

研究ノート

Real-time PCR による牛乳中の *Salmonella* 増殖曲線作成時の
サンプリングおよび核酸抽出条件の検討細谷幸恵¹, Fia Noviyanti², 稲津康弘¹, 川崎晋^{*1,2}¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門² 筑波大学大学院Study of experimental condition to monitor bacterial growth curve of
Salmonella in milk by real-time PCRYukie Hosotani¹, Fia Noviyanti², Yasuhiro Inatsu¹, Susumu Kawasaki^{*1,2}¹ Food Research Institute, Food Safety Division, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12

Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, JAPAN

² Tsukuba Life Science Innovation, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577 JAPAN

Abstract

The objective of this study is to monitor the growth kinetics and calculate lag phase time of *Salmonella* Enteritidis in milk by real-time PCR and mathematical model. We obtained growth curves by real-time PCR and could calculate lag phase time of *S. Enteritidis* growing in milk under 35 °C which is the optimum temperature for its growth. This real-time PCR monitoring method could provide precise estimation of *Salmonella*'s lag phase time in milk.

Key words: *Salmonella*, real-time PCR, monitoring bacterial growth curve*Salmonella*, real-time PCR, 増殖モニタリング

緒言

食品中における食中毒菌の増殖に関する情報は、消費期限の設定の目安となることから、食品微生物学的安全性上、重要視されている¹⁻⁴⁾。一般に、上記の消費期限設定のための食品への食中毒菌接種試験（いわゆるチャレンジテスト）は培養法により行われる。具

体的には、食品にリスクと考えられる食中毒菌を既知量接種した後、一定時間保存し、その検体希釈液を選択培地上に塗布して培養した後に、出現した典型集落数を計測することで行われる。しかしながら、このような従来の培養法にて食品中の食中毒菌を定量する場合には労力が多大となるだけでなく、食中毒菌以外の雑菌を多数含む環境下では、食中毒菌集落を雑菌集落

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

が覆ってしまうために正確な定量ができないことがある。この場合、標的菌に抗生物質耐性変異を有する株を用い、同じ抗生物質を培地に加えることで雑菌の影響を抑えるなどの工夫⁵⁾が求められることになる。

上記の問題の解決を図るため、real-time PCR に代表される遺伝子手法を用いて食品中からの標的菌の定量を可能とした報告⁶⁾がなされている。この方法は特定の遺伝子の特異的検出が可能であるため、雑菌が多数存在する環境下においても標的の食中毒菌のみを定量できる。先に川崎ら⁷⁾は、この原理を利用してサルモネラの増殖挙動解析および特性解析を、牛乳および未殺菌乳中で試みた。サルモネラを接種した牛乳・未殺菌乳を様々な温度帯で保存し、増殖過程を遺伝子定量技術によりモニタリングした結果と従来の培養法の結果と比較したところ、その結果はほぼ等しく、サルモネラの増殖速度と保存温度との関係を正確かつ簡易に遺伝子手法で求めることができることを明らかにした。海外においては、未殺菌乳のサルモネラ汚染を原因とする食中毒事例が報告されている。⁸⁾したがって、牛乳のように高タンパク、含脂質の食品を対象として、食中毒菌接種試験の簡易化、ならびに食中毒菌増殖挙動解析手法の開発は食品産業の場において極めて有用であることから、遺伝子手法による微生物定量法は、食品へのチャレンジテストの簡易迅速化、さらには数学的モデルの利用による消費期限推定への活用が大きいと期待できる。しかしながら、先の川崎らの報告では、遺伝子定量技術と従来の培養法との比較結果は極めて類似するものの、遺伝子定量技術による計測では、本来微生物の増殖曲線に見られる誘導期 (lag phase time) を明確に得ていない。また、得られた結果も多少のバラつきが散見され、実用性はありながらも食品検体を対象とする際の技術的問題も未だ存在すると考えられた。

