

## 核酸増幅副生成物(ピロリン酸)の検出法を利用した食中毒菌の迅速検査

## Rapidly Identification of Food-poisoning Bacteria by Detection of Pyrophosphate

齋藤 紀行 秋山 和夫 遠藤 美砂子\*  
丸山 昇\*Noriyuki SAITO, Kazuo AKIYAMA, Misako TAGIRI-ENDO  
Noboru MARUYAMA

キーワード：PCR法，ピロリン酸，食中毒菌

Keyword : PCR Method, Pyrophosphate, Food-Poisoning Bacteria

食中毒菌の迅速診断法としてPCR法が広く用いられているが、経済性あるいは安全性の理由から食品加工業者などの現場にはほとんど導入されていない。

PCRの終末点の判定法を核酸増幅副産物のピロリン酸に着目し、新たな呈色法によるピロリン酸測定法を開発した。食中毒菌の検出法の応用を考え、市販の食中毒菌鑑別用プライマーを用いて食中毒菌関連菌に対してPCRを行い、反応終末点を従来の電気泳動法及び新たに開発したピロリン酸測定法とで判定した結果、ピロリン酸測定法は電気泳動法と同等の感度で反応終末点が判定でき、食品加工現場での応用の可能性が示された。

## 1 はじめに

微生物の特定遺伝子を増幅するPCR法は、細菌検査の迅速な検出法として日常検査に広く用いられている。PCR法は、微生物等のDNAをテンプレートとしサーマルサイクラーを用いて核酸増幅反応を行い、生成された特異DNA断片(アンプリコン)を電気泳動・染色で検出し、病原菌の有無を判定する検査法である。PCR法に用いるサーマルサイクラーは高価で、アンプリコンの染色に発ガン性物質のエチジウムブロマイドを用い、さらに染色されたバンドの検出に紫外線を用いる。これらの理由から、食品中の微生物を迅速に検出する必要がある食品加工業者などの現場にはほとんど導入されていない。

そこで、PCRに変わるものとして、安価な機器で、簡便かつ安全に食中毒菌の存在が検査できるシステムの開発が求められている。

近年、核酸増幅の反応終末点の判定をアンプリコンの検出に変わり副産物の2リン酸であるピロリン酸を測定する方法が注目されている。わが国においては、核酸増幅を定温で行ないピロリン酸をマグネシウム塩として検出するLAMP法が実用に向けて検証が進められている<sup>1-3)</sup>。

遠藤は、ピロリン酸を酵素反応を利用して測定する方法の導入を考え、新たな呈色法によるピロリン酸測定法(ピロリン酸法)を開発した<sup>4)</sup>。

今回、我々は7種類の市販食中毒菌鑑別用プライマー

\* 産業技術総合センター

を用い、各々の特異遺伝子を保有している食中毒菌及び特異遺伝子を保有していない環境あるいは臨床分離菌についてPCRを行い、反応後を核酸増幅産物を泳動法で、副産物のピロリン酸を新たに開発したピロリン酸法で測定しピロリン酸の有効性について比較検討したので報告する。

## 2 材料と方法

## 2.1 材料

## (1) 供試菌

臨床あるいは環境より分離した大腸菌(*Escherichia coli*)3株、腸管出血性大腸菌(*Enterohemorrhagic E. coli*)5株、腸管侵入性大腸菌(*Enteroinvasive E. coli*)1株、エンテロバクター(*Enterobacter cloacae*)1株、クレブシエラ(*Klebsiella oxytoca*)2株、シトロバクター(*Citrobacter freundii*)2株、セラチア(*Serratia marcescens*)1株、エルシニア(*Yersinia pseudotuberculosis*)1株、プロテウス(*Proteus mirabilis*)1株、プロビデンシア(*Providencia rettgeri*)1株、サルモネラ(*Salmonella spp*)7株、赤痢菌(*Shigella flexneri*)2株、腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)tdf(+ )1株、腸炎ビブリオtdf(- )3株、ビブリオ・バルニフィカス(*Vibrio vulnificus*)1株、ナグビブリオ(*Vibrio cholerae non-O1*)1株、ウエルシユ菌(*Clostridium perfergens*)enterotoxin(+ )3株、ウエルシユ菌enterotoxin(- )3株、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)enterotoxinA(- )1株、黄色ブドウ球菌enterotoxin(- )3

