

# マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システム並びに それを応用した衛生指標細菌迅速検査の開発

大坪雅史、清水健志、須貝保徳\*、高瀬雅由\*、戸ヶ崎恵一\*\*、  
岡田迪徳\*\*\*、長尾直子\*\*\*、山崎浩司\*\*\*\*

## The Development of the Multi Fluorescent Spectrum Analysis FISHFC System and Its Application to Rapid Hygiene Indicator Microorganism Tests

Masashi Ohtsubo、Takeshi Shimizu、Yasunori Sugai\*、  
Masayoshi Takase\*、Eichi Togasaki\*\*、Tadanori Okada\*\*\*、  
Naoko Nagao\*\*\*、Koji Yamazaki\*\*\*\*

### 要 旨

マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによる簡易、迅速で、様々な食品試料に適用可能な細菌検査法を開発した。本システムは、後述の6菌種を測定対象とした。蛍光シグナルを自動計測する上で、励起波長・蛍光波長の組み合わせ条件として3つの領域が利用できた。これら領域で最大蛍光を示す物質で標識した特定細菌検出用 DNA プローブを用いて FISHFC を行うことで、標識蛍光物質由来のシグナルを食品由来の自家蛍光ノイズと弁別できた。開発システムの信頼性評価の結果、腸内細菌科菌群、大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオを正確に測定した。リステリアと黄色ブドウ球菌の測定は概ね妥当だったが計数値のばらつきがやや大きかった。

#### 1. はじめに

学校給食に起因する大腸菌 O157食中毒事故 (1996年)、イクラに起因する大腸菌 O157食中毒事故 (1997年)、イカ乾燥菓子に起因するサルモネラ食中毒事故 (1997年)、低脂肪乳に起因する黄色ブドウ球菌食中毒事故 (2000年)<sup>1)2)</sup> など相次いで発生した大規模細菌性食中毒事故を契機に、消費者の「食の安全」に対する関心が高くなった。

微生物の衛生評価は微生物検査により実施されるが、1996年以降、微生物検査の需要が増加した<sup>3)5)</sup>。微生物検査は従来、培養法で行われてきたが、陽性確定に至るまでに数日の時間と多くの手間がかかる<sup>6)</sup>。食品現場からは、食中毒菌や衛生指標細菌の迅速な検査が求められ、検査に対して迅速、正確、簡易、低コスト等、多様な現場ニーズがある。様々な原理に基づく迅速検査法が商品化され

\* 株式会社電制

\*\* 日本細菌検査株式会社

\*\*\* 一般社団法人北海道食品産業協議会

\*\*\*\* 北海道大学大学院水産科学研究院

責任著者連絡先 (Masashi Ohtsubo) :ohtsubo@techakodate.or.jp

てきたが、既存製品には現場ニーズを十分に満たすものがない<sup>3)-4), 7)</sup>。

我々は、食品現場に普及可能な迅速微生物検査システムの確立を目指し、FISH (蛍光インサイチューハイブリダイゼーション) を用いた迅速測定法を検討してきた。FISH法は、微生物のリボゾーム RNA (rRNA) を標的とする蛍光標識 DNA プローブを、直接、微生物細胞内で rRNA と反応させ、様々な種類の細菌を特異的、迅速に蛍光検出でき、環境における微生物生態の研究分野で発展した<sup>8)</sup>。しかし、FISH法を食品検査へ応用するには、いくつか問題があった。FISHの微生物検出は、高倍率対物レンズ (×100倍) を用いた蛍光顕微鏡目視観察により行うため、視野面積が狭く、また用いる試料量が少ないため、検出限界値が高すぎる ( $10^5$  cells/g)。食品の微生物検査に必要な検出限界値は塗沫平板培養法と同等の $10^2$ 以下 cells/g (又は CFU/g) である。また、人の目視観察による計測では労力と時間を要するため、自動化する必要があった<sup>9), 12)</sup>。

すでに我々は、FISHを細菌検査に応用するため培養併用 FISH (FISHFC) 法を開発した<sup>11)</sup>。FISHFC法は、食品試料懸濁液 (食品0.1g相当量) をメンブレンフィルターでろ過し、そのフィルターを寒天培地に置き数時間培養してマイクロコロニー (直径30 $\mu$ m) を形成させる。その後、エタノールに浸して細胞を固定し、乾燥後、フィルター上のマイクロコロニーに対して蛍光標識 DNA プローブを反応させると通常の FISH よりも蛍光シグナル像は明るく大きくなり、低倍率対物レンズ (×4倍) の使用でも検出可能となった。さらに我々は、白黒 CCD カメラを用いて、マイクロコロニーの大きさ、形、並びに、蛍光シグナル強度を指標とする自動計測システムを構築した<sup>9)</sup>。これらによりフィルター全面計測が数分で実現でき、検出限界値10CFU/gを達成した。また、FISHFCの実施にあたり、試料中の細菌を捕集するためメンブレンフィルターを用いるが、乾燥工程でフィルターが丸まり、次の工程で丸まったフィルターを広げる操作が必要となり手間を要した。現場への普及のため、これら手間を軽減させる必要があると考え、我々は、メンブレンフィルター (ポアサイズ0.4 $\mu$ m) をアクリルリング (外径47mm、内径41mm、高さ15mm) に貼

り付けたフィルターデバイスを開発し、手間を軽減した<sup>10)</sup>。また、我々は、主な衛生指標細菌である腸内細菌科菌群、サルモネラ、大腸菌、腸炎ビブリオ、リステリア、黄色ブドウ球菌の検査に必要な DNA プローブをそれぞれ開発した<sup>13)-18)</sup>。一方、FISHFC自動計測システムの食品への応用を試みた結果、畜産物や水産物に対しては正確に計測できたが、緑黄色野菜では、蛍光ノイズとなる色素が含まれ、ノイズとシグナルを区別できず、正確な計測ができなかった。FISHFC自動計測システムを製品化・普及するためには、畜産物と水産物のみならず緑黄色野菜など様々な食品へ適用できることが新たな課題となった<sup>19)</sup>。さらに、FISHFCの食品現場での評価を実施した結果、FISHFCは、フィルターデバイスを用いても吸引濾過工程が必要だが、一層の簡易化のため、この工程の省略化が求められ課題となった。

