

Evaluation of 3M Molecular Detection System for detecting *Listeria monocytogenes* from food samples

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 3M Molecular detection system, <i>L. monocytogenes</i> , rapid detection, foodborne pathogens 作成者: 川崎, 晋, 持田, 麻里, 齋藤, 美枝, 守山, 隆敏 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002959

報 文

**3M™ Molecular Detection System を用いた *Listeria monocytogenes* の
簡易迅速遺伝子検査法の評価**

川崎 晋*¹, 持田 麻里¹, 齋藤 美枝¹, 守山 隆敏²

¹ 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

² スリーエムヘルスケア株式会社

**Evaluation of 3M Molecular Detection System for detecting *Listeria
monocytogenes* from food samples**

Susumu KAWASAKI*¹, Mari Mochida¹, Mie Saito¹, and Takatoshi Moriyama²

¹ National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

² 3M Health Care Limited, 33-1, Tamagawadai 2-chome Setagaya-ku, Tokyo 158-8583, Japan

Abstract

The culture methods (ISO 11202-1) were compared to 3M Molecular detection system (MDS) for *Listeria monocytogenes* from enrichment cultures of various types of artificially inoculated ready to eat (RTE) foods. The MDS assay was evaluated in 12 types of spiked samples, including meat, fish, sprouts, and dairy products for *L. monocytogenes*. The MDS assay also evaluated in inoculate ground beef samples. Beef samples contamination levels is 0.66 most probable number (MPN)/g were used for recovery study. Twenty test portions (5g) of the contaminated beef were pre-enriched, and MDS assay and the culture method (ISO 11290-1) was used thereafter. An excellent agreement was obtained for the results of MDS assay and culture method, which suggests that the MDS assay is a reliable and useful method for rapid screening of *L. monocytogenes* contamination.

Keywords: 3M Molecular detection system, *L. monocytogenes*, rapid detection, foodborne pathogens

* 連絡先 (Corresponding author), skawasa@affrc.go.jp

緒 言

Listeria monocytogenes は、人獣共通感染症として知られている食中毒菌であり、欧米諸国では1980年代に食品を介した集団感染事例が数多く報告されてきた。我が国においても、2001年のナチュラルチーズを原因食とした集団食中毒事例が報告されており、食中毒起因菌として注目されている¹⁾。本菌は低温での増殖が可能であり、特に市販食品において、非加熱でそのまま喫する「ready-to-eat」食品では、その汚染防除が重要視されている。実際、国内流通の食品の汚染率としても、市販の加熱用食肉からは20~40%の汚染が見られ、国内流通食品魚介類やその加工品においても10~30%の高い汚染率が一部の加工品目について得られており、食品の汚染率は欧米と大差ないことが報告されている²⁾。

L. monocytogenes の培養法による検出では、ISO 11290-1を用いた場合、4~6日の時間を必要とする³⁾。本法では、酵素基質培地と抗原抗体反応による検出を組み合わせるため、FDA/BAM⁴⁾と比較して判定者の経験は軽減されるものの、培養時間を24時間もしくは48時間とするため、検出時間の短縮には至らない。検出時間短縮のために、遺伝子学的手法を用いた*L. monocytogenes* の検出法がこれまで開発されてきた。例えば、Real-Time PCR法に代表されるように、蛍光色素で標識した一本鎖DNAプローブをPCR反応の特異的増幅領域内に設計することにより、電気泳動なしでの直接検出を可能にした検出系を応用した検出法が報告されている⁵⁾。また、SYBR Greenなどds-DNAに直接インターカレートする蛍光物質を用いて、遺伝子増幅の増加量をモニタリングする直接検

出法も開発されている⁶⁾。さらにはPCRのように遺伝子増幅時の温度変化を必要としない、等温遺伝子増幅が可能なLAMP法なども検出法として報告されている⁷⁾。このように遺伝子検出の自動化を可能とする技術の普及により、特に食中毒菌の検出においてはそのキット化が進み始めてきた。

