

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450303

研究課題名(和文)核酸結合試薬を用いた食品関連細菌の生菌死菌判別法

研究課題名(英文) Differentiation of dead cells and live cells in food by using the propidium monoazide

研究代表者

高橋 肇 (TAKAHASHI, HAJIME)

東京海洋大学・その他部局等・助教

研究者番号：40413116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：PCRは様々な環境中に存在する微生物の検出や定量に広く利用されている。しかし、PCRは生菌と死菌を区別することができず、食品製造現場における微生物検査において偽陽性や菌数の過大評価を引き起こす。近年、Propidium monoazide (PMA)を死菌の細胞へ取り込ませ、DNAと結合させることによりPCRの標的から除外する方法が報告されている。しかしながらその処理条件は報告によりまちまちであり、必ずしも最適化されているとは言い難い。本研究では、LEDを用いて最適な照射波長を決定し、PMAの濃度、処理時間を検討し、PMAとDNAの結合には375nmの照射波長が最適であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：PCR has been widely used for detection or enumeration of various bacterial cells in various samples, including food samples, due to its rapidity, simplicity and specificity. However, one of the underlying problems with PCR is the lack of differentiation between viable and non-viable cells, which can lead to false-positive results and overestimation. Recently, several researchers have studied the differentiation of DNA molecules derived from non-viable cells by photo-induced inactivation of DNA using propidium monoazide (PMA). However, the protocols for PMA treatment have yet to be established. In this study, we improved the light exposure apparatus using LED to resolve this issue. Various LED elements were arrayed in an apparatus for PMA treatment in order to suppress false-positive PCR results from DNA derived from dead bacterial cells. LEDs emitting 375 nm were found to facilitate PMA-DNA interaction, thus leading to efficient inhibition of PCR of DNA derived from dead cells.

研究分野：食品微生物学

キーワード：食品微生物 微生物定量 生菌死菌判別 リアルタイムPCR

1. 研究開始当初の背景

食品工場では、製品や製造ラインの衛生管理の一環として、食中毒菌や衛生指標菌について日常的にモニタリングを行っている。モニタリングには従来から培養法が広く用いられてきたが、近年、分子生物学的手法が広く取り入れられている。なかでも、Real-time PCR は、培養法と比べ非常に迅速かつ簡易であり、微生物を定量的に評価できるため、自主衛生検査法として特に重宝されている。

しかしながら、PCR を用いた細菌の検出や定量は、死菌と生菌を正確に識別することが困難であるという問題点が挙げられている。死菌と生菌の誤認は、生産する食品のリスクそのものの誤認となり、また、定量値についても測定した菌数の過大評価につながる。これらは結果として、製品の出荷停止や回収へとつながり、食品会社にとっての大きな経済的損失となりかねない。

近年、それに対応する策として、核酸結合試薬である Propidium monoazide (PMA) や Ethidium monoazide (EMA) を利用した定量法が注目されている。PMA、EMA は Propidium iodide (PI) および Ethidium bromide (EtBr) から派生した化合物であり、光反応性が高く光の照射下で DNA と共有結合する。これらが結合した DNA は PCR の鋳型とはならないため、PCR の標的から除外することが可能である。PMA および EMA は、細胞膜が損傷した状態である死菌にのみ侵入するため、結果的に死菌由来の DNA の増幅は阻害され、生菌由来の DNA のみを検出、定量することが可能となる。本研究では、この PMA を利用し、食品中の菌数を正確に定量できる方法について検討することとした。

2. 研究の目的

細菌の生菌と死菌を区別する試みとして、EMA、PMA が利用され始め、多くの研究者からいくつもの報告が挙がっている。しかし、EMA は対象となる細菌の種類や処理条件によっては死菌由来の細胞膜だけでなく生菌由来の細胞膜まで透過してしまうという問題も挙がってきている。

その点、PMA は、EMA と比べて生菌の細胞膜に対する透過性が低い。そのため、PMA の生菌死菌の判別能はより優れていると考えられている。しかしながら、試薬の添加濃度、照射時間などの処理条件は統一化されておらず、その評価方法もばらついており、どの条件が最適であるのかは未だ明らかにされていない。

これまでの研究においては、核酸結合試薬と DNA の結合にハロゲンランプが使用されてきたが、ハロゲンランプはその発熱性から DNA への光照射には不向きであると考えられる。また、光照射に使用される光源の種類や波長が異なることも PMA 処理の統一化の妨げとなっていると考えられる。そこで本研究では、ハロゲンランプに代わる照射器具として、