本研究は、衛生指標細菌として、腸内細菌科菌群、大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、リステリアを測定対象とし、蛍光ノイズとシグナルを弁別し緑黄色野菜など様々な食品試料に適用可能なマルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムを開発し、並びに同システムによる簡易、迅速、正確な衛生指標細菌検査の開発を行ったので、報告する。

## 2. 材料と方法

### 2.1 供試 DNA プローブ

我々が開発した腸内細菌科<sup>13)</sup>、サルモネラ<sup>15)</sup>、大腸菌<sup>14)</sup>、腸炎ビブリオ<sup>16)</sup>、リステリア<sup>17)</sup>、黄色ブドウ球菌<sup>18)</sup>を検出する DNA プローブを使用した (表1)。標識蛍光物質は Alexa Fluor 488、TAMRA、または Cy5を用いプローブの5' 末端を標識した。

表1 供試 DNA プローブ

対象細菌	プローブ名	プローブ塩基配列 (5' → 3')
腸内細菌科	Ent D	TGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTT
大腸菌	ECO636	GAGACTCAAGCTTGCCAGTATCAG
サルモネラ	SAL343	GCTCACAGCACATGCGCTTTTG
腸炎ビブリオ	VP1253	CACTTTTCGCCAAGTTGGCTGCC
リステリア	mRL-2	AGAATAGTTTTATGGGATTAGTCCACC
黄色ブドウ球菌	STA68	GAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTT

## 2.2 供試細菌株

大腸菌 (*Escherichia coli* JCM1649<sup>T</sup>)、サルモネラ (*Salmonella Enteritidis* NBRC3313)、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* LMG 2850<sup>T</sup>)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* NBRC15035)、リステリア (*Listeria monocytogenes* IID581) の菌株をそれぞれ用いた。

## 2.3 マイクロコロニー形成培地

### (1) 2×SEL (胆汁酸塩含有) 培地

カゼインペプトン34g、ソイペプトン6g、酵母エキス12g、グルコース 5g、塩化ナトリウム 10g、ピルビン酸ナトリウム2.2g、リン酸二水素カリウム2.7g、リン酸水素二カリウム5g、リン酸水素二ナトリウム19.2g、胆汁酸塩 No.3 1.12g、蒸留水1000ml を低温殺菌 (80~100℃、30分) し、室温まで冷却後、これを4ml 容キャップ付プラスチックチューブに1ml ずつ分注し、凍結保存した。使用の際は、解凍し室温に保温した。

### (2) 2×SEL (塩化リチウム含有) 培地

カゼインペプトン34g、ソイペプトン6g、酵母エキス12g、グルコース 5g、塩化ナトリウム 10g、ピルビン酸ナトリウム2.2g、リン酸二水素カリウム2.7g、リン酸水素二カリウム5g、リン酸水素二ナトリウム19.2g、蒸留水900ml をオートクレーブ滅菌 (121℃、15分) し室温まで冷却し、これを (A) とした。別途、オートクレーブ滅菌 (121℃、15分) し室温まで冷却した塩化リチウム溶液 (100g/L) を、(A) に100ml 添加した。これを4ml 容キャップ付プラスチックチューブに1ml ずつ分注し、凍結保存した。使用の際は、解凍し室温に保温した。

### (3) 2% NaCl 添加2×TSB 培地

NaCl 20g、トリプトソーヤブイヨン60g (日水製薬社)、蒸留水 1L、オートクレーブ (121℃、15分) 滅菌した。これを4ml 容キャップ付プラスチックチューブに1ml ずつ分注し、凍結保存した。使用の際は、解凍し室温に保温した。

## 2.4 溶菌酵素溶液

ラビアーゼ OZ-30EX (コスモバイオ社) 溶液 (1000 μg/ml、20mM Tris-HCl pH7.4) を調製し、

これを4ml 容キャップ付プラスチックチューブに2ml ずつ分注し、凍結保存した。使用の際は、解凍し室温に保温した。

## 2.5 各種細菌対照測定法

### (1) 腸内細菌科菌群寒天平板法

VRBG 寒天 (メルク社) をメーカープロトコールに従い調製し、調製培地を用いて混釈平板法を行った。培養は35℃、24時間とし、赤紫のコロニーを計数した。尚、本法は、陽性コロニーの鑑別を省略した。

### (2) サルモネラ寒天平板法

クロモガーサルモネラ寒天培地 (クロモアガー社) をメーカープロトコールに従い調製し、調製培地を用いて塗抹平板法を行った。培養は35℃、24時間とし、藤色コロニーを計数した。尚、本法は、陽性コロニーの鑑別を省略した。

### (3) 大腸菌寒天平板法

XMG 寒天培地 (日水製薬社) をメーカープロトコールに従い調製した。調製培地を用いて混釈平板法を行った。培養は35℃、24時間とし、青色コロニーを計数した。尚、本法は、陽性コロニーの鑑別を省略した。

### (4) 腸炎ビブリオ寒天平板法

クロモアガービブリオ寒天培地 (クロモアガー社) をメーカープロトコールに従い調製した。調製培地を用いて塗抹平板法を行った。培養は35℃、24時間とし、藤色コロニーを計数した。尚、本法は、陽性コロニーの鑑別を省略した。

### (5) リステリア寒天平板法

ALOA 寒天培地 (バイオメリュー社) をメーカープロトコールに従い調製した。調製培地を用いて塗抹平板法を行った。培養は35℃、48時間とし、白濁環を有する青色コロニーを計数した。尚、本法は、陽性コロニーの鑑別を省略した。

