

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5224541号
(P5224541)

(45) 発行日 平成25年7月3日(2013.7.3)

(24) 登録日 平成25年3月22日(2013.3.22)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 Q 1/68 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 Q 1/68 A

請求項の数 8 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2009-215692 (P2009-215692)
 (22) 出願日 平成21年9月17日 (2009.9.17)
 (65) 公開番号 特開2011-62136 (P2011-62136A)
 (43) 公開日 平成23年3月31日 (2011.3.31)
 審査請求日 平成23年8月10日 (2011.8.10)

特許法第30条第1項適用 動物衛生研究成果情報 No. 8 (平成21年8月31日) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所発行第5~6ページに発表

(73) 特許権者 501203344
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
 茨城県つくば市観音台3-1-1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】Salmonella Hadarを検出するためのオリゴヌクレオチドとそれらを用いた血清型迅速同定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致したときに、被検サルモネラの血清型がSHであると判定される方法；

(a) 血清型がSHである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、少なくとも下記(i)又は(ii)に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類； 10

(i) 下記(1)から(3)に記載のセット

(1) 配列番号：9に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：10に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(2) 配列番号：11に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：12に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(3) 配列番号：13に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：14に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(ii) 下記(1)から(4)に記載のセット

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：2に 20

記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(2) 配列番号：9に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：10に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(3) 配列番号：11に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：12に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(4) 配列番号：13に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：14に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット。

【請求項2】

PCRがマルチプレックスPCRである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

以下(5)から(7)に記載の3組のセット：

(5) 配列番号：9に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：10に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(6) 配列番号：11に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：12に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(7) 配列番号：13に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：14に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット。

【請求項4】

以下(1)及び(5)から(7)に記載の4組のセット：

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：2に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(5) 配列番号：9に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：10に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(6) 配列番号：11に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：12に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(7) 配列番号：13に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：14に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット。

【請求項5】

請求項3または4に記載のセットを含むサルモネラの血清型判別用キット。

【請求項6】

血清型SHのサルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、請求項3または請求項4に記載されるセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるDNA断片。

【請求項7】

PCRがマルチプレックスPCRである、請求項6に記載のDNA断片。

【請求項8】

以下(1)から(10)を含むセット：

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：2に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(2) 配列番号：3に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：4に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(3) 配列番号：5に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：6に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(4) 配列番号：7に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：8に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(5) 配列番号：9に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：10に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(6) 配列番号：11に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：12に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(7) 配列番号：13に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：14に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット

10

20

30

40

50

(8) 配列番号：15に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：16に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(9) 配列番号：17に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：18に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(10) 配列番号：19に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：20に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血清型特異的遺伝子の多重検出によるサルモネラ血清型の迅速同定法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

サルモネラ感染は家畜生産の阻害要因であるのみならず、畜産物を介してヒトに食中毒を起こすことから、公衆衛生上の脅威ともなっている。サルモネラは飼料を介して家畜に伝播するため、飼料安全法で有害微生物と規定されている。このため、農林水産消費安全技術センター・肥飼料安全検査部では飼料のサルモネラ汚染のモニタリング調査を継続的に実施している。分離されたサルモネラが、家畜伝染病予防法で「家畜伝染病」または「届出伝染病」と規定される主要6血清型 (Gallinarum、Typhimurium、Dublin、Enteritidis、Choleraesuis、Abortusequi) であるか否かでその後の対応が異なるため、血清型の特定が必須であるが、現行のサルモネラ血清型別法では判定までに約2週間を必要とする。このため、飼料から上記6血清型のサルモネラが検出されても、その判定結果が出るまでに当該飼料が消費されてしまう可能性が高い。また、2004年にと畜場法が改正され、監視伝染病に含まれる病原体が分離された場合、枝肉を全廃棄することが明記された。このため、食肉衛生検査所では、肉眼病変の認められた材料について上記6血清型が分離されるか否かを検査する必要性が生じた。検査結果が出るまでに約2週間を必要とし、この間、枝肉を保留する必要があるため、公衆衛生上大きな問題となっている。以上のことから、飼料検査及び食肉衛生検査の現場で、主要なサルモネラ血清型の迅速同定法開発が強く求められている。人や家畜から分離される主要なサルモネラ血清型の迅速同定法が実用化されれば、家畜保健衛生所における日常検査、血清型別不能菌の同定、スクリーニング検査等へも応用可能であり、畜産物の安全・安心を確保する上で極めて有効なツールとなる。 20 30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2007-274934

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Kim H.J. et al. 2006. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella* serovars. J. Food Prot. 69: 1653-1661. 40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

サルモネラは生化学的性状、DNAの相同性等から1属2菌種6亜種に分類されている。この国際命名規約上の分類とは別にサルモネラでは菌体(O)抗原と鞭毛(H)抗原の組み合わせによる血清型分類が早くから確立しており、現在までに2,500を越す血清型が報告されている。通常、サルモネラの分離、同定に1週間、さらに血清型別を行うと1週間、すなわち血清型の特定までに合計2週間を必要とする。

農林水産消費安全技術センターや各県の食肉衛生検査所では1週間でサルモネラを分離 50

、同定し、0群血清型まで決定している。本発明者らは、この時点でPCR法等の手法を併用し、血清型に特異的な遺伝子を検出することで、従来2週間を要していた検査時間を1週間に短縮することが可能と考えた。即ち本発明は、サルモネラを検出するためのオリゴヌクレオチドとそれらを用いた血清型迅速同定法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

2,500を超えるサルモネラ血清型のうち、1,500以上の血清型が亜種Iに分類され、この中に人や家畜にしばしば感染症を引き起こす血清型のほとんどが含まれる。したがって我々が日常遭遇するサルモネラは互いに遺伝的類似度が極めて高く、これが塩基配列の違いを利用した血清型判定法開発の障壁となってきた。一方、細菌の全ゲノム塩基配列の最初の報告から10年以上が経過し、配列の報告された細菌は数百にのぼる。サルモネラでも、すでに20を超える菌株の全ゲノム塩基配列が参照可能である。10

そこで本発明では、サルモネラ主要血清型に特異的な遺伝子を in silico (コンピューター上) で網羅的に抽出し、本発明者らが所有している3,700株を超えるサルモネラ野外分離株を利用して、その特異性を検証することにより、PCR法を応用したサルモネラ血清型の迅速同定法開発を試みた。

【0007】

具体的には in silico での比較ゲノム解析により血清型 *Salmonella Typhimurium* (ST) 、 *Salmonella Hadar* (SH) 、 *Salmonella Infantis* (SI) の3血清型に特異性の高い遺伝子を、それぞれ3つ選び出した。これらの遺伝子とサルモネラ属特異的であることが公知である invA の4遺伝子を同時に検出するマルチプレックスPCRの系を確立した。上記3血清型同定法としてのマルチプレックスPCR法の特異性を、野外分離株を用いて検証したところ、当該血清型であれば3つの血清型特異的遺伝子全てが増幅されるが、他の血清型で3遺伝子陽性となる例は一部の例外を除いて認められなかった。つまり本発明の方法は十分な特異性を有していることが示された。サルモネラが分離された時点でのマルチプレックスPCR法を用いることにより、これら3血清型を分離培養開始から1週間で同定することが可能となった。20

【0008】

本発明はこのような知見に基づくものであり、より詳細には、以下の〔1〕から〔24〕に記載の発明に関する。30

〔1〕以下(1)から(10)に記載のいずれか1組のセット；

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：2に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(2) 配列番号：3に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：4に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(3) 配列番号：5に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：6に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(4) 配列番号：7に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：8に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(5) 配列番号：9に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：10に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、40

(6) 配列番号：11に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：12に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(7) 配列番号：13に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：14に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(8) 配列番号：15に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：16に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(9) 配列番号：17に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：18に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(10) 配列番号：19に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号 250

- 0に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット。
 [2] [1]の(2)から(4)に記載の3組のセット。
 [3] [1]の(5)から(7)に記載の3組のセット。
 [4] [1]の(8)から(10)に記載の3組のセット。
 [5] [1]の(2)から(7)に記載の6組のセット。
 [6] [1]の(2)から(4)及び(8)から(10)に記載の6組のセット。
 [7] [1]の(5)から(10)に記載の6組のセット。
 [8] [1]の(2)から(10)に記載の9組のセット。
 [9] [1]の(1)から(4)に記載の4組のセット。
 [10] [1]の(1)及び(5)から(7)に記載の4組のセット。 10
 [11] [1]の(1)及び(8)から(10)に記載の4組のセット。
 [12] [1]の(1)から(7)に記載の7組のセット。
 [13] [1]の(1)から(4)及び(8)から(10)に記載の7組のセット。
 [14] [1]の(1)及び(5)から(10)に記載の7組のセット。
 [15] [1]の(1)から(10)に記載の10組のセット。
 [16] [1]から[15]のいずれかに記載のセットを含むサルモネラの血清型判別用キット。
 [17] 以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致したときに、被検サルモネラの血清型がSTであると判定される方法； 20
 (a) 血清型がSTである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、少なくとも[2]又は[9]に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び
 (b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。
 [18] 以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致したときに、被検サルモネラの血清型がSHであると判定される方法； 30
 (a) 血清型がSHである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、少なくとも[3]又は[10]に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び
 (b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。
 [19] 以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致したときに、被検サルモネラの血清型がSIであると判定される方法； 40
 (a) 血清型がSIである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、少なくとも[4]又は[11]に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び
 (b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。
 [20] PCRがマルチプレックスPCRである、[17]～[19]のいずれかに記載の方法。
 [21] 血清型STのサルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、[1]の(1)から(4)からなる群より選択される少なくとも1組のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるDNA断片。 50
 [22] 血清型SHのサルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、[1]の(1)及び(5)から

(7) からなる群より選択される少なくとも1組のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるDNA断片。

[23] 血清型SIのサルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、[1]の(1)及び(8)から(10)からなる群より選択される少なくとも1組のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるDNA断片。

