

# EMA-qPCR法による乳酸菌等グラム陽性菌の生菌迅速検出

○久保恵子、吉崎美和、棚瀬智雄、北川正成（タカラバイオ株式会社 バイオ研究所）

## 研究の背景および目的

食中毒菌をはじめとした微生物等の検出および同定には主に培養法が用いられているが、より簡便かつ迅速な検出方法としてPCR法等の遺伝子検査法の活用が広がりつつある。しかし、遺伝子検査法の課題として、生菌だけでなく死菌由来DNAも検出されるため偽陽性率が高くなる点が指摘されており、この課題を解決するための手法としてEMA(ethidium monoazide)などの選択的膜透過性色素を利用したEMA-PCRによる生菌検出法が報告されている。

昨年までの本学会では、EMA-qPCR法のサルモネラ生菌検出への利用について報告し<sup>1)</sup>、グラム陰性菌における本法の適合を明らかにしたが、本年はより適用を広げた乳酸菌等のグラム陽性菌における生菌検出について検討を行った。

## グラム陽性菌検出系の構築

純粋培養した各菌種においてEMA-qPCR検出系を構築した。

一定量の死菌由来DNAを抑制でき(図2)、生菌由来DNA検出への影響は少ない(図3)。

生菌死菌混在時にも生菌由来DNAを菌数依存的に検出(図4)。

## <インターカレーターによる検出>

【*Bifidobacterium bifidum*】 増幅サイズ 244bp  
死菌抑制効果: 3 log~4 log程度  
少なくとも $6 \times 10^5$  cfuまでの死菌を抑制

Solution B-gp	希釈なし
EMA処理時間	5分
EMA処理回数	1回

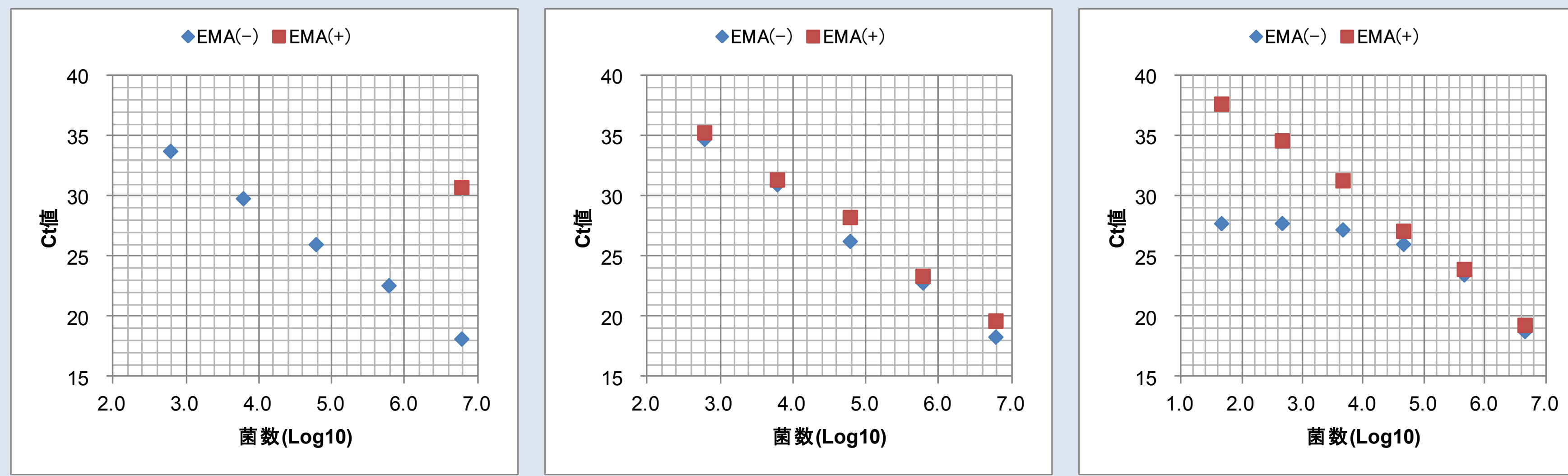
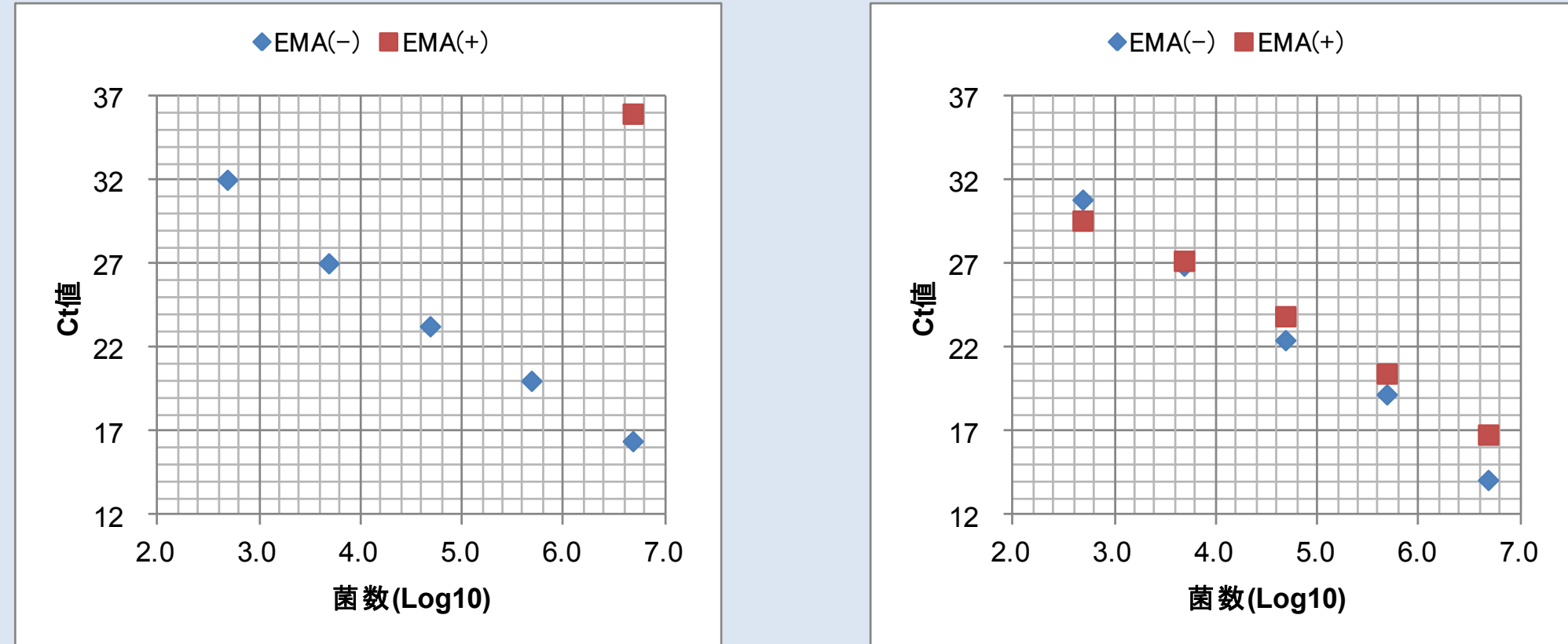


図2-1. 死菌 $6 \times 10^2 \sim 6 \times 10^6$  cfuのEMA処理効果  
図2-3. 生菌 $6 \times 10^2 \sim 6 \times 10^6$  cfuのEMA処理の影響  
図2-4. 生菌 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfuに死菌 $2 \times 10^4$  cfuを混合したEMA処理効果(混合物からの生菌選択的検出)

【*Lactobacillus delbrueckii*】 増幅サイズ 341bp  
死菌抑制効果: 5 log~6 log程度  
少なくとも $5 \times 10^5$  cfuまでの死菌を抑制

Solution B-gp	2倍希釈
EMA処理時間	5分
EMA処理回数	1回

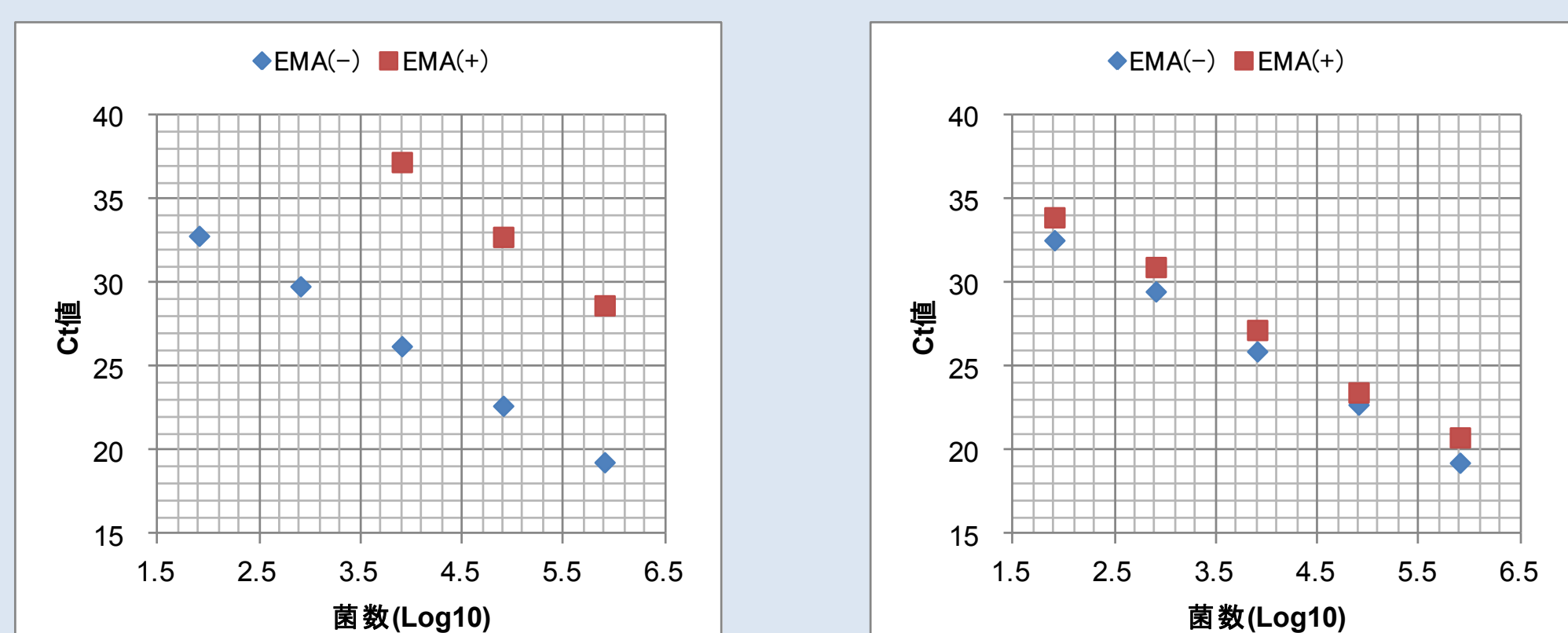
EMA処理供与菌数  
 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^6$  cfu



【*Bacillus subtilis*】 増幅サイズ 165bp  
死菌抑制効果: 3 log~4 log程度  
少なくとも $8 \times 10^2$  cfuまでの死菌を抑制

Solution B-gp	3倍希釈
EMA処理時間	5分
EMA処理回数	1回

EMA処理供与菌数  
 $8 \times 10^1 \sim 8 \times 10^5$  cfu

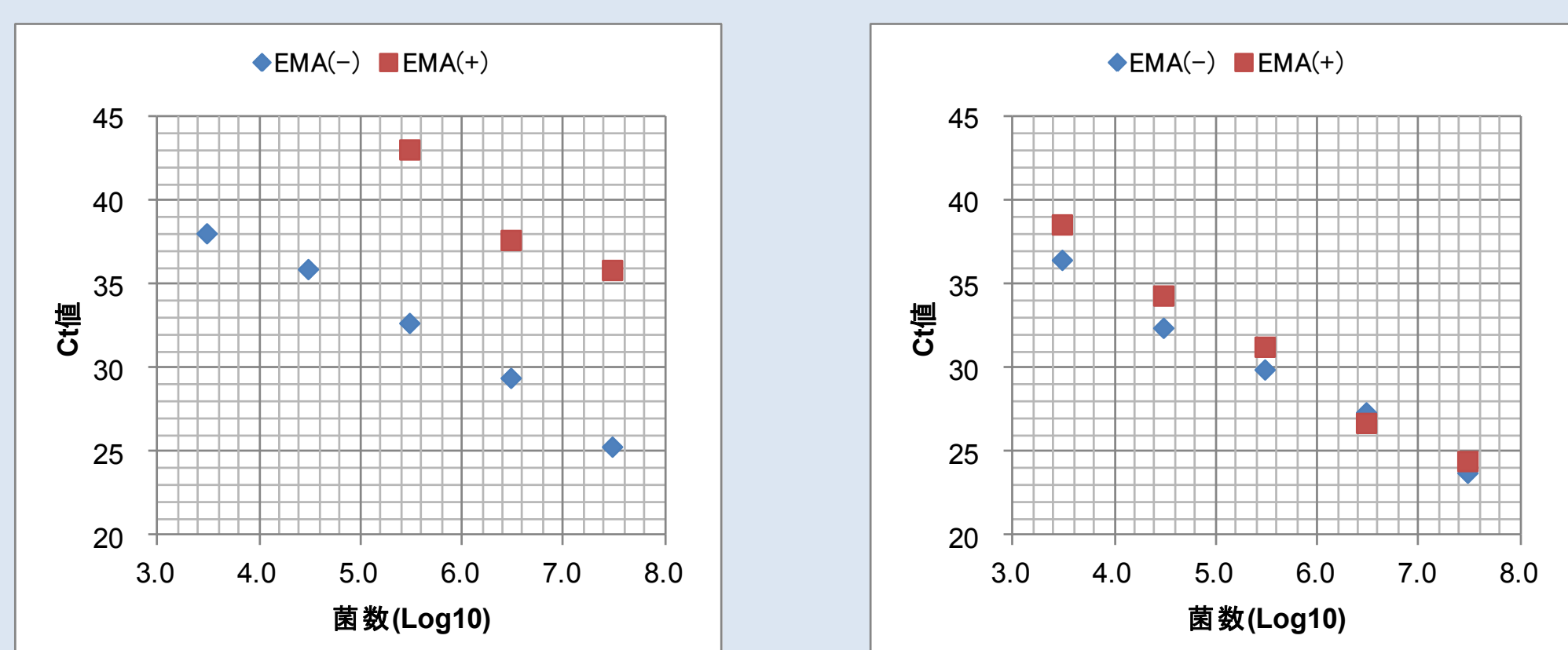


## <サイクリングプローブによる検出>

【*Listeria monocytogenes*】 増幅 製品コードCY223(タカラバイオ)  
死菌抑制効果: 3 log程度  
少なくとも $3 \times 10^4$  cfuまでの死菌を抑制

Solution B-gp	希釈なし
EMA処理時間	5分
EMA処理回数	2回

EMA処理供与菌数  
 $3 \times 10^3 \sim 3 \times 10^7$  cfu



【*Staphylococcus aureus*】 増幅 製品コードCY228(タカラバイオ)  
死菌抑制効果: 4 log程度  
少なくとも $2 \times 10^5$  cfuまでの死菌を抑制

Solution B-gp	希釈なし
EMA処理時間	5分
EMA処理回数	2回

EMA処理供与菌数  
 $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^7$  cfu

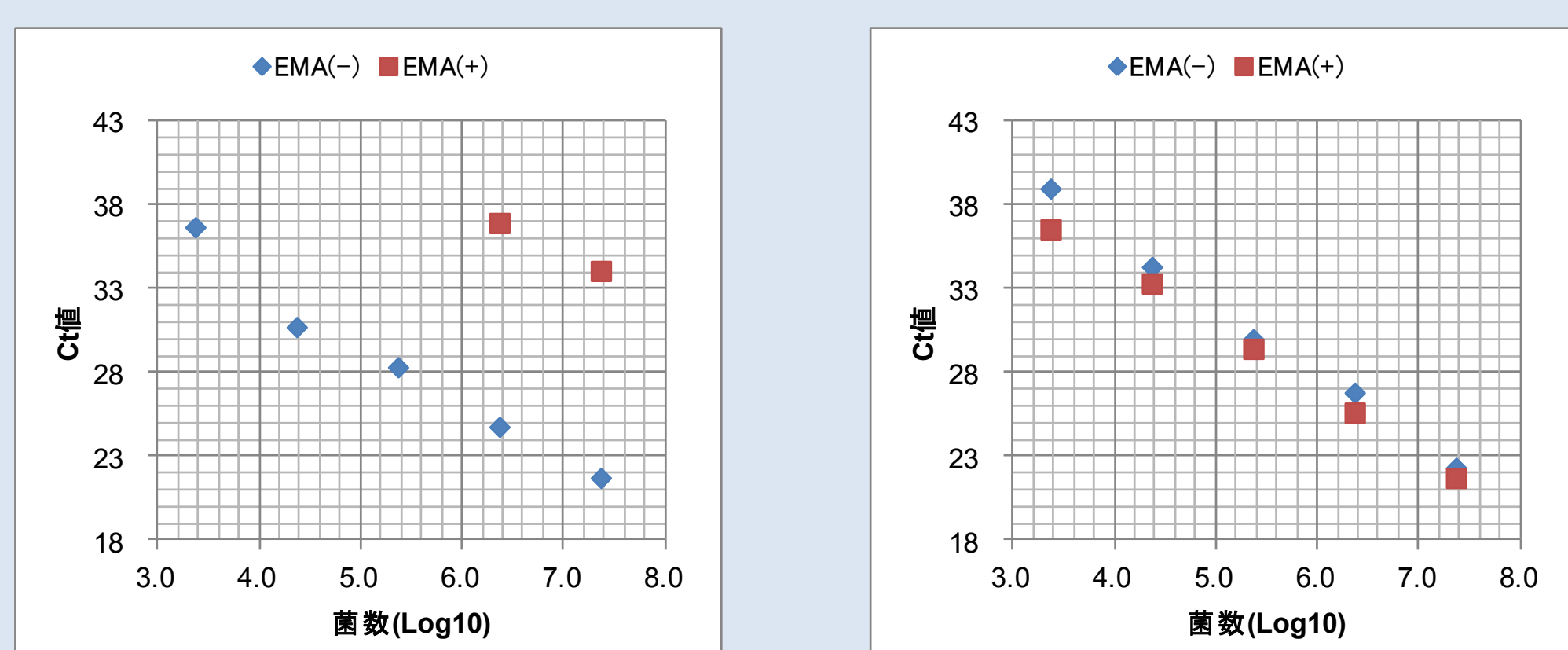


図2-2. EMA処理による死菌抑制効果  
図2-3. EMA処理による生菌への影響

## EMA-qPCR実験の流れ

- 菌液の調製  
(検討の場合、生菌を熱処理するなどして死菌を調製)
- EMA処理  
(Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive)製品コード7705(タカラバイオ)使用)
- DNA抽出
- qPCR/PCRによるターゲット遺伝子の検出

グラム陽性菌におけるEMA処理は低温(4℃または水上)で行う。

## EMA処理温度の影響

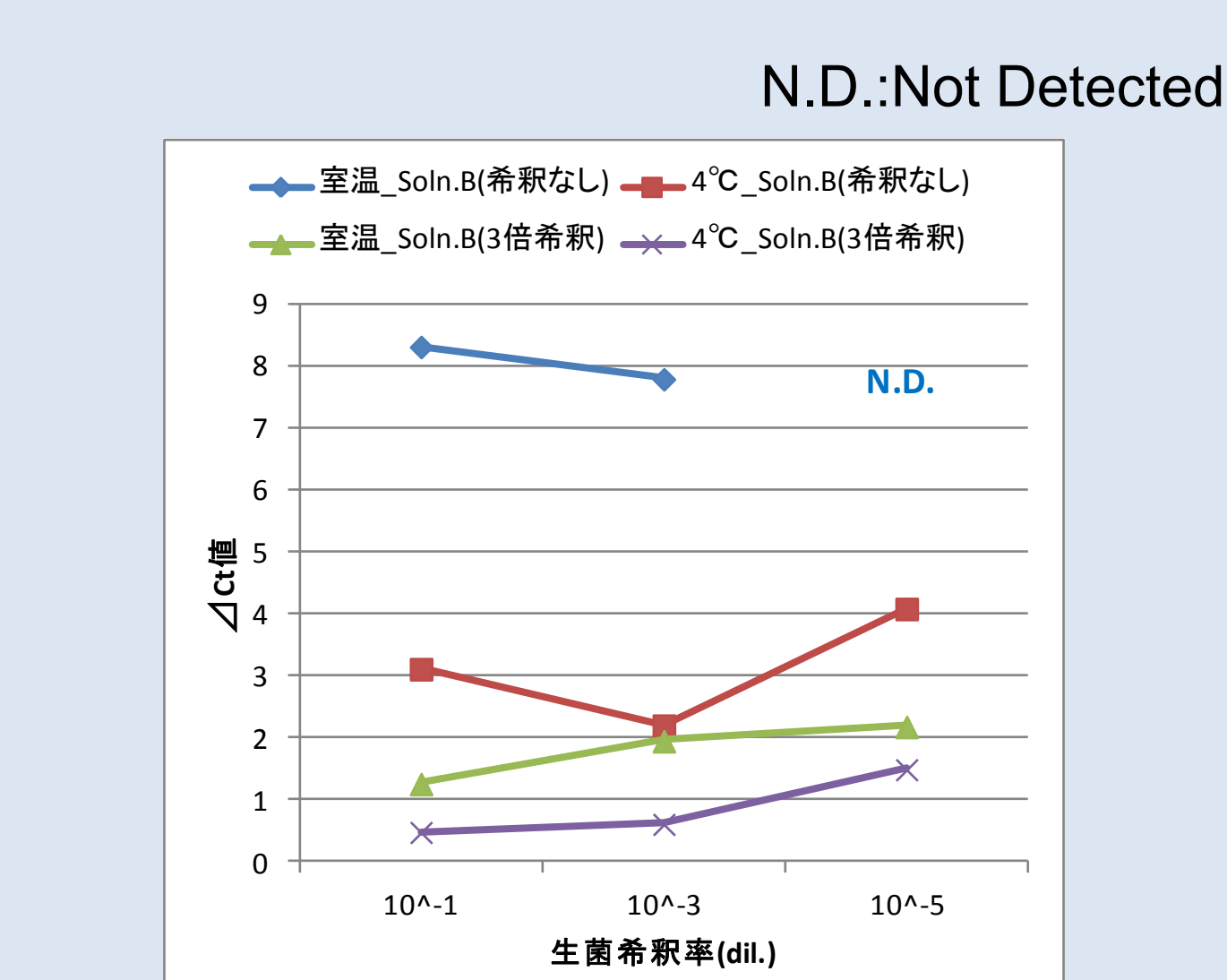


図5. *B. subtilis*生菌に対するEMA処理温度の影響

## EMA-qPCR法の原理

EMAは核酸のインターカレーターとして働く色素で、可視光に曝露することで核酸に対する共有結合能を獲得する。EMAは死菌(膜損傷菌)の細胞内に侵入し、光活性によってDNAを修飾、その結果、死菌由来のPCR増幅が抑制される。一方、生菌は膜の完全性により、EMAが細胞内部に侵入することができず、正常にPCR増幅する。

EMA-qPCR法は、EMAの能力を最大限活用した、細菌の膜完全性に基づく生死判別方法である。

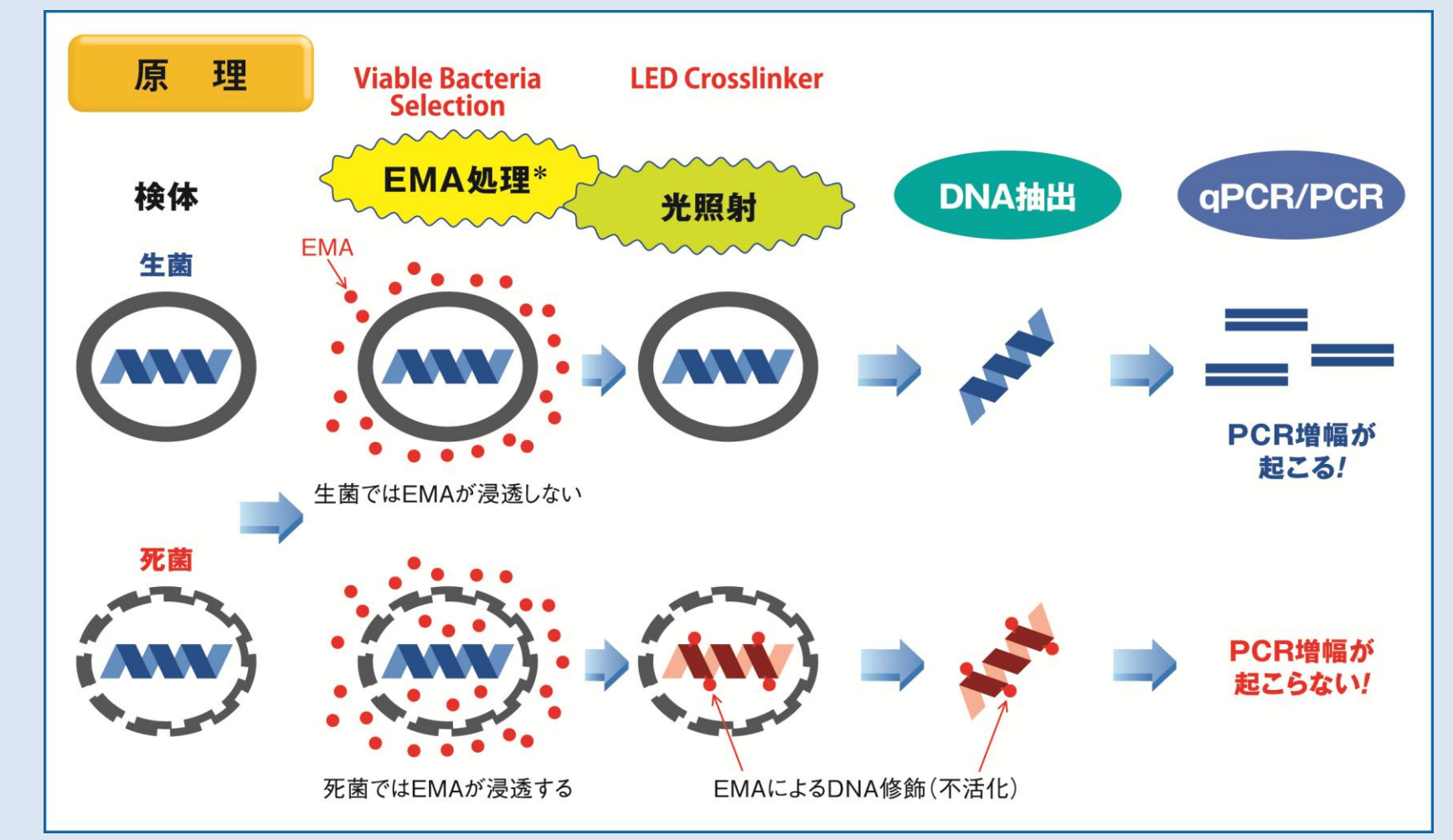


図1. EMA-qPCR法の原理

## *B. bifidum*の加温による検出への影響

純粋培養した*B. bifidum*を15分間加温処理し、どのような検出結果が得られるか、EMA-qPCR法、qPCR法、培養法と比較した。培養法では生存率1%( $1 \times 10^6$ )未満、EMA-qPCR法ではCt値の差( $\Delta Ct$ 値(w/o-with EMA)) $14^*$ を検出限界として、図6、図7に点線にて示した。

\* 90℃ 2分処理で得られる死菌コントロールの平均値より算出

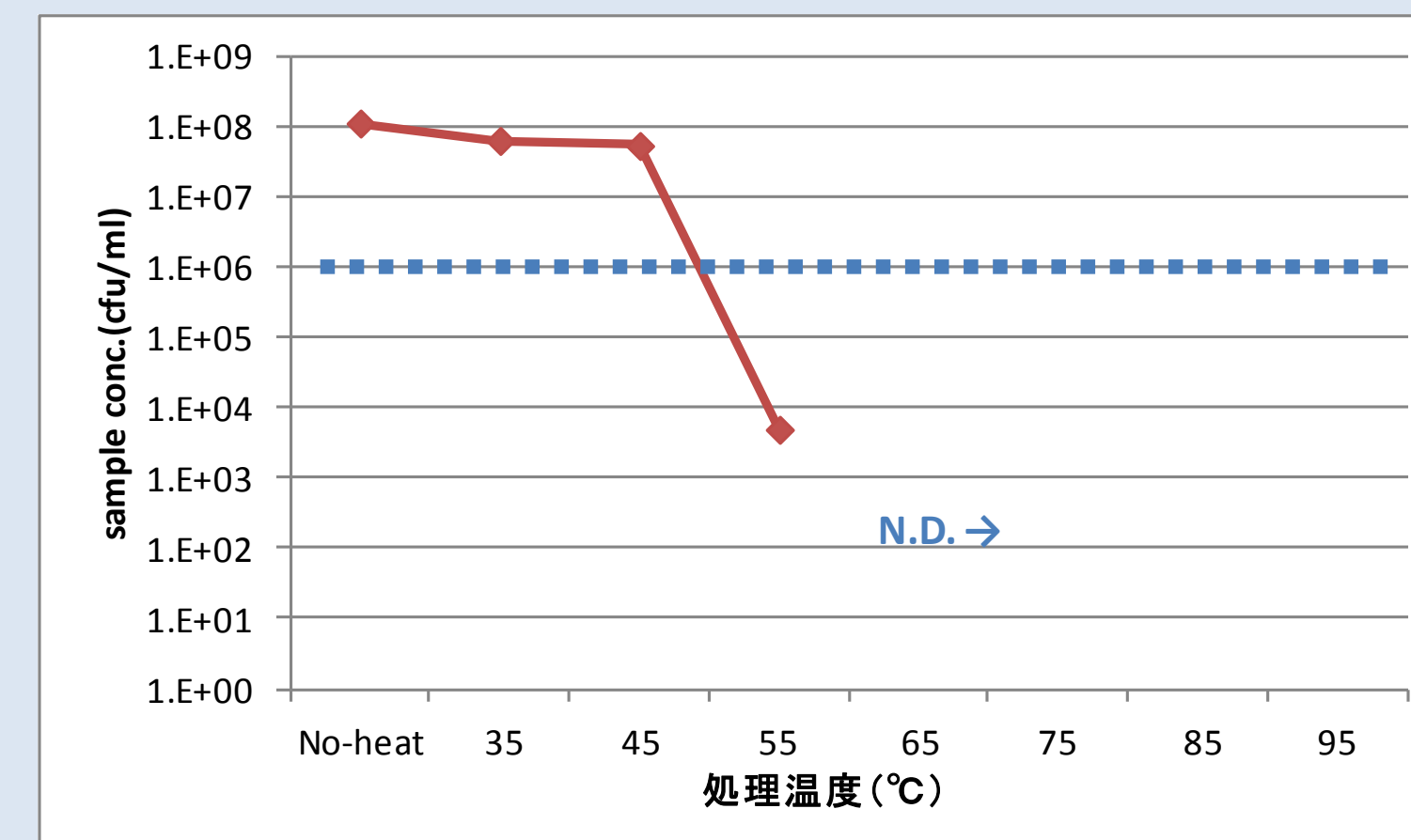


図6. 培養結果

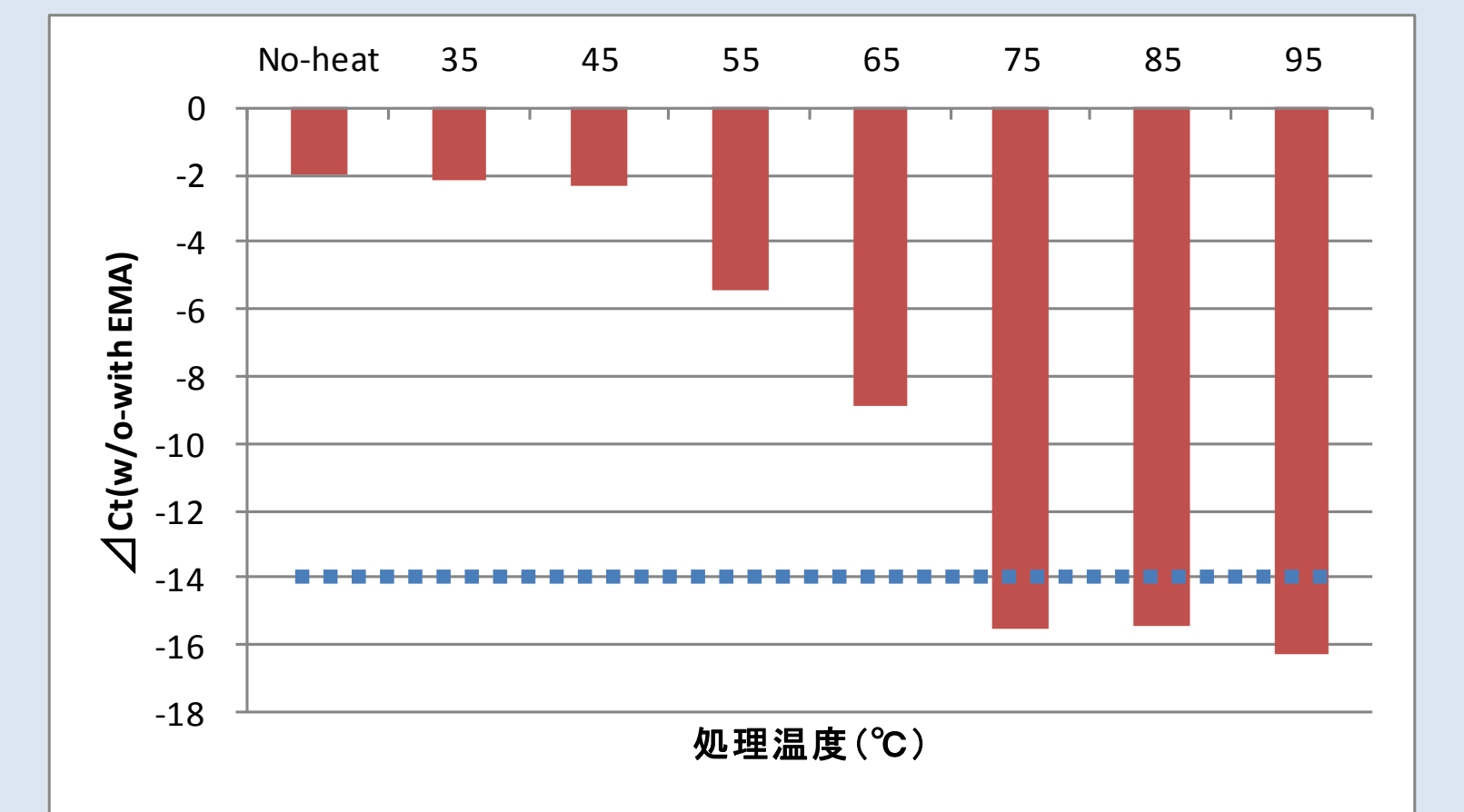


図7. EMA-qPCR結果

培養法とEMA-qPCR法とでは検出限界に至る温度に差が生じた。

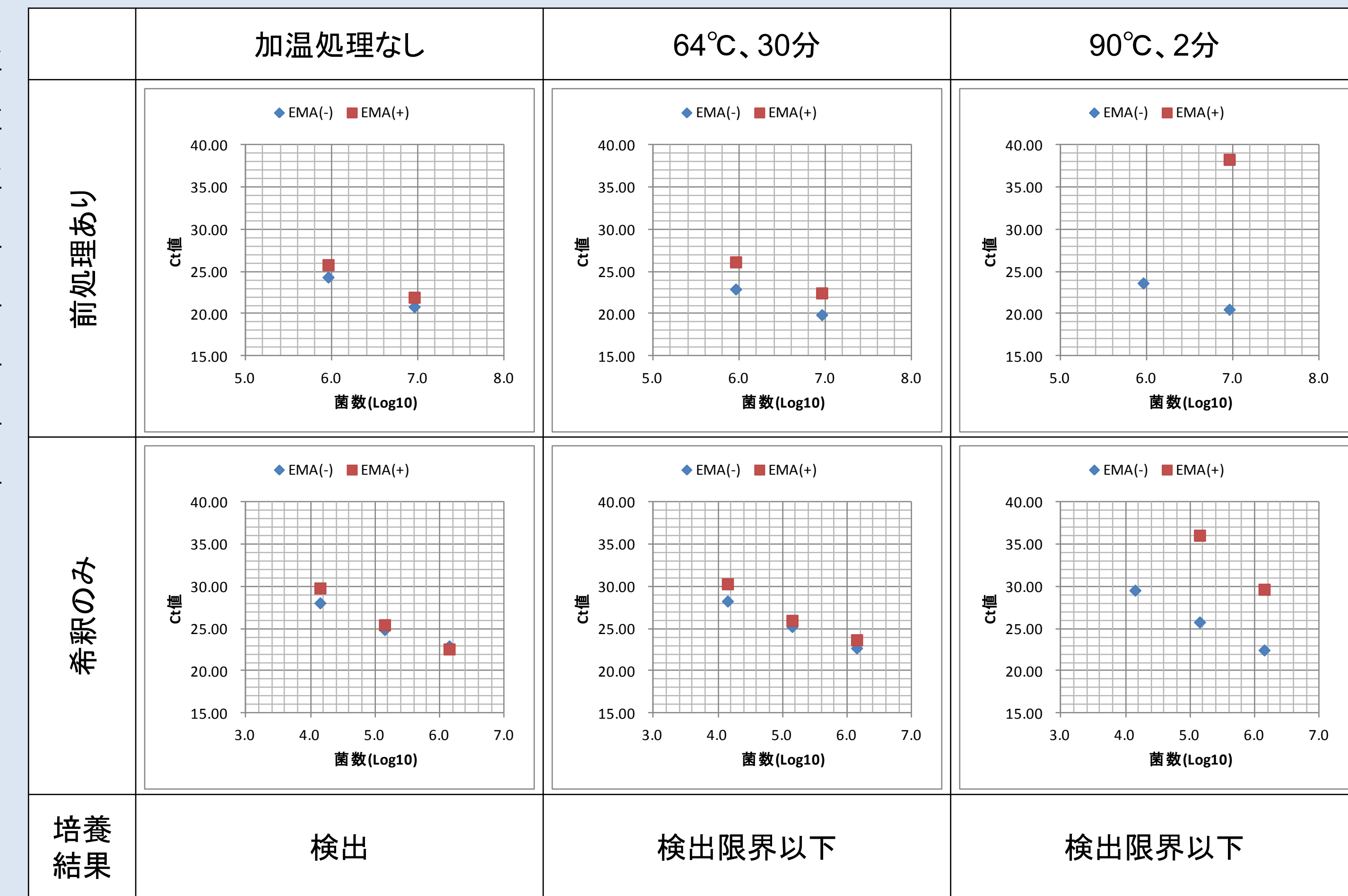
55 - 65℃程度の低温での加温では、EMA-qPCR法は検出限界には至らず、培養法は検出不可であった。

この結果より、EMA-qPCR法では膜損傷を受けていないGhostsおよびviable but not culturable(VNC)を検出していることが示唆された。

## 市販ヨーグルトからの*Bifidobacterium spp.*のEMA-qPCRによる検出

主として*Bifidobacterium spp.*の使用を明記している市販ヨーグルトを用いて、食材成分の持ち込みによるEMA-qPCR法への影響を確認した。検体は、1Mクエン酸ナトリウム溶液による洗浄2回の前処理を行ったものと、生理食塩水での希釈のみのものを使用した。

いずれの場合も90℃、2分加温検体(死菌に相当)では一定量の死菌を抑制でき、加温処理なし検体(生菌に相当)では検出への影響はほとんどないため、生菌検出系への検体由来成分の持ち込みは大きな問題とはならなかった。ただし、希釈のみに比べて前処理ありの方が死菌抑制効果が高いことから検体由来成分の持ち込みにより多少の影響はあると考えられる。



## 市販ヨーグルトからの*Bifidobacterium spp.*の生菌数依存的検出

加温処理なし検体(生菌に相当)と90℃、2分加温検体(死菌に相当)の混合物を用いて、EMA-qPCR法により生菌由来DNAを菌数依存的に検出できることが確認された。