### (6) 黄色ブドウ球菌寒天平板法

マンニット食塩寒天培地 (日水製薬社) をメーカープロトコールに従い滅菌した。これに50% 卵黄液 (極東製薬社) を培地に対し10% 添加し

調製した。調製培地を用いて塗抹平板法を行った。培養は35℃、48時間とし、白濁環を有する奥色コロニーを計数した。尚、本法は、陽性コロニーの鑑別を省略した。

### 3. 結果

#### 3.1 簡易検査キットの開発

我々が開発したフィルターデバイスを用いる FISHFC<sup>10)</sup> において、一層の簡易化を図るため、吸引濾過工程等の省略化を検討し、簡易検査キットを開発した(図1)。簡易検査キットは、プラスチック小シャーレ(直径約55mm)内部にろ紙(直径50mm円盤状に加工。定性用 No.2アドバンテック社)5枚を置き、その上に前記フィルターデバイスを置き、試作したキャップを置くものとした。簡易キットの使用の際は、キャップを外し、フィルターデバイスのフィルター全面に、食品試料懸濁液1mlと液体培地1mlを混合し全量を注ぎ、キャップを被せた。これを恒温器に入れ、数時間置いた。この間に、混合液はフィルター下のろ紙に浸透し培養基材となり、フィルターデバイス上面にマイクロコロニーが形成された。簡易検査キットにより、吸引ろ過工程が省略され、また、FISH工程は一貫して、簡易キットで実施するものとした。

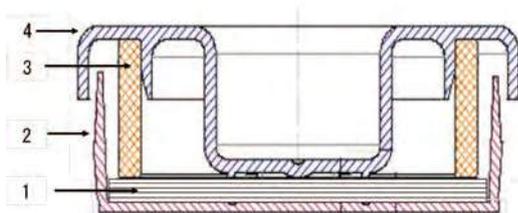


図1 簡易検査キット

上：外観(左 小シャーレ、ろ紙5枚、フィルターデバイス 右 キャップ)、下：断面図(1ろ紙5枚、2小シャーレ、3フィルターデバイス、4キャップ)

#### 3.2 マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 装置の開発

前述の通り、FISHFC 法は蛍光ノイズを有する緑黄色野菜には適用できなかった<sup>19)</sup>。そこで、緑黄色野菜等の食品に適用可能で、蛍光シグナルを蛍光ノイズと弁別して計測する方法を検討した。プローブ標識に用いる蛍光物質と食品の自家蛍光特性を比較した結果、蛍光物質の最大蛍光の得られる励起光と蛍光の波長領域は狭い範囲であるが、各食品の自家蛍光においては、それら領域は広い範囲に及び、蛍光物質と食品の蛍光スペクトルの特徴は異なることを見出した(データ示さず)。

そこで、検出対象細菌を含む食品試料の FISHFC のスペクトル分析として、FISHFC 標本をカラー撮影しその撮像について色相と明度を指標とするシグナルとノイズの弁別手法を検討した。モデルケースとして、DNA プローブは Alexa fluor488、TAMRA または Cy5 で標識した腸内細菌科菌群検出用 Ent D を用いた。供試細菌は大腸菌とした。食品試料は3色ミックス野菜(インゲン、トウモロコシ、ニンジン)、メンチカツ、またはひらめを用い、各食品試料は、大腸菌を添加した(シグナルとノイズを含む)あるいは、添加しない(ノイズのみ含む)2つの区分を設けた。食品試料に対して FISHFC を行い、ハロゲンランプを光源として第1(励起波長465-495 nm、蛍光波長515 nm 以上)、第2(励起波長515-540 nm、蛍光波長565nm 以上)、または、第3(励起波長 590-650nm、蛍光波長660nm 以上)の蛍光検出光学条件にて FISHFC 標本をカラー撮影し、各標本の撮影画像の輝点(大きさ20-150 μm)の色相と明度を測定しシグナルとノイズの弁別条件を検討した。

始めに、第1の蛍光検出光学条件で検討した。この条件で最大蛍光を示す Alexa fluor488 で標識した Ent D を用いた。検討の結果、ノイズと異なる Alexafluor488 のシグナルを特徴する色相と明度を見出した。具体的には、色相範囲：H64-H98、明度：V120以上だった。大腸菌添加3色ミックス野菜試料の FISHFC 画像の測定結果を図2に示した。

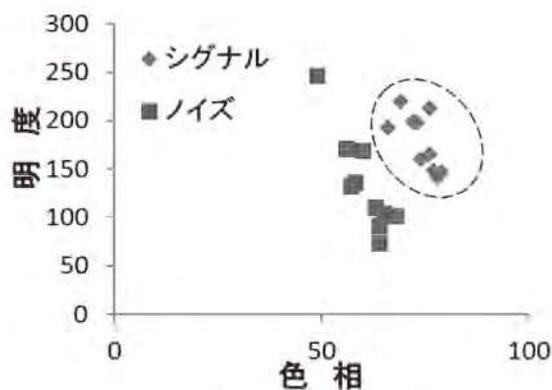


図2 第1の蛍光検出光学条件(励起波長465-495 nm、蛍光波長515 nm 以上)における FISHFC シグナルとノイズの分布

使用プローブ：Alexafluor488標識 Ent D、試料：大腸菌添加3色ミックス野菜

次に、第2の蛍光検出光学条件で検討した。この条件で最大蛍光を示す TAMRA で標識した腸内細菌科 DNA プローブを用いた。検討の結果ノイズと異なり TAMRA のシグナルを特徴する色相と明度を見出した。具体的には、色相範囲：H44-H54、明度：V150以上及び色相範囲：H54-H74、明度：V100以上だった。大腸菌添加3色ミックス野菜試料の FISHFC 画像の測定結果を図3に示した。

