感度は99.1%、特異度は100%であった。検出感度は全ての遺伝子が 10^1 CFU/反応以下となった。ある実施形態では、消化器症状事例において糞便からテンプレートDNAを抽出し、本発明の方法と培養結果を比較したところ、感度は83.3%、特異度は96.4%であった。

【0039】

このように本発明の方法は大規模な食中毒などが発生した際の大量の検体などに用いることができる迅速・安価・簡便な有用なスクリーニング法である。1検体当たり1反応液を使用するため、複雑な操作も必要としない。本発明の検出方法は臨床検体の検査や、食中毒事例における食品中からの細菌検出に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】PCRプロトコルを示す。左が従来一般的なPCR法であり、右が本発明のPCR法である。

【図2】PCR増幅産物を示す。図2Aはアニーリング温度64にて本発明のマルチプレックスシャトルPCR法を行った結果である(本発明)。図2Bはアニーリング温度60にてマルチプレックスシャトルPCR法を行った結果である(比較例)。

【図3】cadF遺伝子増幅によるC. jejuni及びC. coliの鑑別を示す。レーン1がC. jejuniでありレーン2がC. coliである。Mはマーカーを表す。

【発明を実施するための形態】

【0041】

10

20

30

40

50

ある実施形態において本発明は試料中の食中毒原因菌の存在の有無を検出する方法を提供する。食中毒原因菌の検出は、食中毒原因菌に汚染された食品の迅速診断、食品加工工程の安全性確認、食中毒発生時における原因菌の同定などに有用である。

【0042】

ある実施形態において本発明の食中毒原因菌検出方法は、食中毒原因菌のゲノムDNA又はmRNAに特異的に結合可能なプライマー対を使用し、核酸増幅反応を行うことにより試料中の食中毒原因菌を検出するものである。

【0043】

本願明細書において試料は、生物学的材料を含むあらゆる試料を包含する。試料としては、食品や食品由来試料、動物飼料や飼料由来の試料、糞便、尿、直腸のスワブ、唾液、血液、体液等が挙げられる。試料は、適宜材料を希釈して検査に用いることができる。一例として試料が糞便である場合、これに適当量の試薬を添加してDNAを抽出し、抽出DNAについてPCRを行うことができる。

【0044】

本発明の検出法を用いることにより、食品中の食中毒原因菌、例えばC.コリ、C.ジェジュニ、ウエルシュ菌、シゲラ属菌、サルモネラ属菌、ピブリオ・パラヘモリティカス、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、腸管病原性大腸菌、腸管凝集付着性大腸菌等の存在について、簡便かつ迅速に、菌種毎に知ることができる。

【0045】

本発明の方法を実施する際は、食中毒原因菌による汚染が疑われる食品等の生物学的試料から周知のポリヌクレオチド調製方法、例えばアルカリ SDS法やボイル法等によってポリヌクレオチドを調製し、得られたポリヌクレオチドを本発明の被験試料とすることができる。例えば菌株を加熱後、遠心分離した上清をテンプレートDNAとしうる。

【0046】

本明細書においてポリヌクレオチドとは、複数の塩基または塩基対からなるリボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチド重合体をいう。ポリヌクレオチドは、RNA、一本鎖および二本鎖のDNAを含む。ポリヌクレオチドは、未修飾の天然の状態のもの、及び修飾塩基の両方を包含する。

【0047】

本願明細書において塩基配列について特異的に結合とは、一方の塩基配列が他方の塩基配列と相補的に塩基対を形成し結合することを言い、ランダムな配列同士の特異的な結合は除かれる。この場合、一方の塩基配列と他方の塩基配列とは、完全に対形成するよう相補性が一致していると高温でも特異的に結合するが、適当な温度等の条件下で一方の塩基配列と他方の塩基配列とが対形成できるならば配列中に不一致の塩基が一部存在してもよい。例えば配列番号1及び2のプライマーは、それぞれカンピロバクター・コリのcadF遺伝子(配列番号25)の配列と不一致の塩基を1又は2つ有するが、T_m値は59.8及び61であり、これと特異的に結合しうる。また配列番号2のプライマーはカンピロバクター・ジェジュニのcadF遺伝子(配列番号26)と不一致の塩基を1つ有するが、T_m値が61であり、これと特異的に結合しうる。

【0048】

本願明細書において遺伝子とは、生物またはウイルスのゲノムの遺伝情報をコードする塩基配列からなる核酸をいう。遺伝子は狭義には構造遺伝子をさすが、本願明細書中では一部の実施形態においては非コード領域や、認識配列をも包含することがある。本発明のマルチプレックスシャトルPCR法は、Campylobacter coliのcadF遺伝子(配列番号25)、Campylobacter jejuni subsp. jejuniのcadF遺伝子(配列番号26)、Clostridium perfringensのcpe遺伝子(配列番号27)、Shigella flexneriのipaH遺伝子(配列番号28)、Salmonella entericaのinvA遺伝子(配列番号29)、大腸菌のeae遺伝子(配列番号30)、Vibrio parahaemolyticusのtdh遺伝子(配列番号31)、大腸菌のSt1b遺伝子(配列番号32)、大腸菌のST1a遺伝子(配列番号33)、大腸菌のLT遺伝子(配列番号34)、大腸菌のstr2遺伝子(配列番号35)、大腸菌のstx1遺伝子(配列番号36)、

及び大腸菌のaggR遺伝子（配列番号37）等の遺伝子を増幅しうる。また、これらの他に、さらなる遺伝子を増幅してもよい。本発明では、目的遺伝子を検出するために、当該遺伝子を標的とするプライマーを使用できるほか、当該遺伝子に対応するmRNAを標的とするプライマーを使用してもよい。ある遺伝子に対応するmRNAとは、ゲノムにコードされる遺伝子が転写されたmRNA産物をいう。ゲノム中の遺伝子の塩基配列が特定されていれば、当業者は適宜、これに対応するmRNAを標的とするプライマーを設計することができる。

