

7. 培養併用 FISH による迅速なサルモネラ検査法の開発

バイオテクノロジー科

企画事業部

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)

(財) 東京顕微鏡院

○大坪雅史、斉藤美帆、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

須貝保徳

小高秀正

伊藤武

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ことが問題とされている。そのため、食品製造業界から迅速な細菌検査が求められている。

厚生省の研究班では、「食品からの微生物検査標準法検討委員会」を設立し、国際的に通用する日本の微生物検査標準化法を確立するため、公定法を含めて検査手法を見直している。ここでは、標準法は培養法であることとし、各菌種において妥当な手法を検討している。また、同委員会は、標準法の確立による波及効果として次のことも考えている。標準法は、迅速微生物検査法を客観的に評価する尺度とすることができる。優れた手法と見なされた迅速検査法は、現場への導入が可能となり、より優れた迅速高感度な検出法開発の活性化が期待される。

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23年度の予測売り上げは、約172億円である。また、わが国の食品産業の年間売り上げは69.5兆円であり、その売り上げの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。食品検査費用の10%相当が細菌検査関連品の購入に当てられると695億円の市場規模と予想される。今後、迅速微生物検査法を客観的に評価する尺度が確立すれば、迅速細菌検査の市場性はさらに広がることが期待される。

2. 目的

我々は、都市エリア産学官連携促進事業（平成15～20年度）において、生きている特定微生物の迅速検査システムとして、rRNAを標的とするFISHFC法を開発し、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きた。これまでに、腸内細菌科、サルモネラ、カンピロバクター、緑膿菌、ウェルシュ菌、リステリア菌などの特異検出を検討し、さらに、これらを自動計測するための細菌検査装置を試作した。今後、これら開発システムを実用化するにあたっては、細菌検査標準法と同等の正確性と検出限界を兼ね備えること、迅速であること、さらには、簡単に操作でき、再現性や信頼性の高いことを実現させなければならない。

今回、実用化を目指した研究の一環として、検出限界を1CFU/25gとし、正確かつ簡易で、2日間で結果判定が可能な生肉のサルモネラ定性試験法として、FISHFCシステムを開発したので報告する。

3. 方法

3.1 試料調製

供試食品試料として函館市内スーパーマーケット市販の牛ひき肉を用いた。使用時まで-20℃にて冷凍保存した。サルモネラ菌株として *Salmonella* Typhimurium ATCC14028 を用いた。供試菌株の懸濁液を牛ひき肉25gに接種した。この時、ひき肉中のサルモネラ菌数を1～300 CFU/25gの範囲に調製しサルモネラ接種区とした。また、サルモネラ未接種の牛ひき肉を非接種区とした。

3.2 サルモネラの試料接種菌数の測定

牛ひき肉へ接種したサルモネラ希釈液の同量を酵素基質サルモネラ寒天平板に接種し、35℃、24時間培養後、出現した典型的コロニーを計数した。

3.3 FISHFCシステムによるサルモネラ測定

前記サルモネラ接種区と非接種区の牛ひき肉 25g の各々に、ペプトン緩衝液 (BPW) 225ml を加え、35℃、16 時間増菌培養した。BPW 培養液 10 μ l をトリプトソーヤブイヨン 50ml に懸濁し、その 5ml を開発試作した簡易検査キット (図 1 上) で吸引ろ過し、同デバイスをトリプトソーヤ寒天平板培地に置き、マイクロコロニーを形成させるために 42℃、5 時間貼付培養した。次に同キットを乾燥後、エタノールで 10 分間の細胞固定をし、同キットにサルモネラ検出用蛍光 DNA プロブを添加し 55℃で 45 分間反応させた。洗浄後同キットを、開発した FISHFC 蛍光計測装置 (図 1 下) に供し、蛍光マイクロコロニーを 3 分で計数した (検出限界標準法 1CFU/25g、測定時間 22 時間)。

3.4 培養法によるサルモネラ測定

食品からの微生物検査標準法検討委員会作成サルモネラ試験法案 NIHSJ-01-ST4 (標準法) を簡略化し、次の通り実施した。上記の牛ひき肉試料 25g の BPW 培養液を 24 時間まで培養を続けた。これを TT ブロスに 1ml 接種し培養した (42℃、24 時間)。同培養液を酵素基質サルモネラ寒天平板に画線塗抹培養した (35℃、24 時間)。出現したサルモネラの典型的コロニーを TSI、LIM に接種し 35℃、24 時間培養後、生化学性状等からサルモネラを同定した (検出限界 1CFU/25g、測定時間 5 日間)。

なお、本簡略化法は、本試料の測定において標準法と同等の結果となることを確認し、標準法として扱った。



図1 FISHFCシステム
上:簡易検査キット、
下:FISHFC 蛍光計測装置

4. 結果と考察

同一の牛ひき肉試料に対し FISHFC システムと培養法によるサルモネラ測定をくり返し行い、両結果を比較した (表 1)。サルモネラ接種区では、接種サルモネラ菌数は、3~250 CFU/25g だったが、培養法ではいずれも陽性を示し、FISHFC システムの計数値は 1000 以上だった。非接種区では、培養法は陰性を示し、FISHFC システムの計数値は 100 以下だった。ここで、FISHFC システムのサルモネラ判定基準値を 100 と設定した場合、接種区はすべて陽性、非接種区はすべて陰性となり、培養法の結果と完全に一致した。培養法は標準となる結果が得られるが、結果判定まで多くの手間と 5 日間の時間を要する。FISHFC システムは、サルモネラを正確に 22 時間で判定でき、さらに手間が少ない。以上から、FISHFC システムは、迅速、簡易なサルモネラ検査として応用できる可能性が高いと考えられた。

5. まとめ

サルモネラ定性試験用 FISHFC システムを開発した。本法は、標準法と同等の検出限界を有し、正確、迅速、簡易である。

今後、本システムによるサルモネラ測定について、第三者試験機関に客観的評価を依頼し、その結果を基に商品開発へ発展させたい。

表1 サルモネラの培養法と FISHFC システムによる測定

試料 (牛ひき肉)	試料接種 サルモネラ数 (CFU/25g)	培養法	FISHFCシステム		
			計数値	判定※	
サル モ ネ ラ 接 種 区	No.1	37	陽性	1254	陽性
	No.2	43	陽性	1013	陽性
	No.3	70	陽性	11664	陽性
	No.4	110	陽性	12487	陽性
	No.5	250	陽性	2863	陽性
	No.6	60	陽性	2323	陽性
	No.7	210	陽性	3325	陽性
	No.8	14	陽性	3492	陽性
	No.9	14	陽性	6296	陽性
	No.10	6	陽性	3220	陽性
	No.11	215	陽性	17012	陽性
	No.12	3	陽性	14341	陽性
	No.13	5	陽性	1210	陽性
非 接 種 区	No.14	測定せず	陰性	55	陰性
	No.15	測定せず	陰性	7	陰性
	No.16	測定せず	陰性	11	陰性
	No.17	測定せず	陰性	16	陰性
	No.18	測定せず	陰性	2	陰性
	No.19	測定せず	陰性	6	陰性
	No.20	測定せず	陰性	20	陰性
	No.21	測定せず	陰性	2	陰性
	No.22	測定せず	陰性	11	陰性
	No.23	測定せず	陰性	14	陰性

※判定基準値:100