

(7) 食品微生物の特異的定量システムの開発

(平成26年度～平成28年度)

1. 研究のねらい

食品関連企業からは迅速な食品微生物検査が求められている。我々は、これまでに、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISHFC) を応用した迅速細菌検査法の研究開発を行ってきた。FISHFC は、迅速性、検出細菌の特異性、検出感度に優れており、この技術を応用した迅速細菌検査システムの商品化を目指してきた。しかし、FISHFC システムを適用できる食品試料は、水産物と畜産物に限定され、蛍光ノイズを有する緑黄色野菜や惣菜には適用できなかった。緑黄色野菜や惣菜にも適用可能とするため、マルチ蛍光スペクトル分析を導入した計測装置を開発し、様々な食品への適用化を検討している。一方、このシステムの実用化にあたっては、検査工程の簡易化が必要で、とりわけ吸引ろ過工程を省略化する必要がある。また、開発装置の光源、感度の校正法の確立が必要である。そこで、吸引ろ過工程を省略化できるキットを開発するとともに、マルチ蛍光スペクトル計測装置の光源強度、検出感度の調整に用いる校正用試料の量産化方法を開発する。

2. 研究の方法

簡易化システムによる FISHFC 定量 (平成27年度開発)

試料のリン酸緩衝液希釈乳剤 1ml と液体培地 1ml を混合し、これを試作した簡易キット (小シャーレにろ紙、フィルターデバイス (アクリルリング (高さ 10mm、φ47mm) とメンブレンフィルターを貼り合わせ)) を搭載) に添加した。次に 50℃ の溶解した滅菌済 0.6% 寒天 2ml をフィルターデバイスに添加しフィルター面を寒天で覆った。小シャーレ蓋をした後、フィルターデバイス上にマイクロコロニーを形成させるために、簡易キットを 35℃ にて培養した。培養時間は、腸内細菌科 6.6 時間、腸炎ビブリオ 16 時間、黄色ブドウ球菌とリステリア 22 時間とした。次に、エタノール 4ml をフィルターデバイスに加え細菌を 20 分固定した後、フィルターデバイスを乾燥した。次に黄色ブドウ球菌とリステリアの場合は溶菌酵素 (ラビアーゼ) 2ml を加え 46℃、1 時間作用させた。次に、フィルターデバイスにハイブリダイゼーションバッファー 1.5ml と各々の特定細菌検出用蛍光標識 DNA プローブを添加し、46℃ で 60 分ハイブリダイゼーション反応をさせた。次にフィルターデバイスに洗浄液を添加し 46℃、15 分間浸して洗浄した。その後、蒸留水ですすぎ、乾燥させた。次にメンブレンフィルターデバイス中の蛍光マイクロコロニーを FISHFC 蛍光自動計測装置 (試作機) にて各検出対象細菌を計数した。

3. 研究成果の概要

吸引ろ過工程を省略化できる FISHFC の簡易化システムの信頼性評価

平成27年度に開発したシステムの信頼性評価を行った。検査対象細菌を腸内細菌科、腸炎

ビブリオ、黄色ブドウ球菌、およびリステリアとした。食品試料として腸内細菌科、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、およびリステリアの場合は3色ミックス野菜を用い、海洋性食中毒細菌である腸炎ビブリオの場合はヒラメを用いた。その結果、検査対象細菌いずれも対照法とした寒天平板計数と簡易化システムによる FISHFC 計数の間に直線性が認められ、傾きが1に近く、相関係数も0.9以上となり、同システムの定量性が認められ、信頼性が期待できた。

校正用試料の量産化方法

校正用試料の量産化方法を次の通りとする。供試試料として大腸菌懸濁液(約100CFU/ml) 1mlを用い、多数の簡易システムに供しTAMRA標識腸内細菌科プローブを用いてFISHFCを行う。同時に供試試料について寒天平板計数を行いFISHFC計数の妥当性を確認する。計数値の確認された大腸菌FISHFCデバイスを校正試料とし、密閉包装し冷蔵保管する。有効期間は1年とする。

担当者 大坪雅史、鳥海滋、村田政隆