

<平成 22 年度助成>

食の安全安心のためのオンサイト診断技術の開発

山中 啓一郎・民谷 栄一

(大阪大学大学院工学研究科)

1. 緒 言

今日、わが国における食生活は、その多くを輸入に頼っていることや調理済み食材が広く利用されていることなどにより生産、流通、消費のそれぞれの段階で食品を取り巻く環境は以前より複雑化してきている。このような複雑化する食環境の中で、食品の安全性を事前に評価、管理し消費者へ提示することは食に対する安心を確保することにつながり、またそれはわが国だけでなく国際的なニーズでもある。

食品の衛生的な安全性を評価する指標の一つとして、大腸菌群の検査が行なわれている。大腸菌はヒトや動物の糞便や下水に多く存在するだけでなく、自然界にも広く分布しているため、生産、流通段階での衛生管理を評価するために利用されている。現在では、この大腸菌の検査は食品サンプルからの培養、増殖によりその有無を評価している。しかし、この方法は時間がかかるためその場での判断が困難である。一方、PCR などを用いた遺伝子検査は臨床診断、感染症診断など医療現場を中心として環境検査や食品検査にも利用されはじめている。PCR 法は、微量の DNA サンプルから目的とする遺伝子配列領域を人工的に大量に増幅する技術で、その特徴は高感度と高い選択性にあり、また 1-2 時間ほどで検査が可能であるという点である。

また、加工食品が広く利用されている現状では、アレルギーや狂牛病などの食品由来の疾患や特に食肉の場合は宗教上の理由（ハラール）、などの消費

者個人レベルでの理由を含めた食品制限があるため、表示されている成分が正しいのかどうか、また表示以外の内容物が含まれていないかどうかを評価することもまた、消費者の食品への安心を確保する上で重要である。これらの成分の評価方法としては、上述した遺伝子検査の他に HPLC や ELISA などのタンパク質解析が挙げられる。しかしながら、これらの方法は特に加熱処理済み加工食品の場合、タンパク質が構造的に不可逆的に変性しているため検出が難しい。よって、細菌検査と同様に DNA 検査は、成分解析においても有効な手段である。

このような PCR などの特異的遺伝子検出法が日常的な食品検査に用いられるためには、特別な検査所での解析だけでなく、現場レベルでの検査が可能になることが求められる。そこで、要求されるのは、遺伝子検査の迅速化、簡便化、低コスト化、及び装置の小型化及び可搬性などが挙げられる。

そこで、本研究ではこの PCR 法を利用した迅速な大腸菌検出を目的とし、PCR 後の DNA 増幅検出を電気化学測定を用いて検討した。PCR による目的配列の増幅検出は通常、電気泳動か蛍光検出が用いられるが、電気泳動は 30 分程度時間が必要であり、また蛍光検出はリアルタイム測定及び定量評価が可能であるが、その蛍光試薬や probe DNA への標識が必要かつ小型化が難しい蛍光検出部位が必要となるためランニングコストや可搬性の問題がある。一方、DNA の電気化学測定は迅速な測定が可能であり、また高感度な

DNA測定法として注目されており、SNPの測定や微量測定などがおこなわれている。しかしながら、その主なものは精製されたDNAを用いている。ここでは迅速で簡便な検出を目的として、酵素タンパクや塩、primerなど電気化学測定において夾雑物となりうる成分が含まれたPCR溶液から増幅DNAを精製せず直接測定する方法、条件について検討を行った。また、測定は安価に大量生産が可能かつディスプレイな小型カーボン印刷電極 (DEP-chip) を作製、また、USB電源から直接接続できる Hand-held な Potentiostat (BDT ministat) を用いて、大腸菌 PCR による特異的遺伝子増幅を定量的に測定した。また、我々は Microfluidic chip を用いた迅速な PCR についても検討を行ってきており、将来的に統合デバイス構築を目的として大腸菌をターゲットにした迅速 PCR ついても併せて検討を行った。

また、PCRと同様の遺伝子増幅技術の一つである、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた食肉の遺伝子検出 (ブタ、トリ、ウシ) についても検討した。LAMP法は、その特徴として、等温での増幅反応が可能であることと、PCRと比較しその増幅戦略から特異性が高くまた増幅産物の量も多い。よって、通常PCRで用いるサーマルサイクラーを必要とせず簡易的なヒーターで増幅反応が可能のため装置の小型化が