発熱性がなく、光のスペクトルが狭く、光束が拡散しにくい LED (light-emitting diode) 光源を選択し、その有効性について評価を行うとともに、食品中の生菌と死菌を区別するのに最適な条件について検討を行った。

3. 研究の方法

最適照射波長の選択

はじめに、細菌の DNA と PMA が最も効率よく反応する光の波長を検討した。検討には、さまざまな波長を照射できる LED 照射装置を作成し(図 1) 使用した。細菌より抽出した DNA と PMA の混合液にさまざまな波長の光を照射し、PCR の反応阻害を指標とし、PMA の結合性を確認した。

生菌死菌判別に最適な PMA 濃度の検討

E. coli および *Listeria* の菌液を 10^6 CFU/ml、 10^7 CFU/ml に調整し、 100°C で 15 分間加熱することにより死菌液を調整した。これに、生菌と死菌の比率が、*E. coli* は 10^5 log cfu/mL : 10^6 log cfu/mL、*Listeria* は 10^6 log cfu/mL : 10^7 log cfu/mL となるように調整後、終濃度が 50、100 μM となるよう PMA を添加し、375 nm の LED を 5、10、15、20 分間照射した。この時、光源とサンプルの距離は約 10 mm とした。照射後、DNA 抽出を行い、それぞれの菌について、リアルタイム PCR で定量し、実際の生菌数と比較を行った。

最適化した PMA 処理条件の食品中における評価

上記実験より得られた PMA 処理の至適条件を用い、実際の食品中に存在する生菌および死菌を識別できるのか評価を行った。レタスおよび牛肉に、10 倍量の生理的食塩水を加え、食品乳剤を作成した。これを 1ml ずつチューブに取り、既知濃度の死菌液と生菌液をそれぞれ 100 μL 接種した。これに終濃度が 50 μM となるように PMA を添加し、5 分間氷上暗所にて静置した後、チューブの蓋を開けた状態で、375 nm の LED を 15 分間照射した。その後、前述のとおり Real-time PCR に供し、Real-time PCR にて得られた菌数と培養法で得られた菌数を比較し、PMA 処理の評価を行った。

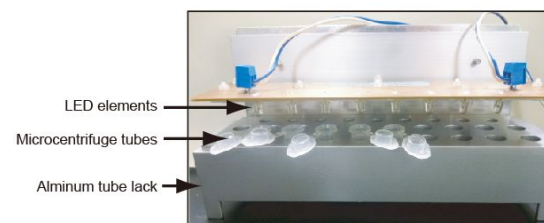


図 1 : LED による光照射装置

4. 研究成果

PMA と DNA の結合に最適な照射波長の検討

作製した装置に、異なる照射波長をもつ LED を取り付け、DNA と PMA の結合性を Real-time PCR を用いた評価系で確認したところ、図 2 のように 375 nm の LED を使用した場合に、リアルタイム PCR の ct 値が遅れる傾向が観察され、これにより、この波長を用いた時、効率よく DNA と PMA が結合していることが明らかとなった。

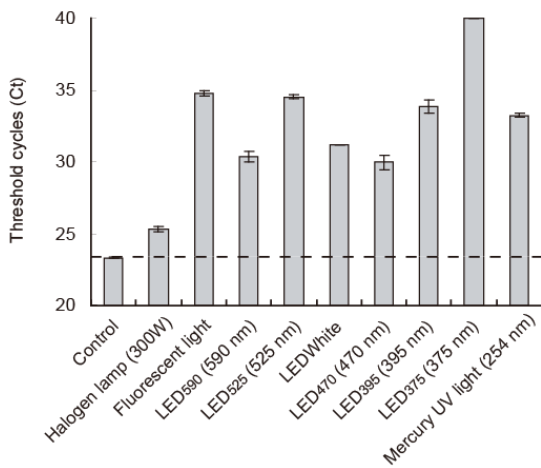


図 2: 各照射波長における DNA と PMA の結合性の確認。Ct 値が大きいほど PCR の反応が阻害されており、効率よく PMA が DNA に結合したことを示す。

生菌死菌判別に最適な PMA 濃度の検討

E. coli の菌液を使用した実験では、 1.2×10^6 CFU/ml の生菌液と、 1.2×10^7 CFU/ml の死菌液を等量混合したものをを用いた。終濃度 $50 \mu\text{M}$ となるよう PMA を添加し、LED による光照射を 15 分間した場合、Real-time PCR による菌液の定量値は 7.6×10^5 CFU/ml、20 分間照射した場合は、 6.8×10^5 CFU/ml となり、これらの定量値は実際に調整した生菌の菌数とほぼ同じであった。