株の20菌種42菌株を供試菌株とした。供試菌のうち各プライマーに対応する特異遺伝子の保有が確認されている菌株を陽性株、特異遺伝子を保有しないことが確認されている菌株を陰性株とした。

(2) 食中毒菌用プライマー

サルモネラ菌invA遺伝子検出用 (SIN), 腸炎ピブリオ耐熱性溶血毒遺伝子検出用 (VPD), 腸管出血性大腸菌VT遺伝子検出用 (EVC), 赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌invE遺伝子検出用 (INV), 赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌ipaH遺伝子検出用 (IPA), サルモネラ菌エンテロトキシン遺伝子検出用 (STN), ウエルシュ菌毒素遺伝子検出用 (CPE) 及び黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子検出用 (SEA) の7種類の市販プライマー (Takara Bio社製) を使用した。各々のプライマーを陽性対象菌, 増幅DNAの大きさとともに表1に示した。

表1 プライマーの種類と陽性対象菌

プライマー	略号	陽性対象菌	増幅DNA (bp)
サルモネラ菌エンテロトキシン遺伝子	STN	サルモネラ菌	264
腸炎ピブリオ耐熱性溶血毒遺伝子	VPD	tdf(+) 腸炎ピブリオ	251
ウエルシュ菌毒素遺伝子	CPE	エンテロトキシン(+) ウエルシュ菌	456
腸管出血性大腸菌VT遺伝子	EVC	腸管出血性大腸菌	171
赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌(EIEC)invE遺伝子	INV	赤痢菌, 腸管侵入性大腸菌	293
赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌(EIEC)ipaH遺伝子	IPA	赤痢菌, 腸管侵入性大腸菌	242
黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子	SEA	エンテロトキシンA(+) 黄色ブドウ球菌	423

(3) PCR試薬

PCRにはDNAポリメラーゼ及び4種の塩基が含有されたPCR Beads Tube Ready-To-Go:Amersham Pharmacia Biotech社製) を使用した。

(4) ピロリン酸測定用試薬

0.4U/mlキサンチンオキシダーゼ (XOD: ロッシュ社製) 及び20mMイノシン酸を含む100mMトリス - 塩酸緩衝液 (pH7.6) を調整し, これを試薬1とした。100U/mlヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPR: シグマ社製250U) 及び4mMのパラヨードニトロテトラゾリウムバイオレットを含む100mMトリス - 塩酸緩衝液 (pH7.6) を調整し, これを試薬2とした。

2.2 方法

(1) 菌の調整

各供試菌を適切な液体培地で1晩培養後遠心し, 沈渣に滅菌蒸留水を加え再浮遊させ, 95℃で6分加熱, 更に10,000rpmで1分間遠心した上清をPCR用テンプレートとした。検出感度測定にはサルモネラ菌 (*Salmonella Enteritidis*) を1晩培養後, 生菌数を算出し, 更に10倍階段希釈した後, 各々の濃度の菌液を熱処理してDNAテン

プレートとした。

(2) DNA増幅

DNA増幅のためのPCRはReady-To-Goチューブ1本に滅菌水 (22µl), 各プライマー (アンチ0.25µl センス0.25µl) および各菌株のDNAテンプレート (2.5µl) を加え, サーマルサイクラー (ABI社) を用い市販プライマーの仕様書に準じた条件でPCRを実施した。1検体につき2本のReady-To-Goチューブを使用した。

(3) 電気泳動によるアンプリコンの確認

PCR終了後, 各検体の5µlを2.5%アガロースゲルで電気泳動を行い泳動後, アガロースゲルをエチジウムブロマイドで処理した後, 紫外線で各々のアンプリコンを確認し写真撮影を行った。

(4) ピロリン酸測定

PCR後, 各検体に試薬1を5µl添加し60℃で1分間加温振とう, さらに試薬2を20µl加え, 60℃で10分間加温振とうした後, 1検体2本のPCRチューブの反応液を合わせ, そこから90µlをマイクロプレートリーダー用のプレートに分注し吸光度 (490nm / 630nm) を測定した。吸光度0.04以上では目視による呈色の判定が可能であった。このことより, 吸光度が0.04未満をピロリン酸法陰性 (呈色陰性) 0.04以上をピロリン酸法陽性 (呈色陽性) とした。

