

Multiplex shuttle PCR による食中毒原因菌の一括検出法

山梨県衛生環境研究所

柳本恵太 植松香星

Rapid, easy, inexpensive simultaneous screening by multiplex
PCR assay for 11 foodborne pathogens using shuttle PCR.

Keita YANAGIMOTO, Kousei UEMATSU

キーワード：multiplex PCR, shuttle PCR

要旨

Multiplex PCR による食中毒原因菌のスクリーニングにおいて、現状では迅速性、操作性、経済性、合理性を同時に持ち、大量の検体を処理しようとする研究は見られない。そこで1検体当たり1反応液で、年間に発生する食中毒原因菌の大部分に対応でき、かつ2時間以内で結果判定が可能である multiplex PCR を開発することとした。検出の対象とした細菌は *Campylobacter jejuni* 及び *coli*、*Clostridium perfringens*、*Shigella* spp.、*Salmonella* spp.、*Vibrio parahaemolyticus*、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とした。1検体当たりの試薬に掛かる費用は電気泳動まで含めて約130円であり、PCRはshuttle PCRを導入し、約75分で完了した。菌株を用いた検討では感度は99.1%、特異度は100%であった。検出感度は全ての遺伝子が 10^2 CFU / reaction 以下となった。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。菌株での検討と比較し感度及び特異度が低下した原因として検体の不適切な温度での保存や死菌を検出したことが考えられた。本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と考えられる。

はじめに

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ることが多い。一般的に食中毒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^{1), 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。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場合がある。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。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 multiplex PCR を用いた検査法の検討がなされている³⁾⁻⁶⁾。仮に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 multiplex 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。しかし、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、年間に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日掛かってしまう方法など迅速性、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方法を検討した研究は見られない。そこで1検体当たり1反応液で、年間に発生する食中毒原因菌の大部分に対応でき、かつ2時間以内で結果判定が可能である multiplex PCR を開発することとした。

材料・方法

1 使用菌株とテンプレート調整

本研究で検出の対象とした細菌は *Campylobacter* (*C. jejuni* 及び *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)、腸管凝集附着性大腸菌 (EAEC) とした。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)。使用培地は *C. jejuni*、*coli* は CCDA (Oxoid)、*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)で行った。また、培養した菌株を滅菌精製水 100 μ L に浮遊させ、100、10分間加熱し、10,000 rpm、5分間遠心した上清をテンプレート DNA とした。

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に示した。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。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 μ Mとなるよう調整し、-30で保存した。

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 multiplex 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 μ L、Multiplex PCR Mix 2 を 0.0625 μ L、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 μ L 加え、滅菌精製水で全量を 12.5 μ L 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 shuttle 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 *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。

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) プロスで 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。*Campylobacter* 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 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 CFU / reaction における multiplex PCR を行い、検出感度を測定した。

5 消化器症状事例における multiplex 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 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。

結果

1 設計プライマーの感度・特異度

各菌株を用いた multiplex 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2)。*Campylobacter* の *cadF* については *jejuni* と *coli* の鑑別のため、さらに 15 分追加した電気泳動が必要であった(図3)。

健常者由来の *C. coli* 1 株と、2 株の EHEC O111:HNM の *eae* 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(表3)。1検体当たりの試薬に掛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。

