

資料

## 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

山田 裕子, 桑山 勝\*, 重本 直樹, 谷澤 由枝, 松尾 健, 福田 伸治

### Simultaneous Detection and Visual Identification of Bacterial Emetic Toxin-related Genes by Multiplex PCR Assay with Fluorescent Quenching-based System

HIROKO YAMADA, MASARU KUWAYAMA\*, NAOKI SHIGEMOTO,

YUKIE TANIZAWA, TAKESHI MATSUO and SHINJI FUKUDA

(Received September 30, 2011)

黄色ブドウ球菌エンテロトキシンおよびセレウス菌セレウリドに起因する食中毒症状は類似しており、症状による区別は困難である。そこで、黄色ブドウ球菌 *sea*, *seb*, *sec*, *sed* および *see* 並びにセレウス菌 *ces* 遺伝子の6種類の嘔吐毒関連遺伝子を対象として、糞便検体から直接 DNA を抽出し、これらの遺伝子を蛍光標識プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法により同時増幅し、クエンチャーによる蛍光消光現象を利用して、反応後のチューブの蛍光色から増幅した遺伝子を迅速かつ簡便に検出・識別する方法を検討した。食中毒事例由来株および模擬糞便検体を用いて検証した結果、本法により、病原遺伝子を蛍光色で容易に検出・識別でき、その有用性が確認された。

Key words : 黄色ブドウ球菌, セレウス菌, 嘔吐毒関連遺伝子, 蛍光消光現象, 蛍光マルチプレックス PCR 法

## 緒 言

黄色ブドウ球菌およびセレウス菌は、菌が食品中で増殖する際に産生する毒素を摂取することにより発症する毒素型の細菌性食中毒起因菌であり、食品衛生上重要な菌種である。黄色ブドウ球菌の産生する食中毒原因毒素はブドウ球菌エンテロトキシン(SE)で、1990年代以降、多種の新型 SE の存在が明らかにされているが [1, 2], ブドウ球菌食中毒の95%程度は従来から知られている SEA, SEB, SEC, SED および SEE によるものである [3-8]。臨床症状は、嘔気および嘔吐を主徴とし、潜伏時間は約1~5時間である [9]。我が国におけるブドウ球菌による食中毒は近年減少傾向にあるが、2000年には乳製品を原因とする大規模な事件が発生し [10], ブドウ球菌食中毒が食品衛生上重要であることが再認識された。また、セレウス菌による食中毒には、症状により嘔吐型と下痢型の2種類が存在するが、我が国における食中毒のほとんどは嘔吐型である [11, 12]。嘔吐型はセレウス菌の産生するセレウリド(嘔吐毒)を原因とし、喫食後1~5時間で悪心、嘔吐が起こる [12]。その症

状は黄色ブドウ球菌食中毒と酷似しており、症状や経過から両者を区別することは困難である。セレウス菌による食中毒事件はそれほど多くはないが、これまでに患者数100名以上の大規模な事例が発生しており [13], セレウス菌も食中毒起因菌として重要である。

食中毒発生時には、原因究明のため、推定原因食品、患者の吐物および糞便等からの迅速な病因物質の検出が求められる。黄色ブドウ球菌またはセレウス菌による食中毒と判定するためには、それぞれ分離菌の SE 産生性、セレウリド産生性の確認が必要である。しかし、従来の培養法では検体から菌を分離後にこれらの毒素検査を実施するため、判定までに少なくとも2~3日を要する。黄色ブドウ球菌の多種類の SE 遺伝子を同時検出するためのマルチプレックス PCR 法の報告は数多くみられるが [14-16], これらは分離菌からの検出を目的としているため、検査時間の大幅な短縮は望めない。また、黄色ブドウ球菌およびセレウス菌を含む多種類の細菌の同時検出法も報告されているが [17, 18], これはリアルタイム PCR 装置などの高価な機器を必要とする。

我々は、先に、蛍光標識プライマーを用いた RT-マルチプレックス PCR 法により、糞便検体から細菌およ

\* 現広島県西部畜産事務所 : Present Address, Hiroshima Prefectural Western Office of Livestock Industry