近年、Molecular Detection System (3Mヘルスケア；以下、MDS) と呼ばれる、等温遺伝子増幅法であるLAMP法とATP検出法による発光検出系を組み合わせることにより遺伝子増幅産物を直接検出可能な遺伝子検査システムが開発された。MDSでは、遺伝子増幅された際に出現するピロリン酸塩および3'ホスホアデノシン-5'ホスホ硫酸をATPスルフィラーゼでの付加反応によりATPを産生させ、これをルシフェラーゼにより発光検出する(図1)ことにより、特定遺伝子の検出を行っている。本技術は、LAMP法を活用しているため増幅反応が比較的早く行われるという優位点に加え、発光検出のため励起光源を必要とせず、検出機器の省スペース化を可能とするという利点がある。また、一般に蛍光よりも発光検出の方が高感度であるということも、優位点のひとつである。しかし、現在、MDSの*L. monocytogenes* 検出キットの評価試験については具体的な報告例がなく、*Listeria* 属検出キットについては製造環境中のスポンジによるサンプリングについて、その優位性の結果が報告されているものの⁸⁾、実際の食品、特にReady-to-eat食品からの検出評価試験結果や、その検出感度についての報告はない。

本研究では、3M MDSの*L. monocytogenes* 検出キットを用いて、日本の小売店舗で販売されているReady-to-eat食品からの検出評価試験を試みた。また、挽肉を用いて低濃度汚染を想定した場合の検出率につい

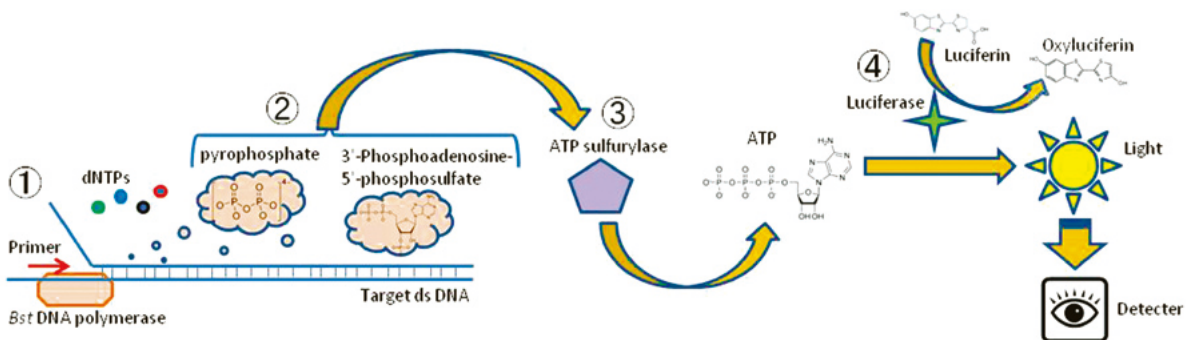


図1. MDS法を用いた遺伝子増幅産物の検出原理

て、3M MDS専用培地とその他の培地を活用した場合
 における検出率についても比較を行った。

実験材料および方法

1. 供試菌および供試食材と接種菌数の確認

供試菌は、*L. monocytogenes* ATCC49594株を用い、Trypticase Soy Broth (TSB, Difco) に0.6%のYeast extractを加えたもの(以下TSBYE)にて35℃、24時間培養後、実験に供した。供試食材は、小売店舗で市販されているReady-to-eat食品(表1)および牛挽肉を購入し、これを以下の実験に用いた。*L. monocytogenes*の前培養液は滅菌リン酸緩衝溶液を用いて10倍段階希釈し、この希釈液をTrypticase Soy Agar (TSA; Difco)に0.6% Yeast extractを加えた寒天平板(以下、TSAYE)に塗抹し培養した。35±1℃24時間培養後に発育集落数を計測し、*L. monocytogenes*の菌数を求めた。

2. 牛挽肉からの*L. monocytogenes* 検出感度試験

牛挽肉からの*L. monocytogenes*の検出感度を求めるため、Fraser培地(3M)もしくは牛挽肉加Fraser培養液からの検出感度を求めた。Fraser培養液は9mLずつ試験管に分注した。また、別途牛挽肉25gをFraser培地225mLに加え35℃で1昼夜培養した液を作成し、これを牛挽肉加Fraser培養液として9mLずつ試験管に分注した。この2つの系に、1.で作成した*L. monocytogenes*前培養液を、Fraser培養液もしくは牛挽肉加Fraser培養液を用いて10倍段階希釈し、それぞれ10⁰CFU/mL(1~9CFU/mL)となるまで希釈した。