(5) 検体の判定

陽性株及び陰性株をそれぞれのプライマーでPCRを行い電気泳動法で特定のアンプリコンが検出された検体を泳動法陽性, 検出されなかった検体を泳動法陰性とした。陰性株のうち泳動法で特定位置以外にバンドが観察される泳動法陰性検体で, ピロリン酸法で呈色するもの (目視で確認可: 吸光度0.04以上) を疑陽性とした。

3 結果

3.1 泳動法とピロリン酸法

表1に示した7種類のプライマーを用い, 特定遺伝子の保有が確認されている菌株 (陽性株) 39, 保有しないことが確認されている菌株 (陰性株) 121についてPCRを行い反応終了後, 電気泳動法によるアンプリコンの検出と呈色反応によるピロリン酸測定を各々について行い, 結果を表2に示した。

表2 食中毒菌の泳動法及びピロリン酸法によるPCR判定

プライマー	検体数	遺伝子保有株			遺伝子非保有株		
		泳動陽性	呈色陽性	呈色陰性	泳動陽性	呈色陽性	呈色陰性
STN	29	12	12	0	17	5	12
VPD	34	9	9	0	25	8	17
CPE	23	7	7	0	16	1	15
EVC	16	5	5	0	11	0	11
INV	16	2	2	0	14	2	12
IPA	16	2	2	0	14	0	14
SEA	26	2	2	0	24	0	24
計	160	39	39	0	121	16	105

陽性株の全ては泳動法及びピロリン酸法で陽性を示した。陰性株は泳動法では全て陰性と判定されるが、この中にピロリン酸法で呈色陽性を示す疑陽性株がSTN, VPD, CPE及びINVプライマーを用いた場合に認められた。VPDでPCRを行った後、その反応液におけるアンプリコンは電気泳動・染色後、画像として、またピロリン酸は呈色反応で測定した吸光度を棒グラフとして、図1に示した。レーン3, 8, 9がtdh(+)腸炎ビブリオで、泳動法では251bpに特異バンドが観察され呈色反応でも吸光度が0.04以上を示し、明らかに陽性と判定できる。レーン1, 2, 4, 5, 6, 10の6菌株は耐熱性溶血毒遺伝子を保有しないエルシニア, プロビデンシア及びtdh(-)腸炎ビブリオで、特異バンド以外の領域に多数のバンドが認められ、泳動法では明らかに陰性と判定できる。しかしピロリン酸法による呈色反応では吸光度が0.04以上を示し陽性と判定され、これが疑陽性の菌株である。

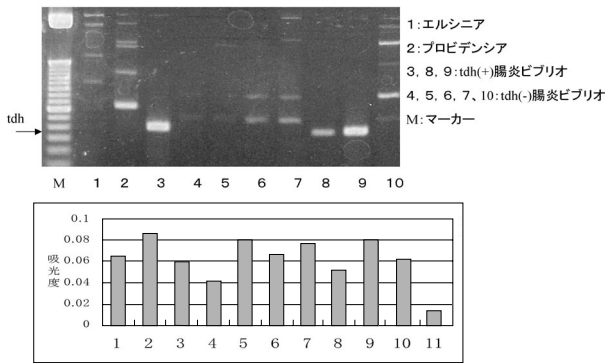


図1 VPDによる電気泳動画像とピロリン酸呈色

### 3.2 ピロリン酸法による食中毒菌等の鑑別

食中毒菌及びその他の菌20種について7種類のプライマーでPCRを行い、反応終末点の判定を泳動法及びピロリン酸法とで比較した。泳動法で特異バンドが認められピロリン酸法でも陽性を示すものを+, また両方法で陰性となったものを-, 疑陽性となったものを\*で表わし、表3に示した。EVC, IPA及びSEAを用いた場合、ピロリン酸法では各々の遺伝子を保有する菌株のみが陽性を示した。しかし、それ以外のプライマーを用いた場合には疑陽性を示す菌株が観察された。VPDでエルシニア, プロビデンシア及びtdh(-)腸炎ビブリオが、STNでシトロバクター, エルシニアプロビデンシアおよびtdh(-)腸炎ビブリオが、INVでクレブシエラ, シトロバクター, エルシニア, プロテウス, プロビデンシアおよびtdh(-)腸炎ビブリオが、CPEでtdh(-)腸炎ビブリオがそれぞれ疑陽性を示した。