びウイルスの食中毒起因微生物を1日程度で簡便に検出する包括的検査法 [19] およびノロウイルス遺伝子グループIおよびII 遺伝子を蛍光標識プライマーを用いたRT-LAMP法により同時増幅し、クエンチャーによる蛍光消光現象を利用して、両者を迅速かつ簡便に検出・識別する方法を確立した [20]。本報では、これらの方法を応用し、黄色ブドウ球菌のSE (SEA ~ SEE) およびセレウス菌のセレウリドの6種類の嘔吐毒に関連する遺伝子を対象として、糞便検体から直接これらを蛍光マルチプレックスPCR法により同時増幅し、反応後のチューブの蛍光色から、簡便に黄色ブドウ球菌とセレウス菌を検出・識別する方法を検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1 供試サンプル

食中毒事例由来のSE 遺伝子保有黄色ブドウ球菌5株、セレウリド合成酵素遺伝子保有セレウス菌2株を用いた。模擬検体は、健康人の糞便にこれらの一夜培養菌液を添加してリン酸緩衝生理食塩水により10%乳剤に調製した。検体に含まれる菌量は、添加した菌液の生菌数を標準寒天培地 (日水製薬) を用いて塗抹平板培養法により測定し、算出した。

### 2 DNA抽出

各菌株の一夜培養菌液および10%乳剤に調製した模擬検体からのDNA抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、キット添付のプロトコールを一部改変して実施した。すなわち、サンプルをボルテックスミキサーで30秒間激しく攪拌して室温で1分間静置後、上清160μlをBuffer AVL 640μlに加えて15秒間ボ

ルテックスし、室温で10分間静置した。そして、6,000 × gで3分間遠心分離した上清700μlを用い、以降の操作手順は添付プロトコールに従った。

### 3 蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックスPCR法

蛍光マルチプレックスPCR反応は、表1に示したとおり、黄色ブドウ球菌は *sea*, *seb*, *sec*, *sed* および *see* の5種類のSE 遺伝子、セレウス菌はセレウリド合成酵素遺伝子 *ces* [21, 22] の計6種類を標的遺伝子として、Beckerら [14] および Ehling-Schulzら [23] のプライマーと Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa) を用いて行った。なお、黄色ブドウ球菌およびセレウス菌の嘔吐毒関連遺伝子を検出する上流側プライマーは、それぞれ Alexa Fluor 594 (赤) および Alexa Fluor 488 (緑) で蛍光標識して用いた。PCR 反応組成は、Multiplex PCR mix 1を0.25μl, Multiplex PCR mix 2を25μl および表1に示した最終濃度のプライマーを含む反応液に、抽出したDNAをテンプレートとして5μl添加し、全量50μlとした。反応条件は、94℃で60秒間初期変性後、94℃で30秒間、57℃で90秒間、72℃で90秒間を40サイクルとした。反応終了後のチューブに、表2に示した蛍光標識プライマーと相補配列を有する100μM濃度のクエンチャー標識オリゴヌクレオチド6種類をそれぞれ2μlずつに加え、UVトランスイルミネーターにより312nmの紫外線を反応チューブに照射して蛍光色を観察した。また、この反応液10μlを3%アガロースゲルで電気泳動後、UVトランスイルミネーターにより、増幅バンドの蛍光色と大きさから6種類の嘔吐毒関連遺伝子を確認した。

表1 蛍光マルチプレックスPCR法に用いたプライマーと標識蛍光物質

対象病原体	標的遺伝子	プライマー名	配列 (5'-3')	5'-標識蛍光物質	最終濃度 (μM)	増幅長 (bp)	文献
黄色ブドウ球菌	<i>sea</i>	SEA-3	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG	Alexa594(赤)	0.1	127	14
		SEA-4	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC				
	<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACCTGACAAACG	Alexa594(赤)	0.2	477	14
		SEB-4	GCAGTACTCTATAAGTGCCCTGC				
	<i>sec</i>	SEC-3	CTCAAGAACTAGACATAAAAAGCTAGG	Alexa594(赤)	0.2	271	14
		SEC-4	TCAAAATCGGATTAACATTATCC				
	<i>sed</i>	SED-3	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	Alexa594(赤)	0.2	319	14
		SED-4	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC				
<i>see</i>	SEE-3	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	Alexa594(赤)	0.2	178	14	
	SEE-2	TAACTTACCGTGGACCCCTTC					
セレウス菌	<i>ces</i>	EM1F	GACAAGAGAAATTTCTACGAGCAAGTACAAT	Alexa488(緑)	0.2	635	23
		EM1R	GCAGCCTTCCAATTACTCCTTCTGCCACAGT				

