

**研究ノート****3M™病原菌自動検出システム 改良サルモネラ検出キット MDA2 SALの評価**川崎 晋\*<sup>1</sup>, 齋藤美枝<sup>1</sup>, Fia Noviyanti<sup>2</sup>, 原田 武尚<sup>3</sup>, 斉藤 匠子<sup>4</sup>, 守山 隆敏<sup>4</sup>

<sup>1</sup>国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門  
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12)

<sup>2</sup>筑波大学 〒305-8571 茨城県つくば市天王台1-1-1),

<sup>3</sup>マルハニチロ株式会社 〒300-4925 茨城県つくば市和台16-2),

<sup>4</sup>スリーエムヘルスケア株式会社 〒158-8583 東京都世田谷区2丁目平和台16-2)

**Evaluation of 3M™ Molecular Detection System MDA2 SAL for the detection of *Salmonella* from food samples**Susumu Kawasaki\*<sup>1</sup>, Mie Saito<sup>1</sup>, Fia Noviyanti<sup>2</sup>, Takehisa Harada<sup>3</sup>,  
Shoko Saito<sup>4</sup>, and Takatoshi Moriyama<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,  
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642)

<sup>2</sup> Tsukuba University, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8571)

<sup>3</sup> Maruha Nichiro Corporations, 16-2 Wadai, Tsukuba, Ibaraki 300-4295, Japan)

<sup>4</sup> 3M Health Care Limited, 33-1, Tamagawadai 2-chome Setagaya-ku, Tokyo 158-8583)

**Abstract**

“Molecular detection Assay2 (MDA2) SAL”, the isothermal amplification with bioluminescent assay has recently been available as modified version of previous *Salmonella* detection kit (MDA1). The performance of MDA2 SAL was compared to MDA1, traditional PCR, and conventional culture (NIHSJ-01-ST4) assay. The MDA2 assay was 100% specific among 13 strains (6 *Salmonella* and 7 non-*Salmonella*). The detection limits were 10<sup>3</sup> to 10<sup>4</sup> CFU per mL in spiked food homogenate samples without enrichment step. The excellent agreement was obtained for the results of MDA2 SAL kit and conventional culture method from artificially contaminated food samples (10<sup>0</sup>-10<sup>1</sup> CFU/25g) with enrichment step. These results suggest that the MDS assay is a reliable and useful method for rapid screening of *Salmonella* contamination.

Key words: 3M Molecular detection system, *Salmonella*, rapid detection, foodborne pathogens

---

\* 連絡先 (Corresponding author), skawasa@affrc.go.jp

サルモネラは腸内細菌科の一菌属で急性胃腸炎を引き起こす食中毒起因菌として知られている。サルモネラ症の予防は世界共通の重要課題で、食品生産者はHACCPの原則に準拠して、生産、加工、流通の全ての過程において食品へのサルモネラの汚染および増殖防止の努力が求められる。サルモネラは家畜・鶏などの畜肉由来の食中毒菌であり、これらを食品工場に取り扱う限り、交差汚染などによる危険性が排除できず、食品製造現場の衛生管理の徹底が求められる<sup>1)</sup>。例えば2011年2月には、北海道巖美沢市の共同調理所で作った学校給食により約1500名以上の集団食中毒が発生した。原因菌と考えられる*S. Enteritidis*がブロッコリーサラダ、回転釜、入院患者糞便から分離されており、前日および前々日に加工調理された豚肉および鶏肉が持ち込みの原因ではないかと指摘された<sup>2)</sup>。このように食品製造環境の汚染によるサルモネラ食中毒は後を絶たない。