特に増殖曲線を作成するにあたり、lag phase time は、食品中での静菌的作用を評価する指標とされている。しかし、遺伝子定量技術を用いて増殖曲線を記載した場合に lag phase time を正確に試算するために必要な条件についての検討まではされていない。そこで本研究では、牛乳中にサルモネラを混入させ、35℃にて保存した場合に、遺伝子定量技術を用いて増殖曲線を記載した際、サンプリング間隔が短く多数の試験数を取得すれば lag phase time が算出可能であるのか、それとも手法上の限界があるのかを明確にするために、サンプリング条件、核酸抽出条件について検討を行った。

方法

1. 供試菌および供試食材

試験には、*S. Enteritidis* IFO3313 株を用い、Trypticase Soy Broth (TSB, Difco, Becton, Dickinson and Company) にて、35℃、24 時間の培養後、試験に供した。また、小売店舗で購入した加熱殺菌済み牛乳 (明治乳業(株)社製) を供試食材として用いた。

2. 供試菌液の調製と接種菌数の確認

前培養後、菌液は滅菌リン酸緩衝液で適宜 10 倍希釈を行い、 10^6 CFU/mL となるよう調製した。この菌液の濃度を測定するため、希釈菌液 50 μ L を Trypticase Soy Agar (TSA, Difco, Becton, Dickinson and Company) に塗抹培養した。35℃、24 時間の培養後、発育集落を計数し、接種に用いた菌液の菌濃度を求めた。また、滅菌リン酸緩衝液にて 10 倍毎の段階希釈を行った希釈菌液を検量線作成用標準試料液として用い、それぞれ 25 μ L ずつ核酸抽出に供した。

3. 検体の調製およびサンプリング条件

あらかじめ 35℃ に保温していた牛乳 10 mL に、希釈菌液 100 μ L を接種した (牛乳中の菌終濃度: 10^4 CFU/mL)。接種後、ただちに 35℃ にて培養を開始し、5 分または 15 分毎に牛乳検体を 25 μ L ずつ分取し、4M guanidine isothiocyanate solution (Thermo Fisher Scientific, USA) 75 μ L に混和した。この操作は培養開始からそれぞれ 210 分まで繰り返し行った。それぞれの試験について、5 分間隔のサンプリング試験は 1 反復、15 分間隔のサンプリングは 3 反復行った。

4. 牛乳からの核酸抽出

サンプリングした検体は、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) を用いて核酸抽出した。最終的に得られた核酸抽出液を以下の real-time PCR による定量評価試験に供した。

5. Real-time PCR による *Salmonella* の特異的遺伝子の定量

試料中に含まれる *Salmonella* の特異的遺伝子数を求めるため、real-time PCR を用いて、核酸抽出液中の遺伝子コピー数を求めた。PCR プライマーおよび TaqMan Probe の配列は *Salmonella* の特異的遺伝子 *invA* 遺伝子を検出する配列を用いた⁹⁾。検出用プローブ

は FAM (6-carboxyfluorescein) および BHQ1 (Black Hole Quencher) にて標識した。PCR 反応は 25 μ L の系で行い, TaqMan gene expression master mix (Applied Bio Systems), 200 nM primers (Fwd-primer: 5'-GTG AAATTATCGCCACGTTCCGGCAA-3', Rev-primer: 5'-CTTCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'), 100 nM probe (Internal probe: 5'- FAM-AGTCGCGG CCGATTTTCTCTGGATGGT-BHQ1-3') を混和し, PCR 反応液とした。反応液 22.5 μ L に対し, 核酸抽出液 2.5 μ L を加え, ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて real-time PCR を行った。PCR 反応条件は, 50 $^{\circ}$ C 2 分, 95 $^{\circ}$ C 10 分間のインキュベートの後, 95 $^{\circ}$ C 20 秒, 65 $^{\circ}$ C 1 分間を 50 サイクル繰り返した。

Real-time PCR によるモニタリングの結果から, 検出閾値まで必要としたサイクル数 (Cycle threshold, 以下, Ct 値) を求めた。検出閾値の設定は, ABIPRISM7900 の自動解析に従った。これにより得られた *Salmonella* の特異的遺伝子コピー数を, 試料中の *Salmonella* の 1 細胞と換算した。