各々の菌液各20μLをMDSによる核酸抽出法に供し、その抽出液をMDSによる遺伝子検出に供した。

3. Ready-to-eat食品からのMDSによる検出評価試験

前培養した*L. monocytogenes*菌液を滅菌リン酸緩衝溶液にて10倍段階希釈し、それぞれ10¹CFU/mLとなるよう調製した。調製した菌液0.1mLを表1に示した供試食材25gに接種し、直ちに評価試験に供した。

評価試験は、培養法ではISO11290-1に従って検出した。MDS法では、ISO11290-1でのDemi-Fraser培地による増菌過程で24時間培養後の菌液を20μL、さらにFraser培地による2次増菌過程で24時間培養後の菌液、それぞれ各20μLをMDSによる核酸抽出法に供した。これらの抽出液をMDSによる遺伝子検出に供し、培養法ISO11290-1の結果とMDSによる結果を比較した。

4. 低濃度接種区における検出感度試験と前培養培地間比較試験

培地間比較試験を行うため、低接種区(1検体25gあたり1細胞以下)の牛挽肉検体を作成し、検出率の比較を試みた(図2)。前培養した*L. monocytogenes*は滅菌リン酸緩衝溶液を用いて10倍段階希釈し、およそ10¹CFU/mLとなるよう調製した。調製した菌液1mLを牛挽肉400gに接種し、無菌の袋に入れ良く混合した。同じく、この菌液1mLを99mLのTSBYEに接種し、これを原液として*L. monocytogenes*の生菌数を求めた。生菌数は5本法による最確数法で求め、各試験管について混濁が見られたものには、*L. monocytogenes*の確認試験を、5.の手順に従って実施した。牛挽肉

表1. *L. monocytogenes*の接種試験によるMDS法の食材適合試験結果.

検体	1次増菌 (Demi-Fraser)		2次増菌 (Fraser)	
	ISO-11290-1	MDS	ISO-11290-1	MDS
ベーコン	+	-	+	+
スモークサーモン	+	+	+	+
マグロ剥き身	+	+	+	+
スジコ	+	-	+	+
エビ	+	+	+	+
明太子	+	+	+	+
コールスローサラダ	+	-	+	+
モヤシ	+	-	+	+
カイワレ	+	-	+	+
モッツァレラチーズ	+	-	+	+
カマンベールチーズ	+	+	+	+