Listeria の菌液を使用した実験では、 7.6×10^6 CFU/ml の生菌液と、 7.6×10^7 CFU/ml の死菌液を等量混合したものをを用いた。同様に、終濃度 $50 \mu\text{M}$ となるよう PMA を添加し、光照射を行った場合、Real-time PCR による定量値は 3.4×10^6 CFU/ml、20 分間の光照射では 4.0×10^6 CFU/ml となり、これらの定量値は実際に調整した生菌の菌数とほぼ同一であった。

以上の結果から、PMA 濃度および照射時間の至適条件は、PMA 濃度が $50 \mu\text{M}$ では照射時間 15 分あるいは 20 分、 $100 \mu\text{M}$ では 5 分または 10 分であることが明らかとなった。よって、以降の食品サンプルを使用した実験には PMA 濃度 $50 \mu\text{M}$ 、照射時間 15 分間の条件を用いた。

最適化した PMA 処理条件の食品中における評価

先の実験において設定した、PMA 濃度 $50 \mu\text{M}$ 、照射時間 15 分間という至適条件を用い、死菌を含んだ食品希釈液中の生菌数を定量を試み、PMA-PCR 法の評価を行った。

レタスの希釈液に死菌より生菌が多い場合を想定し、生菌 1.8×10^8 CFU/ml および死菌 1.8×10^6 CFU/ml となるように各菌液を接種した。これを先の条件を用いて、Real-time PCR により定量したところ、PMA 処理の有無に関わらず、 2.8×10^8 CFU/ml と接種生菌数とほぼ等しい結果が得られた。また、生菌 1.8×10^7 CFU/ml および死菌 1.8×10^6 CFU/ml となるように各菌液を接種した場合も、同様に接種生菌数が接種死菌数を上回っているため、Real-time PCR では接種生菌数とほぼ同じ定量値が得られた。逆に、レタスの希釈液に生菌より死菌が多い場合を想定し、生菌 1.8×10^5 CFU/ml および死菌 1.8×10^6 CFU/ml となるよう接種すると、PMA 処理を行わなかった場合の定量値は 2.2×10^6 CFU/ml となり、菌数が過剰に定量されたが、PMA 処理を行った場合は、Real-time による定量値は 3.5×10^5 CFU/ml となり、死菌由来の DNA の PCR 増幅が阻害され、生菌のみを定量したことが確認された。

なお、牛肉の希釈液も用いて評価を行ったが、レタス希釈液の時と同様、PMA 処理により生菌のみを正確に定量できることが明らかとなった。

以上のことより、本研究において、食品中に生菌と死菌が存在した場合であっても PMA 処理を適切に行うことで、生菌のみを正確に定量できることが示された。ここで確立した手法は、加工食品等幅広い食品の自主衛生管理への応用が期待される。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

1) Hajime Takahashi, Moemi Nakazawa, Chihiro Ohshima, Miki Sato, Tomoki Tsuchiya, Akira Takeuchi, Masaaki Kunou, Takashi Kuda & Bon Kimura.

Heat- denatured lysozyme inactivates murine norovirus as a surrogate human norovirus.

Scientific Reports, 5:11819 (2015)

2) Hajime Takahashi, Tomomi Takahashi, Satoko Miya, Haruka Yokoyama, Takashi Kuda, Bon Kimura.

Growth inhibition effects of ferulic acid and glycine/sodium acetate on *Listeria monocytogenes* in coleslaw and egg salad.

Food Control, 57, 105-109 (2015)

〔学会発表〕(計 3件)

1) 廣川 絵梨、高橋 肇、春日 良太、久田 孝、
木村 凡
薬剤及び日持ち向上剤により処理された菌
に対する PMA-qPCR の有効性
第 36 回日本食品微生物学会学術総会、川崎
市、2015/11/12-11/13

2) 高橋 友美、高橋 肇、横山 遥、久田 孝、
木村 凡
日持ち向上剤を用いたサラダにおける
Listeria monocytogenes の増殖抑制
第 108 回日本食品衛生学会学術講演会、金
沢
2014/12/03-12/04

3) Hajime TAKAHASHI, Yuichiro TANAKA,
Tomoyo SHOJI, Chikako TAKAKURA,
Toshiharu SASAKI, Takashi KUDA, and Bon
KIMURA
Shorter wavelength LED light source
facilitates propidium monoazide PMA-
mediated elimination of false- positive
amplification.
Food Micro2014, Nantes, France,
2014/09/01-09/04.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 高橋 肇 (TAKAHASHI HAJIME)
東京海洋大学 学術研究院 助教
研究者番号: 40413116

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし