

電流検出型DNAチップを用いた食中毒原因菌の簡易自動遺伝子検査技術

Automatic Abbreviated DNA Detection Technology for Food-Borne Pathogen Testing Using Electrochemical DNA Chips

稻田 美雅

高橋 匡慶

小嶋 由香

湯澤 栄子

■INADA Mika

■TAKAHASHI Masayoshi

■KOJIMA Yuka

■YUZAWA Eiko

食中毒原因菌の検査では、時間と手間のかかる培養法が現在も主流であるが、食の安全・安心に対する意識の高まりから、検査の迅速化と効率化を可能にする新しい技術が求められている。

東芝は、独自の電流検出型DNA（デオキシリボ核酸）チップ技術をベースに、煩雑な遺伝子検査の工程を自動化した、簡易自動遺伝子検査技術“DNAチップカード”を開発した。この技術を食中毒の検査に応用することで、主要な15種類の原因菌を、迅速かつ簡便に検出できることを実証した。この技術は、食中毒の早期原因究明や感染拡大の防止に役立つだけでなく、食品や医薬・化粧品製造などの衛生管理に応用することで、安全性の高いものづくりへの貢献も期待される。

The mainstream method for food-borne pathogen testing still requires the complicated and time-consuming process of pathogen cultivation. Demand has therefore been growing for new technologies that can detect food-borne pathogens rapidly and efficiently in line with the greater emphasis on food safety and security in recent years.

As a solution to this issue, Toshiba has developed an automatic abbreviated deoxyribonucleic acid (DNA) detection technology for food-borne pathogen testing called the DNA chip card, using electrochemical DNA chips to improve the complicated process of genetic testing. We have conducted verification tests using DNA chip cards and confirmed that 15 major types of food-borne pathogens can be detected rapidly and efficiently by this system. This technology is contributing not only to prompt investigations into the causes of food-borne illnesses and prevention of the further spread of infection, but also to safe and secure manufacturing through application to hygiene management in the food, pharmaceuticals, and cosmetics fields.

1 まえがき

近年、分子生物学の発展に伴い、多くの感染性細菌の検査に遺伝子検査が導入され、迅速な検査の主流になりつつある。一方、食中毒や食品衛生の細菌検査では、現在も食品衛

生法による検査方法（公定法）である培養法が主流であり、図1に示すように、菌分離、生化学検査、及び確定検査という煩雑な工程を経るため、原因菌の確定までに最大1週間を要している。最近、培養法に代わる技術も多数報告されているが^{(1), (2)}、感度、検査時間、及び操作性（自動化、多項目検査）

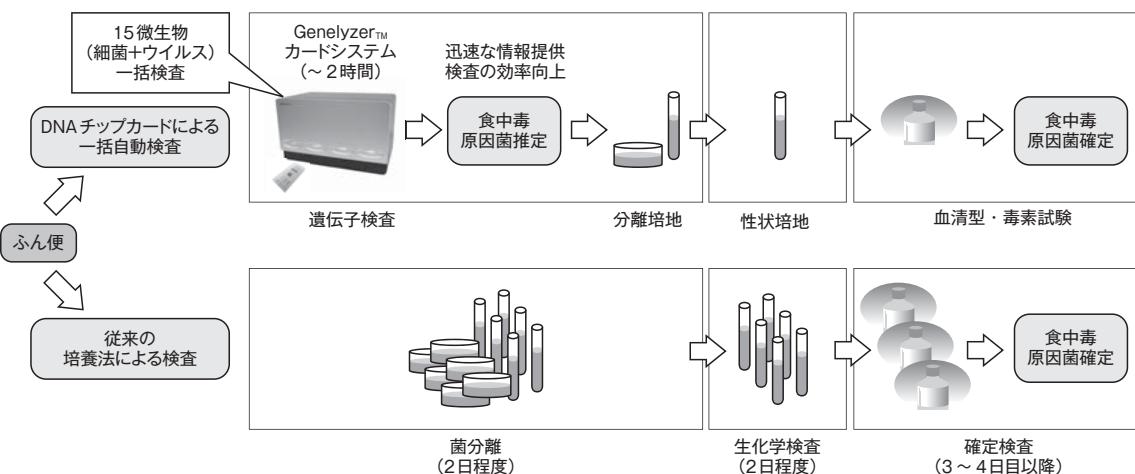


図1. 食中毒原因菌一括簡易自動検査システムの運用イメージ—従来の培養法では食中毒原因菌の検査が最大で1週間かかっていたが、この技術を用いると核酸抽出を含め2時間以内に推定できるようになり、迅速な情報提供や検査の効率化などに貢献できる。

