＝原 著＝

食中毒菌を同定するための核酸増幅副生成物 検出の利用

齋藤紀行^{*1}・遠藤美砂子^{*1,*2,†}・丸山昇^{*2}・秋山和夫^{*1}

(^{*1}宮城県保健環境センター, ^{*2}宮城県産業技術総合センター)

(受付 平成 15 年 12 月 21 日)

(受理 平成 16 年 4 月 6 日)

Detection of the By-products in Amplification Procedure for Identification of Food Poisoning Bacteria

Noriyuki SAITO^{*1}, Misako TAGIRI-ENDO^{*1,*2,†}, Noboru MARUYAMA^{*2}
and Kazuo AKIYAMA^{*1}

(^{*1}Institute of Public Health and Environment, Miyagi Prefectural Government,
Saiwai-cho, Miyagino-ku, Sendai 983-0836)

(^{*2}Industrial Technology Institute, Miyagi Prefectural Government, Akebono, Izumi-ku,
Sendai 981-3206; † Corresponding author)

The enzymatic assay (PPi assay) for inorganic pyrophosphate (PPi) released from nucleotides by polymerase chain reaction (PCR) was compared with the electrophoresis assay in identification of food poisoning bacteria. In this study, 15 species of bacteria and 7 kinds of commercial primers were used. The amplicons and PPi produced by PCR were confirmed by electrophoresis and PPi assay, respectively. In comparison, the PPi assay showed false-positive in bacteria having non-specific genes, using 4 kinds of primers, but showed positive in all bacteria having specific genes, using 7 kinds of primers.

These results suggested that PPi assay could be a simple and effective method for rapid identification of food poisoning bacteria.

Key words: Gene amplification; PCR; Inorganic pyrophosphate; Food poisoning bacteria

緒 言

食中毒細菌をはじめとする食品の細菌検査は、通常、増菌培養・分離培養および菌株の同定などの工程を経るため、操作が煩雑な上、検査結果が得られるまでに数日を要する。このため、さまざまな原理に基づく細菌の簡易迅速検出法が開発されてきた³⁾。微生物の特定遺伝子を増幅するポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法は、細菌の簡易迅速検出法として日常検査に広く用いられている。その方法は、微生物などの DNA や RNA をテンプレートとしサーマルサイ클ーを用いて PCR を行い、増幅産物である増幅 DNA を電気泳動・染

色で検出し、病原菌の有無を判定する検査法である。増幅 DNA の染色に発ガン性物質のエチジウムブロマイドを、さらに染色された増幅 DNA の検出にはヒトに有害な紫外線を用いる。食品工場などの食品生産現場での細菌検査に PCR 法を導入するためには、安全性が高く簡易な増幅産物の検出法が要求される。

増幅 DNA の検出に代わる方法として、PCR の副生成物であるピロリン酸を検出する方法が知られている^{1,6,7)}。Tabary ら⁶⁾は、ピロリン酸を化学発光法で検出する方法を用いたが、この方法は高感度ではあるが、化学発光装置は高価である。Durward と Harris¹⁾はピロリン酸をリン酸にした後、モリブデン酸呈色法で測定した。しかし、この方法は食品や培地中に存在するリン酸が検出を妨害するおそれがある。一方、筆者の一人は、ピロリン酸にヒポキサンチン-グアニンホスホリボシル

† 連絡先

^{*1} ☎983-0836 仙台市宮城野区幸町 4-7-2

^{*2} ☎981-3206 仙台市泉区明通 2-2

トランスフェラーゼ (HGPRT) を作用させて、ヒポキサンチンに導き、次にテトラゾリウム塩の存在下、キサンチンオキシダーゼ/デヒドロゲナーゼ (XOD/XDH) を作用させ、呈色を示すホルマゼンを生成させることで、ピロリン酸の定量を行う方法を開発した⁷⁾。本法は従来のピロリン酸測定法とは異なり、試薬の添加順序を変えるだけで、酵素共役反応の中間生成物 (本法ではヒポキサンチン) の影響を受けずに測定することができ、試薬の毒性も少ない。

