

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 Analyzing System Based on the Gene Detection

TOMINAGA Tatsuya*¹, SEKINE Masahiro*²

抄録

大腸菌群の汚染源を迅速に探索するため、PCRを用いたフローラ解析法を開発した。*Citrobacter*属及び*Klebsiella/Enterobacter*属をそれぞれ検出できる新たな2つのプライマーを設計し、大腸菌群を3区分に分画可能となった。PCR反応の際にゲノム抽出工程を省略した方法を検討したところ、容器あたり 10^3 ~ 10^6 cfuの菌数が存在すれば定量可能であった。フィルターを用いた試料原液の濃縮により、感度を 10^4 倍に向上できた。肉及び野菜の大腸菌群フローラ解析の実施結果、肉では*Citrobacter*属が優占し、野菜では*Citrobacter*属・*Klebsiella/Enterobacter*属以外のグループが優占であることが5時間程度で判明した。

キーワード：食品衛生，大腸菌群，フィルター濾過，リアルタイムPCR

1 はじめに

平成23年4月、焼き肉チェーン店のユッケを原因とする腸管出血性大腸菌 O111 による集団食中毒事件が発生した¹⁾。また、春から夏にかけてドイツで起きた腸管出血性大腸菌 O104 による食中毒事件では、3000人以上の患者が生じた²⁾。これらの例に限らず、食品は製造工程において常に種々の雑菌に汚染される危険性がある。そのため、食品製造者は大腸菌群などの衛生指標菌を用いて、製品品質を管理し、規定数を超える菌数が検出された場合、混入源を探索、除去して重大な食中毒事件の発生防止に努めなければならない。

これまでに我々は、製品と工場拭取りサンプルの大腸菌群フローラを比較照合することにより、汚染源や汚染経路を推定する手法を開発した^{3), 4)}。しかし、この方法では平板培地上に生育した大腸菌群数を計測してフローラ解析を行うため、20~24時間程

度の培養時間が必要となる。このような衛生問題の一刻も早い解決を望む食品製造者からは、フローラ解析時間の短縮、迅速化を強く要請されてきた。そこで、培地ベースではなく、食品や工場拭取りサンプルからDNAを抽出し、ゲノム上の特定領域をPCR増幅することにより、大腸菌群フローラを明らかにする技術開発に着手した。

昨年度は、大腸菌群全体を検出するプライマーを開発した⁵⁾。今年度は、大腸菌群をグループに区分するためのプライマーを開発し、さらに、解析感度の向上、手法の簡略化を試みた。また、開発した解析方法により食品の大腸菌群フローラの解析を試みた。

2 実験方法

2.1 前培養と菌株

大腸菌群はLB培地(Becton Dickinson社)を用いて35°Cにて1晩、好氣的に培養し、PCR試験に供した。定量性試験に用いた菌株は、*Enterobacter amnigenus* JCM1237^T、*Citrobacter*

*¹ 北部研究所 食品・バイオ技術担当

*² 技術支援室 戦略プロジェクト推進担当

freundii IAM12471^T, *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* IAM12349^Tである。

2.2 リアルタイム PCR

プライマーの塩基配列は以下のとおりである：
 1F(5'-CTG GAA GAY CAG GAY ATG TGG CGS ATG AGC GG-3'), 1R(5'-CAG CGC ACG GCG TTR AAR YTG TKC TGC TTC AT-3')。PCR の反応液は、溶液総量を 50 μL とし、iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad 社)を 25 μL、0.5 μM のプライマー混合液、菌体希釈液を添加した。PCR 反応は、94 °Cで1分間、55 °Cで1分30秒間、72 °Cで1分間のサイクルを1サイクルとして、40 サイクル繰り返した。PCR 反応が終了した後、一旦チューブを 55°Cに冷却し、0.5°Cずつ加熱しながら蛍光強度を測定するサイクルを 40 回繰り返して、増幅産物の融解曲線を調べた。

2.3 フィルター濾過

47mm ポリサルホンホルダー(アドバンテック東洋社)にフィルターを設置し、アスピレーターで吸引濾過した。小型シャーレにフィルターを移し、滅菌水または界面活性剤で洗い出した。溶液を 13,000rpm で1分遠心した後、滅菌水を 10 μL ~50 μL 加え、菌体溶液とした。