表2 クエンチャー標識オリゴヌクレオチド配列

オリゴヌクレオチド名	配列 (5'-3')	3'-標識クエンチャー
BHQ2-SEA-3	CGTTTTAACCCTTTCCAAAGG	BHQ2
BHQ2-SEB-1	CGTTTGTTCAGTTTGATGCGA	BHQ2
BHQ2-SEC-3	CCTAGCTTTTATGTCTAGTTCTTGAG	BHQ2
BHQ2-SED-3	CGTTTAAAGGAGATATTACCAAACTAG	BHQ2
BHQ2-SEE-3	GCTTGTTTTAACTTTATCTATAGGTACTG	BHQ2
BHQ1-EM1F	ATTGTACTTGCTCGTAGAAATTTCTCTTGTC	BHQ1

#### 4 スタンダード DNA の作製

表1に示したプライマーを用いて増幅したPCR産物を、それぞれ QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN) を用いて pDrive Cloning Vector (QIAGEN) に挿入し、*Escherichia coli* DH5a にプラスミド DNA として組み込んだ。そして、一夜増菌培養し、MonoFas プラスミド抽出キット III (GL Sciences) を用いてプラスミド DNA を精製後、コピー数を算出した。

#### 5 検出限界の測定

$10^8$  から  $10^2$  コピー/μl まで10倍段階希釈したスタンダード DNA をテンプレートとして蛍光マルチプレックス PCR 反応を行った。そして、クエンチャー標識オリゴヌクレオチドを添加し、蛍光消光現象による反応チューブの蛍光色の変化および電気泳動による蛍光バンドの有無を指標として、目的の蛍光色が観察される限界を測定した。

#### 6 リアルタイム PCR 法による模擬検体中の遺伝子コピー数の定量

LightCycler480システム (Roche Diagnostics), SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) および作製したスタンダード DNA を用いて、インターカレーター法により、模擬検体の遺伝子コピー数を測定した。リアルタイム PCR 反応は95℃で10秒間初期変性後、95℃で10秒間、56℃ (*seb* および *sed* は50℃) で10秒間、72℃で14秒間を50サイクル行い、50℃で30秒間クーリングした。

## 結 果

#### 1 蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックス PCR 法による食中毒事例由来株からの嘔吐毒関連遺伝子の検出

検出対象とした嘔吐毒関連遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌4株およびセレウス菌2株について、蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックス PCR 法により SE 遺伝子 (*sea* ~ *see*) およびセレウリド合成酵素遺伝子 (*ces*) の検出を試みた。*see* については保有する菌株

が得られなかったため、*see* 遺伝子の配列を有するスタンダード DNA を用いて同様に実施した。各菌株から抽出した DNA をテンプレートとして蛍光マルチプレックス PCR 反応を実施し、直後の反応チューブに312nmの紫外線を照射すると、すべて橙色の蛍光色が観察されたが [図1 (A)], 各チューブにクエンチャー標識オリゴヌクレオチドを添加すると、図1 (B)に示したとおり、黄色ブドウ球菌 SE 遺伝子保有株は Alexa Fluor 594の赤色蛍光、セレウス菌セレウリド合成酵素遺伝子保有株は Alexa Fluor 488の緑色蛍光、陰性対照は無色を示し、反応チューブの蛍光色から、目視で黄色ブドウ球菌とセレウス菌の識別が可能であった。そして、これらのチューブ内の反応液を電気泳動したところ、各菌株が保有する *sea* ~ *see* および *ces* 遺伝子の増幅バンドはそれぞれ対応する大きさと蛍光色を示し、6種類の遺伝子の識別が可能であった [図1 (C)]。

#### 2 各病原因子の検出限界の測定

スタンダード DNA を用いて、蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックス PCR 法による嘔吐毒関連遺伝子の検出限界を測定した。その結果、検出限界は反応あたり *sea* で  $10^6$  コピー、*seb* で  $10^7$  コピー、*sec* で  $10^6$  コピー、*sed* で  $10^6$  コピー、*see* で  $10^4$  コピー、*ces* で  $10^6$  コピーであった。

#### 3 模擬糞便検体を用いた検証

蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックス PCR 法による模擬検体からの標的遺伝子の検出結果と、検体 (10%乳剤) に含まれる菌量および反応あたりの DNA 遺伝子コピー数を表3に示した。蛍光マルチプレックス PCR 反応後、クエンチャー標識オリゴヌクレオチドを添加すると、蛍光消光現象により、黄色ブドウ球菌 *sea* ~ *see* 遺伝子保有株を含む検体はすべて赤色蛍光、セレウス菌 *ces* 遺伝子保有株を含む検体はすべて緑色蛍光が検出された。さらに、電気泳動により、各検体に含まれる菌株が保有する *sea* ~ *sed* および *ces* 遺伝子に対応する大きさおよび蛍光色のバンドが確認された。また、複数の SE 遺伝子を保有する株を添加した模擬検体につい

