

## InvA 遺伝子増幅と 16S rDNA 塩基配列解析による 鶏レバーのサルモネラ迅速検査

細井知弘, 三枝静江

### Rapid Analysis of *Salmonellae* Contamination of Chicken Liver Based on *invA* Gene and 16S rDNA

Tomohiro Hosoi, Shizue Saegusa

Food contamination by *Salmonella* spp., especially *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* serotype Enteritidis often causes foodborne disease and human salmonellosis infection. Here, we tried to examine whether commercially available chicken liver was contaminated by *Salmonella* spp. based on *invA* gene amplification and sequence analysis of 16S rDNA. After non-selective enrichment of bacterial cells in Trypticase Soy broth, four kinds of bacterial strains were isolated by colony characteristics on deoxycholate hydrogen sulfide lactose agar plates from the sample. Two of the four strains formed black colonies induced by H<sub>2</sub>S production. It could not be confirmed whether these two strains were *Salmonella* spp. by their characteristics in triple sugar iron agar and lysine indole motility medium tubes. However, these strains were shown not to be *Salmonella* spp. by polymerase chain reaction amplification of *invA* gene, which almost *Salmonella* spp. possess. These bacteria were identified as *Proteus mirabilis* by sequence analyses of their 16S rDNA.

(Accepted Feb. 15, 2002)

食品の微生物汚染は、腐敗や食中毒などの原因となり得る<sup>1)~3)</sup>。したがって、食品の品質管理を行う上で、材料や製品等の微生物検査は極めて重要な役割を果たす。従来、食中毒菌等の特定微生物の検出には、選択培地を用いた培養及び分離と、性状試験等による方法が主に用いられてきたが、多大な労力、時間及び経験を必要とすることが多かった。しかしながら最近では、分子生物学的手法の発達により、対象微生物が有する遺伝情報を利用した検査方法が多く開発され普及してきている<sup>4)~9)</sup>。これらの方法は、従来法に比べ比較的簡便で短時間に結果が得られることが特徴である。特に、微生物が特異的に保持する遺伝子を polymerase chain reaction (PCR) で増幅し検出する方法や、16S リボソーム DNA (16S rDNA) 領域の塩基配列解析による菌種同定法は、特定微生物の検出及び同定を行う際に、頻繁に利用されている方法である。

本報告では、鶏レバーを供試材料とし、多くの食中毒の原因菌とされるサルモネラの検出を、従来の培養及び性状試験と、PCR によるサルモネラ特異的 *invA* 遺伝子の検出により試みた。また分離された細菌の菌種同定を 16S rDNA 塩基配列解析により行った。

#### 実験方法

##### 1. 鶏レバーからの細菌分離

市販鶏レバーを9倍量のトリプチケースソイブイヨン培地 (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) で 35℃, 24 時間培養後、培養液を白金耳で deoxycholate hydrogen sulfide lactose (DHL) 寒天培地 (日水製薬) に平板塗抹し、35℃, 24 時間培養した。生じたコロニーから性状の異なる 4 株を選択し、さらに DHL 培地上で平板塗抹を 2 回繰り返して、純粋分離を行った。

## 2. 分離細菌の性状試験

分離細菌 4 株と、対照として *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* serotype Enteritidis (*S. enteritidis*) JCM 1652 及び *Escherichia coli* JCM 1649<sup>T</sup> を、triple sugar iron (TSI) 寒天培地 (栄研化学) と lysine indol motility (LIM) 寒天培地 (日水製菓) にそれぞれ接種・塗抹し、35℃、24 時間培養後に性状を試験・判定した。

## 3. *invA* 遺伝子の PCR による検出

分離細菌 4 株と、対照として *S. enteritidis* JCM 1652 及び *E. coli* JCM 1649<sup>T</sup> をそれぞれトリプチケースソイブイオン培地 (BBL) で 35℃、24 時間培養し、その培養液 4 $\mu$ l と蒸留水 196 $\mu$ l を混合して 95℃、5 分加熱し DNA を抽出した。遠心分離後 (12000rpm, 4℃, 10 分)、それぞれの上清 50 $\mu$ l とサルモネラ検出用 One Step PCR Screening Kit (宝酒造) 添付 Mg<sup>2+</sup> Solution 8 $\mu$ l を上記キットの Solution tube に添加し、キット指定の条件にてサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) を用いて PCR を行った。反応液を、GelStar 溶液 (BMA) を含む 2% アガロースゲル (Agarose L 03, 宝酒造) を用いて電気泳動 (Mupid-21, コスモ・バイオ) し、254nm の紫外線ランプ (Mineralight Lamp Model UVG-54, Ultra-Violet Products) を照射して、PCR 増幅産物を解析した。

