

# 遺伝子工学技術を用いた食品微生物制御技術に関する研究（第2報）

～ PCR法を用いた食品中のリステリア菌検出の検討～（平成13年度）

研究開発課 川原美香、永草 淳

## 1．試験研究の目的

*Listeria monocytogenes*（以後リステリア菌）は敗血症、髄膜炎、胎盤感染による流産等の症状を引起すとされる食中毒菌である。特に欧米諸国では過去に生乳タイプのナチュラルチーズが原因となるリステリア菌の食中毒事件が発生しており、その致死率の高さから注意視されている。日本では基本的に牛乳の殺菌が義務付けられていることもあり、今までリステリア菌による食中毒は広く知られてこなかった。しかし、全国的に様々なチーズ工房が出来始めている現在、衛生管理を徹底していかなければ、このような危害が起こる可能性は十分考えられる。そこで、別報にあるような衛生管理のマニュアルづくりに取り組むとともに、迅速なリステリア菌の検査体制を整える必要があると考えられた。しかし、公定法に基づくリステリア菌の検査は非常に日数がかかる上、確認試験の項目が多岐にわたり、複雑である。消費期限が短い製品には検査結果からの対応が遅れる可能性があり、実際の検査法としては必ずしも適していない。そこで、本報では短期間で特異性の高い結果が得られる検査方法として、PCR法を用いたリステリア菌の検出を検討した。

## 2．試験方法および結果

### 増菌培地からのリステリア菌の検出

リステリア菌はその危害度の高さから、通常の食品検査では25gあたりの検出を行うこととされている。検出限界を考慮すると、PCR法の前段階として増菌培養の過程は必須である。しかし、培地に含まれる成分がPCRを阻害することが予測され、増菌培地中のリステリア菌の検出限界について検討した。

純培養したリステリア菌をリステア選択増菌培地（FDA/IDF-FIL リステリア増菌ブイヨン基礎培地、MERCK社）に接種し、30、48時間培養した。培養後の菌数は $6.0 \times 10^8$  / mlであり、無菌培地を用いて10倍希釈を繰り返し、 $6.0 \times 10^1 \sim 6.0 \times 10^8$  / mlの菌数が異なる培地を得た。各サンプルは遠心分離（13,000rpm、10min）して菌体を沈降させ、上澄みを除去した。その後、沈澱に滅菌水を加えて2回攪拌、遠心分離を行うことにより洗浄した。DNAの抽出方法は前報<sup>\*</sup>1に従って行い、精製も同様にフェノール-クロロホルム処理後、エタノール沈澱する方法を用いた。また、プライマーは文献<sup>\*</sup>2に報告されている配列を用いた。PCRの条件は純培養した菌体から得られたtemplateDNAで検討し、最終的に図に示す条件を設定した。この条件において菌数が異なる各サンプルのPCRを行ったところ、菌数 $6.0 \times 10^8 \sim 6.0 \times 10^4$  / mlのサンプルがDNA増幅物が確認できた。更に、検出限界を上げるため、DNA吸着カラムを使用した市販のDNA精製キット（Nucleo Spin Food 日本ジェネティクス社）を用いたところ、操作も簡便になり菌数 $6.0 \times 10^3$  / mlのサンプルまで検出が可能であった。増菌培養（30、48hr）後には少なくとも $10^3$  / mlレベル以上の菌数が存在することから、この操作により最短3日間でリステリア菌の判定が可能であると考えられた。なお、PCRによる増幅で得られたDNAを精製してDNAシーケンサーで遺伝子配列を調べたところ、目的とするリステリア菌の溶血毒（リステリオリジンO）遺伝子プライマーによる産物であることが確認された。

| PCR mixture     |                             |
|-----------------|-----------------------------|
| Red Taq (SIGMA) | 25 $\mu$ l                  |
| primer          | 1 $\mu$ l                   |
| template DNA    | 5 $\mu$ l                   |
| water           | 19 $\mu$ l                  |
| <b>Total</b>    | <b>50 <math>\mu</math>l</b> |

| PCR condition        |    |        |
|----------------------|----|--------|
| initial denaturation | 94 | 3 min  |
| denaturation         | 94 | 20 sec |
| anneal               | 55 | 20 sec |
| extension            | 72 | 40 min |
| terminal extension   | 72 | 7 min  |

primer: Listeriolysin O gene

size of PCR products: 519bp

2.5% agarose gel electrophoresis + EtBr

図 . PCR 用反応液の組成と反応条件

### 分離培地からのリステリア菌の検出

また、検査結果を得るまでに時間的制約がない場合は、リステリア菌の陽性率を考慮すると、PALCAM 培地等で陽性が推定されてから確認試験を行った方が作業性はよい。その場合でも確認試験を PCR で行うと判定が早く、判別も容易である。しかし、菌体の採取量が多いと PCR がうまくいかないことがあり、templateDNA を適正な濃度に調製する必要があると考えられた。そこで、分離培地からリステリアコロニーを 1 白金耳採取して templateDNA を調製し、そのサンプルを滅菌水を用いて 10 倍希釈を繰り返し、DNA 含量が異なるサンプルを得た。次に適当な希釈倍率のサンプルを RNase 処理後、260 nm で吸光度を測定し、各サンプルの DNA 含量を推定した。全てのサンプルについて PCR を行ったところ、DNA 含量が 5 ~ 100  $\mu$ g / ml のものが電気泳動時のバンド形成が明瞭であり、PCR に用いるサンプルの適正濃度と考えられた。

### 3 . まとめ

リステリア菌の確定試験を PCR 法で行うと DNA 精製キットの使用で増菌培養から確定まで最短 3 日間と迅速に検出できることが可能であった。また、推定培地から PCR 法で確定を行う場合、templateDNA が濃すぎることで PCR の阻害が生じる可能性があるため DNA 量を適正量にコントロールする必要がある、その範囲は templateDNA の濃度として 5 ~ 100  $\mu$ g / ml と推測された。

\* 1 : 北海道立十勝圏地域食品加工技術センター 平成 12 年度事業報告

\* 2 : APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY , Sept , 1991 , p.2576-2580

謝辞 本試験の実施にあたり、遺伝子解析等のご協力を頂きました (株) フロンティア・サイエンス様に御礼申し上げます。