表 1 使用菌株一覽

菌株	血清型	菌株數	由來	菌株	血清型	菌株數	由來	菌株	血清型	菌株數	由來
<i>Campylobacter jejuni</i>		35	糞便	<i>Salmonella</i>	Mikawashima	1	糞便	<i>Vibrio parahaemolyticus tdh-</i>	O6:KUT	1	食品
	<i>Campylobacter coli</i>	1	井水		Montevideo	1	糞便		OUT:K45	1	食品
<i>Clostridium perfringens cpe+</i>		27	鷄盲腸內容物	Nagoya	1	糞便	EHEC <i>stx1</i>	O157:HNM	4	糞便	
	Hobbs2	1	糞便	Narashino	1	糞便		O26:H11	9	糞便	
	Hobbs3	3	糞便	Newport	1	糞便		O111:HNM	3	糞便	
	Hobbs5	1	糞便	Ohio	1	糞便		O103:H2	1	糞便	
	Hobbs6	1	糞便	Orientalis	1	糞便		O55:H21	1	糞便	
	Hobbs7	1	糞便	Paratyphi B	1	糞便		O157:H7	11	糞便	
	Hobbs13	2	糞便	poona	1	糞便		O157:HNM	2	糞便	
	Hobbs16	1	糞便	Saintpaul	1	糞便		O26:H11	1	糞便	
	UT	2	糞便	Sandiego	1	糞便		O157:H7	6	糞便	
	Hobbs5	1	糞便	Schwarzengrund	1	糞便		O26:H11	1	糞便	
	Hobbs13	2	糞便	Senftenberg	1	糞便		O111:HNM	1	糞便	
	Hobbs17	4	糞便	Singapore	1	糞便		O142:H6	1	糞便	
	UT	5	糞便	Stanley	1	糞便		O167:H9	1	糞便	
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	1	糞便	Tennessee	1	糞便	OUT:H2	1	糞便		
	3	1	糞便	Thompson	1	糞便	O28a:HNM	1	糞便		
	2b	4	糞便	Typhimurium	1	糞便	O124:HNM	1	糞便		
	1	1	糞便	Virchow	1	糞便	O6:H16	1	糞便		
<i>Shigella boydii</i>	4	1	糞便	Weltevreden	1	食品	ETEC <i>lt</i>	O25:HNM	1	糞便	
		1	糞便	O1:K60	2	糞便		O159:HUT	2	糞便	
		13	糞便	O3:K29	2	糞便		O6:H16	7	糞便	
		6	糞便	O3:K6	19	糞便		O148:H28	5	糞便	
<i>Shigella sonnei</i>	Aberdeen	1	糞便	O4:K8	3	糞便	ETEC <i>st1b</i>	O148:HUT	2	糞便	
	Agona	1	糞便	O4:K9	1	糞便	ETEC <i>st1b</i>	O153:H19	1	糞便	
	Anatum	1	糞便	O4:K10	1	糞便		O153:HUT	1	糞便	
	Arizonae	1	糞便	O4:K13	1	糞便		O159:H34	1	糞便	
	Bareilly	1	糞便	O4:K63	1	糞便		O169:H41	1	糞便	
	Bovismorbificans	1	糞便	O1:K12	1	糞便		O111:H21	5	糞便	
	Braenderup	1	糞便	O1:K32	1	食品		O44:H18	1	糞便	
	Brandenburg	1	糞便	O1:K32	1	食品		O126:H27	2	糞便	
	Bredeney	1	糞便	O1:K32	1	食品		O86a:HNM	2	糞便	
	Cerro	1	糞便	O10:K19	1	食品		O15:H2	1	糞便	
	Choleraesuis	1	糞便	O11:K46	1	食品		O86a:H27	1	糞便	
	Derby	1	糞便	O11:K50	1	食品		O1:H7	1	糞便	
	Dublin	1	糞便	O11:KUT	2	食品		O1:HNM	1	糞便	
Emek	1	糞便	O2:K22	2	食品		O125:H4	1	糞便		
Enteritidis	1	糞便	O2:K28	2	食品		O128:H12	1	糞便		
Haifa	1	糞便	O2:K54	1	食品		O128:H34	1	糞便		
Hardar	1	糞便	O3:K5	1	食品		O142:H6	1	糞便		
Heidelberg	1	糞便	O3:K7	2	食品		O148:H28	1	糞便		
Hvittingfoss	1	糞便	O3:KUT	2	食品		O18:H7	1	糞便		
Infantis	1	糞便	O4:K9	1	食品		O27:HUT	1	糞便		
Javiana	1	糞便	O4:K13	1	食品		O44:H18	2	糞便		
Litchfield	1	糞便	O4:K34	1	食品		O55:H10	1	糞便		
Manhattan	1	糞便	O4:K49	1	食品		O6:H16	6	糞便		
Mbandaka	1	糞便	O5:K17	1	食品		OUT:H5	1	糞便		
Meleagridis	1	糞便	O6:K46	2	食品		OUT:HNM	1	糞便		