Overview of food-borne pathogen detection system using DNA chip cards

の全ての要求を満足するものではなく、新しい技術が切望されている。

東芝は、新しい遺伝子検査技術として独自の電流検出型DNA（デオキシリボ酸）チップを開発し、これまでにヒトパピローマウイルスの型判別用DNAチップ⁽³⁾、実験動物の微生物モニタリング用DNAチップ⁽⁴⁾、及びモバイル型生物剤検知システム⁽⁵⁾を製品化している。今回、高感度で短時間に検出するという特長を維持しながら、更に検査の操作性を向上させるとともに、検査項目の拡大も可能にした新たな簡易自動遺伝子検査技術として“DNAチップカード”を開発した（図1）。また最初のアプリケーションとして、川崎市健康安全研究所と共同で、複数の食中毒原因菌を迅速かつ簡便に検査するためのDNAチップカードを開発した。

ここでは、DNAチップカードの概要と、15種類の食中毒原因菌（25遺伝子）を一括検査できる食中毒原因菌検査用DNAチップカードの特性評価について述べる。

2 DNAチップカードの概要

2.1 遺伝子検査の課題

遺伝子の検出には大きく分けて、①サンプルからの核酸（DNAとRNA（リボ核酸））抽出、②遺伝子の増幅、③増幅した遺伝子の検出、の3工程が必要になる。今回開発した複数の遺伝子を検出する場合、増幅反応に用いるプライマなどの試薬組成が遺伝子ごとに異なるため、従来はそれぞれ別々の場所で反応を行うか、混合したとしても数種類が限界であった。そのため検査対象の遺伝子が多くなると、複数の反応容器が必要で、サンプルの注入回数が増えるなど操作が煩雑になるという課題があった。

2.2 DNAチップカードの特長

新たに開発したDNAチップカード内では遺伝子の増幅と検出を行なうが、その最大の特長は、増幅反応と検出反応を微細な流路内で行なう点にある（図2）。今回、流路内の異なる位置にプライマなどの試薬を保持することで、連続する流路内で異なる遺伝子の増幅を可能にした⁽⁵⁾。密閉可能なカード内には検査に必要な試薬を全て内蔵しているので、検出対象遺伝子が多くなっても、ユーザーは1枚のDNAチップカードに抽出した核酸を1回注入するだけで済む。操作は非常に簡単であり、遺伝子増幅産物の拡散によるコンタミネーションを防ぐことができるため、信頼性の高い検査が可能である。また、微細な流路を用いることで、高コストのプライマや酵素の量を少なくすることができるため、検査を低成本化できるメリットもある。

遺伝子の増幅反応と検出反応には、従来製品と同様にLAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法⁽⁶⁾と電流検出型DNAチップを採用しているので、高感度で迅速な検査が可能である。当社が開発したDNA自動検査装置Genelyzer™と組み合わせることで、DNAチップカードを装置にセット後90分以内に自動で判定結果が得られる。

3 食中毒原因菌検査用DNAチップカード

食中毒の原因となる細菌やウイルスは多数報告されているが⁽⁷⁾、その中から表1に示すような発生頻度の高い主要な15微生物（25遺伝子）を選択し、それらを一括して検査できるDNAチップカードを開発した。従来の食中毒原因菌の検査では、細菌は培養法を、ウイルスは免疫あるいは分子生物学的手法を用いるため、別々に検査する必要があったが、DNAチップカードでは、1枚で細菌とウイルスを同時に検出可能である。