[24] PCRがマルチプレックスPCRである、[21]～[23]のいずれかに記載のDNA断片。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、サルモネラを検出するためのオリゴヌクレオチドとそれらを用いた血清型迅速同定法が開発された。従来、サルモネラの血清型特定には2週間程度の時間を要していたため、血清型が特定される前に検査対象である飼料や食肉が消費されてしまう危険性があった。本発明を利用することにより、サルモネラの血清型特定に要する時間を1週間以上短縮することが可能であるため、このような危険性を回避することが可能である。10

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】マルチプレックスPCR法による血清型STの同定を示す写真である。Lane 1, 100 bp DNA Ladder; Lane 2, T1; Lane 3, T2; Lane 4, T3; Lane 5, T4; Lane 6, S1; Lane 7, S2; Lane 8, S3; Lane 9, S420

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明者らは、*in silico*でサルモネラ血清型ST、SH、SIに特異的な遺伝子を解析したところ、これらの血清型に特異的な遺伝子を見出すことに成功した。また本発明者らは、これらの血清型を特異的に検出可能なマルチプレックスPCR用プライマーを見出すことに成功した。本発明はこのような知見に基づき、以下(1)から(10)に記載のいずれか1組のオリゴヌクレオチドのセットを提供する。

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：2に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(2) 配列番号：3に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：4に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、30

(3) 配列番号：5に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：6に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(4) 配列番号：7に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：8に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(5) 配列番号：9に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：10に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(6) 配列番号：11に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：12に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(7) 配列番号：13に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：14に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、40

(8) 配列番号：15に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：16に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(9) 配列番号：17に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：18に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット、

(10) 配列番号：19に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号20に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット。

【0012】

本発明において「含む」という文言の代わりに、「からなる」という文言を使用できる。50

【0013】

本発明のオリゴヌクレオチドのセットは、サルモネラの血清型の同定に用いるPCRプライマー、特にマルチプレックスPCR用のプライマーとして有用である。マルチプレックスPCRにより、一度に複数のPCR産物を検出することが可能である。

【0014】

例えば、サルモネラの血清型がSTであるか否かを判別するために用いられるオリゴヌクレオチドのセット（プライマーセット）としては、上記（1）から（10）からなる群より選択される少なくとも（2）から（4）に記載のセット、又は少なくとも（1）から（4）に記載のセットが例示できる。

【0015】

例えば、サルモネラの血清型がSHであるか否かを判別するために用いられるオリゴヌクレオチドのセット（プライマーセット）としては、上記（1）から（10）からなる群より選択される少なくとも（5）から（7）に記載のセット、又は少なくとも（1）及び（5）から（7）に記載のセットが例示できる。10

【0016】

例えば、サルモネラの血清型がSIであるか否かを判別するために用いられるオリゴヌクレオチドのセット（プライマーセット）としては、上記（1）から（10）からなる群より選択される少なくとも（8）から（10）に記載のセット、又は少なくとも（1）及び（8）から（10）に記載のセットが例示できる。

【0017】

例えば、サルモネラの血清型がSTであるか、SHであるか、またはそのいずれでもないかを判別するために用いられるオリゴヌクレオチドのセット（プライマーセット）としては、上記（1）から（10）からなる群より選択される少なくとも（2）から（7）に記載のセット、又は少なくとも（1）から（7）に記載のセットが例示できる。20

【0018】

例えば、サルモネラの血清型がSTであるか、SIであるか、またはそのいずれでもないかを判別するために用いられるオリゴヌクレオチドのセット（プライマーセット）としては、上記（1）から（10）からなる群より選択される少なくとも（2）から（4）及び（8）から（10）に記載のセット、又は少なくとも（1）から（4）及び（8）から（10）に記載のセットが例示できる。

【0019】

例えば、サルモネラの血清型がSHであるか、SIであるか、またはそのいずれでもないかを判別するために用いられるオリゴヌクレオチドのセット（プライマーセット）としては、上記（1）から（10）からなる群より選択される少なくとも（5）から（10）に記載のセット、又は少なくとも（1）及び（5）から（10）に記載のセットが例示できる。30

【0020】

例えば、サルモネラの血清型がSTであるか、SHであるか、SIであるか、またはそのいずれでもないかを判別するために用いられるオリゴヌクレオチドのセット（プライマーセット）としては、上記（1）から（10）からなる群より選択される少なくとも（2）から（10）に記載のセット、又は（1）から（10）に記載のセットが例示できる。40

【0021】

すなわち本発明は、上記（1）から（10）に記載のいずれか1組のセットに加え、以下（A）から（N）に記載のセットを提供する。

- (A) 上記（2）から（4）に記載の3組のセット。
- (B) 上記（5）から（7）に記載の3組のセット。
- (C) 上記（8）から（10）に記載の3組のセット。
- (D) 上記（2）から（7）に記載の6組のセット。
- (E) 上記（2）から（4）及び（8）から（10）に記載の6組のセット。
- (F) 上記（5）から（10）に記載の6組のセット。
- (G) 上記（1）から（4）に記載の4組のセット。

- (H) 上記(1)及び(5)から(7)に記載の4組のセット。
- (I) 上記(1)及び(8)から(10)に記載の4組のセット。
- (J) 上記(1)から(7)に記載の7組のセット。
- (K) 上記(1)から(4)及び(8)から(10)に記載の7組のセット。
- (L) 上記(1)及び(5)から(10)に記載の7組のセット。
- (M) 上記(2)から(10)に記載の9組のセット。
- (N) 上記(1)から(10)に記載の10組のセット。

【0022】

なお上記(1)のセットをプライマーとするPCRにより、サルモネラ特異的遺伝子であるinvA遺伝子を検出することが出来る。すなわち上記(1)のセットは、被検菌がサルモネラであるか否かを検出する、又は被検菌がサルモネラであること確認するためのプライマーセットとして有用である。また上記(1)のセットはPCR反応の陽性コントロールとしても有用である。10

【0023】

また本発明は、サルモネラの血清型を同定するための試薬やサルモネラの血清型を同定するためのキットを提供する。このような試薬やキットには、少なくとも次の構成要素(i)が含まれる。

- (i) 上記(1)から(10)に記載の少なくとも1組のセット

【0024】

上記試薬やキットには、前記構成要素(i)に加え、さらに次のような付加的な要素(ii)又は(iii)を含むことができる。20

(ii) DNAポリメラーゼ：本発明の試薬やキットは、錆型依存性の相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼを含むことができる。PCRなどの公知の核酸合成反応に利用されている種々のDNAポリメラーゼは、本発明に利用することができる。

(iii) ヌクレオチド基質：本発明の試薬又やキットは、核酸の相補鎖合成反応の基質として利用されるヌクレオチド類を含むことができる。具体的には、dCTP、dGTP、dTTP、およびdATPの少なくとも一つ、通常はこれらの全て(dNTP)をキットに含むことができる。これらのヌクレオチド類は、天然の構造のみならず、誘導体を利用することができる。蛍光物質や結合性リガンドで修飾したヌクレオチド類が公知である。上記試薬やキットには、PCRによる増幅産物の有無や、PCRにより増幅されたPCR産物のサイズが記載された書類を添付することができる。また、PCRにより増幅されたPCR産物のサイズ情報を機械読み取り可能なデータとし、それを格納した記録媒体として、試薬やキットに加えることもできる。30

【0025】

例えば、被検サルモネラの血清型がSTであるか否かを同定するために用いられる試薬やキットとしては、上記(1)から(10)から選択される少なくとも(2)から(4)に記載のセット、又は少なくとも(1)から(4)に記載のセットを含む試薬やキットが例示できる。

【0026】

例えば、被検サルモネラの血清型がSHであるか否かを同定するために用いられる試薬やキットとしては、上記(1)から(10)から選択される少なくとも(5)から(7)に記載のセット、又は少なくとも(1)及び(5)から(7)に記載のセットを含む試薬やキットが例示できる。40

【0027】

例えば、被検サルモネラの血清型がSIであるか否かを同定するために用いられる試薬やキットとしては、上記(1)から(10)から選択される少なくとも(8)から(10)に記載のセット、又は少なくとも(1)及び(8)から(10)に記載のセットを含む試薬やキットが例示できる。

【0028】

例えば、被検サルモネラの血清型がSTであるか、SHであるか、又はそのいずれでもない50

かを判定するために用いられる試薬やキットとしては、上記(1)から(10)から選択される少なくとも(2)から(7)に記載のセット、又は少なくとも(1)から(7)に記載のセットを含む試薬やキットが例示できる。

【0029】

例えば、被検サルモネラの血清型がSTであるか、SIであるか、又はそのいずれでもないかを判定するために用いられる試薬やキットとしては、上記(1)から(10)から選択される少なくとも(2)から(4)及び(8)から(10)に記載のセット、又は少なくとも(1)から(4)及び(8)から(10)に記載のセットを含む試薬やキットが例示できる。

【0030】

例えば、被検サルモネラの血清型がSHであるか、SIであるか、又はそのいずれでもないかを判定するために用いられる試薬やキットとしては、上記(1)から(10)から選択される少なくとも(5)から(10)に記載のセット、又は少なくとも(1)及び(5)から(10)に記載のセットを含む試薬やキットが例示できる。

【0031】

例えば、被検サルモネラの血清型がST、SH、SIのいずれであるか、又はそれらのいずれでもないかを判定するために用いられる試薬やキットとしては、上記(1)から(10)から選択される少なくとも(2)から(10)に記載のセット、又は(1)から(10)に記載のセットを含む試薬やキットが例示できる。

【0032】

また本発明は、本発明のオリゴスクレオチドのセットのうち少なくとも1組のセットを用いたサルモネラの血清型の同定方法に関する。本発明において「少なくとも1組」には、3組、4組、6組、7組、8組、9組、又は10組の組み合わせが含まれる。すなわち本発明は、以下(I)から(VII)に記載のサルモネラの血清型の同定方法に関する。本発明においてPCRは、マルチプレックスPCR法であることが好ましい。

【0033】

(I)

以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致した場合に、被検サルモネラの血清型が対照サルモネラの血清型(ST)であると判定される方法。

(a) STである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される少なくとも(2)から(4)に記載のセット、又は少なくとも(1)から(4)に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。

【0034】

(II)

以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致した場合に、被検サルモネラの血清型が対照サルモネラの血清型(SH)であると判定される方法。