2.4 食品試験

肉または野菜 25g 相当を秤量し、滅菌水で 10 倍希釈した。希釈液全量をフィルター濾過し、菌体回収後、1F-1R、Cit、KE 各プライマーを用いたリアルタイム PCR 試験でフローラを解析した。

3 結果及び考察

3.1 大腸菌群検出プライマーの性能試験

大腸菌群は、乳糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性の無芽胞桿菌と定義され、腸内細菌科の多くの細菌が属する⁹⁾。このうち、食品から検出される代表的な大腸菌群である *Citrobacter* 属・*Enterobacter* 属・*Klebsiella* 属については、プライマー1F-1R を用いた PCR 反応により産物が得られることを確認した。

しかし、食品からは *Escherichia* 属・*Serratia* 属・

Yersinia 属の細菌が検出されることがある⁷⁻⁹⁾。そこで、これらについて 1F-1R を用いた PCR 反応を行い、検出の可否を調べた(表1)。試験した3属11種14株のうち、*Escherichia blattae* 以外では PCR 産物が得られた。昨年度の試験結果⁵⁾と総合すると、13属34種61株の大腸菌群を検出できることになり、食品から検出され得る大腸菌群のほとんどをカバーできた。

なお、*E. blattae* の酵素基質培地(XM-G)上のコロニー色を調べると白色であり、本菌にはβ-ガラクトシダーゼ活性がない可能性、*lacZ* を保持していない可能性がある。事実、*E. blattae* は *Shimwellia blattae* と 2010年に名称変更された¹⁰⁾。

3.2 ゲノム抽出法の省略

市販品を用いた場合、ゲノム抽出時間に3時間程度を要していた。昨年度の研究で、菌体を界面活性剤処理し、フィルターを用いてゲノムを精製することにより、この工程を10分程度にまで短縮できることを示した⁵⁾。分子生物学分野において、大腸菌を用いたクローニングを行う際、コロニーダイレクト PCR と呼ばれる技術が多用される。これは、寒天培地上に形成されたコロニーを楊枝等で釣菌し、PCR 反応液に懸濁してそのまま PCR 反応を行う技術である。本技術を応用すれば、液体中に浮遊する細菌をゲノム抽出せずに PCR 増幅できると考えられる。そこで、*E. amnigenus* の培養液を段階希釈し、その溶液を直接反応液に加えて PCR 増幅を行った。PCR のサイクル反応の前に、94°Cで5分

表1 大腸菌群検出プライマーの性能

<i>Escherichia</i>	<i>albertii</i>	NBRC 107761 ^T	+
<i>Escherichia</i>	<i>blattae</i>	NBRC 105725 ^T	-
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	NBRC 102203 ^T	+
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	NBRC 3301	+
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	NBRC 3302	+
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	NBRC 3972	+
<i>Escherichia</i>	<i>hermannii</i>	NBRC 105704 ^T	+
<i>Serratia</i>	<i>ficaria</i>	NBRC 102596 ^T	+
<i>Serratia</i>	<i>grimesii</i>	NBRC 13537 ^T	+
<i>Serratia</i>	<i>odorifera</i>	NBRC 102598 ^T	+
<i>Serratia</i>	<i>plymuthica</i>	NBRC 102599 ^T	+
<i>Serratia</i>	<i>rubidaea</i>	NBRC 103169 ^T	+
<i>Yersinia</i>	<i>bercovieri</i>	NBRC 105717 ^T	+
<i>Yersinia</i>	<i>rohdei</i>	NBRC 105715 ^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。
 NBRC: NITE Biological Resource Center.