【0049】

本発明の検出方法では、目的遺伝子を増幅するために、当該遺伝子に特異的なプライマーを用いる。プライマーとしては特に断らない限り、目的遺伝子のある領域を挟んで5'側及び3'側から伸長するよう設計されたプライマー対を用いる。増幅されるのは全長遺伝子であっても、その一部の領域であってもよい。プライマーとしては、上記のcadFやcpe遺伝子等を増幅するものが挙げられる。設計したプライマーはBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) といった支援ツールを用いて融点や特異性を確認することができる。本発明のプライマーとしては、例えば配列番号1～24の塩基配列を有するプライマーが挙げられる。本発明の検出方法に用いるプライマーはこれらに限定されず、同じ遺伝子の一部又は全部を増幅し、類似の長さの増幅産物を生じ、類似のT_m温度を有するものであれば、塩基配列が前後したり、一部にミスマッチ、置換、付加塩基を有するものであってもよい。またプライマーは検出のため、適宜標識化することができる。標識としては蛍光物質、放射性同位元素、酵素活性物質等が挙げられる。

【0050】

本発明の方法は、(a)～(l)のプライマー対を別々に用いてもよいが、単一の核酸増幅反応において(a)～(l)のプライマー対の一部又は全部を適当に組み合わせて同時に使用することもできる。複数のプライマーを単一反応に使用する手法を、マルチプレックスPCR法という。また変性ステップ、アニーリングステップ、伸長ステップを通常3段階で行うところを、変性ステップ及びアニーリングと伸長を兼ねたステップからなる2段階でPCRを行う手法をシャトルPCR法という。これらを組み合わせた方法をマルチプレックスシャトルPCR法という。本発明の食中毒原因菌の検出同定方法は、核酸増幅反応工程を含み、好ましくはマルチプレックスPCR法、さらに好ましくはマルチプレックスシャトルPCR法を用いる。本発明の方法ではPCRによる増幅産物を電気泳動し、増幅産物のバンドのサイズを観察することで複数の菌種を同時に鑑別することができる。本発明における核酸増幅方法は、目的産物が得られる限りどのような手法を用いてもよい。例えば本発明の核酸増幅方法はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いることができる。

【0051】

ある実施形態において本発明の核酸増幅反応はシャトルPCR法により行う。シャトルPCR法の条件は、増幅産物が特異的に得られるよう適当に設定することができる。一例として本発明のPCR法の条件は、試料溶液を94℃で1分、次いで94℃で5秒、次いで64℃で45秒にて伸長させるサイクルを所定の回数繰り返し、その後72℃にて5分保持する、というものであり得る。ここでアニーリングと伸長を兼ねたステップ（以下、本願明細書においてアニーリング・伸長ステップということがある）は、温度に敏感であり、64℃以上であれば非特異的バンドの出現を防止できるが、60℃で行うと非特異的増幅産物が生じる場合がある。したがって本発明のシャトルPCR法は64℃以上、63℃以上、62℃以上、又は61℃以上で行うことが望ましい。ある実施形態において本発明のシャトルPCR法のアニーリング・伸長ステップは温度が60℃以下ではない。サイクル数は増幅産物が確認できればよく、例えば20回以上、25回以上、30回以上、例えば31回、32回、33回、34回、35回、36回、37回、38回、39回、40回等とすることができる。サイクル数は試薬中の標的遺伝子または標的微生物の存在量に応じて適宜変更することができる。逆にサイクル数を一定とし、試薬を順次希釈した系列を用意することもできる。

【0052】

本願明細書において検出とは、遺伝子について用いる場合、ある試料中に目的の遺伝子

が存在するか否かを決定することをいう。また検出とは、微生物について用いる場合、ある試料中に当該微生物が存在するか否かを決定することをいい、定性的又は定量的な検出があり得る。本願明細書において同定とは、ある試料中に存在する遺伝子又は微生物の種類を特定することをいう。

【0053】

本発明の方法は、1検体を1反応液で検査できるため、1回の検査で大量の検体を処理できる。これは大規模な食中毒事件を処理する場合や、原因特定のために汚染の疑われる食品試料が一度に多く持ち込まれる場合などに特に有利である。本発明の方法では、例えば96ウェルプレートを用いる場合、コントロール（陽性対照）とブランク（陰性対照）を除き94検体が1プレートで検査可能である。

10

【0054】

本発明の方法は病原遺伝子を標的遺伝子とし、1菌種に複数存在する場合は保有率が高く、病原性に深く関わっている遺伝子を標的とする。カンピロバクター属については増幅産物のサイズから*C. jejuni*と*C. coli*の鑑別ができるような遺伝子を標的とする。これにより本発明の方法は複数の食中毒原因菌、例えば11種又は12種の食中毒原因菌の検出について、高い感度と特異度を実現した。食中毒原因菌の検出について感度が高い、とは試料中に存在する標的微生物が少なくても検出できることをいい、 $10^0 \sim 10^6$ cfu/反応、例えば $10^0 \sim 10^5$ cfu/反応、 $10^0 \sim 10^4$ cfu/反応、 $10^0 \sim 10^3$ cfu/反応又は $10^0 \sim 10^2$ cfu/反応の検出感度が挙げられる。例えばある実施形態においてアニーリング・伸長反応を64にて行うと、全ての遺伝子は 10^2 CFU/反応以下となる。試料当たりのテンプレートDNA添加量が $1.25 \mu\text{L}$ あれば、最も検出感度が低い遺伝子であっても 8×10^4 CFU/mL以上のテンプレートDNAは検出可能である。一般に急性期の食中毒患者の糞便中には 10^6 CFU/g以上の食中毒原因菌が排出されることが多いため（非特許文献11）、最も検出感度が低い遺伝子であっても検出可能となる。また、本願明細書において食中毒原因菌の検出について特異度が高い、とは、ある検査について陰性の検体を正しく陰性と判定する確率が高いことをいう。

20

【0055】

ある実施形態において本発明は、上記の食中毒原因菌の検出に用いるためのキットを提供する。該キットを用い、試料について核酸増幅反応、例えばマルチプレックスシャトルPCR法を行うことにより、試料中の食中毒の原因菌を高感度にて特異的に検出することができる。本発明のキットは、

30

(a) 配列番号1及び配列番号2に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるc adF遺伝子、または前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、