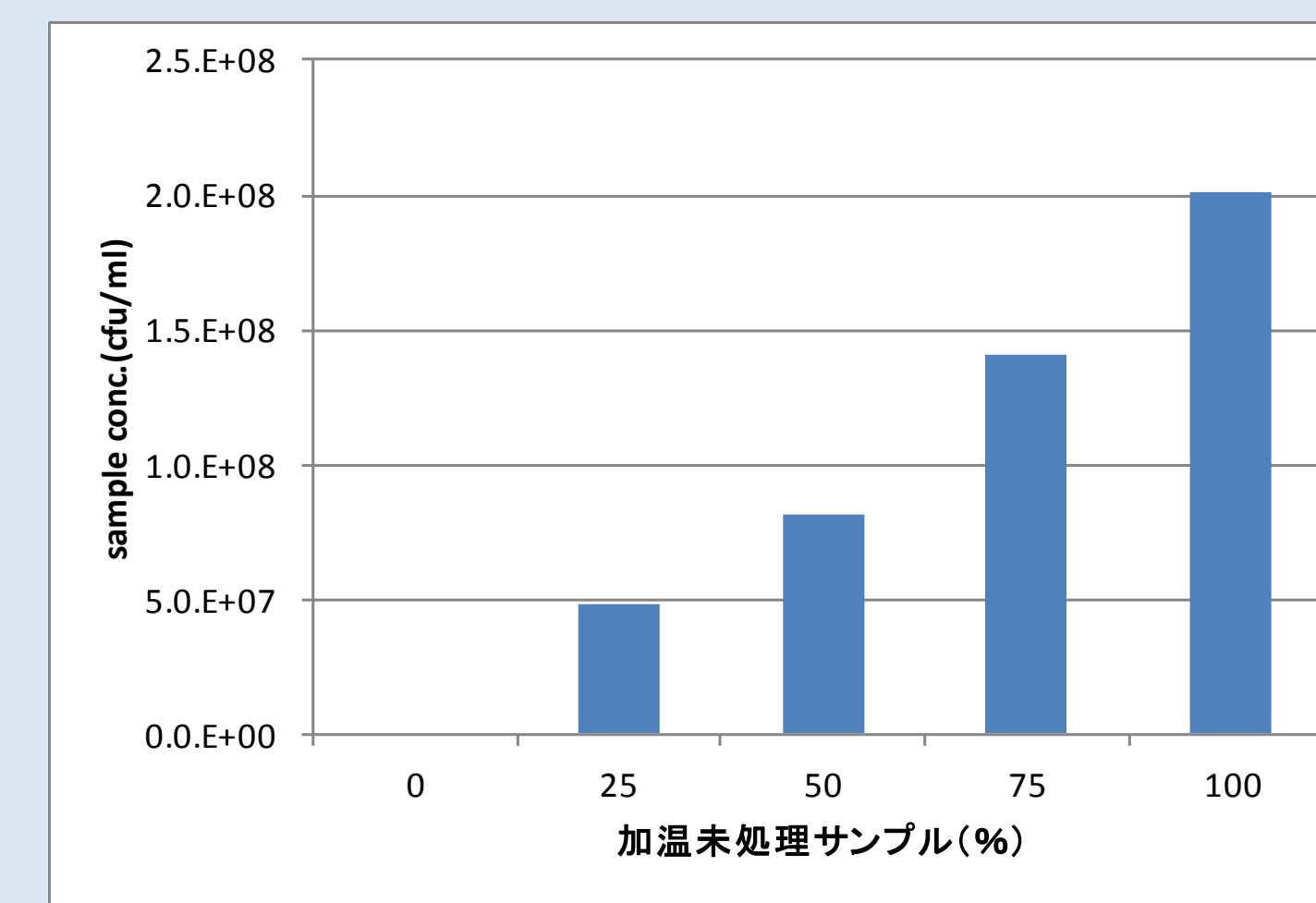


図11. 培養結果

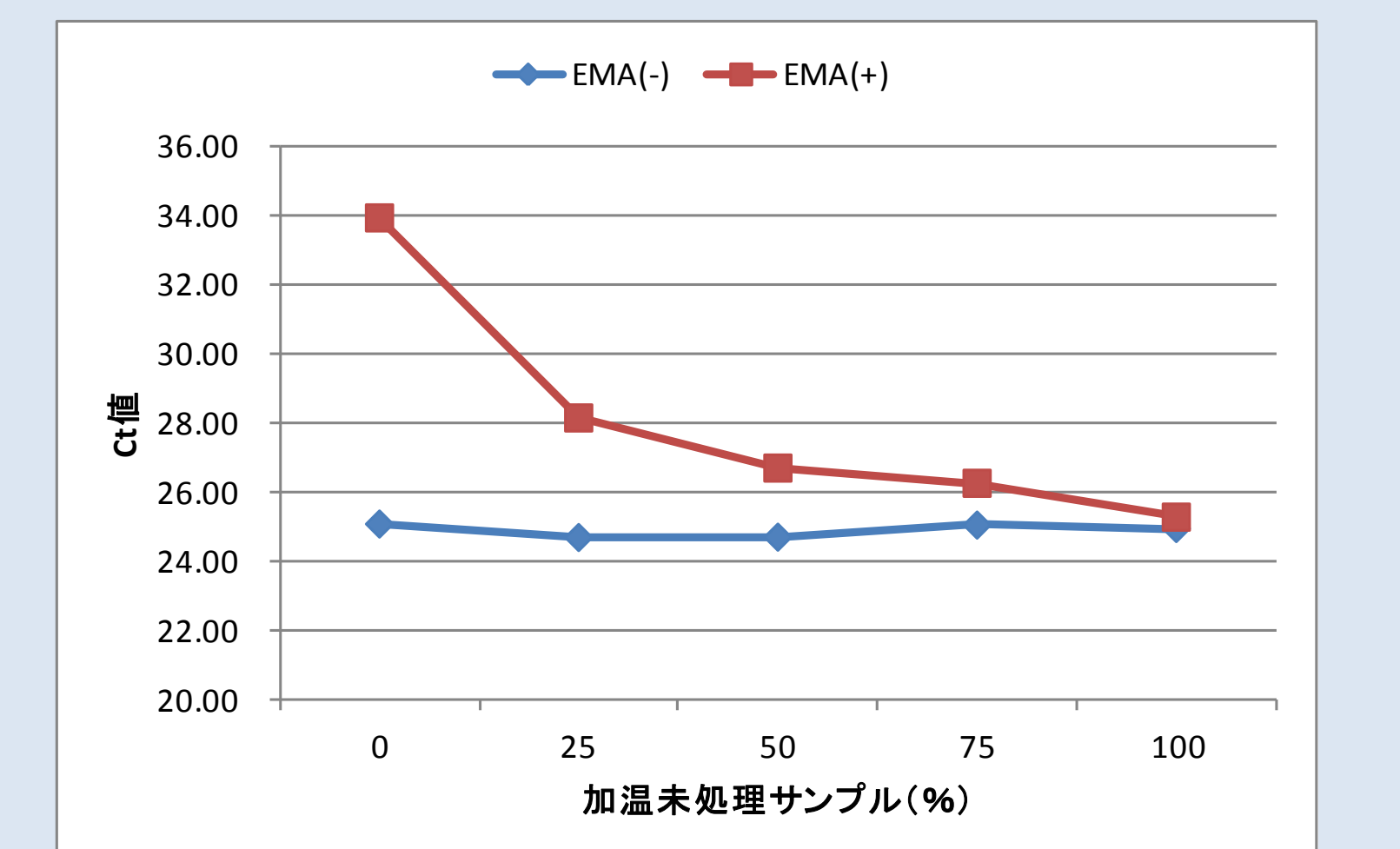


図12. EMA-qPCR結果

EMA-qPCRでの検出結果は培養結果と相関があり、生菌由来DNAを菌数依存的に検出できることが確認できた。

## 結論および考察

今回の検討より、グラム陽性菌におけるEMA-qPCR法の適用は十分可能であることが確認された。また、系構築の過程において、温度感受性の高い菌種が観察されたことより、EMA処理における温度管理の必要性が示唆された。

これまでの評価により様々な検体由来成分の持ち込みによる影響が明らかになったが、ある程度の菌数がある場合、検体の希釈やEMA処理条件の至適化によりEMA-qPCR法の適用が可能であることが確認できた。一方、菌数が少ない検体については検出感度の向上において増菌培養との組み合わせが有効であることも確認できている<sup>1)</sup>。今後、各種食材や糞便検体等についてもこれらの工夫により適用拡大が期待される。

[参考文献]

1) 田畑ら: 第33回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, p.53(2012)