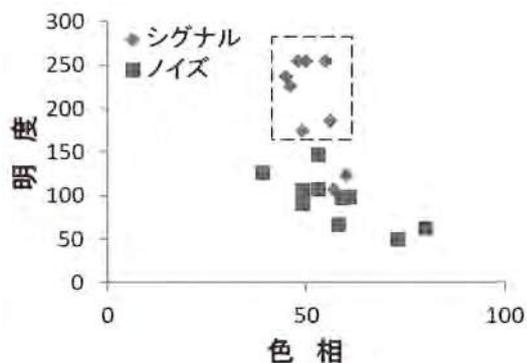


図3 第2の蛍光検出光学条件(励起波長 590-650nm、蛍光波長660nm 以上)における FISHFC シグナルとノイズの分布

使用プローブ：TAMRA 標識 Ent D、試料：大腸菌添加3色ミックス野菜

最後に、第3の蛍光検出光学条件で検討した。この条件で最大蛍光を示す Cy5で標識した腸内細菌科 DNA プローブを用いた。検討の結果、ノイズと異なり Cy5のシグナルを特徴する色相と明度を見出した。具体的には、色相範囲：

H340-H360、明度：V80以上、及び、色相範囲：H0-H20、明度：V80以上だった。大腸菌添加3色ミックス野菜試料の FISHFC 画像の測定結果を図4に示した。

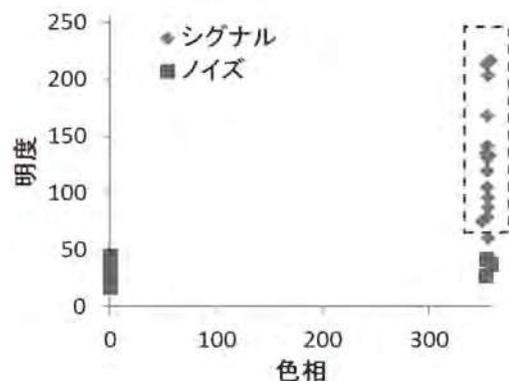


図4 第3の蛍光検出光学条件励起波長 590-650nm、蛍光波長660nm 以上)における FISHFC シグナルとノイズの分布

使用プローブ：Cy5標識 EntD、試料：大腸菌添加3色ミックス野菜

以上より蛍光シグナルを自動検出する励起・蛍光条件として3つの領域が利用可能となり、原理上、マルチ蛍光スペクトル分析による3菌種同時計測が可能となった。次に、これらの結果を基にマルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 装置を試作した(図5)。

マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 装置の概要を以下に記した。

撮影条件(光源強度、ISO、露出、シャッター速度)は、モニター画面から選択入力できる。撮影範囲は、低倍率光学系を用いる事でフィルターデバイス全面(直径47mm)の蛍光画像を1回の撮影で取得できる。カラー撮像素子で撮像する事でシグナル蛍光と自家蛍光などのノイズ成分を色相および明度で自動判別が可能である。

試料ステージ：固定式とした。撮像範囲がフィルターデバイス全面に及ぶので移動式は不要。  
励起光照射方式：光源装置(ハロゲンランプ)からの光を励起光波長選択用の光学フィルターに通した後、ライトガイドを經由し試料ステージ上の試料に対し、励起光を照射する。  
光学フィルター切りかえ装置：使用する標識蛍光物質に合わせ、第1、第2及び第3蛍光検出条件の選択は、励起光波長用光学フィルターと、

蛍光検出部の前段にある蛍光波長用光学フィルターを連動して自動的に切り替えることができる。これらの選択はモニター画面から容易に切り替えできる。

蛍光検出部：デジタルカラーカメラ（CCD 素子サイズ35.9×24.0mm）

画像処理部：蛍光検出部で撮像された蛍光カラー画像に対して色相・明度を基にした画像処理判別を行い、判別結果をモニターへ表示する。また、制御基板への制御命令も行う。

モニター：画像処理部の処理結果の表示を行い、装置の操作状況などの表示も行う。

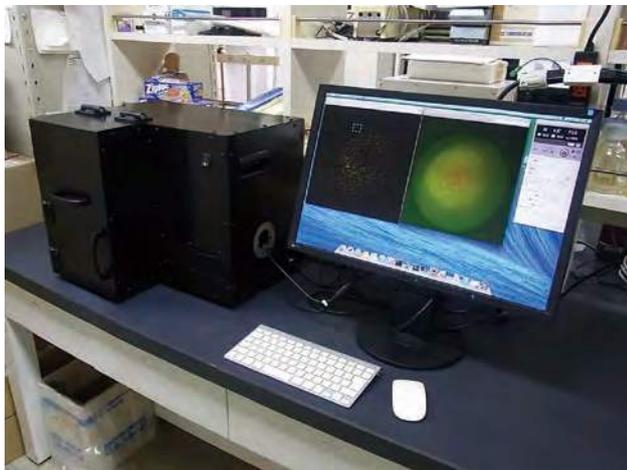


図5 マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 装置の試作機

### 3.3 マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによる細菌検査の開発

前記の簡易検査キットと装置を組み合わせマルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムとし、同システムによる各種細菌の検査手法を開発し、プロトコルを以下の通りとした。

#### (1) リステリア検査（測定時間：22.6時間）

食品試料懸濁液1ml（食品0.1g 以下含有）を1mlの2×SEL（塩化リチウム含有）と混和し、これを簡易検査キットのフィルターデバイスに添加する。キャップを被せ35℃に20時間培養して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。次にフィルターデバイスを、キャップ装着のまま持ち上げ、小シャーレ内のろ紙にエタノール 2ml 添加し、フィルターデバイスを簡易検査キットに戻して20分静置しコロニーの固定

と殺菌を同時に行う。次にフィルターデバイスを乾燥させる。デバイスを新たな小シャーレの下皿に置き、溶菌酵素溶液1.5ml をデバイスに添加しFC キャップを装着する。46℃60分反応させた後、溶菌酵素溶液を排出する。続いて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 とリステリア検出プローブとして10μM 蛍光標識 mRL-2 10μl を添加しキャップを装着し、46℃60分反応させる。ハイブリダイゼーションバッファ排出し、46℃にした洗浄液（0.01%ドデシル硫酸ナトリウム [SDS]、180mM 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]）10ml を加え46℃15分置く。洗浄液排出した後蒸留水で濯ぎ乾燥後、マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 装置に供し菌数計測する。