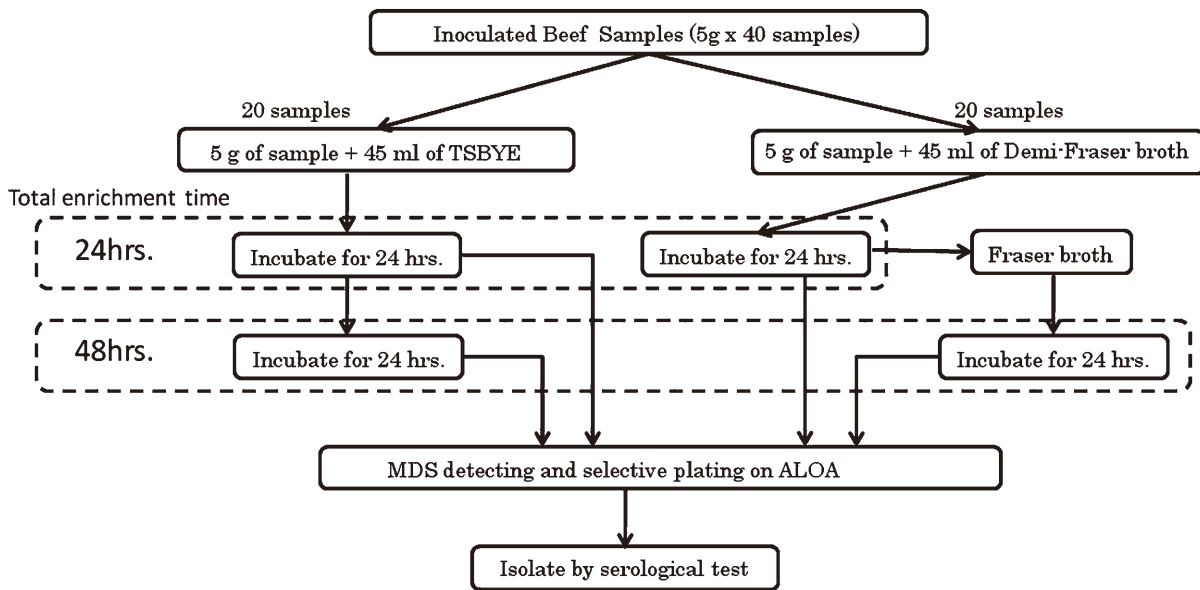


図2. MDSと培養法での*L. monocytogenes*検出比較実験のスキーム

は5gに小分けし、これを2試験区で各20個ずつ作成した。各試験区について、前培養培地（TSBYE、およびDemi-Fraser）を各45mLずつ加え、35℃で24時間培養した。培養後の各培養液は、各1mLずつ微量遠心管に移し、-20℃で直ちに保存した後にMDSによる核酸抽出および遺伝子検出に使用した。同時に、培養液から*L. monocytogenes*の確認試験を実施した。TSBYEの試験区では、さらに24時間培養を継続した。一方、Demi-Fraser培地の試験区では、0.1mLを10mLのFraser培地に移し、培養を24時間継続した。これらも培養が終了後、各々について、培養液から*L. monocytogenes*の確認試験を実施した。10mLのFraser培地については、さらに24時間培養を継続し、同様に確認試験を実施した。

5. 培養法と抗体キットによる*L. monocytogenes*の検出と確認

培養液中からの*L. monocytogenes*検出は、ALOA平板に一白金耳各線して35℃24~48時間培養することで行った。得られた典型コロニーは、釣菌して200μLのPBSに懸濁し内160μLを、抗体検出キットSiglePath L' mono (Merck)に供し、*L. monocytogenes*であることを確認した。

最確数法においても、各試験管にて混濁が見られ

たものにはその160μLをSiglePath L' monoに供し、*L. monocytogenes*であることを確認した。

6. MDSによる核酸抽出法および遺伝子増幅反応による検出

MDSによる核酸抽出ならびに遺伝子増幅反応検出は3M Molecular Detection Assay *Listeria monocytogenes* (3M)と専用遺伝子増幅機3M Molecular Detection Instrument (3M)を用いて行った。

4. で凍結保存した、24時間および48時間培養した培養液は、自然解凍した後、20μLを付属の抽出キットの3M Lysis tube（以下、Lysis tube）に加え、転倒混和した。これをヒートブロックで100℃15分間加熱後、直ちに事前に-20℃で冷却しておいたチルブロックに移し、10分間冷却した。Lysis tubeを数回転倒混和後、室温5分放置しLysis tube内の樹脂を自然沈降させ、検体由来の残渣を共沈により除去した。この上澄み20μLを固形化した遺伝子増幅試薬入りの反応管に移し、ピペティングにより混和させた後、専用遺伝子増幅機3M Molecular Detection Instrumentにより等温遺伝子増幅させた。また、測定毎に、付属の陽性/陰性コントロール試薬を用いて反応の確認を行った。75分間の反応後、*L. monocytogenes*の判定を付属ソフトウェアにより検出結果を自動判別した。

結 果

1. 牛挽肉における検出感度試験

Fraser培地および牛挽肉加Fraser培養液を用いて*L. monocytogenes*を段階希釈し ($10^1 \sim 10^7$ CFU/mL), その培養液20 μ LからMDS法による核酸抽出を行い, 遺伝子増幅反応に供した場合での検出感度を求めたところ, 双方ともに 10^5 CFU/mLと得られた (Data not shown).

2. Ready-to-eat食品でのMDS法の検出評価試験

10^0 CFU/25 gの濃度となるよう*L. monocytogenes*を接種した供試食材からのMDS法による検出試験結果を表1に示した. 1次増菌培地であるDemi-Fraser培地で24時間培養した検体からでは, スモークサーモン・マグロ剥身・エビ・明太子・カマンベールチーズからはMDS法で検出可能であったが, その他の検体からは検出できなかった. さらにこの1次増菌液0.1 mLを10 mLのFraser培地に移し, 24時間培養した検体からでは, 全ての食材においてMDS法による検出が可能であった.

