

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月24日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780191

研究課題名（和文） 分子生物学的方法を用いた腸内細菌科菌群の迅速定量法と同定システムの構築

研究課題名（英文） Quantitative real-time PCR method for rapid enumeration of Enterobacteriaceae in food

研究代表者 高橋 肇 (TAKAHASHI HAJIME)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教

研究者番号：40413116

## 研究成果の概要（和文）：

食品会社では一般的な食中毒菌検査に加え、生菌数や衛生指標菌の検査を行う必要があるが、衛生指標菌などの検査は幅広い菌種を対象としているため、特定の標的遺伝子を見つけ出すことが困難で Real-time PCR による検査法の確立が難しい。本研究では Real-time PCR を用いて食品中の腸内細菌科菌群数を迅速に定量できる方法を確立した。

本研究では腸内細菌科菌群の細菌数を食品中より特異的にかつ定量的に検出するため、*rplP* 遺伝子領域にプライマーセットを作成し、食品中の腸内細菌科菌群の定量法を完成させた。本法は実際の食品を用いて検証し、培養法と比較しほぼ同程度の菌数の算出が可能であることを証明した。

## 研究成果の概要（英文）：

In food manufacturing companies, the bacteriological examination of foods targets not only foodborne pathogens but total aerobic bacterial counts and hygiene indicator bacteria as well. However, it is hard to establish an examination method using real-time PCR for total aerobic bacteria and hygiene indicator bacteria, since the method needs to target several different bacterial species at the same time. In this study, we developed a rapid detection and quantification method for Enterobacteriaceae using quantitative real-time PCR.

First of all, several DNA regions were investigated in order to design PCR primers for specific detection of Enterobacteriaceae. As a result, primers designed within the *rplP* gene could specifically detect Enterobacteriaceae.

Next, the accuracy of the real-time PCR method was confirmed by comparing with a culture method. The difference between these two methods was within one order. These results indicate that the real-time PCR developed in this study could accurately and rapidly quantify Enterobacteriaceae in foods.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 食品微生物  
科研費の分科・細目：水産化学  
キーワード：食品衛生、食品微生物

## 1. 研究開始当初の背景

近年、EU を中心に食品の衛生指標菌の検査は、大腸菌群から「腸内細菌科菌群」を指標とした検査に移行してきている。日本においてもこれまでは食品の衛生指標として、大腸菌群、糞便性大腸菌群が用いられてきたが、ユッケによる食中毒事件をきっかけに生食用食肉については、腸内細菌科菌群を衛生指標菌とするよう検査法が改められた。腸内細菌科菌群の検査法は、一般的には VRBG 培地を用いた培養法で行われるが、食品製造現場においては、自主衛生管理法として、より迅速、簡便な検出・定量法およびその同定法が必要とされている。本研究では、腸内細菌科菌群の検査を迅速に行うため、分子生物学的手法を用い数時間で検出・定量できる手法を構築し、あわせて DNA 多型解析法による簡易同定法の確立を目指した。

## 2. 研究の目的

衛生指標菌には幅広い菌種が含まれており、遺伝子手法を用いて行う一般的な食中毒菌検査のように、特定の標的遺伝子が見つけないくく（毒素遺伝子や病原関連遺伝子など明確なマーカーとなる遺伝子がない）、そのため、PCR による検出法、定量法の確立が困難である。国際的にも衛生指標菌を対象とした遺伝子手法を用いた検査法の報告は少ない。

本研究ではこの問題を解決するため、標的となる遺伝子を選定するところから始め、腸内細菌科菌群を検出・定量できるシステムの確立を行い、食品から直接この菌群の菌数を定量することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、標的遺伝子として細菌のハウスキーピング遺伝子をいくつか探索し、菌群全体を一括して検出できる遺伝子領域を検証した。その結果、*rplP* 遺伝子 (ribosomal protein L16) が PCR の標的遺伝子として最適であることが分かり、その領域内に腸内細菌科菌群特有の配列を見だし、その配列を基にプライマーを設計した。プライマーは特異性、標的菌以外に対する排他性を評価した後、リアルタイム PCR 法を用いて食品中の腸内細菌科菌群を定量するシステムを構築した。