容易である。また、膨大な量の増幅産物は電気化学測定にとってその測定原理上から有利である。

2. 大腸菌 PCR 及び電気化学測定

電気化学測定原理は、DNA結合性の電気化学メディエータを利用した方法で、これを直接PCR溶液と混合して測定する。PCRによりDNAが増幅するとメディエータが結合するため、その増幅DNA量に応じて電気化学活性を有するフリーな状態のメディエータが減少することになるため、電流値が減少する (Fig. 1)。この電流値の減少量を測定することで増幅の検出が可能である。特徴としては、測定時間が約20秒程で完了するため迅速な測定が可能であることと、電極表面への固定化や修飾DNAプローブなど特別な操作や試薬を必要とせずPCR溶液と混合するだけなので簡易な方法であるという点が挙げられる。本研究では、DNA結合性電気化学メディエータとしてベンズイミダゾール化合物などを用いた。また、使用した印刷電極及び小型 Potentiostat を Fig. 2 に示す。

大腸菌株をLB液体培地へ植菌し、37℃、48h振とう培養した。滅菌蒸留水で 10^5 倍希釈した培養液50 μ Lをコンラージ棒でLB寒天培地に平板上に展開し37℃、24h培養し、生育コロニー数をカウントして培養液中の大腸菌数を求めた。

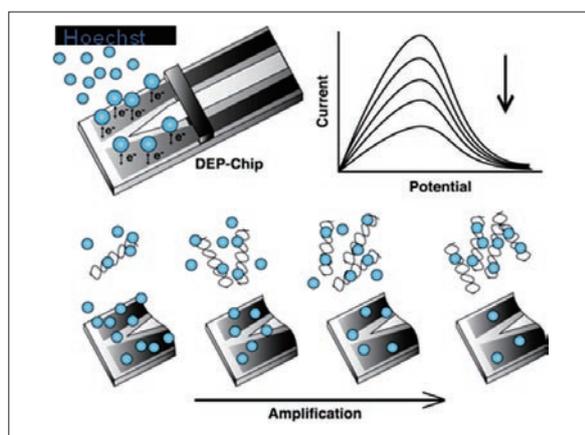


Fig. 1 電気化学測定原理

DNA 合成量に対応してピーク電流値が減少する。

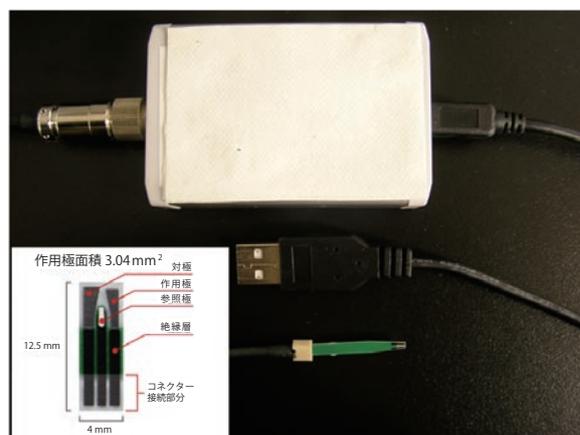


Fig. 2 小型ポテンシostatと印刷電極

USB 接続により外部電源を必要としない名刺サイズのポテンシostat。測定に必要な溶液量が約10 μ Lの小型な印刷電極。

大腸菌および DNA の精製は行わず、大腸菌培養液を加熱処理したものを直接 PCR サンプルとした。PCR は、*E. coli* 特異的 16srRNA 遺伝子をターゲットとしたプライマー、ECA75F: 5'-GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC-3' 及び ECA619R:5-AGCCCGGGGATTTACATCTGACTTA-3' (300 nM each) を用いた。SeedSTAR™ HS DNA polymerase kit (TAKARA BIO. Inc.) を使用し、テンプレートは、培養液希釈列をそれぞれ 1 μL を PCR 溶液に加え、95 °C 30sec 後 95 °C 5sec, 65 °C 15sec (40cycles) で行った。PCR 後の溶液 1 μL を直接 40 μM メディエータ溶液 10 μL に混合した。これをカーボン印刷電極上にドロップし、BDT ministat を用いて LSV (Linear Sweep Voltammetry: from 0 to 700mV, step potential, 50mV/sec) で測定した。