6. 牛乳中における *Salmonella* の増殖曲線の作成

Real-time PCR により得た牛乳中の *Salmonella* 菌数の経時的変動グラフから, フィッティングプログラム DMFit を用いて Baranyi モデル¹⁰⁾ を当てはめることにより増殖曲線を作成し, 同時に lag phase time および最大比増殖速度 (μ_{\max}) などのパラメータを求めた。

結果と考察

牛乳中の *Salmonella* について, 5 分間隔サンプリング (45 点; $n=1$) および 15 分間隔サンプリング (15 点; $n=3$) の両試験により得られた菌数の経時変化データに, フィッティングソフトウェアを用いて Baranyi

表 1 算出した μ_{\max} および lag phase time と増殖曲線のパラメータ

サンプリング間隔	5 min.	5 min.*	15 min.
μ_{\max}	0.515	0.518	0.736
lag phase time	-	0.667	0.581
se(fit)	0.154	0.164	0.095
R ² _stat	0.925	0.878	0.976

*, 5 分間隔サンプリングにより得られたプロットについて, lag phase time を 0.667 と仮定して再解析を行った場合。

モデルにあてはめ (図 1, 図 2), またこの結果から μ_{\max} , lag phase time などの増殖パラメータを求めた (表 1)。*Salmonella* の初発菌濃度は 4.8 log CFU/mL で, 35 $^{\circ}$ C 培養条件下で段階的に増殖するプロットが real-time PCR で確認出来た。川崎らの報告では, 牛乳 1 mL を直接 DNA 抽出キット DNA Extraction Kit [TA10] (プリマハム株製) を用いて, 酵素処理した後核酸抽出処理を行っているが, 本試験では, サンプル容量を 25 μ L に変更し, 酵素処理の工程を経ず

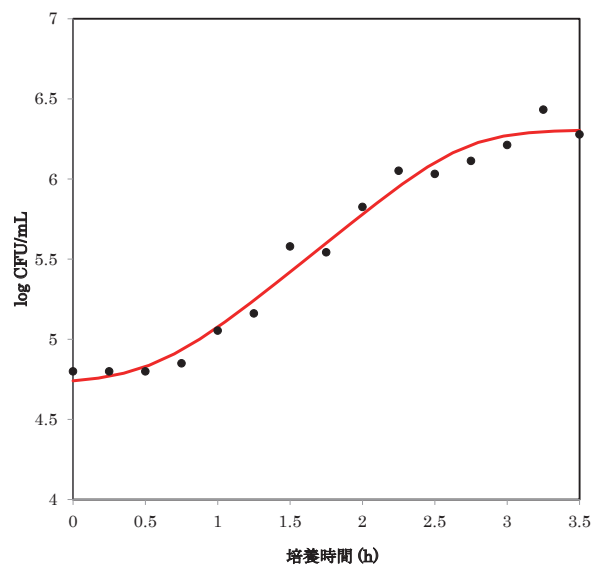


図 1 牛乳 35 $^{\circ}$ C 培養条件下で増殖する *Salmonella* の Baranyi モデルによる増殖曲線 (15 分間隔; $n=3$)

