

遺伝子検出による迅速微生物解析技術の開発

富永達矢*¹ 関根正裕*²

Development of Rapid Microorganism Analysis System Based on the Gene Detection

TOMINAGA Tatsuya*¹, SEKINE Masahiro*²

抄録

食品に混入した大腸菌群の定量を迅速化かつ簡易化するため、PCRを用いた大腸菌群定量方法について検討した。大腸菌群に特有の*lacZ*遺伝子を検出するプライマーを開発し、大腸菌群分譲菌株のPCR反応を調べた結果、供試菌株51株中48株を検出できた。また、ゲノム抽出操作に際して菌懸濁液に界面活性剤を加えることにより抽出時間を従来約1/5に短縮できた。大腸菌群を予め添加したハンバーグについてPCR法により測定した結果、定量PCRにおけるCt値が大腸菌群添加量と高い相関(0.99)を示し、大腸菌群の定量が可能なが示された。食品から抽出して定量PCRの結果を得て、大腸菌群を定量するまでの所要時間は約3時間であり、平板培地法による測定時間の約1/8に短縮できた。

キーワード：食品衛生，大腸菌群，ゲノム抽出，定量PCR

1 はじめに

調理済み加工食品の需要は年々増大している。これらの製造業では食の安心・安全の観点から製品の日常的な細菌検査を欠かせない。そして製品から規定以上の細菌が検出された場合、直ちに製造工程を見直し、製品への細菌混入を防ぐ措置を取る必要がある。これまでの研究で、食品の細菌フローラと工場内各所から拭き取ったサンプルのフローラを解析し、両者を比較照合することにより、汚染源や汚染経路を推測できることを明らかにし、その成果として大腸菌群フローラ解析用培地「MAC キット」((株) コージンバイオ) およびこれを用いた大腸菌群汚染源探索サービス「Rapidom」(アース環境(株)) が上市に至った^{1,2)}。MAC キットでは、4種類の培地上に生育した細菌コロニー数からサンプル中のフローラを簡単に知ることのできるメリットがある一方、培養の必要から解析に時間を要するとい

う課題もあった。

近年、遺伝子を用いて、特定細菌を迅速に検出する技術が研究されている^{3~7)}。主にサルモネラ菌・カンピロバクター菌・黄色ブドウ球菌・リステリア菌・大腸菌 O157・セレウス菌などの食中毒起因菌が研究対象とされ、これらの菌に特異的な遺伝子領域をPCR法(Polymerase Chain Reaction)により増幅し、PCR産物の増幅曲線から菌数を定量する(定量PCR法)。これらの方法では培養を行う必要がなく、平板培地法に比べ格段に速く食中毒菌を検出できる。

本研究では、定量PCR法をベースにした大腸菌群の迅速フローラ解析法の開発を目標とし、大腸菌群検出のための特異的プライマーの開発と分析時間の短縮を検討した。

2 実験方法

2.1 菌株と培養条件

試験に供した細菌株を表1に示す。細菌株は

*¹ 北部研究所 生物工学担当

*² 試験研究室 生産技術担当

LB 培地を用いて 35℃にて 20 ~ 24 時間、好氣的条件にて培養した後、各試験に供した。

2.2 ゲノム抽出

市販キット I (ISOPLANT: ニッポンジーン社)、II (MagPrep[®] Bacterial Genomic DNA Kit: Novagen 社)については、添付の取扱説明書に従って DNA を抽出した。凍結融解法では、大腸菌群懸濁液から得られた菌体を -80℃に冷却した後、95℃で 3 分間加熱したものをサンプルとした。界面活性剤法では、大腸菌群懸濁液 250ml に界面活性剤 B-PER[®] Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific 社) 50ml を加え、室温にて 2 分間静置し、13,000 rpm にて 2 分間遠心した上清をサンプルとした。マイクロ波熱処理法では、電子レンジを用いて大腸菌群懸濁液を高周波出力 500 W にて 2 分間加熱した後、13,000 rpm にて 2 分間遠心した上清をサンプルとした。いずれの抽出液も最終液量を 50 μ l とした。界面活性剤法およびマイクロ波熱処理法では、必要に応じて UltraClean PCR Clean-up DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories 社)を用いて処理後のサンプルを精製した。

