

特 許

リアルタイム PCR 法による食品媒介病原菌の網羅的迅速検出法

福島 博 (元島根県保健環境科学研究所保健科学部長)

特許第 5267293 号 (平成 25 年 5 月 17 日)

本特許請求の範囲は、次のとおりである。【請求項 1】複数種類の食品媒介病原菌それぞれにおける所定の検出用 DNA 断片を増幅させるプライマーペアの組であって、検出用 DNA 断片の T_m 値が互いに異なるように設計されたプライマーペアの組、前記検出用 DNA 断片のいずれの T_m 値とも異なる T_m 値をもつ DNA 断片を有するインターナルコントロール、当該 DNA 断片を増幅させるインターナルコントロール用プライマーペア、および、蛍光インターカレタを、プレートないしチューブセットのそれぞれの穴に分注し、さらに、前記検出用 DNA 断片を 1 穴に 1 種類ずつ種類数分添加し、残余の穴には被験者の糞便液から抽出した鋳型 DNA を 1 穴に 1 人分ずつ人数分添加し、これをリアルタイム PCR によって増幅させた後、融解曲線分析をおこない、被験者に一定量を超えていずれかの食品媒介病原菌の保有が認められるかをスクリーニングすることを特徴とする食品媒介病原菌検査方法。【請求項 2】前記検出用 DNA 断片と前記鋳型 DNA のいずれをも含まず、前記プライマーペアの組、前記蛍光インターカレタ、前記インターナルコントロール用プライマーペア、および、調整水、または、前記プライマーペアの組、前記蛍光インターカレタ、前記インターナルコントロール用プライマーペア、および、前記インターナルコントロールからなる液が分注された区画をプレートないしチューブセットに設けたことを特徴とする請求項 1 に記載の食品媒介病原菌検査方法。【請求項 3】蛍光インターカレタが、サイバークリーン (商標)、BEBO (商標)、YO-PRO-1 (商標)、LC Green (商標)、SYTO-9 (商標)、SYTO-13 (商標)、または、SYTO-82 (商標) であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の食品媒介病原菌検査方法。【請求項 4】プレートないしチューブセットを区画し、プライマーペアの組を、発生頻度の高い第 1 の食品媒介病原菌群から選んだ 1 種の特定の検出用 DNA 断片と、発生頻度が第 1 の食品媒介病原菌よりは高くない第 2 の食品媒介病原菌群から選んだ 1 種または 2 種の食品媒介病原菌の特定の検出用 DNA 断片と、をそれぞれ増幅させるように、かつ、食品媒介病原菌種がそれぞれ重複しないように、グループ化し、1 区画 1 グループとなるように割り当ててプライマーペアの組を分注し、各区画に前記割り当てられたグループに係る前記検出用 DNA 断片を 1 穴に 1 種類ずつ種類数分添加し、各区画の残余の穴には被験者の糞便液から抽出した鋳型 DNA を 1 穴に 1 人分ずつ人数分添加したことを特徴とする請求項 1、2 または 3 に記載の食品媒介病原菌検査方法。【請求項 5】第 1 の食品媒介病原菌群は、耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオ、ウェルシュ菌、サルモネラ菌、カンピロバクター・ジェジュニ、黄色ブドウ球菌、嘔吐毒産生セレウス菌、eaeA 遺伝子保有大腸菌、astA 遺伝子保有大腸菌、から選ばれた群であり、第 2 の食品媒介病原菌群は、カンピロバクター・コリー、aggR 遺伝子保有大腸菌、stx1 遺伝子保有大腸菌、下痢毒産生セレウス菌、赤痢菌、コレラ菌、プロビデンシア・アルカリファシエンシス、プレシオモナス・シグロイデス、LT 遺伝子保有大腸菌、リステリア菌、TRH 産生腸炎ビブリオ、stx2 遺伝子保有大腸菌、ST 遺伝子保有大腸菌、エルシニア菌、エロモナス菌、daaD 遺伝子保有大腸菌、から選ばれた群であることを特徴とする請求項 4 に記載の食品媒介病原菌検査方法。【請求項 6】グループ内の検出用 DNA 断片の T_m 値を互いに 0.6℃以上離れるようにプライマーペアを設計したことを特徴とする請求項 4 または 5 に記載の食品媒介病原菌検査方法。【請求項 7】食品媒介病原菌が、耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオである場合には、検出用 DNA 断片は配列番号 7 に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号 31 および 32 に示すものであり、カンピロバクター・コリーである場合には、検出用 DNA 断片は配列番号 8 に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号 33 および 34 に示すものであり、aggR 遺伝子保有大腸菌である場合には、検出用 DNA 断片は配列番号 9 に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号 35 および 36 に示すものであり、ウェルシュ菌である場合には、検出用 DNA 断片は配列番号 10 に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号 37 および 38 に示すものであり、stx1 遺伝子保有大腸菌である場合には、検出用 DNA 断片は配列番号 11 に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号 39 および 40 に示すものであり、下痢毒産生セレウス菌である場合には、検出用 DNA 断片は配列番号 12 に

