

# 食中毒細菌の簡易・迅速検出キットの紹介

～カクテル増幅法により複数種の食中毒細菌を一括して検出できる遺伝子検査法～

大分事業所 西島 裕人

## 1 はじめに

食品分野の製品や製造工程の管理において、微生物試験および検出された微生物の同定を行うことは衛生管理、汚染原因の究明およびバイオハザード対策等の面から非常に重要である。現在、それらの微生物試験の公定法では、培養法が基本となっている。培養法は、培地調製や滅菌処理等の操作が煩雑だけでなく、増菌培養、選択分離培養、確認培養と目的菌の分離のために何度も培養を繰り返した後、疑わしいコロニーについて生化学性状試験、血清型別試験、毒素産生性試験等の確定試験<sup>1), 2)</sup>を行なうため、判定結果が得られるまでに多大な労力と5日間前後の時間を必要としている。また、対象は食品であり、食中毒細菌が発見されても既に流通し対応が遅れてしまう恐れがあることから、簡便かつ迅速な試験法の開発が求められている。

近年、Polymerase Chain Reaction (以下、PCR法(\*1)という)に代表される遺伝子検出法を利用した技術の発展により、微生物(特に病原菌)を特異的に簡易迅速検出する手法が注目を集めている。しかし、遺伝子検査法の問題として以下の2点が挙げられる。

(1) 多種類の遺伝子を検出する場合、反応条件の設定が難しく、特異性および感度が犠牲となる。

(2) 消毒、加熱等による死菌由来の遺伝子を検出する可能性がある。

そこで我々は、江崎(岐阜大学大学院医学系研究科)らがPCR法を応用して開発した複数の微生物の特定遺伝子配列を、同一条件で高感度に増幅させる技術(以下、カクテル増幅法という)を用い

て、食品中の7菌種または9菌種の生きた食中毒細菌を簡易迅速に一括検出できる試験法を構築し、その検査試薬のキット化を行ったので報告する。

## 2 カクテル増幅法の特徴と原理

### 2.1 特徴

カクテル増幅法は、1回の反応で複数種の食中毒細菌由来の遺伝子を同時に、か

表1 カクテル増幅法と培養法の特徴比較

|     | カクテル増幅法 |  | 培養法 |                    |
|-----|---------|--|-----|--------------------|
| 迅速性 | ○       | 当日～翌日判定可能                              | ×   | 判定まで5日間前後          |
| 効率性 | ○       | 検出対象細菌に関係なく同一操作                        | ×   | 検出対象細菌で培地および操作が異なる |
| コスト | ○       | 検出菌種が多いほど同時測定による試薬および労務費の削減効果が大        | ×   | 検出菌種が多いほどコスト大      |
| 感度  | ○       | 増菌培養+カクテル増幅により、多菌種同時検出でも公定法レベルの検出感度を達成 | ○   | 規格例: 100cfu(*3)/g  |