本研究では、7種類の市販食中毒菌鑑別用プライマーを用いて、特異遺伝子を保有している食中毒菌および特異遺伝子を保有しない菌についてPCRを行い、その増幅産物について、増幅DNAを電気泳動法で、ピロリン酸をTagiri-Endoの方法⁷⁾で測定 (ピロリン酸法) し、ピロリン酸法が電気泳動法の代替法として有効であるかを評価した。

材料および方法

1. 材料

1) 供試菌

臨床あるいは環境より分離した菌株を供試菌株とした。ピロリン酸定量の実験には *Salmonella* Enteritidis O9 (Sa-389), *S. Thompson* O7 (Sa-336), *Escherichia coli* O148 (Ec-446), *E. coli* O6 (Ec-425) を使用した。ピロリン酸法の有用性の検討には15菌種61菌株を使用した。それらの菌種名、血清型、菌株番号、産生毒素、保有遺伝子をTable 1に示す。また、ピロリン酸法の検出感度の検討には、*S. Enteritidis* O9 (Sa-389) を用いた。供試菌のうち各プライマーに対応する特異遺伝子の保有が確認されている菌株を特異遺伝子陽性株、特異遺伝子を保有しないことが確認されている菌株を特異遺伝子陰性株とした。

2) 食中毒菌用プライマー

サルモネラ *invA* 遺伝子検出用 (SIN), 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒遺伝子検出用 (VPD), 腸管出血性大腸菌 VT 遺伝子検出用 (EVC), 赤痢菌および腸管侵入性大腸菌 *invE* 遺伝子検出用 (INV), 赤痢菌および腸管侵入性大腸菌 *ipaH* 遺伝子検出用 (IPA), サルモネラエンテロトキシン遺伝子検出用 (STN), ウェルシュ菌毒素遺伝子検出用 (CPE) および黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子検出用 (SEA) の8種類の市販プライマー (Takara Bio 社製) を使用した。

3) PCR 試薬

PCR にはDNAポリメラーゼおよび4種の塩基が含有されたPCR Beads Tube (Ready-To-Go: Amersham Biosciences 社製) を使用した。

4) ピロリン酸測定用試薬

次の2種の試薬を調製して使用した。

①0.4 U/ml キサンチンオキシダーゼ (XOD; Roche Diagnostics 社製), 10 mM 塩化マグネシウム, 20 mM

イノシン酸 (IMP) を含む 100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) (この試薬を XOD/IMP とする)

②100 U/ml HGPRT (Sigma 社製), 10 mM 塩化マグネシウム, 3.2 mM 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium (INT; Molecular Probes 社製) を含む 100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) (この試薬を HGPRT/INT とする)

2. 方法

1) 菌の調製

腸内細菌、黄色ブドウ球菌、ウェルシュ菌はBHIブイヨン、ビブリオ属菌はアルカリペプトン水を用いて、37℃で一晩培養した。培養液200 μ lをマイクロチューブに分注し、遠心法により菌を洗浄した。菌の沈渣を滅菌蒸留水に再浮遊させ、95℃で6分加熱した後、遠心した上清をPCR用テンプレートとした。検出感度測定では *S. Enteritidis* を一晩培養後、10倍階段希釈した後、各々の濃度の菌液を熱処理してDNAテンプレートとした。同時に培養液の生菌数を算出した。

2) PCR

PCRはReady-To-Goチューブ1本に滅菌蒸留水 (22 μ l), 各プライマー (アンチ 0.25 μ l, センス 0.25 μ l) および各菌株のDNAテンプレート (2.5 μ l) を加え、サーマルサイクラー (ABI 社製) を用いて、市販プライマーの仕様書に準じた条件で実施した。1検体につき2本のReady-To-Goチューブを使用した。