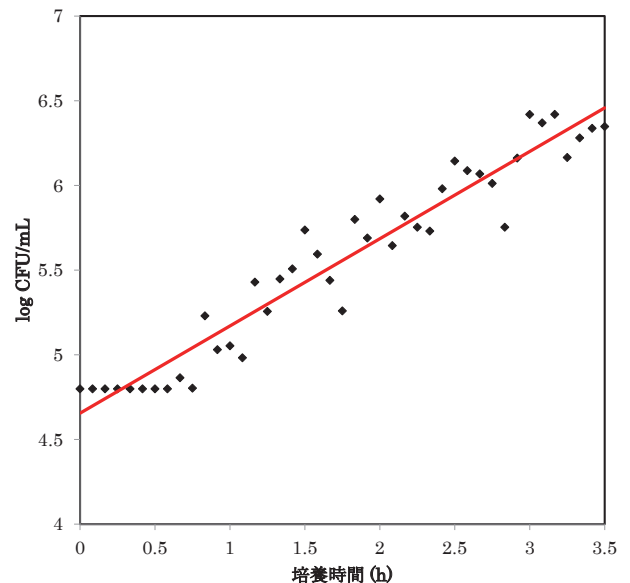


図 2 牛乳 35 $^{\circ}$ C 培養条件下で増殖する *Salmonella* の Baranyi モデルによる増殖曲線 (5 分間隔; $n=1$)

に、直接、試料を核酸抽出に供した。通常の PCR 反応においては、食材試料に対して、その濃度が 10 分の 1 以下となるよう希釈水もしくは培地等を加えて乳剤化し、これを核酸抽出のための検体として用いる。また、市販される PCR 検出用核酸抽出キットでは、重量として 20 mg ~ 200mg の試料からの抽出が推奨されている。おそらく、前報告において多少のバラつきを認めるのは、食材試料を供試試料量として 1mL 供しており、抽出の推奨範囲を大幅に超過しているためではないかと推測された。今回の手法ではサンプルの容量を減らすことにより、供試試料量を推奨範囲内に設定した。また、酵素処理過程を省略したが、牛乳サンプルにおいて抽出時での問題は発生しなかった。一方、サンプルの供試量を減らすことにより検出感度の低下が懸念されたが、3 回の反復試験を行った 15 分間隔のサンプリングによる菌数経時変化データでは、前報告と同様、ほとんどが標準偏差 $\pm 0.40 \log \text{CFU/mL}$ (最大 $\pm 0.62 \log \text{CFU/mL}$) となり、25 μL の供試量でも増殖曲線の作成に十分活用できることが分かった。

本研究では、210 分のモニタリング時間の間に、45 ポイント (5 分間隔; $n=1$)、ないしは 15 ポイント (15 分間隔; $n=3$) で牛乳検体からサンプリングし、それぞれ増殖曲線を作成して比較した。増殖予測モデルにフィッティングする場合、プロット数を増やし、断続的なサンプリングを行えば行うほど、増殖曲線への適合性が向上すると推定した。しかしながら、図 1 で示すように 15 分間隔のサンプリングで得られた菌数の経時変化データから作成した増殖曲線では、ソフトウェアにより適切なフィッティングがなされて lag phase time の算出が可能であったのに対し、5 分間隔のサンプリングにより作成された増殖予測曲線 (図 2) では、lag phase time の算出が出来なかった。一方で、5 分間隔のデータを観察すると、培養開始の 40 分後から増殖が始まる様子が認められたことから、この場合では最大比増殖速度は正確に求められなかったものの、lag phase time は捉えられることが可能であると示唆された。実際に、15 分間隔のサンプリングにより得られた lag phase time は 0.581 h (34.9 分) であり、結果として 5 分間隔のサンプリングで観察されたものとはほぼ一致していた。また、5 分間隔のサンプリングにより得られた増殖予測曲線において増殖が開始したと確認されるまでの時間を lag phase time と見なし、これを 40 分 (0.667 h) であったと仮定して再度、ソフトウェアによる解析を行ったが、15 分間隔のサンプリングにより得られたパラメータ値と同等の値は得られず、 R^2

値も 0.88 と、低い値に留まった。以上の結果から、本解析手法でフィッティングをさせる場合には、菌数計測プロットの数を増やし、サンプリング間隔を極端に短くして断続的な測定をするよりも、測定値の間隔を多少空けるかわりに複数の測定結果から平均値を取得し誤差範囲を軽減する方が、lag phase time の算出および増殖曲線の作成には有効であると考えられた。また、5 分間隔および 15 分間隔での R^2 値を求めたところ、15 分間隔でのほうが 0.97 以上とフィッティングへの適応性が良く、おそらく正確な増殖曲線を作成するにはこの程度のフィッティング適応性を要求されるのではないかと考えられた。従って、前報告の改善点としては、サンプリング間隔をある程度至的化して (今回の条件であれば 15 分間隔) lag phase time が反映される情報を得つつ、かつ 0.97 以上のフィッティングの適応性を持つデータを得ることが考えられ、正確な増殖曲線の取得に必要な指標となるのではないかと推察された。