(a) SHである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される少なくとも(5)から(7)に記載のセット、又は少なくとも(1)及び(5)から(7)に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。

【0035】

10

20

30

40

50

(I I I)

以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致した場合に、被検サルモネラの血清型が対照サルモネラの血清型(SI)であると判定される方法。

(a) SIである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される少なくとも(8)から(10)に記載のセット、又は少なくとも(1)及び(8)から(10)に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。 10

【 0 0 3 6 】

(I V)

以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致した場合に、被検サルモネラの血清型が、PCR産物の種類が一致した対照サルモネラの血清型(ST又はSH)であると判定される方法。

(a) ST又はSHである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される少なくとも(2)から(7)に記載のセット、又は少なくとも(1)から(7)に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び 20

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。

【 0 0 3 7 】

(V)

以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致した場合に、被検サルモネラの血清型が、PCR産物の種類が一致した対照サルモネラの血清型(SH又はSI)であると判定される方法；

(a) SH又はSIである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される少なくとも(5)から(10)に記載のセット、又は少なくとも(1)及び(5)から(10)に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び 30

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。

【 0 0 3 8 】

(V I)

以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致した場合に、被検サルモネラの血清型が、PCR産物の種類が一致した対照サルモネラの血清型(ST又はSI)であると判定される方法； 40

(a) ST又はSIである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される少なくとも(2)から(4)及び(8)から(10)に記載のセット、又は少なくとも(1)から(4)及び(8)から(10)に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。

【 0 0 3 9 】

(V I I)

以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程において比較したPCR産物の種類が一致したときに、被検サルモネラの血清型が、PCR産物の種類が一致した対照サルモネラの血清型(ST、SH、又はSI)であると判定される方法。

(a) ST、SH、及びSIからなる群より選択される対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される少なくとも(2)から(10)に記載のセット、又は(1)から(10)に記載の10組のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。 10

【0040】

本発明の方法では、PCR産物の種類が一致した場合に、被検サルモネラの血清型が、PCR産物の種類が一致した対照サルモネラの血清型であると判定される。

また、PCR産物の種類が一致しない場合に、被検サルモネラの血清型が対照サルモネラの血清型ではないと判定される。

【0041】

本発明において「PCR産物の種類」とは、PCR産物の有無又は分子サイズによって分類されたPCR産物のパターンを意味し、「PCR産物の種類」は「PCRパターン」と表現することができる。 20

また「プライマーセット」は「プライマー対」と表現することも出来る。

また、例えば「配列番号：1に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、及び、配列番号：2に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドのセット」(上記(1)に記載のセット)は「配列番号：1に記載の塩基配列を含むプライマー、及び、配列番号：2に記載の塩基配列を含むプライマーからなるプライマーセット(プライマー対)」と表現することも出来る。本発明のその他のセット(上記(2)から(10)に記載のセット)も同じように表現することができる。

【0042】

本発明における「対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類」は「対照サルモネラの血清型に特異的なPCR産物の種類」と表現することもできる。 30

【0043】

本発明における対照サルモネラは、そのサルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される、本明細書に記載の特定のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類が検出されるサルモネラである。対照サルモネラとしては、例えば、ST、SH、SIからなる群より選択される少なくとも1つのサルモネラが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0044】

STの全ゲノム配列は、アクセション番号NC_003197で特定される配列として知られている。またSTの特徴は、「McClelland,M., Sanderson,K.E., Spieth,J., Clifton,S.W., Latreille,P., Courtney,L., Porwollik,S., Ali,J., Dante,M., Du,F., Hou,S., Layman,D., Leonard,S., Nguyen,C., Scott,K., Holmes,A., Grewal,N., Mulvaney,E., Ryan,E., Sun,H., Florea,L., Miller,W., Stoneking,T., Nhan,M., Waterston,R. and Wilson,R.K. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2, *Nature* 413 (6858), 852-856 (2001)」に開示されている。またSH及びSIの全ゲノム塩基配列情報はそれぞれ、<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Salmonella/HADAR.dbs>、<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Salmonella/SIN.dbs>で参照可能である。 40

【0045】

本発明において、被検サルモネラとしては、サルモネラの特徴を有する細菌、サルモネラの可能性がある細菌、遺伝的にサルモネラに近縁な細菌が例示できるが、これらに制限

10

20

30

40

50

されない。サルモネラはグラム陰性通性嫌気性桿菌であり、通常周毛によって運動するが、非運動性の血清型または変異菌株がある。すなわち本発明の被検サルモネラは、運動性の血清型及び非運動性の血清型または変異菌株を含む。また大部分の菌株は以下の性状を示す。本発明の被検サルモネラには、以下に示す特徴、性状を示すサルモネラが含まれる。

- ・ブドウ糖からガスを产生する。
- ・オキシダーゼ、インドール、フェニルアラニンデアミナーゼ陰性。
- ・リシンデカルボキシラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、硫化水素陽性の性状を示す。

【 0 0 4 6 】

10

またヒトや家畜にサルモネラが感染すると、感染したヒトや家畜はチフス症、敗血症、肺炎、流産、急性胃腸炎、下痢等の症状を示す。本発明の被検サルモネラには、ヒトや家畜にこのような症状を引き起こすサルモネラが含まれる。

【 0 0 4 7 】

サルモネラの血清型は生化学的性状、DNAの相同性等から、Salmonella entericaとSalmonella bongoriの1属2種とし、S. entericaの下に6亜種を設ける分類法によって分類される。本発明における「血清型」はKauffmann-Whiteの様式に従って菌体(O)抗原と鞭毛(H)抗原の組み合わせにより決定される血清型を意味する。参考文献としては9th edition Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars, 2007, Patrick A.D. Grimont & Francois-Xavier Weill (http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_2007.pdf)が挙げられる。

20

【 0 0 4 8 】

本発明における「同定」は、「型別」、「検出」、「識別」、「判別」、「特定」、「鑑定」、又は「判定」と表現することもできる。

【 0 0 4 9 】

また上記(I)から(VII)の発明は、以下のように表現することも出来る。以下に上記(I)の発明を例に示すが、(II)から(VII)の発明もまた同様に表現することが出来る。

以下(a)に記載のPCR産物、及び、以下(b)に記載のPCR産物の同一性を決定する工程を含む被検サルモネラの血清型を同定する方法であって、前記工程においてPCR産物が同一であったときに、被検サルモネラの血清型が対照サルモネラの血清型(ST)であると判定される方法。

30

(a) STである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される少なくとも(2)から(4)に記載のセット、又は少なくとも(1)から(4)に記載のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物であって、対照サルモネラに特異的なPCR産物、及び

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物。

PCR産物が同一である場合、対照サルモネラの血清型と被検サルモネラの血清型が同一であると判定される。

40

【 0 0 5 0 】

また上記(I)から(VII)の発明は、以下のように表現することも出来る。以下に上記(I)の発明を例に示すが、(II)から(VII)の発明もまた同様に表現することが出来る。

以下(a)に記載のPCR産物の種類、及び、以下(b)に記載のPCR産物の種類を比較する工程を含む、以下(b)に記載のPCR産物の種類が以下(a)に記載のPCR産物の種類と一致するか否かを判定する方法。

(a) STである対照サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される少なくとも(2)から(4)に記載のセット、又は少なくとも(1)から(4)に記載のセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類であって、対照サ

50

ルモネラに特異的なPCR産物の種類、及び

(b) 被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、(a)と同じセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類。

PCR産物の種類同士が一致すると判定された場合、対照サルモネラの血清型が被検サルモネラの血清型（例えばST）であると判定される。

【0051】

以下に本発明の方法を例示するが、これに限定されるものではない。

本発明においては、まず、ST、SH及びSIから選択される対照サルモネラそれぞれのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(10)からなる群より選択される、本明細書に記載の特定のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類を検出する（以下、PCR産物Xと称する）。次いで、血清型が未知の所望のサルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、対照サルモネラの場合と同一のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物の種類（以下、PCR産物Yと称する）を検出する。血清型が未知の所望のサルモネラを被検サルモネラとする。次いで、PCR産物XとPCR産物Yを比較する。比較したPCR産物が一致したときに、対照サルモネラの血清型が、被検サルモネラの血清型であると判定される。10

【0052】

具体的には、まず、上記(1)から(10)からなる群より選択される本明細書に記載の特定のセット（プライマーセット）を合成する。プライマーは、その塩基配列情報に従って化学的に合成することができる。任意の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成する方法が公知である。たとえば、オリゴヌクレオチドは、DNA合成装置(DNA synthesizer)によって合成することができる。具体的には、現在、ホスホロアミダイト法やホスホン酸エステル法などの原理に基づく、DNA合成装置が実用化されている。これらのDNA合成装置は、与えられた塩基配列にしたがって、固相上に、ヌクレオチドモノマーをひとつずつ化学的に連結する。全ての反応工程は自動化されていて、目的とする塩基配列情報を入力することで合成が開始される。したがって、このようなDNA合成装置に対して、設計したプライマーの塩基配列を与えることによって、目的とするDNAを合成することができる。20

【0053】

次いで、ST、SH及びSIから選択される対照サルモネラそれぞれについて、ゲノムDNAを鑄型とし、合成したプライマーセットを用いてPCRを行う。本発明においては、好ましくは、まず対照サルモネラのゲノムDNAの調製（ゲノムDNAの抽出）を行う。サルモネラからのゲノムDNAの抽出は、当業者においては一般的に公知の方法、例えば、セチルトリメチルアンモニウムプロミド(CTAB)法(Murray and Thompson, Nucleic Acids Research 8, p.4321 - 4325, 1980)等によって行うことができる。また、DNeasy(登録商標) Plant Mini Kit(QIAGEN)等を利用してゲノムDNAを抽出することができる。また、ゲノムDNAの抽出処理を行わず、例えば、直接細胞破碎液等を用いてPCRを実施することも可能である。30