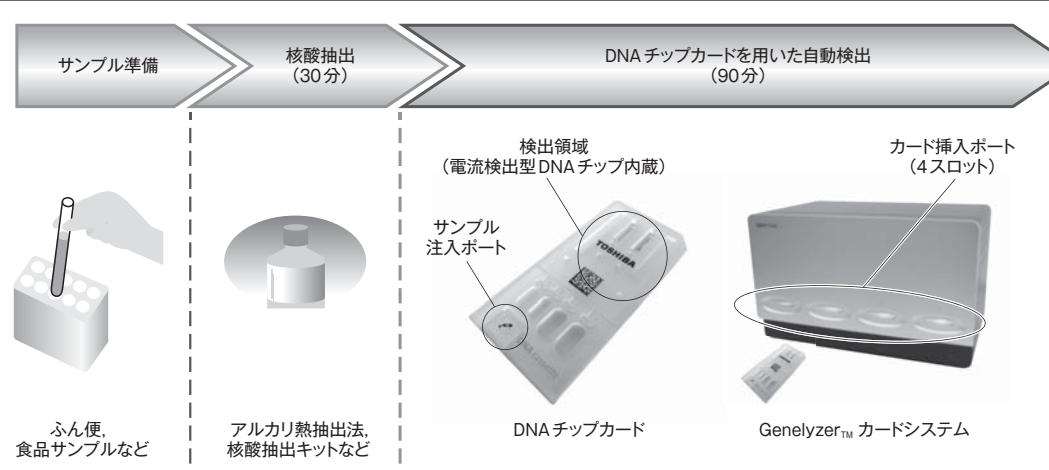


図2. 食中毒原因菌自動検査システムと検査フロー——ふん便や食品などのサンプルから核酸を抽出し、DNAチップカードにセットすれば、90分以内に自動で検査結果が出力される。

Flow of automatic food-borne pathogen detection

表1. 対象微生物と対象遺伝子

Targeted food-borne pathogens and genes

対象微生物	対象遺伝子
ノロウイルスGI	ORF1, 2junction
ノロウイルスGII	ORF1, 2junction
腸管出血性大腸菌 (EHEC)	stx1, stx2
腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)	elt (LT), est (STh, STp)
腸管凝集接着性大腸菌 (EAEC)	aggR
腸管病原性大腸菌 (EPEC)	eae
サルモネラ	invA
カンピロバクター (<i>C.jejuni</i>)	Oxidoreductase gene
カンピロバクター (<i>C.coli</i>)	gufA
腸炎ビブリオ	tth
赤痢菌 (A～D群)	invE, ipaH
黄色ブドウ球菌	seA, seB, nuc
ウエルシュ	cpe
セレウス	16S rDNA, ces
エルシニア (<i>Y.enterocolitica</i>)	yadA
エルシニア (<i>Y.pseudotuberculosis</i>)	yadA
リストリア	hly
コレラ	ctx

3.1 ふん便サンプルによる特性評価

地方衛生研究所や保健所などの行政機関が行う食中毒原因菌検査の場合、サンプルは主にふん便やおう吐物が対象となる。今回はふん便を用いてDNAチップカードの特性を評価した。ふん便からの核酸抽出であるが、細菌の場合はふん便を拭った綿棒でペプトン水に懸濁し、そこから市販の核酸抽出