2.3 PCR

本研究で設計したプライマーは、1F(5'-CTG GAA GAY CAG GAY ATG TGG CGS ATG AGC GG-3')、および 1R(5'-CAG CGC ACG GCG TTR AAR YTG TKC TGC TTC AT-3')である。対照として用いた大腸菌群検出用プライマーは ZL-1675 (5'-ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC-3') および ZR-2025(5'-GGT TTA TGC AGC AAC GAG ACG TCA-3')である^{8),9)}。PCR 反応液は、溶液総量を 50 μ l とし、1×緩衝液、0.2 mM dNTP 混合液、2.5U ExTaq DNA polymerase (タカラバイオ社)、0.5 μ M Forward/Reverse の各プライマーの混合液にゲノム抽出液を添加した。プライマー 1F および 1R を用いた PCR 反応は、以下のプロトコルにて行った。94℃にて 5 分間加熱した後、94℃で 1 分間、55℃で 1 分 30 秒間、72℃で 1 分間のサイクルを 1 サイクルとして、30 サイクル繰り返した後、72℃で 5 分間加熱し

た。プライマー ZL-1675 および ZR-2025 を用いた PCR 反応は、文献の記載に従い、先ず、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃で 1 分間、60℃で 1 分間、72℃で 1 分間のサイクルを 1 サイクルとして、25 サイクル繰り返した後、72℃で 5 分間加熱した^{8),9)}。

2.4 定量 PCR

定量 PCR の反応液は、溶液総量を 50 μ l とし、iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad 社)を 25 μ l、0.5 μ M の 1F/1R プライマー混合液にゲノム抽出液を添加した。定量 PCR のプロトコルは上記プライマー 1F/1R を用いた PCR と同様の条件である。

2.5 食品添加試験

ハンバーグ 10 g に滅菌済生理食塩水 90 ml および 1.6×10^9 cfu、 1.6×10^8 cfu、 1.6×10^7 cfu に相当する *E. amnigenus* の培養液(1ml、100 μ l、10 μ l)を加え、ストマッカーにて 30 秒間懸濁した。懸濁液 1 ml からゲノムを抽出し、定量 PCR のサンプルとした。対照として、培養液を加えていないが同様の処理をしたサンプルを用意した。

3 結果及び考察

3.1 大腸菌群特異的プライマーの設計

大腸菌群は乳糖を発酵しガスおよび酸を産生するグラム陰性・無芽胞細菌の総称とされる¹⁰⁾。乳糖は菌体内に取り込まれ、乳糖分解酵素によりグルコースとガラクトースに分解される。この乳糖分解酵素をコードする遺伝子が *lacZ* であり、定義上、大腸菌群に属するすべての細菌が *lacZ* を有する。そこで、この遺伝子領域を対象に、大腸菌群をほかの細菌から区別するプライマーの開発を試みた。

現在、大腸菌群に属する多くの細菌のゲノム情報が公開されている。そこで、*Citrobacter koseri*、*Escherichia coli*、*Cronobacter sakazakii*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloacae* の *lacZ* 遺伝子のゲノム情報を取得し、アライメントを実行した。5 種の *lacZ* 遺伝子の配列はかなり多様化していたが、局所的に保存されていた遺伝子領域を選び、2 種のプライマー 1F および 1R を設計した。これらのプライ