\*3: colony forming unitの略, コロニー(菌集落)を作る単位で、培養により増殖する細菌数を示す。

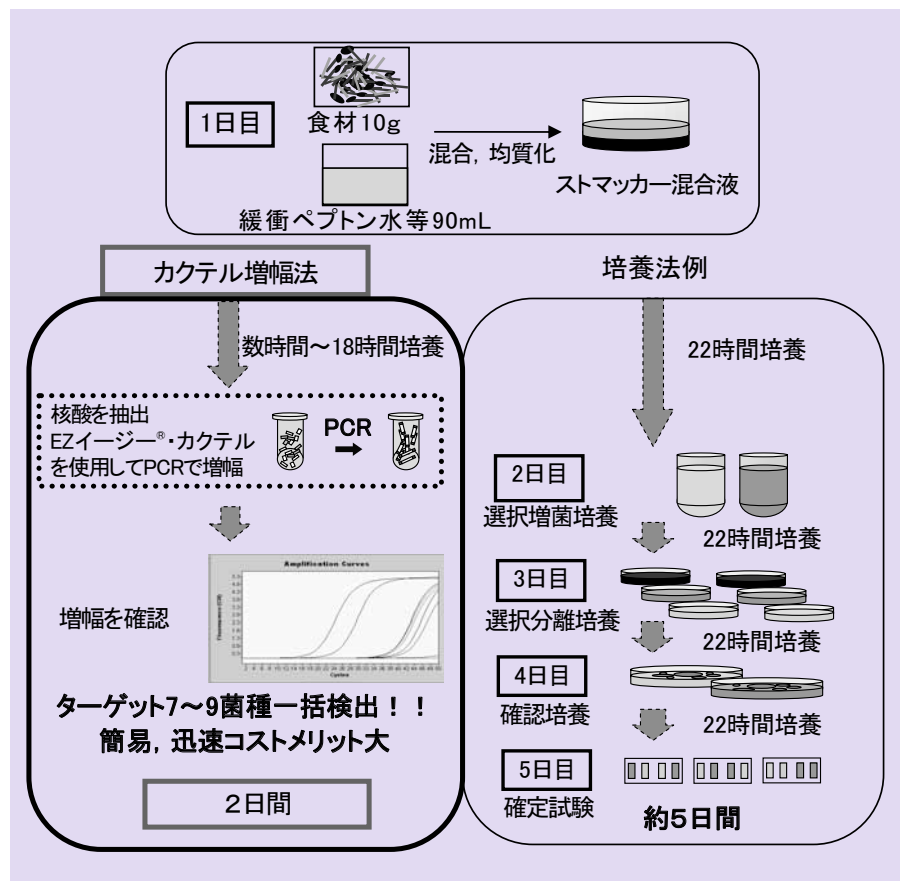


図1 食中毒細菌の検査方法の比較

つ特異的に増幅できる利点があるため、簡易迅速で試薬コストと労力を節約できる安価なスクリーニング手法となる。カクテル増幅法と培養法との比較を以下に示す(表1, 図1)。

(1) 迅速性: 培養法では結果取得まで5日間前後が必要だが、カクテル増幅法では当日または翌日判定が可能である。

(2) 効率性: 培養法は検出菌種に応じて、作業手順が異なり作業が煩雑だが、カクテル増幅法は同一操作で1回の遺伝子増幅反応により複数種の食中毒細菌由来の遺伝子を増幅することが可能であり、非常に効率的である。

(3) コスト: カクテル増幅法では、(2)の理由から検出菌種が多いほど同時測定での試薬および所要工数の削減効果が大きくなる。

(4) 高感度かつ生菌検出: カクテル増幅法では試料の増菌培養0時間と数時間~18時間後を比較し、増殖した菌のDNAをターゲットとして遺伝子増幅を行うことにより、培養法と同等の感度と生菌検出が可能となっている。

## 2.2 原理

カクテル増幅法の基本原理はマルチプレックスPCR法(\*4)を応用したものである。通常マルチプレックスPCR法ではプライマーのTm値(\*5)をできるだけ揃え、各プライマーの感度を維持する必要があるが、感度を考慮するとプライマー配列の設計範囲に限られ、特異性を犠牲にすることとなる。一方、特異性を考慮すると各プライマーの感度を犠牲にすることとなる。マルチプレックスPCR法では各遺伝子の増幅効率に違いが生じ易く、検出対象細菌種を増やすほど検出感度が低下する原因となる。

江崎らが開発したカクテル増幅法を図2に示す。カクテル増幅法は非特異で共通配列のタグ配列を付けた特異配列プライマーとタグ配列プライマーとを混合し、初期の特異配列プライマーでの特異的増幅と初期増幅後のタグ配列プライ