## 4. 16S rDNA 塩基配列解析による菌種同定

分離細菌 4 株のうち硫化水素を産生した菌 A 及び B から、3 と同様に DNA を熱抽出し、16S rDNA の 5' 末端側の約 500 塩基をプライマー対 (Microseq 500 16S rDNA Kit, Applied Biosystems) を用いてサーマルサイクラー (Ramp speed を GeneAmp PCR System 9600 モードに変更) により増幅した。反応後、Microcon YM-100 (Millipore) を用いて精製し、シーケンス反応 (Microseq 500 16S rDNA Kit, Applied Biosystems) 後、Centri-sep カラム (Princeton) にて精製した。風乾後、Template suppression reagent (TSR, Applied Biosystems) に溶解し、DNA シーケンサー (ABI Prism 310, Applied Biosystems) にて塩基配列の解析を行った。結果を解析ソフト (16S rDNA sequence data base, Applied Biosystems) にて Full 解析及び日本 DNA データベースの Web site (URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) にて BLAST 解析を行った。

## 実験結果および考察

### 1. 分離細菌の性状試験

分離した細菌 4 株 (A~D) の DHL 培地上での性状を表 1 に示す。分離細菌 A 及び B は、サルモネラにおいて高頻度にみられる H<sub>2</sub>S 産生能を有していた。そこで、サルモネラの同定に必要とされる、TSI 寒天培地と LIM 寒天培地を用いた性状試験を行った (表 2 及び表 3)。細菌 A 及び B の TSI 培地上での性状は、対照の *S. enteritidis* JCM 1652 と同一であったが、LIM 培地上でのリジン脱炭酸反応は *S. enteritidis* JCM 1652 と異なり陰性であった。食品から高頻度で検出されるサルモネラは、リジン脱炭酸反応が陽性となる場合が多いことが知られているが、一部のサルモネラには、リジン脱炭酸反応が陰性となる株も存在する。したがって、未知の細菌 A 及び B がサルモネラかどうかの判断は、これらの試験結果のみでは不可能であった。サルモネラの同定を行うためには、さらに別の培地を用いた性状試験や血清を用いた凝集テストを行う必要があった<sup>10)</sup>。

表 1 鶏レバーより DHL 培地を用いて分離した 4 菌株の性状

分離細菌	コロニーの色	H <sub>2</sub> S 産生
A	Clear	+
B	Brown	+
C	Red	-
D	Clear	-

表 2 対照菌株と鶏レバーより分離した細菌の TSI 培地上での性状比較

細菌	乳糖・ 白糖資化性	ブドウ糖 資化性	ガス産生	H <sub>2</sub> S 産生
<i>S. enteritidis</i>	-	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	-
A	-	+	+	+
B	-	+	+	+
C	+	+	+	-
D	-	+	+	-

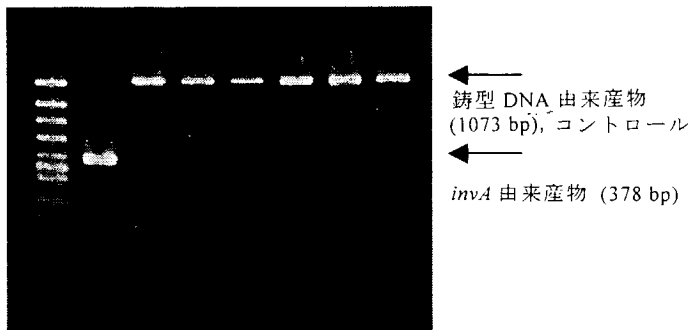
表3 対照菌株と鶏レバーより分離した細菌の LIM 培地上での性状比較

細菌	インドール 反応	リジン脱 炭酸	運動性
<i>S. enteritidis</i>	-	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+
A	-	-	+
B	-	-	+
C	+	+	-
D	-	+	+

## 2. サルモネラが有する *invA* 遺伝子の PCR を用いた検出

*invA* 遺伝子を用いて 99%以上のサルモネラを特異的に検出可能なことが報告されている<sup>11)</sup>。そこで、分離細菌がサルモネラであるかどうかを、PCR を用いた *invA* 遺伝子の増幅により検討した。遺伝子増幅産物をアガロースゲル電気泳動により解析した(図1)。分離細菌4株は全て *invA* 遺伝子を有しておらず、サルモネラではないことが示唆された。

1 2 3 4 5 6 7 8



1, 分子量マーカー(*Hinc* II); 2, *S. enteritidis*; 3, *E. coli*; 4, 細菌 A; 5, 細菌 B; 6, 細菌 C; 7, 細菌 D; 8, 蒸留水

図1 *invA* 遺伝子の PCR による検出

この PCR による検出では、培養による性状試験と比較して、結果の判断に主観が入りにくいとされている。また多種の微生物が混合している試料からも、標的微生物の特異的検出が理論的に可能であり、さらに多くのプライマーを用いて、同時に多種の微生物の検出を行うことも可能である。この場合、各種微生物に対応した選択培地を用いた単独コロニー分離が必要ないことも利点となる。しかしながら、標的微生物の全てが、対象遺伝子を保持しているかどうかは定かでは