#### (2) 黄色ブドウ球菌検査（測定時間：22.6時間）

手法はリステリア計数法と同様とする。但しプローブは黄色ブドウ球菌検出用プローブ10μM TA 蛍光標識 STA68を 10μl を用いた。

#### (3) サルモネラ検査（測定時間：8.6時間）

食品試料懸濁液1ml（食品0.1g 以下含有）を1mlの2×SEL（胆汁酸塩含有）と混和し、これを簡易検査キットのフィルターデバイスに添加する。キャップを被せ35℃に7時間培養して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。次にフィルターデバイスを、キャップ装着のまま、持ち上げ、小シャーレ内のろ紙にエタノール 2ml 添加し、フィルターデバイスを簡易検査キットに戻して20分静置しコロニーの固定と殺菌を同時に行う。次にフィルターデバイスを乾燥させる。デバイスを新たな小シャーレの下皿に置き、ハイブリダイゼーションバッファ（30%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]）1.5ml ならびにサルモネラ検出用プローブ（10μM 蛍光標識 SAL343）5μl および10μM ヘルパープローブ（SalH260-280ATTCAGGCTGTGGGCTCCTCC、SalH301-320TCGCGCGCCTTTCCAGACGC、Sal H281-300TTCCACTAACACACATGCTG、Sal H321-

342TGTACGGGGCTGTCACCCTGTA、SalH365-383GTCCCGCCCTACTCATCGA) 各5  $\mu$ lを添加する。フィルターデバイスにキャップを被せ46°C 60分反応させる。ハイブリダイゼーションバッファを排出し、46°Cの洗浄液(0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、180mM塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]) 10mlを加え46°C 15分置く。洗浄液を排出した後、蒸留水で濯ぎ乾燥後、マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 装置に供し菌数計測する。

尚、ヘルパープローブは次のように設計した。*Salmonella enterica* の23S rDNA 塩基配列情報をコンピューターシミュレーションプログラム(Web Servers for RNA Secondary Structure Prediction : <http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/index.html>) に供しサルモネラ23S rRNA 2次構造モデルを作成し、作成モデルにおいて蛍光標識 SAL343のターゲット領域周辺部に配置されるようにヘルパープローブを設計した。蛍光標識 SAL343単独使用で FISH を行った場合は、シグナル強度が弱く自動計測が困難だったが、ヘルパープローブの併用により、シグナル強度が強くなり自動計測が可能となった(データー示さず)。

#### (4) 大腸菌検査(測定時間: 7.9時間)

サルモネラ計数と同様に行う。但しプローブは、大腸菌検出用プローブ(10  $\mu$ M 蛍光標識 ECO636) 5  $\mu$ l および10  $\mu$ M ヘルパープローブ(H657(-4) CTACCCCCCTCTAC、H621(-2) ATGCAGTTCCCAGGTT、H603 GAGCCCGGGGATTTCACA、H585 TCTGACTTAACAAACC GC)) 5  $\mu$ lを用いる。また、培養時間を6.5時間、ハイブリダイゼーション時間を45分とする。

尚、ヘルパープローブは次のように設計した。Fucks の報告<sup>20)</sup>に記載された大腸菌16SrRNA 2次構造モデルにおいて蛍光標識 ECO636のターゲット領域周辺部に配置されるようにヘルパープローブを設計した。蛍光標識 ECO636単独使用で FISH を行った場合は、シグナル強度が弱く自動計測が困難だったが、ヘルパープローブの併用により、シグナル強度が強くなり自動計測が可能となった(データー示さず)。

#### (5) 腸内細菌科検査(測定時間: 7.9時間)

サルモネラ計数と同様に行う。但しハイブリダイゼーションバッファは次の組成とする(20%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])。また、プローブは、腸内細菌科検出用プローブ(10  $\mu$ M 蛍光標識 Ent D) 5  $\mu$ lを用いる。培養、ハイブリダイゼーションの時間は、それぞれ6.5時間、45分とする。

#### (6) 腸炎ビブリオ検査(測定時間: 17.6時間)

食品試料懸濁液1ml(食品0.1g以下含有)を1mlの2×2% NaCl 添加 TSB と混和し、これを簡易検査キットのフィルターデバイスに添加する。キャップを被せ35°Cに16時間培養して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。次にフィルターデバイスを、キャップ装着のまま、持ち上げ、小シャーレ内のろ紙にエタノール 2ml 添加し、フィルターデバイスを簡易検査キットに戻して20分静置しコロニーの固定と殺菌を同時に行う。次にフィルターデバイスを乾燥させる。デバイスを新たな小シャーレの下皿に置き、ハイブリダイゼーションバッファ(NaCl 0.9M、Tris-HCl (pH7.4) 20mM、SDS 0.01%、formamide 30%) 1.5ml ならびに腸炎ビブリオ検出用プローブ(10  $\mu$ M 蛍光標識 VP1253) 5  $\mu$ l、ヘルパープローブ10  $\mu$ M (VP H 1238-1252 TCTGTAT GCGCCATT、VP H 1275-1298 ACGACGCAC TTTTGGGATTCGCT、VP H 953-969 TTAAACCACATGCTCCA、VP H 1226-1237 GTAGCACGTGTG、VP H 1299-1318 TGCAGACT CCAATCCGGACT、VP H 1322-1341 ATTCC GACTTCATGGAGTCG) 各5  $\mu$ l ずつ) を添加する。キャップを装着し46°C 60分反応させる。ハイブリダイゼーションバッファを排出し、46°Cの洗浄液(0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、112mM塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]) 10mlを加え46°C 15分置く。洗浄液を排出した後蒸留水で濯ぎ乾燥後、マルチ蛍光スペクトル分析 FISH FC 装置に供し菌数計測する。