3) 電気泳動法による増幅DNAの確認

PCR終了後、各検体の5 μ lを2.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、アガロースゲルをエチジウムブロマイドで処理した後、紫外線で各々の増幅DNAを確認し写真撮影を行った。

4) ピロリン酸測定

PCR後、各検体にXOD/IMPを5 μ l添加し60℃で1分間加温振とうした。これにHGPRT/INTを20 μ l加え、60℃で10分間加温振とうした後、1検体2本のPCRチューブの反応液を合わせ、そこから90 μ lをマイクロプレートリーダー用のプレートに分注し吸光度を測定した。吸光度の値は、490 nmにおける吸光度から630 nmにおける吸光度を引いて求めた。吸光度0.04以上では目視による呈色の判定が可能であった。このことより、吸光度が0.04未満の場合をピロリン酸法陰性 (呈色陰性)、0.04以上の場合をピロリン酸法陽性 (呈色陽性) とした。

5) 検体の判定

特定遺伝子陽性株および陰性株を各々のプライマーでPCRを行い、電気泳動法で特定の増幅DNAが検出された菌株を泳動法陽性、検出されなかった菌株を泳動法陰性とした。陰性株のうち泳動法で特定位置以外にバンドが観察され、ピロリン酸法で呈色する場合 (目視で確認可: 吸光度0.04以上) を偽陽性検体とした。

Table 1. Bacterial strains used in this study

Bacterial strain	Serotype	Strain No.	Toxin	Gene
<i>Escherichia coli</i>	O1	Ec-789		
<i>Escherichia coli</i>	O25	Ec-793		
<i>Escherichia coli</i>		MEE-2		
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	O26	Ec-758	VT1	<i>stx1</i>
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	O26	Ec-793	VT1	<i>stx1</i>
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	O157	Ec-812	VT1, 2	<i>stx1</i> , <i>stx2</i>
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	O111	Ec-820	VT1	<i>stx1</i>
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	O157	Ec-845	VT2	<i>stx2</i>
Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	O127a	Ec-449		<i>invE</i> , <i>ipaH</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>		MEE-2		
<i>Klebsiella oxytoca</i>		MEK-2		
<i>Klebsiella oxytoca</i>		MEK-3		
<i>Citrobacter freundii</i>		MEC-2		
<i>Citrobacter freundii</i>		MEC-3		
<i>Serratia marcescens</i>		MES-1		
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		MEY-2		
<i>Proteus mirabilis</i>		MEP-2		
<i>Providencia rettgeri</i>		MEP-3		
<i>Salmonella</i> Oranienburg	O7	Sa-328		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Oranienburg	O7	Sa-329		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Oranienburg	O7	Sa-330		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Oranienburg	O7	Sa-331		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Chester	O4	Sa-334		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Thompson	O7	Sa-336		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	O9	Sa-389		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	O9	Sa-390		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	O9	Sa-391		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	O9	Sa-392		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	O9	Sa-496		<i>enterotoxin</i>
<i>Salmonella</i> Anatum	O3	Sa-509		<i>enterotoxin</i>
<i>Shigella flexneri</i>		Sh-28		<i>invE</i> , <i>ipaH</i>
<i>Shigella flexneri</i>		Sh-29		<i>invE</i> , <i>ipaH</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O3 : K6	Vp-127	TDH(+)	<i>tdh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O3 : K6	Vp-145	TDH(+)	<i>tdh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O3 : K6	Vp-146	TDH(+)	<i>tdh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O3 : K6	Vp-147	TDH(+)	<i>tdh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O3 : K6	Vp-148	TDH(+)	<i>tdh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O3 : K6	Vp-149	TDH(+)	<i>tdh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O3 : K6	Vp-150	TDH(+)	<i>tdh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O4 : K68	Vp-195	TDH(+)	<i>tdh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O1 : K25	Vp-207	TDH(+)	<i>tdh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O4 : K63	MEV-11	TDH(+)	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O4 : K42	MEV-12	TDH(+)	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O4 : K34	MEV-13	TDH(+)	
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1		NAG-12		
<i>Vibrio vulnificus</i>		Vv-117		
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-20	enterotoxin(+)	<i>enterotoxin</i>
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-23	enterotoxin(+)	<i>enterotoxin</i>
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-24	enterotoxin(+)	<i>enterotoxin</i>
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-25	enterotoxin(+)	<i>enterotoxin</i>
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-43	enterotoxin(+)	<i>enterotoxin</i>
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-44	enterotoxin(+)	<i>enterotoxin</i>
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-45	enterotoxin(+)	<i>enterotoxin</i>
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-15	enterotoxin(-)	
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-16	enterotoxin(-)	
<i>Clostridium perfringens</i>		Cp-17	enterotoxin(-)	
<i>Staphylococcus aureus</i>		Sta-411	enterotoxin A(+)	<i>enterotoxin A</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>		Sta-398	enterotoxin A, B(+)	<i>enterotoxin A, B</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>		Sta-412	enterotoxin B(+)	<i>enterotoxin B</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>		Sta-414	enterotoxin C(+)	<i>enterotoxin C</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>		Sta-260	enterotoxin D(+)	<i>enterotoxin D</i>