表2 使用プライマー

標的遺伝子	配列	鎖長 (base)	使用濃度 (nM)	増幅産物 (bp)	Tm値 ()	文献
<i>cadF</i>	GGTGAAAAATCCGCCTTAGTGATTCTTT	29	0.3	<i>C. jejuni</i> 507	59.8	本研究
	GCTTGAGCGTGGATTATCTTGACCATAA	28	0.3	<i>C. coli</i> 546	61	
<i>cpe</i>	GATAAAGGAGATGGTTGGATATTAGGGGAAC	31	0.5	383	62.7	本研究
	CCTAAGCTATCTGCAGATGTTTTACTAAGCC	31	0.5		62.7	
<i>ipaH</i>	GTCAGAACTCTCCATTTTGGATGAGAT	29	0.2	332	61.2	本研究
	AGACCTGATGCTTTCAGCCGGTCA	24	0.2		62.1	
<i>invA</i>	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	26	0.2	285	62.3	7
	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	22	0.2		60	
<i>eae</i>	GATTATGCTTAGTGCTGGTTAGGATTGTT	30	0.5	252	59.9	本研究
	GCCTTCATCATTTTCGCTTTCAGAAGTGT	28	0.5		61	
<i>tdh</i>	CACAACGTCAGGTAATAATGGTTGACAT	29	0.2	195	61.2	本研究
	CTTGGAATAGAACCTTCATCTTCACCAACA	30	0.2		61.3	
<i>st1b</i>	CACCTTTCGCTCAGGATGCTAAACCAGT	28	0.1	169	64	本研究
	TAGCACCCGGTACAAGCAGGATTACAAC	28	0.1		64	
<i>st1a</i>	CACAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACA	28	0.3	150	61	本研究
	GTCAGTCAACTGAATCACTTGACTCTTCA	29	0.3		61.2	
<i>lt</i>	AGCAGGTTTCCACCCGGATCACCA	24	0.1	132	63.8	8 (修正)
	GTGCTCAGATTCTGGGTCCTCATTACAA	30	0.1		64	
<i>stx2</i>	GAATACTGGACCAGTCGCTGGAAT	24	0.3	117	60.4	本研究
	CACTTCAGCAAATCCGGAGCCTGA	24	0.3		62.1	
<i>stx1</i>	AATGTCGCATAGTGGAACTCACTGA	26	0.4	100	60.7	本研究
	CTGTATTGCCGAAAACGTAAGCTTCA	28	0.4		59.6	
<i>aggR</i>	AAGTAGATGCTTGCAATTGTCCGAATTG	28	0.6	76	61	本研究
	GTATCTAATACAGAAATCGTCAGCATCAGCTACA	33	0.6		62.9	

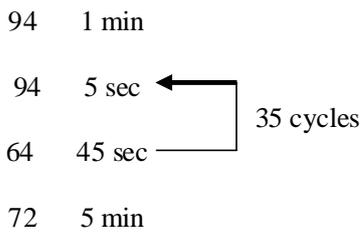


図1 PCRプロトコール

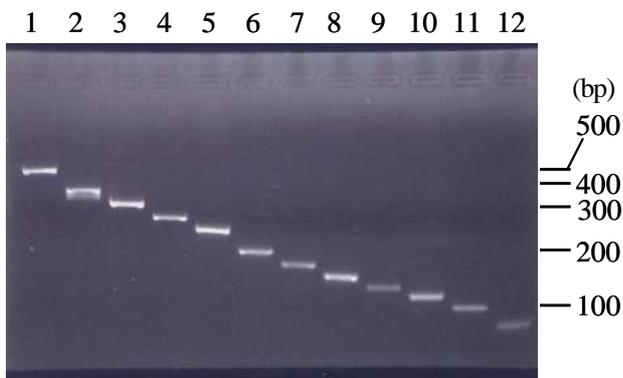


図2 12種の増幅産物

1:*cadF* (*jejuni*) 2:*cpe* 3:*ipaH* 4:*invA* 5:*eae* 6:*tdh*
 7:*st1b* 8:*st1a* 9:*lt* 10:*stx2* 11:*stx1* 12:*aggR*