(b) 配列番号3及び配列番号4に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるc pe遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、

(c) 配列番号5及び配列番号6に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるi paH遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、

(d) 配列番号7及び配列番号8に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるi nvA遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、

(e) 配列番号9及び配列番号10に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるeae遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、

40

(f) 配列番号11及び配列番号12に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるtdh遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、

(g) 配列番号13及び配列番号14に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるst1b遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、

(h) 配列番号15及び配列番号16に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるst1a遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、

(i) 配列番号17及び配列番号18に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるIt遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、

(j) 配列番号19及び配列番号20に記載の配列からなるプライマー対によって増幅さ

50

れるstx2遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、
 (k) 配列番号21及び配列番号22に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるstx1遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対、及び
 (l) 配列番号23及び配列番号24に記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるaggR遺伝子、又は前記遺伝子に対応するmRNAを増幅しうるプライマー対のいずれか、それらの任意の組合せ、又は全てを含みうる。キットは、本発明のプライマー対の他、使用説明書を含み得る。本発明のキットはさらに、蛍光プローブ、インターカレーター、ポリヌクレオチド調製用試薬、陽性又は陰性プライマー対等を含み得る。陽性プライマーは、公知のデータベースから取得した塩基配列情報などから適宜設計することができる。陰性プライマーは、標的遺伝子のいずれとも無関係のランダムな配列とすることができる。10
 本発明の方法及びキットは、さらに黄色ブドウ球菌及びセレウス菌を検出するための手段（プライマー対等）をさらに含みうる。

本明細書に引用した全ての文献は、参照により本明細書に組み入れるものとする。

【実施例】

【0056】

以下の実施例は、例示のみを意図したものであり、何ら本発明の技術的範囲を限定することを意図するものではない。特に断らない限り、試薬は、市販されているか、又は当技術分野で慣用の手法、公知文献の手順に従って入手又は調製する。

【0057】

材料及び方法

1 使用菌株とテンプレート調整

本実施例で検出の対象とした細菌はCampylobacter jejuni及びC. coli、Clostridium perfringens、Shigella spp.、Salmonella spp.、Vibrio parahaemolyticus、腸管出血性大腸菌（EHEC）、腸管毒素原性大腸菌（ETEC）、腸管侵入性大腸菌（EIEC）、腸管病原性大腸菌（EPEC）、腸管凝集付着性大腸菌（EAEC）である。使用菌株は臨床分離株である場合については、同一事例由来で1菌株、または血清型や遺伝子型が異なる株とした（表1）。菌株の一部は山梨県食肉衛生検査所から分与されたものである。使用した培地はC. jejuni及びC. coliはCCDA（Oxoid）培地、Clostridium perfringensはCW寒天培地（ニッスイ）、Shigella spp.及びSalmonella spp. はSS寒天培地（栄研化学）、Vibrio parahaemolyticusはTCBS寒天培地（ニッスイ）、EHEC、ETEC、EIEC、EPEC、EAECはマッコンキー寒天培地（ニッスイ）であった。培養した菌株を滅菌精製水100µLに浮遊させ、100、10分間加熱し、10,000rpm、5分間遠心した上清をテンプレートDNAとした。30

【0058】

【表 1 - 1】

菌株	血清型	菌株数	由来
Campylobacter jejuni		35	ヒト糞便
Campylobacter coli		1	井戸水
		27	鶏盲腸内容物
		1	ヒト糞便
Clostridium perfringens cpe +	Hobbs2	3	ヒト糞便
	Hobbs3	1	ヒト糞便
	Hobbs5	1	ヒト糞便
	Hobbs6	1	ヒト糞便
	Hobbs7	1	ヒト糞便
	Hobbs13	2	ヒト糞便
	Hobbs16	1	ヒト糞便
	UT	24	ヒト糞便
Clostridium perfringens cpe-	Hobbs5	1	ヒト糞便
	Hobbs13	2	ヒト糞便
	Hobbs17	4	ヒト糞便
	UT	5	ヒト糞便
Shigella dysenteriae	2	1	ヒト糞便
	3	1	ヒト糞便
Shigella flexneri	2b	4	ヒト糞便
Shigella boydii	1	1	ヒト糞便
	4	1	ヒト糞便
Shigella sonnei	I	13	ヒト糞便
	II	6	ヒト糞便
Salmonella	Aberdeen	1	ヒト糞便
	Agona	1	ヒト糞便
	Anatum	1	ヒト糞便
	Arizonae	1	ヒト糞便
	Bareilly	1	ヒト糞便
	Bovismorbificans	1	ヒト糞便
	Braenderup	1	ヒト糞便
	Brandenburg	1	ヒト糞便
	Bredeney	1	河川
	Cerro	1	ヒト糞便
	Choleraesuis	1	ヒト血液
	Derby	1	ヒト糞便
	Dublin	1	ヒト糞便
	Emek	1	ヒト糞便
	Enteritidis	1	ヒト糞便
	Haifa	1	ヒト糞便
	Hardar	1	ヒト糞便
	Heidelberg	1	ヒト糞便
	Hvittingfoss	1	ヒト糞便
	Infantis	1	ヒト糞便
Javiana	1	ヒト糞便	
Litchfield	1	ヒト糞便	
Manhattan	1	ヒト糞便	
Mbandaka	1	ヒト糞便	
Meleagridis	1	ヒト糞便	