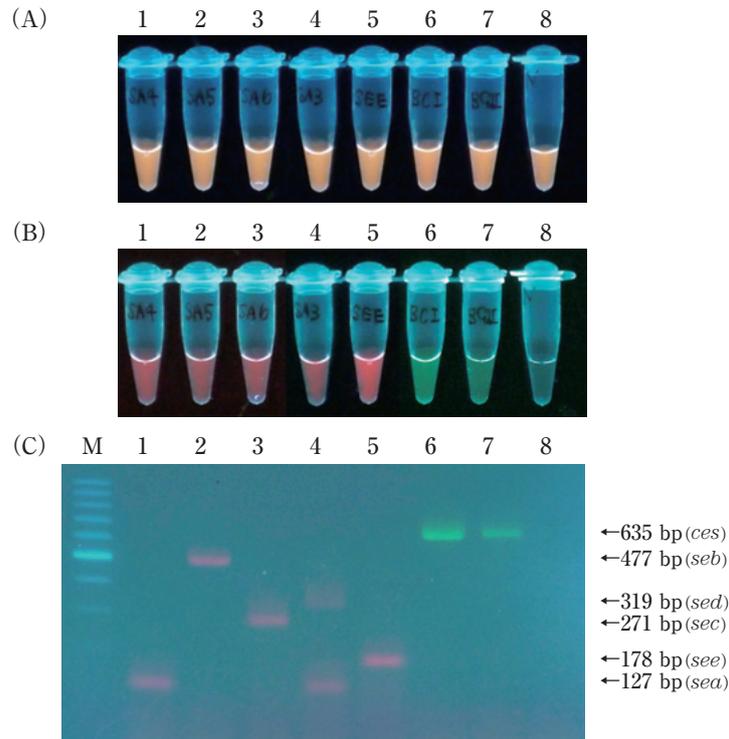


図1 蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックスPCR法による黄色ブドウ球菌およびセレウス菌の嘔吐毒関連遺伝子の検出

(A) 蛍光マルチプレックスPCR反応直後 (B) クエンチャー標識オリゴヌクレオチド添加後  
 (C) 電気泳動像 (いずれも UV312nm 照射)  
 1: 黄色ブドウ球菌 (*sea* 保有株). 2: 黄色ブドウ球菌 (*seb* 保有株). 3: 黄色ブドウ球菌 (*sec* 保有株). 4: 黄色ブドウ球菌 (*sea* および *sed* 保有株). 5: *see* 保有プラスミド. 6: セレウス菌 (*ces* 保有株). 7: セレウス菌 (*ces* 保有株). 8: 陰性対照. M: 100 bp DNA Ladder

表3 模擬検体からの蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックスPCR法による標的遺伝子の検出

検体	添加菌株の保有遺伝子	菌量* (cfu/ml)	DNA遺伝子コピー数 (コピー/反応)	蛍光消光現象後の蛍光色	電気泳動による遺伝子識別
1	<i>sea</i>	$1.3 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^7$	赤	<i>sea</i>
2	<i>seb</i>	$6.0 \times 10^{10}$	$1.7 \times 10^8$	赤	<i>seb</i>
3	<i>sec</i>	$7.5 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^7$	赤	<i>sec</i>
4	<i>sea, sec</i>	$2.1 \times 10^9$	$1.3 \times 10^7$	赤	<i>sea, sec</i>
5	<i>sea, sed</i>	$9.5 \times 10^{10}$	$1.1 \times 10^8$	赤	<i>sea, sed</i>
6	<i>ces</i>	$7.5 \times 10^7$	$3.8 \times 10^7$	緑	<i>ces</i>
7	<i>ces</i>	$1.3 \times 10^{10}$	$6.4 \times 10^7$	緑	<i>ces</i>

\*10%乳剤中に含まれる生菌数

でも保有する遺伝子がすべて検出された。模擬検体10%乳剤中に含まれる菌量は $10^7$ から $10^{10}$ オーダー (cfu/ml) で、反応あたりのDNA 遺伝子コピー数は $10^7$ から $10^8$ オーダーであった。なお、全工程に要した検査時間は5~6時間であった。