結果、Fig. 3 に示すように、PCR による遺伝子

増幅は、*E. coli* 菌体数 1 個からでも可能であり、また、テンプレートとなる菌体数に対応した特異的遺伝子増幅量によるメディエータの電流値 (酸化電位約 400mV) の減少が測定された。この結果から、PCR のエンドポイントでの電気化学測定によって定量的評価が可能であることが示された。また、Micro flow 型 PCR チップによる大腸菌遺伝子の迅速増幅についても検討した。マイクロチャンネル内に反応溶液を送液する Flow 型 PCR チップは、溶液自体が各温度に固定したヒーター上を通過するため、温度の上げ下げの制御に時間がかかる通常のサーマルサイクラー装置よりも迅速化することが可能である。このような Flow 型デバイスでは、遺伝子増幅後の溶液はデバイスの outlet からそのまま送液されてくるため、検出デバイスとの連結性に優れると言う点もある。Polydimethylsiloxane (PDMS) 樹脂を用いた PCR

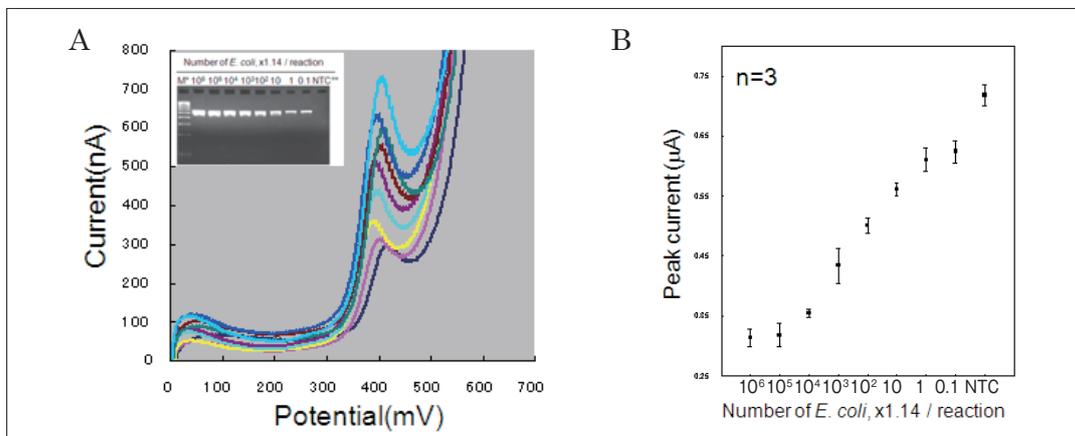


Fig. 3 大腸菌 PCR の電気化学測定。(A) 大腸菌サンプル (Template) の 10 倍希釈列をそれぞれ PCR 後、ヘキスト溶液と混合して LSV 測定した Voltammograms。insets: 電気泳動像 (B) ピーク電流値のプロット。大腸菌量に応じて電流値が減少し、PCR のエンドポイントでの定量的評価が可能。*Molecular size maker, **Non-template control