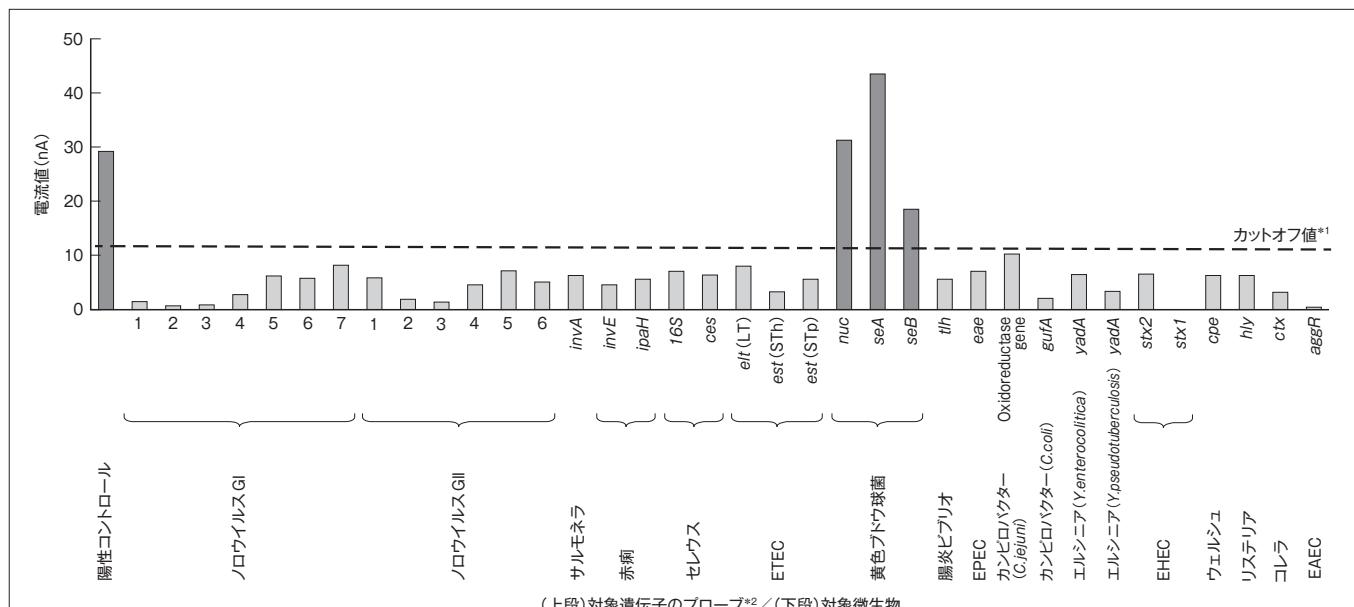
表2. DNAチップカード検査結果のまとめ

Results of experiments on food-borne pathogen detection from stools

検体	従来法の結果		DNAチップカードの結果
	培養法	リアルタイムPCR	
実検体	腸管病原性大腸菌	-	腸管病原性大腸菌
	腸管出血性大腸菌	-	腸管出血性大腸菌
	-	ノロウイルスGI	ノロウイルスGI
	-	ノロウイルスGII	ノロウイルスGII
ふん便	陰性	-	陰性
	カンピロバクター (<i>C.jejuni</i>)	-	カンピロバクター (<i>C.jejuni</i>)
	カンピロバクター (<i>C.coli</i>)	-	カンピロバクター (<i>C.coli</i>)
	腸炎ビブリオ	-	腸炎ビブリオ
	黄色ブドウ球菌	-	黄色ブドウ球菌
	セレウス	-	セレウス
	サルモネラ	-	サルモネラ

キットあるいはアルカリ熱抽出法を用いて行った。ノロウイルスの場合は、ふん便をリン酸緩衝液で溶解後、遠心分離で上澄みを採取し、市販の核酸抽出キットを用いて抽出を行った。

食中毒原因菌検査の一例を、図3に示す。黄色ブドウ球菌の検出結果を黄色ブドウ球菌の検出対象遺伝子であるnuc(耐熱性核酸分解酵素), seA(エンテロトキシンA), seB(エンテロトキシンB)の3種類全てで有意な電流信号が検出されている。他の食中毒原因菌の検査結果を表2にまとめた。全ての検体において、培養法若しくはリアルタイムPCR (Polymerase Chain Reaction : ポリメラーゼ連鎖反応) 法を用いた



*1: カットオフ値より上は陽性と、下は陰性と判定する

*2: 目的の塩基配列を持ったDNAを検出するために用いる一本鎖DNA

図3. DNAチップカードによる黄色ブドウ球菌の検出結果例 — 食中毒原因菌用DNAチップカードで黄色ブドウ球菌を検出した結果、黄色ブドウ球菌由來の遺伝子だけで優位な電流信号が得られた。

Example of result of *Staphylococcus aureus* detection using DNA chip cards

結果と一致しており、DNAチップカードの特異性を検証することができた。

今回ふん便からの核酸抽出に用いたアルカリ熱抽出法は、ウイルスには対応できないものの、操作が簡単で時間も30分程度で抽出できる。ふん便中の細菌を対象にした検査であれば、アルカリ熱抽出法とDNAチップカードの組合せで、2時間以内の食中毒原因菌推定が実現可能である。