定量法の確立には、まず、段階的に希釈した数株の腸内細菌科菌群の培養液から DNA を抽出し、これをテンプレートとしリアルタイム PCR に供し、菌数と PCR の検出サイクルか

ら検量線を作成した。作成した検量線は菌株間で比較し、PCR の増幅効率が菌株間で変わらないこと、また定量範囲、検出限界が変わらないことを確認した。

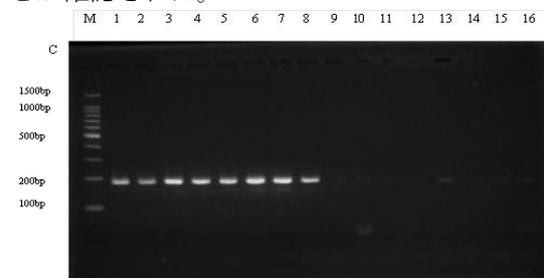
次に、作成した複数種の主要腸内細菌科菌群の菌株から得られた検量線を平均化し、食品中の菌数を測定するための標準曲線とした。

さらに、培養法と Real-time PCR 法による定量法の比較を行った。小売店で購入した複数種の食品について、VRBG 培地を用いた培養法により腸内細菌科菌群数を求めた。同時に、各食品のホモジネート 1ml から DNA を抽出後、Real-time PCR に供し、腸内細菌科菌群の定量を試みた。実際の食品中の腸内細菌科菌群の菌数は本 PCR 法のサイクル数を先に作成した検量線へ当てはめ換算し、培養法によるものと比較を行った。

また、増幅した遺伝子領域内の配列は、菌種により異なることを利用し、この多型を DGGE 法で検出し、菌種同定を行う試みも行った。

## 4. 研究成果

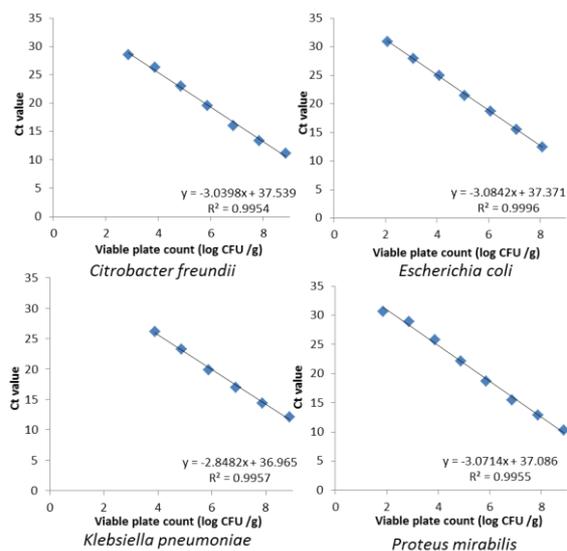
腸内細菌科菌群を特異的に検出・定量するため、複数の遺伝子について PCR の標的領域を探索したところ、標的遺伝子としてハウスキーピング遺伝子である *rplP* 遺伝子が最適であることが明らかとなった。その領域内には腸内細菌科菌群が共通に持つ箇所があり、その部分にプライマーを設計した。腸内細菌科菌群、非腸内細菌科菌群の菌株に対し、本プライマーを用いて PCR を行い、電気泳動にてその特異性を確認したところ、以下のように腸内細菌科菌群を特異的に検出できることが確認された。



