

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
北海道大学大学院水産科学研究院
公立はこだて未来大学
(株)東和電機製作所
(株)電制
日水製薬(株)
北海道大学創成科学共同研究機構
(財)東京顕微鏡院
北海道立衛生研究所

大坪雅史、宮原則行、剣持美帆、林志保、青木 央、鳥海滋、宮崎俊一
澤辺智雄、山崎浩司
高橋信行
藤原里美、澤田大剛、野田 真、紅谷亜矢子
須貝保徳
小高秀正
荒磯恒久
伊藤武
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、研究内容、平成 19 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、培養方法が不相当だと死滅するが、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。

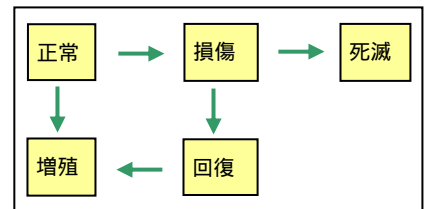


図1 微生物の損傷と回復の過程

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、次のとおりである。

(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 19 年度の主な研究成果

4.1 FISHFC 法による加熱損傷ウエルシュ菌の迅速定量検出

加熱損傷ウエルシュ菌(CW菌)のFISHFC法による迅速定量検出の有効性を評価した。CW菌細胞を54、15分間加熱後、最適希釈液(0.3%ピルビン酸Na加TSC液体培地、pH7.2)で希釈し、損傷回復効果のある同培地とCW菌検出用プローブ(CLP180)を用いたFISHFC法(8時間)によってCW菌の計数を行った。その結果、FISHFC計数は、汎用される卵黄加CW寒天平板での培養計数よりも多かったが、損傷回復をさせながら検出する0.3%ピルビン酸Na加TSC寒天平板での培養計数と有意差は無かった。さらに、実際の食品へ加熱損傷CW菌を人為的に接種し、FISHFC法と標準法(培養計数)を比較した結果、FISHFC法が標準法より迅速性と精度に優れる方法である結果が得られた。これらの成果は、国際学会IFT(2008.6)で公表した。また、リステリア菌のFISHFC法の成果は、日本食品微生物学会(2007.9)とJournal of Applied Microbiology誌(2008)で公表した。

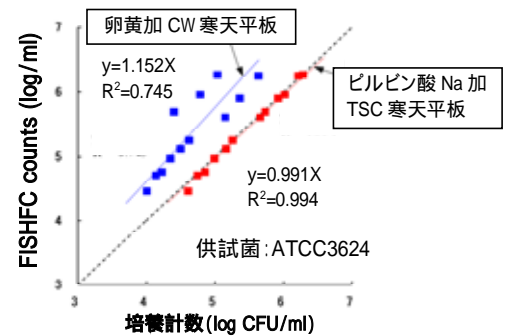


図2 加熱損傷ウエルシュ菌のFISHFC計数と培養計数

4.2 培養併用 FISH 法によるカンピロバクターの迅速検出及び一般菌数の計数

培養併用 FISH 法によるカンピロバクターの高感度迅速検出法と一般菌数の計数法を開発した。カンピロバクターは、鶏肉を主たる原因とする食中毒を引き起こし、国内の細菌性食中毒の発生件数は最も多い。カンピロバクターの公定検査法は現在検討段階であり、食の安全に対する社会へのインパクトを考慮すると迅速検査ニーズはきわめて高い。データベース上の16S rRNA遺伝子配列を比較し、カンピロバクターに特異的な塩基配列を見出すことで本菌のプローブを開発した。このプローブはカンピロバクターにのみ反応した高い特異性を持っていた。開発したカンピロバクタープローブを用いたFISHFC法により、2日以上を費やす本菌の検出・計数が14-16時間以内にまで短縮できた。本成果は、平成20年度に特許出願準備中、国際微生物学協会の集会(8月)で発表予定である。さらに、既存のEUB338プローブを用いて、通常48時間を要する生鮮野菜の一般生菌数の計数が8時間にまで短縮できることを明らかにした。

4.3 FISHFC 蛍光測定装置の商品化用画像解析システムの開発

商品化の最終設計版となる画像のみで同期制御可能なFISHFC蛍光測定装置向けに、実際の多様な測定環境で細菌コロニーを高精度に検出し、計数する画像解析システムを開発した。開発した画像解析システムでは、細菌のコロニー数を自動計測するだけではなく、試料表面上の細菌コロニーの分布状況をコロニー数、コロニーサイズで解析可能である。事例を図3に示す。また、この細菌の分布を視覚的に確認するために、分割計測した蛍光画像を1枚の巨大な画像に合成し、試料全面を目視することも可能となっている(図4)。さらに、解析結果の客観性や信頼性を担保するために、計数に使用した蛍光画像と外部カメラによる計測環境映像を同時記録・保存する機能を有する。本成果は、第31回情報理論とその応用学会(SITA2008)(10月)に発表予定している。

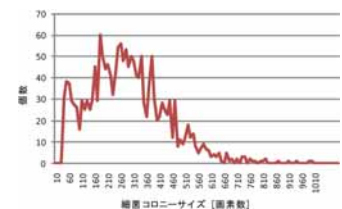


図3 細菌コロニーサイズの分布

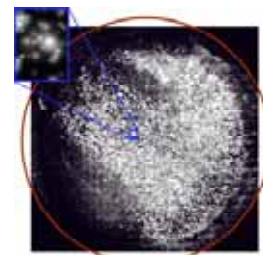


図4 試料全面の合成蛍光画像

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5)。



図5 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)