## 考 察

黄色ブドウ球菌およびセレウス菌は食品衛生上重要な食中毒起因菌であり、いずれも短い潜伏時間と嘔吐を特徴とすることから、症状による区別は困難である。今

回我々は、黄色ブドウ球菌 *sea* ~ *see* およびセレウス菌 *ces* 遺伝子の6種類の嘔吐毒関連遺伝子を対象として、糞便検体から、これらの遺伝子を同時増幅し、クエンチャーによる蛍光消光現象を利用して、反応後のチューブの蛍光色から迅速・簡便に黄色ブドウ球菌およびセレウス菌の遺伝子を検出・識別する方法を確立した。食中毒事例由来株を用いて本法を検証したところ、黄色ブドウ球菌は赤色蛍光、セレウス菌は緑色蛍光が目視で確認でき、1チューブで容易に黄色ブドウ球菌とセレウス菌の検出・識別が可能であった。通常、マルチプレックスPCR法などにより複数の標的遺伝子を同時検出する場合には、遺伝子増幅後に電気泳動などの追加操作を行い、どの遺伝子が増幅したかを確認する必要がある。一方、先に報告したように [20]、今回利用した蛍光消光現象による標的遺伝子の検出・識別方法は、蛍光標識したプライマーを用いて遺伝子増幅を行った後、これらのプライマーと相補配列を有するクエンチャー標識オリゴヌクレオチドを加えるのみで、複数の遺伝子を視覚的に、迅速かつ簡易に、しかも同時に検出・識別することが可能である [「標的核酸の検出・識別方法」として特許出願中 (特願2011-134800)]。これは、遺伝子増幅に用いられなかった蛍光標識プライマーの蛍光をクエンチャーにより消光させ、増幅された遺伝子に対応する蛍光色のみを発光させることにより標的核酸を検出・識別する方法である。今回は黄色ブドウ球菌の検出に同じ蛍光色を標識したプライマーを用いたため、反応チューブの蛍光色のみではどのSE遺伝子が増幅したか判別はできないが、赤色を呈したSE遺伝子陽性の反応液を電気泳動することにより、その増幅バンドの大きさから、検出対象とした5種類のSE遺伝子を識別可能であった。

また、この方法では、蛍光色により増幅バンドを確認でき、電気泳動後に核酸染色を必要としないため、迅速性と簡便性に優れていた。今回は黄色ブドウ球菌とセレウス菌の鑑別を主な目的としたため、SEの毒素型の把握には電気泳動による確認が必要であるが、SE遺伝子の種類ごとに異なる蛍光色をプライマーに標識することにより、電気泳動を行うことなく、反応チューブの蛍光色のみで毒素型の識別が可能となる。さらに、多種の新型SE遺伝子の同時検出へ拡張することも可能である。

スタンダードDNAを用いた本法による標的遺伝子の検出限界は、反応あたり $10^4$ から $10^7$ コピーであった。食中毒急性期の患者糞便には $10^3$ ~ $10^8$ cfu/g程度排菌されるため [17]、多くの急性期患者からの検出には問題ないと思われるが、排菌量が少ない場合もあるので、検出感度の向上が今後の課題である。

次に、各嘔吐毒関連遺伝子を保有する菌株を添加した模擬糞便検体を用いて本法を検証したところ、いずれの検体からも菌株が保有する遺伝子が検出され、糞便検体

からの検出に応用可能であることが確認された。模擬糞便検体中に含まれる菌量は $10^7$ から $10^{10}$ オーダー (cfu/ml) で、反応あたりのDNA遺伝子コピー数は $10^7$ から $10^8$ オーダーであった。菌量と遺伝子コピー数を単純に比較することはできないが、このことは、少なくとも糞便検体から問題なくDNAが抽出されていることを示す結果であると考えられる。ブドウ球菌などのグラム陽性菌からのDNA抽出は容易ではないことが報告されており [24]、今回用いたQIAamp Viral RNA Mini KitはウイルスRNA抽出用キットであるが、プロトコールを一部改変することにより、黄色ブドウ球菌およびセレウス菌のDNAが抽出可能であった。

本法は我々が先に確立した、糞便検体から食中毒起因微生物であるウイルスおよび細菌を包括的に検出する検査法 [19] に準じて実施しているため、これに黄色ブドウ球菌およびセレウス菌を対象微生物として加えることは容易である。食中毒起因微生物をより広範囲に、しかも迅速に検出することは食中毒原因究明および拡大防止に寄与すると考えられる。