【 0 0 5 9 】

【表 1 - 2】

菌株	血清型	菌株数	由来
Salmonella	Mikawashima	1	ヒト糞便
	Montevideo	1	ヒト糞便
	Nagoya	1	ヒト糞便
	Narashino	1	ヒト糞便
	Newport	1	ヒト糞便
	Ohio	1	ヒト糞便
	Orientalis	1	ヒト糞便
	Paratyphi B	1	ヒト糞便
	poona	1	ヒト糞便
	Saintpaul	1	ヒト糞便
	Sandiego	1	ヒト糞便
	Schwarzengrund	1	ヒト糞便
	Senftenberg	1	ヒト糞便
	Singapore	1	ヒト糞便
	Stanley	1	ヒト糞便
	Tennessee	1	ヒト糞便
	Thompson	1	ヒト糞便
	Typhimurium	1	ヒト糞便
	Virchow	1	ヒト糞便
	Weltevreden	1	食品
Vibrio parahaemolyticus tdh +	O1:K60	2	ヒト糞便
	O1:KUT	2	ヒト糞便
	O3:K29	1	ヒト糞便
	O3:K6	19	ヒト糞便
	O4:K8	3	ヒト糞便
	O4:K9	1	ヒト糞便
	O4:K10	1	ヒト糞便
	O4:K13	1	ヒト糞便
	O4:K63	1	ヒト糞便
Vibrio parahaemolyticus tdh -	O1:K12	1	食品
	O1:K32	1	食品
	O1:KUT	1	食品
	O10:K19	1	食品
	O11:K46	1	食品
	O11:K50	1	食品
	O11:KUT	2	食品
	O2:K22	2	食品
	O2:K28	2	食品
	O2:K54	1	食品
	O3:K5	1	食品
	O3:K7	2	食品
	O3:KUT	2	食品
	O4:K9	1	食品
	O4:K13	1	食品
	O4:K34	1	食品
	O4:K49	1	食品
	O5:K17	1	食品
O6:K46	2	食品	

【 0 0 6 0 】

【表 1 - 3】

菌株	血清型	菌株数	由来
Vibrio parahaemolyticus tdh -	O6:KUT	1	食品
	OUT:K45	1	食品
EHEC stx1	O157:HNM	4	ヒト糞便
	O26:H11	9	ヒト糞便
	O111:HNM	3	ヒト糞便
	O103:H2	1	ヒト糞便
	O55:H21	1	ヒト糞便
EHEC stx1, stx2	O157:H7	11	ヒト糞便
	O157:HNM	2	ヒト糞便
	O26:H11	1	ヒト糞便
EHEC stx2	O157:H7	6	ヒト糞便
	O26:H11	1	ヒト糞便
EPEC	O111:HNM	1	ヒト糞便
	O142:H6	1	ヒト糞便
	O167:H9	1	ヒト糞便
	OUT:H2	1	ヒト糞便
EIEC	O28a:HNM	1	ヒト糞便
	O124:HNM	1	ヒト糞便
ETEC lt	O6:H16	1	ヒト糞便
	O25:HNM	1	ヒト糞便
	O159:HUT	2	ヒト糞便
ETEC lt, st1b	O6:H16	7	ヒト糞便
ETEC st1b	O148:H28	5	ヒト糞便
	O148:HUT	2	ヒト糞便
	O153:H19	1	ヒト糞便
	O153:HUT	1	ヒト糞便
ETEC st1a	O159:H34	1	ヒト糞便
	O169:H41	1	ヒト糞便
EAEC	O111:H21	5	ヒト糞便
	O44:H18	1	ヒト糞便
	O126:H27	2	ヒト糞便
	O86a:HNM	2	ヒト糞便
	O15:H2	1	ヒト糞便
	O86a:H27	1	ヒト糞便
E. coli	O1:H7	1	ヒト糞便
	O1:HNM	1	ヒト糞便
	O125:H4	1	ヒト糞便
	O128:H12	1	ヒト糞便
	O128:H34	1	ヒト糞便
	O142:H6	1	ヒト糞便
	O148:H28	1	ヒト糞便
	O18:H7	1	ヒト糞便
	O27:HUT	1	ヒト糞便
	O44:H18	2	ヒト糞便
	O55:H10	1	ヒト糞便
	O6:H16	6	ヒト糞便
	OUT:H5	1	ヒト糞便
OUT:HNM	1	ヒト糞便	

【 0 0 6 1 】

2 プライマーの設計

使用したプライマー及び標的遺伝子を表 2 に示す。プライマーは、上から順に配列番号 1 ~ 24 である。配列番号 1 ~ 6、9 ~ 16、19 ~ 24 の配列を有するプライマーは本発明において新規に設計したものである。配列番号 7 及び 8 のプライマーは非特許文献 7

に記載されているものを使用した。配列番号 17 のプライマーは非特許文献 8 に記載のものを使用した。配列番号 18 のプライマーは非特許文献 8 に記載の配列を延長したものである。設計したプライマーは Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて特異性を確認した。T_m 値 () は試薬メーカーの添付文書を参照した。プライマーは HQ PCR グレード (TaKaRa) を用いた。TE バッファー (Wako) で 100 μM となるよう調整し、-30 で保存した。

【 0 0 6 2 】

【表 2】

標的遺伝子	配列	鎖長 (base)	使用濃度 (μM)	増幅産物 (bp)	T _m 値 (°C)
cadF	GGTGTAATAATCCGCCTTAGTGATTCTTT	29	0.3	C. jejuni 507	59.8
	GCTTGAGCGTGGATTATCTTGACCATAA	28	0.3	C. coli 546	61
cpe	GATAAAGGAGATGGTTGGATATTAGGGGAAC	31	0.5	383	62.7
	CCTAAGCTATCTGCAGATGTTTTACTAAGCC	31	0.5		62.7
ipaH	GTCAGAACTCTCCATTTTGTGGATGAGAT	29	0.2	332	61.2
	AGACCTGATGCTTTCAGCCGGTCA	24	0.2		62.1
invA	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	26	0.2	285	62.3
	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	22	0.2		60
eae	GATTATGCTTAGTGCTGGTTAGGATTGTT	30	0.5	252	59.9
	GCCTTCATCATTTTCGCTTTCAGAAGTGT	28	0.5		61
tdh	CACAACGTCAGGTAATAATGGTTGACAT	29	0.2	195	61.2
	CTTGAATAGAACCTTCATCTTACCAACA	30	0.2		61.3
st1b	CACCTTTCGCTCAGGATGCTAAACCAGT	28	0.1	169	64
	TAGCACCCGGTACAAGCAGGATTACAAC	28	0.1		64
st1a	CACAGGCAGGATTACAACAAAGTTGACA	28	0.3	150	61
	GTCAGTCAACTGAATCACTTGACTCTTCA	29	0.3		61.2
lt	AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA	24	0.1	132	63.8
	GTGCTCAGATTCTGGGTCTCCTCATTACAA	30	0.1		64
stx2	GAATACTGGACCAGTCGCTGGAAT	24	0.3	117	60.4
	CACTTCAGCAAATCCGGAGCCTGA	24	0.3		62.1
stx1	AATGTCGCATAGTGGAACTCACTGA	26	0.4	100	60.7
	CTGTATTTGCCGAAAACGTAAGCTTCA	28	0.4		59.6
aggR	AAGTAGATGCTTGCAGTTGTCCGAATTG	28	0.6	76	61
	GTATCTAATACAGAATCGTCAGCATCAGCTACA	33	0.6		62.9

