

液卵中サルモネラのリアルタイム PCR による迅速検出

細井知弘

Rapid Detection of *Salmonella* spp. in Liquid Egg by Real-Time PCR

Tomohiro Hosoi

A method to detect *Salmonella* spp. in liquid egg was developed using *invA* gene-targeted LightCycler real-time PCR after enrichment culture and DNA extraction by boiling. As a one-step enrichment culture medium, buffered peptone water or Trypticase Soy broth performed better than Rappaport broth or *Enterobacteriaceae* enrichment mannitol broth. By enrichment culture in buffered peptone water at 35 degrees C for 24 h, a small number of *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* JCM 1652 (1 CFU per 3 ml of liquid egg before enrichment) was detected by real-time PCR.

(Accepted Mar. 5, 2004)

食品の微生物による汚染は、腐敗や食中毒などの主要な原因となっている。食中毒統計によると、食中毒事件は依然として多発しており、サルモネラ汚染によるものは、2002年度（平成14年度）に465件、患者数5833名、死者2名の発生をみている¹⁾。感染症発生動向調査の結果からは、さらに多い2000件程度、すなわち1日5件程度の発生が疑われる²⁾。

したがって、食品の品質管理を行う上で、微生物汚染の対策を講じることは、製品の品質化・安全性確保を図る上で最も重要と考えられ、材料や製品等の微生物検査の実施が極めて重要な役割を果たす。近年、食中毒菌等の特定微生物の検出には、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。これらの方法は、従来の培養法に比べて、比較的簡便で短時間に正確な結果が得られることが特徴である。特に、ある微生物が特異的に保持する遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) で増幅し検出する方法は、特定微生物やその産生毒素の検出に頻繁に利用されている。短時間での正確な検査により、出荷前の製品の安全性確保が可能となり、事故発生を未然に防ぐことが容易となる。

本報告では、サルモネラに特異的な *invA* 遺伝子をターゲットとしたリアルタイム PCR により、液卵中サルモネラを迅速に検出する系を構築した。新たに設計したプライマーの特異性、PCR 検出に適した増菌培地の種類、増菌培養を併用した際の検出限界を明らかにした。

実験方法

1. 細菌株

Escherichia coli O157 188-4 株を除く細菌 15 株は、理化学研究所微生物系統保存施設 (Japan Collection of Microorganisms, JCM) より購入し使用した。*Escherichia coli* O157 188-4 株は、東京都立食品技術センターの保有株である。すべての菌株の培養は、トリプチケースソイブイヨン培地 (BBL, Becton Dickinson and Company) を用いて 30°C, 48 時間行い、滅菌蒸留水を用いて 2 度遠沈洗浄 (12000×g, 10 分) し、滅菌蒸留水に再懸濁したものを直ちに実験に供した。

2. プライマーの特異性確認

サルモネラおよび細菌検出用プライマーとして、それぞれサルモネラに特異的な *invA* 遺伝子³⁾ および細菌

すべてが保有する 16S rDNA の 5'末端側約 350 塩基⁴⁾を標的とするものを、日本遺伝子研究所に合成依頼し使用した。invA 遺伝子に特異的なプライマーの設計は、ソフトウェア Primer Express Version 1.5 (アプライドバイオシステムズ) を用いて行った。各プライマーの塩基配列を表 1 に示す。菌体 DNA の抽出は、上述の細菌懸濁液より、塩化ベンジルを主成分とする DNA 抽出キット (Isoplant II, ニッポンジーン) を用いて、指定の方法により行った。抽出 DNA の濃度は、分光光度計 (モデル Gene Spec III, 那珂インストルメンツ) を用いて 260nm の吸光度を測定することにより行い、濃度 0.01 μ g/ μ L にそれぞれ調製して、PCR 反応に供した。PCR 反応は、反応検出試薬 QuantiTect SYBR Green PCR (キアゲン) を用いて、リアルタイム PCR 機器のライトサイクラーシステム (ロシュ・ダイアグノステイクス) により行なった。PCR 反応条件は、初期熱変性を 95 $^{\circ}$ C, 15 分, サイクリングは熱変性を 94 $^{\circ}$ C, 15 秒, アニーリングを 56 $^{\circ}$ C, 30 秒, 伸長反応を 72 $^{\circ}$ C, 50 秒で 50~60 サイクルとした。増幅産物の融解曲線解析は、65 $^{\circ}$ C より 95 $^{\circ}$ C まで 0.1 $^{\circ}$ C/秒の昇温により行った。増幅産物の特異性の確認は、SYBR Green I nucleic acid gel stain 溶液 (BMA) を含む濃度 1.6~2.0% のアガロースゲル (Agarose, インビトロジェン) を用いた電気泳動 (Mupid-21, コスモ・バイオ) において、増幅産物のサイズを調べることに由り行った。

