

# SYBR Green real-time PCR 法を用いた 食品中のサルモネラ属菌スクリーニング法の検討

古賀舞香・高橋直人・松永典久・丸山浩幸

福岡市保健環境研究所保健科学課

## Screening of Genus *Salmonella* in food by SYBR Green real-time PCR

Maika KOGA, Naoto TAKAHASHI, Norihisa MATSUNAGA  
and Hiroyuki MARUYAMA

Health Science Section, Fukuoka City Institute for Health and the Environment

### 要約

迅速かつ簡便、正確なサルモネラ属菌のスクリーニング法の確立を目的に、サルモネラ属菌が特異的に保持している遺伝子のひとつである侵入性因子関連遺伝子 *invA* をターゲットとして、前培養培地から SYBR Green real-time PCR を実施後、培養法への移行の要否を決定する検査法の検討を行った。まず、サルモネラ属菌を含む 5 菌株で特異性確認試験を行った結果、サルモネラ属菌 3 菌株のみ陽性に判定され、かつ、融解曲線解析でピークが 83°C 付近にのみ確認された。次に、検出限界確認試験を行った結果、段階希釈菌液では 10<sup>4</sup>CFU/mL であった。また、鶏肉に段階希釈菌液を添加して前培養後に qPCR を行った結果、添加菌数に関係なく、Ct 値はほぼ一定となり、前培養培地の qPCR 結果と培養結果はすべて一致した。さらに、流通品における qPCR 結果と培養結果もすべて一致した。以上のことから、本法はスクリーニング法として有効であると考えられた。

**Key Words** : サルモネラ属菌 Genus *Salmonella*, 侵入性因子関連遺伝子 invasion gene *invA*, SYBR Green 定量 PCR SYBR Green real-time PCR, スクリーニング検査 Screening test, 前培養 preculture

### 1 はじめに

食品中のサルモネラ属菌の検査は厚生労働省通知<sup>1)</sup>に従い、図 1 に示すとおり、前培養後に選択増菌する 2 段階増菌培養を行い、更に分離培養後、生化学性状試験や抗原型決定試験にて同定を行っている（以下、培養法という）。そのため、分離・同定には 5 日間以上を要し、操作も煩雑である。さらに、分離培地上でサルモネラ属菌の定型的集落と近似した集落を形成する菌の存在や、リジン陰性、硫化水素非産生等の非定型サルモネラ属菌の存在も知られており、培養法では検出が困難となる場合も少なくない。

一方、食品中の腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査については、厚生労働省通知<sup>2)</sup>に従い、real-time PCR にてベロ毒素遺伝子及び O 抗原遺伝子検出による増菌培地からのスクリーニングを行い、その結果で培養法への移行の要否を決定している（以下、PCR 後培養法という）。

「食品からの微生物標準試験法検討委員会」は、「最も基準となる標準的な細菌試験方法は培養法であり、規格化された標準法と、迅速法や簡便法等他の試験法を比較検討し、標準法と同等以上の精度や感度であると確認することで、それに準ずる方法と考えることができ、目的に適した試験法が広く利用できる」という旨の考えを示している<sup>3)</sup>。

本研究では迅速かつ簡便、正確なサルモネラ属菌のスクリーニング法の確立を目的に、サルモネラ属菌が特異的に保持している遺伝子のひとつである侵入性因子関連遺伝子 *invA*<sup>4)</sup> をターゲットとして、SYBR Green real-time PCR（以下、qPCR という）でスクリーニングを行う PCR 後培養法の検討を行った。