【 0 0 6 3 】

3 設計プライマーの感度・特異度の検討

全ての使用プライマーを混合し、1反応液中で表1の菌株を用いたマルチプレックスPCRを行った。反応試薬は Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa) を用いた。1反応当たり Multiplex PCR Mix 1を6.25 μL、Multiplex PCR Mix 2を0.0625 μL、プライマーを表2の濃度となるよう添加し、テンプレートDNAを1.25 μL 加え、滅菌精製水で全量を12.5 μLとした。PCR装置はPerkin Elmer cetus DNA Thermal Cycler 480を用いた。反応条件は検討の結果2ステップのシャトルPCRとした(図1)。増幅産物を3%アガロースゲル (TaKaRa) で100V、30分間電気泳動し、増幅産物の大きさにより判定を行った。C. jejuni及びC. coli、Shigella spp.、Salmonella spp.については全ての菌株が遺伝子を保有しているものとし、それ以外については市販プライマーまたは既に反応性が確立されているプライマー(既存プライマー)を用いて結果を比較することにより感度・特異度を算出した。

【 0 0 6 4 】

4 検出感度の測定

使用菌株のうち各々の遺伝子保有株の任意の菌株をBrain Heart Infusion (BHI:Oxoid) ブロスで3~5時間培養し、希釈した菌液をTryptone Soya Agar (TSA:Oxoid) で一夜培養し、菌数を算出した。カンピロバクターについては7%馬血液含有BHIで一夜培養後、CCDA選択サプリメント不含CCDA培地で菌数を算出した。この菌液を用いて 10^1 、 10^2 、 10^3 CFU/反応におけるmultiplex PCRを行い、検出感度を測定した。

【0065】

5 消化器症状事例におけるマルチプレックスPCRのスクリーニング法としての感度・特異度の検討

山梨県内において2012年3月~2013年6月までに消化器症状を呈した患者及び、調理従事者等の健常者の糞便72検体(9事例)を対象とし、培養結果と本発明の方法の比較を行った。糞便の培養は前述の培地で行った。糞便からのDNA抽出はアルカリ熱溶菌法により行った。即ち、約10倍乳剤の糞便を100 μ L採取し、10,000 rpmで5分間遠心後、上清を取り除き、50 mMのNaOH (Wako) 85 μ Lで懸濁した。100 μ Lで10分間加熱し、1M Tris HCl (pH 7.5 : Wako) 15 μ Lで中和後、10,000 rpmで5分間遠心し、上清をテンプレートDNAとした。

【0066】

結果

1 設計プライマーの感度・特異度

各菌株を用いたマルチプレックスPCRの結果、各遺伝子の増幅産物は明瞭に区別することができた(図2A)。図2AおよびBにおいて、各レーンは次のとおりである。1:cadF (jejuni)、2:cpe、3:ipaH、4:invA、5:eae、6:tdh、7:st1b、8:st1a、9:lt、10:stx2、11:stx1及び12:aggR。図2Aはアニーリング・伸長ステップの温度を64 $^{\circ}$ Cとして本発明のマルチプレックスシャトルPCR法を行った結果であり、非特異的バンドが出現することなく、各菌株が特異的に識別できた。図2Bはアニーリング・伸長ステップの温度を60 $^{\circ}$ CとしてシャトルPCRを行った比較例であり、レーン5、7、9、12に非特異的バンドが見られた。他の条件は図2Aの場合と同様であった。

【0067】

カンピロバクター属のcadF遺伝子についてはさらに15分の電気泳動を行ったところ、カンピロバクター・ジェジュニ(*C. jejuni*)とカンピロバクター・コリ(*C. coli*)を鑑別することができた(図3)。レーン1が*C. jejuni*でありレーン2が*C. coli*である。

【0068】

健常者由来の*C. coli* 1株と、2株のEHEC 0111:HNMのeae遺伝子以外は全て検出または、既プライマーと同一の結果であり、感度は99.1%であった。また、非特異反応は確認されなかったため、特異度は100%であった。1検体当たりの試薬にかかる費用は電気泳動まで含めて約130円であり、PCRは約75分で完了した。

【0069】

2 検出感度の測定

12種の遺伝子の検出感度はipaHが1 CFU/反応と最も検出感度が高く、invA、eae、tdh、lt、st1a、st1b、stx1、stx2は10 CFU/反応であり、cadF、cpe、aggRは 10^2 CFU/反応であった。

本発明の方法の既存プライマーと比較した感度及び特異度を表3に示す。

【0070】

【表 3】

		本発明の方法		
		陽性	陰性	合計
既存プライマー	陽性	333	3	336
	陰性	0	63	63
	合計	333	66	399

【0071】

3 消化器症状事例におけるマルチプレックスPCRのスクリーニング法としての感度・特異度の検討 10

消化器症状事例において糞便からテンプレートDNAを抽出し、マルチプレックスPCRを行い、培養結果との比較を行ったところ、感度は83.3%、特異度は96.4%であった(表4)。検出された遺伝子はcadF、cpe、eae、stx1、aggRの5種であった。カンピロバクターが培養陽性となった2検体でcadFが陰性となり、cadFが陽性となった2検体でカンピロバクターが培養陰性となった。また、EHEC 0103が培養陽性となった検体でeaeを検出することができなかった(表5)。下記表4に消化器症状事例由来糞便を用いた培養と比較した本発明の方法の感度・特異度を示す。また表5に消化器症状事例由来糞便の培養及び本発明の方法の結果を示す。