それゆえ、食品製造現場での食中毒菌モニタリング手法が求められている。さらに近年、厚生労働省からHACCPの義務化の方針が示され<sup>3)</sup>、Codex HACCPを推進する意味でも製造環境モニタリングの普及は重要な課題と考えられている。しかしながら、サルモネラを含む食中毒菌の検査を従来の培養法による検出では確定までに4～7日の時間が必要で<sup>4)</sup>、そのために必要な人材の育成と人件費、さらには検査室の整備までを鑑みると、一般の食品工場において自主衛生管理法として培養法を導入するのは極めて難しいのが現状である。このような背景から多数の迅速検査法が開発・販売されてきた。その中で近年、等温遺伝子増幅法と発光検出法を組み合わせた遺伝子検査システム(3M Molecular Detection System, 以下MDS)が開発され、我々はその検出原理および使用時における具体的な優位点について報告した<sup>5)</sup>。特に、遺伝子抽出作業工程に複雑な操作を必要としないことは本検出システムの大きな利点の一つであった。本試薬キット(Molecular Detection Assay kit; 以下MDA1)による検出では、前培養液を担体樹脂入りの溶液に加え、煮沸と急冷により核酸抽出し、それを直接遺伝子増幅試薬に加えることで行われ、*Listeria monocytogenes*での検出においてもその検出感度は極めて高かったことを報告した。

しかし、その後の研究にてMDA1による抽出法では食材や前培養条件によっては遺伝子増幅反応に影響を与えることがあり、再現性のないものの偽陽性の結果を与える可能性を報告されることから抽出法の改良が検討されることとなった。このような背景から、改良

型キットとして、キレート化技術を応用した不純物沈殿法と煮沸法を組み合わせた抽出方式に変更した「Molecular Detection Assay 2」キット(以降MDA2)が開発された。MDA2における検出については、2016年に牛挽肉やピーナツバターなどについての評価試験結果が報告されており<sup>6)</sup>、FDA/BAM法とMDA2による検出結果の相関は極めて高いことが報告されている。しかしながら、ここでの報告は加工食品までは議論されておらず、それらへの適応の可能性については明らかではない。

さらに、MDA2による抽出法は、粗抽出のまま核酸抽出液が遺伝子増幅反応系に持ち込まれるため、核酸抽出効率、食材由来の混合物による遺伝子増幅阻害、発光検出系の阻害については明らかにされていない。本研究では、実際の食材系における検出感度の検証を目的として、MDA2、MDA1法、通知法、PCR法、での検出感度比較および食材を用いた評価試験を行った。

## 実験材料および方法

### 1. 供試菌および供試食材と接種菌数の確認

供試菌はサルモネラ株として、*S. Typhimurium* (O4: FSD287), *S. Thompson* (O7: FSD59), *S. Enteritidis* (O9: FSD309), *S. Senftenberg* (O1,3,19: FSD280), *S. Newport* (O8: FSD191), *S. Weltevredene* (O3,10: FSD294)の6株を用いた。また非サルモネラ株として、*Citrobacter diversus* (FSD537), *C. freundii* (FSD542), *Escherichia coli* (FSD722), *Enterobacter cloacae* (FSD577), *Cronobacter sakazakii* (FSD589), *Pseudomonas aeruginosa* (NBRC13275), *Proteus vulgaris* (NBRC3988)の7株を用いた。これらはTrypticase Soy Broth (TSB, Difco)にて35℃、24時間培養後、実験に供した。これらの培養液は滅菌リン酸緩衝溶液にて適宜10倍段階で希釈し、これらの段階希釈した培養液を以降の実験に供した。同時に菌数を計測するため、これらの段階希釈した培養液100μLをTrypticase Soy Agar (TSA; Difco)平板(以下、TSA)に塗抹し培養した。35±1℃24時間培養後に発育集落数を計測し、各々の接種菌量を算出した。

供試食材は、共同研究者(マルハニチロ株式会社)が販売する水産品・農産品・畜肉を使用した加工食品から計6検体(ゆでがに、たらこ、ボイル枝豆、炒飯、油淋鶏、ハンバーグ)を選択し、これらを以降の実験に用いた。

## 2. 培養液および供試食材を含む培養液からのサルモネラ検出限界確認試験

MDA2およびMDA1による各種サルモネラの検出感度を求めるために、各種菌体および供試検体を含む培養液中にサルモネラを接種し、これらからの回収試験を行った。培養液のみからの場合では、その濃度を $10^2 \sim 10^5$  CFU/mLとなるよう調製し、これらをMDA2もしくはMDA1各々に付属する核酸抽出ならびに遺伝子検出プロトコールに供した。