本法により、糞便検体から直接黄色ブドウ球菌およびセレウス菌の嘔吐毒関連遺伝子を5~6時間で迅速に検出することが可能となり、培養法で2~3日を要する黄色ブドウ球菌およびセレウス菌の検査時間が大幅に短縮された。今回は模擬糞便検体を用いた検証のみしか実施していないため、今後、患者糞便あるいは嘔吐物検体を用いた実証試験と検出感度の検討を実施することが必要であるが、本法は、短い潜伏時間と嘔吐症状を特徴とする食中毒発生時の起因微生物の迅速なスクリーニング法として有用であると考えられる。

## 結 語

食中毒症状の類似する黄色ブドウ球菌およびセレウス菌の嘔吐毒関連遺伝子を、糞便検体から、クエンチャーによる蛍光消光現象を利用した蛍光マルチプレックスPCR法により迅速かつ簡便に検出する方法を確立した。本法は、食中毒発生時の起因微生物の迅速スクリーニングの一法としての利用が期待される。

## 文 献

- [1] 重茂克彦. ブドウ球菌エンテロトキシン研究の最近の進展. 食品衛生. 2005;51(4):81-90.
- [2] Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B, Cozon G, Echasserieau K, Etienne J, Gougeon M-L, Lina G, Vandenesch F. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within

- the enterotoxin gene cluster. *Infect Immun.* 2006;74(8):4724-4734.
- [ 3 ] 五十君静信. *Staphylococcus*. 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; 2009. p. 424-438.
- [ 4 ] Casman EP. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *J Bacteriol.* 1960;79: 849-856.
- [ 5 ] Bergdoll MS, Surgalla MJ, Dack GM. Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *J Immunol.* 1959;83(3): 334-338.
- [ 6 ] Bergdoll MS, Borja CR, Avena RM. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J Bacteriol.* 1965;90(5):1481-1485.
- [ 7 ] Casman EP, Bennett RW, Dorsey AE, Issa JA. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J Bacteriol.* 1967;94: 1875-1882.
- [ 8 ] Bergdoll MS, Borja CR, Robbins RN, Weiss KF. Identification of enterotoxin E. *Infect Immun.* 1971;4:593-595.
- [ 9 ] 寺山武. *Staphylococcus aureus* 食中毒. 坂崎利一編集. 新訂食水系感染症と細菌性食中毒. 中央法規出版; 2000. p. 454-472.
- [10] 雪印食中毒事件厚生省・大阪市原因究明合同専門家会議. 雪印乳業食中毒事件の原因究明調査結果について. 病原微生物検出情報. 2000;22:188-190.
- [11] 河合高生, 浅尾努. *Bacillus cereus*. 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; 2009. p. 439-455.
- [12] 品川邦汎. *Bacillus cereus*. 坂崎利一編集. 新訂食水系感染症と細菌性食中毒. 中央法規出版; 2000. p. 473-491.
- [13] 柳川義勢. セレウス菌感染症. IDWR 感染症週報: 感染症発生動向調査. 2003; 5(5):9-11.
- [14] Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2548-2553.
- [15] Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D-L, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):857-862.
- [16] Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol.* 1999;37(10):3411-3414.
- [17] 福島博, 角森ヨシエ. 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. 2005;79(9):644-655.
- [18] Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5134-5146.
- [19] 重本直樹, 谷澤由枝, 山田裕子, 松尾健, 福田伸治. 蛍光 RT-multiplex PCR 法を用いた食中毒起因微生物の包括的検出. 日本食品微生物学会雑誌. (印刷中)
- [20] 山田裕子, 桑山勝, 重本直樹, 谷澤由枝, 松尾健, 福田伸治. 蛍光消光現象を利用した Duplex RT-LAMP 法によるノロウイルス遺伝子グループ I および II の同時検出および識別. 日本食品微生物学会雑誌. 2011;28(4):226-231.
- [21] Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Martlbauer E, Scherer S. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(1):105-113.
- [22] Ehling-Schulz M, Fricker M, Grallert H, Rieck P, Wagner M, Scherer S. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol.* 2006;6(20). doi:10.1186/1471-2180-6-20.
- [23] Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;232:189-195.
- [24] 藤本秀士, 中上佳子, 小島夫美子. 細菌 DNA 分離におけるピーズ法の応用. 九州大学医学部保健学科紀要. 2004;(3):33-38.