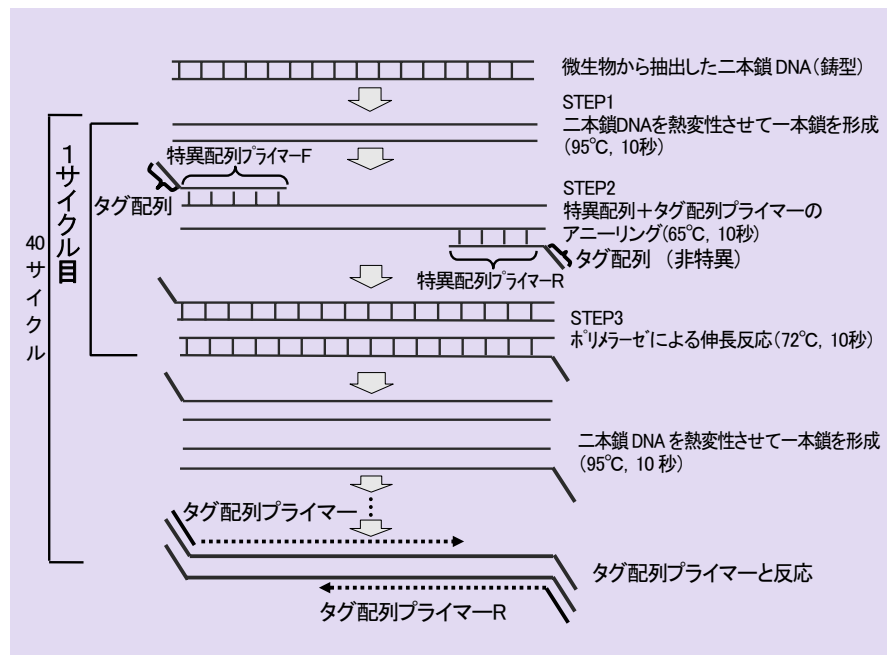


図2 カクテル増幅法の原理

マーでの増幅とを分割させることで、マルチプレックスPCRの短所を解決することに成功した<sup>3)</sup>。具体的に説明すると、増幅反応の初期段階(図2中の1サイクル目)は特異配列プライマーと検出対象遺伝子がアニーリングし、増幅反応が進行する。その後の増幅反応は、タグ配列プライマーで行うことにより、特異性および感度を犠牲にせず、複数種の検出対象細菌遺伝子の同一条件下での増幅が可能となる仕組みである。

## 3 開発したEZイージー®・カクテルの内容および測定方法

カクテル増幅法を用いて当社が開発した食中毒菌検出キットであるEZイージー®・カクテルの検出対象細菌種および標的遺伝子を表2にまとめた。標的遺伝子は検出対象細菌が保有している毒素遺伝子とハウスキープング遺伝子(\*6)である16SrRNAおよび*dnaJ*が対象となっている。*dnaJ*は、プライマーの設計において通常使用される16SrRNAの配列より、特異性が高い場合があることが近年の江崎教授らの研究で判明しており、大腸菌や黄色ブドウ球菌等の特異遺伝子検出のターゲットとし

て有用な領域である<sup>3), 4), 5)</sup>。

現在、販売しているEZイージー®・カクテルは、9菌種10遺伝子検出用と7菌種8遺伝子検出用の2種類があり、それぞれタグ付き特異配列プライマーおよびタグ配列プライマーを混合しているキットである。本キットは図2に示すカクテル増幅法で標的遺伝子の高感度一括増幅が可能であり、表1で説明したように簡易、迅速で試薬コストおよび作業時間が大幅に削減できるため、食中毒細菌の有無のスクリーニング手法として非常に有用である。

なお、カクテル増幅法で陽性判定の場合、表2の通りTm値が近接していることから菌種の特定が困難である。そのため、個別検出用キットであるEZイージー®・プライマーを用いて個別判定を行うことで菌種の特定が可能である。

## 4 スパイク試験によるEZイージー®・カクテルを用いたカクテル増幅法の評価<sup>6)</sup>

スパイク試験とは、たとえば牛乳には大腸菌、豚挽肉にはサルモネラ菌の段階希釈した菌液をそれぞれ食材に添加し、増菌培養した培養液のDNAを抽出した

後、カクテル増幅法により検出感度を検証する試験である。

4.1 実験

検査対象細菌種と食材との関係を以下に示す。セレウス菌はパックご飯、カンピロバクター菌は鶏ささみ、リステリア菌は生ハム、サルモネラ菌は豚挽肉、黄色ブドウ球菌はハンペン、腸炎ビブリオ菌およびコレラ菌はマグロ刺身、大腸菌およびエルシニア菌は牛乳について9菌種、7食材の組み合わせで実施した。

前処理フロースキームを図3に示す。本工程は次の3工程に大別される。食材の前処理工程は、食材の各10g(mL)に緩衝ペプトン水90mLを添加してストマッカーを用いて均質化処理を行った後、食材を均質化した懸濁液40mLを分取し、遠心分離後の残渣に数cfu/mL~10<sup>3</sup>cfu/mLに調製した菌液2mLを添加する工程である。培養工程(\*9)は、二酸化炭素を封入して9菌種の検出対象細菌を一括して増殖できるEZイージー®・プロスを用いて、菌液を添加した食材残渣懸濁試料を37℃で18時間培養する工程である。核酸抽出工程は、培養0時間および培養18時間後の培養液2mLを分取し、遠心分離後の残渣の核酸をEZイージー®・ビーズで物理的破碎により抽出する工程である。