尚、ヘルパープローブは次のように設計した。腸炎ビブリオ16SrDNA 塩基配列情報をコンピューターシミュレーションプログラム(前記)に供し腸炎ビブリオ16SrRNA 2次構造モデ

ルを作成した。モデルにおいて蛍光標識 VP1253 のターゲット領域周辺部に配置されるようにヘルパープローブを設計した。蛍光標識 VP1253 単独使用で FISH を行った場合は、シグナル強度が弱く自動計測が困難だったが、ヘルパープローブの併用により、シグナル強度が強くなり自動計測が可能となった（データ示さず）。

### 3.4 マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによる細菌検査の信頼性評価

作成したマルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 検査マニュアル(腸内細菌科、大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、リステリアと黄色ブドウ球菌)について信頼性評価を行った。食品試料に3色ミックス野菜、鶏ひき肉、ヒラメを用いた。比較対照に各種細菌用寒天平板計数を用いた。DNA プローブの標識蛍光物質は TAMRA を用いた。結果は次の通りだった。

腸内細菌科菌群検査においては、大腸菌を添加した3色ミックス野菜試料の測定では、開発システム計数値と培養計数法値の両者の相関が高く直線性があり傾きは1に近かった ( $y=0.9365x+0.296$ ,  $R^2=0.9359$ )。両者はよく一致し開発システムによる計数は正確だった(図6)。

大腸菌検査においては、大腸菌を添加した鶏挽肉試料の測定では、開発システム計数値と培養計数法値の両者の相関は高く直線性があり傾きは1に近かった ( $Y=1.1742x-0.8199$ ,  $R^2=0.971$ )。両者はよく一致し開発システムによる計数は正確だった(図7)。

サルモネラ検査においては、サルモネラを添加した3色ミックス野菜試料では、開発システム計数値と培養計数法値の両者の相関は高く直線性があり傾きは1に近かった ( $Y=1.1742x-0.8199$ ,  $R^2=0.971$ )。両者はよく一致し開発システムによる計数は正確だった(図8)。

腸炎ビブリオ検査においては、腸炎ビブリオを添加したヒラメ試料では、開発システム計数値と培養計数法値の両者の相関は高く直線性があり傾きは1に近かった ( $Y=0.9889x-0.051$ ,  $R^2=0.983$ )。両者はよく一致し開発システムによる計数は正確だった(図9)。

リステリア検査においては、リステリアを添加した3色ミックス野菜試料では、開発システム計

数値と培養計数法値の両者の間に相関は認められ、値がばらついたが直線性が認められ傾きは1に近かった ( $Y=1.0546X-0.6106$ ,  $R^2=0.680$ )。開発システムによる計数は概ね正確だった(図10)。

黄色ブドウ球菌検査においては、黄色ブドウ球菌を添加した3色ミックス野菜試料では、開発システム計数値と培養計数法値の両者の間に多少の相関は見られ ( $R^2=0.680$ )、直線性は弱いながら認められ傾きは1に近かった ( $Y=1.0546X-0.6106$ )。開発システムによる計数は概ね正確だったが、ばらつきがやや大きかった(図11)。