加熱する工程を追加した。高濃度の細菌を加えたチューブから順に蛍光を検出できた(図 1A)。Ct 値を縦軸、菌数の対数を横軸にとり、検量線を調べると、0.9998 と両者は高い相関係数を示した(図 1C)。融解曲線を調べると、ピークは 1 つであった(図 1B)。PCR 反応が不完全であると本来の増幅産物に由来するもの以外にもピークが見られるが、今回の結果は、どの希釈段階においても PCR 増幅が完全になされたものと判断された。このことから、ゲノム抽出工程を省略しても、PCR 反応容器あたり $10^3 \sim 10^6$ cfu の菌数が存在すれば定量可能と判明した。

3.3 グループ分けプライマーの開発

これまでの試験で用いてきた 1F, 1R は全ての種類の大腸菌群を検出するためのプライマーである。フローラ解析のためには、数種類の大腸菌群を検出するためのプライマーを複数要する。1F-1R で増幅される *lacZ* 領域の塩基配列を大腸菌群

間で比較し、系統樹を描くと *Citrobacter* 属は一群のクラスターを形成し、*Klebsiella* 属といくつかの *Enterobacter* 属も別の一群のクラスターを形成する。そこで、*Citrobacter* 属と *Klebsiella/Enterobacter* 属をそれぞれ特異的に検出するためのプライマー(Cit プライマー及び KE プライマー)を作製し、各々で増幅される菌株を確かめた(表 2)。Cit プライマーでは *Citrobacter* 属の 4 種の細菌で PCR 増幅が確認できたが、これらの細菌に対して KE プライマーでは PCR 産物が確認されなかった。逆に、KE プライマーでは、*Klebsiella* 属、*Enterobacter* 属および近縁の *Raoultella* 属の細菌で PCR 増幅が確認できたが、これらに対して Cit プライマーでは PCR 産物が確認されなかった。以上のことから、Cit プライマーが *Citrobacter* 属細菌に特異的であり、KE プライマーが *Klebsiella/Enterobacter* 属に特異的であると確認された。

定量性を調べるため、*C. freundii* の培養液を段階希釈し、Cit プライマーで PCR を行ったところ、 $10^3 \sim 10^6$ cfu/ PCR 反応容器で 0.9917 と高い相関係数を示した。同様に *E. cloacae* の段階希釈培養液を KE プライマーで PCR を行ったところ、 $10^2 \sim 10^6$ cfu/ PCR 反応容器で 0.9882 と高い相関係数を示した。各々、1F-1R プライマーを用いたときと同様の培養液の濃度範囲で定量性があると判断された。以上から、1F-1R・Cit・KE 各プライマーを用いることにより、サンプル中の大腸菌群を *Citrobacter* 属・*Klebsiella/Enterobacter* 属・それ以外の大腸菌群と 3 グループに区分可能になった。

3.4 濃縮法の検討

1F-1R、Cit プライマーを用いた PCR では 10^3 cfu、KE プライマーを用いた PCR では 10^2 cfu

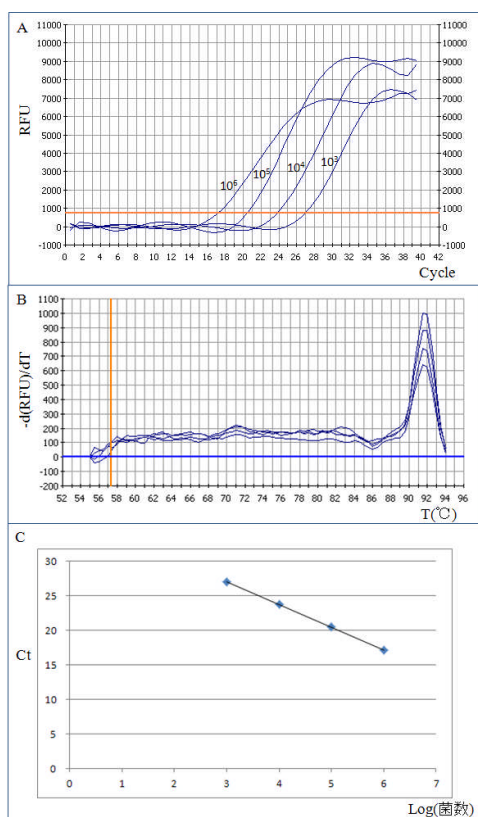


図 1 菌液希釈系列のリアルタイム PCR

A: 菌液希釈系列の PCR。縦軸：蛍光強度、横軸：サイクル数。B: 融解曲線。C: 検量線。

表 2 Cit, KE プライマーの特異性

Cit	KE
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Raoultella planticola</i>

Cit: Cit プライマーで検出された細菌。KE: KE プライマーで検出された細菌。

の菌数が PCR 反応容器あたりの検出限界であった。大腸菌群の計数法は、『食品 25g に 225mL の滅菌希釈水を加え、ストマッカー等を用いて均質化し、試料原液とする。試料原液 1mL およびその 10 倍段階希釈液を 1mL、ブイヨン培地ないし寒天培地に添加して 20~48 時間培養する。』とされる⁹⁾。PCR 溶液に添加できる試料原液は、本研究においては 10 μ L が上限である。PCR 法で大腸菌群を検出するためには、10⁵cfu/mL 以上の濃度の試料原液を用意する必要がある。これは食品 1g あたりに換算すると 10⁶cfu 以上の大腸菌群に相当する。このような高濃度の大腸菌群に汚染されている食品は稀であり、検出感度の向上が課題となる。ここで、試料原液 225mL 全量を PCR 反応に供することが可能ならば、食品 1g あたり 10²cfu 以上の大腸菌群で PCR 反応によりシグナルを検出でき、実際の食品汚染の程度に即した試験が可能になる。そこで、試料原液を濾過してフィルター上に大腸菌群を捕捉し、菌体をフィルターから洗い出して PCR 溶液に添加し、大腸菌群の濃縮を試みた。フィルターには、セルローズ系統のものやプラスチックを素材とするものが知られる。これらのうち、どの素材が適するか調べるために、滅菌水に *C. freundii* を懸濁した溶液を調整し、各々のフィルターで濾過した。菌体を滅菌水で洗い出して PCR 反応を行い、Ct の値から回収率を計算した(表 3)。セルローズ系よりもプラスチック系フィルターで高い回収率がみられたが、その値は高くても 16%程度であった(方法 1)。そこで、菌体の洗い出しに界面活性剤を用いて溶媒を調整し、これを用いて再度試験した。回

収率は全般に改善し、プラスチック系フィルターの 1 つでは 68%を記録した(方法 2)。以上の結果から、試料原液をフィルター濾過し、菌体を回収することによって、濃縮工程がない場合に比して 10⁴ 倍以上感度が向上することが明らかになった。

3.5 食品試験

一連の試験により、食品 1g あたり 10²cfu 以上の大腸菌群が混入していれば、PCR 増幅により菌群を 3 グループに分けたフローラ解析が可能と考え、本技術を用いて実際の食品の大腸菌群フローラを解析できるか実現可能性を検証した。肉、野菜の試料原液を調整し、菌体をフィルターで濃縮した後、PCR を用いてフローラ解析を行った。Ct 値と検量線から推定される菌数を示した(表 4)。肉では *Citrobacter* 属が 92%、*Klebsiella/Enterobacter* 属が 8%と構成比が判明した。一方、野菜では *Citrobacter* 属は検出されず、*Klebsiella/Enterobacter* 属が 2%、それ以外の大腸菌群が 98%を占めた。以上の結果から、肉と野菜の大腸菌群フローラの差異を捉えることができた。食品の処理からフローラ解析結果が得られるまでに要した時間は 5 時間程度であった。

本研究では、PCR 法をベースとした大腸菌群フローラ解析法を開発した。検出に必要な菌数は食品 1g あたり 10²cfu 以上であり、10cfu から検出可能な従来の平板培地を用いた手法と比較すると 10 倍感度が低い。また、PCR 法は培地法よりも検出誤差が大きいため、フローラを構成するグループ間の構成比が 10 : 1 程度異なる場合にはその相違を検出できるが、1 : 1 程度の構成比である場合には正確な構成比の算出が困難である。即

表 3 フィルターからの菌体回収率

	回収率(%)	
	方法1	方法2
プラスチック系フィルターA	0	68
プラスチック系フィルターB	10	54
プラスチック系フィルターC	16	37
セルローズ系フィルターA	3	32
セルローズ系フィルターB	2	14
プラスチック系フィルターD	5	4