結 果

1. 細菌 DNA の増幅で生成するピロリン酸の量

細菌 DNA を PCR で増幅させた場合のピロリン酸生成量を調べた。サルモネラ (*S. Enteritidis*, *S. Thompson*), 非病原性大腸菌 (*E. coli* O148 および O6) を供試菌とした。陽性コントロールは 0.1 ng の特殊細菌検出用 Positive Control Template SN (Takara Bio 社製) を用いた。SIN を用いて PCR を行った後、ピロリン酸を定量した結果を Table 2 に示す。ピロリン酸量は、ピロリン酸カリウムを 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) で希釈したものを用いて作成した検量線から求めた。陽性コントロールやサルモネラでは、200~400 μ M のピロリン酸が遊離したが、陰性コントロール、非病原性大腸菌では 60 μ M 以下であった。以上のことから、ピロリン酸生成量を指標として、PCR の判定が可能なが示された。

2. 電気泳動法とピロリン酸法の比較

7 種類のプライマー (SIN を除く) を用い、特定遺伝子の保有が確認されている菌株 (陽性株)、保有しないことが確認されている菌株 (陰性株) について PCR を行い、反応終了後に電気泳動法による増幅 DNA の検出とピロリン酸 (PPi) の測定を行った。

STN を用いた場合の電気泳動およびピロリン酸測定の結果を Fig. 1 に示す。エンテロトキシン遺伝子を有す

Table 2. Absorbance and amount of PPi in PCR mixture

Template	Absorbance ^a	PPi (μ M) ^b
Negative control (0 ng)	0.022 $\pm$ 0.001	44
Positive control (0.1 ng)	0.098 $\pm$ 0.010	398
<i>E. coli</i> O148	0.019 $\pm$ 0.004	41
<i>E. coli</i> O6	0.032 $\pm$ 0.003	60
<i>S. Thompson</i>	0.075 $\pm$ 0.005	205
<i>S. Enteritidis</i>	0.082 $\pm$ 0.006	254

^a Mean $\pm$ SD ($n=3$).

^b Amount of PPi was calculated from the calibration curve.

Table 3. Detections of target gene by electrophoresis and PPi assay with PCR using seven kinds of primers

Primer	Number of sample	Bacteria with target gene		Bacteria without target gene		
		Electrophoresis-positive	PPi assay-positive	Electrophoresis-negative	PPi assay-negative	PPi assay-positive ^a
VPD	34	9	9	25	17	8
EVC	22	5	5	17	17	0
INV	16	2	2	14	12	2
IPA	18	2	2	16	16	0
STN	29	12	12	17	12	5
CPE	24	7	7	17	16	1
SEA	26	2	2	24	24	0
Total	169	39	39	130	114	16

^a Non-specific fragments were detected by gel electrophoresis.