3. 低濃度接種区における検出感度試験と前培養培地間比較試験

低濃度接種区における牛挽肉からの検出感度試験の結果を表2に示した. *L. monocytogenes*の接種菌数は最確数法で0.66 MPN/5 gと求められた. Demi-Fraser培地で一次増菌した場合, MDS法による陽性検出数は20検体中5検体で, これらは培養法での結果と一致した. 1検体のみ培養法で陽性, MDS法で陰性との結果を得た (検体No. 24). さらにFraser培地に移して培養を24時間行った検体では, 培養法で陽性と得られた検体は全てMDS法でも陽性と得られた. 1検体 (検体No. 33) のみ, 培養法で陰性であったが, MDS法で陽性と検出された. このFraser培養液については, 別途核酸を抽出し通常のPCR法に供したところ, *L. monocytogenes*陽性と得られることを確認した.

Demi-Fraser, Fraser培地以外の前培養培地の活用の可能性を検討するため, TSBYEにおいても, 同様の試験を実施した. TSBYEにて24時間培養の時点で, 培養法ならびにMDS法による検出に供したが, 培養法では3検体が陽性, MDS法では検出できなかった. さらに培養を48時間まで継続したところ, 培養法では8検体が陽性と得られたものの, MDS法にて陽性と得られたものは3検体であった.

表2. 牛挽肉を用いた*L. monocytogenes*の培地間評価および検出試験結果.

SampleNo.	TSBYE				SampleNo.	Demi-Fraser		Demi-Fraser \rightarrow Fraser	
	24h		48h			24h		48h	
	ISO 11290-1	MDS	ISO 11290-1	MDS		ISO 11290-1	MDS	ISO 11290-1	MDS
1	+	-	+	-	21	-	-	-	-
2	-	-	+	+	22	-	-	-	-
3	-	-	-	-	23	+	+	+	+
4	-	-	-	-	24	+	-	+	+
5	-	-	+	+	25	-	-	-	-
6	-	-	-	-	26	+	+	+	+
7	-	-	-	-	27	-	-	-	-
8	-	-	+	-	28	-	-	-	-
9	-	-	-	-	29	+	+	+	+
10	+	-	+	-	30	-	-	-	-
11	-	-	-	-	31	-	-	-	-
12	-	-	-	-	32	-	-	-	-
13	-	-	+	-	33	-	-	-	+
14	-	-	-	-	34	+	+	+	+
15	-	-	-	-	35	+	+	+	+
16	-	-	-	-	36	-	-	-	-
17	-	-	-	-	37	-	-	-	-
18	-	-	-	-	38	-	-	-	-
19	-	-	+	+	39	-	-	-	-
20	+	-	+	-	40	-	-	-	-

考 察

L. monocytogenes の検出には遺伝子学的手法によるキットが多数販売されてきた。しかしながら、多くの場合、その検出は電気泳動後の検出をはじめ、蛍光色素標識した特異的プローブの活用など、励起光を必要とする検出法が主流である。本法は発光による検出法であるゆえ、蛍光検出よりも検出感度は高いと一般的に考えられ、かつ励起光源を必要とせずに検出可能という利点がある。しかしながら、図1に示したように、本法は遺伝子増幅と発光検出において、ATPスルフララーゼによる付加反応やATPとのルシフェラーゼ反応の過程を必要とするため、実際の食品に適応した場合に遺伝子検出阻害は起こりうるのか、検討する必要がある。また、本検出に必要な前培養時間は十分であるのか、確認する必要がある。さらに*L. monocytogenes* の遺伝子検出には、効果的な核酸抽出が必要であることを述べた⁹⁾が、本法では担体樹脂に溶菌試薬を混合した試験管で100℃ 15分加熱するのみという極めて簡易な抽出操作であり、その抽出効率についても評価が必要と考えられた。

核酸抽出効果について検討したところ、MDS法による抽出の場合、20 µLの培養液を680 µLの溶菌試薬が入った試験管に加えて反応させた後、その上澄み20 µLを直接遺伝子増幅反応管に加えることから、理論上、培養中に35 CFU/20 µL (1.8×10^3 CFU/mL) 存在すれば1 copyの標的遺伝子が反応管に入り、増幅反応が起こることとなる。しかし、今回の試験結果では、検出感度は 10^5 CFU/mLと理論値よりも低く得られたことから、MDS法による抽出キットでは抽出効率が低いことを示唆した。本抽出法では遠心分離を必要とせず、担体樹脂による食品残渣の共沈作用とボイル法を同時に行える利点はあるものの、抽出効率はボイル法と同程度⁹⁾であった。

