

(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

食品関連企業に向けた迅速細菌検査法として、これまでにマルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムを試作した。本システムは、大腸菌、腸内細菌科菌群、サルモネラ、リステリア、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオをそれぞれ特異的に迅速で正確に測定できた。しかし、本システムは、食品産業製造現場での適用性等の現場ニーズを満たしているか不明のため、商品化段階に進むことができない。また、真菌の迅速検査法のニーズはあり、真菌のうちカビの定量法は確立したが、酵母の定量が困難のため真菌の迅速検査法が十分に確立されていない等の問題があった。商品化に向けこれらの問題を解決するため、食品製造企業に開発システムを持ち込み、現場での妥当性やニーズを調査する。また、本システムによる迅速な酵母定量法を開発し迅速正確な真菌定量法を構築する。

2. 研究の方法

検査キット

小シャーレ下皿に直径 50mm 濾紙 5 枚を置き、その上にフィルターデバイス (直径 47 mm アクリルリングにメンブレンフィルター (ポアサイズ 0.40 μm) を貼り試作した) を置き小シャーレ上蓋を被せて構成した。

マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによる黄色ブドウ球菌測定 (19 時間)
食品試料 10 倍希釈懸濁液 0.1ml と SEL (塩化リチウム含有) 培地 2ml を混合して検査キットのフィルターデバイスに添加した。小シャーレ上蓋を被せ 2 分置いた。その後、上蓋を外して溶解 0.6%寒天 2ml をフィルターデバイスに注ぎ蓋を被せ 35°C16h 培養した。培養後、デバイスに 100%エタノール 2ml 添加し 20 分固定した。フィルターデバイスを乾燥後、溶菌酵素処理工程を行った。酵素溶液 (Labiase (コスモバイオ社 OZ-30EX) 1000 $\mu\text{g/ml}$ 、20mM Tris-HCl pH7.4) 1.5ml をフィルターデバイスに添加し 46°C60 分反応後、酵素溶液を排出した。次に、ハイブリダイゼーション操作を行った。ハイブリダイゼーションバッファ (25%ホルムアミド、0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、0.9M 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]、5×デンハルト溶液) 1.5ml とプローブとして 10 μM TAMRA 標識 STA68 (GAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTC)10 μl をフィルターデバイスに添加し 46°C60 分反応させた。ハイブリダイゼーションバッファを排出し 46°Cにて洗浄液 5ml を加え 46°C15 分置いた後、洗浄液を排出し蒸留水で洗浄して乾燥した。フィルターデバイスをこれまでに試作したマルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 装置に供し蛍光画像をカラー撮影し、蛍光プローブ固有の色を有すマイクロコロニーをモニター画面から目視確認して計測した。

黄色ブドウ球菌測定対照法（4日間）

食品衛生検査指針を参考に卵黄加マンニット食塩寒天を用いて行った。

マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによる真菌測定（42時間）

試料懸濁液 0.1ml を 2ml の PYD（クロラムフェニコール含有）培地に懸濁し、検査キットのフィルターデバイスに添加した。小シャーレ上蓋を被せ 2 分置いた。0.6%アガロース溶解液を 2ml 添加した。25℃、40h 培養した後、エタノール 2ml 添加し 30 分静した。フィルターデバイスを乾燥後、ハイダイゼーションバッファ（35%ホルムアミド、0.02%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、0.9M 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]、蛍光プローブ（TAMRA 標識 EUK516（ACCAGACTTGCCCTCC））を用いてハイブリダイゼーション（46℃、1 h）し、後の操作は前記と同様に行った。

真菌測定対照法（7日間）

食品衛生検査指針を参考に PDA 寒天平板を用いて行った。

3. 研究成果の概要

マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムの現場適用性の検討

研究協力頂いた水産加工 M 社（道南地域）に本システムを持ち込み、現場の品質管理担当者に対照法と本システムによる試験を実施の上、現場適用性を検討頂いた。評価対象を黄色ブドウ球菌検査とした。試料を協力的会社製造製品である鮭フレークとし、黄色ブドウ球菌 ATCC6538P を添加あるいは無添加の鮭フレークをそれぞれ調製し用いた。その結果、鮭フレーク（無添加）と鮭フレーク（黄色ブドウ球菌添加）の本システムによる計数値は、いずれも対照法と同等だった。現場適用性は、対照法は陽性確定に至るまで 4 日間を要すが、マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムは検査翌日に判定結果が出るので迅速で適用の可能性はある。しかし、蛍光コロニー計測は目視でなく自動化が必要と評価され、今後のシステム改良を求められた。

マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによる真菌の迅速測定法の開発

これまで、FISHFC による酵母の定量が困難だった理由は、酵母コロニーは粘着性が弱く、ハイブリダイゼーションにおいてコロニーが液体に浸され脱落するためと推定した。そこで、脱落防止として上記の方法を考案した。次に、この手法の妥当性を評価した。酵母試料として *Saccharomyces cerevisiae* JCM2223 を用い、対照法、及び、本システムによる測定を行った。その結果、両者による測定は同等の計数値となり、本システムの結果は妥当だった。以上より、*Saccharomyces cerevisiae* JCM2223 においては、コロニー脱落は防止でき妥当な測定値が得られた。

担当者 大坪雅史