

5. 公定法を超える高感度の分子生態学的 微生物モニタリングシステム

北海道立工業技術センター ○大坪雅史、宮原則行、剣持美帆、青木 央、宮崎俊一
北海道大学大学院水産科学研究院 澤辺智雄、山崎浩司
公立はこだて未来大学 高橋信行
(株)東和電機製作所 藤原里美、澤田大剛、野田 真、紅谷亜矢子、(株)電制 須貝保徳、
日水製薬(株) 堀米一己、小高秀正
北海道大学創成科学共同研究機構 荒磯恒久
(財)東京顕微鏡院 伊藤武
北海道立衛生研究所 清水俊一

1. はじめに

食品製造業では「食の安全性」を確保するため、徹底した食品衛生が求められている。その実践に不可欠である微生物検査は、公定法に準拠するが、これは培養法が主体であり結果判定に数日を要し時間がかかりすぎるのが問題とされている。そのため、食品製造業から迅速な細菌検査が求められている。また、損傷した食品衛生細菌は、しばしば、公定検査法では検出できないことがあり、近年、大きな問題となっている。

本研究開発は、培養併用蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISHFC)という技術を応用し、公定法では測定できない損傷した食品衛生細菌をも迅速で正確に測定するシステムを開発するものであり、最終的に、本システムを製品として市場に送り出すことを目指している。本発表では、研究開発の背景、本研究内容、平成18年度の主な研究成果、および今後の期待される成果について紹介する。

2. 研究開発の背景

2.1 損傷菌とは？

食品などの製造環境における微生物は、加熱、凍結、乾燥、殺菌剤等の様々なストレスを受けている。そのため、そこに存在する微生物の一部は傷つき、損傷菌として存在すると推定される。損傷菌とは、培養方法が不適当だと死滅するが、適切な場合には、増殖能を回復できる微生物を指し(図1)、従来の公定法では損傷菌を充分に検出できない。製品の品質管理や製造環境の微生物学的状態を正しく評価するうえで、損傷菌の存在は、等閑視できない重要な問題である。

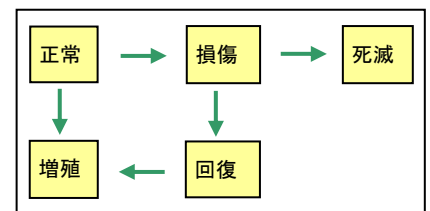


図1 微生物の損傷と回復の過程

2.2 細菌検査の社会的ニーズ

食品検査市場の前年比成長率は、平成7年度以降、10%以上の伸びを示し、成長市場とされている。平成14年度の売り上げは、約100億円である。また、わが国の食品産業の年間売り上げは69.5兆円である。そのうち、売り上げの1%が食品検査費用として使われると想定すると6950億円となる。さらに、食品検査費用の10%相当が細菌検査装置関連品の購入に当てられると想定すると695億円の市場規模となる。本研究で開発している迅速細菌検査の市場性は非常に大きいと予測している。

3. 研究内容

本研究は、損傷した食品衛生細菌を高感度で正確に、かつ、迅速に検査できる培養併用 FISH 法を応用した微生物モニタリングシステムの構築を目指し、3つのサブテーマを設けている。各研究の内容は次の通り。

(A) 損傷した特定細菌の培養・検出技術の開発：ストレス環境に曝された食品衛生細菌の損傷回復条件を確立する。(B) 食中毒細菌の高感度蛍光イメージング技術の開発：キャンピロバクター、黄色ブドウ球菌、一般細菌など重要な食品衛生細菌の検出用高感度蛍光オリゴヌクレチドプローブを設計する。(C) 系の複雑度を尺度とした細菌コロニー検出のための高速高精度なデータマイニング法の開発：蛍光画像雑音を多く含む画像からの細菌識別方法を開発し、これを FISHFC モニタリング装置に応用し、自動計数の信頼性を検討する。