表1 プライマーの塩基配列

増幅遺伝子	プライマー塩基配列 (5'-3')	増幅産物サイズ(bp)
invA	sense TTTCTCTATTGTCACCGTGG	212
	antisense CGTCAAAGGAACCGTAAAG	
16S rDNA	sense GAGTTTGATCCTGGCTCAG	349*
	antisense CTGCTGCCTCCCGTAG	

**Escherichia coli* (position 9-357) の場合に相当

3. 液卵中サルモネラの増菌培養による検出

液卵は、市販卵の全卵を攪拌することにより調製した。人為的に添加する *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* JCM 1652 の菌体懸濁液の調製は、リン酸緩衝生理食塩水を用いるほかは、上述の方法と同様に行った。液卵中サルモネラの前培養用培地として、FeSO₄·7H₂O 添加 (64 mg/L) 緩衝ペプトン水 (自家調製), トリプチケースソイブイオン培地 (BBL), *Enterobacteriaceae* enrichment mannitol (EEM) 培地 (日

水製薬) およびラパポート培地 (栄研化学) を用いた。各培地を用いた増菌培養は、液卵 3mL に培地 27mL を添加しておこなった。生菌数測定は、各増菌培地の 10 倍段階希釈液をリン酸緩衝生理食塩水を用いて作成し、トリプチケースソイ寒天培地を用いた平板混釈法 (35 $^{\circ}$ C, 48 h 培養) により行った。増菌培養前後の培地に含まれる菌体からの DNA 抽出は、攪拌した各培地 1mL を沸騰水中で 10 分加熱により行い、遠沈上清 (12000 \times g, 10 分) を PCR に供した。リアルタイム PCR と電気泳動は、上述の方法と同様におこなった。