検出対象遺伝子の増幅は、抽出したDNAと9菌種10遺伝子検出用のEZイージー®・カクテルとで図2に示す条件で一括増幅を行った。判定はリアルタイムPCR (ABI: STEP ONE PLUS) を用いてTm値の測定により行った。

4.2 検討結果

スパイク試験により得られた各検出対象細菌の検出感度を表3に、大腸菌の最低添加濃度(40cfu/g未満)での遺伝子増幅およびTm値の測定例を図4に示す。

図4は培養0時間と培養18時間後のDNA抽出試料の遺伝子増幅に明確な差が認められたことおよび培養18時間後で

腸菌標的遺伝子のTm値が測定されたことから、培養により増殖した大腸菌が検出された例、つまり大腸菌の生菌検出を示

している。なお、培養0時間においても遺伝子増幅が確認されるが、これまでの実績からTm値が78±1℃の場合、プライ

表2 EZイージー®・カクテルの検出対象細菌種および標的遺伝子 (Tm値, 増幅サイズ) の関係

| 細菌種   | 標的遺伝子                  | Tm 値 (°C) |
|---|------------------------|-----------|
| <i>Bacillus cereus</i> (セレウス菌) (*7)                           | <i>cesB</i> (*8) (嘔吐毒) | 80-81     |
|   | NHENT (*8) (下痢毒)       | 80-81     |
| <i>Campylobacter jejuni</i> group (カンピロバクター属菌)                | 16SrRNA                | 80-81     |
| <i>Escherichia coli</i> - <i>Shigella</i> spp. (大腸菌・赤痢菌) (*7) | <i>dnaJ</i>            | 82-83     |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (リステリア菌) (*7)                   | <i>dnaJ</i>            | 80-81     |
| <i>Salmonella</i> spp. (サルモネラ属菌) (*7)                         | <i>invA</i> (*8)       | 83-84     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (黄色ブドウ球菌) (*7)                   | <i>dnaJ</i>            | 83-84     |
| <i>Vibrio cholerae</i> (コレラ菌)                                 | <i>Cta</i> (*8)        | 80-81     |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (腸炎ビブリオ菌) (*7)                 | <i>Tdh</i> (*8)        | 80-81     |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> (腸炎エルシニア菌) (*7)                | <i>dnaJ</i>            | 84-85     |