【0072】

【表 4】

		本発明の方法		
		陽性	陰性	合計
培養	陽性	15	3	18
	陰性	2	54	56
	合計	17	57	74

【0073】

【表 5】

培養結果	本発明の方法	検体数
Campylobacter jejuni	cadF+	7
Campylobacter jejuni	陰性	2
陰性	cadF+	2
Clostridium perfringens	cpe+	1
EHEC	stx1+ eae -	1
EPEC	eae+	2
EAEC	aggR+	4
陰性	陰性	54

【0074】

本発明の方法で検出対象とした11種の細菌は厚生労働省の統計によると、国内で過去10年間に発生した細菌性食中毒の原因の約90%を占めている。標的遺伝子は病原遺伝子とし、1菌種に複数存在する場合は保有率が高く、病原性に深く関わっているものを選択した。また、カンピロバクターについては増幅産物のサイズからC. jejuniとC. coliの鑑別ができるような遺伝子とした。

【0075】

使用プライマーは特異性の確保とシャトルPCRの導入を考え、3つの条件(1. Tm値が概 50

ね60以上、2.鎖長が25から30塩基程度、3.増幅産物が区別可能な大きさ)を満たすものとした。プライマー対(d)と(i)を除き、全てのプライマー対は本発明において独自に設計したものである。12対のプライマーは少なくとも66まではアニーリング可能であったことから、反応時間の短縮と特異性の向上を目的にシャトルPCRとした(図1)。

表1の菌株を用いたマルチプレックスPCRの結果、感度・特異度ともに良好であった(表4)。

【0076】

本発明の方法の検出感度はアニーリング・伸長反応を64に下げても行うことにより、全ての遺伝子が 10^1 CFU/反応以下となった。1反応チューブ当たりのテンプレートDNA添加量は $1.25\mu\text{L}$ であるため、最も検出感度が低い遺伝子であっても 8×10^1 CFU/mL以上のテンプレートDNAであれば検出が可能である。一般に急性期の患者糞便中には 10^5 CFU/g以上の原因菌が排出されることが多いため(非特許文献11)、最も検出感度が低い遺伝子であっても検出が可能であると考えられる。

【0077】

消化器症状事例における本発明の方法の有用性を糞便からDNAを抽出し確認したところ、菌株を用いた結果と比較し、若干の感度・特異度の低下が見られたものの、概ね同様の結果が得られた(表4)。感度低下の原因としては検体の不適切な保存が考えられる。培養からカンピロバクターが3検体陽性になった事例において、先に搬入のあった1検体はcadF陽性が確認されたが、その後搬入があり3日間、20程度の室温で保存していた2検体は陰性となった。この際、陽性となっていた1検体についても同条件下で保存していたが、再度確認したところ陰性となった。このことから、検体の保存温度は本発明の方法の結果に影響を与えることが考えられる。また、特異度が低下した原因として死菌由来遺伝子の検出が考えられる。カンピロバクターが原因となった食中毒事例の患者糞便1検体からcadFが検出されたが、培養結果は非病原菌を含む全ての細菌が陰性であった。この検体は抗菌薬を投与後採取されたものであったこと、既存プライマーにおいてもカンピロバクター由来の増幅産物が確認されていることから、死菌由来の遺伝子を検出したことが考えられた。同様の検体は他にも1検体確認されている(表5)。これらの結果は過去に感染があり、抗菌薬の投与により通常培養で分離できない検体であっても、PCRにより検出することができる一例である。多くの患者が抗菌薬服用後であり、患者検体が限られる事例などにおいては、このような結果は補助的な情報として有用であると考えられる。

【0078】

本発明の方法は迅速・安価・簡便なスクリーニング法として開発された。シャトルPCRを用いたため、検出所要時間は温度変化が遅い初期の機器を使用した場合で、電気泳動を含めても2時間以内に検出が可能であった。最新の機器を使用すればさらなる迅速性が期待される。1検体当たりの費用についても特殊で高価な試薬を必要としないため、前述のとおり試薬費が約130円/検体と安価である。また、リアルタイムPCRやLAMP法などと比べ高価な機器を導入する必要もない。1検体当たりに1反応液を使用するため、複雑な操作も必要としない。これらのことから本発明の方法は日常搬入される全ての検体から大規模な食中毒などが発生した際の大量の検体まで用いることができる迅速・安価・簡便な有用なスクリーニング法であると考えられる。本発明の検出方法は臨床検体の検査や、食中毒事例における食品中からの細菌検出に用いることができる。

【0079】

本発明の食中毒原因菌の検出方法は、(I)大量の検体数に対応できる、(II)細菌性感染型食中毒の原因菌のほとんどを検出できる、(III)試料搬入当日に結果が判定できる、(IV)操作が簡便である、(V)1検体当たりのランニングコストが安いという5つの要件を同時に満たすために開発された。

【0080】

本発明の方法は従来法と比較して迅速・安価・簡便で大量の検体を同時に処理可能である。ここでは従来法の例として非特許文献12、非特許文献4、非特許文献13及び非特許文献5に記載の方法に言及し、本発明をこれらと比較して説明する。例えば(I)機器1