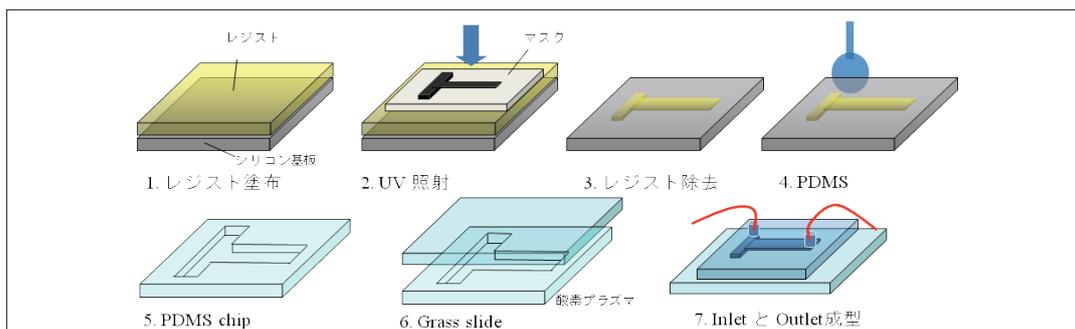


Fig. 4 マイクロフロー型 PCR チップ作製手順

マイクロ流路チップの作製手順を Fig. 4 に示す。シリコン基板上にフォトリソグ (SU-8) をスピコートした後、流路パターンを描いたマスクフィルムをレジスト上に接触させ、UV を照射してパターンを転写する。余分なレジストを洗い流した後ベークして鋳型とした。熱硬化樹脂である PDMS を流し込み 120℃ でベークして流路パターンを PDMS に転写し、これをガラス基板と酸素プラズマを用いて貼り合わせる。Inlet と outlet 部位を成型して PDMS マイクロフローチップとした。Fig. 5 (A) に作製した 6 チャンネル型 Microfluidic PCR chip を示す。PCR チップは、流路サイズ 50 × 50 μm の 6 つの独立したチャンネル、及び独自技術である気泡発生を抑制するためのプレッシャーチャンネル部 (20 × 50 μm) を一枚のチップに集積させたものを作製した。温度固定型ヒーター (95℃、65℃) 上に Flow チップを設置後、シリンジポンプで PCR 溶液を送液して大腸菌遺伝子を増幅した。Outlet から溶液を回収後メディエータ溶液と混合して電気化学測定を行った結果を Fig. 5 (B) に示す。結果、約 20 分 (50 cycles) で PCR が可能であり、その増幅有無を電気化学測定することが可能であった。

以上の結果より、ポータブル型ポテンシostat 及び小型印刷電極を用いて大腸菌 PCR の検出が可能であり、また大腸菌や PCR 後の DNA

の精製が必要なく培養液から直接増幅し PCR 後すぐに測定が行えることを示した。これにより、大腸菌 1 個からでも検出できる高感度な迅速食品検査の可能性を示した。今後、Microfluidic PCR chip による高速な PCR との連結による、さらに迅速、小型化によって現場ですぐに検出可能なシステムへの応用を検討する。

3. ブタ、トリ、ウシ遺伝子の LAMP 及び電気化学測定

等温増幅が可能な LAMP 法の原理を以下に記述する。65℃ 付近の温度条件では DNA 2 本鎖は、動的に平衡状態にあり完全に融解はしないが部分的に 1 本鎖状態と 2 本鎖状態を繰り返している。この部位に Template DNA のターゲットとなる領域上の 6 つの配列を認識するように設計された 4 種類の異なる Primer がアニールすることになる。鎖置換活性を持つ *Bst* DNA polymerase が、primer と結合した部分的 2 本鎖部位を認識し、template 上の融解していない 2 本鎖部分を剥しながら新しい DNA 鎖を合成する。こうして作られた DNA には自身の末端配列部位と相補的な配列を有した構造があるため、自己アニールにより両末端に対称的なループを持つダンベル様構造の 1 本鎖増幅中間体ができることになる。この構造体が爆発的な増幅の起点となり、同一鎖上に互い

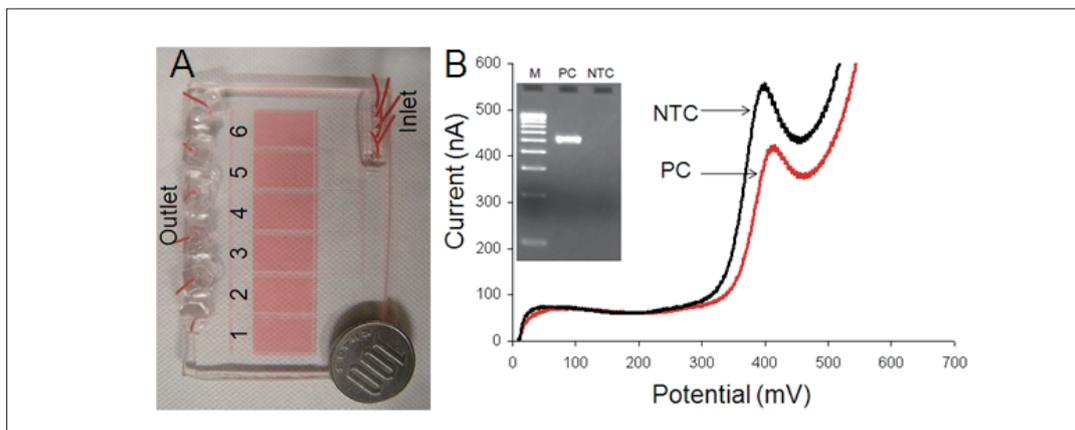


Fig. 5 Microfluidic PCR. (A) PDMS製6チャンネルPCRチップ。チャンネルサイズは、サーマルサイクル部 50 × 50 μm、プレッシャーチャンネル部 50 × 20 μm。 (B) Microfluidic PCR の電気化学測定。Inset: 電気泳動像。NTC: Non-template control, PC: Positive control

に相補的な配列を繰り返す増幅産物が様々なサイズでできることになる。このように LAMP 法は、等温での増幅反応が可能でありまた 4 種類の異なる Primer を用いることで PCR と比較し特異性が高く増幅産物量も多い。

本研究では、ブタ、トリ、ウシを LAMP 法で特異的に検出するために、それぞれのターゲットに対して 4 種類の Primer を設計した (Table 1)。FIP, BIP primer それぞれ 32 μ M、F3, B3 primer それぞれ 2 μ M、*Bst* DNA polymerase を 16 U、dNTPs を 0.4 mM、10 \times Thermopool buffer、MgSO₄、3 mM、Betaine、0.64M、total volume、25 μ L として 63°C で 1 時間反応させた。反応後の LAMP 溶液を 4 倍希釈したものを、メディエータ溶液と混合 (20 μ M) し電気化学測定した。まず、作製した

primer により特異的な検出が可能かどうか検討するために、トリ肉及びブタ肉から DNA を抽出し各比率で混合し、ブタ検出用 primer set 及びトリ検出用 primer set を用いてそれぞれ LAMP を行い電気化学測定を行った。結果として、Fig. 6 に示すように目的としない DNA が混合されていても交差反応は起きずに特異的な増幅が可能であること、またこれは加工混合食品などから目的とするトリ、ブタ肉の検出が可能であることを示している。次に、検出感度の検討を Fig. 7 に示す。Template のトリ、ブタ、ウシ DNA を 3、3 \times 10、3 \times 10²、3 \times 10³、3 \times 10⁴ copies/reaction になるように希釈し LAMP を行い電気化学測定した結果、検出感度は、ブタ DNA の場合は 3 \times 10⁴、トリ DNA では 3 \times 10²、ウシ DNA では 3 \times 10

Table 1 設計した LAMP 用の primer 配列。P-pork, B-bovine, C-chicken の特異的遺伝子検出用 primer

Primer type	Primer sequence (5'-3')	Target regions
P-F3	AACCCACGAAAGTGACTC	370-598
P-B3	CAAGGGTTGGTAAGGTCT	
P-FIP	GTTTAGGGCTAGGCATAGTGGGATCCTGACACACGATAGC	
P-BIP	TATTCGCCAGAGTACTACTCGCGAACAGGCTCCTCTAGGT	
B-F3	CACCAATTCTTGCTAATACAGT	582-803
B-B3	CACTCTATTCTTAGTTTACTGCTAA	
B-FIP	ACACCTTGACCTAACGTTTTTATGTCTATATACCGCCATCTTCAGC	
B-BIP	TGAAATGGGAAGAAATGGGCTACCCCTCTTGGTTATTGGTTTC	
C-F3	CCATCACACATGTATCCGCC	483-685
C-B3	GGGCTATTGAGCTCACTGTT	
C-FIP	CTAGGTGGGTTTGGGGCACCCGAACACTACGAGCACAAACGCT	
C-B1P	TCCACGATTACCCAACCACCATTAGAGGTGGGCTGGCG	