供試食材については、各食材25 gに225 mLのBuffered peptone water (BPW; ISO 6579) を加えストマッカー (Pro-media SH II M; ELMEX) にてホモジナイズしたものを各9 mLずつ分注し、これに濃度調整した培養液を1 mL加え、終濃度を $10^2 \sim 10^5$  CFU/mLとなるよう調整した。これらを試料検体としてMDA2もしくはMDA1による核酸抽出ならびに遺伝子検出プロトコールに供した。

## 3. 特異性試験

MDA2, MDA1両キットの特異性 (特定菌についての程度正確に判定可能か) について試験するため、サルモネラ株では培養液を $10^4$  CFU/mLとなるよう、非サルモネラ菌株では $10^7$  CFU/mLとなるよう調整し、これらの培養液各20  $\mu$ LをMDA2もしくはMDA1による核酸抽出ならびに遺伝子検出プロトコールに供し、各キットの特異性を確認した。

## 4. 前培養工程を含めた検出感度試験

前培養工程を含めて検出感度を確認するために、供試食材に適宜10倍希釈した各サルモネラ培養液を接種し、25 g当たり $10^0$  CFU ( $1 \sim 9$  CFU) となるよう接種された検体を各々調整した。これを前培養に供した後、その前培養液から検出可能であるかを調べた。前培養はサルモネラ属菌の通知法NIHSJ-01-ST4<sup>7)</sup> に則り前培養を行い、その培養液20  $\mu$ LをMDA2もしくはMDA1法による核酸抽出ならびに遺伝子検出プロトコールに供した。

同時に、通常のPCRによる検出結果と比較するため、これらの前培養液1 mLを他キットの核酸抽出法およびPCRに供して遺伝子検出を行った。核酸抽出およびPCRによるサルモネラの検出は、食中毒菌多重検出システム “[TA10] Pathogenic Bacterial Multiplex PCR Detection System” のDNA抽出キットDNA Extraction Kit TA10 (プリマハム(株))、およびMultiplex PCRキットPathogenic Bacterial Multiplex PCR Detection Kit TA10

(Takara) のキットを用いて行った<sup>8)</sup>。DNA抽出プロトコールおよびPCR反応条件は付属のマニュアルに従って行った。PCR反応後の増幅産物の確認はアガロースゲルを用いた電気泳動法により行った。PCR後の反応溶液10  $\mu$ Lを2.5%アガロースゲル (Sigma) で分離し、エチジウムブロマイドによる染色の後、UVトランスイルミネーター上で観察し、その結果375-bpの増幅産物が確認された場合、陽性と判断した。

さらに、前培養液から通常の培養法による検出をサルモネラ属菌の通知法NIHSJ-01-ST4に則って行い、その検出結果と比較した。

## 5. MDA2およびMDA1による核酸抽出法および遺伝子増幅反応による検出

MDSによる核酸抽出ならびに遺伝子増幅反応検出は3M Molecular Detection Assay2 SAL (3M) と発光自動検出器付き等温遺伝子増幅機3M Molecular Detection Instrument (3M) を用いて行った。培養液20  $\mu$ LをMDA2付属の抽出キットの3M Lysis tube (以下、Lysis tube) に加えた。これをヒートブロックで100°C 15分間加熱後、直ちに室温で10分間冷却した。この上澄み20  $\mu$ Lを固化化した遺伝子増幅試薬入りの反応管に移し、ピペティングにより混和させた後、3M Molecular Detection Instrumentにより等温遺伝子増幅させた。また、測定毎に、付属の陽性/陰性コントロール試薬を用いて反応の確認を行った。等温遺伝子増幅中は、遺伝子増幅管の発光強度の変化を常時モニタリングした。60分間の反応後、サルモネラの有無の判定を、発光増加の有無と付属ソフトウェアにより自動判別した。一方、MDA1法による検出ではMDA1付属の抽出キットならびに遺伝子増幅方法は前報に従い、75分間の増幅反応後に同様に発光増加の有無により検出結果を自動判別した。

## 実験結果および考察

各サルモネラにおいて、その培養液もしくは供試食材を含む培養液からの検出感度を表1に示した。検出感度を求めたところ、MDA1, MDA2ともに $10^3 \sim 10^4$  CFU/mL程度が検出感度として得られ、前キットと比較して同等の感度が得られた。MDA2とMDA1両者を比較したところ、MDA2がMDA1よりも検出感度が高く得られたのは9ケース、逆にMDA1が高く得られたのは5ケースあり、検出感度の明確な上昇が認められるとは言えなかった。それゆえ、MDA2においても

表1. 各サルモネラ菌液および供試食材を含む菌液からの検出限界確認試験結果.