Fig. 1. PCR products with STN primer: (A) Electrophoresis assay, (B) Absorbance by PPi assay; (1-4) *Salmonella* Oranienburg, (5) *Salmonella* Chester (Sa-334), (6) *Salmonella* Thompson (Sa-336), (7) *Salmonella* Enteritidis (Sa-389), (8) *Vibrio parahaemolyticus* O4:K34 (MEV-13), (9) *Escherichia coli* (Ec-789), (10) *Staphylococcus aureus* (Sta-411).

るサルモネラ (*S. Oranienburg*, *S. Chester*, *S. Thompson*, *S. Enteritidis*) は電気泳動で 264 bp の特異的な増幅 DNA が検出され、かつピロリン酸呈色反応の吸光度も高かった (0.135~0.096) が、サルモネラのエンテロトキシン遺伝子をもたない大腸菌や黄色ブドウ球菌では増幅 DNA は検出されず、かつ吸光度も低かった (それぞれ 0.022, 0.018)。一方、エンテロトキシン遺伝子をもたない腸炎ビブリオ O4:K34 では非特異的な増幅 DNA (レーン 8) が検出され、吸光度 (0.069) も高かった (偽陽性)。

7 種のプライマーを用いて菌の特定遺伝子確認を行った結果を Table 3 に示す。すべての陽性株は電気泳動法およびピロリン酸法で陽性を示した。一方、陰性株は電

Table 4. Detections of target genes in various bacterial strains by PPI assay with PCR using seven kinds of primers

Bacterial strain ^b	Primer ^a						
	VPD	EVC	INV	IPA	STN	CPE	SEA
<i>E. coli</i>	—	—	—	—	—	—	—
EHEC	—	+	—	—	—	—	—
EIEC	—	—	+	+	—	—	—
<i>Enterobacter</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>Klebsiella</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>Citrobacter</i>	—	—	—	—	*	—	—
<i>Serratia</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>Yersinia</i>	*	—	*	—	*	—	—
<i>Proteus</i>	—	—	—	—	*	—	—
<i>Providencia</i>	*	—	*	—	*	—	—
<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	+	—	—
<i>Shigella</i>	—	—	+	+	—	—	—
<i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh</i> +	+	—	—	—	—	—	—
<i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh</i> —	*	—	—	—	*	*	—
<i>V. cholerae</i> non-O1	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. vulnificus</i>	*	—	—	—	—	—	—
<i>C. perfringens</i> ET+	—	—	—	—	—	+	—
<i>C. perfringens</i> ET—	—	n	n	n	n	—	—
<i>S. aureus</i> A+	n	—	—	—	—	—	+
<i>S. aureus</i> A—	n	n	n	n	n	n	—

^a +: Positive, —: Negative, *: False-positive, n: Not examined.

^b EHEC: Enterohemorrhagic *E. coli*, EIEC: Enteroinvasive *E. coli*, ET: Enterotoxin, A: Enterotoxin A.

気泳動法ではすべて陰性と判定されたが、この中にピロリン酸法で呈色陽性を示す偽陽性反応が VPD, INV, STN および CPE を用いた場合に認められた。

PCR の判定精度を電気泳動法とピロリン酸法で比較した (Table 4)。電気泳動法で特異な増幅 DNA が認められ、かつピロリン酸法でも陽性を示すものを +、また両判定で陰性となったものを —、偽陽性となったものを * で表した。EVC, IPA および SEA を用いた場合、ピロリン酸法では各々の遺伝子を保有する菌株のみが陽性を示した。しかし、それ以外のプライマーを用いた場合には偽陽性を示す菌株が観察された。VPD でエルシニア、プロビデンス、*tdh* 遺伝子をもたない *tdh*(-) 腸炎ビブリオおよび *V. vulnificus* が、INV でエルシニアおよびプロビデンス、STN でシトロバクター、エルシニア、プロテウス、プロビデンスおよび *tdh*(-) 腸炎ビブリオが、CPE で *tdh*(-) 腸炎ビブリオが、それぞれ偽陽性を示した。