表1 分譲菌株のPCR反応

			プライマー	
			1F IR	ZL-1675 ZR-2025
<i>Buttiauxella</i>	<i>agrestis</i>	JCM 1090 ^T	+	-
<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>	JCM 1661 ^T	+	-
<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>	NBRC 13547	+	+
<i>Citrobacter</i>	<i>braakii</i>	ATCC 43162	+	-
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	NBRC 13539	+	-
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	NBRC 13546	+	-
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	NBRC 16624	+	-
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	NBRC 13545	+	+
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	NBRC 13539	+	-
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	IAM 12471 ^T	+	-
<i>Citrobacter</i>	<i>koseri</i>	JCM 1658 ^T	+	+
<i>Cronobacter</i>	<i>sakazakii</i>	JCM 1233 ^T	+	+
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>	NBRC 12010	+	-
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>	IAM 12348 ^T	+	-
<i>Enterobacter</i>	<i>amnigenus</i>	JCM 1237 ^T	+	-
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	NBRC 12937	+	-
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	NBRC 3320	+	+
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	IAM 12349 ^T	+	+
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	NBRC 13536	-	-
<i>Erwinia</i>	<i>aphidicola</i>	JCM 21238 ^T	+	-
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	NBRC 102203 ^T	+	+
<i>Escherichia</i>	<i>fergusonii</i>	NBRC 102419 ^T	+	-
<i>Escherichia</i>	<i>vulneris</i>	JCM 1688 ^T	+	-
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	JCM 1666 ^T	+	-
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	NBRC 3731	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	ATCC 8724	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	ATCC 43086	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	ATCC 43165	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	ATCC 700324	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	ATCC 49131	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	ATCC 43863	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	IAM 1063	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	NBRC 3318	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	NBRC 3319	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	NBRC 3321	+	+
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	NBRC 3512	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	NBRC 12059	+	-
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	IAM 12351	+	+
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	NBRC 12059	-	-
<i>Kluyvera</i>	<i>ascorbata</i>	IAM 14203 ^T	+	+
<i>Kluyvera</i>	<i>cryocrescens</i>	JCM 17580 ^T	+	+
<i>Kluyvera</i>	<i>intermedia</i>	JCM 1238 ^T	+	+
<i>Leclercia</i>	<i>adecarboxylata</i>	ATCC 23216	+	+
<i>Leclercia</i>	<i>adecarboxylata</i>	JCM 1667 ^T	+	+
<i>Leclercia</i>	<i>adecarboxylata</i>	ATCC 700325	-	-
<i>Raoultella</i>	<i>ornithinolytica</i>	JCM 6096 ^T	+	-
<i>Raoultella</i>	<i>planticola</i>	JCM 7251 ^T	+	-
<i>Raoultella</i>	<i>planticola</i>	NBRC 3317	+	-
<i>Raoultella</i>	<i>terrigena</i>	JCM 1687 ^T	+	-
<i>Serratia</i>	<i>fonticola</i>	JCM 1242 ^T	+	-
<i>Serratia</i>	<i>liquefaciens</i>	JCM 1245 ^T	+	-

PCR産物を得られたものを+、得られなかったものを-とした。IAM: Institute of Applied Microbiology; JCM: Japan Collection of Microorganisms; NBRC: NITE Biological Resource Center; ATCC: American Type Culture Collection.

プライマーを用いて51株の大腸菌群分譲菌株についてPCR反応を調べた結果、48株(94%)で増幅産物を得た(表1)。対照の大腸菌群検出用プライマーZL-1675およびZR-2025を用いた場合、PCR増幅産物が生成されたのは、14株(27%)に留まった。

また、8種の乳酸菌および2種のバチルス属細菌についても、プライマー1F/IRを用いてPCR反応を

調べたが、増幅産物は生成しなかった。

以上より、今回設計したプライマーを用いたPCR反応が大腸菌群に特異的であり、大多数の大腸菌群を検出可能であることが示された。

3.2 ゲノム抽出方法の改良

ゲノム抽出法の迅速化を目指し、①市販キットI、②市販キットII、③凍結融解法、④界面活性剤法、⑤マイクロ波法と5種類の方法を比較した。被検菌として、*E. vulneris*、*E. amnigenus*、*H. alvei*を用い、これらの細菌のゲノム抽出液にプライマー1F/IRを用いてPCR反応を行った際に電気泳動にて増幅産物に相当するバンドの発現の程度から抽出法の良否を評価した(表2)。①および②の市販キットでは、いずれも*E. vulneris*、*E. amnigenus*については明瞭なバンドが観察され、十分なPCR産物を得られたが、*H. alvei*ではバンドがやや薄かった。一方、③では、いずれもPCR産物を得られず、④および⑤では、*E. vulneris*のみPCR産物を得られた。④、⑤をさらに改良し、各々の処理後のサンプルを精製した④'、⑤'では市販キットと同等の結果を得られた。

⑤'に比較して操作の容易な④'の方法により、12種の大腸菌群株について、ゲノム抽出を行った結果、11種でPCR産物を得ることができた(表3)。

以上の結果から、④'の方法は市販キットと同等に確実なゲノム抽出が可能であり、さらに処理時間が短く、操作性にも優れており、迅速で実用的なゲノム抽出手法として利用可能なことが示された。

表2 ゲノム抽出法の比較

抽出法	処理時間	PCR増幅の有無		
		<i>E. vulneris</i>	<i>E. amnigenus</i>	<i>H. alvei</i>
①市販キットI	55分	+	+	±
②市販キットII	30分	+	+	±
③凍結融解法	5分	-	-	-
④界面活性剤法	5分	+	-	-
④'界面活性剤法 +精製	10分	+	+	±
⑤マイクロ波法	5分	+	-	±
⑤'マイクロ波法 +精製	10分	+	+	±

処理時間：反応時間の合計。実際の処理時間はいずれの場合もチューブ間での溶液の移し替えなどを考慮する必要があり、これらの数値よりも大きくなる。±はPCR産物を確認できるがバンドが薄い。

表3 ④' 法によるゲノム抽出

			PCR増幅
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	IAM 1063	+
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	ATCC 43086	+
<i>Serratia</i>	<i>liquefaciens</i>	JCM 1245 ^T	+
<i>Erwinia</i>	<i>aphidicola</i>	JCM 21238 ^T	+
<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>	NBRC 13547	+
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	NBRC 13546	+
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>	NBRC 12010	+
<i>Kluyvera</i>	<i>cryocrescens</i>	JCM 7580 ^T	+
<i>Leclercia</i>	<i>adecarboxylata</i>	ATCC 23216	+
<i>Raoultella</i>	<i>ornithinolytica</i>	JCM 6096 ^T	+
<i>Raoultella</i>	<i>planticola</i>	JCM 7251 ^T	+
<i>Raoultella</i>	<i>terrigena</i>	JCM 1687 ^T	-

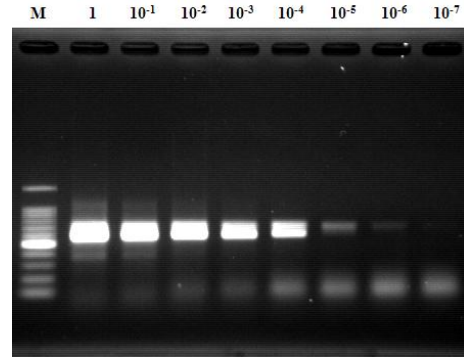


図2 定量PCR産物の電気泳動

M: 100bp ラダーマーカー。

3.3 定量性の検討

プライマー1F/1R を用いて大腸菌群の定量 PCR を行った際、直線性が得られる希釈範囲を調べた。定量 PCR の結果を図1に示す。定量 PCR ではゲノムの濃度が高いほど、PCR 増幅曲線がより早いサイクルで立ち上がる。原液~10⁴ 倍希釈まではゲノム濃度が低いほど PCR 増幅曲線の立ち上がりが遅れた。シグナル強度が任意の閾値を超えたサイクル数(Ct)を縦軸、希釈度(対数)を横軸として、原液~10⁴ 倍希釈のサンプル間で相関関係を調べた結果、相関係数=0.991 となり、高い直線性が得られた。このときの *E. amnigenus lacZ* 遺伝子の PCR 増幅効率率は 88%であった。

他方、10⁵ 倍~10⁷ 倍希釈サンプルでは、Ct 値がほぼ同一であった。これらの PCR 産物の電気泳動結果を図2に示した。10⁵ 倍~10⁷ 倍希釈のサンプルにも目的産物のバンドが確認されたが、それより低分子量側のバンドがやや濃くなり、目的とは異なる増幅産物の生成によって PCR 増幅曲線が立ち上がったものと推察された。

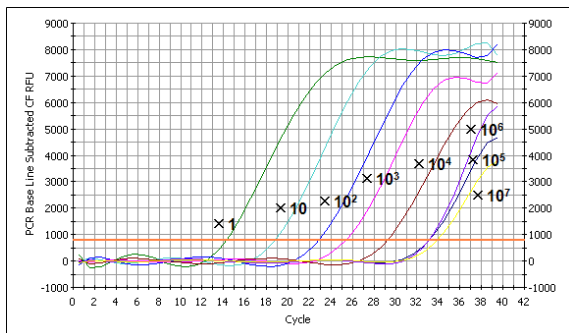


図1 ゲノム希釈系列の定量PCR

5.5×10¹⁰ cfu/ml の *E. amnigenus* 培養液からゲノム抽出を行い、抽出液(1.1×10⁹ cfu 相当)を原液~10⁷ 倍希釈まで 10 倍ごとに段階希釈し、定量 PCR のゲノム溶液とした。

以上の結果から、原液~10⁴ 倍希釈(1.1×10⁹ cfu/ml ~ 1.1×10⁵ cfu/ml)までは定量可能であった。

3.4 食品添加試験

ハンバーグに段階的に濃度を変えた *E. amnigenus* 懸濁液を加え、各々からゲノム抽出し、定量 PCR を行った結果を図3に示した。*E. amnigenus* 懸濁液を加えた量に応じて、PCR 増幅曲線の立ち上がりに変化がみられる。*E. amnigenus* 懸濁液を加えなかったサンプルにおいても PCR 曲線が立ち上がったが、これは目的産物よりも低分子の増幅産物と考えられた。Ct 値と添加した菌体量の相関関係を調べた結果、相関係数=0.996 と高い相関が認められた。このときの *E. amnigenus lacZ* 遺伝子の PCR 増幅効率率は 99%であった。ハンバーグに *E. vulneris* 懸濁液を加えた場合、さらに、穀物製品に *E. amnigenus* 培養液および *E. vulneris* 培養液を加えた場合にも同等の結果が得られた。また、定量 PCR には約 2 時間 30 分を要した。

