

## 2. FISHFC 法による迅速細菌検査システムの開発と

### 食の安全保障への応用

食産業技術支援グループ	○大坪雅史、平井絵梨、清水健志
応用技術支援グループ	高村巧
(株) 電制	須貝保徳、原 潤海、高瀬雅由、伊藤洋輔
日本細菌検査 (株)	竹本方泰、戸ヶ崎恵一、李鎮熙
(一社) 北海道食品産業協議会	田中富重、岡田迪徳、長尾直子
北海道大学大学院水産科学研究所	山崎浩司

#### 1. はじめに

食の高付加価値化の取り組みにおいて、おいしさ、高品質、機能性は重要な検討項目であるが、食の安全もまた、その項目に挙げられる。国内では、毎年、数百件の食中毒事故が発生し、とりわけ食中毒細菌を起因とするものが過半数を占める。我が国の食品衛生関連法規では、食品の危害リスク低減化のため、各種の食品群について微生物の規格と微生物検査法（公定法）が定められている。水産物においては、生食用鮮魚介類、生食用冷凍鮮魚介類、生食用かき、魚肉練り製品、ゆでだこ、ゆでがに等で、腸炎ビブリオ、大腸菌群、大腸菌、または、一般細菌について規格と検査法が定められている。一方、我が国の食品微生物検査公定法は、国際間の協調性や信頼性の点で見直しされ、標準法の検討がされている。また、公定法や標準法は、培養法に基づくが、多大の時間と手間がかかり、食品製造業からは迅速、簡易な微生物検査法が求められている。今日、様々な迅速微生物検査法が開発されてきた。市販の検査製品は様々な検出法に基づくが、選択培養法、免疫反応法、遺伝子工学法に大別される。食品製造現場のニーズは、迅速、簡易、正確、低コスト等が挙げられるが、既存の迅速微生物検査製品は、すべての現場ニーズを満たすものではなく、食品製造現場にあまり普及していない。

#### 2. 迅速細菌検査システムの開発と水産物の微生物リスク管理への応用

我々は、食品製造現場に普及可能な迅速微生物検査法の確立を目指し、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）システムの開発を行った<sup>1-5)</sup>。本システムは、16SrRNAを標的とし特定微生物を検出する蛍光標識 DNA プローブを用いて検査対象微生物を蛍光検出し測定する。これまでに腸炎ビブリオ<sup>2)</sup>や腸内細菌科菌群<sup>3)</sup>等、各菌種特異検出プローブを開発した。測定手順は、食品試料乳剤を試作デバイス（メンブレンフィルターを合成樹脂リングに貼り合わせ）<sup>4)</sup>で吸引ろ過し、同デバイスを寒天培地上に置き、マイクロコロニー形成のための培養を数時間行う。次にデバイスをエタノールに浸しマイクロコロニーを固定する。デバイスを乾燥後、検出対象細菌用蛍光標識 DNA プローブと反応させる。洗浄乾燥後、デバイスのフィルター上の蛍光シグナルを有するマイクロコロニーを蛍光信号検出試作装置<sup>5)</sup>で測定する。検出限界は食品試料乳剤のデバイス濾過量に依存し、固形食品の場合 1-10 CFU/g である。測定時間は、腸炎ビブリオで約 6 時間である。本システムの水産物リスク管理への応用について紹介する。生食用冷凍鮮魚介類は、腸炎ビブリオ数の基準があるが、その腸炎

ビブリオ定量検査への適用を検討した。冷凍マグロ刺身の腸炎ビブリオ接種区および非接種区の試料を調製し、腸炎ビブリオ計数を標準法および腸炎ビブリオ検出プローブ (VP1253)<sup>2)</sup>を用いる FISHFC システムにより実施した。その結果、いずれの試料区においても両手法の値は同等だった(表 1)。このことから、FISHFC システムは、生食用冷凍鮮魚介類の腸炎ビブリオ基準の迅速判定に応用できる可能性がある。また、腸内細菌科菌群を測定する FISHFC システムは、魚肉練り製品の大腸菌群基準の迅速判定に応用できる可能性を見出した(表 2)。以上より、FISHFC システムは、水産物のリスク管理に応用できる可能性がある。

### 3. FISHFC システムの商品化に向けて

FISHFC システムは、水産物の他に食肉製品や乳製品に適用できるが、緑黄色野菜には蛍光ノイズとなる色素が含まれ、これら野菜や惣菜には適用できない。本システムを製品化するためには、これらへの適用性が不可欠で、大きな課題となる。また、FISHFC システムの測定手順は、まだ工程数が多く、一層の簡易化が必要である。平成 25 年度農林水産省研究事業(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平成 25 年～27 年)において「マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC による食品衛生細菌迅速一括検査システムの商品モデル開発」の研究課題が採択された。この事業では、これら課題を解決して、現場ニーズを満たす商品モデルシステム開発を行うとともに食の安全保障への応用を目指している。

### 文献

- 1) Ootsubo M, Shimizu T, Tanaka R, Sawabe T, Tajima K, Ezura Y. Seven-h fluorescence in situ hybridization technique for enumeration of Enterobacteriaceae in food and environmental water sample. J. Appl. Microbiol. 2003; 95: 1182-1190.
- 2) Sawabe T, Yoshizawa A, Kawanishi Y, Komatsu-Takeda E, Nakagawa S, Sawabe T, Ootsubo M, Satomi M, Yano Y, Yamazaki K, Multi-probe-fluorescence in situ hybridization for the rapid enumeration of viable *Vibrio parahaemolyticus*. Microbes Environ. 2009; 24: 259-264.
- 3) 腸内細菌検出用オリゴヌクレチド及び腸内細菌の検出方法. 特許第 4427806 号, 2009.
- 4) 簡易迅速培養併用インサイチューハイブリダイゼーション法. 特許第 4950433 号, 2012.
- 5) 培養併用インサイチューハイブリダイゼーション法による食品の微生物検査法. 特許第 4785449 号, 2011.

表1 生食用冷凍鮮魚介類のFISHFCシステムと標準法による腸炎ビブリオ計数

試料		FISHFC (CFU/g) 約6時間	標準法 5日間			
No.	区分		MPN /g	95%信頼区間		FISHFCとの一致
1	腸炎 ビブリオ 添加区	880	460	71	2400	○
2		950	1,100	150	4800	○
3		320	460	71	2400	○
4		490	460	71	2400	○
5		160	460	71	2400	○
6	非 添加区	<10	<3			○
7		<10	<3			○
8		<10	<3			○
9		<10	<3			○

試料: 冷凍マグロ刺身

表2 魚肉練り製品における腸内細菌科菌群および大腸菌群測定

試料		添加菌数 CFU/g	腸内細菌科菌群		大腸菌群 標準法 2~4日間
No.	区分		FISHFCシステム 約7時間	標準法変法 3~5日間	
1	大腸菌 添加区	60	陽性	陽性	陽性
2		30	陽性	陽性	陽性
3		5	陽性	陽性	陽性
4		2	陽性	陽性	陽性
5	非 添加区	無	陰性	陰性	陰性
6		無	陰性	陰性	陰性
7		無	陰性	陰性	陰性
8		無	陰性	陰性	陰性

試料: かまぼこ