

リアルタイム PCR による納豆中の黄色ブドウ球菌の迅速検出

細井知弘

Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* in Natto Using Real-time PCR

Tomohiro Hosoi

Fermented soy foods made with *Bacillus subtilis*, such as natto, are produced in Japan and several other East Asian countries. During the manufacturing process, components of these products and their containers are touched or exposed to the environment, which causes contamination with other microorganisms. In this study, we attempted to develop a method for detecting a small number of *Staphylococcus aureus* in natto using the LightCycler real-time PCR system. By real-time PCR with a primer set for the *nuc* gene after an enrichment culture with Giolitti-Cantoni broth at 35°C for 20 h, *S. aureus* at a concentration of more than 12 CFU/30 g (in natto) was detected.

(Accepted Mar. 10, 2005)

枯草菌 *Bacillus subtilis* を用いて製造される大豆発酵食品は、日本や東南アジア諸国に存在し、日本では納豆 natto, 中国では dou chi, ネパールとミャンマーでは kinema, タイでは tua nao, 韓国では chungkuk-jang とそれぞれ呼ばれている。これらの食品は大豆由来成分と枯草菌が産生する物質を含み、その摂取により種々の有益な作用が得られるとされ、近年、プロバイオティクスのひとつとして認識されつつある¹⁾。

納豆の一般的な製造工程は、大豆を洗浄・浸漬後に蒸煮し（加圧水蒸気滅菌に相当）、枯草菌の1種である納豆菌 *B. subtilis* (natto) をおよそ 10⁴ CFU/g 大豆の濃度になるように噴霧・接種し、ポリスチレンや紙製のバックに機械充填後、発酵・冷却工程を経て出荷される。しかしながら、納豆菌接種後の大豆を、経木や稲わら、カップなどに手作業で充填する製品や、通常の工程を経て完成した納豆をさらに調味・天日干しした乾燥納豆なども商品化されている。これらの手作業や乾燥工程を経る納豆製品では、通常の納豆以上に納豆菌以外の微生物に汚染される可能性が高い。実際に、ブドウ球菌や大腸菌群、腸球菌などが納豆から検出されることもある。納豆は、通常、購入後非加熱で摂取

することが多いことから、品質保持や事故防止のためには納豆菌以外の微生物の汚染には細心の注意を払い、また、定期的に製品の微生物汚染検査を実施することが重要と思われる。

食品中の黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* の検出には、通常、黄色ブドウ球菌に選択性を有する寒天培地、例えば卵黄加マンニット食塩培地などが使用される。しかしながら、卵黄加マンニット食塩培地には枯草菌や納豆菌も速やかに発育するため、黄色ブドウ球菌に高濃度の枯草菌や納豆菌が共存する場合には、培地上での黄色ブドウ球菌に特徴的なコロニーの形成や、黄色ブドウ球菌による培地色の赤色から黄色への変化などが妨げられる場合がある。そのため、納豆から、本培地を用いて黄色ブドウ球菌を検出する場合には、黄色ブドウ球菌の検出感度が低下する恐れがある。

本研究では、枯草菌及び納豆菌を高濃度含む食品から、低濃度の黄色ブドウ球菌の検出を高感度に行う目的で、黄色ブドウ球菌が産生する核酸分解酵素 *nuclease* をコードする *nuc* 遺伝子^{2,3,4,5)}をターゲットとしたリアルタイム PCR (Polymerase chain reaction) により、黄色ブドウ球菌を検出する方法の構築を検討し

た。新たに設計したプライマーの特異性、黄色ブドウ球菌検出に対する共存する枯草菌の影響、Giolitti-Cantoni 培地による増菌培養を併用した際の黄色ブドウ球菌の検出感度等を明らかにした。

実験方法

1. 細菌株

Escherichia coli O157 188-4 と *Staphylococcus warneri* は、東京都立食品技術センターの保有株であり、それ以外の細菌 15 株は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (Japan Collection of Microorganisms, JCM) より購入した菌株である。すべての菌株の増菌培養は、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 回遠沈洗浄 (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

黄色ブドウ球菌及び細菌それぞれの検出用プライマーとして、*nuc* 遺伝子^{2,3,4,5}及び細菌すべてが保有する 16S rDNA の 5'末端側約 350 塩基を標的とするもの⁶を、日本遺伝子研究所に合成依頼し使用した。*nuc* 遺伝子に特異的なプライマーの設計は、*nuc* 遺伝子の配列を DNA Data Bank of Japan より入手し (Accession Number, V01281), 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及び予想される PCR 増幅産物のサイズを表 1 に示す。菌体 DNA の抽出は、上述の細菌懸濁液より DNA 抽出キット (Isoplant II, ニッポンジーン及び DNeasy Plant Mini Kit, キアゲン) 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 µg/µL にそれぞれ調製して、PCR に供した。PCR は、リアルタイム PCR 機器であるライトサイクラーシステム (ロシュ・ダイアグノスティクス) により、反応検出試薬 QuantiTect SYBR Green PCR (キアゲン) を指定の方法で用いて行なった (テンプレート DNA 含有試料 2 µL, プライマー溶液 (10 pmol/µL) 各 1 µL, 反応溶液総量 20 µL)。PCR 条件は、初期熱変性を 95°C, 15 分間、サイクリングは、熱変性を 94°C, 15 秒間、アニーリングを 56°C, 30 秒間、伸長反応を 72°C, 50 秒間で、50 サイクルとした。蛍光強度と増幅産物の融解曲線の解析は、LightCycler