以上の結果から、この方法では 1.6×10⁶~1.6×10⁸ cfu/g の範囲でハンバーグ中の大腸菌群を定量可能なことが示された。大腸菌群を添加していないサンプルでも PCR 増幅曲線の立ち上がるため、現状では 1.6×10⁶ cfu/g が検出下限と考えられ、食品からの抽出率の向上などによる定量範囲の拡大が今後の課題である。

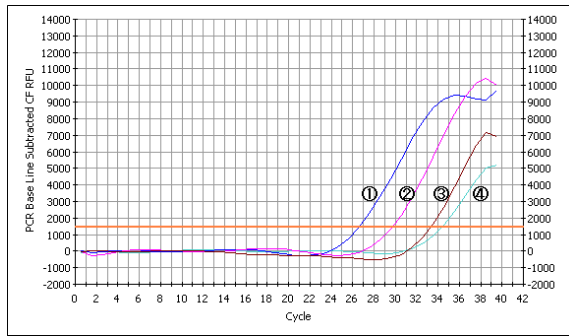


図3 食品添加試験

- ① ハンバーグ 10g に *E. amnigenus* を 1.6×10^9 cfu 添加。
- ② ハンバーグ 10g に *E. amnigenus* を 1.6×10^8 cfu 添加。
- ③ ハンバーグ 10g に *E. amnigenus* を 1.6×10^7 cfu 添加。
- ④ ハンバーグ 10g に *E. amnigenus* 添加なし。

今回開発した手法では、ストマッカーによる食品の懸濁液の作製に 20 分程度、ゲノム抽出に 10 分と定量 PCR に 2 時間 30 分と約 3 時間程度で食品中の大腸菌群数を定量できた。平板培地法による測定では、培養時間を含め 24 時間程度要するため、約 1/8 に短縮されたことになる。

また、平板培地法では計数するコロニーが 1 枚当たり 30~300 cfu となるよう適宜サンプルを希釈し、数段階の希釈系列を作製するが、今回の定量 PCR を用いた方法では、 1.1×10^5 cfu/ml ~ 1.1×10^9 cfu/ml の範囲であれば、原液で測定でき、操作を簡素化できる。

4 まとめ

- (1) 51 株の大腸菌群分譲菌株を対象に新規に開発したプライマーで PCR 反応を行ったところ、48 株(94%)で反応がみられた。
- (2) ゲノム抽出法の簡略化を検討し、抽出時間を従来の 1/5 程度に短縮した。
- (3) 定量 PCR を用いた大腸菌群の定量可能な濃度範囲を調べたところ、 $10^5 \sim 10^9$ cfu/ml で直線性がみられた。
- (4) 食品に大腸菌群を添加したところ、 10^6 cfu/g 程度の濃度が検出限界であった。このとき、定量 PCR は約 2 時間 30 分を要した。

謝辞

本研究を進めるにあたり、客員研究員として御

指導いただきました東京大学大学院小柳津広志教授に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 富永達矢、本多春樹、関根正裕: 食品製造工程における微生物検出技術の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **4**(2006)72.
- 2) 関根正裕: マイクロフロー解析によるアドバンスドサニタリーシステムの開発, *New Food Industry*, **52**(2010)1.
- 3) Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., and Wagner, M.: Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese., *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(2001)3122.
- 4) Martinez-Blanch, J. F., Sanchez, G., Garay, E., and Aznar, R.: Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples., *Int. J. Food Microbiol.*, **135**(2009)15.
- 5) Nam, H. M., Srinivasan, V., Gillespie, B. E., Murinda, S. E., and Oliver, S. P.: Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples., *Int. J. Food Microbiol.*, **102**(2005)161.
- 6) Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., and Magnani, M.: A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk., *Food Microbiol.*, **26**(2009)615.
- 7) Sails, A. D., Fox, A. J., Bolton, F. J., Wareing, D. R., and Greenway, D. L.: A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture., *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(2003)1383.
- 8) Bej, A. K., McCarty, S. C., and Atlas, R. M.:

- Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring., Appl. Environ. Microbiol., **57**(1991)2429.
- 9) Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J., Haff, L., and Atlas, R. M.: Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes., Appl. Environ. Microbiol., **56**(1990)307.
- 10) (社)日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針微生物編, (2004).