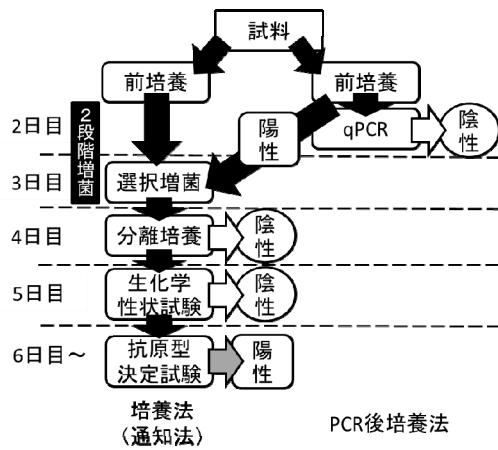


図1 検査フロー

## 2 実験方法

### 2.1 PCR 後培養法の検討

#### 2.1.1 試料, 菌株, 試薬及び使用機器

試料：平成 27 年に市内で流通していた鶏肉

菌株：*Salmonella* Enteritidis (以下, SE という),  
*S.Senfteberg*, *S.Schwarzengrund*,  
*Escherichia coli* O124 (*invE*, *ipaH*),  
*Proteus vulgaris*

試薬：Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (invitrogen 社製)

使用機器：Mx3005P qPCR System (Agilent Technologies 社製)

#### 2.1.2 qPCR 条件

プライマーの配列, 反応混液の組成, 反応条件は表 1~3 のとおりである。

表1 プライマーの塩基配列<sup>5)</sup>

塩基配列(5'-3')	増幅産物	Tm(°C)
(F) GATTCTGGTACTAATGGTGATGATC	288	82.6
(R) GCCAGGCTATCGCCAATAAC		

表2 反応混液の組成

試薬	容量(μL)
Platinum SYBR Green	25
プライマー F/R混液(10 μM)	1
ROX	0.1
滅菌水	18.9
テンプレート	5
計	50

表3 反応条件

条件	ステージ						
	初期変性 (1サイクル)		PCR反応 (40サイクル)		融解曲線分析 (1サイクル)		
温度 (°C)	50	95	95	60	95	55	95
時間 (秒)	120	12	15	30	60	30	30

### 2.1.3 特異性の確認

供試菌株 5 株の集落を TE100μL に懸濁し, 熱抽出法 (95 °C, 5 分加熱処理. 12,000rpm, 5 分遠心.) で DNA 抽出し, qPCR を行った。

### 2.1.4 qPCR の検出限界確認

緩衝ペプトン水 (以下, BPW という) に SE を接種, 37°C, 24 時間培養した. 12,000rpm, 10 分遠心集菌後, 滅菌水で洗浄, 遠心集菌したものを滅菌水 10mL で懸濁し, 菌体原液とした. その菌体原液を滅菌水で段階希釈し, 段階希釈菌液とした. 段階希釈菌液をトリプチケースソイ寒天培地に塗抹, 培養後集落数を計測し, 各段階希釈液の菌数オーダーを算出した。

各段階希釈菌液 100μL を熱抽出法で DNA 抽出し, qPCR を行った。

### 2.1.5 qPCR 結果と培養法結果の比較

段階希釈菌液各 1mL を鶏肉 4g に添加し, BPW45g を加えて, 1 分間ストマッキング処理し, 37°C, 24 時間前培養した。

前培養を行った BPW100μL をアルカリ熱抽出法 (10,000×g, 10 分遠心, 上清除去. 沈渣に 50mM NaOH 85μL を添加. 100°C, 10 分加熱処理. 1M Tris-HCl (pH7.0) 15μL を加えて中和. 10,000×g, 10 分遠心.) で DNA 抽出し, qPCR を行った。

また, 前培養を行った BPW を, テトラチオネート培地 (以下, TT 培地という) に 1mL, ラポポート・バシリアディス培地 (以下, RV 培地という) に 100μL 接種し, 37°C, 24 時間増菌培養した. 各増菌培地を DHL 寒天培地と ES サルモネラ寒天培地 II (以下, ES II 寒天培地という) に塗抹, 37°C, 24 時間培養し, 同定を行った。

## 2.2 流通品による比較

### 2.2.1 試料

試料:平成 28 年に市内で流通していた食品全 28 品(鶏正肉 8, 惣菜 9, 卵 11 検体) (以下, 流通品という)