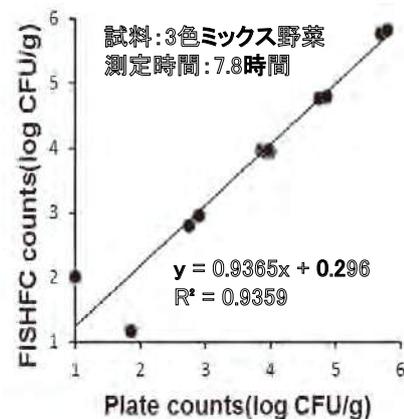


図6 開発システムによる腸内細菌科検査の信頼性評価

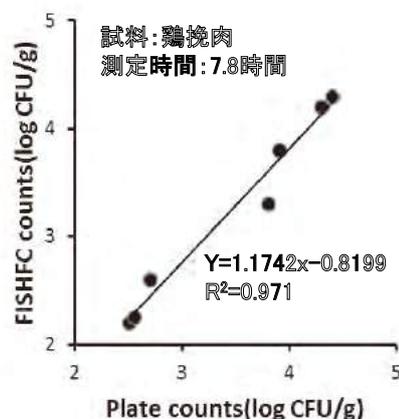


図7 開発システムによる大腸菌検査の信頼性評価

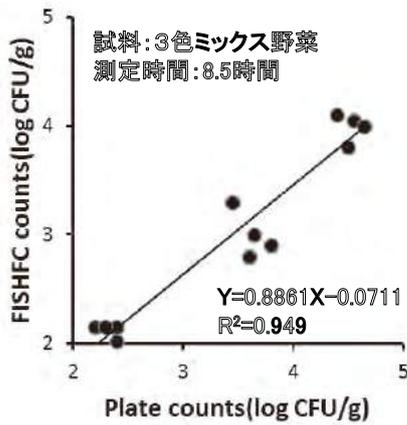


図8 開発システムによるサルモネラ検査の信頼性評価

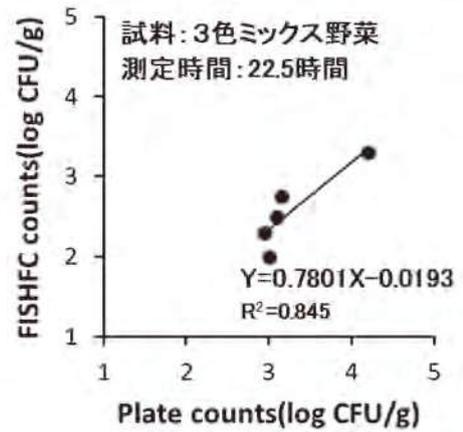


図11 開発システムによる黄色ブドウ球菌検査の信頼性評価

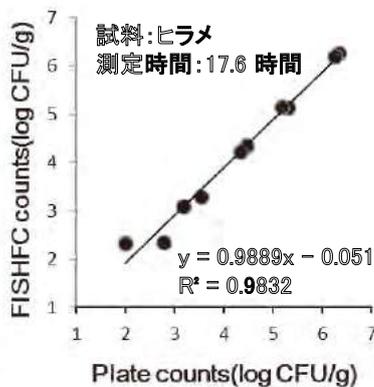


図9 開発システムによる腸炎ビブリオ検査の信頼性評価

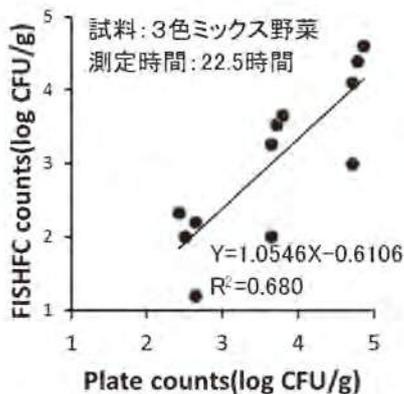


図10 開発システムによるリステリア検査の信頼性評価

#### 4. 考 察

食品現場に普及可能な迅速微生物検査システムの確立を目指し、簡易、迅速、正確で、さまざまな食品試料に適用可能なマルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムを開発した。本システムは簡易検査キットと、マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 装置からなり、測定対象細菌を腸内細菌科、大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、リステリアとした。蛍光シグナルを自動検出する励起・蛍光条件として第1(励起波長465-495 nm、蛍光波長515 nm 以上)、第2(励起波長515-540 nm、蛍光波長565nm 以上)、第3(励起波長 590-650nm、蛍光波長660nm 以上) の3つの領域が利用可能となり、これら領域で最大蛍光を示す物質(例えば、Alexafluor488、TAMRA、Cy5等)を標識したDNAプローブを用いてFISHFCを行うことで、原理上、マルチ蛍光検出による3菌種同時計測が可能となった。開発システムによる細菌検査の信頼性評価の結果、腸内細菌科(図6)、大腸菌(図7)、サルモネラ(図8)、腸炎ビブリオ(図9)を正確に測定したが、リステリア(図10)と黄色ブドウ球菌(図11)は計数値のばらつきが多少生じ改善が望まれた。そこで、開発システムの黄色ブドウ球菌、リステリアの測定の改善を図った。計数値のばらつきの原因は、FISH操作におけるマイクロコロニーの脱落と推定された。脱落防止として、FISHFCプロトコルに次の操作を加えた。食品試料液1mlと液体培地1mlの懸濁液を簡易検査キットに

添加した後キャップを被せ5分静置する。その後、キャップをはずす。フィルター上面に液の無いことを確認し、そのフィルター上面に50℃に保温した滅菌0.5%寒天溶液2mlをフィルター全面に広げ固化する。シャーレ上皿を被せ、培養を行う。後の操作は、プロトコールに準じる。以上のプロトコールの変更により、黄色ブドウ球菌、リステリアは計数値のばらつきが低下し、計数値の正確性が高まった(データ示さず)。マイクロコロニー形成培養前にフィルターデバイスを寒天皮膜で覆うことで、マイクロコロニーの脱落が抑えられ計数が向上したと推定した。以上により、開発システムは、検出限界値を10CFU/gとして食品中の前述6菌種の迅速測定に適用できる可能性が高まった。

次に、本開発システムの食品検査の普及に向け、有効な活用法について、日本の食品の微生物基準、食品の微生物リスク、並びに本システムの特徴を通して考察した。日本の食品の微生物基準は、食品衛生関連法規<sup>21)24)</sup>により定められ、乳製品、清涼飲料水、食肉製品、魚肉ねり製品、冷凍食品、弁当、漬物等の各食品において、大腸菌群、E.coli、腸内細菌科、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、リステリア等の基準がある。これら基準に記載の公定法のうち、検出限界値が10~100CFU/gのものがあるが、これらは陽性発生時に手間と時間がかかる<sup>6)</sup>。本開発システムによる細菌検査は、簡易、迅速、正確に実施でき、利便性があり、これら公定検査と代替して活用できる可能性が将来的にはあると考える。具体例を以下に示した。

大腸菌群検査：プロセスチーズ、アイスクリーム、練乳、粉乳、発酵乳、乳酸飲料、氷雪、ゆでだこ、冷凍食品(加熱後摂取冷凍食品(冷凍直前加熱以外)を除く)。以上の食品の大腸菌群基準の公定法はデゾキシコレート寒天平板法<sup>21)22)</sup>を用いるが、これら基準の検査を本開発システムによる腸内細菌科検菌群査に替える。大腸菌群と腸内細菌科菌群は同一の目的に用いられる衛生指標細菌であり、腸内細菌科菌群は、サルモネラリスクも評価できるので大腸菌群よりも優れており、ヨーロッパでは微生物基準として用いられている<sup>25)</sup>。また、大腸菌群検査と腸内細菌科菌群検査の結果はよく相関していると報告がある<sup>26)</sup>。よって本開

発システムによる腸内細菌科検菌群査に替えても齟齬はないと推定する。

E.coli検査：乾燥食肉製品、非加熱食肉製品、加熱後摂取冷凍食品(冷凍直前加熱以外)。以上の食品のE.coli基準の公定法はEC発酵管法によるが<sup>22)</sup>、これら基準の検査を本開発システムによる大腸菌検査と替える。E.coli検査は、必ずしも大腸菌のみを測定しているわけではないが糞便汚染の指標に用いられ、本開発システムによる大腸菌検査に替えても齟齬はないと推定する。

腸炎ビブリオ検査：生食用冷凍鮮魚介類、生食用冷凍鮮魚介類、一夜漬け。以上の食品の腸炎ビブリオ基準の公定法は腸炎ビブリオMPN法により実施されるが<sup>22)、24)</sup>、これら食品検査を本開発システムによる腸炎ビブリオ検査に替える。