PCR法としては、例えば、マルチプレックスPCR法が挙げられる。

【0054】

次いで、PCR産物の有無、又はPCRによって増幅されたPCR産物の分子サイズを測定する。PCR産物の有無、又はPCRによって増幅されたPCR産物の分子サイズの測定方法としては、当業者に周知の方法が挙げられる。ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる方法、アガロースゲル電気泳動を用いる方法、フラグメントアナライザーを用いる方法、マイクロチップ電気泳動装置(Multina, 島津)が例示できるが、これらに限定されるものではない。40

【0055】

PCR産物の分子サイズを測定する場合、具体的には、PCR産物を蛍光ラベルした後にキャピラリー電気泳動で分離、分離された各々のPCR産物の分子サイズを測定する。あるいは、PCR産物を（ポリアクリルアミドゲル/アガロースゲルで）電気泳動で分離し、分離された各々のPCR産物の分子サイズを測定する。通常、予めサイズが既知のDNA断片（例えば、サイズマーカー）を対照として、分離された各々のPCR産物の分子サイズ（例えば、分子50

量や長さ)を測定する。次いで、分子サイズによってPCR産物を分類し、PCR産物の種類を特定する。特定されたPCR産物の種類は、対照サルモネラの血清型に特異的である。

【0056】

次いで、被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とし、合成したプライマーセットを用いてPCRを行う。被検サルモネラのゲノムDNAを鑄型とするPCR産物の同定は、対照サルモネラと同一の実験方法及び実験条件で行われることが好ましい。

【0057】

本発明において、ST、SHおよびSIからなる群より選択されるいずれかの対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類としては、本実施例に記載の方法によって得られるPCR産物の種類が例示できるが、これに限定されない。例えば、これら対照サルモネラに特異的なPCR産物の種類としては、本実施例と異なるPCR条件によって増幅されたPCR産物を本実施例と同じ分離方法及び分離条件で分離したときに検出されるPCR産物の種類に相当するPCR産物の種類でもよいし、本実施例と同じPCR条件又は異なるPCR条件によって増幅されたPCR産物を本実施例と異なる分離方法及び分離条件で分離したときに検出されるPCR産物の種類に相当するPCR産物の種類でもよい。

10

【0058】

さらに本発明は、STのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)から(4)からなる群より選択される少なくとも1組のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物を提供する。このようなPCR産物は、ST特異的なPCR産物である。当該PCR産物は、サルモネラの血清型がSTであるか否かの判定に有用である。

20

上記(1)から(4)からなる群より選択される少なくとも1組のセットとして、(2)から(4)に記載の3組のセット及び(1)から(4)に記載の4組のセットが例示できるが、これらに限定されない。

【0059】

さらに本発明は、SHのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)及び(5)から(7)からなる群より選択される少なくとも1組のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物を提供する。このようなPCR産物は、SH特異的なPCR産物である。当該PCR産物は、サルモネラの血清型がSHであるか否かの判定に有用である。

上記(1)及び(5)から(7)からなる群より選択される少なくとも1組のセットとして、(5)から(7)に記載の3組のセット及び、(1)及び(5)から(7)に記載の4組のセットが例示できるが、これらに限定されない。

30

【0060】

また本発明は、SIのゲノムDNAを鑄型とし、上記(1)及び(8)から(10)からなる群より選択される少なくとも1組のセットをプライマーセットとするPCRによって増幅されるPCR産物を提供する。このようなPCR産物は、SI特異的なPCR産物である。当該PCR産物は、サルモネラの血清型がSIであるか否かの判定に有用である。

上記(1)及び(8)から(10)からなる群より選択される少なくとも1組のセットとして、(8)から(10)に記載の3組のセット及び、(1)及び(8)から(10)に記載の4組のセットが例示できるが、これらに限定されない。

本発明においてPCRは、好ましくはマルチプレックスPCRである。

40

【実施例】

【0061】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に制限されるものではない。

方法

遺伝子データベース上に公開されている血清型ST、SH、及びSIの全ゲノム塩基配列を用いて、STとSH、STとSI、SHとSIの間で比較ゲノム解析を実施し、非共通領域に含まれる遺伝子を血清型特異的遺伝子の候補とした。遺伝子データベースを用いて相同性検索を実施することで血清型特異的遺伝子の絞り込みを行い、各血清型について3つの遺伝子を選び出した。これらの遺伝子とサルモネラの細胞内侵入性に関与するinvA遺伝子の4遺伝子を

50

同時に検出するマルチプレックスPCR法の確立を試みた。invA遺伝子はサルモネラ属特異的であることが知られており、本遺伝子を同時に検出することで、被検菌がサルモネラ属に含まれることを示すことができる。また、本遺伝子の増幅サイズを最も大きく設定することでdNTPsの消費を増やし、非特異的増幅を抑える効果も期待できる。

次に過去30年間にわたって収集した約3,700株の野外分離サルモネラの中から異なる事例に由来するST125株（表1-1、1-2）、SH19株（表2）、SI55株（表3）、それ以外の117血清型（表4-1、4-2）から各1株を選び、これらのゲノムDNAを鑄型として上記遺伝子を同時に検出するマルチプレックスPCR法を実施し、野外分離サルモネラにおける血清型特異的遺伝子候補保有率を調べることで本法の特異性を検証した。

【0062】

10

結果と考察

オーソログ解析に基づく比較ゲノム解析の結果、ST、SH、及びSIで、それぞれ533、297、268の非一致ORFを抽出した。これら遺伝子のうち挿入配列と考えられる領域から1遺伝子を選び、相同性検索を実施し、他のサルモネラで登録の少ない遺伝子をST、SH、SIで、それぞれ3個ずつ選び出した。表5にこれらの遺伝子及びinvA遺伝子をマルチプレックスPCR法で検出するためのプライマーと増幅産物の塩基配列等を示した。STを同定するマルチプレックスPCRではinvA、TMP1、TMP2、及びTMP3の4遺伝子領域を標的とした。同様にSHではinvA、HMP1、HMP2、及びHMP3の4遺伝子領域を、SIではinvA、IMP1、IMP2、及びIMP3の4遺伝子領域を標的とした。条件検討の結果、マルチプレックスPCRはDNAポリメラーゼ（KOD FX；東洋紡）1U、dNTPs各0.4mM、プライマー各0.3μM（4ペア）、テンプレートDNA 100ngを含む50μlの反応系で行い、サイクル条件は熱変成98℃、10秒、アニール52℃、30秒、伸長反応68℃、30秒を35サイクルとした。増幅産物は2%アガロースゲル中で電気泳動することにより、そのサイズを確認した。

20

【0063】

30

ST同定用マルチプレックスPCRでは、供試したST125株において3つの血清型特異的遺伝子が全て増幅陽性であったのに対し、ST以外の117血清型では血清型04:i:-でのみ3遺伝子陽性の結果が得られた（図1、表6）。本血清型はSTの単相変異株と考えられ、本法ではSTと識別できないものと考えられた。非ST 117株における各遺伝子の陽性率はTMP1で13.7%、TMP2で21.4%、TMP3で9.4%であった（表6）。SH同定用マルチプレックスPCRでは、供試したSH 19株全てにおいて3遺伝子陽性であったのに対し、SH以外の117血清型では3遺伝子陽性の株は認められなかった。非SH 117株における各遺伝子の陽性率はHMP1で0.9%、HMP2で3.4%、HMP3で0.9%であった（表7）。SI同定用マルチプレックスPCRでは、供試したSI55株全てにおいて3遺伝子陽性であったのに対し、SI以外の117血清型では3遺伝子陽性の株は認められなかった。非SI 117株における各遺伝子の陽性率はIMP1で6.0%、IMP2で0%、IMP3で4.3%であった（表8）。以上の結果から、これらのマルチプレックスPCR法は上記3血清型の同定法として用いるための十分な特異性を有しているものと考えられた。

【表1 - 1】

工番号	L番号	血清型等	由来	分離年	分離地
1	44	Typhimurium	豚(肥育豚クロアカスワブ)	1977	福岡県
2	55	Typhimurium	鶏(肝)	1977	長崎県
3	66	Typhimurium	牛(直腸便)	1976	長崎県
4	112	Typhimurium	牛(ホルスタイン雄)	1978	熊本県
5	161	Typhimurium	トリ(ウズラ食道末端結節)	1978	岡山県
6	209	Typhimurium	牛(直腸):ホルスタイン雄	1979	長崎県
7	245	Typhimurium	牛	1980	和歌山県
8	413	Typhimurium	鶏	1981	徳島県
9	518	Typhimurium	牛(糞便):屠場直行肉牛	1981	和歌山県
10	534	Typhimurium	牛(下痢便)	1981	岐阜県
11	535	Typhimurium	牛(腸リン)	1981	宮城県
12	538	Typhimurium	牛(腸間膜リンパ)	1981	富山県
13	564	Typhimurium	馬(肝):フランス導入馬の子	1982	熊本県
14	578	Typhimurium	牛(糞便)	1982	富山県
15	674	Typhimurium	牛	1982	徳島県
16	690	Typhimurium	鶏	1983	福岡県
17	694	Typhimurium	牛	1983	富山県
18	712	Typhimurium	牛:死亡牛	1983	岐阜県
19	719	Typhimurium	牛(肝):死亡子牛No. 1	1983	長野県
20	737	Typhimurium	ヒト	1983	茨城県
21	748	Typhimurium	豚(下痢便):繁殖豚	1983	石川県
22	753	Typhimurium var Copenhagen	牛(臓器):死亡肉用子牛	1983	愛知県
23	754	Typhimurium var Copenhagen	牛(下痢便)	1983	徳島県
24	767	Typhimurium var Copenhagen	牛(肝):乳用雄下痢	1983	島根県
25	778	Typhimurium var Copenhagen	牛(牛床)	1983	栃木県
26	779	Typhimurium	牛(下痢):乳用雄	1983	和歌山県
27	783	Typhimurium	牛(腸内容):死亡乳用雄	1983	愛知県
28	796	Typhimurium	イヌ	1983	茨城県
29	801	Typhimurium var Copenhagen	牛(糞便):肥育素牛下痢	1983	愛知県
30	804	Typhimurium	牛(糞便):雄子牛	1984	山梨県
31	815	Typhimurium	トリ(ハト肝)	1983	東京都
32	914	Typhimurium	牛	1984	愛知県
33	1180	Typhimurium	豚(肺)	1988	千葉県
34	1216	Typhimurium	豚	1988	愛知県
35	1247	Typhimurium	トリ(ハト)	1989	千葉県
36	1257	Typhimurium	飼料	1988	肥飼検
37	1285	Typhimurium	ネコ(ハクビシン)	1989	愛知県
38	1300	Typhimurium	豚	1989	和歌山県
39	1306	Typhimurium	牛	1989	和歌山県
40	1332	Typhimurium	牛	1989	島根県
41	1343	Typhimurium	牛	1989	京都府
42	1350	Typhimurium	豚(糞便)	1989	和歌山県
43	1363	Typhimurium	馬(歎料)	1989	岩手県
44	1367	Typhimurium	牛(肝)	1989	埼玉県
45	1372	Typhimurium	牛(腎):1	1989	千葉県
46	1387	Typhimurium	鶏:ヒナ	1989	横浜動検
47	1402	Typhimurium	牛(下痢便)	1989	石川県
48	1410	Typhimurium	牛(十二指腸)	1990	千葉県
49	1500	Typhimurium	ネコ(腎)	1990	山形県
50	1511	Typhimurium	牛(肝):ホルスタイン雄	1990	千葉県
51	1521	Typhimurium	鶏:ヒナ	1990	徳島県
52	1522	Typhimurium	牛:肉牛	1990	徳島県
53	1632	Typhimurium	牛(下痢便):和牛	1991	山梨県
54	1650	Typhimurium	牛(肝)	1987	千葉県
55	1663	Typhimurium	トリ(ハト)	1989	千葉県
56	1664	Typhimurium	豚(肺)	1988	千葉県
57	1670	Typhimurium	綿羊(肝)	1991	東京都
58	1692	Typhimurium	牛:ホルスタイン	1991	神奈川県
59	1705	Typhimurium	牛(糞便)	1991	千葉県
60	1796	Typhimurium	豚	1992	千葉県
61	1832	Typhimurium	牛	1992	神奈川県
62	1858	Typhimurium	トリ(ウズラ)	1992	長野県
63	1862	Typhimurium	牛	1992	埼玉県
64	1883	Typhimurium	牛	1992	長野県