### 2.2.2 流通品の qPCR 結果と培養法結果の比較

各流通品 25g に BPW225g を加えて, 1 分間ストマッキング処理し, 37°C, 24 時間前培養した. 前培養を行った BPW100μL をアルカリ熱抽出法で DNA 抽出し, qPCR を行った。

また, 前培養を行った BPW を, TT 培地に 1mL, RV 培地 100μL 接種し, 37°C, 24 時間培養した. 各増菌培地を DHL 寒天培地と ES II 寒天培地に塗抹, 37°C, 24 時間培養した。

### 3 実験結果

#### 3.1 PCR 後培養法の検討

##### 3.1.1 特異性の確認

供試菌株 5 株で検討を行った結果, サルモネラ属菌 3 株 (SE, *S.Senftenberg*, *S.Schwarzengrund*) のみが qPCR 陽性であり, 細胞侵入性に関与する病原遺伝子を保有した *Escherichia coli* O124 (*invE*, *ipaH*), 培養法でサルモネラ属菌と類似した集落を形成する *P. vulgaris* は qPCR 陰性であった. また, 図 2 のとおり, 融解曲線解析において, ピークは 83°C 付近のみであり, プライマーはサルモネラ属菌の特異的検出に機能したと確認された.

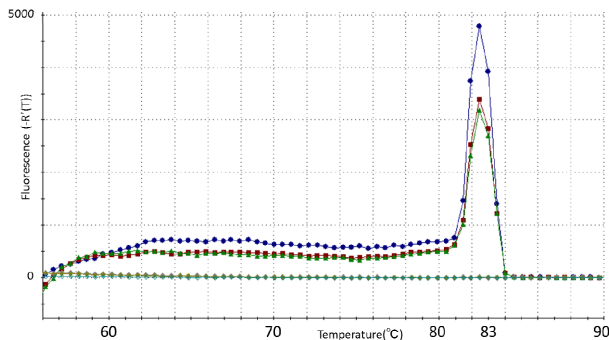


図2 融解曲線解析

##### 3.1.2 qPCR の検出限界確認

段階希釈菌液の qPCR 結果を表 4 に示す. 検出限界は  $10^4$  CFU/mL であった.

表4 検出限界確認試験

菌数 オーダー (CFU/mL)	段階希釈菌液qPCR		
	qPCR結果	平均Ct値	標準偏差
$10^1$	—	—	—
$10^2$	—	—	—
$10^3$	—	—	—
$10^4$	+	38.93	0.1294
$10^5$	+	34.99	0.1072
$10^6$	+	31.09	0.1479
$10^7$	+	26.75	0.2366
$10^8$	+	22.68	0.0996
$10^9$	+	19.13	0.0260
NC	—	—	—

n=4

##### 3.1.3 qPCR 結果と培養法結果との比較

前培養後の qPCR 結果と, 培養法の培養結果を表 5 に示す. 前培養後に qPCR を行うと, 添加菌数に関係なく, Ct 値はほぼ一定となり, 段階希釈菌液の Ct 値と比較すると  $10^9$  CFU/mL 相当の遺伝子量が得られていると推察された. また, qPCR 結果と培養結果はすべて一致した.

表5 qPCR結果と培養結果

接種菌数 オーダー (CFU)	前培養培地qPCR			培養法結果
	qPCR結果	平均Ct値	標準偏差	
$10^1$	+	15.63	1.760	+
$10^2$	+	15.37	1.502	+
$10^3$	+	16.01	1.261	+
$10^4$	+	15.50	1.226	+
$10^5$	+	17.19	1.048	+
$10^6$	+	18.43	0.4504	+
$10^7$	+	19.71	0.7178	+
$10^8$	+	18.92	1.033	+
$10^9$	+	17.94	1.257	+
NC	—	—	—	—

n=4

#### 3.2 流通品の qPCR 結果と培養法結果の比較

流通品の qPCR 結果と培養法結果を表 6 に示す. 鶏肉 8 検体中 4 検体が, qPCR 結果, 培養結果ともに陽性で, 残りはすべて qPCR 結果, 培養結果ともに陰性であった. つまり, qPCR 結果と培養法結果はすべて一致した.