なく、また DNA の抽出効率や遺伝子増幅の成否が、試験結果に影響するという欠点も有している。

## 3. 16S rDNA 塩基配列解析による細菌同定

分離細菌 A 及び B の菌種を同定することを目的として、16S rDNA の 5'末端側約 500 塩基の配列を解析した。図2に分離した細菌 A 及び B の 16S rDNA 5'末端領域塩基配列を示す。データベースと比較した結果、細菌 A 及び B の塩基配列は、*Proteus mirabilis* の配列と 100%一致し、細菌 A 及び B は *P. mirabilis* と推定された。一般に、98%以上の塩基配列一致が、菌種推定の判断基準とされている。

サルモネラの迅速な特異的検出法として、本報以外に、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) や、核酸ハイブリダイゼーション等を利用した方法も開発されている<sup>12)</sup>。従来の培養による検出方法に加え、これらの分子生物学的手法を用いた各種方法を比較検討して併用することにより、効率良く精度の高い微生物検査が可能になると考える。

```
TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACCGTGGCGGCAAGGCCTAACACATGC
AAGTCGAGCGGTAACAGGAGAAAGCTTGCTTTCTTGCTGACGAGCGGGGACGG
GTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTG
GCTAATACCCGATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGACT
ATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGC
GACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
CTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTC
AGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCTTATCAATTGACGTTACCCGAGA
AGAAGCACCCGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
```

図2 分離細菌 A 及び B の 16S rDNA 5'末端領域塩基配列

本報では、試料から多くの汚染細菌を分離するために、最初に非選択性のトリプチケースソイブイオン培地を用いて増菌を行った。特異的プライマーを数種用いた PCR にて、多くの微生物検出を同時に行おうとする場合には、今回のような非選択性の培地の使用が適していると考えられる。しかしながら、サルモネラの検出のみを目的とするのであれば、サルモネラ検出に適した増菌方法を、すなわち前培養に *Enterobacteriaceae* enrichment mannitol (EEM) プイオン培地等を用い、増菌培養にセレナイトシスチン培地またはラバポート培地等を用いることにより、サルモネラと類似した  $H_2S$  産生能を有する *Proteus* spp.

の増殖及び検出を抑制し、サルモネラの検出効率を高めることが望ましいと考える<sup>10)</sup>。

### 要 約

市販鶏レバーよりサルモネラの検出を試みた。トリプチケースソイブイオン培地で増菌後、DHL 培地を用いて性状の異なる4株の細菌を分離した、次にTSI培地、LIM 培地を用いて分離菌の性状を検討したが、サルモネラ汚染の有無を確定出来なかった。しかしながら、PCRによるサルモネラ特異的 *invA* 遺伝子の増幅結果から、分離細菌4株はサルモネラではないことが示された。16S rDNA 解析により、サルモネラと類似した性状を示した分離細菌は、*Proteus mirabilis* と推定された。食品の微生物検査において、このような遺伝子解析を利用した方法を用いることは、検査の精度及び効率を高める上で、非常に有効であると考えられる。

### 文 献

- 1) Kingsley, R.A. and Baumler, A.J., Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Mol. Microbiol.*, **36**, 1006-1014 (2000).
- 2) Plaut, A. G., Clinical pathology of foodborne diseases: notes on the patient with foodborne gastrointestinal illness. *J. Food Prot.*, **63**, 822-826 (2000).
- 3) Lee, W.C., Lee, M.J., Kim, J.S. and Park, S.Y., Foodborne illness outbreak in Korea and Japan studied retrospectively. *J. Food Prot.*, **64**, 899-902 (2001).
- 4) Gurtler, V. and Stanisich, V.A., New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, **142** (Pt 1), 3-16 (1996).
- 5) Busse, H.J., Denner, E.B. and Lubitz, W., Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnol.*, **47**, 3-38 (1996).
- 6) Kolbert, C.P. and Persing, D.H., Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 299-305 (1999).
- 7) Theron, J. and Cloete, T.E., Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.*, **26**, 37-57 (2000).
- 8) Ludwig, W. and Klenk, H-P., Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In "Bergey's manual of systematic bacteriology," 2nd ed. (Springer), pp. 49-65 (2001).
- 9) 中川恭好, 田村朋彦, 川崎浩子, 遺伝子解析法, 「放線菌の分類と同定」, 日本放線菌学会編, (日本学会事務センター, 東京), pp. 83-132 (2001).
- 10) 仲西寿男, サルモネラ, 「食品衛生検査指針 微生物編」, 厚生省生活衛生局監修, (日本食品衛生協会, 東京), pp. 118-146 (1990).
- 11) Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galan, J.E., Ginocchio, C., Curtiss, R. 3rd. and Gyles, C.L., Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes*, **6**, 271-279 (1992).
- 12) 小沼博隆, 熊谷進, 仲西寿男, サルモネラ, 「食品衛生検査指針 追補 II」, 厚生省生活衛生局監修, (日本食品衛生協会, 東京), pp. 7-17 (1996).  
(平成14年2月15日受理)