方法 1 : 滅菌水を用いた回収。方法 2 : 界面活性剤を用いた回収。

表 4 食品の大腸菌群フローラ

	Ct値		
	1F1R	Cit	KE
肉	18.4	19.0	20.5
野菜	18.5	N.D.	23.2
換算値(cfu)			
	全大腸菌群	<i>Citrobacter</i> 属	<i>Klebsiella</i> 属/ <i>Enterobacter</i> 属
肉	4.2×10 ⁵	5.7×10 ⁵	5.3×10 ⁴
野菜	3.9×10 ⁵	N.D.	7.1×10 ³

1F1R, Cit, KE : プライマー名。N.D. : 検出下限以下。

ち、PCR 法ではフローラ構成を大雑把にしか把握できない。しかし、培地法では、培養に 20 時間以上かかるため、製造日内にフローラ解析するのは不可能である。この点、PCR 法では、食品の処理からフローラ解析までに 5 時間程度要するのみで、製造日中に結果を得ることができる。大腸菌群を検出した食品のフローラ概要を迅速につかむことができれば、どのラインに汚染源があるのか推定でき、そこを優先して培地を用いた詳細な解析を行うことで迅速かつ確実に汚染源や経路を把握できる。このような衛生管理手法により、食品汚染源の迅速な解明と重大な食中毒事故の根絶が可能になると期待される。

4 まとめ

- (1) 全ての大腸菌群を検出するためのプライマーで PCR 反応を行ったところ、*Escherichia* 属・*Serratia* 属・*Yersinia* 属など総計 13 属 34 種 61 株を検出できた。
- (2) ゲノム抽出工程を省略しても、PCR 反応容器あたり $10^6 \sim 10^3$ cfu の菌数が存在すれば定量可能であることが分かった。
- (3) 大腸菌群フローラ解析用プライマーとして、*Citrobacter* 属 特 異 的 な プ ラ イ マ ー 及 び *Klebsiella/Enterobacter* 属 特 異 的 な プ ラ イ マ ー を 開発し、大腸菌群を 3 グループに分けた。各々 PCR 反応容器あたり $10^3 \sim 10^6$ cfu 及び $10^2 \sim 10^6$ cfu で定量できた。
- (4) フィルターを用いて試料原液の濃縮を試みたところ、濃縮工程がない場合に比して 10^4 倍以上感度が向上することが明らかになった。
- (5) 肉及び野菜の大腸菌群フローラを調べた結果、肉では *Citrobacter* 属が優占したが野菜では *Citrobacter* 属・*Klebsiella/Enterobacter* 属以外のグループが優占しており、両者の相違が 5 時間程度で判明した。

参考文献

- 1) Matano, S. *et al.*: Encephalopathy, disseminated intravascular coagulation, and hemolytic-

uremic syndrome after infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111., *J. Infect. Chemother.*, (2011).

- 2) Frank, C. *et al.*: HUS Investigation Team.: Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany., *N. Engl. J. Med.*, **365**(2011)1771.
- 3) 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.
- 4) 関根正裕: マイクロフローラ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.
- 5) 富永達矢、関根正裕: 遺伝子検出による迅速微生物解析技術の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **9**(2011).
- 6) (社)日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針微生物編, (2004).
- 7) Vishnubhatla, A. *et al.*: Evaluation of a 5'-nuclease (TaqMan) assay for the detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* in raw meat and tofu samples., *J. Food Prot.*, **64**(2001)355.
- 8) Tacket, C. O. *et al.*: An outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections caused by contaminated tofu (soybean curd)., *Am J Epidemiol.*, **121**(1985)705.
- 9) Nosedá, B. *et al.*: Microbiological spoilage of vacuum and modified atmosphere packaged Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* fillets., *Food Microbiol.*, **30**(2012)408.
- 10) Priest, F. G., Barker, M.: Gram-negative bacteria associated with brewery yeasts: reclassification of *Obesumbacterium proteus* biogroup 2 as *Shimwellia pseudoproteus* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Escherichia blattae* to *Shimwellia blattae* comb. nov., *Int J Syst Evol Microbiol.*, **60**(2010)828.