表3 ピロリン酸法による判定

菌種	プライマー						
	STN	VPD	CPE	EVC	INV	IPA	SEA
大腸菌	-	-	-	-	-	-	-
腸管出血性大腸菌	-	-	-	+	-	-	-
腸管侵入性大腸菌	-	-	-	-	+	+	-
エンテロバクター	-	-	-	-	-	-	-
クレブシエラ	-	-	-	-	-	-	-
シトロバクター	-	-	-	-	-	-	-
セラチア	-	-	-	-	-	-	-
エルシニア	*	*	-	-	*	-	-
プロテウス	*	-	-	-	-	-	-
プロビデンシア	*	*	-	-	-	-	-
サルモネラ	+	-	-	-	-	-	-
赤痢菌	-	-	-	-	+	+	-
tdh(-)腸炎ビブリオ	*	*	*	-	-	-	-
tdh(-)腸炎ビブリオ	-	+	-	-	-	-	-
ナグビブリオ	-	-	-	-	-	-	-
ビブリオ・パルニフィカス	-	*	-	-	-	-	-
エンテロトキシン(-)エルシ菌	NT	-	NT	NT	NT	NT	-
エンテロトキシン(-)エルシ菌	-	-	+	-	-	-	-
エンテロトキシンβ-黄色ブドウ球菌	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
エンテロトキシンβ-黄色ブドウ球菌	-	-	-	-	-	-	+

+ : 陽性 - : 陰性 \* : 疑陽性 NT : 測定せず

### 3.3 ピロリン酸法による検出感度

サルモネラ菌 (*Salmonella Enteritidis*) を  $1.7 \times 10^8 \sim 10^0$  cells/ml まで10倍9段階の各濃度に希釈調整し、熱処理後テンプレート検体とした。STNを用い、増幅数を35回及び40回の各サイクル数でPCRを実施し、反応終了後、各々についてアンプリコンを泳動法で、ピロリン酸を呈色法で測定し、結果を図2に示した。

35サイクルでは  $1.7 \times 10^6$  cell/ml以上の菌量でピロリン酸法での呈色が陽性に、また泳動法でも陽性を示した。40サイクルでは  $1.7 \times 10^4$  cell/ml以上の濃度で両方法とも陽性を示した。

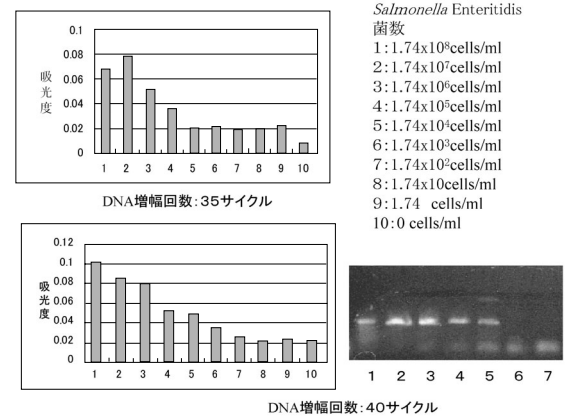


図2 菌数変化によるSTNでの電気泳動画像とピロリン酸呈色

次に  $1.7 \times 10^8$  cells/mlの濃度に調整し熱処理したサルモネラ菌 (*Salmonella Enteritidis*) をテンプレートとしSTNでPCRを行った。DNA増幅数を10, 15, 20, 25, 30及び35回で反応を終了させ後、各々についてアンプリコンとピロリン酸を測定し、結果を図3に示した。増幅数が10~20回では両方法とも陰性であったが、25回以上では泳動法、ピロリン酸法とも陽性を示した。また同様の実験を菌量  $1.7 \times 10^5$  cells/mlで行った場合でも、25回以上の増幅で両方法とも陽性を示した。