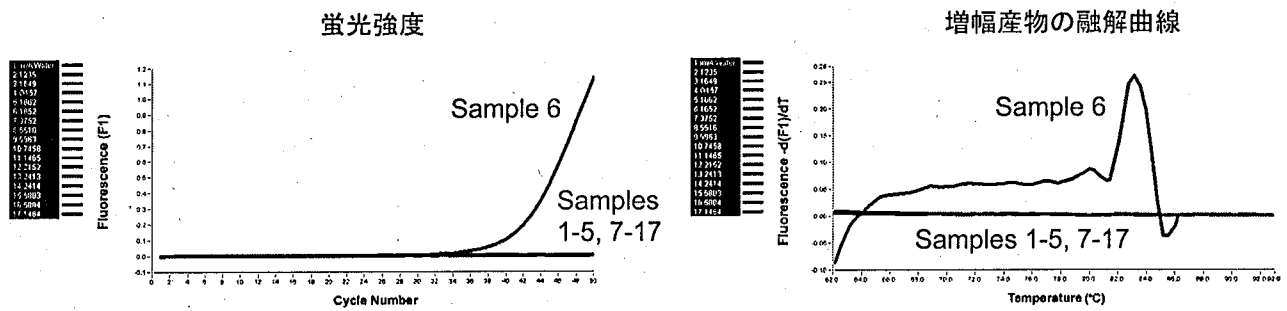
実験結果及び考察

1. プライマーの特異性確認

invA 遺伝子はサルモネラが特異的に保有する遺伝子とされ、100 以上の血清型を含むサルモネラ 630 株とサルモネラ以外の 142 菌株に対する invA 遺伝子を標的とした PCR により、サルモネラの 99.4% の株を特異的に検出可能であったことが報告されている³⁾。本研究で新たに設計した invA 遺伝子を標的とするプライマーを用いて、細菌 16 種由来 DNA あるいは蒸留水に対してリアルタイム PCR (50 サイクル) を行った際の、蛍光強度変化と増幅産物の融解曲線解析結果を図 1 に示す。サンプル 6 の *S. choleraesuis* ssp. *choleraesuis* JCM 1652 に対してのみ蛍光強度の上昇が認められ、融解曲線解析においても、83 $^{\circ}$ C 付近に主要なピークが生じた。また、このリアルタイム PCR の増幅産物と、対照として各種細菌 DNA の存在を確認するために行った 16S rDNA を標的としたリアルタイム PCR の増幅産物とともに回収し、アガロース電気泳動にて確認した (図 2)。invA 遺伝子に対する増幅については、サンプル 5 の *S. choleraesuis* ssp. *choleraesuis* JCM 1652 に対してのみ、予想される塩基数の単一バンドが認められた。また、16S rDNA に対するリアルタイム PCR については、すべてのサンプルにおいて、予想される塩基数のバンドが認められた。以上の結果から、設計した invA 遺伝子特異的プライマーは、サルモネラの特異的検出に機能すると判断した。

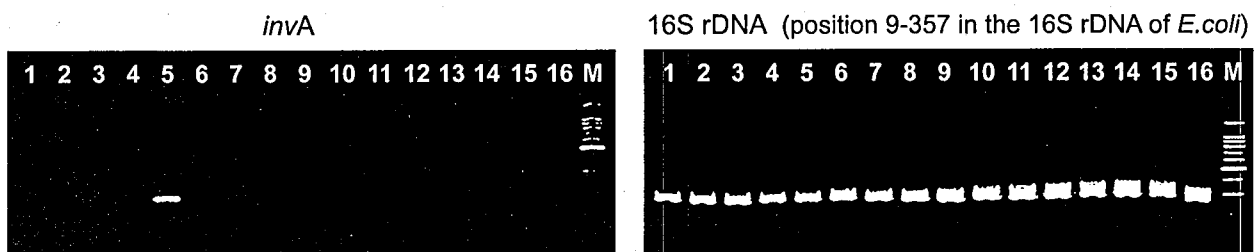
2. 増菌培地の検討

4 種の培地について、増菌効果とリアルタイム PCR による検出への影響を検討した。増菌前後の菌数を調べたところ、緩衝ペプトン水、トリプチケースソイブイオン培地、および EEM 培地が、ラパポート培地と比較して、増菌効果が高いことが判明した (表 2)。つぎに、増菌培養後の培地を 100 $^{\circ}$ C, 10 分間、沸騰水中



- 1, Water; 2, *Enterobacter aerogenes* JCM 1235; 3, *Escherichia coli* JCM 1649; 4, *Escherichia coli* O157 188-4;
 5, *Klebsiella pneumoniae* JCM 1662; 6, *Salmonella choleraesuis* JCM 1652; 7, *Vibrio fluvialis* JCM 3752;
 8, *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5516; 9, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5963; 10, *Flavobacterium odoratum* JCM 7458;
 11, *Bacillus subtilis* JCM 1465; 12, *Bacillus cereus* JCM 2152; 13, *Staphylococcus aureus* JCM 2413;
 14, *Staphylococcus epidermidis* JCM 2414; 15, *Enterococcus faecalis* JCM 5803; 16, *Enterococcus faecium* JCM 5804;
 17, *Micrococcus luteus* JCM 1464