食材への適応評価試験では、国内外で*L. monocytogenes* の検出が報告されている主なもの¹⁾を検体として使用した。評価試験の結果、スモークサーモン・マグロ剥身・エビ・明太子・カマンベールチーズでは1次増菌培地Demi-Fraserで24時間培養後から検出されたが、多くの検体ではさらにFraserによる2次増菌までを必要とした。それゆえ、検体の種類にもよるであろうが、MDS法による*L. monocytogenes* 検出においては2次増菌までを行うことが望ましいという結果となった。この結果から、他の培地の活用による前

培養時間短縮の可能性を調べるため、非選択培地であるTSBYE培地にて前培養した場合での陽性検出率について比較検討した。

低接種区における培地間比較試験の結果、MDS法の基本プロトコールであるDemi-Fraserで24時間培養後にFraserでさらに24時間培養するスキームでは、1次増菌時点での培養法との比較結果においてMDS法では1検体において偽陰性を得たため、牛挽肉を検体とした場合2次増菌までが必要と考えられた。逆に、2次増菌後においては培養法では6検体に対しMDS法では7検体が陽性となり、陽性検体が一致もしくはそれ以上の結果を得たため、上記の培養条件でMDS法は十分に培養法の結果を包括できると考えられた。一方、TSBYEでは24時間培養後において陽性検体数は培養法においてもわずか3検体、MDS法では検出できなかった。48時間まで培養を継続しても、培養法では8検体が陽性と得られたのに対し、MDS法では3検体のみが陽性検体として一致した。それゆえ、TSBYEでの前培養はMDS法での検出に適さないと考えられた。

以上のことから、MDS法ではDemi-FraserおよびFraser培地で各々24時間の培養後に付属キットでの遺伝子抽出プロトコールと等温遺伝子増幅反応により、*L. monocytogenes* を特異的に検出可能であった。また、挽肉を用いた接種試験においてもその検出結果は培養法の結果と一致した。使用する食材に対して、個別の事前評価試験が必要となると考えられるものの、*L. monocytogenes* の迅速検査法として、十分使用に耐えうるものと考えられた。

要 約

L. monocytogenes を様々なReady to eat食品に接種した検体を用いて、培養法と3M Molecular detection systemによる検出結果を比較した。肉、魚、モヤシ、乳製品など12種類について検出評価試験を実施した。また、牛挽肉を用いたMDSの検出評価試験も実施した。牛挽肉の実験では接種菌数を0.66 MPN/gとし、添加回収試験を実施した。各20検体(5g)の牛挽肉を前培養し、それぞれMDS法およびISO11202-1による培養法により検出した。上記いずれも、MDS法による検出結果は通常の培養法の結果と一致し、MDS法は食品中の*L. monocytogenes* 汚染の迅速スクリーニング法として有用であると考えられた。

参考文献

- 1) 食中毒予防必携 第2版, 社団法人 日本食品衛生協会 155-162. (2007).
- 2) 厚生労働省, 食品由来のリストeria菌の健康被害に関する研究, 食品安全確保研究事業, 総括研究報告書 (2004).
- 3) ISO 11290-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. (1996).
- 4) FDA: Bacteriological Analytical Manual, Capture 10 (2003).
- 5) Kawasaki, S., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T. and Kawamoto, S., Multiplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection and quantification of *Salmonella* species, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in ground pork samples. *Foodborne Pathog. Dis.*, **7**, 549-554 (2010).
- 6) Li, F., Zhao, C., Zhang, W., Cui, S., Meng, J., Wu, J., and Zhang, D. Y., Use of ramification amplification assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* Shiga toxin-producing strains. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 6086-6090, (2005).
- 7) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T., Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl. Acids Res.*, **28**, E63, (2000).
- 8) Fortes, E. D., David, J., Koeritzer, B., Wiedmann, M., Validation of the 3M molecular detection system for the detection of listeria in meat, seafood, dairy, and retail environments. *J. Food Prot.*, **76**, 874-878. (2013).
- 9) Kawasaki, S., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S., Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. *J. Food Prot.* **68**, 551-556. (2005).