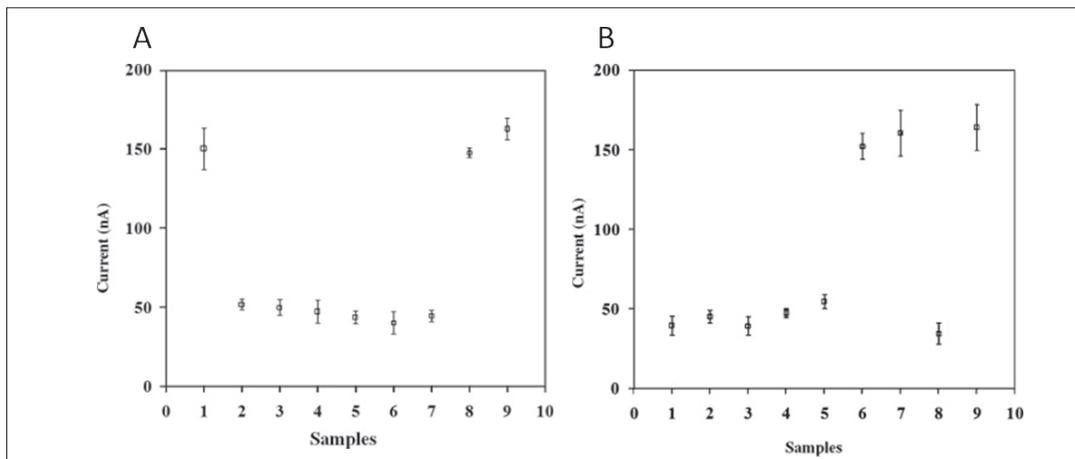


Fig. 6 トリ、ブタ DNA 混合サンプルの LAMP 電気化学測定。(A) ブタ遺伝子検出 primer。(B) トリ遺伝子検出 primer。ブタ DNA: トリ DNA % 1, 0:100. 2, 20:80. 3, 40:60. 4, 60:40. 5, 80:20. 6, 100:0. 7, control ブタ DNA. 8, control トリ DNA. 9, non-template control

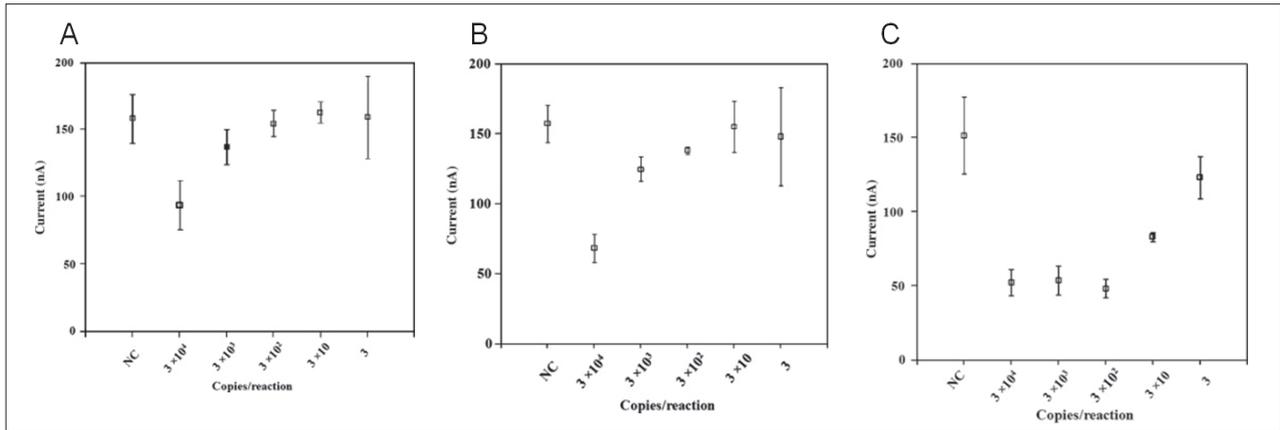


Fig. 7 LAMPによる特異的遺伝子増幅の電気化学測定検出感度。(A) ブタ遺伝子増幅測定。(B) ウシ遺伝子増幅測定。(C) トリ遺伝子増幅測定。Templateとなるそれぞれの抽出DNAのコピー数を3から 3×10^4 まで10倍希釈段階を作成しLAMP後、電気化学測定した。

copies/reaction 以上で可能であった。

以上の結果から、新しく設計したLAMP primerによって3種類の食肉の特異的増幅が可能であり、また電気化学測定によりその増幅を迅速に検出することが可能であった。LAMP法は高価なサーマルサイクラーを必要とせず恒温槽など簡易的なヒーターで可能であり装置の小型化が容易である。今後はさらに簡易的な検出を目的とし、LAMP反