Strain	serotype	菌液のみ (Log CFU/mL)		ユーリンチー		炒飯		枝豆		ハンバーグ		ゆでがに		たらこ	
		MDA1	MDA2	MDA1	MDA2	MDA1	MDA2	MDA1	MDA2	MDA1	MDA2	MDA1	MDA2	MDA1	MDA2
<i>S. Thompson</i>	O4	4.0	3.0	4.0	4.0	4.0	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	5.0	5.0
<i>S. Senftenberg</i>	O7	4.4	3.4	4.4	3.4	3.4	3.4	4.4	4.4	3.4	3.4	4.4	4.4	4.4	3.4
<i>S. Typhimurium</i>	O9	2.9	3.9	2.9	2.9	3.9	1.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	2.9	4.9	3.9
<i>S. Enteritidis</i>	O1,13,19	4.2	4.2	3.2	3.2	3.2	4.2	3.2	3.2	3.2	3.2	4.2	4.2	3.2	4.2
<i>S. Newport</i>	O8	3.2	3.2	4.2	4.2	3.2	4.2	3.2	3.2	4.2	3.2	3.2	4.2	4.2	4.2
<i>S. Weltevreden</i>	O3,10	3.8	3.8	4.8	3.8	3.8	4.8	3.8	2.8	2.8	3.8	3.8	3.8	4.8	4.8

数値は1 mL当たりの菌数 (log/mL) を示す.

表2. MDA2, MDA1キットによる特異性試験結果

Strain		MDA1	MDA2
<i>Salmonella</i>	<i>Typhimurium</i>	+	+
	<i>Thompson</i>	+	+
	<i>Enteritidis</i>	+	+
	<i>Senftenberg</i>	+	+
	<i>Newport</i>	+	+
	<i>Weltevreden</i>	+	+
<i>Citrobacter</i>	<i>diversus</i>	-	-
	<i>freundii</i>	-	-
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	-	-
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	-	-
<i>Cronobacter</i>	<i>sakazakii</i>	-	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	-	-
<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>	-	-

表3. 供試食材に*S. Typhimurium*を $10^0$ CFU/25g接種した検体からの各手法による検出結果

	MDA1	MDA2	PCR	培養法
ユーリンチー	+	+	+	+
炒飯	+	+	+	+
枝豆	+	+	+	+
ハンバーグ	+	+	+	+
ゆでがに	+	+	+	+

MDA1と同様に十分な前培養工程が必要であると考えられた. 一般にBPWなどの増菌培地によるサルモネラの前培養工程では, 24時間の培養で $10^6$  CFU/mL以上の濃度まで十分に達すると考えられることから, 検出感度は $10^5$  CFU/mLを保持できればサルモネラの迅速スクリーニング検査に十分活用可能と考えられた. さらに検出感度の理論値を核酸抽出工程を含めて算出すると, 核酸抽出工程では菌液 $20 \mu\text{L}$ が $680 \mu\text{L}$ の抽出試薬にて抽出され, 遺伝子反応工程では抽出液 $20 \mu\text{L}$ を遺伝子反応管に直接供されることから, MDA2, MDA1ともにおよそ $1.8 \times 10^3$  CFU/mL (Log 3.3 CFU/mL) と

計算された. 表1の検出感度の結果もこの濃度近くの値を示しており, 検出感度はほぼ理論値通りに実験結果として得られたと考えられた.

MDA2, MDA1キットの特異性試験の結果を表2に示した. 今回の試験では, 特異性試験のために, 食中毒報告の多くのケースを占めるサルモネラO抗原のO4群, O7群, O9群, O1, 3, 19群, O8群, O3, 10群を選択し, その中から代表的な菌株を用いて実験に供した. また, 類似菌株である*Citrobacter*等を中心に選定し, 実験を行った. 両キットともにサルモネラおよびその他の菌株について, 偽陽性および偽陰性は認められず, 特異性についての問題は認めなかった.