図1 *invA*特異的プライマーを用いたLightCycler Real-time PCRにおける蛍光強度と増幅産物の融解曲線



- 1, *Enterobacter aerogenes* JCM 1235; 2, *Escherichia coli* JCM 1649; 3, *Escherichia coli* O157 188-4;
 4, *Klebsiella pneumoniae* JCM 1662; 5, *Salmonella choleraesuis* JCM 1652; 6, *Vibrio fluvialis* JCM 3752;
 7, *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5516; 8, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5963; 9, *Flavobacterium odoratum* JCM 7458;
 10, *Bacillus subtilis* JCM 1465; 11, *Bacillus cereus* JCM 2152; 12, *Staphylococcus aureus* JCM 2413;
 13, *Staphylococcus epidermidis* JCM 2414; 14, *Enterococcus faecalis* JCM 5803; 15, *Enterococcus faecium* JCM 5804;
 16, *Micrococcus luteus* JCM 1464; M, 100bp DNA ladder Marker (Takara Bio)

図2 *invA*および16S rDNA特異的プライマーを用いた各種細菌DNAに対するPCR増幅産物

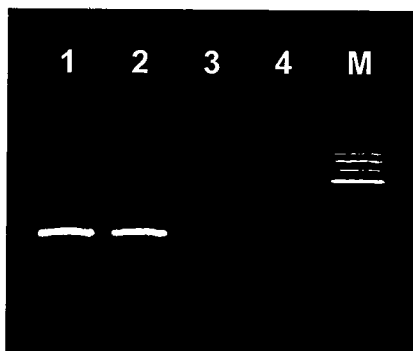
で加熱し、遠沈上清をDNA含有試料としてリアルタイムPCR (50 サイクル) を行った。その結果、緩衝ペプトン水、トリプチケースソイブイオン培地由来試料の順で、蛍光強度の上昇開始が認められ、EEM培地とラパポート培地由来の試料では上昇が認められなかった(データ未掲載)。また、リアルタイムPCR後の試料をアガロース電気泳動により確認したところ、蛍光強度の上昇が認められた2サンプルにおいてのみ、特異的な増幅が認められた(図3)。これまでに、EEM

培地に含まれるウシ胆汁末が0.075%以上PCR反応溶液中に存在するとPCR反応が阻害されること⁵⁾、またラパポート培地に含まれるMgイオンによりPCR反応を阻害される可能性があること⁶⁾が報告されている。したがって、増菌培養後の試料からPCRによりサルモネラの検出を行う場合には、培地の増菌効果だけでなく、PCR反応への培地成分の阻害作用とその回避方法(DNAの抽出・精製方法等)についても、検討することが重要と思われる。

細井：液卵中サルモネラの PCR 検出

表2 増菌培養後 (35°C, 24 h) のサルモネラ菌数

増菌培地	菌数 (CFU/mL)
緩衝ペプトン水	6.6×10^8
トリプテケースソイブイオン培地	1.2×10^9
<i>Enterobacteriaceae</i> enrichment mannitol (EEM) 培地	1.8×10^9
ラパポート培地	2.1×10^4

初発菌数： 3.7×10^2 CFU/mL

- 1, 緩衝ペプトン水
- 2, トリプテケースソイブイオン培地
- 3, ラパポート培地
- 4, *Enterobacteriaceae* enrichment mannitol 培地
- M, 100bp DNA ladder Marker (Takara Bio)

LightCyclerによるPCR増幅産物を、アガロース電気泳動により確認した

図3 各種培地で増菌した *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* JCM 1652のPCRによる検出

3. 増菌培養併用による少数サルモネラのPCR検出

最も良好な検出結果が得られた緩衝ペプトン水を用いて増菌培養を行い、どの程度の初発菌数の液卵中サルモネラを検出することが可能かどうかを検討した。液卵中に濃度を変化させて *S. choleraesuis* ssp. *choleraesuis* JCM 1652 を人為的に添加し、増菌培養前後の培地の加熱・遠心沈降を行い、遠沈上清を試料としたリアルタイムPCR (60 サイクル) によりサルモネラの検出を試みた。増菌培養を経ない場合には、菌濃度 2.5×10^6 CFU/3 mL 液卵 以上で増幅に伴う蛍光強度の上昇が認められ、アガロース電気泳動においても、その結果と一致する特異的増幅が認められた (図4)。一方、増菌培養を35°C, 24時間行なった場合には、初発菌濃度 1 CFU/3 mL 液卵 以上で増幅に伴う蛍光強度の上昇が認められ、アガロース電気泳動においても特異的増幅が認められた (図4)。以上の結果から、緩