3. ピロリン酸法による検出感度

S. Enteritidis を $1.7 \times 10^8 \sim 10^2$ cfu/ml まで 10 倍 7 段階の各濃度に希釈調整し、熱処理後テンプレート検体とした。STN を用い、35 回および 40 回のサイクル数で PCR を実施し、反応終了後、増幅 DNA を泳動法で、ピロリン酸を呈色法で測定した。40 回サイクルの場合の結果を Fig. 2 に示す。35 サイクルでは 1.7×10^6 cfu/ml 以上の菌量でピロリン酸法での呈色が陽性に、また泳動法でも陽性を示したが、40 サイクルでは 1.7×10^4 cfu/ml 以上の濃度で両判定とも陽性を示した。

Fig. 2. PCR products using *Salmonella* Enteritidis template: (A) Electrophoresis assay, (B) Absorbance by PPI assay; (1) 1.7×10^8 , (2) 1.7×10^7 , (3) 1.7×10^6 , (4) 1.7×10^5 , (5) 1.7×10^4 , (6) 1.7×10^3 , (7) 1.7×10^2 cfu/ml.

次に 1.7×10^8 , 10^5 および 10^3 cfu/ml の濃度に調整し、熱処理した *S. Enteritidis* をテンプレートとして、STN で PCR を行った。PCR サイクル数を 10, 15, 20, 25, 30 および 35 回として、各々について増幅 DNA とピロリン酸を測定した (Table 5)。初期菌量が、 1.7×10^8 cfu/ml の場合は、サイクル数が 10~20 回では両判定

Table 5. Sensitivity of electrophoresis and PPI assay

Starting amount of template (cfu/ml)	Cycle	Electrophoresis ^a	Absorbance
1.7×10 ⁸	0	—	0.029
	10	—	0.029
	15	—	0.031
	20	—	0.030
	25	+	0.057
	30	+	0.109
	35	+	0.141
1.7×10 ⁵	0	—	0.020
	10	—	0.022
	15	—	0.025
	20	—	0.019
	25	+	0.119
	30	+	0.102
	35	+	0.085
1.7×10 ³	0	—	0.022
	10	—	0.029
	15	—	0.025
	20	—	0.026
	25	—	0.020
	30	—	0.022
	35	+	0.045

^a +: Positive, -: Negative.

とも陰性であったが、25 回以上ではともに陽性を示した。また菌量 1.7×10⁵ cfu/ml で行った場合でも、25 回以上の増幅で両方法とも陽性を示した。以上の結果より、25 回サイクル以上で菌の STN 保有菌の判定が可能と思われた。

考 察

PCR 法は、増幅 DNA を検出して判定する。しかし、PCR 法では特異遺伝子が増幅されるとともにピロリン酸が生成されることから、PCR の判定は、ピロリン酸の測定でも可能である。筆者の一人は、酵素を利用した新たなピロリン酸の測定法を開発した⁷⁾。そこで、7 種類の食中毒菌病原遺伝子鑑別用プライマーを用い 15 種の食中毒菌などについて PCR を実施した後、開発したピロリン酸の測定法で判定し、通常用いる電気泳動法による判定と比較した。

PCR で生成するピロリン酸量を調べた結果、陽性株では 200~400 μM のピロリン酸が遊離したが、陰性株では 60 μM 以下であった。したがってピロリン酸生成量を指標として、PCR の判定が可能ことが示された。

測定した菌株のうち、プライマーに特異な遺伝子を保有する陽性菌株では、ピロリン酸法の判定結果は泳動法の結果と全く同じであった。このように、ピロリン酸法では、陽性菌が陰性と判断されることはなく、1 次スクリーニングに有効であることがわかった。一方、遺伝子を保有しない陰性菌株は、泳動法ではすべてが陰性であるが、ピロリン酸法ではプライマーとして VPD, INV, STN および CPE を用いた場合に偽陽性を示す菌株が認