Software version 3.5.28 により行った。融解曲線解析は、65°C より 95°C まで 0.1°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)
<i>nuc</i>	sense	AGGGATGGCTATCAGTAATG	114
	antisense	GCTGAGCTACTAGACTTGAAA	
16S rDNA	sense	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	349*
	antisense	CTGCTGCCTCCCGTAG	

**Escherichia coli* (position 9-357) の場合

3. 枯草菌・黄色ブドウ球菌混合懸濁液からの黄色ブドウ球菌の検出

枯草菌 *Bacillus subtilis* JCM 1465 (最終濃度 3.0×10^5 CFU/mL あるいは 3.0×10^7 CFU/mL) と黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* JCM 2413 (最終濃度 9.2×10^2 CFU/mL ~ 9.2×10^7 CFU/mL) の蒸留水懸濁液を調製した。テンプレート DNA 含有試料として、菌懸濁液 2 µL を PCR 溶液に直接添加し、サイクル数のみ 70 に変更した以外は上述の条件と同様にして PCR を行った。

4. 納豆中黄色ブドウ球菌の増菌培養による検出

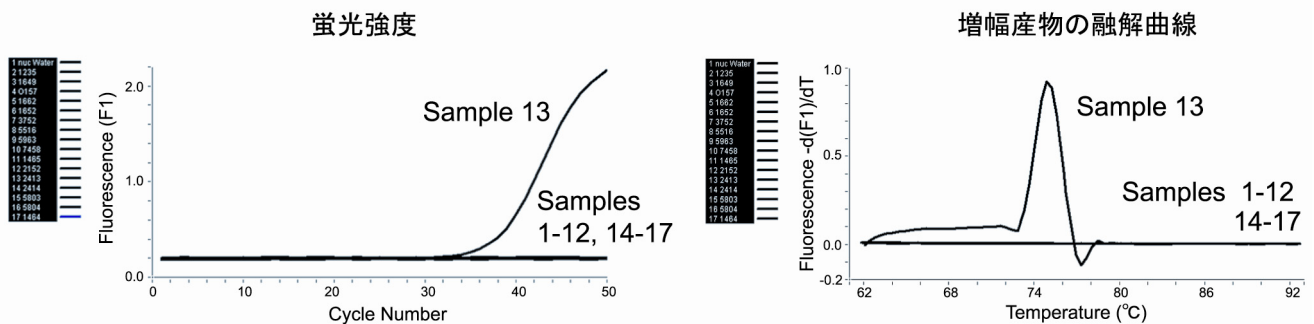
納豆は、市販の小粒納豆を購入して供試した。納豆菌を 1.0×10^9 CFU/g 以上含む納豆 30g を、Potassium tellurite trihydrate 未添加の Giolitti-Cantoni 培地 (メルク) 50mL に添加し、黄色ブドウ球菌を人為的に添加した (最終濃度 0 ~ 1.2×10^9 CFU/30g 納豆)。増菌培養 (35°C, 20 時間) 前後に、リアルタイム PCR により黄色ブドウ球菌の検出を行った。リアルタイム PCR の条件は、初期熱変性を 95°C, 15 分間、サイクリングは、熱変性を 94°C, 15 秒間、アニーリングを 56°C, 40 秒間、伸長反応を 72°C, 50 秒間で、70 サイクルとした。なお、PCR に用いるテンプレート DNA 含有試料は、以下のようにして調製した。納豆と培地を攪拌後 3 分間静置し、その上部 1 mL を遠心沈降 (12000×g, 10 分間) させたのち、100 µL の滅菌蒸留水に再懸濁した。懸濁物を、沸騰水中で 10 分間加熱後、10 分間氷冷し、その遠心上清 (12000×g, 10 分) をテンプレート DNA 含有試料とした。

実験結果及び考察

1. プライマーの特異性

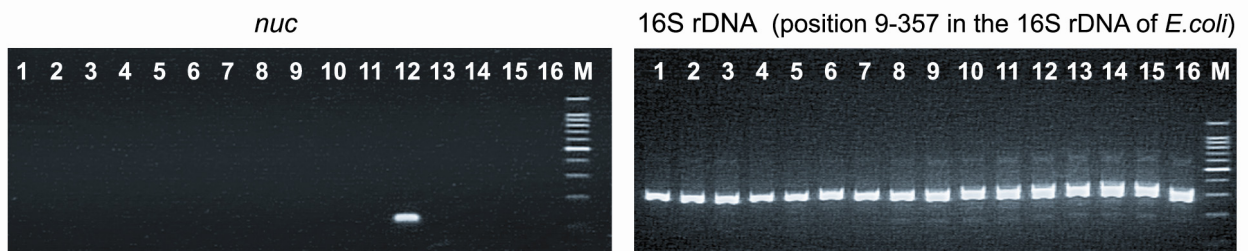
黄色ブドウ球菌が細胞外に産生する *nuclease* は、熱安定酵素で 100°C、1 時間の加熱に耐性を有しており、DNA と RNA を切断する酵素である⁴⁾。本研究では、本酵素をコードする *nuc* 遺伝子を標的としたプライマー対を新たに設計し用いた。細菌 16 種より抽出した DNA あるいは蒸留水に対してリアルタイム PCR (50 サイクル) を行った際の、蛍光強度変化と増幅産物の

融解曲線解析結果を図 1 に示す。サンプル 13 の *S. aureus* JCM 2413 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、75°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)。 *nuc* 遺伝子に対する増幅については、サンプル 12 の *S. aureus* JCM 2413 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



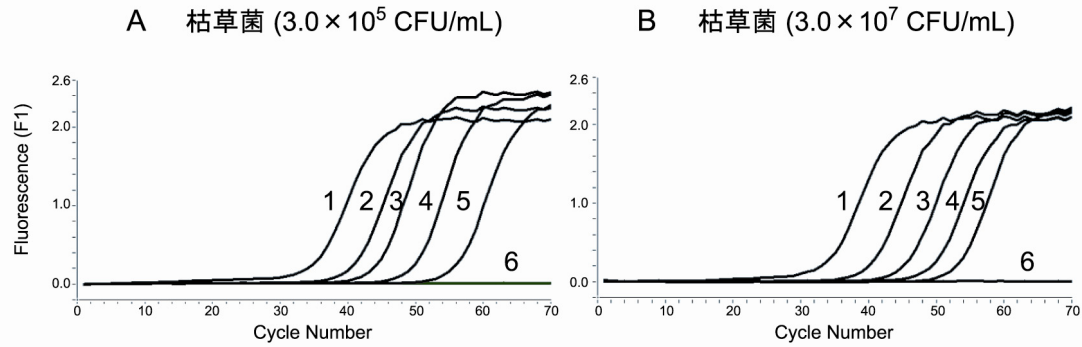
- 1, Water; 2, *Enterobacter aerogenes* JCM 1235; 3, *Escherichia coli* JCM 1649; 4, *Escherichia coli* O157 188-4;
5, *Klebsiella pneumoniae* JCM 1662; 6, *Salmonella choleraesuis* JCM 1652; 7, *Vibrio fluvialis* JCM 3752;
8, *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5516; 9, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5963; 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 各種細菌DNAに対し、*nuc*遺伝子特異的プライマーを用いて LightCycler real-time PCRを行った際の蛍光強度変化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 各種細菌DNAに対し、*nuc*遺伝子及び16S rDNA特異的プライマーを用いて real-time PCRを行った際の増幅産物



黄色ブドウ球菌濃度 (CFU/mL): 1, 9.2×10^7 ; 2, 9.2×10^6 ; 3, 9.2×10^5 ; 4, 9.2×10^4 ; 5, 9.2×10^3 ; 6, 9.2×10^2

図3 枯草菌及び黄色ブドウ球菌を含む細菌懸濁液からの real-time PCR による黄色ブドウ球菌の検出

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。また、図中に示したブドウ球菌の1種 *S. epidermidis* に対してのみならず、別のブドウ球菌 *S. warneri* に対しても、*nuc* 遺伝子特異的な増幅産物が生じないことを確認した（データ未掲載）。Brakstad らは、*nuc* 遺伝子を標的とした本研究とは異なるプライマー対を用いた PCR を、90 株の黄色ブドウ球菌 *S. aureus* と黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌属細菌 16 種 80 菌株に対して行ったところ、黄色ブドウ球菌のみを 100% 特異的に検出可能だったことを報告している³⁾。*nuclease* の活性は、黄色ブドウ球菌 *S. aureus* 以外にも、*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* などのブドウ球菌で認められることから^{3, 5)}、本研究において新たに設計した *nuc* 遺伝子特異的なプライマーの黄色ブドウ球菌のみに対する特異性の確認には、さらに詳細な検討を必要とするが、本プライマーは、*S. aureus* JCM 2413 に対し偽陰性を示さなかったことから、黄色ブドウ球菌の1次スクリーニングには機能すると判断した。そこで、本プライマーを用いて、以後の枯草菌・納豆菌と共存する黄色ブドウ球菌の検出の検討を進めた。