【表1 - 2】

工番号	L番号	血清型等	由来	分離年	分離地
65	1911	Typhimurium	牛	1992	山梨県
66	1926	Typhimurium	牛	1992	大分県
67	1942	Typhimurium	牛(腎)	1992	長野県
68	1945	Typhimurium	トリ(ジュウシマツ)	1992	長野県
69	1989	Typhimurium	牛(子牛ホル)	1993	愛知県
70	1998	Typhimurium	トリ(ウズラ)	1993	愛知県
71	2014	Typhimurium	牛(黒毛和種腸リン)	1993	宮城県
72	2020	Typhimurium	牛(肺)	1993	東京都
73	2042	Typhimurium	豚(糞便)	1993	熊本県
74	2054	Typhimurium	乳用牛(腸管)	1994	神奈川県
75	2061	Typhimurium	乳牛雄(下痢)	1994	岩手県
76	2063	Typhimurium	乳用牛(下痢)	1994	群馬県
77	2070	Typhimurium	牛(直腸)	1994	千葉県
78	2087	Typhimurium	豚(下痢)	1994	岐阜県
79	2090	Typhimurium	搾乳牛(下痢)	1994	岩手県
80	2106	Typhimurium	搾乳牛(下痢)	1994	山形県
81	2111	Typhimurium	牛(肝臓)	1994	千葉県
82	2137	Typhimurium	牛口腔	1995	千葉県
83	2190	Typhimurium	ホルスタイン成牛肝臓	1994	岩手県
84	2239	Typhimurium	F1子牛、腸リンパ	1995	千葉県
85	2256	Typhimurium	F1雄子牛肝臓	1995	群馬県
86	2261	Typhimurium	成牛粘血便	1991	愛知県
87	2270	Typhimurium	F1哺育牛糞便	1992	滋賀県
88	2331	Typhimurium	子牛、腸管リンパ	1995	石川県
89	2386	Typhimurium	豚肺	1996	千葉県
90	2413	Typhimurium	採卵鶏飼料	1996	群馬県
91	2428	Typhimurium	搾乳牛(ホルスタイン)糞便	1996	福島県
92	2453	Typhimurium	牛糞便	1996	千葉県
93	2666	Typhimurium	豚 腸間膜リンパ節 農場C	1997	神奈川県
94	2686	Typhimurium	乳牛 直腸便 成牛	1997	群馬県
95	2694	Typhimurium	乳牛A 十二指腸	1997	千葉県
96	2723	Typhimurium	採卵鶏 床面スワブ	1997	神奈川県
97	2754	Typhimurium	ブロイラー鶏 鶏舎塵埃	1997	千葉県
98	2839	Typhimurium	ヤクシカ 肺	1998	長野県
99	2897	Typhimurium	鶏 肝	1998	千葉県
100	2929	Typhimurium	ドバト 肝	1998	愛知県
101	2984	Typhimurium DT104	エルク	1993	米国
102	2985	Typhimurium DT104	ヒト WA	1994	米国
103	2987	Typhimurium DT193	牛 糞便		米国
104	2988	Typhimurium DT208	牛 糞便	1995	米国
105	2989	Typhimurium DT10	エミュー 糞便	1995	米国
106	2990	Typhimurium DT120	牛 剖検材料	1996	米国
107	2991	Typhimurium DT12	牛	1996	米国
108	2992	Typhimurium DT2	牛	1996	米国
109	2993	Typhimurium DT771	牛	1996	米国
110	2994	Typhimurium DT51	牛	1996	米国
111	2996	Typhimurium DT66	牛	1994	米国
112	3039	Typhimurium	カラス No.4 腎	1998	千葉県
113	3103	Typhimurium	豚 糞便 無症状	1999	福島県
114	3130	Typhimurium	アイガモ 肝	1999	山梨県
115	3191	Typhimurium	豚 空腸内容	2000	神奈川県
116	3245	Typhimurium	採卵鶏 トラック荷台糞便	2001	滋賀県
117	3287	Typhimurium	採卵鶏舎床塵埃	2001	神奈川県
118	3385	Typhimurium	ホルスタイン牛 糞便	2002	茨城県
119	3421	Typhimurium	アイガモ・孵卵器	2005	大阪府
120	3438	Typhimurium	死亡牛		山形県
121	3492	Typhimurium	成牛・糞便		福島県
122	3529	Typhimurium	牛・肝		福島県
123	3542	Typhimurium	成牛・糞便		福島県
124	3563	Typhimurium	鶏舎床埃	2006	神奈川県
125	3564	Typhimurium	哺乳豚・敗血症	2006	山形県

【表2】

H番号	L番号	由来動物	分離年	分離地
1	1143	鶏:ヒナ	1987	動検成田
2	1501	鶏(クロアカスワブ):ブロイラー	1989	三重県
3	1503	鶏(クロアカスワブ):ブロイラー	1990	三重県
4	1505	環境(敷料:鶏ブロイラー)	1990	三重県
5	1508	鶏(脾):ヒナ	1990	栃木県
6	1560	鶏:ブロイラー	1990	徳島県
7	1685	鶏(舎内糞便)	1991	滋賀県
8	1908	鶏	1992	千葉県
9	1949	牛(牛舎糞便)	1992	北海道
10	1963	その他(ニシキヘビ、腸内容)	1993	茨城県
11	1974	鶏(ブライラー糞便)	1993	新潟県
12	1983	鶏(成鶏)	1993	北海道
13	2010	鶏(ブロイラー糞便)	1993	新潟県
14	2449	搾乳牛下痢便	1996	岩手県
15	2638	採卵鶏 鶏舎塵埃	1997	和歌山県
16	2767	アイガモ糞便	1997	山形県
17	2769	鶏舎塵埃	1997	山形県
18	2818	肉様鶏 嘉佐	1997	滋賀県
19	2997	ブロイラー鶏 クロアカスワブ	1998	長野県

【表3】

F番号	L番号	由来動物	分離年	分離地
1	164	鶏	1978	三重県
2	273	環境(汚水)	1981	動検
3	383	飼料	1981	S社
4	410	鶏	1981	徳島県
5	411	鶏	1981	徳島県
6	412	鶏	1981	徳島県
7	450	飼料	1981	S社
8	916	牛	1984	愛知県
9	949	?	1984	三重県
10	984	飼料(魚粉)	1986	香川県
11	1036	?	1987	愛知県
12	1061	飼料	1987	肥飼研
13	1152	鶏(臓器:肝、脾、胆、心、卵黄囊、盲腸):ヒナ	1988	動検成田・河野
14	1261	飼料	1988	肥飼検
15	1304	牛:子牛	1989	和歌山県
16	1313	鶏(脾):ブロイラー	1989	栃木県
17	1419	飼料(肉粉)	1989	肥飼研
18	1540	牛:肉用牛	1990	徳島県
19	1725	牛(下痢便):肉牛	1992	島根県
20	1732	飼料	1992	広島県
21	2005	鶏(ブロイラー心)	1993	熊本県
22	2011	鶏(ブロイラー糞便)	1993	新潟県
23	2050	鶏(糞便)	1994	千葉県
24	2286	採卵鶏盲腸便	1995	群馬県
25	2372	鶏飼料	1996	F社
26	2384	採卵鶏舍塵埃	1996	千葉県
27	2411	採卵鶏舍塵埃	1996	滋賀県
28	2463	淘汰鶏肝臓	1996	滋賀県
29	2543	ブロイラー盲腸	1996	和歌山県
30	2576	ブロイラークロアカ	1997	滋賀県
31	1803	鶏(糞)	1992	千葉県
32	1844	豚	1992	群馬県
33	1932	飼料(鶏)	1992	愛媛県
34	2487	採卵鶏舍長靴拭い	1996	滋賀県
35	2583	ブロイラー盲腸 鶏	1997	和歌山県
36	2617	鶏ブロイラー肝	1997	千葉県
37	2623	鶏 ブロイラー 盲腸	1997	和歌山県
38	2645	鶏舍内塵埃	1997	長野県
39	2650	採卵鶏 塵埃	1997	群馬県
40	2727	採卵鶏 鶏舍内塵埃	1997	愛知県
41	2739	鶏 ヒナ輸送箱敷料	1997	滋賀県
42	2780	鶏舍床	1997	東京都
43	2784	鶏舍塵埃	1997	千葉県
44	2814	採卵鶏 床面	1997	滋賀県
45	2830	ブロイラー鶏 糞便	1998	山梨県
46	2908	ブロイラー鶏	1998	千葉県
47	2957	鶏舍塵埃	1998	山梨県
48	3038	採卵鶏 盲腸	1998	千葉県
49	3121		1999	東京肥飼料検査所
50	3148	採卵鶏舍塵埃	1999	山梨県
51	3408	堆肥	2003	畜産環境技術研究所
52	3624	採卵鶏舍床塵埃	2007	神奈川県
53	3680	採卵鶏鶏舍床	2007	神奈川県
54	3685	鶏舍床塵埃	2007	神奈川県
55	3701	鶏舍塵埃	2008	神奈川県

