

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 (平成 12 年度)

～ P C R法を用いた食品中の黄色ブドウ球菌検出の検討～

研究開発課 川原美香、永草 淳

1 . 試験研究の目的

従来、食中毒菌を対象とした食品の品質管理には微生物培養による検査が一般的であったが、この手法では結果が得られるまで数日かかり、その判定も確実性に欠ける面があった。特に黄色ブドウ球菌の場合は耐熱性毒素を産生することから殺菌後の製品でも食中毒を引き起こす危害が考えられ、その安全性を証明することは困難である。そこで、近年微生物等の定性に用いられている P C R法を用いれば、製品中の黄色ブドウ球菌の遺伝子を迅速かつ特異的に検出し、製造ラインにおけるトータル的な黄色ブドウ球菌の存在履歴の推定が可能であると考えられた。しかし、P C R法を導入するためには、初期の設備投資がかかることや食中毒菌の検出限界、結果の再現性等、製品ごとに検討することが予め必要となり、いまだ食品会社での品質管理に導入されている実例は少ない。本試験においては、主に乳製品を対象として P C R法による黄色ブドウ球菌の検出効率を確認し、食品工場での新たな品質管理法として有効であるか検討した。

2 . 試験方法および結果

黄色ブドウ球菌添加サンプルの調製とエンテロトキシンの確認

試料は黄色ブドウ球菌に汚染する可能性が考えられる食品のうち牛乳、ひき肉、卵焼きの3点について検討した。各サンプルに黄色ブドウ球菌 (エンテロトキシン A 型) を $1 \sim 9 \times 10^1$ cfu / g 程度添加した後 10 ~ 30 で保存試験を行い、菌数の異なるサンプルを得た。また、参考までにブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット SET-RPLA (デンカ生研) で肉、卵焼きのエンテロトキシンを調べたところ、 10^4 / g レベル以上の菌数のサンプルから毒素が検出された (10倍希釈液の感度 1~2ng/ml)。よって、少なくとも食品衛生の基準で用いられるように 10^3 / g レベルでの黄色ブドウ球菌を検出する必要があることが確認された。これらの調製したサンプルを用いて P C R用 templateDNA の抽出条件を検討した。

DNA の抽出効率と P C R 条件の検討

まず、黄色ブドウ球菌のコロニーを用いて P C R の条件を検討した。菌体を水洗浄後、アクロモペプチダーゼで溶菌処理を行い、沸騰加熱後、遠心分離により懸濁液から DNA 画分を得た。反応液の $MgCl_2$ 濃度、アニーリング温度を検討して最終的に以下の P C R 条件を採用した。

P C R mixture

| | |
|----------------|------------|
| Red Taq(SIGMA) | 25 μ l |
| Primer | 1 μ l |
| templateDNA | 5 μ l |
| water | 19 μ l |

primer : thermostable nuclease gene
size of PCR product : 280bp

P C R condition

| | | | |
|----------------------|----|--------|---------------|
| initial denaturation | 94 | 3min. |) x 30 cycles |
| denaturation | 94 | 20sec. | |
| anneal | 62 | 20sec. | |
| extension | 72 | 40sec. | |
| terminal extension | 72 | 7min. | |

→ 2.5% agarose gel
electrophoresis + EtBr

なお、得られたPCR増幅サンプルを精製してDNAシーケンサーで遺伝子配列を調べたところ、目的とする黄色ブドウ球菌の耐熱性ヌクレアーゼ遺伝子プライマーによる産物であることが確認された。次に で調製した菌数の異なる牛乳サンプルを用いてPCRに供するtemplateDNAの抽出条件を検討した。まずサンプルをbufferで希釈、遠心を繰り返し菌体を集め、プロテイナーゼ、リゾチーム、アクロモペプチダーゼ等の酵素を用いて溶菌させてからインスタジーン（キレート剤 BioRad）を添加し、煮沸してから遠心で得られた上澄液をtemplateDNAとした。PCR分析の結果、 $1.0 \times 10^2 / g$ のサンプルで黄色ブドウ球菌の判定が可能であった。また、ひき肉では $1.0 \times 10^3 / g$ で判定が可能であったが、卵焼きではこの条件では検出できなかった。そこで、得られたDNA画分を常法によりエタノール沈殿で精製したところ、両者とも $1.0 \times 10^2 / g$ の感度で検出が可能であった。

牛乳を加工した場合の抽出効率の変化

以上の試験では異なる菌数のサンプルを調製するため、最終製品に黄色ブドウ球菌を添加したもの（生菌状態あるいはその凍結品）で抽出効率を検討したが、実際の食品加工では加熱や乾燥により菌体がダメージを受けていることが考えられ、それらの影響でPCRの検出効率が変わるかどうかを検討した。サンプルは市販の牛乳（120、2s殺菌）に $1.0 \times 10^2 / g$ 程度になるように黄色ブドウ球菌を添加し、さらに殺菌を90、30分間と130、1分間の2通り行ったものを調製した。また、それぞれのサンプルについて乾燥サンプルとしてフリーズドライを行い粉乳を調製した。これらのサンプルは加熱品については-40で、乾燥品については室温で保存し、10、20、30日後のDNA抽出効率を調べた。その結果、加熱あるいは乾燥工程を入れることでの牛乳サンプルと同様の方法では検出感度が 10^4 レベルと低下したが、サンプル洗浄とエタノール沈殿による精製を十分に行うことにより30日後においてもいずれの加工サンプルも原液1gあたりの菌数が 10^2 レベルであれば目的とするPCR産物が得られ、黄色ブドウ球菌存在の履歴を確認することが出来た。

| |
|---|
| <p>1,000 μl sample</p> <p>13,000rpm, 10min.</p> <p>pellet を Lysis buffer で洗浄 ($\times 2$) (13,000rpm, 10min.)</p> <p>+ Lysis buffer 200 μl + proteinase k (2mg/ml) 4 μl mix + lysozyme (10mg/ml) 50 μl + ACPase 100 μl (50U)</p> <p>37、60min.</p> <p>+ InstaGene™ Matrix (BioRad) 100 μl</p> <p>56、15min.</p> <p>100、8min.</p> <p>Ph/Ch 抽出</p> <p>EtOH 沈殿</p> <p>TE buffer 20 μl で溶解 (template DNA)</p> <p>10 \times Lysis buffer 0.5% N-laurylsarcosine 50mM Tris-HCl 25mM EDTA (pH8.0)</p> <p>DNAの抽出方法</p> |
|---|

3. 考察

以上の結果から、今回サンプルに用いた牛乳、生肉、卵焼き等のサンプルに存在した黄色ブドウ球菌をPCR法により検出する場合、サンプル洗浄、DNAの精製を十分に行えば、培養法と同等の検出効率（ $1.0 \times 10^2 / g$ ）で検査が可能であった。また、検査時間は判定まで4時間程度と迅速であること、特異性が高いこと、判定が容易であることを考慮するとPCR法をこれらの食品の品質管理に導入することは有効であると考えられた。