10

20

30

40

50

台当たりの処理検体数（96ウェルプレートの場合）に着目すると非特許文献13に記載の方法は本発明と同様94検体を処理可能であるが、非特許文献13に記載の方法では検出遺伝子数は6と少なく、(II)発生する食中毒原因菌の約10%程度に対応するのみである。非特許文献12、非特許文献4及び非特許文献5に記載の方法は機器1台当たりの処理検体数が、それぞれ7、11及び30である。(III)検出時間に着目すると非特許文献12に記載の方法及び非特許文献4に記載の方法は2時間程度で結果ができるが、非特許文献12に記載の方法も非特許文献4に記載の方法も(I)処理できる検体数が少なく、試薬費を市販試薬の価格や使用量から推定すると(V)1検体当たりのコストも本発明のそれより高い。非特許文献13及び非特許文献5に記載の方法の検出時間はPCRのみでも、それぞれ4~5時間及び3.5~4.5時間を要する。これに対して本発明の方法はPCR反応に1~1.25時間を要するのみである。(IV)1検体に必要な反応液については、本発明の方法は1反応液で1検体を検査できる。非特許文献13に記載の方法も同様であるが、非特許文献13に記載の方法は検出感度が 10^7 ~ 10^8 cfu/反応と低い。一般に急性期の患者糞便中には 10^8 CFU/g以上の原因菌が排出されるが、DNA抽出のための希釈等により、検査チューブには 10^2 ~ 10^3 cfu程度の原因菌に相当するDNAが存在することとなる。そのため、非特許文献13に記載の方法は感度が糞便からのDNA抽出サンプルの検査には不向きである。非特許文献12、非特許文献4及び非特許文献5に記載の方法は、1検体に必要な反応液が、それぞれ、8、7、及び3反応液である。(IV)操作の簡便性については、本発明の方法はリアルタイムPCRを必要とせず、1検体に必要な反応液も少ない。非特許文献12に記載の方法はリアルタイムPCRを必要とする。また非特許文献4及び非特許文献5に記載の方法は1検体に必要な反応液が、それぞれ7及び3である。(V)検体当たりのコストに着目すると、試薬費を市販試薬の価格や使用量から推定すると本発明の方法は従来法（例えば非特許文献12、非特許文献13、非特許文献4、非特許文献13及び非特許文献5に記載の方法）より有意に低コストで検査が可能である。このように本発明の検出方法はこうした(I)~(V)の望ましい性質を全て備えている。

【産業上の利用可能性】

【0081】

本発明のプライマーによるマルチプレックスシャトルPCR法を用いることにより、食中毒原因菌を一括検出することができる。本発明の方法は迅速かつ簡便に、そして安価に、かつ高い特異性で多種の食中毒原因菌を一括検出できる。

[1] 試料中の食中毒原因菌を検出する方法であって、

食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(a) cadF遺伝子を増幅するための配列番号1及び配列番号2に記載の配列からなるプライマー対、

を用いて試料について核酸増幅反応を行う工程及び増幅産物を確認する工程を含む、試料中の食中毒原因菌を検出する方法。

[2] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(b) cpe遺伝子を増幅するための配列番号3及び配列番号4に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる1に記載の方法。

[3] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(c) ipaH遺伝子を増幅するための配列番号5及び配列番号6に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、1または2に記載の方法。

[4] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(e) eae遺伝子を増幅するための配列番号9及び配列番号10に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、1~3のいずれか1項に記載の方法。

[5] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(f) *tdh*遺伝子を増幅するための配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

[6] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(g) *st1b*遺伝子を増幅するための配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

[7] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(h) *st1a*遺伝子を増幅するための配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

[8] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(j) *stx2*遺伝子を増幅するための配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 に記載の配列からなるプライマー、

を用いる、1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

[9] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(k) *stx1*遺伝子を増幅するための配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

[10] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(l) *aqgR*遺伝子を増幅するための配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 に記載の配列からなるプライマー対、

を用いる、1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

[11] 前記核酸増幅反応においてさらに、

(d) *invA*遺伝子を増幅するための配列番号 7 及び配列番号 8 に記載の配列からなるプライマー対、及び / 又は

(i) *It*遺伝子を増幅するための配列番号 1 7 及び配列番号 1 8 に記載の配列からなるプライマー、

を用いる、1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

[12] 核酸増幅反応がシャトルPCRであり、シャトルPCRにおいて試料溶液を(i) 9 4 で1分間変性させ、その後、(ii) 9 4 で5秒間変性させ(iii) 6 4 で4 5秒間アニーリング及び伸長させる(iii)及び(iii)からなるサイクルを繰り返す、1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

[13] 食中毒原因菌を検出するためのキットであって、

食中毒原因菌のゲノムDNAに特異的に結合可能な2つのポリヌクレオチドからなる以下のプライマー対、すなわち、

(a) *cadF*遺伝子を増幅するための配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の配列からなるプライマー対、

を含む、食中毒原因菌検出用キット。

[14] さらに、

(b) *cpe*遺伝子を増幅するための配列番号 3 及び配列番号 4 に記載の配列からなるプライマー対、

を含む、13に記載のキット。

[15] さらに、

(c) *ipaH*遺伝子を増幅するための配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の配列からなるプライマー対、