図：腸内細菌科菌群を標的としたプライマーの特異性確認。1～8 レーン、腸内細菌科菌群、9～16 レーン、非腸内細菌科菌群

次に、腸内細菌科菌群を定量するため、検量線の作成を行った。主要な腸内細菌科菌群

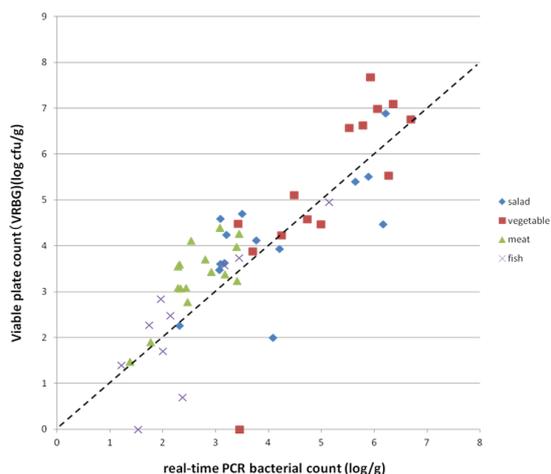
菌株の培養液を 10 倍段階希釈したのち、各希釈段の培養液より抽出した DNA に対し、リアルタイム PCR を行ったところ、以下図に示すように 7 オーダーの範囲で PCR の Ct 値と菌数が相関し、検量線の作成が可能であった。



図：4種の腸内細菌科菌群における検量線。

図には代表的な腸内細菌科菌群の菌種4種を掲載するが、他の腸内細菌科菌群に対するPCR効率、検出限界も同様の結果となった。

ここで作成した検量線を平均化したものをベースに食品からの直接定量用の検量線を作成し、実際の食品の菌数を求め培養法と比較したところ、以下ようになった。



図：本実験で確立したリアルタイム定量PCR法と培養法の比較

培養法による計測結果とリアルタイムPCR法による算出結果の差異は、23サンプル(41.8%)が $|0.5|$ log以下、17サンプル(30.9%)は $|0.5| \sim |1.0|$ の間であった。また、

1.0 logを超える差異は15サンプル(27.3%)観察された。また、16サンプル(29.1%)においては、培養法による計測値のほうがリアルタイムPCR法による算出値よりも小さい傾向にあった。これは、リアルタイムPCR法では食品中で死滅した菌もDNAとして食品中に存在するため、死菌DNAまで検出してしまった可能性が高いと考えられ、今後はこの点についても核酸結合試薬の利用により、生菌特異的PCR法を開発するなど改善の余地があると考えられる。しかしながら、培養法とリアルタイムPCRで算出した菌数は、ほとんどのサンプルで相関し、本法は培養法の代替として腸内細菌科菌群の定量法に利用可能であることが示された。

さらに、PCR増幅後の産物が元の腸内細菌科菌群の構成により多型を含むことに注目し、これをDGGE法で解析する試みを行った。その結果、食品中に複数の腸内細菌科菌群が存在する場合、本法で分離判別が可能で、特に注目する腸内細菌が存在する場合には、マーカーなどと比較することである程度の同定を行える可能性が示された。

本助成による研究内容の一部は、腸内細菌科菌群検出法として特許を出願し、製品化、実用化の可能性を示した。また、国際学会への発表をおこない、国際誌への投稿も準備中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

### 1 : International ICFMH symposium

FoodMicro2012 (Istanbul)

2012年09月03日~2012年09月07日

Hajime Takahashi, Yuichiro Tanaka, Rumi Sito, Takashi Kuda, Bon Kimura  
Quantitative real-time PCR method for rapid enumeration of Enterobacteriaceae in food

### 2 : 第102回日本食品衛生学会学術講演会

2011年9月29日(秋田)

齊藤瑠美, 田中悠一郎, 高橋 肇, 久田 孝, 木村 凡

PCR法を用いた腸内細菌科菌群の迅速検出法の検討

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：腸内細菌科菌群検出方法

発明者：高橋 肇 他

権利者：国立大学法人 東京海洋大学  
種類：特願  
番号：特願 2012-035637  
出願年月日：2012年2月21日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 肇 (TAKAHASHI HAJIME)  
東京海洋大学 海洋科学技術研究科 助教  
研究者番号：40413116

(2) 研究分担者 なし