通常の培養法では、増殖曲線を取得するために 5 分もしくは 15 分おきに菌数を測定することは極めて難しい。本遺伝子手法では全てのサンプリングが終了した後に、まとめて核酸抽出を行えばよく、増殖至適温度に近い 35℃ という増殖速度が極めて速い条件であるにも関わらず、増殖曲線および lag phase time を計測できた。また、前報告において算出された牛乳中で増殖する *Salmonella* の 35℃ 培養条件下の最大比増殖速度 (μ_{\max}) は 0.74 であったが、本実験の 15 分間隔サンプリングにおいても同等の値を得ることが出来た。

標的微生物の増殖過程をモニタリングすることで導かれる lag phase time は、菌の増殖活性を評価する指標として応用が期待できる。たとえば、標的微生物を速やかに増菌するための培地開発の検討や、菌体のダメージにより通常の培養法では培養できない菌 (損傷菌) の増殖活性評価等、培養法では検討出来なかった情報を、lag phase time を含めて検討できると考えられる。Real-time PCR での増殖曲線取得手法は、分単位での菌量計測を可能とし、増殖速度が速い培養条件下でも正確な増殖曲線を得ることが出来る。本法によりサルモネラの lag phase time ならびに最大増殖速度を少ない労力で算出できた。

要約

牛乳中に混入した *Salmonella* について，増殖曲線を real-time PCR により作成し，lag phase time の算出を試みた．核酸抽出条件，プロット条件について検討を行い，増殖至適温度に近い 35℃ 条件においても増殖曲線および lag phase time を計測できた．

参考文献

- 1) 円谷悦造，浅井美都，辻畑茂朝，塚本義則，太田美智男，腸管出血性大腸菌 O157:H7 をはじめとする食中毒菌に対する食酢の抗菌作用（その 1）静菌作用および殺菌作用，感染症学会誌，**71**(5)，443-450, (1997)
- 2) 塩沢寛治，杉枝正明，林道明，半田淑明，仁科徳啓，中津川修二，赤堀港治，液卵の微生物汚染と液卵中でのサルモネラ，病原大腸菌の消長，食品と微生物，**5**(2)，113-120, (1988) .
- 3) 伊藤武，坂井千三，主な食中毒起因菌の食品中における増殖について，食品衛生学会誌，**30**(2)，123-137, (1989) .
- 4) 松田敏生，非加熱殺菌技術による食品の殺菌と保存，食品衛生学会誌，**41**(3)，163-170, (2008) .
- 5) 名塚英一，稲津康弘，川崎晋，宮丸雅人，市販カット果実における衛生指標菌調査と接種した腸管出血性大腸菌 O157:H7 および *Salmonella* Enteritidis の消長，日本食品微生物学会雑誌，**21**(4)，269-274, (2004) .
- 6) Kimura B, Kawasaki S, Nakano H, Fujii T, Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 206-216, (2001) .
- 7) 川崎晋，清水茂雅，小関成樹，稲津康弘，Real-time PCR を用いた牛乳および生乳中の *Salmonella* 増殖の特性評価と増殖挙動のモデル化，日本食品微生物学会誌，**31**(1)，28-35, (2014)
- 8) Stephen P. Oliver, Kathryn J. Boor, Steven C. Murphy, Shelton E. Murinda, Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk., *Foodborne pathogens and disease*, **6**, 793-806, (2009)
- 9) Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Gálan, J.E., Ginocchio, C., Curtiss III, R., Gyles, C.L., Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*. **6**, 271-279, (1992) .
- 10) Baranyi, J., Roberts, T.A., A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 277-294, (1994) .