められた。特に、*tdh*(-) 腸炎ビブリオは 3 種類のプライマーで非特異的に反応し、泳動法では非特異バンドを認めるものの、特定位置にバンドはなく陰性と判定はされるが、ピロリン酸法では陽性と判定された。しかし、ピロリン酸法で陰性株が陽性と判定される偽陽性は、より特異性の高いプライマーを用いることで防止できると思われる。今回検討した市販プライマーの場合では、EVC, IPA, SEA の 3 種のプライマーは特異性が高く、ピロリン酸法による判別でも精度よく同定できた。

次に食中毒菌の検出感度を調べるために、1.7×10⁸~10² cfu/ml の濃度に調整したサルモネラをテンプレートとして、STN プライマーで PCR を行った後、泳動法とピロリン酸法で判定を行った。その結果、泳動法での検出限界は 1.7×10⁴ cfu/ml であり、ピロリン酸法でも同じ菌濃度以上で吸光度が 0.04 以上を示した。すなわち、この菌量が泳動法およびピロリン酸法での検出限界と思われた。検出限界の菌量を PCR 反応チューブ当たりの菌量に換算すると 4.3×10¹ cfu であった。さらに、DNA 増幅回数を変えた場合でも、ピロリン酸法と泳動法とは同じ増幅回数以上で陽性と認められ、ピロリン酸法は泳動法と同程度の検出感度であることが示された。通常の PCR 法では増幅 DNA の検出に発ガン物質と紫外線を用いるが、ピロリン酸法ではこれらを用いないことから、泳動法より安全な方法であると考えられる。

最近、PCR に代わる核酸増幅法がわが国でも開発されている。LAMP 法⁵⁾は増幅反応を定温で行い、生成する大量のピロリン酸をピロリン酸マグネシウムに変え、濁りとして検出する⁴⁾。TRC 法²⁾は、RNA を一定温度で増幅できる方法である。ピロリン酸法は、これらの増幅手法の判定にも応用可能と期待される。

要 約

細菌の簡易迅速検出法を確立するために、PCR 副生成物のピロリン酸を PCR の陽性・陰性の判定に利用する方法について検討した。

15 種の菌を用いて、食中毒菌検出用の 7 種のプライマーによる PCR を行い、電気泳動法とピロリン酸測定法で PCR の判定を行った。その結果、4 種のプライマーでは非特異的な反応のため、ピロリン酸法では陰性菌が陽性と判断させる場合があった。別の 3 種のプライマーは電気泳動法の結果と全く同じであった。また、いずれの場合もピロリン酸法で、陽性菌が陰性と誤判定されることはなかった。以上より、ピロリン酸測定法は PCR の判定を安全かつ迅速に判定することができ、食品中の食中毒菌の鑑別に有効と考えられた。

文 献

- 1) Durward, E. and Harris, W. J.: Colorimetric method for detecting amplified nucleic acids. *BioTechniques*,

- 25, 608–614 (1998).
- 2) Ishiguro, T., Saitoh, J., Horie, R., Hayashi, T., Ishizuka, T., Tsuchiya, S., Yasukawa, K., Kido, T., Nakaguchi, N., Nishibuchi, M. and Ueda, K.: Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel. *Anal. Biochem.*, **314**, 77–86 (2003).
- 3) 宮本敬久: 食品衛生細菌の簡易迅速測定法. *食科工*, **47**, 173–180 (2000).
- 4) Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T.: Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 150–154 (2001).
- 5) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **28**, e63 (2000).
- 6) Tabary, T., Ju, L. Y., and Cohen, J. H.: Homogeneous phase pyrophosphate (PPi) measurement (H3PIM). A non-radioactive, quantitative detection system for nucleic acid specific hybridization methodologies including gene amplification. *J. Immunol. Methods*, **156**, 55–60 (1992).
- 7) Tagiri-Endo, M.: A colorimetric assay for inorganic pyrophosphate that is also useful for measuring product accumulation in polymerase chain reactions. *Anal. Biochem.*, **315**, 170–174 (2003).