【表4 - 1】

S番号	L番号	血清型	O	H1	H2	由来	分離年	分離地
1	162	Oslo	6,7	a	e,n,x	鶏(腸管)	1978	岡山県
2	282	Meunster	3,10	e,h	1,5	環境(汚水)	1981	
3	306	Bonn	6,7	l,v	e,n,x	飼料		
4	315	Minnesota	21	b	e,n,x	飼料		
5	316	Tshiongwe	6,8	e,h	e,n,z ₁₅	飼料		
6	317	Inganda	6,7	z ₁₀	1,5	飼料		
7	327	Eko	4,12	e,h	1,6	鶏	1976	
8	361	Stratford	1,3,19	i	1,2	飼料		
9	391	Yarrabach	13,23	y	1,7	飼料:成鶏用飼料	1981	静岡県
10	405	Kiambu	4,12	z	1,5	飼料:種鶏飼料(14号)	1981	静岡県
11	423	Typhimurium	4,12	i	1,2	鶏	1981	徳島県
12	435	Bovismorificans	6,8	r	1,5	飼料	1981	
13	438	S. II(Tosamanga)	6,7	z	1,5	飼料	1981	
14	446	Ruiru	21	y	e,n,x	飼料	1981	
15	503	Welikade	16	l,v	1,7	飼料		
16	504	Zanzibar	3,10	k	1,5	飼料		
17	625	Blockley	6,8	k	1,5	鶏(下痢便)	1982	
18	749	Javiana	9,12	l,z ₂₈	1,5	鶏(脾):ハバードブロイラー種鶏	1983	兵庫県
19	797	Mendoza	9,12	l,v	1,2	豚(盲腸)	1983	茨城県
20	798	Irumu	6,7	l,v	1,5	豚(回腸リンパ)	1983	茨城県
21	846	Paratyphi B	4,12	b	1,2	馬	1985	北海道
22	1052	Cubana	13,23	z ₂₉	-	飼料	1987	肥飼検
23	1097	Dallgow	1,3,19	z ₁₀	e,n,z ₁₅	飼料	1987	肥飼検
24	1103	Mikawashima	6,7	y	e,n,z ₁₅	飼料	1987	肥飼検
25	1111	Nchanga	3,10	l,v	1,2	飼料	1987	肥飼検
26	1160	Schleissheim	4,12	b	-	サル2(No. 044)	1987	靈長類センター
27	1164	Weltevreden[lanka]	3,10	r	z ₆	サル6(No. 085)	1987	靈長類センター
28	1275	Fresno	9,46	Z ₃₈	-	飼料	1988	肥飼検
29	1278	Liverpool	1,3,19	d	e,n,z ₁₅	飼料	1988	肥飼検
30	1421	S. IIIa [arizonae]	42	z ₄ ,z ₂₃	-	飼料(肉骨粉)	1989	肥飼検
31	1454	Wayne	30	g,z ₅₁	-		予研	
32	1455	Budapest	4,12	g,t	-		予研	
33	1456	Rostock	9,12	g,p,u	-		予研	
34	1457	Berta	9,12	[f],g,[t]	-		予研	
35	1463	S. IIIa [arizonae]	38	g,z ₅₁	-		予研	
36	1466	S. IIIa [arizonae]	21	g,z ₅₁	-		予研	
37	1467	Naestved	9,12	g,p,s	-		予研	
38	1468	Agbeni	13,23	g,m	-		予研	
39	1470	Godesberg	30	g,m	-		予研	
40	1482	Stanley	4,12	d	1,2	トリ(キジ腸内容)	1990	和歌山県
41	1489	Chailey	6,8	z ₄ ,z ₂₃	[e,n,z ₁₅]	トリ(ヤマドリ臓器):ヒナ	1990	埼玉県
42	1594	Derby	4,12	f,g	[1,2]	豚(肝)	1991	群馬県
43	1771	Lille	6,7	z ₃₈	-	鶏(糞)	1992	鳥取県
44	1804	Saintpaul	4,12	e,h	1,2	鶏(糞)	1992	千葉県
45	1860	Thompson	6,7	k	1,5	トリ(ウズラ)	1992	長野県
46	1961	Christiansborg	44	z ₄ ,z ₂₄	-	その他(ニシキヘビ、血液)	1993	茨城県
47	1967	Havana	13,23	f,g	-	鶏(心)	1993	群馬県
48	1982	S. II (sofia)	4	b	e,n,x	鶏(鶏舍糞便)	1993	山梨県
49	2043	O4:d:-	4	d	-	豚(糞便)	1993	熊本県
50	2060	Amager	3,10	y	1,2	飼料(鶏)	1994	神奈川県
51	2077	Sandiego	4,12	e,h	e,n,z ₁₅	牛(下痢)	1994	北海道
52	2098	Ouakam	9,46	z ₂₉	-	畜舎環境(鶏舎床塵埃)	1994	北海道
53	2110	Duesseldorf	6,8	z ₄ ,z ₂₄	-	鶏舎床	1994	岐阜県
54	2125	Ohio	6,7	b	l,w	鶏(糞受け板)	1995	岡山県
55	2254	Grumpensis	13,23	d	1,7	採卵鶏(ハイライン)成鶏舎内塵埃	1995	群馬県
56	2377	Blegdam	9,12	g,m,q	-	鶏飼料	1996	
57	2378	Bardo	8	e,h	1,2	搾乳牛糞便	1996	岩手県
58	2393	Othmarschen	6,7	g,m,[t]	-	採卵鶏クロアカ	1996	千葉県
59	2434	Abortusequi	4,12	-	e,n,x	馬	1996	北海道
60	2582	Muenchen	6,8	d	1,2	採卵鶏 鶏舎床	1997	滋賀県

【表4 - 2】

S番号	L番号	血清型	O	H1	H2	由来	分離年	分離地
61	2583 Infantis	6,7	r	1,5		ブロイラー盲腸 鶏	1997	和歌山県
62	2584 Isangi	6,7	d	1,5		牛 ホルスタイン子牛	1997	福島県
63	2586 Virchow	6,7	r	1,2		ブロイラー鶏舎内拭き取り	1997	岡山県
64	2587 Agona	4,12	f,g,s	-		採卵鶏 鶏舎内塵埃	1997	愛知県
65	2594 Oranienburg	6,7	m,t	[z ₅₇]		鶏 鶏舎塵埃	1997	山梨県
66	2596 Enteritidis	9,12	g,m	[1,7]		鶏 廃鶏変性卵胞	1997	山梨県
67	2597 Cerro	6,14	z ₄ ,z ₂₃	[1,5]		鶏 鶏舎換気扇フィルター	1997	山梨県
68	2600 Dublin	9,12	g,p	-		牛 黒毛和種雌牛 糞便	1997	青森県
69	2608 Give	3,10	l,v	1,7		採卵鶏 糞便	1997	群馬県
70	2619 Lexington	3,10	z ₁₀	1,5		採卵鶏 盲腸便	1997	千葉県
71	2624 Corvallis	8,20	z ₄ ,z ₂₃	[z ₆]		鶏 ブロイラー 肝	1997	和歌山県
72	2638 Hadar	6,8	z ₁₀	e,n,x		採卵鶏 鶏舎塵埃	1997	和歌山県
73	2640 Livingstone	6,7	d	l,w		採卵鶏 盲腸便	1997	和歌山県
74	2642 Braenderup	6,7	e,h	e,n,z ₁₅		採卵鶏 盲腸便	1997	和歌山県
75	2643 Narashino	6,8	a	e,n,x		鶏舎内塵埃	1997	長野県
76	2669 Bredeney	4,12	l,v	1,7		鶏舎塵埃、糞便	1997	群馬県
77	2671 Brancaster	4,12	z ₂₉	-		鶏舎塵埃、糞便	1997	群馬県
78	2674 Mbandaka	6,7	z ₁₀	e,n,z ₁₅		鶏舎塵埃、糞便	1997	群馬県
79	2683 Albany	8,20	z ₄ ,z ₂₄	-		採卵鶏 盲腸便	1997	千葉県
80	2688 Krefeld	1,3,19	y	l,w		採卵鶏 鶏舎床面スワブ	1997	群馬県
81	2691 S. IIIa [arizonae]	48	k	UT		子牛 下痢糞便	1997	岡山県
82	2773 Heidelberg	4,12	r	1,2		鶏舎床	1997	東京都
83	2810 Haifa	4,12	z ₁₀	1,2		採卵鶏 鶏舎床	1997	滋賀県
84	2813 Gaminara	16	d	1,7		採卵鶏 鶏舎床	1997	滋賀県
85	2829 Colorado	6,7	l,w	1,5		採卵鶏舎塵埃	1998	山梨県
86	2836 Rissen	6,7	f,g	-		採卵鶏塵埃	1998	群馬県
87	2859 Newport	6,8	e,h	1,2			1998	山口県
88	2925 Schwarzengrund	4,12	d	1,7		肉用種鶏 盲腸	1998	千葉県
89	2952 Orion	3,10	y	1,5		鶏舎塵埃	1998	山梨県
90	2958 Brandenburg	4,12	l,v	e,n,z ₁₅		鶏舎塵埃	1998	山梨県
91	2962 Anatum	3,10	e,h	1,6		鶏舎塵埃	1998	山梨県
92	3079 Potsdam	6,7	l,v	e,n,z ₁₅		鶏舎床	1998	神奈川県
93	3099 Taksony	1,3,19	i	z ₆		採卵鶏 糞便	1999	千葉県
94	3104 London	3,10	l,v	1,6		豚 糞便 無症状	1999	福島県
95	3126 Tennessee	6,7	z ₂₉	[1,2,7]			1999	肥飼検
96	3152 Pakistan	8	l,v	1,2		アオバズク糞便	1999	石川県
97	3190 Chester	4,12	e,h	e,n,x		採卵鶏 鶏舎床	2000	神奈川県
98	3192 Kentucky	8,20	i	z ₆		採卵鶏 直腸スワブ	2000	山梨県
99	3200 Worthington	1,13,23	z	l,w		採卵鶏 直腸スワブ	2000	山梨県
100	3213 Bareilly	6,7	y	1,5		豚 鼻腔スワブ	2000	神奈川県
101	3250 Ealing	35	g,m,s	-		動物園フトアゴヒゲトカゲ直腸スワブ	2001	埼玉県
102	3252 Johannesburg	1,40	b	e,n,x		乳用牛 糞便	2001	岐阜県
103	3267 Carrau	6,14	y	1,7		乳牛直腸便	2001	栃木県
104	3274 Singapore	6,7	k	e,n,x		鶏舎床塵埃	2001	神奈川県
105	3293 Montevideo	6,7	g,m,s	[1,2,7]		採卵鶏舎床塵埃	2001	神奈川県
106	3322 Gallinarum	9,12	-	-		ブロイラー鶏 心	2002	千葉県
107	3365 S. IIIb [diarizonae]	50	UT	UT		堆肥	2002	
108	3370 Senftenberg	1,3,19	g,[s],t	-		採卵鶏舎床塵埃	2002	神奈川県
109	3389 Nagoya	6,8	b	1,5		牛糞便	2001	埼玉県
110	3402 Amsterdam	3,10	g,m,s	-		アイガモ 糞便	2003	青森県
111	3407 Uganda	3,10	l,z ₁₃	1,5		採卵鶏塵芥	2003	神奈川県
112	3423 Meleagridis	3,10	e,h	l,w		乳用牛・小腸	2005	長崎県
113	3428 Wandsworth	39	b	1,2		ブロイラー鶏・床面スワブ	2005	奈良県
114	3429 Panama	9,12	l,v	1,5		肉用牛・F1・直腸便	2005	熊本県
115	3575 O4:i:-	4	i	-		搾乳牛下痢	2006	山形県
116	3577 Adelaide	35	f,g	-		採卵鶏環境	2006	神奈川県
117	3591 Choleraesuis	肥育豚肺由来		061114		肥育豚肺由来	2006	神奈川県
118	3627 Kedougou	O13	i	l,w		採卵鶏環境	2007	神奈川県