\*7: 7菌種8遺伝子検出用EZイージー®・カクテルの検出対象細菌種  
\*8: それぞれの細菌種が保有している毒素遺伝子

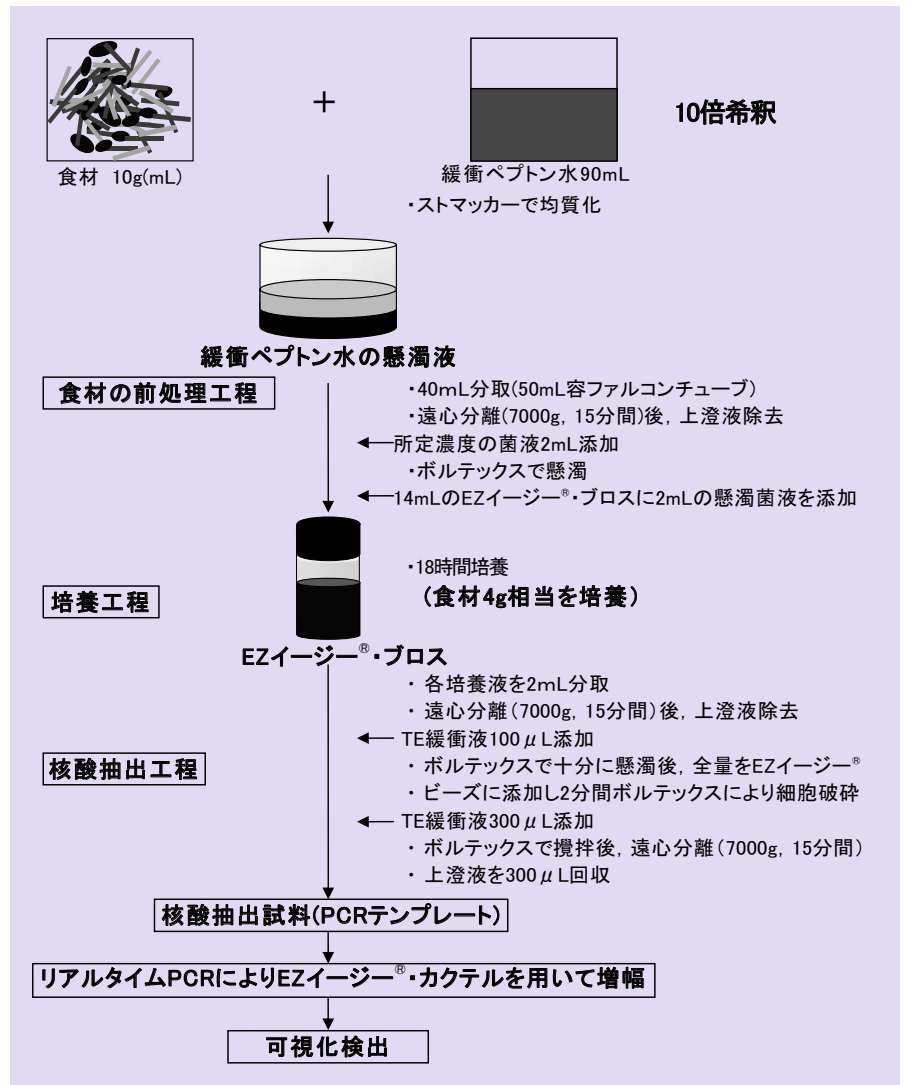


図3 スパイク試験の前処理フロースキーム

マーダイマー (\*10) による増幅であることが確認されている。

表3に示したように各検出対象細菌の検出感度はカンピロバクター菌で40cfu/g、他の8菌種で最低濃度の40cfu/g未満であり、すべての菌種で高感度検出を確認し、良好な結果を示した。

## 5 まとめ

スパイク試験によりEZイージー®・カクテルを用いたカクテル増幅法の検出感度を検証した結果、すべての検出対象細菌で40cfu/g以下の高感度検出を確認した。

以上のことから、増菌培養にEZイージー®・カクテルを用いたカクテル増幅法を組み合わせることで、検査開始から当日または翌日には7菌種または9菌種の生きた食中毒細菌を一括して高感度検出が可能であり、本測定法は簡易迅速および安価に食中毒細菌有無の確認が行えるスクリーニング試験として非常に有用であることが確認できた。

## 6 おわりに

近年のHACCPやISO22000などによる品質管理システムの普及により、食品業界の品質チェックやトラブル対策などで微生物試験の範囲は拡大してきており、かつ、迅速な試験結果の提出が強く求められてきている。また、微生物試験なしでバイオハザードのリスク管理は考えられないことから、我々はこうした社会や顧客のニーズに応えるため、今後とも積極的に微生物試験技術の開発や実用化を目指して行きたい。

表3 スパイク試験による検出感度検証結果

単位: cfu/g

| 試料    | セレウス菌 | カンピロバクター菌 | リステリア菌 | サルモネラ属菌 | 黄色ブドウ球菌 | コレラ菌 | 腸炎ビブリオ菌 | 腸炎エルシニア菌 | 大腸菌・赤痢菌 |
|-------|-------|-----------|--------|---------|---------|------|---------|----------|---------|
| バックご飯 | 40>   |           |        |         |         |      |         |          |         |
| 鶏ささみ  |       | 40        |        |         |         |      |         |          |         |
| 生ハム   |       |           | 40>    |         |         |      |         |          |         |
| 豚挽肉   |       |           |        | 40>     |         |      |         |          |         |
| ハンペン  |       |           |        |         | 40>     |      |         |          |         |
| マグロ刺身 |       |           |        |         |         | 40>  | 40>     |          |         |
| 牛乳    |       |           |        |         |         |      |         | 40>      | 40>     |