最後に, 実際の食品での汚染を想定して, 供試食材への接種試験を行った. BPW培養液からのMDA2, MDA1による検出結果は陽性となり, この結果は従来のPCR法による結果とも一致した (表3). 従って本法は従来の遺伝子検査手法として同等の感度を保持しており, 今回供試した食材においては影響を受けなかった. また, 通知法に準じた培養法の結果とも一致することからも, 本法の食中毒菌スクリーニングへの有用性を示唆した.

MDA2法では, 核酸抽出ステップがMDA1法より省力化されたプロトコールとなった. 前キットのMDA1法では, 抽出中に転倒混和や担体樹脂の完全な沈殿を確認する等の工程が必要であったが, MDA2法では単純に前培養液 $20 \mu\text{L}$ を付属の溶菌試薬に加え, 静置のまま加熱させ放冷した後, その上澄み $20 \mu\text{L}$ を直接遺伝子増幅反応管に加えることで終了する簡易な抽出ステップでありながら検出感度を保持していた. MDA2法では夾雑物質の沈殿に担体樹脂との共沈作用ではなく, キレート剤による夾雑物質の沈殿作用で阻害物質の除去を行っている. 特に金属イオンは遺伝子増幅反応に影響を与えることが想定され, 供試食材または前培養培地によってはMDA2による抽出プロトコールに

変更することで検出感度に改善が認められるかもしれない。しかしながら本検討では、そのような具体的食材のケースを認めるまでには至らなかった。

以上、MDA2法では改善された核酸抽出法と等温遺伝子増幅反応により、ルーチン検査におけるサルモネラの迅速スクリーニング法として有効であると考えられた。

### 参考文献

- 1) 食中毒予防必携 第2版, 社団法人 日本食品衛生協会 73-79. (2007).
- 2) 佐藤俊哉, 中嶋由美子, 坂下路絵. 2011年北海道で発生したサルモネラ食中毒と2次感染事例. 環境感染誌. **27**, 20-24 (2011).
- 3) 食安発1014第1号: 食品事業者が実施すべき管理運営基準に関する指針(ガイドライン)の改正について. 厚生労働省. 平成26年10月14日.
- 4) FDA: Bacteriological Analytical Manual, Capture 5 (2003).
- 5) 川崎晋, 持田麻里, 齋藤美枝, 守山隆敏. 3MTM Molecular Detection Systemを用いた*Listeria monocytogenes*の簡易迅速遺伝子検査法の評価. 食総研報. **80**, 9-15. (2016).
- 6) Bird, P., Flannery, J., Crowley, E., Agin, J. R., Goins, D., and Monteroso, L., Evaluation of 3MTM Molecular Detection Assay (MDA)2-*Salmonella* for the detection of *Salmonella* spp. in select foods and environmental surfaces: Collaborative study, First action 2016.01. *J. AOAC Int.* **99**, 980-997. (2016).
- 7) 食品からの微生物標準試験法検討委員会(国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部) <http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/protocol.html> (2016.11.1 接続確認)
- 8) Kawasaki, S., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S., Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. *J. Food Prot.* **68**, 551-556. (2005).

### 要約

等温遺伝子増幅法によるサルモネラ検出キット3M Molecular detection Assay SAL (MDA1 SAL) の改良キットMDA2 SALが開発された。6種類のサルモネラを様々な加工食品に接種した検体を用いて、MDA2, MDA1, 通常のPCR, 培養法による検出結果を比較した。MDA2による検出感度は $10^3 \sim 10^4$ CFU/mLと得られ、MDA1と比較して検出感度は同等であった。また、試験した菌株について偽陽性・偽陰性の結果は示さなかった。MDA2, MDA1法およびサルモネラ通知法NIHSJ-01-ST4, 通常のPCRにより検出した方法いずれも、供試食材中における検出結果は一致した。MDA2法は食品中のサルモネラ汚染の迅速スクリーニング法として有用であると考えられた。