2 検出感度の測定

12種の遺伝子の検出感度は*ipaH*が1 CFU / reactionと最も検出感度が高く、*invA*、*eae*、*tdh*、*lt*、*st1a*、*st1b*、*stx1*、*stx2*は10 CFU / reactionであり、*cadF*、*cpe*、*aggR*は10² CFU / reactionと最も低くなった。

表3 本法の既存プライマーと比較した感度及び特異度

		本法		
		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



図3 *CadF*による*C. jejuni*及び*coli*の鑑別
 1:*C. jejuni* 2:*C. coli* M:マーカー

3 消化器症状事例における multiplex PCR のスクリーニング法としての感度・特異度の検討

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、multiplex 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 O103 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)。

表 4 消化器症状事例由来糞便を用いた培養と比較した本法の感度・特異度

		本法		
		陽性	陰性	合計
培養	陽性	15	3	18
	陰性	2	54	56
	合計	17	57	74

表 5 消化器症状事例由来糞便の培養及び本法の結果

培養結果	本法	検体数
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>cadF</i> +	7
<i>Campylobacter jejuni</i>	陰性	2
陰性	<i>cadF</i> +	2
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i> +	1
EHEC	<i>stx1</i> + <i>eae</i> -	1
EPEC	<i>eae</i> +	2
EAEC	<i>aggR</i> +	4
陰性	陰性	54

考察

本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。残りの 10 % は黄色ブドウ球菌とセレウス菌がほとんどを占めている⁹⁾。この 2 つの細菌による食中毒は毒素型であるため、潜伏時間が 30 分から 6 時間と非常に短い。そのため、聞き取り調査などの疫学調査の結果のみにより、ある程度原因を絞ることができる。このことから、スクリーニングの必要性が低いと判断し、対象から除いた。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、*Campylobacter* については増幅産物のサイズから *jejuni* と *coli* の鑑別ができるような遺伝子とした。

使用プライマーは特異性の確保と shuttle PCR の導入を考え、3 つの条件 (1. Tm 値が概ね 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。上記遺伝子を標的とし、この条件を満たすプライマーを文献から検索し、足りないものは独自に設計した。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 shuttle PCR とした (図 1)。

表 1 の菌株を用いた multiplex PCR の結果、感度・特異度ともに良好であった (表 3)。検出することができなかった *C. coli* は症状のない調理従事者由来であり、また同菌の *cadF* 保有率は 83.3 % であるとの報告もある¹⁰⁾ ことから、非保有株である可能性も考えられたが、詳細は不明であった。同じく検出できなかった EHEC O111 の *eae* については単独プライマーでは検出できており、multiplex にすることにより検出感度が低下したことが考えられた。

本法の検出感度はアニーリング・伸長反応を 64 に下げたことにより、全ての遺伝子が 10^2 CFU / reaction 以下となった。1 tube 当たりのテンプレート DNA 添加量は 1.25 μ L であるため、最も検出感度が低い遺伝子であっても 8×10^4 CFU / mL 以上のサンプル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 10^6 CFU / g 以上の原因菌が排出されることが多いため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。

消化器症状事例における本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、感度・特異度とも低下した (表 4)。感度が低下した原因として考えられるのが、検体の不適切な保存方法である。培養から *Campylobacter* 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。*Campylobacter* 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 *Campylobacter* 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。

本法は迅速・安価・簡便なスクリーニング法として開発を試みた。Shuttle 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。今後は臨床検体を用いた更なる検証や、食中毒事例における食品中からの細菌の検出を検討していきたい。

謝辞

貴重な菌株を分与いただいた山梨県食肉衛生検査所の諸氏に深謝いたします。

引用文献

- 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)
- 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，380-397 (2009)
- 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)
- 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)
- 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 Mi-*

- crobiol.*，**29**(1)，11-17 (2012)
- 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)
- 7 Christine C. Ginocchio *et al.*：Naturally Occurring Deletions in the Centisome 63 Pathogenicity Island of Environmental Isolates of *Salmonella* spp., *Infect. Immun.*，**65**，1267-1272 (1997)
- 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)
- 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>
- 10 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)
- 11 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の検討，*感染症学雑誌*，**79**，644-655 (2005)