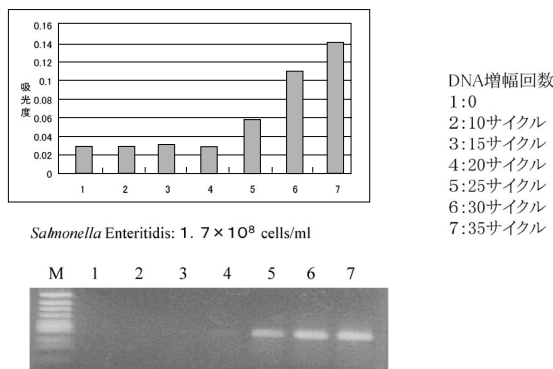


図3 増幅回数可変によるSTNでの電気泳動画像とピロリン酸呈色

#### 4 考 察

PCR法において、反応の終末点は増幅されるアンプリコンを検出して判定する。しかし、PCR法では特異遺伝子が増幅されると共にピロリン酸が生成されることから、反応の終末点をピロリン酸の測定でも可能である。遠藤は、酵素を利用した新たなピロリン酸の測定法を開発した。そこで、7種類の食中毒菌病原遺伝子鑑別用プライマーを用いた20種の食中毒菌等についてPCRを実施し、反応終末点を新たに開発したピロリン酸の測定法で判定し、その結果を通常用いる電気泳動法による判定と比較した。

検出対象とした特異遺伝子を保有する陽性菌株では、ピロリン酸法の判定結果は泳動法の結果と全く同じであった。一方、遺伝子を保有しない陰性菌株は、泳動法では全てが陰性であるが、ピロリン酸法ではVPD、STN及びCPE用のプライマーを用いた場合に疑陽性を示す菌株が認められた。特に、tdh(-)腸炎ピブリオは3種類いずれのプライマーにも非特異的に反応し、泳動法では非特異バンドを認めるものの、特定位置にバンドはなく陰性と判定はされるが、ピロリン酸法による呈色では陽性と判定された。しかし、このようなピロリン酸法で陰性菌株が陽性と判定される擬陽性はより特異性の高いプライマーを用いることで防止できると思われる。

次に食中毒菌の検出感度についての検討を $1.7 \times 10^8 \sim 10^0$  cells/mlの各濃度に調整したサルモネラ菌をテンプレートとしSTNプライマーでPCRを行い泳動法とピロ

リン酸法で判定を行った。その結果、泳動法での検出限界は $1.7 \times 10^5$  cells/mlで、また、ピロリン酸法でも同じ菌濃度以上で吸光度が0.04以上を示した。すなわち、この菌量が泳動法及びピロリン酸法での検出限界と思われる。検出限界の菌量をPCR反応チューブ当たりの菌量に換算すると $4.3 \times 10$  cellsであった。さらに、DNA増幅回数について比較した場合でもピロリン酸法と泳動法とでは同じ増幅回数以上で陽性と認められ、ピロリン酸法は泳動法と同程度の検出感度であることが示された。通常のPCR法ではアンプリコンの検出に発ガン物質・紫外線を用いるがピロリン酸法ではこれらを用いないことから泳動法より安全な方法であると考えられる。

最近、日本で開発されたLAMP法はDNA増幅を定温で行い、生成する大量のピロリン酸をピロリン酸マグネシウム塩に変え、濁りとして検出する方法である。LAMP法は、特異性の高い4種のプライマーを用いていることが大きな特徴で、増幅されるDNAの大きさは単一のサイズでない。このため、電気泳動では多数のバンドが観察され、生成DNAの特異性は泳動で容易に確認できず、また、生成DNAを直接シーケンス解析できない。一方、ピロリン酸法は呈色反応に用いる酵素、基質について検討すればLAMP法にも応用できる可能性もある。核酸増幅で生成されるDNAは単一であることから、直接シーケンス解析できる。

以上のことから、新たに開発したピロリン酸法はDNA増幅の終末点測定が安全かつ迅速に判定ができ、食品中の食中毒菌の鑑別に充分応用できると考えられた。

#### 5 参 考 文 献

- 1) 納富継宣, 長谷哲: 次世代の遺伝子増幅法, 化学と工業, 第54巻 第6号, 674 - 676, 2001
- 2) Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res., 28 : e 63, 2000
- 3) Nagamine, K., K. Watanabe : Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. Clinical Chemistry, 47 : 1742 - 1743, 2001
- 4) M. T. Endo: A colorimetric assay for inorganic pyrophosphate that is also useful for measuring product accumulation in polymerase chain reaction : Analytical Biochemistry 315, 170 - 174, 2003