表6 流通品の qPCR 結果と培養法結果の比較

検体	前培養培地	培養法結果
	qPCR結果	
鶏肉	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	—
	6	—
	7	—
	8	—
肉類加工品	1	—
	2	—
	3	—
野菜類加工品	1	—
	2	—
卵類加工品	1	—
	2	—
	3	—
	4	—
卵	1	—
	2	—
	3	—
	4	—
	5	—
	6	—
	7	—
	8	—
液卵	1	—
	2	—
	3	—

### 4 考察

食品中のサルモネラ属菌の PCR 後培養法の検討を行った. その結果, プライマーはサルモネラ属菌の特異的検出に機能しており, qPCR の検出限界は  $10^4$  CFU/mL であった. また, 段階希釈菌液を添加した鶏肉を前培養すると, 添加菌数が少量であっても増菌して十分な遺伝子量を得ることができた. さらに, 段階希釈菌液を添加した鶏肉を前培養後行った qPCR 結果と培養法結果, 又, 流通品を前培養後行った qPCR 結果と培養法結果は, すべて一致した. 以上より, PCR 後培養法はサルモネラ属

菌のスクリーニング検査として適切であると考えられた。

検体のサルモネラ属菌汚染状態によって、次の4つの場合が想定される。

- ①検体に生菌が少量でも存在している場合：前培養で qPCR 検出限界以上に増菌され、qPCR 陽性と判定される。培養法に移行し、分離培養で集落を確認できることから、陽性の結果判定となる。
- ②検体に死菌のみが多量（約  $10^5$  CFU/g 以上）に存在している場合：増菌はしないが、前培養培地中に qPCR 検出限界以上存在していることとなり、qPCR 陽性と判定される。培養法に移行するが、分離培養では集落を確認できず、陰性の結果判定となる。
- ③検体に死菌のみが約  $10^5$  CFU/g 以下存在している場合：増菌せず、qPCR 検出限界以下しか含まれないため、qPCR 陰性と判定される。培養法に移行せず、陰性の結果判定となる。
- ④検体に生菌・死菌いずれも存在しない場合：ターゲット遺伝子が存在しないため、qPCR 陰性と判定される。培養法に移行せず、陰性の結果判定となる。

本法を用いると、qPCR 陰性は③と④のように生菌が存在しないことを意味し、検査開始の翌日に陰性の結果判定が可能であり、迅速なスクリーニング法として有効であると考えられる。一方、qPCR 陽性は①と②のように遺伝子の存在のみ判明し、培養法に移行する必要があるが、培養法に移行する検体が qPCR 陽性検体に限定される上に、生死は不明であってもサルモネラ属菌の存在

が判明した状態で検査を進めていくため、従来の培養法と比較して効率性・正確性の向上が期待できる。

今後も検討を続け、生死が判別できる方法等、より迅速かつ簡便、正確なサルモネラ属菌のスクリーニング法を確立したい。

## 文献

- 1) 厚生労働省通知食安発 0729 第 4 号食品：添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について、平成 27 年 7 月 29 日
- 2) 厚生労働省通知食安監発 1120 第 1 号：腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法、平成 26 年 11 月 20 日
- 3) 食品からの微生物標準試験法検討委員会（標準法検討委員会）について、食品からの微生物標準試験法ホームページ (<http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/about.html>)
- 4) 松下 秀, 他：腸管感染症における LAMP 法の応用, モダンメディア, 50 巻 12 号, 293~299, 2004)
- 5) Fey, A. et al. : Establishment of a Real-Time PCR-Based Approach for Accurate Quantification of Bacterial RNA Targets in Water, Using *Salmonella* as a Model Organism, Appl. Environ. Microbiol., 70, 3618~3623, 2004