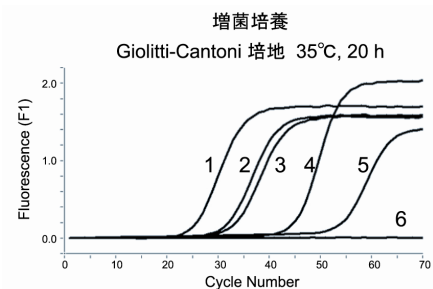
2. 黄色ブドウ球菌検出に対する共存する枯草菌の影響

共存する枯草菌が黄色ブドウ球菌の検出に影響を及ぼすかについて、枯草菌・黄色ブドウ球菌混合懸濁液を用いて検討した。その結果、枯草菌の濃度（最終濃度 3.0×10^5 CFU/mL 及び 3.0×10^7 CFU/mL）の影響は受けずに、黄色ブドウ球菌の検出が可能であった（図3）。本結果から、比較的高濃度の枯草菌が共存しても、黄色ブドウ球菌の検出に与える影響は少ないと思われるので、続いて、高濃度の納豆菌を含む納豆製品からの黄色ブドウ球菌の検出を検討した。

3. 増菌培養併用による納豆からの黄色ブドウ球菌の検出

納豆中の低濃度の黄色ブドウ球菌を検出する目的で、Giolitti-Cantoni 培地による増菌培養を併用した際の PCR による黄色ブドウ球菌検出感度を検討した。増菌培養を 35°C 、20 時間行なった場合には、PCR により、初発菌濃度 12 CFU/30 g 納豆以上で増幅に伴う蛍光強度の上昇が認められ（図4）、アガロース電気泳動においても特異的な増幅が認められた。このとき、培地は全体が褐色に変化していた。また増菌培養を全く行わない場合には、黄色ブドウ球菌の初発菌濃度が、 1.2×10^8 CFU/30 g 納豆以上という高濃度のときのみ、増幅に伴う蛍光強度の上昇が認められた（データ未掲載）。

納豆菌とともに少数の黄色ブドウ球菌を添加して製造した納豆では、ときに増菌培養を経ずに本法により黄色ブドウ球菌が検出可能となるほど、発酵工程中に、納豆菌と黄色ブドウ球菌は増殖した（データ未掲載）。したがって、本研究で構築した増菌培養と PCR による黄色ブドウ球菌検出法の感度（初発菌濃度 12 CFU/30g 納豆以上）は、納豆中の黄色ブドウ球菌の検出に、十分実用的で要求を満たすものと思われる。



黄色ブドウ球菌初発濃度 (CFU/30 g 納豆)
1, 1.2×10^8 ; 2, 1.2×10^6 ; 3, 1.2×10^4 ;
4, 1.2×10^2 ; 5, 1.2×10^1 ; 6, 未添加

図4 黄色ブドウ球菌を人為的に添加した納豆からの real-time PCR による黄色ブドウ球菌の検出

要 約

日本や東南アジア諸国では、枯草菌 *Bacillus subtilis* を利用した大豆発酵食品が製造されているが、製造工程中に様々な微生物に汚染される可能性が存在する。しかしながら、黄色ブドウ球菌に汚染された場合に、高濃度の納豆菌や枯草菌と共存する低濃度の黄色ブドウ球菌を、黄色ブドウ球菌用選択寒天培地で検出することは困難である。そこで、*nuc* 遺伝子を標的としたライトサイクラーリアルタイム PCR により黄色ブドウ球菌を迅速に検出する方法を検討した。その結果、Giolitti-Cantoni 培地を用いた増菌培養 (35°C, 20 時間) の併用により、初発菌数 12 CFU/30 g 納豆 という少数の黄色ブドウ球菌が、リアルタイム PCR により検出可能であった。

文 献

- 1) Hosoi, T. and Kiuchi, K., Production and probiotic effects of natto. In "Bacterial spore formers," eds. Ricca, E., Henriques, A.O., and Cutting, S.M. Horizon Bioscience, pp. 143-153 (2004).
- 2) Shortle, D., A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene*, **22**, 181-189 (1983).
- 3) Brakstad, O.G., Aasbakk, K., and Maeland, J.A., Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J. Clin. Microbiol*, **30**, 1654-1660 (1992).
- 4) Lachica, R.V., Hoerich, P.D., and Riemann, H.P., Tolerance of staphylococcal thermonuclease to stress. *Appl. Microbiol*, **23**, 994-997 (1972).
- 5) Gudding, R., Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. *J. Clin. Microbiol*, **18**, 1098-1101 (1983).
- 6) 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). (平成 17 年 3 月 10 日受理)