応と同時に電気化学測定を行う方法の検討および定量的な評価への応用を検討する。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご援助を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

Development of on-site detection system for food safety

Kiichiro Yamanaka, Eiichi Tamiya

Department of applied physics, Osaka University

The food sanitation control is important for consumer protection. *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria have been utilized as one of the indicator organisms for food safety. Usually, cultural procedure is used for identification of *E. coli*, however it is time-consuming method because of the bacterial growth require over a day. Therefore, the development of on-site bacteria detection system (which with rapid, simple, low cost and portable but high sensitive) is beneficial in the food safety testing. On the other hand, DNA analysis with polymerase chain reaction (PCR) has become routine part of medical diagnosis, for the sensitive, rapid and specific detection of virus and/or bacteria. The detection of genes amplified by PCR is commonly accomplished by gel electrophoresis and/or fluorescence observation based on Taqman chemistry. In particular, fluorescence-based detection is highly sensitive and makes quantitative real-time PCR possible. However, the optical detection apparatus for fluorescence intensity measurement is not amenable to miniaturization which makes it unsuitable for the construction of portable system. We have been currently investigating the development of electrochemical sensor for nucleic acid, and electrochemical based DNA detection is a relatively simple technique and is high amenable to miniaturization as it offers label-free, rapid measurement (about 20 seconds) with low power consumption. In this study, Hoechst was used as a reporting element for electrochemical detection. Hoechst is an electro-active molecule with high affinity towards nucleic acid and it can intercalate into double helix. The binding of Hoechst molecules to the amplified DNA cause the decrease of the peak current due to the slow diffusion of Hoechst-amplified DNA complex to electrode surface.

Here we proposed that the electrochemical method for *E. coli* detection without the purification of DNA using the hand-held potentiostat and the small-sized disposable electrical printed chip (DEP-chip). The bacteria cultures of various concentrations of *E. coli* were directly added in PCR solutions, and 2-step PCR (95, 65 °C for 40 cycles) were carried out. After PCR, the solutions were directly mixed into the Hoechst solutions, and dropped onto the DEP chip. Electrochemical signals (linear sweep voltammogram) were recorded by the portable potentiostat. As the results, the oxidation peak current of Hoechst were decreased depending on the number of the added *E. coli*, moreover, from only one bacteria per reaction could be detected.

Identification of meat species is also crucial for the detection of adulteration in processed foods to safeguard the consumers against the presence of unknown or less desirable species from health perspectives or religious. In this study, we have tried to determine meat species-specificity using a combination of loop mediated isothermal amplification (LAMP) followed by electrochemical detection. LAMP is a newly invented method for amplifying DNA, where the amplification reaction proceeds at a constant temperature (~65 °C) by using the strand displacement typed DNA polymerase. Those reactions enable to amplify the target sequence with high sensitivity because of the recognition of the target sequence by four different primers designed to anneal six distinct sequences during the reaction. Therefore, it is easy to miniaturize the equipments for DNA amplification in comparison with the commonly used thermal cycler for PCR. To produce species-specific loop amplicons, specific primers for bovine, chicken and pork were newly designed respectively. In order to confirm the specificity of designed primers for LAMP, pork-chicken mixtures at different ratios were amplified using pork specific primer set or chicken specific primer set. After LAMP, the solutions were mixed with Hoechst, and measured the current signals by same procedure as described above. As the result, the presence of the target specific amplicon were confirmed by the electrochemical signal without cross-reactivity, and it indicated that precise detection of meat species in mixed samples could be performed.

As described above, the developed electrochemical measurement technique by using DEP chip and hand-held potentiostat has possibility for applying to the quantitative detection of *E. coli* and meat species, and can be extended to be the on-site detection system for food safety testing.