4. 平成 18 年度の主な研究成果

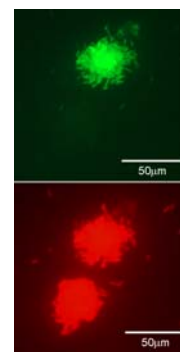
4.1 FISHFC 法による加熱損傷腸内細菌科の迅速検出

加熱損傷した腸内細菌科の FISHFC 法による迅速検出・計数の可能性を検討した。*Escherichia coli* IAM12119^T と *Enterobacter cloacae* IAM12349^T の各株の培養希釈液をそれぞれ 55℃及び 50℃にて 2 分間加熱して、加熱処理菌体を調製した。菌数測定は、腸内細菌科については腸内細菌科特異検出プローブ(EntD)を用いた FISHFC 計数法 (6 時間) 及び腸内細菌科選択培地 VRBDA 平板計数法 (24 時間) により、また、損傷菌を含む培養可能細菌については非選択培地 TSA 平板培養計数法 (24 時間) により、それぞれ行った。その結果、両株の加熱処理菌液の TSA 平板計数値は、VRBDA 平板計数より、それぞれ 3 または 50 倍有意に高かった($p < 0.01$)。このことは、加熱処理菌体の多くが損傷し VRBDA 平板法で検出できないことを示唆するものであった。加熱損傷後 *E. coli* の FISHFC 計数値は、VRBDA 平板計数値より有意に高かったが($p < 0.01$)、TSA 平板計数値より有意に低かった($p < 0.01$)。一方、加熱損傷 *E. cloacae* の FISHFC 計数値は、VRBDA 平板計数より有意に高いが($p < 0.01$)、TSA 平板計数値とは有意差が認められなかった ($P > 0.05$)。以上の結果から、FISHFC 法は加熱損傷した腸内細菌科を検出する上で公定法である VRBDA 平板法より優れさらに腸内細菌科を迅速で正確に検出計数できる。本成果は、シカゴで開催される国際学会 Institute of Food Technology (7 月)、日本食品微生物学会 (9 月)、日本微生物生態学会 (9 月) で発表予定している。

4.2 緑膿菌検出用プローブの開発と培養併用 FISH 法による緑膿菌の迅速検出

緑膿菌の高感度迅速検出に利用可能な新規遺伝子プローブを開発した。緑膿菌は免疫能が低下したヒトに肺炎などの日和見感染症を引き起こし院内感染などで問題視されている。食品衛生法では未殺菌ミネラルウォーターの製造基準に本菌の検出基準が設けられている。緑膿菌の公定検査は確定までには 10 日近くを要するため、迅速検査ニーズは高い。本研究では、データベース上の 16S rRNA 遺伝子配列を比較し緑膿菌に特異的な塩基配列を見だし、緑膿菌プローブを開発した。このプローブは 14 株の緑膿菌にのみ反応し、近縁なシュードモナス属菌や食品・環境から見いだされる 35 種の非緑膿菌には反応しなかった。開発プローブの特異検出例を図 2 に示した。開発した緑膿菌プローブを用いた FISHFC 法により緑膿菌の検出・計数が 8 時間以内にまで短縮できる。本成果は、平成 19 年 4 月に特許出願し、日本微生物生態学会 (9 月) で発表予定している。

図 2 緑膿菌を含む複合菌種試料の FISHFC 蛍光顕微鏡像
上: 開発プローブと反応した緑膿菌の微小集落。
下: ユニバーサルプローブとの反応(上と同一視野像)。緑膿菌と別種の細菌が共存している。



4.3 FISHFC 蛍光測定装置量産型タイプの開発

都市エリア事業一般型で開発した FISHFC 蛍光測定装置の商品化に向け量産型タイプを試作した。装置は、計測部と画像解析システムから成り、これらをコンパクトにまとめた (図 3)。計測部は、光源、励起光フィルター、X-Y 軸自動走査ステージ、ステージコントローラー、蛍光フィルター、対物レンズ、鏡筒、CCD カメラで構成され、この計測部の CCD カメラ画像をキャプチャーボードで直接取り込み、解析する画像解析システムを MS-Windows XP PC 上に開発した。本成果は FIT2007 第 6 回情報科学技術フォーラム(9 月)で発表予定している。今後、装置の性能を充分評した上で、食品業界、あるいは微生物の受託検査センターなどの外部機関へ本装置をモニターとして貸し出し、装置について評価を受ける予定である。その結果をもとに商品コンセプトを確立し、商品化の最終設計・製造を行い装置の上市を目指す。



図 3 FISHFC 蛍光測定装置量産型タイプ

5. 期待される成果

- (1) 培養併用 FISH 法を応用した微生物モニタリングシステムは、新規な迅速細菌検査法として確立する。
- (2) 微生物モニタリングシステムの関連製品として、培養併用 FISH モニタリング装置、簡易検査キット、試薬キット、損傷回復培地、全自動型細菌検査装置などが商品化される (図 4)。



図 4 予想される商品化: 培養併用 FISH 法を応用した微生物モニタリングシステム (平成 22 年以降)