3.2 食品検査への適用評価

食品検査への適応を検討するために、加熱総菜中の食中毒原因菌の検出について評価を行った。食品検査では、存在する食中毒原因菌が非常に微量であることや、生菌だけを検出する必要があることなどから、現在の培養検査では検査前に増菌が行われる。そこで、加熱総菜にサルモネラ菌を添加し、18時間増菌した培養液を擬似陽性検体としてDNAチップカードにより検出した。

その結果、サルモネラ菌の*invA*（細胞侵入性因子）遺伝子が検出され、食品中のサルモネラ菌を特異的に検出できることが示された。食品は生鮮品や加工品など様々なサンプルが対象であり、また増菌も菌によって培養の条件が異なることから、食品検査では今後サンプル前処理工程の検討が重要となる。

4 あとがき

当社は、電流検出型DNAチップを用いて遺伝子の簡易自動遺伝子検査技術であるDNAチップカードを開発した。また川崎市健康安全研究所と共同で15種類の食中毒原因菌（25遺伝子）を、90分以内に同時に自動で検査可能であることを実証した。従来最大で1週間かかっていた食中毒原因菌の検査時間を、DNAチップカードを用いることで短縮し、食中毒拡大防止のための迅速な情報提供に貢献できると思われる。また、公定法である培養法と併用した場合でも、迅速に原因菌を絞り込めるので、検査の効率化や、検査・試薬保管スペースの最小化、食中毒菌汚染リスクの低減などにも有用と思われる。

遺伝子検査はこれまで高い専門性が必要とされていたが、DNAチップカードでは必要な操作が核酸サンプルの注入だけであり、誰にでも簡単に検査が可能である。また、対象が複数であっても一括で検査できるので、迅速なスクリーニング検査に強みを発揮できる。今後は、食中毒検査や食品衛生検査などの食の安全・安心だけにとどまらず、化粧品や医薬品など製品の品質管理に応用し、安全性の高いものづくりに貢献していく。

文 献

- (1) 福島 博 他. リアルタイムPCR法による食中毒菌の迅速スクリーニングの検討. 感染症学雑誌. **79**, 9, 2005, p.644 - 655.
- (2) 重本直樹 他. 蛍光RT-multiplex PCR法を用いた食中毒起因微生物の包括的検出. 日本食品微生物学会雑誌. **29**, 1, 2012, p.11 - 17.
- (3) Satoh, T. et al. Rapid genotyping of carcinogenic human papillomavirus by loop-mediated isothermal amplification using a new automated DNA test (Clinichip HPVTM). Journal of Virological Methods. **188**, 1-2, 2013, p.83 - 93.
- (4) Nakamura, N. et al. Development of multisample detection system using a tag insertion primer and an electrochemical DNA chip. Analytical Biochemistry. **419**, 2, 2011, p.190 - 195.
- (5) Okada, J. et al. Mobile Automatic Detection System for *Bacillus anthracis* using Electrochemical DNA Chip. Journal of Biosensors and Bioelectronics. **3**, 126, 2012, 12, doi:10.4172/2155-6210.1000126.
- (6) Notomi, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research. **28**, 12, 2000, e63.
- (7) 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針 微生物編2004. 日本食品衛生協会. 2004, 736p.



稲田 美雅 INADA Mika

部品材料事業統括部 DNAチップ事業推進統括部。
DNAチップのコンテンツ開発に従事。日本食品微生物学会
会員。
DNA Chip Business Promotion Div.



高橋 匠慶 TAKAHASHI Masayoshi

部品材料事業統括部 DNAチップ事業推進統括部グループ長。
DNAチップ事業の企画及び営業業務に従事。日本感染症
学会、日本食品微生物学会会員。
DNA Chip Business Promotion Div.



小嶋 由香 KOJIMA Yuka

川崎市健康安全研究所 担当係長。
食中毒・食品細菌検査に従事。
Kawasaki City Institute for Public Health



湯澤 栄子 YUZAWA Eiko

川崎市健康安全研究所 主任。
食中毒・食品細菌検査に従事。
Kawasaki City Institute for Public Health