黄色ブドウ球菌検査：食肉製品、弁当・惣菜。以上の食品の黄色ブドウ球菌基準の公定法は卵黄加マンニット食塩寒天平板法により実施されるが<sup>22)、23)</sup>、これら食品検査を本開発システムによる黄色ブドウ球菌検査に替える。

リステリア検査：非加熱食肉製品、ナチュラルチーズ。以上の食品のリステリア基準の公定法は酵素基質培養法により実施されるが<sup>21)22)</sup>、これら食品検査を本開発システムによるリステリア検査に替える。

一方、食品には、微生物基準のない食品があり、そのなかに微生物リスクを危惧されているものがある。燻製魚介類、ネギトロ、魚卵製品についてはリステリア・モノサイトゲネスの検出事例があり、食中毒リスクが懸念されている<sup>27)</sup>。これらを用いた惣菜・弁当では、黄色ブドウ球菌と並びリステリア検査の実施が望ましい。本開発システムは、これら食品のリステリアと黄色ブドウ球菌の検査を迅速、さらには、両菌を同時に測定できる可能性があり、有用性がある。次に、生食用野菜およびその加工品では、病原性大腸菌、サルモネラの食中毒菌のリスクが指摘されている<sup>28)</sup>。大腸菌、サルモネラの検査は、これら食品の微生物のリスク回避に有効と考えられる。本開発システムはこれら両菌を迅速に測定でき、さらには、同時に測定できる可能性があり、有用性がある。

## 謝 辞

本研究の主な成果は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業実用技術開発ステージ（農林水産省 平成25年～27年）の実施による。関係各位に深く感謝する。

## 引用文献

- 1) 食品と開発編集部: 食品と開発、39巻、1号 (2004)、P 19～28
- 2) 伊藤武、甲斐明美: モダンメディア、50巻、4号 (2004)、P 104～116
- 3) 飯塚登: 食品衛生検査の市場動向2002年版 (株) 矢野経済研究所、東京 (2002)
- 4) 2006食品検査市場 富士経済社
- 5) 大坪雅史、宮原則之、剣持美帆、澤辺智雄、山崎浩司、高橋信行、藤原里美、須貝保徳、荒磯恒久: 食品工業、49巻、20号 (2006)、P 46～53
- 6) 日本薬学会: 衛生試験法・注解2005、金原出版 (株)、東京 (2005)
- 7) 伊藤武: 食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった! (株) サイエンスフォーラム、東京 (2002)
- 8) R. I. Amann, W. Ludwig and K.-H. Schleifer: Microbiological Reviews、Vol. 59、No.1 (1995)、P 143～169
- 9) 宮原則之、大坪雅史、藤原里美、荒磯恒久、須貝保徳: 特許第4785449(2011)
- 10) 大坪雅史、山崎浩司、澤辺智雄、荒磯恒久、浜出雄一: 特許第4950433(2012)
- 11) M. Ootsubo M、T. Shimizu、R. Tanaka、T. Sawabe、K. Tajima、Y. Ezura: J. Appl. Microbiol.、Vol. 95、No. 6 (2003)、P 1182～1190
- 12) 大坪雅史、高瀬雅由、須貝保徳: 特許出願56271(2016)
- 13) M. Ootsubo M、T. Shimizu、R. Tanaka、T. Sawabe、K. Tajima、M. Yoshimizu、Y. Ezura、T. Ezaki and H. Oyaizu: J. Appl. Microbiol.、Vol.93、No.1、(2002)、P 60～68
- 14) 青井良平、清水茂雅、山崎浩司、澤辺智雄、川合祐史: 日食科工誌、58巻、10号 (2011)、P 483～489
- 15) S. Shimizu、R. Aoi、Y. Osanai、H. Kawai And K. Yamazaki: Food Sci. Tech. Res.、Vol.19、No. 1 (2013)、P 59～67
- 16) T. Sawabe、A. Yoshizawa、Y. Kawanishi、S. Komatsu(Takeda)、S. Nakagawa、T. Sawabe、M. Ohtsubo、M. Satomi、Y. Yano and K. Yamazaki: Microbes and Environments、Vol. 24、No.3 (2009)、P 259～264
- 17) I. Fuchizawa、S. Shimizu、M. Ootsubo、H. Kawai and K. Yamazaki: Microbes and Environments Vol. 24、No. 3 (2009)、P 273～275
- 18) 清水茂雅、久保沢洋介、松浦美里、川合祐史、山崎浩司: 日食微誌、28巻、1号 (2011)、P 29～36
- 19) 大坪雅史、高瀬雅由、須貝保徳: 特許出願56271 (2016)
- 20) B. M. Fuchs、F. O. Glöckner、J. Wulf and R. Amann: Appl. Environ. Microbiol.、Vol. 66、No. 8 (2000)、P3603～3607
- 21) 厚生労働省: 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令、昭和26年12月27日厚生省令第52号、平成26年厚生労働省令第142号
- 22) 厚生労働省: 食品、添加物等の規格基準、昭和34年12月28日厚生省告示第370号、平成26年厚生労働省告示第496号
- 23) 厚生労働省: 弁当及びそだいの衛生規範、昭和54年6月29日環食第161号、改正平成7年10月12日衛食第188号・衛乳第211号・衛化第119号
- 24) 厚生労働省: 漬物の衛生規範、昭和56年9月24日環食第214号、改正平成25年12月13日食安発1213第2号
- 25) 浅尾努: 日食微誌26巻、3号 (2009)、P163～167
- 26) J. Sato、H. Ohno and C. Matsui、Jpn. J. Food Microbiol.、Vol. 31、No. 2 (2014)、P 86～92
- 27) 社団法人畜産技術協会: 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書、内閣府食品安全委員会事務局平成21年度食品安全確保総合調査 (2009)
- 28) 稲津康弘: 食料その科学と技術、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所53巻 (2015)、P5～13