【表5】

同定しようとする 血清型	標的領域	増幅 プライマー名	塩基配列 (5' → 3')
サルモネラ属	<i>invA</i> 遺伝子の 一部	invAF	AAACCTAAAACCAGCAAAGG (配列番号:1)
		invAR	TGTACCGTGGCATGTCTGAG (配列番号:2)
Typhimurium	TMP1	TMP1F	ATGCGGGTATGACAAACCCCT (配列番号:3)
		TMP1R	TTAGCCCCATTTGGACCTTT (配列番号:4)
Typhimurium	TMP2	TMP2F	CAGACCAGGTAAAGTTCTGG (配列番号:5)
		TMP2R	CGCATATTGGTGCAGAAAT (配列番号:6)
Typhimurium	TMP3	TMP3F	TTTACCTCAATGGCGGAACC (配列番号:7)
		TMP3R	CCCAAAAGCTGGTTAGCAA (配列番号:8)
Hadar	HMP1	HMP1F	ACTTCATGCGCAGACTTGCC (配列番号:9)
		HMP1R	CAAGAACGGAAATTGAA (配列番号:10)
Hadar	HMP2	HMP2F	TACCGCCCCATTGATATCT (配列番号:11)
		HMP2R	CCCTTGCGAACATAAAACT (配列番号:12)
Hadar	HMP3	HMP3F	GGATCTAACAAAATGAGGT (配列番号:13)
		HMP3R	ATGCATCACTGCATCTCGT (配列番号:14)
Infantis	IMP1	IMP1F	GGTCATTGTCGGAAACCTGC (配列番号:15)
		IMP1R	ACATTCCCCCTTCCACTGCC (配列番号:16)
Infantis	IMP2	IMP2F	CGCGAAGAAGTGCATAAACCC (配列番号:17)
		IMP2R	CGCCACTTTCGTTATCTGAG (配列番号:18)
Infantis	IMP3	IMP3F	ACCTACTACTATCCCTGATG (配列番号:19)
		IMP3R	GCGAATTGCTACTTGAAG (配列番号:20)

10

20

【表6】

	TMP1	TMP2	TMP3		TMP1	TMP2	TMP3		TMP1	TMP2	TMP3	
T1	○	○	○		T78	○	○	○	S30	○	×	×
T2	○	○	○		T79	○	○	○	S31	×	×	×
T3	○	○	○		T80	○	○	○	S32	×	○	×
T4	○	○	○		T81	○	○	○	S33	×	○	×
T5	○	○	○		T82	○	○	○	S34	×	×	×
T6	○	○	○		T83	○	○	○	S35	×	×	×
T7	○	○	○		T84	○	○	○	S36	×	×	×
T8	○	○	○		T85	○	○	○	S37	×	○	×
T9	○	○	○		T86	○	○	○	S38	×	×	×
T10	○	○	○		T87	○	○	○	S39	×	×	×
T11	○	○	○		T88	○	○	○	S40	×	○	×
T12	○	○	○		T89	○	○	○	S41	×	×	×
T13	○	○	○		T90	○	○	○	S42	×	×	×
T14	○	○	○		T91	○	○	○	S43	×	×	×
T15	○	○	○		T92	○	○	○	S44	○	○	×
T16	○	○	○		T93	○	○	○	S45	×	×	×
T17	○	○	○		T94	○	○	○	S46	×	×	×
T18	○	○	○		T95	○	○	○	S47	×	×	×
T19	○	○	○		T96	○	○	○	S48	×	×	×
T20	○	○	○		T97	○	○	○	S49	×	○	×
T21	○	○	○		T98	○	○	○	S50	×	×	×
T22	○	○	○		T99	○	○	○	S51	○	×	×
T23	○	○	○		T100	○	○	○	S52	×	○	×
T24	○	○	○		T101	○	○	○	S53	×	×	×
T25	○	○	○		T102	○	○	○	S54	×	×	○
T26	○	○	○		T103	○	○	○	S55	×	×	×
T27	○	○	○		T104	○	○	○	S56	×	×	×
T28	○	○	○		T105	○	○	○	S57	○	×	×
T29	○	○	○		T106	○	○	○	S58	×	×	×
T30	○	○	○		T107	○	○	○	S59	×	×	×
T31	○	○	○		T108	○	○	○	S60	○	×	×
T32	○	○	○		T109	○	○	○	S61	×	×	×
T33	○	○	○		T110	○	○	○	S62	×	×	×
T34	○	○	○		T111	○	○	○	S63	×	×	×
T35	○	○	○		T112	○	○	○	S64	×	○	×
T36	○	○	○		T113	○	○	○	S65	×	×	×
T37	○	○	○		T114	○	○	○	S66	×	×	×
T38	○	○	○		T115	○	○	○	S67	×	×	○
T39	○	○	○		T116	○	○	○	S68	×	○	×
T40	○	○	○		T117	○	○	○	S69	×	×	×
T41	○	○	○		T118	○	○	○	S70	×	×	×
T42	○	○	○		T119	○	○	○	S71	×	×	×
T43	○	○	○		T120	○	○	○	S72	○	×	×
T44	○	○	○		T121	○	○	○	S73	×	×	○
T45	○	○	○		T122	○	○	○	S74	×	×	×
T46	○	○	○		T123	○	○	○	S75	×	×	×
T47	○	○	○		T124	○	○	○	S76	×	○	×
T48	○	○	○		T125	○	○	○	S77	×	×	×
T49	○	○	○		S1	×	×	×	S78	○	×	×
T50	○	○	○		S2	○	×	×	S79	×	×	○
T51	○	○	○		S3	○	×	×	S80	×	×	○
T52	○	○	○		S4	×	×	○	S81	×	×	×
T53	○	○	○		S5	×	×	×	S82	×	○	×
T54	○	○	○		S6	×	×	×	S83	×	○	×
T55	○	○	○		S7	×	×	×	S84	×	×	×
T56	○	○	○		S8	×	×	×	S85	×	×	○
T57	○	○	○		S9	×	×	×	S86	×	×	×
T58	○	○	○		S10	×	○	×	S87	○	×	×
T59	○	○	○		S11	○	○	○	S88	○	×	×
T60	○	○	○		S12	×	×	×	S89	×	×	×
T61	○	○	○		S13	○	×	×	S90	×	○	×
T62	○	○	○		S14	×	○	○	S91	×	×	×
T63	○	○	○		S15	×	×	○	S92	×	×	×
T64	○	○	○		S16	×	×	×	S93	×	×	×
T65	○	○	○		S17	×	×	×	S94	×	×	×
T66	○	○	○		S18	×	×	×	S95	×	×	×
T67	○	○	○		S19	○	○	○	S96	×	×	×
T68	○	○	○		S20	○	×	×	S97	×	○	×
T69	○	○	○		S21	×	○	×	S98	×	×	×
T70	○	○	○		S22	×	×	×	S99	×	×	×
T71	○	○	○		S23	×	○	×	S100	×	×	×
T72	○	○	○		S24	×	×	×	S101	×	×	×
T73	○	○	○		S25	×	×	×	S102	×	×	×
T74	○	○	○		S26	×	○	×	S103	×	×	×
T75	○	○	○		S27	×	○	×	S104	×	×	×
T76	○	○	○		S28	×	○	×	S105	×	×	×
T77	○	○	○		S29	×	○	×	S106	×	×	×