示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号41および42に示すものであり、サルモネラ菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号13に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号43および44に示すものであり、赤痢菌である場合には、検出用DNA断片は14であり、これに対するプライマーペアは配列番号45および46に示すものであり、コレラ菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号15に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号47および48であり、カンピロバクター・ジェジュニである場合には、検出用DNA断片は配列番号16に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号49および50に示すものであり、プロビデンシア・アルカリファシエンスである場合には、検出用DNA断片は配列番号17に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号51および52に示すものであり、プレシオモナス・シグロイデスである場合には、検出用DNA断片は配列番号18に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号53および54に示すものであり、黄色ブドウ球菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号19に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号55および56に示すものであり、LT遺伝子保有大腸菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号20に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号57および58に示すものであり、リステリア菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号21に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号59および60に示すものに示すものであり、嘔吐毒産生セレウス菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号22に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号61および62に示すものであり、TRH産生腸炎ビブリオである場合には、検出用DNA断片は配列番号23に示すものに示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号63および64に示すものであり、stx2遺伝子保有大腸菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号24に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号65および66に示すものであり、eaeA遺伝子保有大腸菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号25に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号67および68に示すものであり、ST遺伝子保有大腸菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号26に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号69および70に示すものであり、エルシニア菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号27に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号71および72に示すものであり、astA遺伝子保有大腸菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号28に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号73および74に示すものであり、エロモナス菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号29に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号75および76に示すものであり、daaD遺伝子保有大腸菌である場合には、検出用DNA断片は配列番号30に示すものであり、これに対するプライマーペアは配列番号77および78に示すものであることを特徴とする請求項4または5に記載の食品媒介病原菌検査方法。【請求項8】請求項1～7のいずれか一つに記載の食品媒介病原菌検査方法における、*Yersinia ruckeri*のI6SrRNA遺伝子のインターナルコントロールとしての使用。【請求項9】食中毒罹患の疑いのある複数の被験者から食品媒介病原菌をスクリーニングするための食品媒介病原菌スクリーニング用PCRプレートであって、発生頻度の高い第1の食品媒介病原菌群から選んだ1種と発生頻度が第1の食品媒介病原菌よりは高くない第2の食品媒介病原菌群から選んだ1種または2種により、食品媒介病原菌をそれぞれ重複しないように複数のグループに分け、プレートを区画して1区画1グループとなるように割り当て、プレートの各穴に、インターナルコントロールと、インターナルコントロール用プライマーペアと、蛍光インターカラータと、を分注し、さらに、グループ内の食品媒介病原菌それぞれの所定の検出用DNA断片を増幅させるプライマーペアの組であって、検出用DNA断片のTm値が互いに異なるように設計されたプライマーペアの組を、当該グループに係る区画にそれぞれ分注し、かつ、各区画に当該区画に割り当てられたグループに係る前記検出用DNA断片を1穴に1種類ずつ種類数分添加し、当該区画の残余の穴には被験者の糞便液から抽出した鋳型DNAを1穴に1人分ずつ人数分添加したことを特徴とする食品媒介病原菌スクリーニング用PCRプレート。