衝ペプトン水を用いた増菌培養を行うことにより、非常に初発濃度が低い液卵中サルモネラを検出可能なことが示された。

本研究では、リアルタイムPCR機器を用いたが、通常の遺伝子増幅機器を適用することも可能であり、どちらの方法によっても、1週間程度を要する各種培地を用いた培養による検出・同定法⁷⁾と比較して、相当の時間短縮が可能である。今後、増菌培養条件、DNA抽出と濃縮の方法、プライマー、使用するPCR機器、DNA増幅試薬、PCR条件などの検討を一層進めることにより、さらなる検出感度の向上、ひいては、より短時間での増菌培養による少数サルモネラの検出が可能になると考える。

要 約

液卵中に存在するサルモネラを、増菌培養と菌体DNAの加熱抽出後に、*invA* 遺伝子を標的としたライトサイクラーリアルタイムPCRにより迅速検出する方法を構築した。本検出系では、前培養に用いる培地として、緩衝ペプトン水とトリプテケースソイ培地が良好な結果を示し、ラパポート培地と *Enterobacteriaceae* enrichment mannitol 培地は、適用不可能であった。緩衝ペプトン水を用いた前培養 (35°C, 24時間) により、初発菌数 1 CFU/3 mL 液卵という少数のサルモネラ *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* JCM 1652 が、リアルタイムPCRにより検出可能であった。

本研究の実験全般にわたり、実施・協力して下さった吉野亜紀氏に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省, 食中毒統計調査.
- 2) 国立感染症研究所, 感染症発生動向調査.
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) Rossen, L., Norskoy, P., Holmstrom, K., and

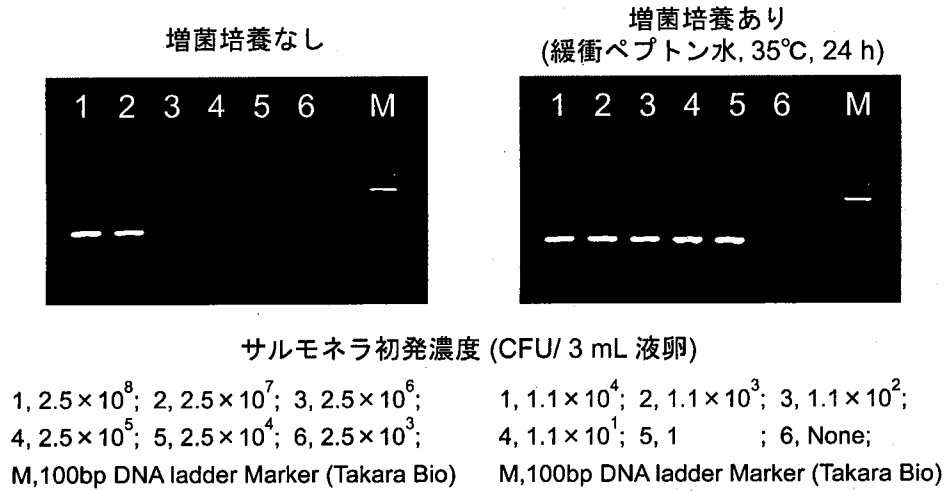


図4 初発菌数が異なる *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* JCM 1652 の PCR による検出

Rasmussen, O.F., Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**, 37-45 (1992).

- 6) キューピー株式会社, PCR を用いた液全卵からのサルモネラの迅速検査法, 「食品産業のためのバイオセンサー」, 社団法人農林水産先端技術産業

振興センター (バイオセンサー事業部会), (食品科学新聞社, 東京), pp. 131-160 (1998).

- 7) 細井知弘, 三枝静江, *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, 東京都立食品技術センター研究報告, **11**, 17-20 (2002).

(平成 16 年 3 月 5 日受理)