20
30
40

10

O4:i:-

Typhimurium

【表7】

	HMP1	HMP2	HMP3		HMP1	HMP2	HMP3
H1	○	○	○	S51	×	×	×
H2	○	○	○	S52	×	×	×
H3	○	○	○	S53	×	○	×
H4	○	○	○	S54	×	×	×
H5	○	○	○	S55	×	×	×
H6	○	○	○	S56	×	×	×
H7	○	○	○	S57	×	×	×
H8	○	○	○	S58	×	×	×
H9	○	○	○	S59	×	×	×
H10	○	○	○	S60	×	×	×
H11	○	○	○	S61	×	×	×
H12	○	○	○	S62	×	×	×
H13	○	○	○	S63	×	○	×
H14	○	○	○	S64	×	×	×
H15	○	○	○	S65	×	×	×
H16	○	○	○	S66	×	×	×
H17	○	○	○	S67	×	×	×
H18	○	○	○	S68	×	×	×
H19	○	○	○	S69	×	×	×
S1	×	×	×	S70	×	×	×
S2	×	×	×	S71	×	×	×
S3	×	×	×	S72	○	○	Hadar
S4	×	×	×	S73	×	×	×
S5	×	×	×	S74	×	×	×
S6	×	×	×	S75	×	×	×
S7	×	×	×	S76	×	×	×
S8	×	×	×	S77	×	×	×
S9	×	×	×	S78	×	×	×
S10	×	×	×	S79	×	×	×
S11	×	×	×	S80	×	×	×
S12	×	×	×	S81	×	×	×
S13	×	×	×	S82	×	×	×
S14	×	×	×	S83	○	×	×
S15	×	×	×	S84	×	×	×
S16	×	×	×	S85	×	○	×
S17	×	×	×	S86	×	×	×
S18	×	×	×	S87	×	×	×
S19	×	×	×	S88	×	×	×
S20	×	×	×	S89	×	×	×
S21	×	×	×	S90	×	×	×
S22	×	×	×	S91	×	×	×
S23	×	×	×	S92	×	×	×
S24	×	×	×	S93	×	×	×
S25	×	×	×	S94	×	×	×
S26	×	×	×	S95	×	×	×
S27	×	×	×	S96	×	×	×
S28	×	×	×	S97	×	×	×
S29	×	×	×	S98	×	×	×
S30	×	×	×	S99	×	×	×
S31	×	×	×	S100	×	×	×
S32	×	×	×	S101	×	×	×
S33	×	×	×	S102	×	×	×
S34	×	×	×	S103	×	×	×
S35	×	×	×	S104	×	×	×
S36	×	×	×	S105	×	×	×
S37	×	×	×	S106	×	×	×
S38	×	×	×	S107	×	×	×
S39	×	×	×	S108	×	×	×
S40	×	×	×	S109	×	×	×
S41	×	○	○	S110	×	×	×
S42	×	×	×	S111	×	×	×
S43	×	×	×	S112	×	×	×
S44	×	×	×	S113	×	×	×
S45	×	×	×	S114	×	×	×
S46	×	×	×	S115	×	×	×
S47	×	×	×	S116	×	×	×
S48	×	×	×	S117	×	×	×
S49	×	×	×	S118	×	×	×
S50	×	×	×				

10

20

30

40

【表8】

	IMP1	IMP2	IMP3		IMP1	IMP2	IMP3		IMP1	IMP2	IMP3
F1	○	○	○	S1	×	×	×	S61	○	○	○
F2	○	○	○	S2	×	×	×	S62	×	×	×
F3	○	○	○	S3	×	×	×	S63	×	×	×
F4	○	○	○	S4	×	×	×	S64	×	×	×
F5	○	○	○	S5	○	×	×	S65	×	×	○
F6	○	○	○	S6	×	×	×	S66	×	×	×
F7	○	○	○	S7	×	×	×	S67	×	×	×
F8	○	○	○	S8	×	×	×	S68	×	×	×
F9	○	○	○	S9	○	×	×	S69	×	×	×
F10	○	○	○	S10	×	×	○	S70	×	×	×
F11	○	○	○	S11	○	×	×	S71	×	×	×
F12	○	○	○	S12	×	×	×	S72	×	×	×
F13	○	○	○	S13	×	×	×	S73	×	×	×
F14	○	○	○	S14	×	×	×	S74	×	×	○
F15	○	○	○	S15	×	×	×	S75	×	×	×
F16	○	○	○	S16	×	×	×	S76	×	×	×
F17	○	○	○	S17	×	×	×	S77	×	×	×
F18	○	○	○	S18	×	×	×	S78	×	×	×
F19	○	○	○	S19	×	×	×	S79	×	×	×
F20	○	○	○	S20	×	×	×	S80	×	×	×
F21	○	○	○	S21	×	×	×	S81	×	×	×
F22	○	○	○	S22	○	×	×	S82	×	×	×
F23	○	○	○	S23	×	×	×	S83	×	×	×
F24	○	○	○	S24	×	×	×	S84	○	×	×
F25	○	○	○	S25	×	×	×	S85	×	×	×
F26	○	○	○	S26	×	×	×	S86	×	×	×
F27	○	○	○	S27	×	×	×	S87	×	×	×
F28	○	○	○	S28	×	×	×	S88	×	×	×
F29	○	○	○	S29	×	×	×	S89	×	×	×
F30	○	○	○	S30	×	×	×	S90	×	×	×
F31	○	○	○	S31	×	×	×	S91	×	×	×
F32	○	○	○	S32	×	×	×	S92	×	×	×
F33	○	○	○	S33	×	×	×	S93	×	×	×
F34	○	○	○	S34	×	×	×	S94	×	×	×
F35	○	○	○	S35	×	×	×	S95	×	×	×
F36	○	○	○	S36	×	×	×	S96	×	×	×
F37	○	○	○	S37	×	×	×	S97	×	×	×
F38	○	○	○	S38	×	×	×	S98	×	×	×
F39	○	○	○	S39	×	×	×	S99	×	×	×
F40	○	○	○	S40	×	×	×	S100	×	×	×
F41	○	○	○	S41	×	×	×	S101	×	×	×
F42	○	○	○	S42	×	×	×	S102	×	×	×
F43	○	○	○	S43	×	×	×	S103	×	×	×
F44	○	○	○	S44	×	×	×	S104	×	×	×
F45	○	○	○	S45	×	×	×	S105	×	×	×
F46	○	○	○	S46	×	×	×	S106	×	×	×
F47	○	○	○	S47	○	×	×	S107	×	×	×
F48	○	○	○	S48	×	×	×	S108	×	×	×
F49	○	○	○	S49	×	×	×	S109	×	×	×
F50	○	○	○	S50	×	×	×	S110	×	×	×
F51	○	○	○	S51	×	×	×	S111	×	×	×
F52	○	○	○	S52	×	×	×	S112	×	×	×
F53	○	○	○	S53	○	×	×	S113	×	×	×
F54	○	○	○	S54	×	×	×	S114	×	×	×
F55	○	○	○	S55	×	×	×	S115	×	×	×
F56	○	○	○	S56	×	×	×	S116	×	×	○
F57	○	○	○	S57	×	×	×	S117	×	×	×
F58	○	○	○	S58	×	×	○	S118	×	×	×
F59	○	○	○	S59	×	×	×				
F60	○	○	○	S60	×	×	×				

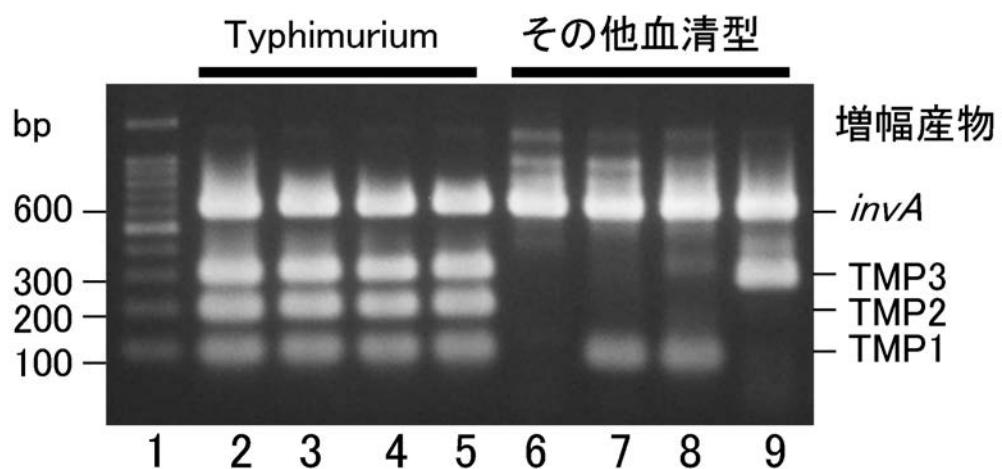
10

20

30

40

【図1】



【配列表】

0005224541000001.app

フロントページの続き

特許法第30条第1項適用 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所ホームページhttp://niah.naroaffrc.go.jp/publication/seikajoho2/2008/niah08003.html(平成21年9月11日)に発表

特許法第30条第1項適用 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所ホームページhttp://niah.naroaffrc.go.jp/publication/seikajoho2/2008/niah08003-e.html(平成21年9月11日)に発表

(出願人による申告) 平成20年度、農林水産省、病原微生物の迅速検出技術および効果的な殺菌・制御技術の開発委託事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 秋庭 正人

茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所内

(72)発明者 楠本 正博

茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所内

(72)発明者 岩田 剛敏

茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所内

審査官 三原 健治

(56)参考文献 Res.Vet.Sci.,Vol.81(2006)p.340-344

BMC Microbiology, Vol.8, No.178(2008)p.1-8

Curr.Opin.Biotechnol., Vol.20(Apr.2009)p.149-157

動物衛生研究所研究報告, No.114(Jan.2008)p.45-50

J.Clin.Microbiol., Vol.42, No.4(2004)p.1734-1738

Vet.Microbiol., Vol.61(1998)p.215-227

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

C 12 Q 1 / 68

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)

W P I