を含む、13または14に記載のキット。

[16] さらに、

(e) *eae*遺伝子を増幅するための配列番号 9 及び配列番号 10 に記載の配列からなるプライマー対、

10

20

30

40

50

を含む、13～15のいずれか1項に記載のキット。

[17] さらに、

(f) *tdh*遺伝子を増幅するための配列番号11及び配列番号12に記載の配列からなるプライマー対、

を含む、13～16のいずれか1項に記載のキット。

[18] さらに、

(g) *st1b*遺伝子を増幅するための配列番号13及び配列番号14に記載の配列からなるプライマー対、

を含む、13～17のいずれか1項に記載のキット。

[19] さらに、

(h) *st1a*遺伝子を増幅するための配列番号15及び配列番号16に記載の配列からなるプライマー対、

を含む、13～18のいずれか1項に記載のキット。

[20] さらに、

(j) *stx2*遺伝子を増幅するための配列番号19及び配列番号20に記載の配列からなるプライマー、

を含む、13～19のいずれか1項に記載のキット。

[21] さらに、

(k) *stx1*遺伝子を増幅するための配列番号21及び配列番号22に記載の配列からなるプライマー対、

を含む、13～20のいずれか1項に記載のキット。

[22] さらに、

(l) *eqgR*遺伝子を増幅するための配列番号23及び配列番号24に記載の配列からなるプライマー対、

を含む、13～21のいずれか1項に記載のキット。

[23] さらに

(d) *invA*遺伝子を増幅するための配列番号7及び配列番号8に記載の配列からなるプライマー対、及び/又は

(i) *It*遺伝子を増幅するための配列番号17及び配列番号18に記載の配列からなるプライマー、

を含む、13～22のいずれか1項に記載の食中毒原因菌検出用キット。

【配列表フリーテキスト】

【0082】

配列番号1 *cadF*遺伝子用フォワードプライマー *cadF* F
 配列番号2 *cadF*遺伝子用リバースプライマー *cadF* R
 配列番号3 *cpe*遺伝子用フォワードプライマー *cpe* F
 配列番号4 *cpe*遺伝子用リバースプライマー *cpe* R
 配列番号5 *ipaH*遺伝子用フォワードプライマー *ipaH* F
 配列番号6 *ipaH*遺伝子用リバースプライマー *ipaH* R
 配列番号7 *invA*遺伝子用フォワードプライマー *invA* F
 配列番号8 *invA*遺伝子用リバースプライマー *invA* R
 配列番号9 *eae*遺伝子用フォワードプライマー *eaeA* F
 配列番号10 *eae*遺伝子用リバースプライマー *eaeA* R
 配列番号11 *tdh*遺伝子用フォワードプライマー *tdh* F
 配列番号12 *tdh*遺伝子用リバースプライマー *tdh* R
 配列番号13 *st1b*遺伝子用フォワードプライマー *ST1b* F
 配列番号14 *st1b*遺伝子用リバースプライマー *ST1b* R
 配列番号15 *st1a*遺伝子用フォワードプライマー *ST1a* F
 配列番号16 *st1a*遺伝子用リバースプライマー *ST1a* R
 配列番号17 *It*遺伝子用フォワードプライマー *LT* F

10

20

30

40

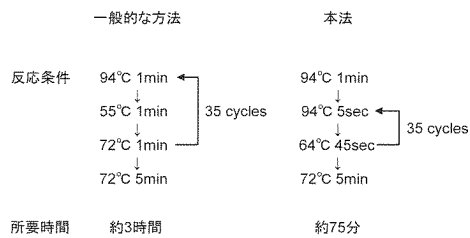
50

- 配列番号 1 8 It遺伝子用リバースプライマーLT R
- 配列番号 1 9 stx2(VT2)遺伝子用フォワードプライマーVT2 F
- 配列番号 2 0 stx2(VT2)遺伝子用リバースプライマーVT2 R
- 配列番号 2 1 stx1(VT1)遺伝子用フォワードプライマーVT1 F
- 配列番号 2 2 stx1(VT1)遺伝子用リバースプライマーVT1 R
- 配列番号 2 3 aggR遺伝子用フォワードプライマーaggR F
- 配列番号 2 4 aggR遺伝子用リバースプライマーaggR R
- 配列番号 2 5 *Campylobacter coli* JV20 contig00034 cadF
- 配列番号 2 6 *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* CG8421 CPS cadF
- 配列番号 2 7 *Clostridium perfringens* SM101, complete genome cpe
- 配列番号 2 8 *Shigella flexneri* invasion plasmid antigen H (ipaH)
- 配列番号 2 9 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium DT104 main chromosome, complete genome invA
- 配列番号 3 0 *Escherichia coli* O55:H7 eae
- 配列番号 3 1 *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin(tdh)
- 配列番号 3 2 *Escherichia coli* ETEC heat stable enterotoxin (St1b)
- 配列番号 3 3 ETEC H10407 plasmid pEntH10407 (ST1a)
- 配列番号 3 4 heat labile enterotoxin (LT)
- 配列番号 3 5 *Escherichia coli* O157:H7 str. Sakai VT2 subunit B
- 配列番号 3 6 *Escherichia coli* O157:H7 sakai VT1 subunitA precursor
- 配列番号 3 7 *Escherichia coli* 55989 aggR

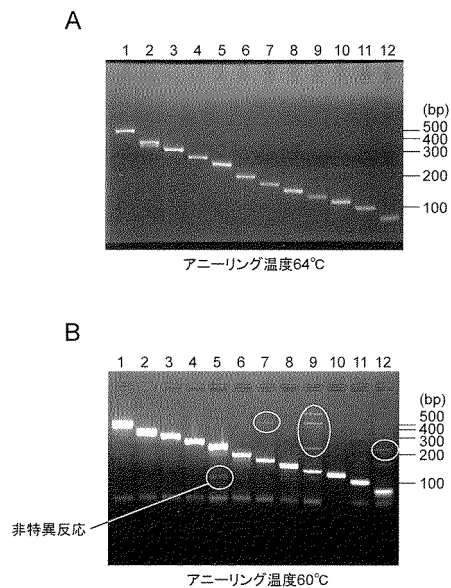
10

20

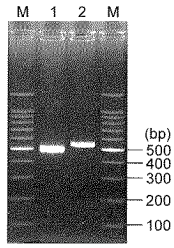
【図 1】



【図 2】



【 図 3 】



【 配列表 】

0005884108000001.app

フロントページの続き

審査官 植原 克典

- (56)参考文献 特表2005-511014(JP,A)
特開2010-130901(JP,A)
平成23年度熊本県保健環境科学研究所報 [online], 2011年, Vol.41, pp.20-26, <<https://www.pref.kumamoto.jp/common/UploadFileOutput.ashx?cid=3&id=2887&subid=1&flid=16&dainid=1>> [retrieved on 2015 06 17]
細胞膨化致死毒素遺伝子を標的としたmultiplexPCR法によるCampylobacter jejuni Coli及びC.coliの同定について, 山梨衛環研年報 [online], 2011年, Vol.55, pp.62-64, <<https://www.pref.yamanashi.jp/eikouken/documents/11v55kenkyuhoukoku8.pdf>> [retrieved on 2015 06 18]
Infect. Immun., 1997年, Vol.65 No.4, pp.1267-1272
医学検査, 2008年, Vol.57, No.8, pp.1041-1046
感染症学雑誌 [online], 2009年, Vol.83, No.5, pp.490-495, <<http://journal.kansensho.or.jp/Disp?pdf=0830050490.pdf>> [retrieved on 2015 06 17]
Lett. Appl. Microbiol., 2010年, Vol.51, No.5, pp.539-545
Journal of Food Safety, 2009年, Vol.29, No.3, pp.348-363
Food Control, 2013年, Vol.32, No.1, pp.198-204
J. Appl. Microbiol., 2012年, Vol.112, No.4, pp.823-830

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
C12Q 1/00 - 3/00
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
PubMed
Caplus / MEDLINE / BIOSIS / REGISTRY (STN)