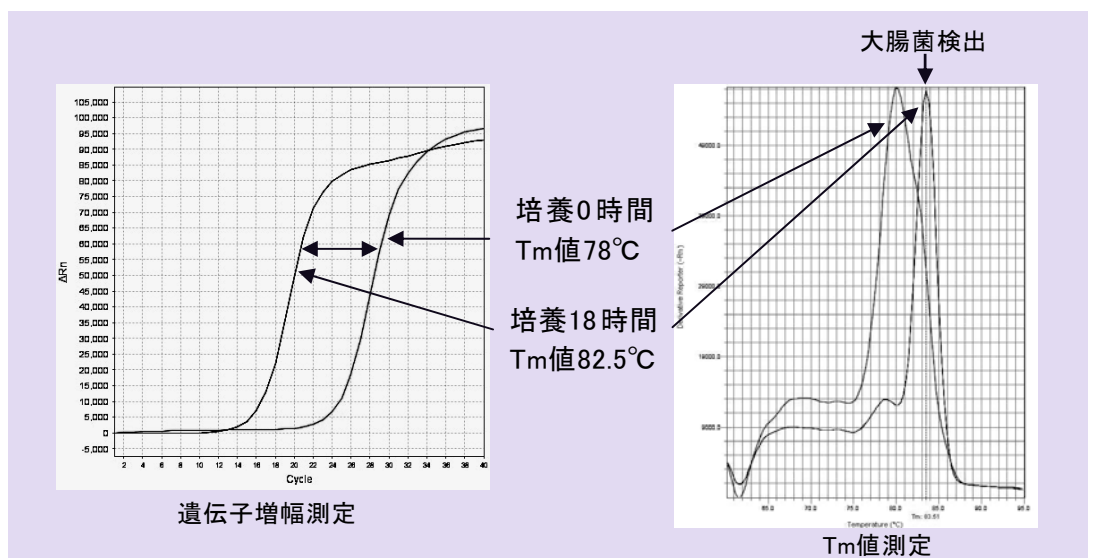


図4 リアルタイムPCR装置を用いた遺伝子増幅、Tm値測定での大腸菌検出例 (添加濃度40cfu/g未満)

## 注 釈

\*1: 2本鎖DNAを熱変性させて1本鎖を形成、プライマー (\*2) と標的遺伝子の反応 (以下、アニーリングという)、ポリメラーゼを介した伸長反応の3段階でDNA合成反応を行うことにより、標的領域のDNAを特異的かつ大量に増幅させることができる手法

\*2: PCR法において標的領域のDNAを増幅する時に使用されるDNA断片で、増幅したいDNA領域の両端に結合するDNA配列を有する。

\*4: 複数種のプライマーを混合して、1回のPCRで多種の検出対象遺伝子を増幅させる方法

\*5: Melting Temperature (融解温度) の略で二本鎖核酸の溶液を加熱し、全体の半分の分子が一本鎖状態 (熱変性した状態) になるときの温度。

\*6: エネルギー代謝等、細胞機能の維持に必要なで細胞中に共通して一定量発現する遺伝子群

\*9: 図3では培養18時間のプロトコルであるが、増殖が速い細菌種 (腸炎ビブリオ菌、セレウス菌及び黄色ブドウ球菌) では、4時間培養で40cfu/gの検出感度を確認している。このため、検出下限値の規格や検出対象細菌種の組み合わせにより培養時間を短縮でき、当日判定が可能となる場合がある。

\*10: PCRにおいてプライマー同士が部分的に反応し、お互いを鋳型として増幅する現象

## 文 献

- 1) 厚生労働省監修: 「食品衛生検査指針 微生物編」, 日本食品衛生協会 (2004)
- 2) 西島 裕人, 増山 博幸: 「これからの微生物検出について (簡易・迅速測定法を中心に)」 SCAS NEWS 2005-II, pp.7-10
- 3) 江崎孝行: 日本食品微生物学会雑誌, 26 (3) pp.150-157 (2009)
- 4) T.Ezaki et al.: *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. Syst. Appl. Microbiol. 30, pp.309-315 (2007)
- 5) T.Ezaki et al.: *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. Syst. Evol. Microbiol. 57, pp.25-30 (2007)
- 6) 西島 裕人, 高原 達夫, 窪田 佐代子, 吉田 滋, 江崎 孝行: 第97回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, p.45 (2009)



西島 裕人  
(にしじま ひろと)  
大分事業所